

Université de Montréal

Impact de la rigidité artérielle sur le cerveau et effets bénéfiques potentiels de l'œstradiol et de la vitamine K

Par
Gervais Muhire
Département de Pharmacologie et Physiologie
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine en vue de l'obtention du grade de
Philosophiae Doctor (Ph.D.)
en pharmacologie

Janvier 2019
© Gervais Muhire, 2019
Université de Montréal

Faculté des études supérieures et postdoctorales

La thèse intitulée:

Impact de la rigidité artérielle sur le cerveau et effet
bénéfiques potentiels de l'œstradiol et de la vitamine K

Présentée par: Gervais Muhire

a été évaluée par le jury suivant:

Dre Hélène Girouard: directrice de recherche
Dre Guylaine Ferland: co-directrice de recherche
Dr Réjean Couture: président -rapporteur
Dr Éric Thorin: membre du jury
Dre Stéphanie Lehoux: examinatrice externe

Résumé

Les études épidémiologiques ont associé la rigidité artérielle au déclin cognitif et à la démence. Cependant ses effets sur la biologie du cerveau restent méconnus. Dans notre première étude, en utilisant un nouveau modèle murin de rigidité artérielle, nous avons voulu caractériser les effets de la rigidité artérielle sur le cerveau indépendamment de l'âge et de l'augmentation de la pression artérielle. Les résultats indiquent que la rigidité artérielle altère la régulation du flux sanguin cérébral et l'intégrité du système vasculaire cérébral, endommageant la barrière hémato-encéphalique et conduisant à des déficits cognitifs. Le débit sanguin cérébral est altéré au repos ainsi qu'au niveau de ses mécanismes de régulation comme l'autorégulation cérébrale, le couplage neurovasculaire et la fonction endothéliale.

Dans notre deuxième étude nous avons cherché à comprendre le dimorphisme sexuel pour la rigidité artérielle et ses conséquences sur le cerveau dans le même modèle. Nos résultats montrent que la rigidité artérielle entraîne une altération du couplage neurovasculaire et de la réactivité vasculaire dépendante de l'endothélium chez les souris mâles mais pas chez les souris femelles reproductives. Chez les souris ovariectomisées, cette protection a été supprimée, mais a été restaurée par un traitement à l'œstradiol.

Dans la troisième étude, nous avons voulu étudier la possibilité de prévenir la rigidité artérielle et ses effets subséquents sur le cerveau. Pour cette étude, nous avons utilisé la vitamine K (VK) (phylloquinone ou VK₁ et la ménaquinone-4 ou MK-4) vu son action anti-calcifiante et ses effets bénéfiques sur les fonctions cognitives observés dans d'autres modèles animaux et chez l'homme. Cette étude a démontré que la VK améliore les fonctions cognitives et rétablit le débit sanguin cérébral au repos et diminue la calcification vasculaire. Les capacités d'apprentissage s'amplifient avec l'apport de la VK alimentaire et la concentration de la VK au cerveau.

Ces études permettent une meilleure compréhension de la rigidité artérielle et démontrent le potentiel de la VK et le traitement hormonal par l'œstradiol dans la prévention de ses effets sur le cerveau. Cependant, d'autres études sont nécessaires pour déterminer tous les mécanismes impliqués dans la protection du cerveau par la VK et l'œstradiol.

Mots clés: rigidité artérielle, fonctions cognitives, débit sanguin cérébral, œstradiol, VK

Abstract

Epidemiological studies have associated arterial stiffness with cognitive decline and dementia. However, its effects on the brain biology remain unknown. In our first study, using a new murine model of arterial stiffness, we wanted to characterize the effects of arterial stiffness on the brain independently of age and pressure. Our results indicate that arterial stiffness impairs the regulation of cerebral blood flow and the integrity of the cerebrovascular system, damaging the blood-brain barrier and leading to cognitive deficits. Arterial stiffness results in significant alterations in resting cerebral blood flow and mechanisms regulating cerebral blood flow such as cerebral autoregulation, neurovascular coupling, and endothelial function.

In our second study we sought to understand sexual dimorphism in arterial stiffness and its consequences on the brain in the same model. Our results show that arterial stiffness leads to impaired neurovascular coupling and endothelial-dependent vascular reactivity in male mice but not in female reproductive mice. In ovariectomized mice this protection was suppressed but was restored by estradiol treatment.

In the third study, we wanted to study the possibility of preventing arterial stiffness and its subsequent effects on the brain. In this study, we used vitamin K (phylloquinone or VK1 and menaquinone-4 or MK-4) for its anti-calcifying action and its beneficial effects on the cognitive functions observed in other animal models and in humans. This study demonstrated that VK prevent cognitive impairment in part by restoring the resting cerebral blood flow but also by preventing vascular calcification. Learning abilities increase with the contribution of food VK, which in turn correlates with the VK content of the brain.

These studies provide a better understanding of arterial stiffness and demonstrate the potential of VK and hormone therapy with estradiol in preventing its effects on the brain. However,

further studies are needed to determine all the mechanisms involved in the brain protection by VK and estradiol.

Key words: arterial stiffness, cognitive function, cerebral blood flow, estradiol, VK

PREMIERE PARTIE: INTRODUCTION	1
1 RIGIDITE ARTERIELLE	1
1.1 Introduction	1
1.2 Composantes de la paroi vasculaire	2
1.3 Régulation du tonus vasculaire.....	3
1.3.1 <i>Contrainte de cisaillement</i>	4
1.3.2 <i>Mécanisme myogénique</i>	4
1.3.3 <i>Régulation endothéliale</i>	5
1.3.3.1 <i>Monoxyde d'azote (NO)</i>	6
1.3.3.2 <i>Prostacycline (PGI2)</i>	7
1.3.3.3 <i>Facteurs hyperpolarisants dérivés de l'endothélium (EDHFs)</i>	7
1.3.3.4 <i>Adénosine</i>	7
1.3.3.5 <i>Endothélines (ET)</i>	8
1.3.3.6 <i>Thromboxane (TXA2)</i>	9
1.3.3.7 <i>20-HETE</i>	9
1.3.3.8 <i>Espèces réactives de l'oxygène (ROS)</i>	10
1.4 Changements vasculaires associés à la rigidité artérielle	11
1.4.1 <i>Changements structurels et mécaniques</i>	11
1.4.2 <i>Calcification artérielle</i>	13
1.4.3 <i>Inflammation</i>	14
1.4.4 <i>Fonction endothéliale</i>	15
1.5 Mesure de la rigidité artérielle	17
2 RIGIDITE ARTERIELLE ET CERVEAU	20
2.1 Caractéristiques de la circulation cérébrale.....	20
2.1.1 <i>Autorégulation</i>	21
2.1.2 <i>Couplage neurovasculaire</i>	23
2.1.2.1 <i>Neurones</i>	23
2.1.2.2 <i>Astrocytes</i>	24
2.1.2.3 <i>Cellules musculaires lisses vasculaires</i>	25
2.1.2.4 <i>Cellules endothéliales</i>	26
2.1.2.5 <i>Péricytes</i>	26
2.2 Effets de la rigidité artérielle sur le cerveau.....	28
2.2.1 <i>Rigidité artérielle et maladie des microvaisseaux</i>	28
2.2.2 <i>Rigidité artérielle et accident vasculaire cérébral (AVC)</i>	29
2.2.3 <i>Rigidité artérielle et fonctions cognitives</i>	30
3 MODÈLES ANIMAUX DE RIGIDITÉ ARTÉRIELLE	33
3.1 Modèles spontanés	33
3.2 Modèles chirurgicaux	35
3.3 Modèles génétiques	36
3.4 Modèles chimiques.....	38
4 RIGIDITÉ ARTÉRIELLE ET DIFFÉRENCES SEXUELLES	39
4.1 En périphérie	39
4.2 Au cerveau.....	43
5 TRAITEMENTS POSSIBLES POUR LA RIGIDITÉ ARTÉRIELLE	46
5.1 Les bisphosphonates	46
5.2 Les statines	46

5.3	Les antihypertenseurs	48
5.4	Les oestrogènes	49
5.5	La supplémentation	51
5.6	L'effet de l'exercice physique sur la rigidité artérielle	52
6	LA VITAMINE K (VK)	54
6.1	Structure de la VK.....	55
6.2	Cycle de la VK	55
6.3	Rôle des protéines VK dépendantes (VKDP) dans le système cardiovasculaire	58
6.3.1	<i>Protéine gla de la matrice (Matrix Gla Protein; MGP)</i>	<i>58</i>
6.3.2	<i>La protéine du gène 6 spécifique d'arrêt de croissance (Gas6)</i>	<i>59</i>
6.3.3	<i>Protéine S (PS)</i>	<i>60</i>
6.3.4	<i>Protéine riche en Gla (Gla rich protein; GRP)</i>	<i>61</i>
6.4	VK et cerveau.....	62
6.4.1	<i>Les protéines VK dépendantes (VKDP)</i>	<i>62</i>
6.4.2	<i>Biosynthèse des Sphingolipides</i>	<i>63</i>
6.4.3	<i>VK et fonctions cognitives</i>	<i>64</i>
6.4.4	<i>Autres actions potentielles de la VK.....</i>	<i>65</i>
7	OBJECTIFS	66
8	HYPOTHÈSES	67
	DEUXIEME PARTIE : PUBLICATIONS	68
	Étude 1: La rigidité artérielle causée par la calcification de la carotide perturbe la régulation du flux sanguin cérébral et conduit au déficit cognitif.....	68
	Résumé.....	68
	Étude 2: Les femelles sont protégées contre les dysfonctions neurovasculaires induites par la rigidité artérielle chez la souris	70
	Résumé.....	70
	Females are protected from neurovascular dysfunction induced by arterial stiffness in mice.....	72
	Abstract	72
	Introduction	74
	Material and methods.....	75
	Results	79
	Discussion	81
	Conclusion and perspectives	84
	Étude 3: La VK prévient les troubles cognitifs associés à la rigidité artérielle dans un modèle murin de calcification artérielle.....	95
	Résumé.....	95
	VK prevents cognitive impairment associated with arterial stiffness in a murine model of arterial calcification	97
	Abstract	97
	Introduction	99
	Material and methods.....	101

Results	106
Discussion	108
Conclusion and perspectives	112
TROISIEME PARTIE: DISCUSSION	124
CONCLUSION.....	133
LIMITES DE L'ÉTUDE	134
PERSPECTIVES.....	134

Listes des figures

Figure 1: Composantes de la paroi vasculaire.....	3
Figure 2: Mécanisme d'autorégulation cérébrale.....	22
Figure 3: Composantes de l'unité neurovasculaire	27
Figure 4: Cycle de la Vitamine K.....	57

Liste des abréviations

[¹⁴C] IAP: iodoantipyrine 4-N-méthyl-¹⁴C

20-HETE: acide hydroxyéicosatétraénoïque-20

AA: acide arachidonique

AC: adénylate cyclase

aCSF : liquide céphalo-rachidien artificiel

AD (MA): maladie d'Alzheimer

ADP: adénosine diphosphate

AGEs: produits de glycation avancés

Aix: indice d'augmentation

Akt: protéine kinase B

AMPC: adénosine monophosphate cyclique

Ang II: angiotensine II

AP-1: protéine activatrice 1

ApoE: apolipoprotéine E

AT1: récepteur de l'angiotensine II de type 1

Ang II: angiotensine II

ATP: adénosine triphosphate

AVC: accident vasculaire cérébral

AVK: antagonistes de la vitamine K

A β : amyloïde β

β 2R: récepteur bêta-2 adrénergique

B2R: récepteur 2 de la bradykinine

BBB (BHE): barrière hématoencéphalique

BMP-2: protéine de la morphogenèse osseuse 2

CA1: zone 1 de la corne d'Ammon

CA2-3: zones 2 et 3 de la corne d'Ammon

Ca²⁺: ion calcium

CaCl₂: chlorure de calcium

CAVI: indice vasculaire cœur-cheville

CBF: *cerebral blood flow*

CC: *corpus callosum*

cGMP: guanosine monophosphate cyclique

CysLT1: Cystéinyl-leucotriène 1

COX: cyclo-oxygénase

DG: gyrus dentelé

DVC: diépoxyde de 4-vinylcyclohexène

E2: œstradiol

EDHF: facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium

EET: acides époxyeicosatétraénoïques

ER: récepteur des estrogènes

ET: endothéline

FSH: hormone folliculo-stimulante

Gas6: protéine du gène 6 spécifique d'arrêt de croissance

GGCX: gamma-glutamyl carboxylase

Gla: acide gamma-carboxyglutamique

GnRH: hormone de libération des gonadotrophines

GRP: protéine riche en Gla

GST: *galactocerebroside sulfotransferase*

HMG-CoA: 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A

IECA: inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine

IL: interleukine

JAK: janus kinase

JNK: domaine NH₂-terminal de transactivation de c-Jun

K⁺: ion potassium

KCa: canaux potassiques activés par le calcium (BKCa : à large conductance, IKCa : à conductance intermédiaire ; SKCa : à petite conductance)

KH₂: vitamine K hydroquinone

KO: vitamine K 2,3-époxyde

LDL: lipoprotéines de faible densité

LH: hormone lutéinisante

LPS: lipopolysaccharides

M₃R: récepteur muscarinique de type 3

MCP-1: protéine chimioattractrice de type 1

MGP: protéine gla de la matrice (pc, phosphorylée-carboxylée; uc, décarboxylée ; p-uc, phosphorylée-décarboxylée ; dp-c, désphosphorylée-carboxylée; dp-uc, désphosphorylée-décarboxylée)

MK: ménaquinone

MMP: métalloprotéinase matricielle

Mn-SOD: superoxyde dismutase à manganèse

MSX-2: gène homéotique-2 du «muscle segment homeobox»

NaCl: chlorure de sodium

NADPH: nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NaF: fluorescéine de sodium

NF-κB: facteur nucléaire kappa-B

NHE: échangeur Na⁺/H⁺

NO: monoxyde d'azote

NOS: synthase du monoxyde d'azote (n, neuronale; i, inductible ; e, endothéliale)

O₂: oxygène

OVX: ovariectomisé, *ovariectomized*

P2XR: récepteur purinergique P2X

P2YR: récepteur purinergique P2Y

p38: protéine-kinase p38 activée par des mitogènes

PECx: *perirhinal and entorhinal cortex*

PGE₂: prostaglandine E₂

PGI₂: prostacycline

PI3K: phosphatidylinositol 3-kinase

PLC: phospholipase C

PP : *pulse pressure*

PS: protéine S

RANKL: ligand activateur du récepteur du facteur nucléaire kappaB

ROS: espèces réactives de l'oxygène

RSK2: ribosomal S6 kinase 2

Runx2 ou cbfa1: sous-unité alpha 1 du facteur de transcription

SAPK: protéine kinase activée par le stress

sGC: guanylate cyclase soluble

SHR: rat spontanément hypertendu

SNP: nitroprussiate de sodium, *sodium* nitroprussiate

STAT: facteur-5 transducteur du signal et activateur de la transcription

TAM: récepteurs TYRO3, AXL et MERTK

TGF- β : facteur de croissance transformant β

THA: thalamus

TIMP: inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases

TNF α : facteur de nécrose tumorale α

TRP: potentiel de récepteur transitoire

TXA2: thromboxane A2

UBIAD1: *UbiA prenyltransferase containing 1*

UTP: uridine triphosphate

VCAM: molécule d'adhérence vasculaire

VEGFR: récepteurs du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

VK: vitamine K

VK₁: phylloquinone ou vitamine K₁

VKDP: protéine dépendante de la vitamine K

VKOR: vitamine K époxyde réductase

VOP : vitesse de l'onde de pouls (cf, carotide-fémorale; ba, tibio-brachial)

VSCx: visual and somatosensory cortices

Dédicace

A ma Femme, l'amour de ma vie, les mots ne seraient pas assez pour exprimer mes sentiments et l'amour que j'ai pour toi. Tu m'as toujours soutenu depuis qu'on s'est connu et ton amour m'a apporté la stabilité. Tu as toujours été ma source d'inspiration. Merci pour ta tendresse, ton attention et ta patience. Merci pour tous les moments inoubliables qu'on a passés ensemble. Puisse Dieu nous garder ensemble le plus longtemps possible.

A ma fille Skylah, ta venue a été un cadeau du ciel et a transformé notre vie pour le meilleur. Ton sourire illumine nos journées. Je te dédie aussi ce travail et j'espère que tu pourras le lire un jour.

Remerciements

Tout au long de ce parcours, j'ai eu l'immense honneur de côtoyer des personnes inspirantes qui m'ont aidé à trouver mon chemin. Je voudrais remercier, tout d'abord ma directrice de recherche, Dre Hélène Girouard et ma co-directrice Dre Guylaine Ferland pour m'avoir accueilli dans leurs laboratoires et donné l'opportunité de faire mon doctorat. Ça a été un énorme privilège d'évoluer à leurs côtés. Je remercie également Dr Réjean Couture et Dr Éric Thorin d'avoir accepté d'évaluer ce travail malgré leur emploi du temps très chargé. Mes remerciements aussi à Dr Guy Rousseau et Dr Jonathan Brouillette d'avoir fait partie de mon comité de parrainage. Je remercie Dr Cardinal pour ses conseils dans les demandes de bourses. Je remercie particulièrement Diane Vallerand et Bouchra Ouliass pour leur disponibilité et leur contribution dans ce travail. Je remercie également tous les collègues avec lesquels j'ai travaillé dans les différents laboratoires : Florencia, Sonia, Kelly, Lin, Maryam, Nasr, Dima, Jessica, Sherri, Stéphane, Pierre, Elisabeth, Marie-Claude. Je remercie tous les collègues du département de Pharmacologie et Physiologie. Enfin un grand merci à ma famille ; ma femme Diane, mon frère Herman et sa famille, Joselyne, Neilla et Tehkla qui sans leur présence inestimable, rien n'aurait été possible.

PREMIERE PARTIE: INTRODUCTION

1 RIGIDITE ARTERIELLE

1.1 Introduction

Le système artériel a la fonction d'acheminer le sang du cœur aux tissus périphériques, selon l'activité métabolique (fonction de conduit) et d'amortir les oscillations de la pression artérielle causées par l'éjection ventriculaire pulsatile (fonction d'amortissement)^{1,2}. Les parois des grosses artères transforment le flux pulsatile en un flux plus constant en se dilatant pendant la systole pour amortir l'éjection du sang et en se rétractant pendant la diastole, cette fonction est appelée " Effet de Windkessel" ³. Ceci est déterminé en grande partie par la compliance du système artériel ⁴. Cependant, la compliance des artères diminue avec le vieillissement normal et cette diminution s'accélère avec certaines pathologies. Le terme «rigidité artérielle» est utilisé pour indiquer l'altération de ces propriétés des parois vasculaires ⁵. Une augmentation de la rigidité artérielle entraîne une diminution de l'effet de Windkessel des artères, une augmentation de la pression pulsée et de la vitesse de l'onde de pouls (VOP), ce qui provoque un retour précoce des ondes réfléchies vers le cœur et donc une augmentation de la pression systolique ⁶. Le ventricule gauche doit alors générer une charge de travail supplémentaire pour surmonter l'augmentation de la pression. Il en résulte une hypertrophie ventriculaire gauche et une insuffisance cardiaque ⁷. La rigidité artérielle altère la fonction d'amortissement et transmet la pression pulsatile du sang plus profondément dans la microvasculature ce qui endommage les organes distaux, en particulier le rein et le cerveau ⁸.

La rigidité artérielle est une conséquence naturelle du vieillissement et elle augmente de façon accélérée avec l'hypertension artérielle. Elle constitue aussi un facteur indépendant de prédiction d'événements cardiovasculaires. La rigidité artérielle présente une relation causale bidirectionnelle

avec la pression artérielle parce que l'hypertension artérielle provoque une lésion de la paroi artérielle, ce qui favorise la rigidité alors que la rigidité artérielle est aussi la principale cause de l'augmentation de la pression artérielle systolique ^{9, 10}. La rigidité artérielle peut résulter de la combinaison de plusieurs facteurs systémiques (sang et pression), vasculaires (vasoréactivité, remodelage vasculaire), cellulaires (organisation du cytosquelette, réponses inflammatoires) et moléculaires (stress oxydatif, signalisation intracellulaire, mécanotransduction) qui accompagnent le vieillissement et l'hypertension ¹¹⁻¹³.

1.2 Composantes de la paroi vasculaire

Les vaisseaux sanguins sont composés de trois couches : l'intima qui constitue une monocouche de cellules endothéliales ; la media, couche de cellules musculaires lisses vasculaires et l'adventice externe (Figure 1). L'intima ou endothélium tapisse tout l'intérieur de l'arbre vasculaire, forme une barrière entre le sang et les tissus environnants et repose sur la membrane basale interposée entre les cellules endothéliales et la media ¹⁴. L'endothélium joue un rôle modulateur dans la régulation basale et dynamique du diamètre des vaisseaux sanguins en produisant et sécrétant des molécules vasoactives comme le monoxyde d'azote (NO) qui agit sur la media ^{15, 16}. La media détermine le tonus des vaisseaux sanguins et, selon l'épaisseur des vaisseaux spécifiques, elle contient un nombre différent de couches musculaires lisses. Ces couches sont constituées de cellules musculaires lisses et de composants de la matrice extracellulaire, y compris l'élastine et le collagène. En revanche, les cellules murales des capillaires sont constituées de péricytes au lieu de cellules musculaires lisses ¹⁴. L'adventice est composée d'une matrice extracellulaire, de fibroblastes, de nerfs et de petites artères appelées vasa vasorum qui fournissent des nutriments à l'adventice et aux couches médiales externes des grosses artères ¹⁴. Les composantes de l'adventice sont également impliquées dans le développement et le remodelage vasculaire ¹⁷⁻²⁰.

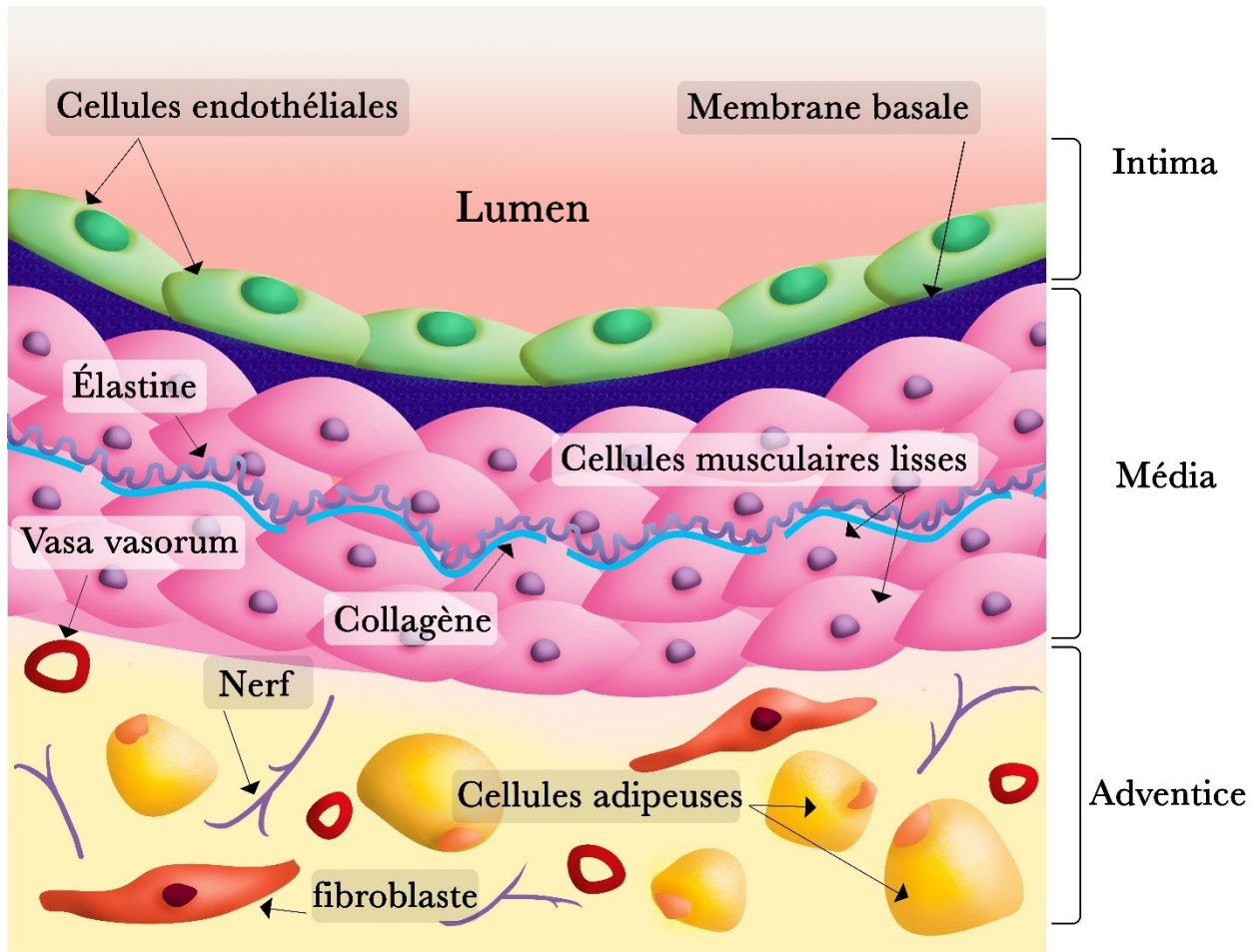


Figure 1: Composantes de la paroi vasculaire

1.3 Régulation du tonus vasculaire

Physiologiquement, le tonus vasculaire est la tension contractile d'un vaisseau sanguin par rapport à sa dilatation maximale²¹. Le tonus vasculaire des artères de résistance et des artérioles détermine la résistance vasculaire périphérique, contribuant ainsi à la régulation de la pression artérielle et du débit sanguin vers les tissus et les organes du corps et à l'intérieur de ceux-ci²². Le tonus vasculaire est régulé par la force ou la contrainte de cisaillement et la contrainte tangentielle. Ces mécanismes déclenchent l'action des agents vasomoteurs qui peuvent moduler le tonus vasculaire

par la vasodilatation ou la vasoconstriction. Les deux réactions dépendent de la structure des vaisseaux, du contenu moléculaire, ainsi que des interactions entre leurs signaux ²³.

1.3.1 Contrainte de cisaillement

L'endothélium vasculaire est constamment exposé à la force de cisaillement, c'est-à-dire la force de frottement générée par l'écoulement du sang. En réaction à cette force, les cellules endothéliales ont la propriété de modifier leur morphologie et leur fonction ²⁴. Lorsque les cellules endothéliales cultivées sont exposées à la force de cisaillement dans des dispositifs de chargement de flux conçus de façon dynamique, les cellules changent de morphologie et de fonctions. Ainsi, les cellules sont polygonales dans des conditions de culture statique, mais s'allongent avec leur grand axe orienté dans la direction de l'écoulement en réponse à la force de cisaillement ^{25, 26}. Lorsque la force de cisaillement augmente, les cellules endothéliales augmentent la production de substances vasodilatatrices, telles que le NO ^{27, 28}, la prostacycline (PGI₂) ²⁹, le peptide natriurétique de type C et l'adrénoméduline ³⁰ et diminuent la production de facteurs vasoconstricteurs, comme l'endothéline (ET) ^{29, 31} et l'enzyme de conversion de l'angiotensine ³². Diverses molécules membranaires et microdomaines cellulaires, y compris les canaux ioniques, les récepteurs du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGFR), les récepteurs couplés aux protéines G, les cavéoles, les protéines d'adhésion, le cytosquelette, le glycocalyx et les cils primaires jouent un rôle important dans le mécanisme de détection de la force de cisaillement ^{33, 34}.

1.3.2 Mécanisme myogénique

Le mécanisme myogénique est un contrôle de la circulation sanguine lié à la pression sanguine tangentielle sur la paroi vasculaire. Ce comportement est inhérent au muscle lisse et indépendant des influences neurales, métaboliques et hormonales. Le muscle lisse vasculaire se contracte

activement en réponse à l'étirement, dans une tentative de maintenir la tension circonférentielle de la paroi relativement constante dans les vaisseaux de résistance. Ce mécanisme de régulation est aussi appelé «Effet de Bayliss»^{35, 36}. Ainsi, les vaisseaux sanguins élastiques exposés à une augmentation de la pression intravasculaire deviennent passivement distendus. Le muscle lisse de la paroi vasculaire répond par une contraction active conduisant à une vasoconstriction qui tend à ramener la tension de la paroi proche de sa valeur initiale et le calibre vasculaire inférieur à sa valeur initiale³⁷. L'élévation de la pression intraluminaire entraîne une stimulation dépolarisante telle que l'ouverture du canal TRP (potentiel de récepteur transitoire) ainsi qu'une inhibition simultanée des facteurs hyperpolarisants incluant différents types de canaux potassiques (K^+) dans les cellules du muscle lisse. Il en résulte une dépolarisation de la membrane cellulaire des muscles lisses, un afflux de Ca^{2+} et une contraction des muscles lisses³⁸. Dans les artères mésentériques de souris, les récepteurs de l'angiotensine AT1 et le récepteur cystéinyl-leucotriène 1 (CysLT1) qui sont couplés à la protéine $G_{q/11}$ régulent 60% de la vasoconstriction myogénique dans les artères de résistance³⁹. Une autre voie de signalisation qui contribue à la régulation de la vasoconstriction myogénique implique la RSK2 (ribosomal S6 kinase 2) qui active l'échangeur Na^+/H^+ (NHE-1), entraînant une alcalinisation cytosolique et une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire qui favorise la vasoconstriction.⁴⁰

1.3.3 Régulation endothéliale

Dans les artères de résistance, l'endothélium joue un rôle fondamental dans la régulation du tonus vasculaire, du flux sanguin local et de la pression artérielle systémique via la génération de divers facteurs vasoactifs⁴¹. Dans des conditions physiologiques normales, les agents vasoactifs dérivés et non dérivés de l'endothélium contrôlent le tonus vasculaire en agissant à la fois sur les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses vasculaires sous-jacentes⁴². L'endothélium permet

de détecter et d'intégrer les signaux présents dans le sang et l'environnement tissulaire local, lesquels initient une modulation dynamique de l'activité contractile des cellules musculaires lisses vasculaires environnantes. En réponse à des stimuli mécaniques (force de cisaillement causée par le flux sanguin) et chimiques (acétylcholine, bradykinine, ATP), les cellules endothéliales libèrent des facteurs vasoactifs. Ces facteurs peuvent être divisés en deux types: les vasodilatateurs tels que le NO⁴³, la PGI2⁴⁴ et les facteurs d'hyperpolarisation dérivés de l'endothélium (EDHF)^{44, 45} et vasoconstricteurs tels que l'ET-1, la thromboxane A2 (TXA2), les espèces réactives de l'oxygène (ROS)⁴⁶ et les métabolites de l'acide arachidonique tels les prostaglandines et l'acide hydroxyéicosatétraénoïque-20 (20-HETE)²¹. Ces facteurs agissent en synergie pour réguler le tonus vasculaire^{41, 47}.

1.3.3.1 Monoxyde d'azote (NO)

Le NO peut être produit par cinq isoformes de la synthase du NO (NOS) : NOS neuronal (nNOS), NOS inductible (iNOS), NOS endothélial (eNOS), NOS mitochondriale et NOS érythrocytaire^{23, 48, 49}. Dans l'endothélium, l'eNOS catalyse la dégradation de la L-arginine en NO et L-citrulline. Par la suite, le NO diffuse dans les cellules musculaires lisses vasculaires adjacentes pour activer la guanylate cyclase soluble (sGC). La sGC soluble convertit le GTP en guanosine monophosphate cyclique (cGMP) qui active la protéine kinase G et cela conduit à des diminutions de la concentration cytosolique du calcium (Ca²⁺) entraînant ainsi une vasodilatation^{50, 51}. Le NO peut également affecter l'activité cellulaire indépendamment de l'activation de la sGC, par la stimulation de l'ATPase calcique du réticulum endoplasmique et sarcoplasmique, réduisant la concentration de Ca²⁺ intracellulaire et conduisant à une relaxation du muscle lisse⁵². Le NO stimule aussi les canaux K⁺ et l'hyperpolarisation membranaire qui en résulte abaisse la concentration de Ca²⁺ intracellulaire⁵³.

1.3.3.2 Prostacycline (PGI₂)

Dans l'endothélium, la PGI₂ est synthétisée à partir de l'acide arachidonique (AA)²³. La PGI₂ se lie ensuite à son récepteur IP situé sur la membrane des cellules musculaires lisses vasculaires. L'adénylate cyclase (AC) liée à la membrane est ensuite stimulée pour convertir l'adénosine triphosphate (ATP) en adénosine monophosphate cyclique (AMPc). L'AMPc active alors la protéine kinase A (PKA) et induit la vasodilatation en modulant l'ouverture des canaux potassiques⁵⁴.

1.3.3.3 Facteurs hyperpolarisants dérivés de l'endothélium (EDHFs)

Le rôle des EDHFs a été mis en évidence avec la découverte de la relaxation résiduelle dépendante de l'endothélium après la déplétion du NO et de la PGI₂^{55, 56}. Les dérivés de l'AA comme les acides époxyeicosatriénoïques (EETs), le peroxyde d'hydrogène, le peptide natriurétique de type C et le sulfide d'hydrogène fonctionnent comme EDHF dans le système vasculaire. Les EDHFs génèrent un signal électrique au niveau de l'endothélium, qui va ensuite induire le courant hyperpolarisant dans les cellules musculaires lisses adjacentes, provoquer la vasodilatation en activant les canaux K⁺ activés par le Ca²⁺ à petite conductance et à conductance intermédiaire (SK_{Ca} et IK_{Ca}), puis initier l'hyperpolarisation et la relaxation des cellules musculaires lisses⁵⁷⁻⁵⁹. Les effets des EDHFs sont plus importants dans la microcirculation ainsi que dans les artères coronaires, mésentériques et rénales que dans les gros vaisseaux. Ils participent à la régulation du débit sanguin, de la résistance vasculaire périphérique et de la tension artérielle, en particulier lorsque la production de NO est réduite^{57, 60-63}.

1.3.3.4 Adénosine

L'adénosine est un nucléoside généré par le stress métabolique et par une activité cellulaire élevée. Bien que l'effet principal de l'adénosine dans la plupart des lits vasculaires soit la vasodilatation,

le nucléoside peut provoquer une vasoconstriction des vaisseaux rénaux ⁶⁴. Il existe quatre récepteurs de l'adénosine exprimés dans les cellules endothéliales et le muscle lisse vasculaire et impliqués dans la régulation du tonus vasculaire, à savoir A1, A2A, A2B et A3 ²¹. Les récepteurs de l'adénosine A1 et A3 sont couplés principalement aux protéines Gi/o et interviennent dans l'inhibition de l'AC ce qui conduit à une réduction de l'AMPc, tandis que les récepteurs de l'adénosine A2A et A2B sont couplés aux protéines Gs et activent l'AC, ce qui conduit à une augmentation de l'AMPc ⁶⁵. Ainsi, l'activation des récepteurs A2A et A2B induit une vasodilatation dans divers vaisseaux alors que l'activation des récepteurs A1A et A3A provoque une vasoconstriction ^{21, 64, 66, 67}.

1.3.3.5 Endothélines (ET)

Les ET sont de puissantes molécules vasoconstrictrices jouant un rôle clé dans l'homéostasie vasculaire. Il existe trois types d'ET (ET-1, ET-2, ET-3) ⁶⁸, mais les cellules endothéliales ne produisent que l'ET-1 qui joue un rôle important dans la régulation du tonus vasculaire ⁶⁹. L'ET-1 possède deux types de récepteurs soit ETA et ETB, lesquels sont couplés à une protéine G ⁷⁰. Dans les vaisseaux sanguins, le récepteur ETA est dominant dans les conditions normales. L'ET-1 produit une vasoconstriction en se liant aux récepteurs ETA sur les cellules musculaires lisses vasculaires. Au niveau de l'endothélium, l'ET-1 se lie aux les récepteurs ETB et stimule la libération des vasodilatateurs, principalement le NO, mais aussi la PGI₂ et les EDHFs. De faibles niveaux d'ET-1 favorisent la vasodilatation, tandis que des concentrations plus élevées et physiopathologiques augmentent la pression artérielle et la résistance vasculaire périphérique totale. Ainsi, la libération du NO et d'autres vasodilatateurs suite à la stimulation des récepteurs ETB est cruciale pour limiter la vasoconstriction induite par les récepteurs ETA ⁷¹. La production et la libération de l'ET-1 sont stimulées par l'angiotensine (Ang) II, l'hormone antidiurétique

(ADH), la thrombine, les cytokines, les ROS et les forces de cisaillement agissant sur l'endothélium vasculaire. La libération d'ET-1 est inhibée par la PGI₂, le peptide natriurétique et le NO ⁷¹.

1.3.3.6 *Thromboxane (TXA2)*

La TXA₂ est un membre de la famille des lipides eicosanoïdes et est générée dans le lit vasculaire à partir de la prostaglandine H₂ par la TXA₂ synthase. La TXA₂ a une action vasoconstrictrice et agit à travers son récepteur TP-β qui est couplé à la protéine G de type G_q dans les cellules musculaires lisses vasculaires et les plaquettes ^{72, 73}. La TXA₂ induit l'activation de la phospholipase C (PLC), une enzyme membranaire qui hydrolyse le phosphatidylinositol pour former deux seconds messagers, l'inositol triphosphate (IP₃) et le diacylglycérol (DAG). L'IP₃ active la mobilisation du Ca²⁺ intracellulaire du réticulum sarcoplasmique vers le cytosol, alors que le DAG active la protéine kinase C (PKC). Ces événements induisent la contraction des cellules musculaires lisses vasculaires. Le récepteur TP-β est également couplé à la protéine G_i, qui module le contenu en AMPc par son action inhibitrice sur l'AC ^{74, 75}.

1.3.3.7 *20-HETE*

Le 20-HETE est un métabolite dérivé de l'AA grâce à une époxygénase CYP ⁷⁶. Sa biosynthèse dans la paroi vasculaire est principalement localisée dans les cellules musculaires lisses vasculaires mais dans la circulation pulmonaire, l'endothélium vasculaire produit également le 20-HETE. Le 20-HETE participe à la régulation du tonus vasculaire en sensibilisant les cellules des muscles lisses vasculaires aux stimuli constricteurs tels que l'Ang II, la phényléphrine et l'ET, et en contribuant à la réponse myogénique. Le 20-HETE inhibe les canaux potassiques à large conductance activés par le Ca²⁺ (BKCa) conduisant à la dépolarisation des cellules musculaires

lisses vasculaires et augmente donc le Ca^{2+} intracellulaire. Le 20-HETE active aussi directement les canaux calciques de type L et la PKC qui contribuent également à la vasoconstriction ^{77, 78}.

1.3.3.8 Espèces réactives de l'oxygène (ROS)

Dans le système vasculaire, la NADPH oxydase (Nox), la xanthine oxydase et la Nos découplée sont les principales sources de ROS qui incluent aussi la myéloperoxydase, la lipoxygénase, la COX et de nombreuses autres amines oxydase. Les Nox constituent la seule famille d'enzyme dont la fonction première est de produire des ROS et ils sont la principale source de production de ROS dans le système vasculaire ^{79, 80}. Les Nox contiennent deux sous-unités liées à la membrane (gp91 phox et p22phox) et plusieurs sous-unités cytoplasmiques (p47phox, p67phox, p40phox et les protéines G) ⁸¹. La famille des Nox se divise en 7 isoformes parmi lesquelles la Nox1, la Nox2, la Nox4 et la Nox5 sont exprimées dans la vasculature ⁸⁰. La Nox5 est présente chez l'humain mais ne l'est cependant pas chez les rongeurs ⁸².

La phosphorylation représente une partie essentielle de l'activation de toutes les isoformes des NOX. Cette phosphorylation survient par plusieurs voies impliquant les sérines kinases ⁸³. Cependant, les principales kinases impliquées sont les PKC particulièrement en situation de stress cellulaire ⁸⁴. L'activation des récepteurs AT1 de l'Ang II est étroitement associée à l'activation de la Nox et à la production des ROS dans les cellules musculaires lisses vasculaires et stimule les voies de la PKC et de la Rho kinase. Ces interactions cellulaires entre les récepteurs de l'AngII, la Nox et la PKC sont essentielles au développement et au maintien physiologique du tonus myogénique microvasculaire mais sont aussi étroitement impliquées dans le développement des vasculopathies ^{38, 80}. Dans les conditions physiologiques, les ROS participent à la régulation du tonus vasculaire. La pression transmurale élevée initie une production rapide et transitoire des ROS dans les artères de résistance. En effet, l'augmentation de la pression transmurale active les canaux

sensibles à l'étirement ce qui conduit à un afflux de Ca^{2+} et à une activation de Rac laquelle est associée à une production de ROS dépendante de la Nox⁸⁵. Réciproquement, les ROS augmentent la sensibilité au Ca^{2+} et la contraction vasculaire en réponse à une augmentation de la pression intraluminale⁸⁶. Ainsi, les ROS activent la voie de signalisation de RhoA/ Rho kinase dans les cellules musculaires lisses vasculaires. RhoA est un membre de la famille des petites protéines liant la GTPase Rho. Il participe à la vasoconstriction par la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine et la sensibilisation des protéines contractiles au Ca^{2+} .

Tous ces mécanismes contribuent donc à la régulation du tonus vasculaire et du flux sanguin. Les cellules musculaires lisses vasculaires qui composent la paroi des artères et artérioles de résistance servent d'effecteur principal dans la régulation du tonus vasculaire par leur contraction. Le tonus vasculaire dépend aussi de la pression artérielle dans ces vaisseaux, ainsi que de l'équilibre entre les signaux vasoconstricteurs et vasodilatateurs qui les atteignent. Enfin, la tension artérielle, en étirant les cellules musculaires lisses vasculaires, active les voies de signalisation pour produire un tonus myogénique, caractéristique des artères et artérioles de résistance⁸⁷.

1.4 Changements vasculaires associés à la rigidité artérielle

1.4.1 Changements structurels et mécaniques

Les changements physiologiques dans la paroi vasculaire sont dynamiques et se produisent tout au long de la vie^{88, 89}. Le remodelage vasculaire associé au grand âge dans les parois des grandes artères est très similaire chez l'homme, les primates non humains et les rongeurs et inclut la dilatation luminale, l'épaississement intimal et médial, la rigidité vasculaire et la baisse de la fonction endothéliale⁹⁰⁻⁹². La stabilité et la compliance de la paroi vasculaire dépendent de la contribution relative de deux protéines d'échafaudage importantes: le collagène et l'élastine. L'équilibre dans le contenu de ces protéines est maintenu stable par un processus dynamique de

production et de dégradation ⁹³. La dérégulation de cet équilibre, principalement par l'inflammation, entraîne une surproduction de collagène et une baisse des quantités d'élastine, contribuant à la rigidité vasculaire ⁹⁴. L'équilibre entre les métalloprotéases matricielles cataboliques (MMPs) régulant le collagène et l'élastine et leurs inhibiteurs (TIMP) change aussi avec le vieillissement. Des études chez les vieux rats et les primates non humains démontrent une augmentation de l'expression de la MMP-2 et de son activité dans les vaisseaux comparativement aux jeunes homologues ^{95, 96}. L'hypertension stimule également la production excessive du collagène. Chez l'homme, le collagène entraîne une augmentation de l'épaisseur de l'intima-média ^{11,97} et l'hypertrophie de la couche musculaire lisse vasculaire ⁹⁸. Le remodelage artériel est associé à une désorganisation des cellules endothéliales, une augmentation du collagène, des MMPs, du TGF- β (facteur de croissance transformant β), des molécules d'adhésion cellulaire intracellulaire et des cytokines, une dégradation des fibres d'élastine et une infiltration de cellules musculaires lisses, des macrophages et des cellules mononucléaires. L'augmentation du collagène et la dégradation de l'élastine entraînent des changements mécaniques caractérisés par une réduction de la compliance, de l'élasticité et de la distensibilité et donc la rigidité artérielle ^{11, 97}. La dégradation des fibres d'élastine prédispose ces fibres à la minéralisation avec dépôt de Ca^{2+} et de phosphore, augmentant ainsi la rigidité artérielle ^{99, 100}. Chez l'homme, la rigidité artérielle entraîne aussi une augmentation progressive du diamètre intérieur artériel (9% par décennie de 20 à 60 ans dans l'aorte ascendante) ⁹⁹. L'augmentation du diamètre luminal serait une adaptation compensatoire à la formation de plaques et / ou une augmentation de l'épaisseur de la paroi, afin de maintenir l'espace intérieur. L'augmentation de la taille du lumen associée à l'âge pourrait aussi être la conséquence d'une perte ou de la fragmentation des fibres d'élastine ¹⁰¹. La rigidité artérielle est également causée par la formation des produits de glycation avancée (AGEs) qui résultent de

la glycation non enzymatique des protéines pour former des liaisons croisées irréversibles avec le collagène. Avec les AGEs, le collagène forme une molécule plus rigide et moins sensible au renouvellement hydrolytique ¹⁰². Les AGEs réduisent également la matrice élastique de la paroi vasculaire ¹⁰³ et peuvent affecter la fonction des cellules endothéliales en désactivant le NO et en augmentant la génération des ROS tels que le peroxy-nitrite ⁹³.

1.4.2 Calcification artérielle

La calcification de la média vasculaire est une caractéristique du vieillissement vasculaire ¹⁰⁴. Chez les sujets plus âgés, la calcification se produit dans la média de la paroi artérielle autour des fibres d'élastine (élastocalcinose) ¹⁰⁵ et dans la plaque athérosclérotique au niveau de l'intima ¹⁰⁶. Bien que souvent considérées comme des entités distinctes, les calcifications intimaux et médiaux coexistent souvent. La rigidité artérielle est étroitement associée à la calcification, une association qui pourrait être expliquée par l'athérosclérose coexistante ¹⁰⁷. Cependant, les modèles animaux montrent que la calcification médiaux (en l'absence d'athérosclérose) augmente la rigidité artérielle, suggérant une relation causale directe entre la calcification et la rigidité ¹⁰⁸. La calcification vasculaire est un processus étroitement contrôlé similaire à la formation de l'os, mais contrairement à l'os, le phosphate de Ca^{2+} dans les artères n'est pas principalement déposé sur le collagène de type I, mais plutôt sur l'élastine amorphe qui comprend les lamelles élastiques ¹⁰⁹. Ce processus est augmenté lorsque l'élastine est dégradée par l'élastase et d'autres protéases ¹¹⁰. Dans ce processus, les cellules musculaires lisses vasculaires subissent une différenciation ostéoblastique, exprimant plusieurs des protéines associées à la formation osseuse ¹⁰⁶ et libérant des vésicules dans la matrice extracellulaire qui servent de sites de nucléation pour l'accumulation de cristaux d'hydroxyapatite ^{94, 111}. Dans les milieux de culture, des concentrations élevées de Ca^{2+} et de

phosphate induisent une différenciation ostéoblastique des cellules musculaires lisses vasculaires^{111, 112}.

Les mécanismes de la calcification impliquent la perte des inhibiteurs de la calcification, tels que la fétuine-A, la MGP, le pyrophosphate, et l'ostéopontine¹¹³⁻¹¹⁵. La calcification résulte également de la régulation à la hausse des facteurs de transcription tels que Runx2 ou cbfa1 (sous-unité alpha 1 du facteur de transcription), le gène homéotique-2 du «muscle segment homeobox» (MSX-2) et la protéine morphogénétique osseuse 2 (BMP-2). Ces facteurs interviennent dans le développement osseux normal et la calcification vasculaire en régulant l'expression des protéines ostéogéniques, dont l'ostéocalcine, l'ostéonectine, la phosphatase alcaline, le collagène-1 et la sialoprotéine osseuse^{113, 116}.

1.4.3 Inflammation

Les processus inflammatoires contribuent aux maladies vasculaires, à l'hypertension, à l'infarctus du myocarde, à l'accident vasculaire cérébral (AVC) et à l'insuffisance cardiaque associés à l'âge^{117, 118}. L'inflammation chronique semble être un facteur central de la calcification anormale des tissus mous en général et il a été démontré que les sites d'inflammation chronique dans le système vasculaire deviennent des sites de calcification chez la souris¹¹⁹ et chez les humains¹²⁰. Avec le vieillissement, on observe une évolution vers un phénotype vasculaire pro-inflammatoire associé à une régulation à la hausse des cytokines inflammatoires¹²¹ et des molécules d'adhésion cellulaire, à une augmentation des interactions des cellules endothéliales-leucocytes et à des altérations de la sécrétion des médiateurs qui sont essentiels aux réponses inflammatoires¹²². Les facteurs de transcription pro-inflammatoires et les protéines qui ont été associées au vieillissement vasculaire comprennent la protéine chimioattractrice de type 1 (MCP-1), le TGF- β 1, la MMP-2, la protéine activatrice 1 (AP-1) et le NF- κ B^{11, 97}. L'augmentation du tonus musculaire vasculaire, l'activité

accrue du système rénine-angiotensine-aldostérone ainsi que l'augmentation du stress oxydatif, contribuent également à la pro-inflammation artérielle liée à l'âge ^{12, 123}.

L'inflammation vasculaire induit le remodelage cardiovasculaire ¹²⁴ conduisant à la dégradation de l'élastine et à l'augmentation du collagène de la paroi vasculaire ¹²⁵. Elle augmente également la prolifération des cellules musculaires lisses ce qui contribue à la rigidité artérielle ¹²⁶. De plus, les cellules musculaires lisses vasculaires peuvent subir une transdifférenciation en un phénotype ostéoblastique dans des conditions inflammatoires permettant la minéralisation (absorption du phosphate) et le dépôt de Ca^{2+} dans la média artérielle ^{127, 128}.

1.4.4 Fonction endothéliale

L'endothélium est important dans le maintien de l'homéostasie vasculaire et est impliqué dans de nombreuses fonctions physiologiques, y compris la régulation de la pression artérielle, la promotion de l'angiogenèse et le contrôle du processus de coagulation ¹²⁹⁻¹³¹. La fonction endothéliale est altérée avec l'âge et peut contribuer à l'augmentation de la rigidité artérielle observée dans les études épidémiologiques ¹³². La rigidité artérielle et le dysfonctionnement endothélial sont deux des principales altérations vasculaires liées à l'âge ¹³³. L'altération de la fonction endothéliale est également associée à d'importants facteurs de risque des maladies cardiovasculaires, notamment le tabagisme, l'hypercholestérolémie, l'hypertension, l'hyperglycémie, le diabète, l'obésité, l'inflammation chronique et les antécédents familiaux de maladies occlusives vasculaires précoces ^{134, 135}. Bon nombre de ces facteurs de risque sont associés à une augmentation de stress oxydatif ¹³⁶. Le déséquilibre entre les systèmes oxydatif et antioxydant entraîne une augmentation de la production de ROS menant à l'inactivation du NO et à l'augmentation du stress nitrosatif altérant ainsi la fonction endothéliale ^{137, 138}. Le mécanisme primaire responsable de la détérioration de la fonction endothéliale est la réduction de la

biodisponibilité du NO, en raison de son interaction avec les ROS pour former du peroxy-nitrite. Le peroxy-nitrite inactive le tétrahydrobioptérine (BH4), un cofacteur essentiel pour la synthèse de NO par la NOS endothéliale (eNOS), réduisant la production du NO. De plus, une réduction des niveaux du BH4 a été signalée chez les rongeurs âgés et peut entraîner un découplage de l'eNOS, de sorte que le superoxyde est produit au lieu du NO ¹³⁹. La diminution de l'expression de l'eNOS est également causée en partie par la dégradation de la L-arginine par l'arginase II, une enzyme qui entre en compétition avec la eNOS pour la L-arginine. Cette enzyme dont l'expression augmente avec l'âge, réduit la formation du NO et augmente la production du superoxyde par la eNOS. L'activité de l'arginase est augmentée par le peroxy-nitrite. ¹⁴⁰⁻¹⁴². Certaines données indiquent que les vasodilatateurs prostanoides tels que la PGI₂ sont également réduits avec l'âge ¹²⁹. Le peroxy-nitrite réagit également avec la tyrosine, entraînant la formation de nitrotyrosine, dont l'abondance dans les artères augmente avec l'âge ^{143, 144}. Le NO non seulement régule le tonus vasculaire en agissant directement sur les cellules musculaires lisses, mais il contrebalance également l'action d'autres vasoconstricteurs tels que l'ET-1 ¹⁴⁵ et l'Ang II ¹⁴⁶. Bien que non limité au métabolisme du NO, l'homéostasie de l'endothélium dépend fortement de la libération équilibrée de NO en raison des actions pléiotropiques que le NO exerce sur la plupart des autres facteurs endothéliaux. La réduction de la biodisponibilité du NO augmente également le risque d'ischémie. En effet, le NO dérivé de l'endothélium protège contre les lésions cérébrales hypoxiques ou ischémiques par son action vasodilatatrice permettant d'augmenter le flux sanguin vers la zone cérébrale endommagée ^{147, 148}. Une association entre la calcification artérielle et le risque d'ischémie a notamment été observée dans les études cliniques ¹⁴⁹⁻¹⁵¹.

La rigidité artérielle est fréquemment considérée comme résultant principalement de la pression de la distension et de la qualité / quantité de la teneur en fibres artérielles des fibres d'élastine et

de collagène. Cependant, la paroi vasculaire est riche en cellules musculaires lisses qui répondent à l'activation sympathique et à la libération paracrine de vasomédiateurs tels que le NO, l'ET-1 et la PGI₂. Par conséquent, il n'est pas surprenant que les altérations de la biodisponibilité du NO influencent la rigidité artérielle ¹⁵². Les mesures visant à contrôler les facteurs de risque cardiovasculaires qui améliorent la fonction endothéliale peuvent donc inverser la rigidité artérielle en influençant à la fois les composantes de la paroi vasculaire et le tonus vasculaire ¹³².

La rigidité artérielle entraîne donc un remodelage de la paroi vasculaire avec épaissement progressif de la paroi artérielle, des modifications du contenu de la paroi (dégradation de l'élastine, l'augmentation du collagène et des AGEs) et une augmentation du diamètre de l'artère. L'inflammation vasculaire participe aussi à l'induction du remodelage vasculaire et favorise le dépôt de Ca²⁺ dans la paroi artérielle. Ces changements sont accompagnés par une altération progressive de la fonction endothéliale causée par une réduction de la biodisponibilité du NO et à une augmentation de la production de vasoconstricteurs comme l'Ang II et l'ET-1.

1.5 Mesure de la rigidité artérielle

La rigidité artérielle repositionne le site des réflexions de l'onde de pouls. Ces réflexions représentent un phénomène inévitable de tout système de conduit à discontinuité géométrique. Lorsque les ondes de pression se déplacent vers le bas et à travers des tubes de diamètre décroissant, une onde d'énergie réfléchie est créée. Chez les jeunes, ces ondes réfléchies arrivent au cœur au début de la diastole, contribuant ainsi à l'amplitude de la diastole. Cependant, la rigidité artérielle entraîne une réduction plus précoce du diamètre artériel ce qui provoque un retour rapide de l'onde réfléchie vers le cœur. Par conséquent, l'onde réfléchie arrive au cœur plus près de la systole, ce qui augmente la pression artérielle systolique alors que la pression artérielle diastolique diminue engendrant une réduction de la perfusion coronaire diastolique. Cette augmentation de la

pression artérielle systolique et de la pression pulsée exerce une plus grande charge sur le cœur, contribuant à l'hypertrophie ventriculaire gauche ^{153, 154}.

La rigidité artérielle régionale et locale peut être mesurée directement, et de façon non invasive, à divers endroits le long de l'arbre artériel ¹⁵⁵. Plusieurs méthodes non invasives sont actuellement utilisées pour évaluer la rigidité vasculaire ¹⁵⁶. Les mesures régionales et locales de la rigidité artérielle présentent l'avantage majeur d'être basées sur des mesures directes de paramètres fortement liés à la rigidité des parois vasculaires ¹⁵⁵.

La rigidité artérielle peut être évaluée en mesurant la vitesse de l'onde de pouls (VOP) ⁴. La VOP est la plus utilisée et est évaluée en mesurant le temps de transit de l'onde et la distance parcourue entre les deux sites d'enregistrement [$VOP \text{ (m/s)} = \text{distance (m)}/\text{temps de propagation}$] ¹⁵⁷. Les artères plus rigides causent un déplacement rapide et donc une vitesse plus élevée. Différentes approches peuvent être utilisées pour mesurer la vitesse, y compris la tonométrie d'applanation, l'oscillométrie, l'échocardiographie Doppler et l'imagerie par résonance magnétique ⁴. La VOP peut être mesurée dans n'importe quel segment artériel entre deux régions ¹⁵⁸ notamment entre l'aorte et l'artère fémorale (cfVOP) ou entre l'artère brachiale et l'aîne (baVOP) ¹⁵⁹. L'une des limites de la VOP dans l'évaluation des pathologies vasculaires est le fait que la rigidité mesurée est influencée par la pression sanguine exercée sur la paroi artérielle ¹⁶⁰.

L'index de rigidité β est un marqueur de la rigidité régionale et non segmentaire ¹⁵⁵ et il est mesuré au même site de mesure que la VOP, mais avec un ajustement pour la pression sanguine. L'index β correspond au rapport de la pression artérielle systolique/ diastolique à la variation relative du diamètre ¹⁶¹. Il ne peut pas être utilisé pour obtenir une rigidité artérielle segmentaire lorsque la pression artérielle diffère entre le point proximal et le point distal ¹⁶².

La rigidité carotidienne peut être déterminée directement à partir du rapport de la pression pulsée locale (mesurée par tonométrie d'applanation) et le changement relatif du diamètre (mesuré par échographie) ^{163, 164}.

La rigidité aortique peut être estimée indirectement à partir de l'index d'augmentation (AIx) ¹⁶⁵. L'AIx reflète la rigidité artérielle systémique ¹⁶⁶ et traduit l'augmentation supplémentaire de pression provoquée par l'onde de pression réfléchie à partir de la périphérie. Elle dépend de la rigidité artérielle et de l'intensité des réflexions, qui découlent à leur tour de la géométrie et du tonus vasomoteur du système artériel ¹⁶⁵. L'AIx est déterminé à partir des ondes de pression carotidiennes ou radiales enregistrées par tonométrie d'applanation ¹⁶⁵.

L'indice vasculaire cœur-cheville (CAVI) est un indicateur de rigidité et d'artériosclérose des artères thoraciques, abdominales, iliaques communes, fémorales et tibiales ^{167, 168}. L'indice CAVI n'est pas influencé par les changements de pression artérielle au cours de sa mesure et peut donc mieux refléter la rigidité vasculaire que la VOP ¹⁶⁹. Cet index est obtenu en enregistrant la distance du niveau de la valve aortique (niveau brachial) au point de mesure (la cheville) et le délai entre la fermeture de la valve aortique à la modification détectée de l'onde de pression artérielle au point de consigne ¹⁶⁸.

La rigidité artérielle peut également être déterminée par d'autres paramètres et indice comme la distensibilité, liée au comportement mécanique de l'artère dans son ensemble et correspond à la relation entre la variation relative du diamètre du vaisseau pour un changement de pression donnée ¹⁷⁰; la compliance reflétant la relation entre la baisse de pression et la baisse de volume dans l'arbre artériel pendant la diastole ¹⁷¹; le module d'élasticité incrémental de Young correspondant au module d'élasticité par unité de surface et peut donner un aperçu du comportement mécanique de

la paroi ¹⁷²et le module d'élasticité de Peterson correspondant au changement de pression requis pour un allongement de 100% à partir du diamètre de repos ¹⁷³.

En résumé, plusieurs paramètres ont donc été proposés pour mesurer la rigidité artérielle de façon non invasive. Parmi eux, la VOP est la plus utilisée en clinique. Cependant, cette mesure est influencée par la pression artérielle exercée sur la paroi artérielle et conséquent, elle n'est peut-être pas la plus appropriée pour évaluer la rigidité artérielle, en particulier pour les études impliquant des variations de la pression artérielle. D'autre part, le CAVI n'est pas influencé par la pression artérielle et peut donc mieux refléter la rigidité vasculaire.

2 RIGIDITE ARTERIELLE ET CERVEAU

2.1 Caractéristiques de la circulation cérébrale

La circulation sanguine vers le cerveau est assurée par les artères carotidiennes et vertébrales internes. Les artères vertébrales donnent naissance à l'artère basilaire qui, avec la carotide interne et les artères communicantes, forment le cercle de Willis ¹⁷⁴. Le cercle de Willis se divise davantage, donnant naissance aux artères cérébrales antérieure, moyenne et postérieure qui continuent ensuite à se ramifier en artères et artérioles plus petites ¹⁷⁵. Les artérioles à la surface du cerveau se divisent en artérioles piales qui entourent la surface du cerveau, elles pénètrent ensuite dans le parenchyme cérébral en tant qu'artérioles pénétrantes ou parenchymateuses. Les artérioles parenchymateuses se ramifient en réseau de capillaires étendu avec une distribution de densité hétérogène qui dépend de la proximité du réseau aux cellules neuronales ¹⁷⁶.

Le cerveau, par son influence humorale et neurale sur le système cardio-vasculaire, contrôle la distribution du flux sanguin et, lorsque la perfusion cérébrale est menacée, redirige le flux sanguin des autres régions vers la circulation cérébrale ¹⁷⁷. L'autre mécanisme de régulation du flux sanguin, appelé autorégulation cérébrovasculaire, protège le cerveau contre les fluctuations

normales de la pression artérielle périphérique ¹⁷⁸. Ainsi, les artères cérébrales se dilatent lorsque la pression artérielle baisse et se contractent lorsque la pression artérielle augmente ¹⁷⁹. Ceci permet de maintenir une perfusion cérébrale stable malgré les changements de pression artérielle périphérique. Enfin, le cerveau régule le débit sanguin en fonction de l'activité fonctionnelle des différentes régions du cerveau par un mécanisme appelé hyperémie fonctionnelle ou couplage neurovasculaire, de sorte que lorsque l'activité d'une région du cerveau augmente, le flux vers cette région augmente également. Ce mécanisme contrôle l'apport du substrat et l'élimination des sous-produits du métabolisme. En tant que tel, il est essentiel pour l'homéostasie du microenvironnement cérébral ¹⁸⁰.

2.1.1 Autorégulation

Les artères cérébrales se dilatent lorsque la pression artérielle baisse et se contractent lorsque la pression artérielle augmente ¹⁷⁹. En conséquence, le débit sanguin cérébral reste relativement constant sur une plage assez large de pression artérielle définie comme le plateau d'autorégulation (Figure 2). Les limites inférieure et supérieure du plateau chez les adultes ont été déterminées comme étant respectivement d'environ 50-60 mm Hg et 150-160 mm Hg. La limite inférieure de l'autorégulation fait référence au point auquel le débit sanguin cérébral commence à diminuer et non au point auquel les artères de la résistance cérébrale sont complètement dilatées. Les artères de résistance peuvent continuer à se dilater dans une certaine mesure, même après que la limite inférieure de l'autorégulation de débit sanguin cérébral ait été dépassée. Les réductions passives de diamètre se produisent seulement à de très bas niveaux de pression. Ainsi, la limite inférieure de la vasodilatation cérébrale ne correspond pas précisément à la limite inférieure de l'autorégulation. Les réductions de la pression sous la limite inférieure de l'autorégulation entraînent une hypoperfusion du cerveau. Dans une tentative de compenser les réductions du débit

sanguin cérébral, le coefficient d'extraction d'oxygène (O₂) du sang augmente. Aucun symptôme clinique n'est observé jusqu'à ce que les réductions de pression dépassent la capacité d'augmentation de l'extraction d'O₂ pour satisfaire les demandes métaboliques des tissus cérébraux¹⁸¹. Certaines pathologies peuvent altérer l'autorégulation du cerveau. Par exemple l'autorégulation est perdue dans l'AVC ischémique aigu, laissant le tissu cérébral survivant non protégé contre l'effet potentiellement néfaste des changements de pression artérielle. Dans l'hypertension chronique, les limites de l'autorégulation sont déplacées vers les pressions plus élevées¹⁸².

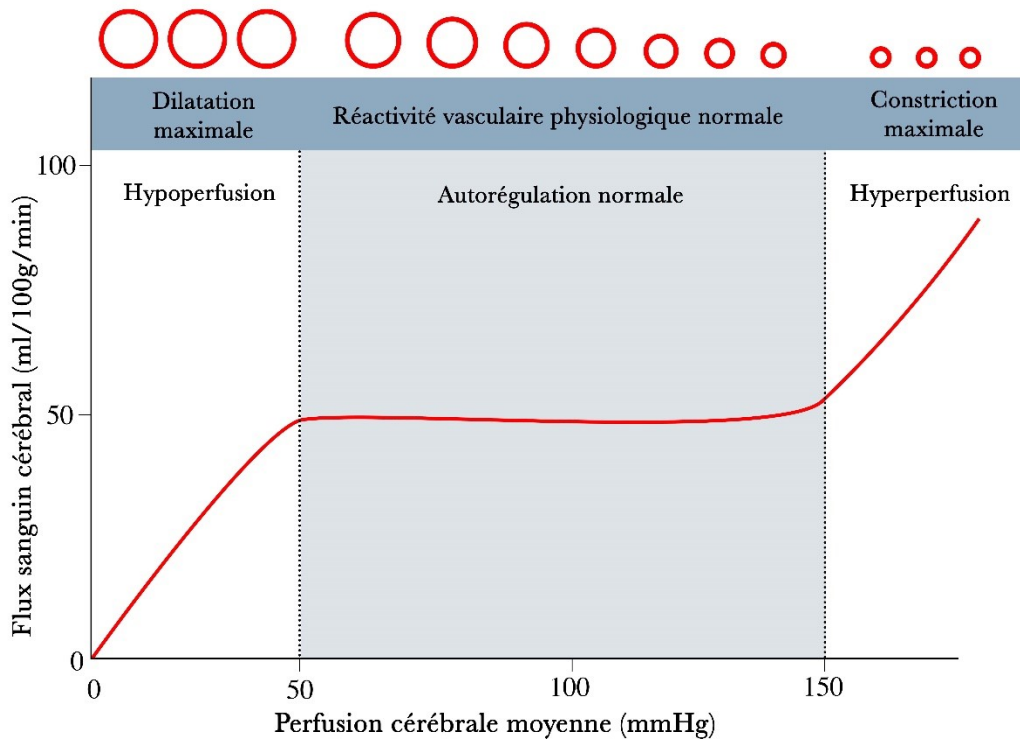


Figure 2: Mécanisme d'autorégulation cérébrale. La ligne continue représente le débit sanguin cérébral et les cercles représentent le diamètre artériel.

2.1.2 Couplage neurovasculaire

Les différents types de cellules constituant l'unité neurovasculaire sont les neurones, les interneurons, les astrocytes, les cellules musculaires lisses vasculaires, les péricytes, et les cellules endothéliales (Figure 3)^{180, 183}. Ces cellules établissent un ensemble anatomique et fonctionnel aboutissant à un système de régulation du flux sanguin cérébral très efficace¹⁸⁴.

2.1.2.1 Neurones

Les neurones participent au couplage neurovasculaire en envoyant des signaux vers les cellules musculaires lisses vasculaires ou les astrocytes. Plusieurs molécules libérées des neurones tels que les neuropeptides, l'ATP, le NO ou les PGs peuvent mener à la vasoconstriction ou à la vasodilatation¹⁸⁵. L'un de ces mécanismes implique la PGE2, un métabolite de l'AA. Dans certains neurones excitateurs du cortex, la COX2 est exprimée de façon constitutive en particulier dans les arborisations dendritiques et les épines¹⁸⁶. En utilisant un inhibiteur spécifique de la COX2 et une souris dont le gène codant pour la COX2 a été délété, Niwa *et al.*¹⁸⁷, ont démontré que la COX2 est impliquée dans la régulation du couplage neurovasculaire. Plus récemment, Lacroix *et al.*,¹⁸⁸ ont identifié la PGE2 comme produit de la COX2 impliqué dans la dilatation en réponse aux vibrisses chez la souris. Cet effet se fait par les récepteurs EP2 et EP4. Le NO dérivé de la nNOS peut agir directement sur les cellules musculaires lisses vasculaires, entraînant une hyperpolarisation et une relaxation. L'ATP et l'adénosine libérés lors de l'activité neuronale peuvent également agir directement sur les cellules musculaires lisses vasculaires entraînant une relaxation¹⁸⁹. Les neurones peuvent aussi communiquer avec les vaisseaux via les astrocytes, soit directement, soit par l'intermédiaire d'un interneurone, régulant ainsi le tonus vasculaire et l'apport sanguin dans la zone qui les entoure¹⁸⁵.

2.1.2.2 *Astrocytes*

Les astrocytes sont idéalement placés entre les neurones et les microvaisseaux cérébraux pour traduire les informations sur le niveau d'activité et les besoins énergétiques des neurones aux cellules vasculaires ¹⁹⁰. Ils sont impliqués dans le support neuronal et les interactions cellulaires au sein de l'unité neurovasculaire, où elles sont essentielles pour le maintien de la barrière hémato-encéphalique et le couplage neurovasculaire (BHE) ¹⁹¹. Les neurones libèrent le glutamate et l'ATP qui agissent sur les récepteurs métabotropes du glutamate ou purinergiques P2YR sur les astrocytes afin d'initier l'augmentation du Ca^{2+} cytosolique. Cette élévation de Ca^{2+} initie des cascades de signalisation dans les astrocytes résultant en une libération d'ions et de molécules vasoactives à partir des pieds astrocytaires. Ces agents vasoactifs, principalement les ions K^+ et les produits du métabolisme de l'AA tels les EETs et les prostaglandines de type E2 (PGE_2) agissent ensuite sur les cellules musculaires lisses vasculaires ¹⁹², les péricytes ¹⁹³ et les cellules endothéliales ¹⁹⁴. La libération de ces vasomédiateurs peut conduire à une vasodilatation ou à une vasoconstriction. Cela signifie que les astrocytes sont capables de déterminer la vasodilatation ou la vasoconstriction en fonction non seulement de la voie de signalisation activée, mais également en fonction des informations neuronales et de l'environnement immédiat. Cela est dû au fait que plusieurs voies de signalisation sont impliquées dans le couplage neurovasculaire.

Dans une situation d'hypoxie, la concentration de lactate augmente, ce qui inhibe les transporteurs de la PGE_2 et l'accumulation de PGE_2 qui en résulte favorise la vasodilatation. En revanche, lorsque la tension en O_2 est élevée, la production de lactate par les neurones diminue, ce qui réduit la disponibilité de la PGE_2 extracellulaire, favorisant ainsi la vasoconstriction ^{195, 196}.

Un autre mécanisme qui peut avoir un effet biphasique conduisant à une vasodilatation ou à une vasoconstriction est la concentration de K^+ présente dans l'espace entre le pied astrocytaire et les

artérioles. Dans les pieds astrocytaires, les canaux BKCa induisent une majorité de la vasodilatation et la totalité de la vasoconstriction impliquant le K^+ local extracellulaire comme signal vasoactif. L'augmentation de la concentration intracellulaire du Ca^{2+} dans les astrocytes cause une libération du K^+ qui est proportionnelle à l'augmentation du Ca^{2+} . Ainsi, une augmentation modeste de Ca^{2+} conduit à une faible augmentation de la concentration du K^+ et cause une hyperpolarisation des cellules musculaires lisses vasculaires et donc une vasodilatation, alors qu'une augmentation plus importante provoque une dépolarisation, entraînant ainsi une vasoconstriction ¹⁹⁷.

2.1.2.3 Cellules musculaires lisses vasculaires

Les cellules musculaires lisses vasculaires sont les principaux contributeurs au maintien du tonus basal, à la pression artérielle et à la distribution du flux sanguin. Elles présentent plusieurs mécanismes par lesquels elles régulent à la fois la vasodilatation et la vasoconstriction des vaisseaux sanguins cérébraux ¹⁹⁸.

Les ions et molécules vasoactifs libérés par les astrocytes et les neurones agissent sur les cellules musculaires lisses vasculaires et entraînent un changement de tonus vasculaire. Les EETs et une augmentation modérée de la concentration de K^+ extracellulaire agissent sur les canaux potassiques des cellules musculaires lisses vasculaires, notamment les canaux BKCa et les canaux potassiques rectifiant rentrant (Kir), provoquant ainsi une dépolarisation et une contraction des cellules musculaires lisses. La PGE₂, par ses récepteurs EP₄, génère l'AMPc à partir de l'ATP intracellulaire, produisant également une hyperpolarisation et une relaxation. Les cellules vasculaires lisses peuvent aussi produire de l'acide 20-hydroxyéicosatétraénoïque (20-HETE), un puissant dépolarisant des muscles lisses vasculaires, entraînant une contraction vasculaire. Le NO libéré par les neurones ou les cellules endothéliales favorise la relaxation en se fixant sur la sGC

qui catalyse la conversion de la guanosine triphosphate (GTP) en GMPc¹⁹⁹. Le NO peut aussi bloquer la production de 20-HETE. L'adénosine libérée par les astrocytes agit sur les récepteurs A2B des cellules vasculaires lisses et bloque l'activation des canaux calciques, ce qui entraîne une hyperpolarisation et une relaxation des artères²⁰⁰.

2.1.2.4 Cellules endothéliales

Les cellules endothéliales régulent le tonus vasculaire en libérant des facteurs vasoactifs en réponse à des signaux chimiques²⁰¹ ou des forces mécaniques, comme la force de cisaillement³⁴. Les composés vasoactifs, y compris l'ATP, l'adénosine diphosphate (ADP), l'uridine triphosphate (UTP), l'acétylcholine et la bradykinine, se lient à leurs récepteurs respectifs (purinergiques: P2XR et P2YR; muscarinique: M3R; bradykinine : B2R) dans les cellules endothéliales. Les cellules endothéliales libèrent alors des substances vasoactives comme le NO, des métabolites de l'AA comme la PGI₂ et les EETs. Ces agents vasoactifs agissent sur les cellules musculaires lisses vasculaires entraînant ainsi une hyperpolarisation et, conséquemment, une vasorelaxation¹⁸⁹. L'endothélium libère aussi des substances vasoconstrictrices comme l'ET-1 et la TXA2¹⁸⁵.

2.1.2.5 Péricytes

Les péricytes sont des cellules arrondies et isolées en contact étroit avec les cellules endothéliales. Les péricytes possèdent des protéines contractiles et, étant juxtaposés aux capillaires cérébraux, ils sont capables de contrôler le diamètre capillaire et probablement de moduler le flux sanguin en réponse à l'activité neuronale²⁰². Ce rôle a été contredit par une étude qui a démontré que les péricytes des capillaires ne sont pas contractiles et que la régulation du débit sanguin cérébral dans des conditions physiologiques et pathologiques était assurée par les cellules musculaires lisses vasculaires artériolaires²⁰³. Cependant, dans ces deux études, les cellules contractiles sont

identiques et les divergences des résultats sont dues au fait que, dans la dernière étude, ces cellules ont été classées comme des cellules musculaires lisses de manière non conventionnelle au lieu d'être classés comme des péricytes ²⁰⁴ selon la définition de Zimmerman ²⁰⁵. En réalité les deux études arrivent à la même conclusion ²⁰⁴.

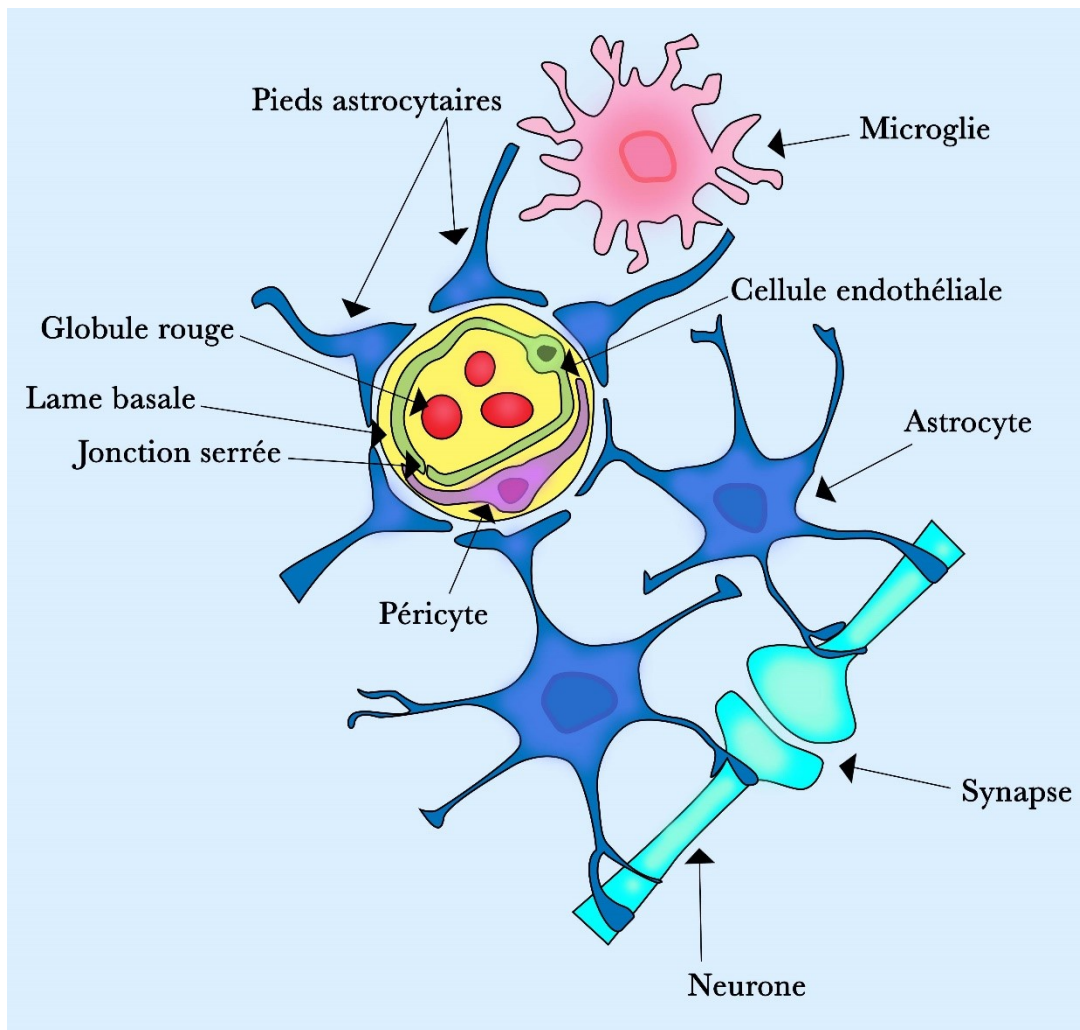


Figure 3: Composantes de l'unité neurovasculaire

La circulation cérébrale est donc caractérisée par la capacité du cerveau à réguler le flux sanguin cérébral de façon à rediriger le sang dans les régions du cerveau en besoin et à maintenir une perfusion cérébrale constante, protégeant ainsi le cerveau contre les changements de la pression artérielle périphérique. Également, le débit sanguin et donc l'apport de nutriments et l'élimination

des sous-produits du métabolisme, est régulé en fonction de l'activité fonctionnelle des différentes régions du cerveau.

2.2 Effets de la rigidité artérielle sur le cerveau

Après les artères, les artéριοles permettent la distribution de l'O₂ et du sang à travers un flux constant au sein d'organes tels que le cerveau, le cœur et le rein ²⁰⁶. La rigidité artérielle entraîne une augmentation de la pression pulsatile au niveau du cerveau, ce qui peut endommager les petits vaisseaux ²⁰⁷⁻²¹⁰. Le cerveau est plus vulnérable à cette augmentation de pression qui permet à la charge pulsatile de pénétrer profondément dans son lit microvasculaire qui est caractérisé par une faible impédance ²⁰⁸⁻²¹⁰. Les altérations microvasculaires jouent un rôle important dans les lésions associées au vieillissement dans les organes cibles comme le cerveau ²⁰⁸. En effet, la microcirculation permet la livraison de l'O₂ et des nutriments aux tissus, et l'élimination des déchets et du dioxyde de carbone. Par conséquent, la survie cellulaire dépend de la perfusion microvasculaire adéquate ²¹¹. Dans le cerveau, les lésions microvasculaires peuvent se manifester par des hyperintensités de la substance blanche, des microsaignements cérébraux et des infarctus lacunaires ²¹² qui peuvent finalement entraîner des troubles cognitifs, y compris la démence ²¹³. Les études épidémiologiques ont montré une association entre la rigidité artérielle et le déclin cognitif, les infarctus lacunaires et la maladie des petits vaisseaux cérébraux ²¹⁴.

2.2.1 Rigidité artérielle et maladie des microvaisseaux

Bien qu'autrefois considérée comme inoffensive, la maladie des microvaisseaux cérébraux est maintenant considérée comme le facteur vasculaire le plus important contribuant à la démence ²¹⁵. Elle est caractérisée par des altérations des plus petits vaisseaux sanguins cérébraux comprenant les artéριοles, les capillaires et les veinules ²¹⁶. Les études épidémiologiques ont établi une

corrélation positive entre la rigidité artérielle et la maladie des petits vaisseaux ²¹⁷. Ces études suggèrent fortement que la corrélation est aussi forte que celle entre la rigidité artérielle et l'athérosclérose ²¹⁸. Le mécanisme impliquerait un dysfonctionnement endothélial vasculaire causant une défaillance de la BHE ²¹⁷. Dans un modèle de rigidité artérielle, il a été démontré qu'une augmentation de la rigidité de la carotide se traduit par une augmentation de la pulsativité sanguine dans les vaisseaux cérébraux et de la production de ROS au cerveau ²⁰⁷. Les radicaux libres diminuent la demie-vie du NO ce qui pourrait altérer la fonction endothéliale cérébrale ²¹⁹⁻²²¹. De par le rôle important joué par l'endothélium dans la régulation du débit sanguin cérébral, la perturbation de la fonction endothéliale pourrait entraîner des lésions cérébrales résultant de l'hypoperfusion cérébrale chronique ²²², l'hypométabolisme progressif ²²³, l'inflammation chronique et l'augmentation de la perméabilité de la BHE ²²⁴. En outre, les lésions de la BHE ou la progression des changements artérioscléreux peuvent entraîner des lésions cérébrales parenchymateuses ²²⁵.

2.2.2 Rigidité artérielle et accident vasculaire cérébral (AVC)

L'AVC survient lorsque le flux sanguin vers une partie du cerveau est interrompu. La première étude sur la rigidité artérielle chez les patients ayant subi un AVC a évalué la rigidité vasculaire en calculant l'indice β . L'indice β aortique était significativement plus élevé chez les patients ayant subi un AVC que chez les témoins, ce qui indique que la rigidité aortique était associée à l'AVC ²²⁶. Plus tard, des études cas-témoins ont confirmé qu'une plus grande rigidité artérielle était fréquente chez les patients ayant subi un AVC ^{227, 228}. D'autres études aussi ont démontré une association entre la rigidité artérielle ²²⁹, (cfVOP et cAIx) ²³⁰ et l'AVC suggérant que la rigidité aortique est un prédicteur indépendant de l'AVC. L'augmentation de la pression pulsée induit un remodelage artériel, augmente l'épaisseur de la paroi, favorise le développement de la plaque et de

l'athérosclérose, et éventuellement conduit à la rupture ou à l'ulcération des plaques athérosclérotiques ²¹³. Enfin, la thromboembolie consécutive à la rupture de la plaque peut augmenter le risque d'AVC ²²⁹.

2.2.3 Rigidité artérielle et fonctions cognitives

Le vieillissement normal est associé à une augmentation marquée de la rigidité des artères centrales du corps causée par les changements dans la structure et la fonction artérielle ²³¹⁻²³³. La rigidité artérielle expose la vascularisation cérébrale aux forces potentiellement dommageables du pouls artériel augmenté ²⁰⁹. Bien que la rigidité artérielle soit un déterminant établi de la condition cardiovasculaire ^{231, 234}, elle se définit maintenant comme un prédicteur du déclin des fonctions cognitives notamment la mémoire, les fonctions exécutives et la vitesse de traitement ^{235, 236} ainsi que de la démence ²³⁷.

Chez les personnes âgées, plusieurs études ont associé la rigidité et la calcification artérielles à des lésions cérébrales structurelles et à des performances cognitives plus faibles ²³⁸⁻²⁴². De plus, chez les personnes âgées, la rigidité artérielle augmente le risque d'évolution de la déficience cognitive légère à la démence ²⁴³. Alors que la plupart des études portant sur la structure et la fonction cérébrales ont été faites sur des cohortes de personnes âgées, l'étude Framingham a examiné l'association entre la rigidité aortique et les premiers signes de vieillissement cérébral chez les jeunes adultes. Cette étude a rapporté une association entre la rigidité aortique et des lésions vasculaires cérébrales subcliniques bien que le déficit cognitif ne soit manifeste qu'à la quarantaine. Les résultats de cette étude mettent en évidence la possibilité que la rigidité artérielle, causant des lésions cérébrales initiales à la structure cérébrale, puisse commencer dès l'âge adulte, avant la manifestation du déclin cognitif et de la détérioration progressive plus tard dans la vie ²⁴⁴.

Certaines divergences entre les études ont émergé en raison des différents devis expérimentaux (transversaux/ longitudinaux), et de l'hétérogénéité des populations cibles et des outils d'évaluation des fonctions cognitives ²⁴⁵. Par exemple, le Mini-Mental State Examination (MMSE), un test couramment utilisé comme instrument de dépistage de la démence, évalue l'état mental général de façon non spécifique mais n'est pas sensible à la déficience cognitive légère ²⁴⁶. Par contre d'autres tests comme le Blessed IMC (Blessed Information-Memory-Concentration), le Montreal Cognitive Assessment (MoCA) et l'Addenbrooke's Cognitive Examination–Revised (ACE-R) sont plus sensibles et spécifiques à la déficience cognitive légère et seraient plus appropriés pour le dépistage d'altérations subtiles de la fonction cognitive ^{235, 247, 248}. Cependant, la littérature s'accorde sur le lien entre la rigidité artérielle et les différents domaines de la cognition comme les fonctions exécutives, la vitesse de traitement ainsi que les mémoires épisodique, visuelle et spatiale ^{245, 249}.

Les mécanismes proposés relèvent d'association entre la rigidité artérielle élevée et une augmentation de la pulsativité sanguine en aval, un remodelage microvasculaire cérébral, des lésions de la matière blanche, une diminution du volume de la matière grise et du cerveau ^{238, 240-242}. Une forte pulsativité du flux artériel intracrânien entraîne un remodelage cérébrovasculaire et altère les fonctions cérébrovasculaires et de l'hippocampe ^{250, 251} ce qui contribue au déclin cognitif ^{252, 253}. Ainsi, un flux très pulsatile peut induire le rétrécissement du système vasculaire cérébral, empêchant ainsi la livraison de substrats énergétiques et de nutriments aux cellules cérébrales actives. L'hypoperfusion chronique qui en résulte peut aussi directement causer des lésions dans la substance blanche cérébrale ou permettre l'accumulation de sous-produits métaboliques toxiques dans le cerveau et les vaisseaux sanguins ²⁵⁴. Les individus présentant un dysfonctionnement cognitif précoce développent des dommages capillaires cérébraux et une dégradation de la BHE

dans l'hippocampe, indépendamment des modifications du biomarqueur A β et/ou tau de la maladie d'Alzheimer, suggérant que la dégradation de la BHE est un biomarqueur précoce du dysfonctionnement cognitif humain indépendant de l'A β ²⁵⁵. La perturbation de la BHE est exacerbée par la pénétration accrue des ondes de pression pulsatiles dans la microcirculation cérébrale, résultant d'une rigidité artérielle périphérique accrue ^{256, 257}. Un autre mécanisme impliqué dans la déficience cognitive est la neuroinflammation caractérisée par l'activation de la microglie en réponse aux constituants plasmatiques pénétrant dans le cerveau ²⁵⁸. En effet, la rupture de la BHE permet aux toxines, protéases ou autres substances présentes dans le sang de pénétrer dans l'espace interstitiel du cerveau et de causer des lésions au niveau des neurones et des cellules gliales environnantes ²⁵⁹.

L'hypertension artérielle est étroitement liée à la rigidité artérielle. Toutefois, il a été suggéré que les médicaments antihypertenseurs réduisant plus efficacement la rigidité vasculaire sont plus susceptibles de retarder la survenue de troubles cognitifs ^{245, 260, 261}. Les médicaments tels que les antagonistes des récepteurs de l'angiotensine AT1, les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, les inhibiteurs des canaux calciques et les diurétiques, ont permis de réduire le risque de démence et le déclin cognitif dans plusieurs études ²⁶²⁻²⁶⁵. La réduction de risque de démence et du déclin cognitif dépend de la durée du traitement antihypertenseur ²⁶⁶. De plus, une intervention précoce contre l'hypertension même au stade de pré-hypertension, peut être bénéfique pour la protection contre le dysfonctionnement cognitif et le développement de la démence plus tard dans la vie ^{267, 268}. Cependant, malgré les nombreuses données épidémiologiques et mécanistiques établissant un lien entre l'hypertension et les troubles cognitifs, les résultats contradictoires de certaines études ont remis en question l'efficacité des antihypertenseurs dans la prévention du déclin cognitif et la démence. Ceci résulte de différentes méthodologies utilisées

dans ces études notamment l'hétérogénéité des populations cibles, la classe d'antihypertenseurs utilisés, la durée des études, le niveau de réduction de la pression artérielle ou la prise en compte d'autres paramètres associés à l'hypertension qui pourraient avoir biaisé ces résultats ²⁶¹. Même si certaines classes d'antihypertenseurs réduisent la rigidité artérielle, ils ne peuvent pas la normaliser. Également, la plupart des antihypertenseurs qui réduisent la rigidité artérielle agissent en diminuant la résistance périphérique plutôt qu'en réparant les dommages structurels qui entraînent la rigidité artérielle ²⁴⁵. Les antihypertenseurs réduisant la pression artérielle sans corriger la rigidité artérielle n'auraient donc pas d'impact sur la prévention du déclin cognitif et la démence ²⁶¹. Les statines utilisées dans le traitement de la rigidité artérielle pourraient également avoir un effet sur les fonctions cognitives mais ce sujet reste controversé ²⁶⁹.

La rigidité artérielle entraîne donc une augmentation de la pulsatilité du flux sanguin au niveau du cerveau avec comme conséquence un dysfonctionnement endothélial et une augmentation de la perméabilité de la BHE pouvant conduire au déclin cognitif.

3 MODÈLES ANIMAUX DE RIGIDITÉ ARTÉRIELLE

Les modèles animaux utilisés pour l'étude de la rigidité artérielle se divisent en deux catégories: les modèles où la rigidité vasculaire est induite par les moyens génétiques, chimiques ou chirurgicaux; et ceux où la rigidité est secondaire à d'autres conditions, telles que le vieillissement, l'athérosclérose ou l'hypertension ²⁷⁰.

3.1 Modèles spontanés

Les changements physiologiques de la paroi vasculaire sont dynamiques et se produisent tout au long de la vie ^{88, 89}. De nombreuses altérations structurelles et mécaniques ont été observées dans le système vasculaire âgé, y compris une augmentation de l'épaisseur de l'intima-média qui augmente de deux à trois fois entre 20 et 90 ans au niveau de l'artère carotide chez l'homme.

L'épaississement subclinique de l'intima-média est fortement associé au vieillissement et est également un prédicteur d'événements cardiovasculaires futurs ^{11,97}. À ces altérations structurales, sont associés des changements mécaniques caractérisés par une réduction de la compliance, une élasticité / distensibilité réduite et une rigidité accrue ^{11,97}.

L'un des modèles utilisés est le modèle du rat âgé. Ce modèle présente certains avantages, tels qu'une petite taille (la quantité de médicament candidat disponible pour les tests sur les animaux étant plus souvent limitée) et une durée de vie relativement courte. Cependant, comme la majorité des mammifères, le rat ne présente pas de pathologie cardiovasculaire liée à l'âge, peut-être parce qu'il n'est pas exposé à des facteurs de risque cardiovasculaire tels que le tabagisme ou l'hypertension artérielle ²⁷⁰.

Un autre modèle est celui du rat spontanément hypertendu (SHR). C'est le modèle animal le plus largement utilisé pour étudier l'hypertension essentielle et l'hypertrophie ventriculaire gauche ²⁷¹. Il est caractérisé par une apparition des lésions vasculaires et cérébrales. L'augmentation de la pression artérielle entraîne une atrophie cérébrale, une perte de cellules nerveuses et une réaction des cellules gliales. Ces lésions cérébrales sont aussi observées dans l'hypertension chez l'homme ²⁷².

En effet, l'hypertension est associée aux changements fonctionnels, structuraux et mécaniques dans les artères qui ressemblent étroitement aux altérations vasculaires liées au vieillissement. Ces changements comprennent la dysfonction endothéliale, le remodelage vasculaire, l'inflammation, la calcification et l'augmentation de la rigidité. Les changements artériels chez les jeunes patients hypertendus ressemblent à ceux observés chez les personnes âgées normotendues. L'hypertension accélère le remodelage et le dysfonctionnement vasculaire liés à l'âge, et le vieillissement peut

avoir un impact sur la gravité des lésions vasculaires dans l'hypertension, indiquant des interactions étroites entre l'élévation de la pression artérielle et le vieillissement biologique ¹³.

3.2 Modèles chirurgicaux

La rigidité artérielle peut être induite chirurgicalement par l'ischémie, par le remplacement d'une partie de l'artère par un tube rigide ou par l'application topique du chlorure de Ca^{2+} (CaCl_2) sur l'artère. L'ischémie peut reproduire les conditions des pathologies cardiovasculaires liées à l'âge telles que l'infarctus du myocarde et l'AVC ²⁷⁰. La procédure consiste à induire une interruption de la circulation des vasa vasorum irriguant les cellules musculaires de la paroi aortique ce qui produit une dégénérescence de l'adventice, une réduction de la conductance médiale, une altération des fibres d'élastine et de collagène et enfin, une augmentation de la rigidité artérielle ²⁷³.

La rigidité peut également être induite en remplaçant une partie d'une artère par un tube rigide. Le remplacement de l'aorte par un tube rigide entraîne une augmentation de la pression artérielle pulsée avec un changement minime de la pression et du débit moyen ²⁷⁴.

Il existe aussi un modèle qui augmente la pression pulsée, le modèle murin de coarctation de l'aorte transversale. Il consiste à isoler l'aorte transversale entre le tronc et les artères carotides droite et gauche par une ligature entre les deux artères carotides, ce qui entraîne une augmentation de la pression artérielle. L'hypertension qui en résulte entraîne une rupture de la BHE, une astrogliose, une augmentation du stress oxydatif et une inflammation. En outre, la rupture de la BHE est principalement localisée dans des régions cérébrales contrôlant les fonctions cognitives, telles que le cortex et l'hippocampe, et pourrait être à l'origine des troubles cognitifs ²⁷⁵. Dans ce même modèle, l'altération de la perméabilité de la BHE entraîne le dépôt de $\text{A}\beta$ dans le cerveau ²⁷⁶.

L'équipe de la Dr Girouard a développé un modèle de calcification de l'artère carotide. Ce modèle consiste en une application topique de CaCl_2 stérile sur la carotide, l'artère est isolée et une

compresse stérile trempée dans du CaCl_2 est placée directement sur l'artère pendant 20 minutes. La compresse est ensuite retirée et les tissus sont refermés. Les animaux témoins sont soumis à la même procédure chirurgicale, mais reçoivent une compresse trempée dans une solution saline stérile. Chez les souris C57BL6 âgées de 10 à 12 semaines au moment de la chirurgie, l'application de CaCl_2 sur l'artère carotide conduit au développement de dépôts de Ca^{2+} sur cette artère, à un épaississement des couches intima-média avec un dépôt accru de collagène, à une fragmentation de l'élastine et à une infiltration de macrophages dans la carotide calcifiée 2 semaines après l'application de CaCl_2 . On observe aussi une diminution de la compliance de la carotide accompagnée d'une augmentation de l'indice β . Tous ces changements surviennent sans modifier la pression artérielle systolique ou le rayon de la carotide. Contrairement aux autres modèles chirurgicaux dont la manipulation chirurgicale affecte directement la santé du cerveau en causant une ischémie, ce modèle permet d'étudier spécifiquement les effets de la rigidité artérielle sur le cerveau ²⁰⁷.

3.3 Modèles génétiques

Plusieurs modèles murins avec une délétion des gènes qui régulent la formation osseuse ont conduit à de nouvelles perspectives sur la pathogenèse de la calcification artérielle. Un de ces modèles est le modèle dont le gène codant pour la protéine gla de la matrice (MGP) a été délété. La MGP joue un rôle important dans la prévention de la calcification artérielle. Elle possède des résidus d'acide gamma-carboxyglutamique (Gla), qui se lie à l'hydroxyapatite, produisant une couche protéique qui inhibe la minéralisation ultérieure ²⁷⁷.

Les souris dont le gène codant pour l'ostéoprotégérine a été délété développent une calcification médiale et subintimale dans l'aorte et les artères rénales ²⁷⁸.

Un autre modèle est le modèle du syndrome de Marfan avec une mutation hypomorphique homozygote du gène de la fibrilline-1, composante structurelle majeure des microfibrilles. Dans ce modèle, les souris développent une calcification médiale mais qui est limitée aux lamelles des artères élastiques ²⁷⁹.

Il existe aussi le modèle des souris déficientes en gène Klotho qui développent également une calcification ectopique dans les artères et les artérioles, ainsi que dans le parenchyme de plusieurs organes ²⁸⁰. La protéine Klotho est une protéine transmembranaire qui joue un rôle clé dans le métabolisme cellulaire et l'homéostasie corporelle et elle a été associée à des maladies liées au vieillissement ²⁸¹.

Les souris avec une délétion du gène codant pour l'ApoE développent également une calcification de l'aorte et des artères coronaires ²⁸² et une athérosclérose ²⁸³. Les souris dépourvues du gène de l'isoenzyme II de l'anhydrase carbonique développent une calcification vasculaire des petites artères et des artérioles dans un certain nombre d'organes ²⁸⁴. Comme ces gènes ne sont pas spécifiques aux vaisseaux sanguins et se retrouvent dans d'autres cellules ou matrice du cerveau ²⁸⁵⁻²⁹⁰, ces modèles ne sont pas compatibles avec une étude des effets de la rigidité artérielle sur la santé du cerveau.

Un autre modèle concerne le gène de l'élastine chez la souris. Dans ce modèle, le gène codant pour l'élastine est modifié et les souris hétérozygote (Eln +/-) sont utilisées. Les souris Eln +/- ont une teneur deux fois plus faible en élastine mais ont une durée de vie normale, bien que leurs vaisseaux soient plus étroits ²⁹¹. Les souris Eln +/- développent une rigidité des artères élastiques ²⁹¹⁻²⁹⁴ avec une augmentation du nombre de lamelles élastiques ²⁹¹ et de la pression artérielle ²⁹³. Au niveau du cerveau, on observe une altération de la fonction de dilatation dépendante de l'endothélium ²⁹⁴ ainsi qu'une exacerbation de la vasoconstriction dépendante de l'Ang II ²⁹⁵ dues à une réduction

de la biodisponibilité du NO et une augmentation du stress oxydatif et de l'inflammation ^{294, 295}. Cela se traduit par une baisse de la perfusion cérébrale ²⁹⁶. Cependant, la pression artérielle élevée peut être considérée comme un facteur confondant ²⁹⁴.

3.4 Modèles chimiques

La rigidité artérielle similaire à celle observée chez l'homme peut être produite par l'hypervitaminose D, seule ou en association avec la nicotine ou le cholestérol ²⁷⁰. Des niveaux toxiques de vitamine D induisent une calcification artérielle, ce qui peut impliquer la stimulation de vésicules matricielles qui agissent alors comme des sites de nucléation minéraux ²⁹⁷. L'effet de la nicotine a été associé à sa capacité à libérer des catécholamines ou à son effet vasoconstricteur direct sur les artères ²⁹⁸. La combinaison de la vitamine D et du traitement à la nicotine chez le rat entraîne une augmentation de la teneur en Ca^{2+} de l'aorte qui s'accompagne d'une hypertension systolique et d'une augmentation de la rigidité de la paroi aortique ^{108, 299}. Le dépôt de Ca^{2+} sur les lamelles élastiques conduit à la fragmentation des fibres élastiques avec une perte de compli-ance artérielle ³⁰⁰. On peut aussi induire la calcification et la fragmentation de la fibre élastique par l'inhibition de l'activation de la protéine MGP en traitant des rats avec de la warfarine ³⁰¹. La warfarine inhibe l'enzyme γ -glutamate carboxylase dépendante de la vitamine K (VK) discutée à la section 6, empêchant ainsi la formation de résidus d'acides carboxyglutamiques qui se lient aux ions et empêchent ainsi la précipitation du phosphate de Ca^{2+} ^{301, 302}. Par conséquent, la MGP qui est synthétisée en présence de warfarine est inactive en raison de l'absence de la carboxylation ³⁰⁰. Ainsi, dans le modèle de warfarine/VK, on note une calcification de l'aorte, une diminution de la teneur en élastine ainsi qu'une augmentation de la vitesse de l'onde de pouls et la pulsatilité de la pression ³⁰¹. Cependant, ces modèles ne peuvent être utilisés pour étudier les effets de la rigidité

artérielle sur le cerveau puisque les molécules qui induisent la rigidité peuvent agir directement sur le cerveau ³⁰³⁻³⁰⁹.

Il existe donc plusieurs modèles pour étudier la rigidité artérielle. Dans ces modèles la rigidité vasculaire survient suite à d'autres conditions telles que l'athérosclérose ou l'hypertension ou elle est induite par les moyens génétiques, chimiques ou chirurgicaux. Contrairement à la plupart de ces modèles qui présentent des facteurs confondants comme l'hypertension ou l'ischémie, le modèle de calcification de la carotide permet d'étudier spécifiquement les effets de la rigidité artérielle sur le cerveau.

4 RIGIDITÉ ARTÉRIELLE ET DIFFÉRENCES SEXUELLES

4.1 En périphérie

Avant la ménopause, les femmes présentent moins de risques de mortalité liée aux maladies cardiovasculaires, alors qu'après la ménopause, le risque est accru par rapport aux hommes ³¹⁰. Plusieurs études suggèrent des différences sexuelles en regard de la rigidité artérielle ³¹¹ et les femmes ménopausées présentent, plus particulièrement, une plus grande rigidité artérielle que les hommes ³¹². Bien qu'il ait été imaginé que la petite taille de l'aorte chez les femmes pourrait affecter l'interprétation des résultats de ces études, les différences persistent malgré l'ajustement de la taille de l'aorte, suggérant des différences intrinsèques entre les hommes et les femmes, dans les propriétés aortiques proximales³¹². Ces différences sexuelles sont associées aux effets protecteurs des hormones sexuelles telles que les œstrogènes sur le système cardiovasculaire impliqués dans la régulation de la compliance des artères ^{311, 313}. Il a été démontré que la rigidité artérielle est associée aux périodes de transition hormonale chez la femme, comme avant et après la puberté ou tout au long du cycle menstruel. En effet, avant la puberté, les filles tendent à

démontrer une rigidité artérielle plus élevée que les garçons du même âge. Après la puberté, la rigidité diminue et devient plus faible chez les filles que chez les garçons ³¹⁴. En outre, la rigidité varie pendant le cycle menstruel et il a été démontré que l'utilisation de contraceptifs oraux chez les femmes en âge de procréer était associée à une plus grande rigidité artérielle ³¹⁵ ce qui corrobore l'hypothèse que la suppression des hormones sexuelles endogènes féminines pourrait avoir un effet sur la santé artérielle et la compliance ³¹². La rigidité artérielle augmente aussi après la ménopause ^{316,317}, mais elle peut être améliorée par l'hormonothérapie ³¹⁸. L'hormonothérapie améliore aussi la compliance ³¹⁹ mais elle se détériore à nouveau après le retrait du traitement ³²⁰.

En effet, les récepteurs des œstrogènes (ER), de la progestérone et de la testostérone ont été identifiés dans les vaisseaux sanguins où ils semblent provoquer une stimulation des mécanismes de relaxation vasculaire dépendants de l'endothélium et l'inhibition des mécanismes de contraction des muscles lisses vasculaires. Ces actions potentielles peuvent contribuer aux différences associées au sexe en regard du tonus vasculaire ³²¹.

Les œstrogènes affectent directement le remodelage de la paroi vasculaire en augmentant la production d'élastine et en diminuant le dépôt de collagène dans les artères humaines ³²². Chez les femmes avant la ménopause, la production du NO est plus importante que chez les hommes ³²³, et les effets vasodilatateurs de l'œstrogène dépendants de l'endothélium et produits par le NO diffèrent entre les hommes et les femmes ³²⁴. Les œstrogènes entraînent une relaxation artérielle en augmentant la production de NO en agissant sur les récepteurs ER α localisés dans les cavéoles de la membrane plasmique des cellules endothéliales ³²⁵. Plus précisément, l'œstradiol (E2) augmente la biodisponibilité du NO par l'activation de la voie phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-protéine kinase B (Akt)-eNOS ³²⁶. Les œstrogènes peuvent aussi augmenter la disponibilité du NO en diminuant la concentration d'anion superoxyde (O₂⁻) ³²¹. Le NO conduit à l'activation

de la voie de la cGMP dans les cellules musculaires lisses vasculaires puis à l'activation des canaux K^+ menant ainsi à une hyperpolarisation des cellules et donc à leur relaxation^{327, 328} et à une diminution de l'influx de Ca^{2+} ³²⁹. L'E2 réduit également les facteurs de constriction comme l'ET et augmente la production de facteurs relaxants dérivés de l'endothélium tels que la PGI_2 et les facteurs hyperpolarisants dérivés de l'endothélium (EDHF)³³⁰, impliqués dans la relaxation vasculaire dans les artères de résistance³²¹. L'E2 inhibe aussi le système rénine-angiotensine en réduisant la transcription de l'enzyme de conversion de l'angiotensine³³¹ et prévient le développement de l'hypertension³³². Cependant, l'E2 peut aussi entraîner une relaxation des artères dénudées d'endothélium³³⁰. Les effets directs des œstrogènes sur la fonction endothéliale et des cellules musculaires lisses vasculaires ainsi que sur la rigidité artérielle pourraient partiellement expliquer l'hémodynamique favorable des femmes avant la ménopause et les effets hémodynamiques indésirables qui suivent souvent la ménopause³¹².

En ce qui concerne la progestérone, certaines études ont montré des effets bénéfiques de cette hormone semblables à ceux des œstrogènes^{333, 334} comme la diminution des lipoprotéines de basse densité et l'augmentation des lipoprotéines de haute densité³³⁵. Cependant, chez les souris ovariectomisées, l'action de la progestérone est associée à des effets négatifs sur le système cardiovasculaire notamment l'inhibition de l'effet antioxydant de l'E2, l'augmentation de l'activité de la NADPH oxydase et la production de ROS³³⁶. Les effets de la progestérone sur le système vasculaire restent encore méconnus³³³.

Quant à la testostérone, les études épidémiologiques ont montré qu'il existe une forte prévalence de faibles niveaux de testostérone chez les hommes atteints de coronaropathie, et que cette association existe quel que soit l'âge du patient³³⁷. Les études chez l'homme et chez l'animal ont rapporté qu'elle peut jouer un rôle important dans la régulation des fonctions vasculaires *in vivo*

et *in vitro* ³³⁸⁻³⁴⁰, en induisant une vasorelaxation rapide du muscle lisse vasculaire ³⁴¹. Elle a également des effets protecteurs sur le système cardiovasculaire ³⁴⁰. Dans les études *in vitro*, l'action vasorelaxante de la testostérone est principalement indépendante de l'endothélium mais est associée à une diminution de la probabilité d'ouverture des canaux calciques ³⁴² et à une activation des canaux K⁺ membranaires des cellules musculaires lisses ³⁴³. La testostérone stimule également la production de NO par la nNOS, qui à son tour induit la formation de cGMP et une vasorelaxation ³⁴⁴ et stimule aussi la production d'AMPc ³⁴⁵. La testostérone diminue aussi l'expression de la molécule d'adhésion vasculaire (VCAM)-1 dans les cellules endothéliales, une des étapes précoces de l'athérogenèse ³⁴⁶; et favorise la prolifération des cellules endothéliales en culture ³⁴⁷. Chez l'homme, le traitement à la testostérone réduit les taux sériques des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et le facteur de nécrose tumorale (TNF)- α , et augmente les taux des cytokines anti-inflammatoires IL-10. Il réduit également le cholestérol ³⁴⁸. Enfin, la testostérone induit une vasodilatation et améliore la vasoréactivité chez les hommes atteints de maladie coronarienne ^{338, 349}. Cependant, dans les études interventionnelles, le traitement par testostérone à dose physiologique n'a pas montré d'effet significatif sur la pression artérielle ^{350, 351} alors que les stéroïdes anabolisants élèvent la pression artérielle ^{352, 353}.

Chez l'homme, un état déficitaire en estrogènes soit par une mutation du gène de l'aromatase ou du récepteur aux estrogènes était associé à une insulino-résistance, des taux de cholestérol, LDL et TG élevés ainsi que d'HDL abaissés ³⁵⁴. Ces anomalies étaient corrigées par l'administration d'estrogènes par voie orale ou transdermique ³⁵⁵. De plus, une administration aiguë d'estrogènes chez l'homme améliore la fonction cardiaque systolique et diminue les résistances vasculaires ³⁵⁶. Les hormones sexuelles et de façon plus importante, les estrogènes, exercent donc une action bénéfique sur la structure et la fonction vasculaires. La diminution drastique d'estrogènes à la

ménopause pourrait donc expliquer le dysfonctionnement vasculaire et les différences sexuelles dans le fonctionnement vasculaire après la ménopause.

4.2 Au cerveau

Au niveau du cerveau, de nombreuses maladies neurologiques présentent des différences sexuelles, concernant notamment la gravité de la neuropathologie³⁵⁷, l'incidence³⁵⁸ et les facteurs de risque³⁵⁹. Dans la maladie d'Alzheimer par exemple, les études épidémiologiques montrent qu'elle est plus fréquente chez les femmes que chez les hommes en contrôlant pour l'âge. Il a été supposé que la susceptibilité des femmes pour la maladie d'Alzheimer était causée par le déclin prononcé œstrogènes ovariens après la ménopause. Cependant, des études récentes dans des modèles expérimentaux et chez l'humain démontrent que le risque est plutôt associé à une diminution de l'œstrogène dérivé du cerveau^{360,361}. En effet, même si la plus grande partie des œstrogènes circulants chez les femmes préménopausées est produite par les ovaires et par le placenta pendant la grossesse, les œstrogènes sont également produits en petites quantités par plusieurs tissus périphériques tels que le foie, la glande surrénale, les glandes mammaires, le tissu adipeux et le cerveau^{362, 363}. L'E2 peut être produit à partir de la testostérone circulante par l'aromatase (œstrogène synthase) locale, enzyme responsable d'une étape clé de la biosynthèse des œstrogènes, ou être synthétisé *de novo* à partir du cholestérol, par les neurones ou les astrocytes³⁶⁴⁻³⁶⁹. Il est important de noter que le neurone est le principal site de synthèse d'E2 dans le cerveau. Dans les conditions physiologiques normales, seulement quelques astrocytes dans le cerveau expriment l'aromatase tandis qu'elle augmente dans les astrocytes réactifs en raison de diverses lésions cérébrales³⁷⁰. Chez les souris femelles transgéniques portant une délétion du gène de l'aromatase, une occlusion de l'artère cérébrale moyenne a provoqué une lésion ischémique significativement plus importante comparée aux témoins intacts. L'administration du 17 β -estradiol

(17 β -E2) plasmatique à des niveaux physiologiques a complètement inversé la sensibilité des femelles transgéniques. Également, la lésion ischémique était moins importante chez les souris ovariectomisées comparées aux souris transgéniques, suggérant un rôle essentiel de l'estradiol local extragonadal chez les femelles ³⁷¹. Le cerveau produit donc ses propres œstrogènes tandis que les œstrogènes circulants et les précurseurs stéroïdiens C19 (substrat pour la synthèse des œstrogènes) peuvent également traverser la BHE et fournir les substrats essentiels pour la synthèse des œstrogènes dans le système nerveux central ³⁷². Dans la période précédant la ménopause et durant celle-ci, la production des œstrogènes baisse à cause de l'épuisement des follicules ovariens entraînant une insuffisance des gonadotrophines (hormone folliculo-stimulante, FSH et hormone lutéinisante; LH), ³⁷³ pouvant maintenir les taux élevés des œstrogènes circulants. Avec l'élimination des œstrogènes ovariens à la ménopause, la production extra-ovarienne d'œstrogènes devient prédominante, et le principal estrogène plasmatique pendant cette période est l'estrone, un œstrogène moins puissant que le 17 β -E2 ³⁷⁴. Chez les femmes ménopausées, la synthèse et l'activité locale des œstrogènes cérébraux deviennent plus indépendantes des œstrogènes circulants. Il a été montré que les femmes atteintes de la maladie d'Alzheimer présentent une activité plus faible de l'aromatase dans le cerveau que les femmes de même âge sans la maladie ³⁷⁵. Par conséquent, le maintien de la synthèse des œstrogènes cérébraux au cours du vieillissement pourrait être d'une importance cruciale pour la fonction cognitive normale, ainsi que pour la réduction du risque de la maladie d'Alzheimer chez les femmes ³⁶¹.

L'E2 induit une vasodilatation et possède des effets anti-inflammatoires et antioxydants dans les vaisseaux sanguins cérébraux ³⁷⁶. L'E2 régule le tonus vasculaire cérébral en modulant les fonctions cellulaires endothéliales et musculaires lisses. Comme dans les cellules endothéliales périphériques, l'E2 facilite la production de substances vasoactives dérivées de l'endothélium telles

que le NO et les dérivés cyclo-oxygénases (COX) de l'AA mais diminue toutefois la production d'EDHF³⁷⁷. L'E2 diminue indirectement le tonus myogénique de l'appareil cérébrovasculaire par la vasorelaxation dépendante du NO en augmentant l'activité du GMPc, et conséquemment le flux sanguin artériel³⁷⁸. Les actions de l'E2 sont produites via leurs ER α et β localisés dans les cellules endothéliales et les ER α des cellules musculaires lisses vasculaires des artères cérébrales³⁷⁹. L'E2 exerce des effets anti-inflammatoires en inhibant l'adhésion des leucocytes dans les cellules endothéliales dans les microvaisseaux cérébraux³⁷⁸. Les effets anti-inflammatoires de l'E2 dans la circulation cérébrale comprennent la suppression des cytokines pro-inflammatoires, la réduction de la production de radicaux libres et une diminution de la perméabilité cérébrale et de l'œdème³⁸⁰⁻³⁸². Il a été démontré que l'E2 diminue l'inflammation cérébrale par l'atténuation des marqueurs pro-inflammatoires endothéliaux tels que la production de l'interleukine-1 (IL-1), l'activation du facteur nucléaire kappa-B (NF-kB) et l'adhésion leucocytaire³⁸²⁻³⁸⁴. L'E2 protège aussi les artères cérébrales contre le stress oxydatif. L'E2 augmente notamment l'expression de la superoxyde dismutase à manganèse (Mn-SOD) dans les artères cérébrales, atténuant ainsi la production de l'anion superoxyde³⁸⁵ et du peroxyde d'hydrogène³⁸⁶.

Enfin, l'E2 régule la perméabilité de la BHE³⁸⁷ et la protège contre la rupture suite à l'ischémie en réduisant l'expression de la matrice des métalloprotéases 2 et 9 (MMP2 et MMP9)³⁸⁸.

Les œstrogènes ont donc des effets bénéfiques sur le cerveau notamment les effets anti-inflammatoires et antioxydants et jouent un rôle dans la régulation du tonus vasculaire. Le cerveau produit aussi les œstrogènes localement et cette production devient prédominante après la ménopause. Le maintien de la synthèse des œstrogènes cérébraux au cours du vieillissement pourrait être d'une importance cruciale pour la fonction cognitive normale.

5 TRAITEMENTS POSSIBLES POUR LA RIGIDITÉ ARTÉRIELLE

Il existe plusieurs approches thérapeutiques qui visent à prévenir la progression de la calcification artérielle vu que l'hydroxyapatite est très peu soluble et l'enlever des artères serait l'équivalent de déminéraliser l'os, ce qui serait difficile à réaliser ³⁰⁰.

5.1 Les bisphosphonates

Les bisphosphonates inhibent la résorption osseuse en bloquant l'activité des ostéoclastes. Cependant, ils inhibent la calcification vasculaire en empêchant la formation d'hydroxyapatite à partir des ions phosphates et Ca^{2+} . En raison de la relation entre l'ostéoporose et la calcification vasculaire, les bisphosphonates ont été considérés comme une thérapie potentielle contre la calcification vasculaire ^{389, 390}. Pour la calcification vasculaire, même si le traitement par les bisphosphonates a montré son efficacité dans les modèles animaux ³⁹¹, son efficacité pour prévenir la calcification vasculaire chez l'homme fait encore l'objet de débats. Les résultats diffèrent selon le bisphosphonate en question et certains résultats montrent une diminution de la calcification vasculaire ³⁹² alors que d'autres ne montrent aucun effet ³⁹³. Les bisphosphonates présentent également des effets favorables tant sur l'épaisseur de la paroi vasculaire que sur les paramètres d'élasticité et de rigidité ³⁹⁴⁻³⁹⁹. Le mécanisme d'action implique une diminution des lipides sériques, considérés comme responsables du déclenchement et de la progression de l'athérosclérose. Les effets des bisphosphonates sur l'athérosclérose et la calcification vasculaire varient en fonction du type, la puissance, la posologie ou la voie d'administration ⁴⁰⁰.

5.2 Les statines

Les statines agissent en diminuant la teneur en cholestérol cellulaire par l'inhibition sélective de l'enzyme 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) réductase responsable de sa biosynthèse ⁴⁰¹. L'hypercholestérolémie est fortement associée à l'athérosclérose qui est produite

en partie par l'absorption de lipoprotéines de faible densité (LDL) dans la paroi vasculaire. Les doses thérapeutiques de statines réduisent nettement les taux sériques totaux et de cholestérol LDL chez les humains ⁴⁰². Les statines possèdent le plus grand potentiel de tous les médicaments actuellement disponibles pour retarder le développement de la calcification artérielle ^{402, 403}. Dans une étude chez le porc, le retrait du régime riche en cholestérol a réduit la calcification intimale et médiale dans l'aorte ainsi que la charge athérosclérotique de façon concomitante ⁴⁰³. Les statines exercent d'autres effets, ce qui pourrait également être bénéfique pour la réduction de la calcification. La plupart de ces effets sont attribués à l'amélioration de la fonction des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses vasculaires, ainsi qu'aux voies de coagulation et d'activation plaquettaire. En particulier, les statines améliorent l'activité de la eNOS et augmentent ainsi la production du NO ^{404, 405}. Les statines atténuent la production des ROS induits par l'Ang II ⁴⁰⁶ ce qui atténue également la dégradation du NO ⁴⁰². Elles diminuent l'expression des récepteurs de type 1 de l'Ang II, puissant vasoconstricteur et pro-fibrotique dans les cellules musculaires lisses vasculaires ⁴⁰⁷. En outre, les statines favorisent la vasculogenèse et la formation osseuse ⁴⁰⁸ et inhibent l'apoptose, la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses vasculaires. Enfin, elles diminuent la réponse des lymphocytes T qui conduisent à l'état pro-inflammatoire de l'athérosclérose et exercent ainsi des effets anti-inflammatoires sur la paroi vasculaire ^{404, 409}.

Cependant, l'utilisation des statines à long terme a été associée au développement de la calcification de l'artère coronaire ^{410, 411}. Les statines auraient également un effet néfaste sur les fonctions cognitives mais il existe un désaccord à ce sujet. Une revue des articles parus entre 1992 et 2018 a conclu que les différences méthodologiques pourraient avoir contribué à la divergence des résultats de ces études. L'évaluation de toutes ces études a montré que le déclin cognitif associé aux statines est réel. Les mécanismes susceptibles d'expliquer ces effets indésirables sont la

réduction de la synthèse de la coenzyme Q10 avec l'augmentation conséquente du stress oxydatif, la réduction de la production d'énergie au cerveau et la réduction de la myéline du système nerveux central suite à l'inhibition de la synthèse du cholestérol ²⁶⁹.

5.3 Les antihypertenseurs

Les antihypertenseurs diminuent la rigidité artérielle de par leur effet sur la pression artérielle. Cependant, certaines de ces drogues présentent un effet additionnel sur la compliance des vaisseaux indépendamment de leur effet sur la pression artérielle.

Par exemple, la plupart des études portant sur les IECA montrent un effet favorable sur la compliance vasculaire par rapport aux autres classes d'antihypertenseurs. Cet effet est indépendant de la réduction de la pression artérielle. Ce traitement entraîne la diminution du ratio intima-lumen de la paroi vasculaire ³. L'effet sur la compliance implique l'augmentation de la biodisponibilité du NO en diminuant la synthèse de l'Ang II et en augmentant les taux sériques de bradykinine par l'inhibition de sa dégradation ⁴¹².

Aussi, les antagonistes du récepteur AT1 diminuent la calcification vasculaire au-delà de leurs effets antihypertenseurs. ⁴¹³. Par exemple, le losartan améliore la compliance artérielle ⁴¹⁴ et réduit le ratio media-lumen ⁴¹⁵ indépendamment de son effet sur la pression artérielle. L'Ang II accélère l'ostéoporose grâce à la régulation à la hausse du système RANKL (ligand activateur du récepteur du facteur nucléaire kappaB) dans les ostéoblastes. Le RANKL à son tour contribue à la calcification vasculaire en diminuant l'expression de la MGP et en régulant l'expression de la BMP-2 ainsi que d'autres protéines apparentées à l'os ⁴¹³. Le système Ang II-aldostérone augmente aussi la teneur en collagène et la fibrose impliqués dans les mécanismes physiopathologiques de la rigidité artérielle ^{416, 417}.

Plusieurs études chez l'animal ont démontré que les antagonistes des canaux calciques sont efficaces pour réduire les dépôts de Ca^{2+} artériel dans plusieurs modèles de calcification ³⁰⁰. Les médicaments comme le verapamil et le diltiazem ont montré leur efficacité dans la réduction de la calcification de façon uniforme dans tout l'arbre artériel, alors que la nifédipine et ses dérivés sont plus efficaces pour prévenir la calcification artérielle périphérique ^{418, 419}. Des études impliquant des modèles animaux d'athérosclérose ont également démontré un effet bénéfique des antagonistes des canaux calciques sur les propriétés anti-athérogéniques, mais ils ne sont pas toujours associés à la réduction de la calcification ⁴²⁰.

Chez l'humain, les effets des antihypertenseurs sur la rigidité artérielle peuvent différer selon la méthode d'estimation de la rigidité, la dose et le type du médicament utilisé, la voie d'administration, le degré de réduction de la pression artérielle, la durée du traitement, l'âge et la santé du patient, la maladie touchant la paroi vasculaire et la région du système vasculaire étudié ⁴²¹. Cependant, à part ceux qui agissent sur le système rénine-angiotensine-aldostérone, ces traitements ne sont pas assez efficaces puisqu'ils ne ciblent pas directement les anomalies structurelles et les changements dans la signalisation vasculaire sous-jacente à la rigidité ⁹³.

5.4 Les oestrogènes

Une association inverse entre la progression de la calcification de l'aorte abdominale et la perte de masse osseuse a été démontrée chez les femmes ménopausées. Ainsi, ces femmes sont plus à risque de développer l'ostéoporose et la calcification artérielle ⁴²². Les femmes ménopausées présentant une calcification artérielle ont aussi montré des niveaux sériques d'E2 plus faibles que ceux du groupe témoin ⁴²³. Plusieurs études ont rapporté des effets bénéfiques du traitement hormonal de substitution contre la calcification chez les femmes ménopausées ⁴²⁴⁻⁴²⁶. L'effet de l'E2 des œstrogènes est produit par sa liaison à l'ER α où il inhibe l'apoptose et la calcification des cellules

musculaires lisses vasculaires par l'activation de la transcription de la protéine Gas6 (protéine du gène 6 spécifique d'arrêt de croissance)⁴²⁷ et leur différenciation ostéoblastique en favorisant l'autophagie⁴²⁸. Les œstrogènes inhibent aussi la calcification en inactivant le système RANKL qui contribue à la calcification vasculaire⁴²⁹. Les données actuelles suggèrent que les œstrogènes peuvent avoir des effets bénéfiques, neutres ou néfastes sur le cerveau en fonction de l'âge au moment du traitement, du type de ménopause (naturel par rapport à induit médicalement ou chirurgicalement) ou du stade de la ménopause. Ces données ont donné naissance à l'hypothèse de l'existence d'une période critique de la protection des estrogènes selon laquelle ils doivent être administrés peu après l'arrêt de la fonction ovarienne pour être neuro-vaso-protecteur et exercer des effets positifs^{430, 431}. Les œstrogènes administrés après cette période critique pourraient avoir des effets négatifs. Une explication possible implique la perte du récepteur ER α dans le cerveau résultant de la privation d'hormones à long terme. Cela ne permettrait pas aux estrogènes d'agir⁴³². Le résultat final est que la présence d'œstrogènes pendant la période critique exerce des effets bénéfiques sur la fonction cérébrale et diminue le risque de neurodégénérescence et de déficience cognitive^{357, 433}. À part les œstrogènes, les modulateurs sélectifs des ER possèdent une forte affinité pour les ER α et β et présentent des effets similaires à ceux des œstrogènes sur le système cardiovasculaire et les lipides sanguins^{434, 435}. Le raloxifène notamment, réduit les LDL et abaisse le fibrinogène⁴³⁶. Il pourrait fournir une protection contre la progression de la calcification vu qu'il existe une forte corrélation entre le niveau de fibrinogène plasmatique et la calcification de l'artère coronaire⁴³⁷.

Les phytoestrogènes, composés dérivés de plantes contenant un cycle phénolique qui se lie aux récepteurs et produisent des effets œstrogéniques suscitent un intérêt croissant⁴³⁸. La puérarine, un phytoestrogène extrait du *Radix Puerariae* atténue la calcification en inhibant l'activité de la

phosphatase alcaline, la sécrétion de l'ostéocalcine et l'expression de Runx2 dans les cellules musculaires lisses vasculaires de l'aorte de souris ⁴³⁹.

5.5 La supplémentation

Étant donné le rôle essentiel joué par le stress oxydatif dans la perturbation du fonctionnement endothélial ⁴⁴⁰, l'administration d'antioxydants devrait être une stratégie raisonnable pour traiter le dysfonctionnement endothélial. En effet, la supplémentation en antioxydants, tels que le glutathion, la N-acétylcystéine et la vitamine C a rétabli la fonction endothéliale des artères coronaires et périphériques des patients présentant des facteurs de risque cardiovasculaires et/ou une athérosclérose ⁴⁴¹⁻⁴⁴³. La supplémentation en antioxydant MitoQ, ciblant les mitochondries, améliore la fonction endothéliale vasculaire en réduisant le stress oxydatif dans les mitochondries et améliore la biodisponibilité du NO et la rigidité artérielle chez les souris âgées ⁴⁴⁴. Ces effets ont été confirmés chez l'homme ⁴⁴⁵ ce qui suggère que MitoQ et d'autres stratégies thérapeutiques ciblant le stress oxydatif mitochondrial pourraient être prometteurs pour le traitement de la dysfonction vasculaire liée à l'âge ⁴⁴⁵.

La supplémentation avec la L-arginine, le substrat pour la synthèse de NO, améliorerait la fonction endothéliale ⁴⁴⁶ mais demeure controversée. Une étude récente réalisée chez les jeunes hommes en bonne santé n'a montré aucun effet de la L-arginine sur la rigidité ⁴⁴⁷.

Une méta-analyse des essais cliniques contrôlés et des études longitudinales montre que la supplémentation en VK réduit significativement la calcification vasculaire mais pas la rigidité vasculaire par rapport au groupe témoin. Les conclusions tirées sont limitées par un petit nombre d'études présentant une hétérogénéité substantielle, ce qui justifie la nécessité des essais cliniques plus vastes portant sur l'amélioration de la calcification vasculaire, de la rigidité vasculaire et de la santé cardiovasculaire à long terme par la supplémentation en VK ⁴⁴⁸.

5.6 L'effet de l'exercice physique sur la rigidité artérielle

Plusieurs études ont démontré un effet bénéfique de l'exercice physique sur la rigidité artérielle mais cet effet semble varier en fonction des modalités de l'exercice. Ces études suggèrent que l'exercice comportant une composante aérobique comme la course ou la natation présente un grand effet bénéfique sur la rigidité artérielle chez les hommes âgés et les femmes pré et post ménopausées⁴⁴⁹⁻⁴⁵⁴ ainsi que chez les jeunes adultes⁴⁵⁵. Chez les sujets pré-hypertendus en revanche, l'entraînement aérobique ne réduit pas la rigidité artérielle sauf s'il s'accompagne d'une réduction importante de la pression systolique⁴⁵⁶. Des études portant sur l'entraînement avec des exercices aérobiques avec intervalles à haute intensité, c'est-à-dire des périodes répétées d'exercices intensifs entrecoupées de périodes de récupération de faible intensité, ont donné des résultats divergents. Certains auteurs ont rapporté un effet positif^{449, 457} alors que d'autres n'ont observé aucun effet bénéfique sur la rigidité artérielle⁴⁵². Chez les personnes âgées initialement sédentaires, les entraînements aérobiques avec des périodes de récupération active n'ont pas permis d'améliorer la rigidité artérielle, bien qu'on ait observé une amélioration de la pression sanguine⁴⁵⁸. Contrairement aux exercices aérobiques, les exercices de résistance ont souvent été considérés comme n'améliorant pas la rigidité artérielle chez les personnes d'âge moyen et pourraient même l'aggraver en augmentant l'indice β ou la VOP chez les jeunes⁴⁵⁹⁻⁴⁶¹. Cependant, une meta-analyse récente démontre une réduction de la VOP et suggère que les exercices de résistance n'augmentent pas la rigidité artérielle chez les patients atteints ou présentant un risque de maladies cardiovasculaires et pourraient même être aussi efficaces ou supérieurs aux exercices aérobiques⁴⁶².

L'effet de l'exercice sur la rigidité artérielle a aussi été étudié chez les rongeurs. Chez la souris B6D2F1, un entraînement volontaire sur la roue a permis de diminuer la rigidité artérielle chez les

souris âgées initialement sédentaires ⁴⁶³. Chez le rat Wistar-Kyoto initialement sédentaire, on a observé une réduction de la rigidité aortique suite à un exercice de natation ⁴⁶⁴. Chez le rat Sprague-Dawley également, l'entraînement avec des périodes répétées d'exercices intensifs entrecoupées de périodes de récupération de faible intensité, a entraîné une réduction de la rigidité aortique ⁴⁴⁹. L'exercice aérobique améliore la fonction endothéliale et vasculaire ⁴⁶⁵⁻⁴⁶⁷. L'exercice réduit le stress oxydatif dans les cellules endothéliales vasculaires par une réduction de l'expression de l'enzyme oxydante NADPH oxydase dans les cellules endothéliales et du NFκB ainsi qu'une par l'augmentation de l'expression de l'enzyme antioxydante, la Mn-SOD mitochondriale ⁴⁶⁸. La réduction du stress oxydatif endothélial diminue l'inactivation du NO et augmente sa biodisponibilité ce qui améliore la fonction endothéliale ^{449, 469, 470}.

L'exercice entraîne aussi une augmentation des taux plasmatiques de l'apéline chez les humains ⁴⁷¹. L'apéline et ses récepteurs sont largement exprimés dans divers organes, notamment le cœur, les poumons, le foie, le cerveau, la rétine, la peau, les reins et les tissus adipeux. Dans le système cardiovasculaire, l'apéline joue un rôle important, notamment en améliorant la contractilité cardiaque, en inhibant l'hypertrophie des cardiomyocytes, en favorisant l'angiogenèse et en réduisant l'athérosclérose. L'apéline atténue aussi l'hypertension en modulant les voies de signalisation du NO et le système rénine-angiotensine-aldostérone ⁴⁷².

L'exercice diminue la concentration plasmatique d'ET-1 ce qui peut avoir des effets vasodilatateurs et anti-athérosclérotiques ^{473, 474}. L'effet de l'exercice a été associé à la réduction de collagène I et III et du TGF-β1. Le TGF-β1 joue un rôle clé dans le dépôt de collagène et la rigidité des artères élastiques lors du vieillissement. Cet effet était également associé à la réduction de la calcification vasculaire ⁴⁶³.

Plusieurs traitements et approches thérapeutiques susceptibles d'influencer la rigidité artérielle sont donc disponibles actuellement. Cependant, leur efficacité reste plus ou moins controversée.

6 LA VITAMINE K (VK)

L'intérêt particulier de la VK dans cette étude, relève de son rôle dans le maintien de l'intégrité vasculaire et la prévention de la rigidité artérielle mais aussi de ses effets bénéfiques sur les fonctions cérébrales. Le rôle de la VK dans la fonction vasculaire a notamment été mis en évidence par le traitement avec les anticoagulants oraux antagonistes de la VK (AVK) tel que la warfarine sodique (Coumadin) qui induisent la calcification vasculaire chez les patients traités⁴⁷⁵⁻⁴⁷⁷. Ce traitement est aussi associé à la rigidité artérielle, elle-même liée à la calcification vasculaire⁴⁷⁸⁻⁴⁸⁰. Ces dernières années, plusieurs études ont aussi montré un intérêt croissant pour le rôle de la VK dans les fonctions cérébrales, en particulier les fonctions cognitives. Ces études ont notamment montré qu'un statut vitamini K appauvri ou l'administration d'AVK, sont associés à des effets négatifs sur la cognition⁴⁸¹⁻⁴⁸⁴. Par contre, les anticoagulants non antagonistes de la VK comme l'Apixaban et le Dabigatran ont été associés à un plus faible risque de déclin cognitif par rapport aux AVK⁴⁸⁵. L'effet néfaste de la warfarine sur la cognition a aussi été observé chez le rat⁴⁸⁶.

La VK possède de multiples fonctions et les mieux documentées découlent des protéines "VK dépendantes" (VKDP),⁴⁸⁷. Les VKDP nécessitent la carboxylation post transcriptionnelle dépendante de la VK de leurs résidus glutamate (Glu) en résidus Gla pour être biologiquement actives⁴⁸⁸. La carboxylation des protéines VKD a principalement été associée à la coagulation, car elle avait été initialement observée dans les facteurs de coagulation. Les défauts de carboxylation des facteurs de coagulation II, VII, IX et X, ainsi que des protéines anticoagulantes C, S et Z provoquent des troubles de la coagulation⁴⁸⁹. Avec la découverte de nouvelles protéines Gla, l'importance des VKDP a été étendue au-delà de la coagulation pour englober d'autres protéines

extra-hépatiques comme l'ostéocalcine, la MGP, la GRP, la protéine S (PS) et la protéine Gas6⁴⁸⁹,
490.

6.1 Structure de la VK

La VK représente une famille de composés dont tous possèdent un noyau commun 2-méthyl-1,4-naphtoquinone, mais dont les structures des chaînes aliphatiques en position 3, diffèrent. La phylloquinone ou VK₁ se caractérise par un résidu d'isoprényle en position 3 et elle est exclusivement synthétisée dans les plantes vertes. Les ménaquinones (VK₂) comprennent un éventail de formes apparentées, les ménaquinone-n (MK-n), où « n » correspond au nombre de groupes isoprényles non saturés. Les bactéries synthétisent les ménaquinones à longues chaînes, les MK-7 à MK-10 étant les formes les plus courantes. La MK-4 se trouve principalement dans les produits animaux (viande, produits laitiers) et provient de la conversion à la fois de la VK₁ et de la ménadione (ou VK₃, une forme synthétique hydrosoluble ajoutée aux aliments pour animaux)⁴⁹¹. La VK₁, la MK-4 et la MK-7 sont disponibles dans le commerce et vendues comme suppléments^{488, 492}.

6.2 Cycle de la VK

Tel que mentionné brièvement plus haut, la VK participe à titre de cofacteur à l'activation biologique d'une famille de protéines, les VKDP. Quatre composantes clés sont impliquées dans leur biosynthèse : les enzymes gamma-glutamyl carboxylase (GGCX) et le complexe VK oxydo-réductase (VKOR), la VK et une protéine précurseur. La VK est utilisée comme cofacteur par l'enzyme GGCX sous la forme réduite, la VK hydroquinone (KH₂) lors de la réaction de carboxylation. La KH₂ est convertie en VK 2,3-époxyde (KO) qui est ensuite réduite en VK et en vitamine KH₂ en deux réactions par l'action de la VKOR. La réduction de la VK en KH₂ est

effectuée par deux voies : une voie qui implique le thiol comme cofacteur et une deuxième voie qui utilise le NAD(P)H comme cofacteur ⁴⁹³. L'ensemble de ces réactions permet de recycler la VK i.e. cycle de la VK (Figure 4) ^{490, 494}. Cette carboxylation augmente l'affinité des protéines pour le Ca²⁺, formant une liaison nécessaire aux interactions moléculaires protéine-protéine ou protéine-membrane ⁴⁹⁵.

La warfarine, bloque en partie l'action de la VKOR ce qui entraîne une carence fonctionnelle en VK. Il en résulte un défaut de carboxylation des protéines extra-hépatiques. Toutefois, il existe une VK réductase dépendante de NADPH qui est spécifique au foie et insensible à l'action inhibitrice de la warfarine en présence des doses massives de VK. Elle assure la transformation de la VK quinone en KH2 et assure donc la carboxylation des protéines VKD hépatiques ^{493, 496, 497}.

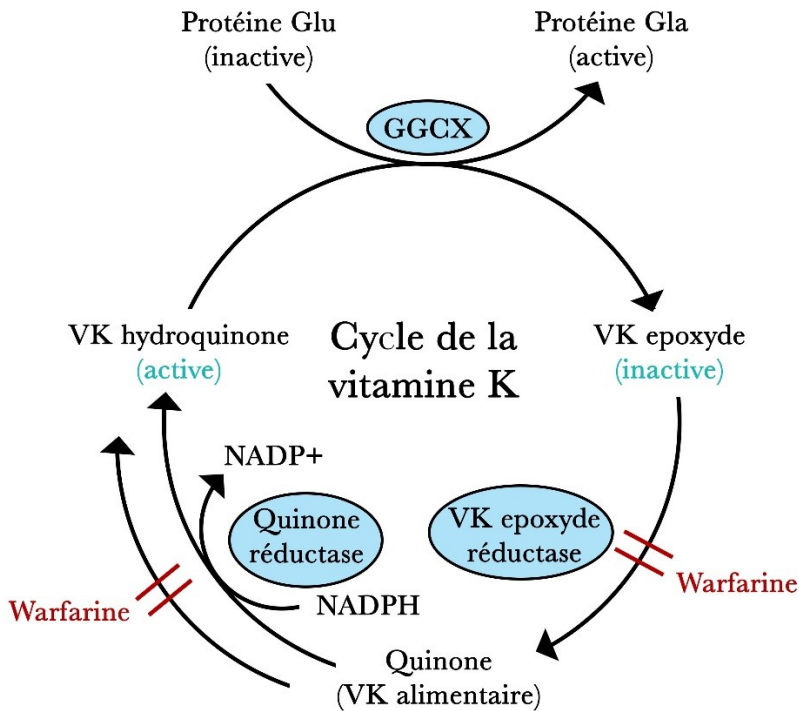


Figure 4: Cycle de la Vitamine K. Les résidus d'acide glutamique (Glu) liés aux protéines sont transformés en résidus d'acide γ -carboxy glutamique (Gla) par l'enzyme γ -glutamyl carboxylase (GGCX). La forme de VK active comme cofacteur de la GGCX est la forme réduite de la VK hydroquinone (KH₂). Au cours de la carboxylation, les protéines carboxylées sont sécrétées dans la circulation et la KH₂ devient oxydée en VK époxyde (KO). L'époxyde est réduit en VK quinone par l'enzyme VKOR. La quinone est ensuite réduite en KH₂ pour compléter le cycle. La réduction de quinone en KH₂ peut être obtenue par la VKOR ou par une quinone réductase dépendante de NADPH. La warfarine inhibe la VKOR mais pas la quinone réductase. L'activité alternative de la quinone réductase permet de contourner l'inhibition de la VKOR par la présence de doses massives de VK.

6.3 Rôle des protéines VK dépendantes (VKDP) dans le système cardiovasculaire

6.3.1 Protéine gla de la matrice (*Matrix Gla Protein*; MGP)

La MGP est un puissant inhibiteur de la calcification présent dans le cartilage et la paroi vasculaire, où elle est synthétisée par les chondrocytes et les cellules musculaires lisses vasculaires^{498, 499}. La MGP contient 5 résidus Gla dont la carboxylation contribue à leur fonction d'inhibiteur de la calcification⁵⁰⁰. La carence en VK causée par une carence nutritionnelle ou le traitement à la warfarine, entraîne une sous-carboxylation de la MGP ce qui a été associé à de la calcification vasculaire⁵⁰¹⁻⁵⁰³. Le rôle de la MGP dans la prévention de la minéralisation vasculaire a été révélé dans un modèle de souris transgéniques où le gène codant pour MGP avait été éliminé⁵⁰⁴. Ces souris sont nées à terme, mais sont mortes dans les 8 semaines suivant la naissance suite à la rupture des gros vaisseaux, massivement minéralisés. L'examen a révélé une fragmentation et une calcification des fibres élastiques ainsi qu'une perte du phénotype contractile des cellules musculaires lisses et leur trans-différenciation en cellules ostéochondrogéniques. Ce phénotype vasculaire ne pouvait être renversé que si la MGP était restaurée localement dans les cellules musculaires lisses et si la MGP était gamma-carboxylée⁵⁰⁴, ce qui suggère que la MGP agit localement pour inhiber la calcification vasculaire et que son activité dépend de la présence des résidus Gla^{505, 506}. Le mécanisme d'action de la MGP repose sur sa liaison à la BMP-2 impliquée dans le développement de l'os et du cartilage^{507, 508}.

La MGP existe sous diverses formes selon son état de carboxylation et / ou de phosphorylation : la forme carboxylée mais non phosphorylée (dp-cMGP), la forme phosphorylée mais non carboxylée (p-ucMGP), la forme active phosphorylée et carboxylée (p-cMGP) et la forme totalement inactive non carboxylée et déphosphorylée (dp-ucMGP).⁵⁰⁹ La MGP inactive (dp-ucMGP) est un biomarqueur du statut vitaminique K fréquemment utilisé lorsque les fonctions

cardiovasculaires sont étudiées. Certaines études ont montré que les taux de dp-ucMGP sont très élevés chez les patients hémodialysés et sont en corrélation avec les marqueurs de la calcification vasculaire ⁵¹⁰.

6.3.2 La protéine du gène 6 spécifique d'arrêt de croissance (Gas6)

La protéine Gas6 est une VKDP impliquée dans plusieurs processus physiologiques ^{511, 512}. Elle est un ligand de la famille des récepteurs TAM (récepteurs TYRO3, AXL et MERTK) ⁵¹³⁻⁵¹⁵, le récepteur Axl ayant la plus forte affinité pour Gas6, suivi de Tyro3 et Mer ⁵¹⁶.

La protéine Gas6 et ses récepteurs sont exprimés par les fibroblastes mais aussi par les cellules progénitrices myéloïdes ⁵¹⁷, la plupart des cellules du système immunitaire, notamment les macrophages, les granulocytes et les cellules dendritiques, ainsi que par les cellules endothéliales ^{518, 519}.

Dans le système vasculaire, la protéine Gas6 présente des actions signalitiques nécessaires à ses fonctions. La liaison Gas6 / Axl active les molécules de signalisation telles que la PI3K / Akt ⁵²⁰, la protéine kinase activée par le stress (SAPK)/ c-Jun NH2-terminal kinase (JNK), protéine-kinase p38 activée par des mitogènes (p38) et le transducteur du signal de janus kinase (JAK) et le facteur-5 transducteur du signal et activateur de la transcription (STAT) ⁵²¹⁻⁵²³.

La liaison de Gas6 à son récepteur Axl conduit à la modulation de fonctions cellulaires importantes telles que l'inhibition de l'apoptose ⁵²⁴. Dans les cellules musculaires lisses vasculaires, il a été montré que les statines ainsi que la VK₂ réduisaient la calcification induite par le phosphate inorganique de façon dose-dépendante en inhibant l'apoptose par la restauration de la voie Gas6-Axl ^{409, 525}. De plus, Gas6 favorise la clairance des corps apoptotiques ^{526, 527}. Les corps apoptotiques dérivés des cellules musculaires lisses vasculaires peuvent jouer un rôle dans la formation de cristaux de Ca²⁺ ⁵²⁸. La protéine Gas6 joue aussi un rôle dans la promotion de la

migration et la prolifération cellulaire impliquées dans l'athérogenèse ^{529, 530}. Gas6 possède également une action anti-inflammatoire et réduit l'expression des cytokines pro-inflammatoires ^{515, 531}. Elle joue un rôle dans la stabilisation des plaques d'athérosclérose en partie en réduisant le phénotype pro-inflammatoire des cellules musculaires lisses vasculaires ⁵³². Une étude clinique récente a démontré que des concentrations élevées de Gas6 circulantes chez les participants présentant des facteurs de risque cardiovasculaire (i.e. diabète, obésité) étaient indépendamment associées à une réduction de la taille des plaques d'athérosclérose dans l'artère carotide ⁵³³.

La protéine Gas6 présente aussi des actions bénéfiques au niveau du cerveau et ces actions seront discutées dans la section [6.4.1](#).

6.3.3 Protéine S (PS)

La PS partage les mêmes récepteurs TAM que Gas6 ^{514, 515}. Les cellules endothéliales vasculaires sont une source majeure de PS circulante ⁵³⁴ mais elle peut être produite par d'autres cellules telles que les hépatocytes, les mégacaryocytes et les ostéoblastes ⁵¹⁵. Avant l'identification de ses récepteurs, il a été démontré que la PS humaine possédait une activité mitogène sur les cellules musculaires lisses vasculaires ⁵³⁵. De plus, la PS favorise la phagocytose des cellules apoptotiques par les macrophages en se liant à la phosphatidylsérine exprimée à la surface des cellules apoptotiques ou par la liaison du complexe formé avec la protéine de liaison de C4b i.e. une protéine inhibitrice du complément, aux cellules apoptotiques ^{536, 537}. Par cette action, PS participe à l'inhibition de la calcification vasculaire ⁵⁰². La PS est aussi présente dans le cerveau et ses effets seront également discutés à la section [6.4.1](#).

6.3.4 Protéine riche en Gla (*Gla rich protein*; GRP)

La GRP est une VKDP récemment découverte, d'abord isolée à partir du cartilage calcifié de l'esturgeon de l'Adriatique (*Acipenser naccarii*). Dans cette espèce, cette protéine contient 16 résidus Gla dans sa séquence de 74 résidus, nombre le plus élevé de Gla de toutes les VKDP connues, d'où son nom de protéine riche en Gla⁵³⁸. Chez l'humain, la GRP entièrement carboxylée peut contenir 15 Gla⁵³⁸. La séquence protéique de la GRP est hautement conservée, avec 78% d'identité entre l'esturgeon et l'humain⁵³⁸. Les cellules exprimant la GRP comprennent les chondrocytes, les chondroblastes, les ostéoblastes et les ostéocytes. La GRP a aussi été observée chez le rat notamment dans le cartilage, les tissus osseux et mous mais aussi en circulation. Chez l'humain, cette protéine est aussi en circulation et est également exprimée dans les tissus mous comme la peau et le système vasculaire⁵³⁹. En raison de son potentiel de liaison au Ca²⁺ via les résidus Gla, la GRP pourrait jouer un rôle dans la régulation du Ca²⁺ dans l'environnement extracellulaire et influencer directement le processus de la minéralisation tissulaire^{538, 539}. Notamment, il a récemment été rapporté que la GRP pourrait réguler les cytokines pro-inflammatoires TNF α , IL-1 β et NF κ B et jouer le rôle de médiateur moléculaire liant les événements d'inflammation et de calcification, avec une application thérapeutique potentielle^{540, 541}.

Les protéines VKD préviendraient donc les complications liées aux maladies cardiovasculaires notamment la calcification vasculaire, l'apoptose et l'inflammation. Cela protégerait le cerveau contre les effets de ces complications et de préserver ses fonctions importantes.

6.4 VK et cerveau

6.4.1 Les protéines VK dépendantes (VKDP)

Deux VKDP ont été étroitement associées au système nerveux, à savoir Gas6 et, dans une moindre mesure, PS. Leurs actions de signalisation cellulaire dans les neurones, la glie (Gas6) ainsi que l'activité antithrombotique (PS) pourraient influencer le processus cognitif sous-jacent ⁵⁴². Au niveau neuronal, Gas6 contribue à la migration des neurones de l'hormone de libération des gonadotrophines (GnRH), migration responsable de la maturation sexuelle ⁵⁴³. Il a également été démontré que Gas6 protège les neurones corticaux et les oligodendrocytes contre l'apoptose induite respectivement par la protéine amyloïde β ($A\beta$) et par le TNF α *in vitro* ^{544, 545}. Cette action protectrice procéderait de l'activation du récepteur Axl et de la voie de signalisation PI3-K / Akt ⁵⁴⁵. La protéine Gas6 posséderait également une action anti-inflammatoire. En effet, dans une étude *in vitro* réalisée sur les cellules microgliales, il a été montré que Gas6 supprime les réponses inflammatoires en diminuant l'expression des médiateurs pro inflammatoires, iNOS et IL-1 β induite par les lipopolysaccharides (LPS) ⁵⁴⁶. Dans un modèle d'encéphalomyélite, Gas6 a un effet neuroprotecteur en atténuant la réponse inflammatoire, préservant ainsi l'intégrité axonale et la myélinisation ⁵⁴⁷. Dans un modèle *in vitro* de démyélinisation induite par la lysolécithine, et dans un modèle *in vivo* de démyélinisation induite par le cuprizone, Gas6 a favorisé la remyélinisation et a augmenté la maturation des cellules progénitrices des oligodendrocytes via les récepteurs Tyro3 *in vitro* et Axl *in vivo* ⁵⁴⁸⁻⁵⁵¹.

La PS est connue pour son rôle dans la coagulation sanguine en tant que cofacteur de la protéine C-réactive ⁵⁵², mais elle est aussi exprimée dans le cerveau ⁵⁵³. Grâce à ses fonctions antithrombotiques, la PS offre une protection neuronale et assure l'intégrité vasculaire en protégeant la BHE contre les dommages hypoxiques et ischémiques, à la fois *in vitro* et *in vivo*.

^{554, 555}. Cette protection passe par la voie de signalisation Tyro3-Akt ^{554, 556, 557}. Enfin, la PS joue un rôle dans la neurogenèse en tant que facteur pro-neurogène et en assurant l'équilibre entre la quiescence et la prolifération des cellules souches neurales ⁵⁵⁸.

Gas6 et PS participent donc à l'homéostasie cérébrale grâce à leurs actions de signalisation cellulaire, à leurs fonctions anti-apoptotiques, anti-inflammatoires et/ou antithrombotiques.

6.4.2 Biosynthèse des Sphingolipides

Au cerveau, la VK participe à la synthèse des sphingolipides, une famille de lipides très présents dans les membranes des cellules cérébrales où ils sont des composantes majeures des membranes cellulaires ^{559, 560}. Les principaux sphingolipides sont les céramides, la sphingomyéline, les cérébrosides, les sulfatides et les gangliosides ⁵⁶¹. Au-delà de leur rôle structurel, les sphingolipides sont impliqués dans la prolifération, la différenciation, la sénescence et l'interaction cellulaire ⁵⁶². Des altérations du métabolisme des sphingolipides ont été associées au processus de vieillissement ⁵⁶³ et à des troubles neurodégénératifs tels que la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson ^{559, 564}. Le rôle spécifique de la VK se situe dans l'activation de la 3-Kétodihydrosphingosine synthase, l'enzyme impliquée dans l'étape initiale de la biosynthèse des sphingolipides ⁵⁶⁵. Le traitement à la warfarine perturbe la biosynthèse des sphingolipides ⁵⁶⁶ mais cet effet est inversé pas l'administration de VK ^{566, 567}. Il a été également possible de moduler la synthèse des sphingolipides par la VK alimentaire. Des animaux ayant reçu un régime riche en VK ont montré une concentration plus élevée de sulfatides, effet observé avec la phylloquinone et la MK-4 comme source de VK ⁵⁶⁸. Une étude ultérieure réalisée chez des rongeurs a rapporté des corrélations positives entre les concentrations de MK-4 dans le cerveau et celles des sulfatides et sphingomyéline alors qu'une corrélation négative était observée avec les concentrations de gangliosides ⁵⁶⁹. Chez des animaux âgés ayant reçu un régime pauvre en VK₁ tout au long de leur

vie, on a observé des concentrations plus élevées de céramides dans l'hippocampe et des concentrations réduites de gangliosides dans la médulla et le tronc cérébral ⁵⁷⁰.

Par son rôle dans la biosynthèse des sphingolipides, la VK contribue au bon fonctionnement du cerveau.

6.4.3 VK et fonctions cognitives

Plusieurs études ont montré l'effet de la VK sur les fonctions cognitives. Chez le rat, des animaux âgés ayant reçu un régime alimentaire pauvre en VK₁ depuis le sevrage ont montré des performances d'apprentissage réduites au test de la piscine de Morris lorsque comparés aux rats ayant reçu des régimes adéquats ou enrichi en VK₁. Les altérations cognitives induites par la VK observées chez les animaux âgés étaient associées à des concentrations plus élevées de céramides dans l'hippocampe et des faibles concentrations de gangliosides dans le médulla et le mésencéphale ⁵⁷⁰. Dans une autre étude plus récente, les troubles cognitifs ont également été observés indépendamment de l'âge dans un modèle de warfarine- VK₁ qui induit une déficience de VK extra-hépatique de façon aiguë. Dans cette étude, les troubles cognitifs étaient également associés à une altération des sphingolipides au niveau du cerveau ⁴⁸⁶. Chez l'humain, une analyse détaillée de la consommation de VK₁ chez les patients aux premiers stades de la maladie d'Alzheimer rapportait que des apports significativement plus faibles chez les patients lorsque comparés aux sujets du groupe témoin ⁵⁷¹. Une autre étude menée auprès de femmes atteintes de la maladie d'Alzheimer rapportait des taux plasmatiques de VK₁ significativement plus faibles comparativement à ceux des sujets témoins. De plus, parmi les patients, la concentration sérique de VK₁ était positivement corrélée à la cognition ⁵⁷². Chez les personnes âgées en santé et sans atteintes cognitives, un apport alimentaire plus élevé en VK₁ a été associé à de meilleures performances cognitives ⁵⁷³. Par ailleurs, dans une étude pilote réalisée chez des patients

gériatriques, l'utilisation des AVK était associée aux troubles cognitifs ⁵⁷⁴. Dans une autre étude plus récente, une évaluation des effets de l'utilisation des AVK sur les fonctions cognitives et exécutives chez les personnes âgées a montré un dysfonctionnement exécutif après 24 mois chez les patients gériatriques utilisant des AVK toutefois, sans déclin cognitif ^{481 575}.

Toutes ces études chez les animaux et les humains ont permis d'établir un lien direct entre les niveaux de VK et les performances cognitives.

6.4.4 Autres actions potentielles de la VK

En plus de ses actions modulées par les VKDP et les sphingolipides, la VK posséderait d'autres actions au niveau du cerveau. La MK-4 et, dans une moindre mesure, la VK₁ ont pu prévenir l'accumulation des radicaux libres et la mort cellulaire causés par la déplétion du glutathion dans les cultures primaires de précurseurs d'oligodendrocytes et de neurones corticaux fœtaux immatures ⁵⁷⁶. Les deux vitamères K ont également été associés à la survie de différents types de cellules neuronales (cortex, hippocampe et striatum) aux stades ultérieurs de l'embryogenèse ⁵⁷⁷. Par ailleurs, la MK-4 semble posséder une action protectrice dans les processus inflammatoires. *In vitro*, il a été montré que la MK-4 limite la production d'IL-6 dans les fibroblastes humains en culture ⁵⁷⁸. Chez l'animal, la MK-4 a permis de limiter l'inflammation dans le modèle d'encéphalomyélite ⁵⁷⁹, tandis que la VK₁ a été associée à une réduction de l'inflammation dans le modèle d'inflammation induite par LPS chez le rat ⁵⁸⁰. Cette activité anti-inflammatoire de la VK, notamment celle de la MK-4, a été associée à une inhibition de la voie de signalisation du NFκ-B ⁵⁸¹. Enfin, des études épidémiologiques ont montré qu'un état nutritionnel élevé en VK était associé à des niveaux plus faibles de marqueurs pro-inflammatoires tels l'IL-6, la molécule d'adhésion intracellulaire-1, le récepteur du facteur de nécrose tumoral et la protéine C-réactive ^{582, 583}.

La VK possède donc des fonctions bénéfiques au cerveau via les protéines VKD et son rôle dans le métabolisme des sphingolipides mais pourrait également s'avérer protectrice par le biais d'actions spécifiques de ses vitamines.

7 OBJECTIFS

L'objectif de cette thèse était de caractériser les effets de la rigidité artérielle sur le cerveau en utilisant le modèle murin de rigidité artérielle basé sur la calcification de la carotide. Ensuite nous avons cherché à déterminer le dimorphisme sexuel de l'effet de la rigidité artérielle sur le débit sanguin cérébral. Enfin, nous avons exploré le potentiel de la VK à prévenir la rigidité artérielle et nous avons étudié ses effets sur le cerveau.

Les objectifs spécifiques étaient de:

- Déterminer si la rigidité de la carotide pouvait induire des troubles cognitifs et des lésions cérébrovasculaires notamment une altération de l'intégrité de la BHE, une diminution du débit sanguin cérébral et de la densité cérébrovasculaire, des microhémorragies cérébrales et des pathologies A β et tau. Nous avons aussi déterminé le moment d'apparition de ces lésions, afin de comprendre si les troubles cognitifs surviennent consécutivement aux lésions cérébrovasculaires induites par la rigidité artérielle;
- Étudier l'effet du sexe en déterminant si l'E2 protège les femelles en prévenant l'altération du débit sanguin cérébral et les propriétés mécaniques vasculaires dans le modèle de rigidité artérielle;
- Évaluer l'effet potentiellement bénéfique de la VK (K₁ et MK-4) sur la fonction cérébrale dans le modèle de rigidité artérielle en déterminant si la VK, aux doses étudiées, prévient la calcification de la carotide, la baisse du débit sanguin cérébral au repos ainsi que le déficit cognitif.

8 HYPOTHÈSES

Les hypothèses de cette thèse étaient les suivantes :

- La rigidité artérielle induirait des lésions cérébrovasculaires dans les régions du cerveau impliquées dans la cognition et ces lésions surviendraient avant l'apparition des troubles cognitifs;
- L'E2 préviendrait l'altération de la réponse cérébrovasculaire par la rigidité artérielle chez les femelles, et sa suppression par l'ovariectomie rendrait les femelles aussi vulnérables que les mâles;
- La VK, par ses actions au niveau vasculaire et cérébral, permettrait de réduire la calcification artérielle et préviendrait l'altération du débit sanguin cérébral au repos ainsi que les troubles de la mémoire dans le modèle de rigidité artérielle.

DEUXIEME PARTIE : PUBLICATIONS

Étude 1: La rigidité artérielle causée par la calcification de la carotide perturbe la régulation du flux sanguin cérébral et conduit au déficit cognitif

Par

Gervais Muhire, M. Florencia Iulita, Diane Vallerand, Jessica Youwakim, Maud Gratuze, Franck R. Petry, Emmanuel Planel, Guylaine Ferland, et Hélène Girouard.

Résumé

La rigidité artérielle est associée au déclin cognitif et à la démence. Cependant, les mécanismes précis par lesquels elle affecte le cerveau restent méconnus. À l'aide d'un modèle murin de rigidité artificielle basé sur la calcification de la carotide, nous avons étudié les mécanismes pouvant contribuer à la dégénérescence du cerveau suite à la rigidité artérielle. Deux semaines après la calcification, la rigidité de la carotide a atténué le débit sanguin cérébral au repos dans plusieurs régions du cerveau, y compris le cortex périrhinal/ entorhinal, l'hippocampe et le thalamus, tel que déterminé par autoradiographie. La calcification de la carotide a altéré l'autorégulation cérébrale et diminué les réponses du débit sanguin à l'activité neuronale et à l'acétylcholine, examinées par débitmétrie laser Doppler. La rigidité de la carotide a significativement affecté la mémoire spatiale à 3 semaines, mais pas à 2 semaines post-chirurgie, ce qui suggère que les atteintes cérébrovasculaires précèdent les dysfonctions cognitives. Parallèlement aux déficits endothéliaux, la rigidité de la carotide a entraîné une augmentation de la perméabilité de la BHE dans l'hippocampe. Cette région ainsi que le cortex somatosensoriel présentaient également une réduction du nombre de vaisseaux. Aucun signe de microhémorragie cérébrale n'était présent. La rigidité de la carotide n'a pas montré d'effet sur la production d'A β ni sur la phosphorylation de la protéine tau, bien qu'elle ait entraîné une augmentation modeste du rapport A β 40 / A β 42 dans

le cortex frontal. Ces résultats suggèrent que la rigidité de la carotide altère la microcirculation cérébrale et augmente la perméabilité de la BHE conduisant au déficit cognitif. Par conséquent, la rigidité artérielle devrait être considérée comme une cible pertinente pour protéger le cerveau et prévenir les dysfonctionnements cognitifs.

Contributions : GM, MFI, DV, JY, MG, FRP et HG ont effectué des expériences et analysé des données. MG, FRP et EP ont fourni une assistance pour la conception et la réalisation de l'analyse de protéine tau. GF a fourni des conseils pour les études comportementales. L'étude a été conçue par GM, MFI, DV et HG. Tous les auteurs ont contribué à la rédaction et à la révision du manuscrit.

Arterial Stiffness Due to Carotid Calcification Disrupts Cerebral Blood Flow Regulation and Leads to Cognitive Deficits

Gervais Muhire, MSc;* M. Florencia Iulita, PhD;* Diane Vallerand, BSc; Jessica Youwakim, BSc; Maud Gratuze, PhD; Franck R. Petry, PhD; Emmanuel Planel, PhD; Guylaine Ferland, PhD; Hélène Girouard, PhD

Background—Arterial stiffness is associated with cognitive decline and dementia; however, the precise mechanisms by which it affects the brain remain unclear.

Methods and Results—Using a mouse model based on carotid calcification this study characterized mechanisms that could contribute to brain degeneration due to arterial stiffness. At 2 weeks postcalcification, carotid stiffness attenuated resting cerebral blood flow in several brain regions including the perirhinal/entorhinal cortex, hippocampus, and thalamus, determined by autoradiography ($P < 0.05$). Carotid calcification impaired cerebral autoregulation and diminished cerebral blood flow responses to neuronal activity and to acetylcholine, examined by laser Doppler flowmetry ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Carotid stiffness significantly affected spatial memory at 3 weeks ($P < 0.05$), but not at 2 weeks, suggesting that cerebrovascular impairments precede cognitive dysfunction. In line with the endothelial deficits, carotid stiffness led to increased blood-brain barrier permeability in the hippocampus ($P < 0.01$). This region also exhibited reductions in vessel number containing collagen IV ($P < 0.01$), as did the somatosensory cortex ($P < 0.05$). No evidence of cerebral microhemorrhages was present. Carotid stiffness did not affect the production of mouse amyloid- β (A β) or tau phosphorylation, although it led to a modest increase in the A β ₄₀/A β ₄₂ ratio in frontal cortex ($P < 0.01$).

Conclusions—These findings suggest that carotid stiffness alters brain microcirculation and increases blood-brain barrier permeability associated with cognitive impairments. Therefore, arterial stiffness should be considered a relevant target to protect the brain and prevent cognitive dysfunctions. (*J Am Heart Assoc.* 2019;8:e011630. DOI: 10.1161/JAHA.118.011630.)

Key Words: arterial stiffness • blood-brain barrier • carotid calcification • cerebral blood flow • cognitive impairment

Epidemiologic studies have associated large-artery stiffness to cognitive decline and dementia, such as Alzheimer disease.^{1–5} Stiffness in large elastic arteries refers to the reduced capability of these vessels to buffer the pulsatile blood flow that arises with each heart contraction (also known as Windkessel effect) and comprises several mechanisms affecting arterial flexibility, such as calcification, endothelial dysfunction, fibrosis, atherosclerosis, and vascular remodeling.

Despite the evidence associating arterial stiffness with cognitive decline, the precise mechanisms of brain dysfunction

induced by arterial stiffness remain largely unknown. This is partly because, in humans, arterial stiffness is accompanied by other conditions that can affect the brain and that also arise during aging (eg, hypertension, diabetes mellitus), making it difficult to dissect the contribution of each individual parameter.

To examine this, we previously developed a new murine model of arterial stiffness based on carotid calcification.⁶ The advantage of this model over previous ones is that it is the only model in which the elements making the arteries stiffer do not affect the brain in parallel. Specifically, the animals do

From the D epartements de Pharmacologie et Physiologie (G.M., D.V., J.Y., H.G.), Neurosciences (M.F.I.), and Nutrition (G.F.) and Groupe de Recherche sur le Système Nerveux Central (M.F.I., H.G.), Université de Montréal, Québec, Canada; Département de Psychiatrie et Neurosciences, Université Laval, Québec, Québec, Canada (M.G., F.R.P., E.P.); Centre de Recherche du CHU de Québec, Québec, Québec, Canada (E.P.); Centre de Recherche de l'Institut de Cardiologie de Montréal, Montréal, Québec, Canada (G.F.); Centre de Recherche de l'Institut Universitaire de Gériatrie de Montréal, Montréal, Québec, Canada (H.G.).

Accompanying Data S1, Tables S1 and S2, and Figures S1 through S3 are available at <https://www.ahajournals.org/doi/suppl/10.1161/JAHA.118.011630>

*Mr Muhire and Dr Iulita contributed equally to this work.

Correspondence to: Hélène Girouard, PhD, Département de Pharmacologie et Physiologie, Université de Montréal, Pavillon Roger-Gaudry, 2900 Édouard-Montpetit, Montréal, Québec, Canada H3T 1J4. E-mail: helene.girouard@umontreal.ca

Received November 30, 2018; accepted April 15, 2019.

  2019 The Authors. Published on behalf of the American Heart Association, Inc., by Wiley. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.

Clinical Perspective

What Is New?

- This study is the first demonstration of a direct cause-effect relationship between arterial stiffness and cerebrovascular alterations.

What Are the Clinical Implications?

- The knowledge that peripheral arterial stiffness alters cerebral blood flow regulation and the integrity of the cerebral vasculature suggests that targeting arterial stiffness could protect the brain of the elderly and hypertensive patients.

not develop increases in systolic blood pressure or narrowing of the carotid radius, which can themselves result in brain damage independently of stiffness. Mice with carotid calcification develop typical features of arterial stiffness such as decreased arterial compliance and distensibility, increased intima-media thickness, and elastin fragmentation,⁶ with a beta index comparable to that of a 75 years-old human.⁷

Besides developing increased carotid stiffness, mice with carotid calcification exhibit increased blood flow pulsatility in large and medium-sized cerebral vessels,⁶ which could potentially compromise the cerebral microcirculation and impact cognition. Whether arterial stiffness independently of other factors is sufficient to affect higher brain functions, such as learning and memory, is unclear. Likewise, whether disruption of cerebral blood flow (CBF) regulation precedes the negative effects of arterial stiffness on brain function has not been examined.

This is important considering that the vertebrate brain is highly vascularized, and continued perfusion is central to meeting its high metabolic demand. Thus, the brain relies on 3 major regulatory mechanisms: (1) autoregulation, (2) neurovascular coupling, and (3) endothelial regulation.⁸ Cerebrovascular autoregulation is the process by which CBF remains constant within a certain range of arterial pressures (60–120 mmHg).⁹ This is an important regulatory control given that blood pressure exhibits circadian variations (eg, during sleep) and may also vary during daily activities (eg, exercise), which could potentially impact on cerebral perfusion. Neurovascular coupling is the dynamic link that combines the increase in neural activity to a vasodilatory response.¹⁰ Impairments in neurovascular coupling affect the delivery of nutrients (oxygen, glucose) to active brain cells and slow the clearance of brain metabolites, including potentially toxic ones, which could lead to brain dysfunction. Finally, cerebral endothelial cells are vital for the regulation of vascular tone¹¹ and for the integrity of the blood-brain barrier,

whose function is key to the maintenance of brain homeostasis.¹² Neurovascular alterations, at the level of the blood-brain barrier or attributable to reduced cerebral perfusion, have been identified as key mechanisms for the reduced clearance, and hence buildup, of brain amyloid- β (A β) peptides in Alzheimer disease.^{13,14}

To provide a deeper understanding of the mechanisms by which arterial stiffness affects the brain, we performed an *in vivo* study in mice to examine whether carotid stiffness is sufficient to impair cognition, resting CBF, and regulated cerebrovascular responses. We further characterized potential mechanisms that could contribute to brain degeneration caused by carotid stiffness, by examining the integrity of the blood-brain barrier, cerebral microhemorrhages, and cerebrovascular density as well as A β and tau pathologies, the 2 main hallmarks of Alzheimer disease. A better understanding of the temporal development of these alterations is crucial for the identification of relevant targets to protect the brain in vulnerable populations with high arterial stiffness, such as the elderly and hypertensive individuals.

Methods

This article adheres to the Transparency and Openness Promotion guidelines. All data, methods, and materials used to conduct the research are available from the corresponding author upon reasonable request.

Animals

All procedures were approved beforehand by the Animal Care Committee of Université de Montréal and were performed in accordance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care and the Animal Research Reporting of *In Vivo* Experiments guidelines. Ten- to 12-week-old C57BL/6 male mice (Charles River Laboratories, Saint-Constant, Canada) were housed individually in a temperature-controlled room and maintained on a 12-hour light/12-hour dark cycle with *ad libitum* access to water and a standard rodent diet (Envigo #2018 Teklad global 18% protein rodent diet). Examinations of sex differences on the effects of carotid stiffness on brain function are part of a separate study. Following acclimation, mice were randomly assigned to 2 groups receiving either a periarterial application of NaCl (control group) or CaCl₂ (carotid stiffness group). Based on previous experiments on analysis of CBF and cognition, it was determined that a minimum of n=6 mice per group would be required. For all other exploratory analyses, a minimum of n=4 mice per group were used. For each experiment, the number of animals is specified in the text and figure legends. Exclusion criteria are detailed in the corresponding experimental sections. Experimental analyses were done on the right side of the brain

(corresponding to the side of the calcified carotid) and compared with a noncalcified control group rather than to the left side in calcified mice, given that we have previously observed increases in blood flow pulsatility in this hemisphere, although to a smaller extent than that of the right side.⁶

Carotid Calcification

Animals were handled during the 2 days preceding the surgery. Mice were anesthetized with a mixture of ketamine/xylazine (90 mg/kg; 6 mg/kg; CDMV, Saint-Hyacinthe, Canada) and the right common carotid artery was carefully isolated and a small piece of sterile parafilm was slid underneath. A sterile gauze (5×5 mm) soaked in 0.3 mol/L CaCl₂ (Sigma-Aldrich, Oakville, Canada) was applied on the carotid artery for 20 minutes. The gauze and parafilm were then removed and the incision sutured. Control animals received a sterile compress soaked in 0.9% NaCl in identical conditions. Carprofen (Rimadyl, 5 mg/kg; CDMV, Saint-Hyacinthe, Canada) was injected subcutaneously as the primary anti-inflammatory analgesic after the surgery and was administered every 24 hours during 2 consecutive days. The day of the surgery, mice also received bupivacaine hydrochloride (Marcaine, 4 mg/kg subcutaneous injection; CDMV, Saint-Hyacinthe, Canada) at the site of the incision, and trimethoprim sulfadiazine (Tribrissen, 30 mg/kg subcutaneous injection; CDMV, Saint-Hyacinthe, Canada) every 24 hours for 3 days to prevent infections. The weight of the animals was monitored weekly after the surgery to verify good recovery. There were no significant mortality (4%) events resulting from the surgery in any of the groups. Upon euthanasia, carotids were dissected and calcification was confirmed with the Von Kossa stain in 4 μM paraffinized tissue sections (performed at the Institute for Research in Immunology and Cancer, Université de Montréal), to visualize calcium deposits.¹⁵ Images were acquired with a Leitz Diaplan microscope equipped with an Olympus DP21 camera (Wild Leitz GmbH, Germany).

Blood Pressure

Systolic blood pressure was monitored by noninvasive tail-cuff plethysmography (Kent Scientific Corp, Torrington, CT) 2 days before the periarterial application of CaCl₂ or NaCl (day 0) and weekly for 3 weeks, as detailed in Data S1.

Morris Water Maze

Spatial learning and memory was assessed at 2 and 3 weeks following the periarterial application of NaCl or CaCl₂. The testing arena consisted of a circular pool (160 cm in diameter) filled with water made opaque with skim milk powder. The temperature of the water was kept at 18 to 19°C.

The pool was divided into 4 virtual quadrants referred to as north, south, east, and west. A clear plexiglass escape platform (10 cm diameter) was placed 1.5 cm beneath the surface in the southwest quadrant. To examine spatial learning, escape latencies were measured during a period of 5 training days (D1–D5), during which mice were allowed three 60 seconds trials per day to find the escape platform. Each trial was 20 minutes apart. Mice were released from a different quadrant each time. An average of the time spent to locate the platform (latency) during the 3 trials was calculated per day per mouse. Latencies to locate the platform were plotted for each training day. The average latency across the entire training and the area under the learning curve were also calculated to compare learning performance.

A probe test (to assess the memory recall) and a cue test (to assess the visual accuracy) were performed on day 6. For the probe test, the platform was removed, and two 30-second trials, 1 hour apart, were conducted to assess time spent in the target quadrant (the place where the platform was originally located), the number of target crossings, and the latency to reach the target quadrant. Swimming speed was determined as a measure of locomotor activity and to ensure that latencies were not confounded by physical impairments. During the cue test, some water was removed so that the escape platform could be visible. Animals with visual impairments were excluded from the analysis. Data were acquired with the Smart Video Tracking Software (Smart version 3.0.01, Panlab Harvard apparatus, USA), connected to an overhead camera. The experimenter was blinded to the treatment assignment (NaCl or CaCl₂).

Autoradiography

Resting CBF was measured 2 weeks after the periarterial application of NaCl or CaCl₂ in awake mice by quantitative autoradiography, using [¹⁴C]IAP (Iodoantipyrine 4-N-Methyl-¹⁴C; Perkin Elmer, Woodbridge, Canada) as a diffusible tracer. The protocol was adapted from Joutel and colleagues¹⁶ and is detailed in Data S1. Brain sections containing the dorsal hippocampus (from Bregma –1.82 to –2.18 mm) were used for analysis in the following regions: visual and somatosensory cortices (VSCx), perirhinal and entorhinal cortices (PECx), cornu ammonis area 1 (CA1), cornu ammonis area 2-3 (CA2-3), dentate gyrus (DG), thalamic nuclei (THA), and corpus callosum (CC). Four brain sections per animal were examined, and data from the right hemisphere (corresponding to the side of the calcified carotid) were used for analysis.

In Vivo Laser Doppler Flowmetry

Cerebrovascular autoregulation as well as CBF responses to whisker stimulation as well as to endothelium-dependent and

-independent vasodilators were examined on the right somatosensory cortex, 2 weeks after the periarterial application of NaCl or CaCl₂. Details on the surgical procedures are available in Data S1.

Autoregulation was investigated based on the protocol of Niwa and colleagues.¹⁷ Hypotension was induced by controlled exsanguination to reduce blood pressure every 10 mmHg. In a separate group of mice, mean arterial blood pressure was elevated every 10 mmHg up to 160 mmHg by infusion of 20 to 30 µg/mL phenylephrine (Sigma-Aldrich, Oakville, Canada) via the femoral artery. Given that mice with carotid calcification, but not controls, exhibited breathing distress episodes at the highest pressures (140–160 mmHg), results are presented up to 130 mmHg only. Blood pressure was allowed to stabilize for 5 minutes following each manipulation, after which CBF perfusion units were determined. Results are expressed as percent change with respect to CBF values prior to the change in blood pressure. Neurovascular coupling was examined with 3 whisker stimulations (1 minute duration, spaced every 3 minutes) on the contralateral side from the probe location. Endothelium-dependent responses were measured during the superfusion of acetylcholine 10 µmol/L (Sigma-Aldrich, Oakville, Canada) for 5 minutes followed by a 15 minutes artificial cerebrospinal fluid superfusion to restore CBF responses to basal levels. Endothelium-independent responses were examined with the superfusion of sodium nitroprussiate (SNP) 50 µmol/L (Sigma-Aldrich, Oakville, Canada), a nitric oxide donor. Relative changes in CBF (percent increase in CBF after stimulation compared with baseline) were analyzed with LabChart6 Pro software (version 6.1.3, AD Instruments, USA). Experimental analyses were compared with a noncalcified control group rather than to the contralateral side in calcified mice, given that we have previously observed small significant increases in blood flow pulsatility in this hemisphere.⁶

Tissue Preparation for Histology and Immunostaining

At 3 weeks after surgery, mice were anesthetized with sodium pentobarbital (100 mg/kg body weight; CDMV, Saint-Hyacinthe, Canada) and perfused with 40 mL of phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4. The brains were removed and immersed in cold 4% paraformaldehyde (Bioshop, Burlington, Canada) for 24 hours and then transferred to 30% sucrose for 24 hours. Brains were stored at –20°C in cryoprotectant solution (37.5% v/v ethylene glycol, 37.5% w/w sucrose, in PBS pH 7.4) until sectioning. The right side of the brain was identified, and 40 µm coronal sections were cut with a vibratome (Leica VT 1000S, Leica Biosystems, Germany).

Collagen IV Immunostaining

Collagen IV immunostaining was done adapting the protocol from Franciosi and colleagues¹⁸ and examined at 3 weeks after surgery. Briefly, brain sections were washed 4 times in PBS at room temperature followed by 1 wash with ddH₂O preheated at 37°C. Antigen retrieval was done with pepsin (1 mg/mL) dissolved in 0.2 N HCl for 10 minutes at 37°C followed by 1 wash with warm PBS (at 27°C) and 3 PBS washes at room temperature. Normal goat serum (5%, dissolved in PBS-Triton 0.1%) was used for blocking for 90 minutes at room temperature. The primary antibody (rabbit anticollagen IV, Millipore, Oakville, Canada #AB756P) was incubated at 1:500 in blocking solution overnight at room temperature. The following day, brain sections were washed once with PBS for 5 minutes and later for 1 hour. Incubation with the secondary antibody (goat antirabbit Alexa Fluor 488 at 1:800, Invitrogen-Thermo Fisher Scientific, Burlington, Canada) was done for 2 hours under agitation at room temperature, in PBS-T (Triton 0.1%) with normal goat serum (5%). Following washes in PBS, sections were mounted, allowed to dry, and then coverslipped.

Z-stacked (1.0 µm) confocal images were acquired with an Olympus laser-scanning microscope (model FV1000MPE). At least 3 brain sections per mouse were imaged from the right primary somatosensory cortex as well as from the hippocampal regions CA1, and DG (from Bregma –1.46 to –1.94 mm).

The percentage of collagen IV-positive area per micrograph was calculated with the ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD), as per published protocols for microvascular density analysis.¹⁹ For vascular area, the background was first subtracted with the despeckle and median filter (1.0 pixel) functions, and after threshold adjustment and skeletonization, the area covered by the skeleton of cerebral vessels was calculated. Because the resorption of collagen IV occurs after endothelial loss, the quantification of collagen IV skeleton is a very good marker of complete capillary loss.²⁰ To minimize variability due to different batches, results were expressed as fold change with respect to the control group.

Microhemorrhages

Microhemorrhages were examined with the Prussian blue staining at 3 weeks after surgery, as detailed in Data S1. The following regions were analyzed: frontal cortex, somatosensory cortex, and the hippocampal regions CA1 and DG.

Sodium Fluorescein Extravasation Assay

Blood-brain barrier permeability was examined by the extent of sodium fluorescein (NaF) extravasation to the brain at 3 weeks after surgery. A solution of 10% NaF (Sigma-Aldrich,

Oakville, Canada) was injected intraperitoneally (100 μ L) and allowed to circulate for 30 minutes. Mice were then anesthetized with sodium pentobarbital (100 mg/kg body weight; CDMV, Saint-Hyacinthe, Canada) and perfused with 40 mL of cold PBS, pH 7.4. The right frontal cortex, hippocampus, and rest of the cortex were dissected. All tissues were frozen at -80°C until analysis. Brain tissues were weighted and homogenized in 10X cold PBS, pH 7.4, and centrifuged 15 minutes at 14 000g at 4°C . The supernatant was recovered, mixed with an equal amount of 15% trichloroacetic acid (Sigma-Aldrich, Oakville, Canada) and centrifuged 15 minutes at 15 000g at 4°C . The resulting supernatant was neutralized with 5 mol/L NaOH (diluted 1:5) and mixed. For all samples (standards and unknowns) 100 μ L were used for analysis (in duplicate). Relative fluorescence units (excitation 480 nm, emission 525 nm) were read with a fluorometer (SpectraMax M2, Molecular Devices, Sunnyvale, USA) and data were extracted with the SoftMax Pro software (v5.2, Molecular Devices, Sunnyvale, CA). The amount of NaF in brain was calculated from a standard curve (0–5 μ mol/L NaF) and normalized per gram of tissue. Results were expressed as fold change with respect to the control group.

A β 40 and A β 42 ELISA

Endogenous mouse A β 40 and A β 42 were measured by ELISA (KMB3481 and KMB3441, Life Technologies, Invitrogen-Thermo Fisher Scientific, Burlington, Canada) 3 weeks after surgery, as detailed in Data S1.

Tau Western Blot

Examination of phospho-tau levels was done 3 weeks after surgery, following our published protocol²¹ and as detailed in Data S1.

Statistical Analysis

Data are displayed in box-and-whisker plots, where the median is represented by the horizontal line, and the 10th and 90th percentiles extend from the extremes of the box. Empty circles represent points below and above the whiskers. Data are displayed as mean \pm SD. Data analysis was performed with GraphPad Prism software (version 7.05a, La Jolla, USA). ANOVA for factorial design with repeated measures followed by a Fisher's least significant difference posttest for multiple group comparisons was used for analysis of the behavioral data. In the learning curve analysis, the repeated factor is the measure of latency through different time points (D1–D5) and the treatment as a between-group factor. The area under the learning curve was calculated with the area under the learning curve function. In the cerebral autoregulation analysis, a linear

regression has been made in order to compare the slopes of treatment and control before and after the diverging point set at 70 mmHg, 100% change in CBF.

For autoradiography, significance of comparisons was tested with a 2-tailed unpaired Student *t*-test per independent brain region; however, results are presented in a single graph. A 2-tailed unpaired Student *t*-test was used for all other 2-group comparisons. Significance was set at $P<0.05$. Sample size per group is presented with the text and figures.

Results

Arterial stiffness was induced by the application of CaCl_2 to the right carotid artery. Carotid calcification was confirmed with the Von Kossa stain, revealing the formation of calcium deposits on the carotid of mice treated with CaCl_2 examined 2 and 3 weeks after surgery (Figure S1A, right panels). Calcium deposits were absent in mice exposed to NaCl (Figure S1A, left panels). Carotid calcification did not result in an increase in systolic blood pressure, even at 3 weeks after calcification (Figure S1B).

Carotid Stiffness Impairs Learning and Memory

The mice's cognitive abilities were tested with the Morris water maze. At 2 weeks after surgery, mice subjected to the periarterial application of CaCl_2 exhibited a progressive decrease in escape latencies during the training phase, as did control animals (Figure 1A; main effect of time: $F[4, 60]=23.07$; $P<0.0001$; $n=8-9$). Latencies between the 2 groups did not differ at any day during training; neither did the area under the learning curve (137.2 \pm 33.8 NaCl versus 134.1 \pm 17.7 CaCl_2 , data not shown) or the average latency across the 5 days (Figure 1B), indicating absence of learning impairments at this time point.

In contrast, at 3 weeks after surgery, mice with carotid stiffness exhibited initially greater mean escape latencies at day 2 (41.7 \pm 14.4 versus 28.3 \pm 11.9 seconds, simple main effect $P<0.05$; $n=9-13$), although with continued training they exhibited escape latencies comparable to control mice during the remaining days (Figure 1C; $F[4, 80]=16.02$; $P<0.0001$; $n=9-13$). There were no significant differences in the area under the learning curve (108.0 \pm 30.8 NaCl versus 125.1 \pm 41.1 CaCl_2 , data not shown) or in the overall average latencies through the entire training (Figure 1D); however, the median overall latency for mice with carotid stiffness was 33.8 seconds, while the median latency for controls was 24.1 seconds.

Following the learning period, memory recall was measured with a probe test 24 hours later. Mice subjected to carotid calcification for 2 weeks did not manifest differences

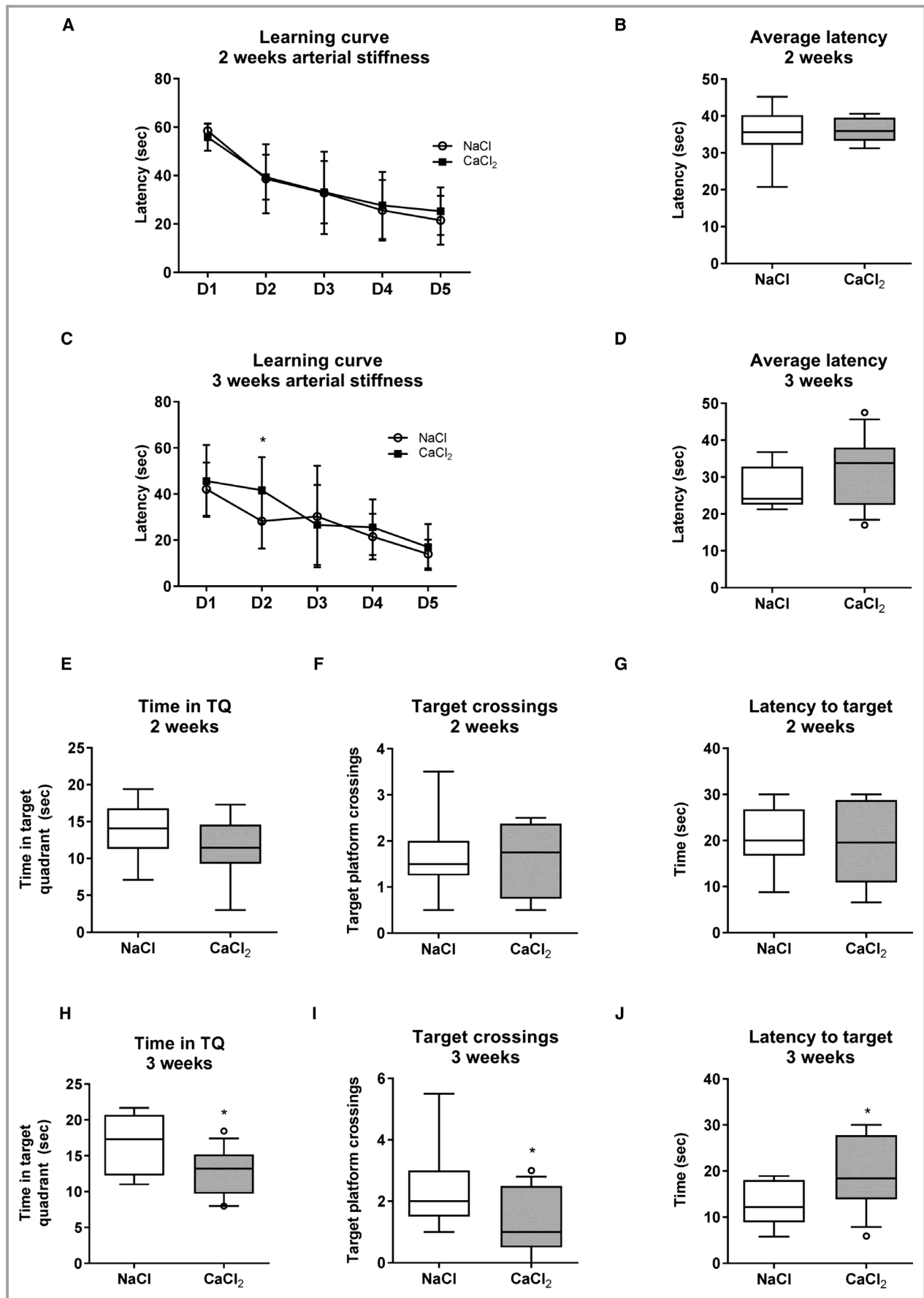


Figure 1. Effect of carotid calcification on spatial learning and memory. Cognitive abilities were examined with the Morris Water Maze test (2 and 3 weeks after application of CaCl_2 or NaCl) (A and C). The test consisted of 5 training days (D1–D5) during which mice were allowed three 60 seconds trials per day to find the escape platform. Each trial was 20 minutes apart. The area under the learning curve (AUC) and the average latency across the training (B and D) were calculated to compare learning performance. Graphs represent mean \pm SD. Data are displayed in box-and-whisker plots, where the median is represented by the horizontal line, and the 10th and 90th percentiles extend from the extremes of the box. For the probe test (day 6), the platform was removed and animals were given two 30 seconds trials separated 1 hour apart, to assess (E and H) time spent in the target quadrant (the place where the platform was originally located), (F and I) number of target crossings and (G and J) latency to reach the target zone. Data were analyzed with ANOVA for factorial design with repeated measures followed by a Fisher's LSD posttest for multiple group comparisons for the learning curves; unpaired Student *t*-test was used for all other 2-group comparisons; $n=8$ to 9 mice/group (2 weeks) and $n=9$ to 13 mice/group (3 weeks). * $P<0.05$; TQ indicates target quadrant.

in the time spent in the target quadrant (Figure 1E), in the target crossings (Figure 1F), or in the latency to reach the target quadrant (Figure 1G), indicating absence of memory impairments at this time point. Instead, at 3 weeks after surgery, mice with carotid calcification spent significantly less time in the target quadrant compared with controls (Figure 1H; $P<0.05$; $n=9-13$). In line with these results, mice with carotid stiffness also performed significantly fewer target crossings (Figure 1I; $P<0.05$, $n=9-13$) and showed increased

time to reach the target zone (Figure 1J; $P<0.05$; $n=9-13$). Swimming speed was comparable between the 2 groups at both time points (Figure S2).

Carotid Stiffness Leads to Diminished Resting CBF

At 2 weeks after calcification, when cognitive deficits were not yet present, resting CBF was assessed by quantitative

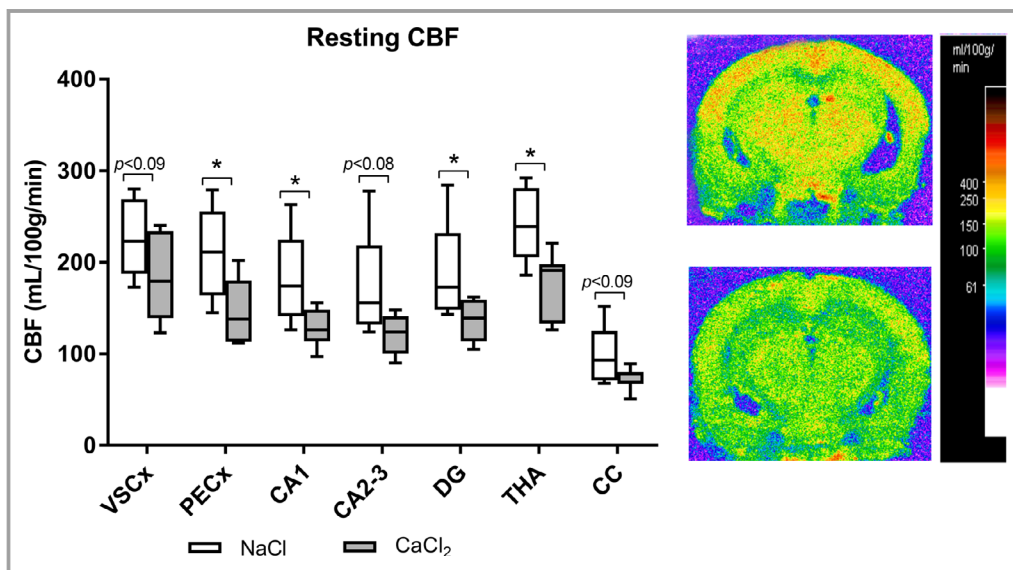


Figure 2. Effect of carotid calcification on resting cerebral blood flow (CBF). Resting CBF was measured by autoradiography using [^{14}C]iodoantipyrine as a diffusible tracer in awake mice, 2 weeks after application of CaCl_2 or NaCl . CBF was quantified in the following regions from the right hemisphere: visual and somatosensory cortices (VSCx), perirhinal and entorhinal cortices (PECx), cornu ammonis area 1 (CA1), cornu ammonis area 2-3 (CA2-3), dentate gyrus (DG), thalamus (THA), and corpus callosum (CC). Data are displayed in box-and-whisker plots, where the median is represented by the horizontal line and the 10th and 90th percentiles extend from the extremes of the box. * $P<0.05$; unpaired Student *t*-test per independent brain region (results presented in a single graph); $n=5$ to 7 mice/group. CBF is expressed as mL/100 g/min. Representative blood flow autoradiograms for control (upper panel) and CaCl_2 mice (lower panel) are shown with a color scale.

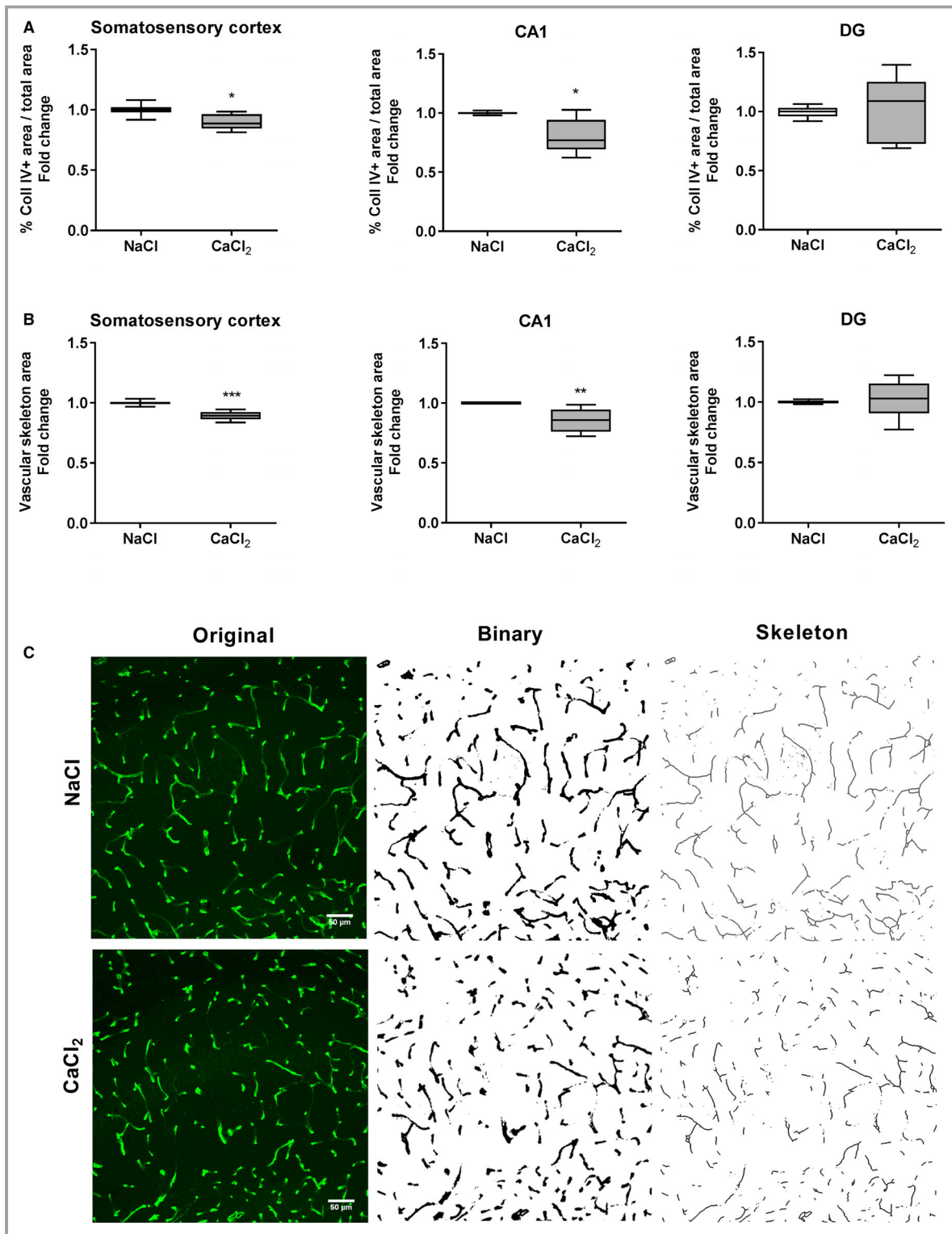


Figure 3. Effect of carotid calcification on number of cerebral vessel containing collagen type IV. Semiquantitative analysis of microvessel number per field by examination of (A) collagen IV–positive area percentage and (B) vascular skeleton area in the somatosensory cortex and hippocampus (cornu ammonis area 1 [CA1] and dentate gyrus [DG]) from the right hemisphere. Data are displayed in box-and-whisker plots, where the median is represented by the horizontal line, and the 10th and 90th percentiles extend from the extremes of the box. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.0001$; unpaired Student t -test, $n = 5$ to 6 mice/group. C, Representative micrographs of collagen IV immunostaining, binary transformation, and skeletonization for CA1 are shown. Scale bar = 50 μm . Analysis was done 3 weeks after surgery.

autoradiography. Mice with carotid calcification exhibited decreases in resting CBF in several brain regions, including gray and white matter (Figure 2; $n=5-7$ mice/group). Specifically, carotid calcification led to significant reductions in resting CBF (mean range, 28%–30% decrease) in the perirhinal/entorhinal region ($P<0.05$), in CA1 ($P<0.05$), DG ($P<0.05$), and thalamus ($P<0.05$), with a trend in CA2-3 ($P=0.0768$) and in the VSCx region ($P=0.0896$). Likewise, there was a trend for a decrease in resting CBF in the white matter, measured in the corpus callosum (mean 26% decrease; $P=0.0895$).

Carotid Stiffness Leads to a Diminished Number of Cerebral Vessels Containing Collagen IV

To evaluate whether the decrease in resting CBF was caused by a diminished microvascular density, we assessed whether carotid stiffness would be sufficient to affect the cerebral microvasculature. Analysis of collagen IV immunostaining (Figure 3A) revealed a small but significant reduction in cerebral vessels in the somatosensory cortex of mice subjected to carotid calcification ($\approx 10\%$ decrease; $P<0.05$;

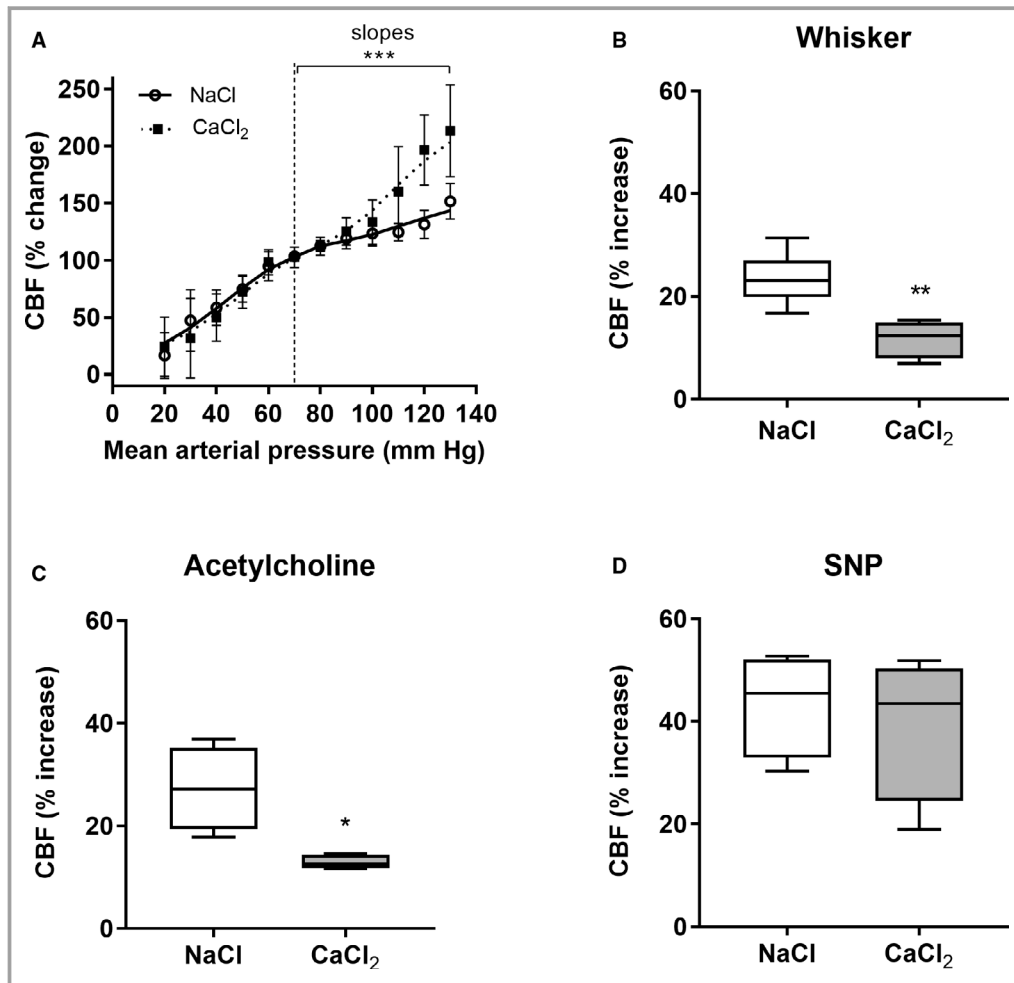


Figure 4. Effect of carotid calcification on cerebrovascular responses. **A**, Analysis of cerebral autoregulation depicting relationship between mean arterial pressure and cerebral blood flow (CBF). Graph represents mean \pm SD. Data are displayed in box-and-whisker plots, where the median is represented by the horizontal line, and the 10th and 90th percentiles extend from the extremes of the box. $***P<0.001$, linear regression of slopes between 70 and 130 mmHg was used; $n=5$ to 9 mice/group. CBF responses to whisker stimulation (**B**), to the endothelium-dependent vasodilator, acetylcholine (**C**), and to the endothelium-independent vasodilator, sodium nitroprussiate (SNP; **D**) were evaluated. Graphs depict the percentage increase in CBF following the stimulation with respect to its initial value. $*P<0.05$; $**P<0.01$; unpaired Student t -test; $n=4$ to 6 mice/group. CBF was measured on the right somatosensory cortex by laser Doppler flowmetry 2 weeks after application of CaCl₂ or NaCl.

n=6/group) and a more prominent reduction in the CA1 region of the hippocampus ($\approx 19\%$ decrease; $P<0.05$; n=5–6/group). No differences were detected in the DG.

Analysis of the vascular skeleton area followed a similar pattern in mice with carotid stiffness (Figure 3B), with small but significant reductions in skeleton area in the somatosensory cortex ($\approx 11\%$ decrease; $P=0.0001$; n=6/group) and greater reductions in CA1 ($\approx 15\%$ decrease; $P<0.01$; n=5–6/group). No differences were detected in the DG. The measures of skeleton area and collagen IV density correlated. Spearman analysis revealed positive associations both in the somatosensory cortex ($r=0.5654$; $P=0.0582$) and in CA1 ($r=0.6989$; $P<0.05$).

Carotid Stiffness Impairs Cerebral Autoregulation, Neurovascular Coupling, and CBF Responses to Endothelial Stimulation

To further investigate the mechanisms of CBF damage due to arterial stiffness, we examined whether carotid calcification affected regulated cerebrovascular responses at the same time point when resting CBF was found impaired (2 weeks after calcification).

While control animals exhibited small variations in CBF within a certain range of arterial pressures (60–120 mmHg), suggesting that autoregulation was operating, these fluctuations were increased in mice with carotid calcification at the highest pressures, significantly differing from control mice (Figure 4A; $F[1, 54]=26.39$; $P<0.001$; n=5–9). The lower limit of autoregulation was not disrupted in mice with carotid stiffness.

Mice subjected to the periarterial application of CaCl_2 further exhibited attenuated CBF responses produced by

neuronal activity (whisker stimulation) compared with control mice (Figure 4B; NaCl mean 23.5% versus CaCl_2 11.8%; $P<0.01$; n=4–6 mice/group). The loss of autoregulation and impairments in neurovascular coupling in mice with carotid stiffness were also accompanied by attenuated increases in CBF produced by the application of the endothelium-dependent vasodilator, acetylcholine (Figure 4C; NaCl mean 27.2% versus CaCl_2 12.9%; $P<0.05$; n=4 mice/group). In contrast, there were no differences in CBF responses to the nitric oxide donor, sodium nitroprussiate (Figure 4D; n=4 mice/group). Physiological parameters comprising blood pH, pO_2 , pCO_2 , mean arterial pressure, and CBF at baseline (before the stimulation) were comparable between control and mice with carotid stiffness (Table S1).

Effect of Carotid Stiffness on Cerebral Microhemorrhages

Considering the previously reported increases in the pulsatility of cerebral vessels in this model⁶ and impaired autoregulation, cerebral microhemorrhages were examined 3 weeks after calcification, when cognitive deficits were present. Histochemical analysis with the Prussian blue reaction did not reveal the presence of iron deposits, neither in the frontal or somatosensory cortex nor in the hippocampus of mice subjected to arterial stiffness (Figure S3).

Carotid Stiffness Increases Blood-Brain Barrier Permeability in the Hippocampus

Given the deficits in cerebral endothelial responses, we next tested the hypothesis that the permeability of the blood-brain barrier would be affected as a consequence of carotid

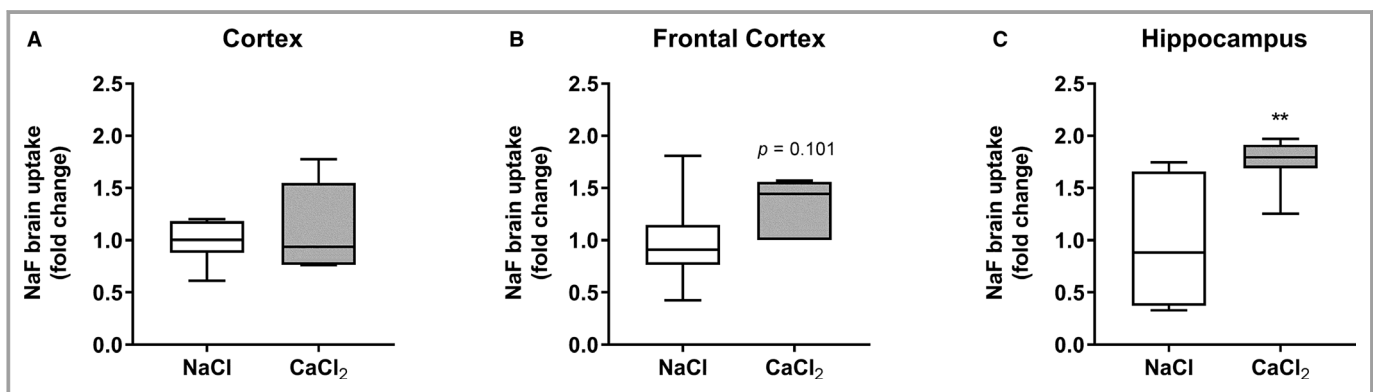


Figure 5. Effect of carotid calcification on blood-brain barrier permeability. Permeability of the blood-brain barrier was examined by sodium fluorescein (NaF) extravasation in specific brain regions cortex (A), frontal cortex (B) and hippocampus (C) from the right hemisphere 3 weeks after application of CaCl_2 or NaCl. The amount of NaF in each region was calculated from a standard curve (0–5 $\mu\text{mol/L}$ NaF) and normalized per gram of tissue. Results are expressed as fold change by normalizing values to the average of the control group. Data are displayed in box-and-whisker plots, where the median is represented by the horizontal line, and the 10th and 90th percentiles extend from the extremes of the box. ** $P<0.01$; unpaired Student *t*-test, n=7 mice/group.

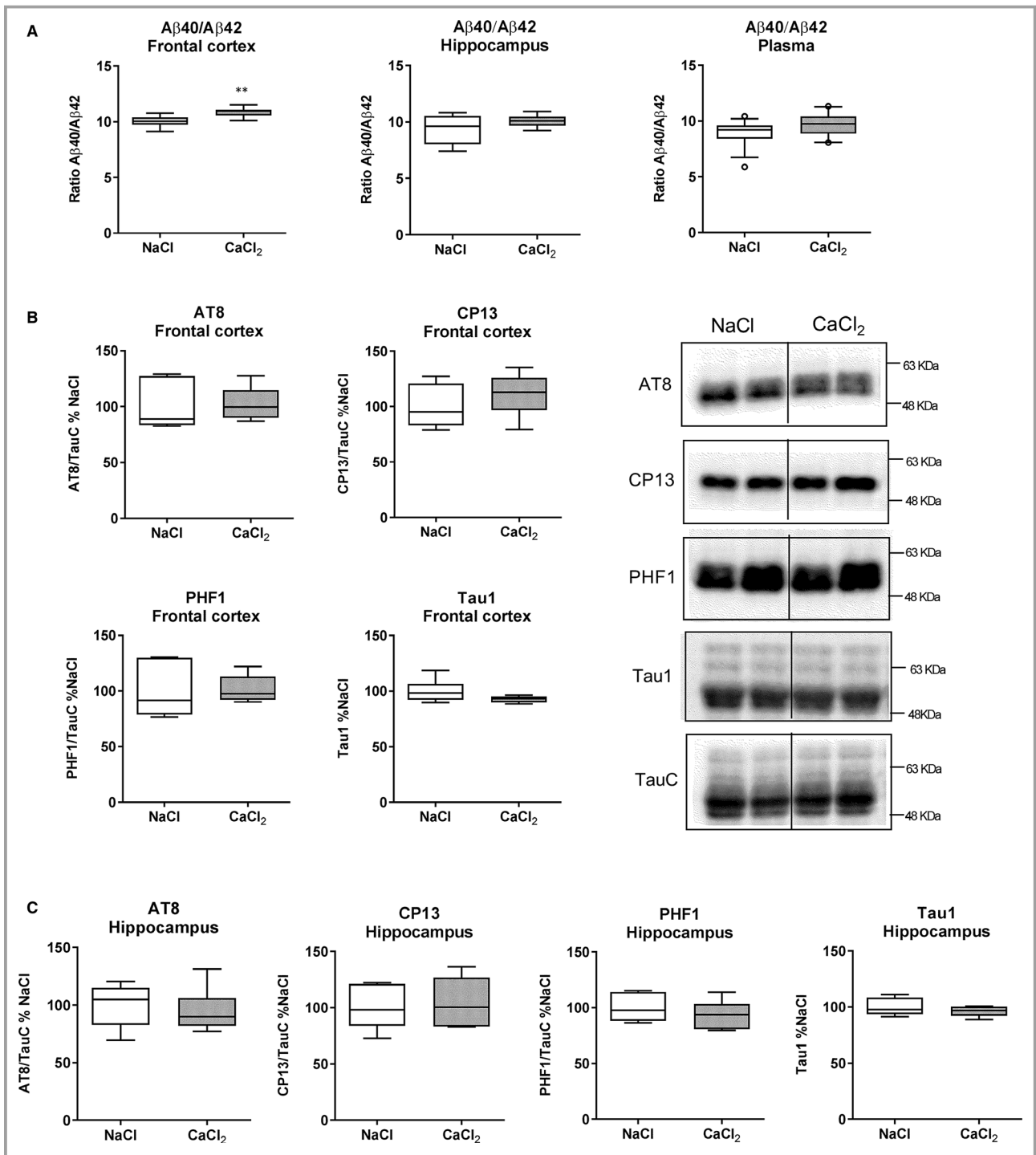


Figure 6. Effect of carotid calcification on amyloid- β ($A\beta$) and tau hyperphosphorylation. **A**, The $A\beta_{40}/A\beta_{42}$ ratio was calculated from $A\beta$ concentrations determined by ELISA in the frontal cortex and hippocampal tissue as well as in plasma. Expression of phosphorylated tau (AT8, CP13 and PHF1) and dephosphorylated tau (Tau1) in frontal cortex (**B**) and hippocampus (**C**) examined by western blotting. Representative immunoblots are shown. Data are displayed in box-and-whisker plots, where the median is represented by the horizontal line and the 10th and 90th percentiles extend from the extremes of the box. ** $P < 0.01$; unpaired Student t -test, $n = 6$ to 7 mice/group in frontal cortex and hippocampus, $n = 10$ to 15 mice/group in plasma. Analysis was done 3 weeks after surgery on frozen tissue from the right hemisphere.

stiffness. The increase in sodium fluorescein brain uptake in mice subjected to carotid calcification was region specific (Figure 5). While there were no differences in sodium fluorescein uptake in the brain cortex (Figure 5A; $n=7$ /group), a trend suggesting incipient increase in blood-brain barrier permeability was observed in the frontal cortex (Figure 5B; mean 1.3 fold change; $P=0.1013$; $n=7$ /group). Notably, the hippocampus exhibited the most significant differences in sodium fluorescein uptake (Figure 5C; mean 1.7-fold; $P<0.01$; $n=7$ /group), suggesting that this region was highly vulnerable to blood-brain barrier damage.

Effect of Carotid Stiffness on Amyloid and Tau Pathology

Given the epidemiologic associations between arterial stiffness and dementia, and the brain vascular damage reported in this study, we questioned whether such changes could have an impact on A β buildup and tau hyperphosphorylation, the 2 main pathological hallmarks of Alzheimer disease.

Although the absolute concentrations of brain A β peptides did not differ between groups (Table S2), quantitative analysis revealed a modest but significant increase in the ratio A β 40/42 in the frontal cortex of mice with carotid stiffness (Figure 6A; $P<0.01$; $n=6-7$), with a similar trend in the hippocampus, although not significant (Figure 6A; $n=6-7$). There were also no significant differences in the ratio of circulating A β peptides measured in plasma between mice with carotid stiffness and controls (Figure 6A; $P=0.1369$; $n=10-15$).

In line with the modest changes in A β , there were no significant differences in the expression of phosphorylated tau, examined by the assessment of several phospho tau epitopes in the same brain regions where A β was measured (Figure 6B and 6C; $n=6$ /group). There were also no differences in the expression of dephosphorylated tau (Tau1) or total tau levels (TauC), the latter being used for normalization of phospho tau signals.

Discussion

Arterial stiffness, a common condition that arises with aging, is emerging as a strong and independent risk factor for early cognitive impairment and dementia,^{22,23} as recently reviewed.²⁴ Arterial stiffness may contribute to cerebral dysfunction via numerous effects, which until now have been difficult to dissect in human studies attributable to multiple factors that may affect the brain being present in parallel.

In this study, we address this issue by characterizing the impact of carotid stiffness on brain function with a unique murine model based on carotid calcification,⁶ specific for this vascular parameter. Our findings indicate that carotid

stiffness, independently of aging or increased blood pressure, alters the regulation of CBF and the integrity of the cerebral vasculature, increasing the blood-brain barrier permeability and leading to cognitive deficits.

Mice with carotid calcification exhibited significant impairments in resting CBF and in the mechanisms that regulate cerebrovascular responses, including cerebral autoregulation, neurovascular coupling, and endothelial dilatation. These deficits preceded the manifestation of spatial memory impairments. Resting CBF was found diminished in critical brain regions including the hippocampus and entorhinal cortex, which are highly vulnerable areas important for memory and one of the earliest affected in patients with Alzheimer disease,²⁵ the most common form of dementia in elderly subjects. The decrease in resting CBF, measured by autoradiography, could be explained at least partly by a decrease in vascular density as determined by analyzing the collagen IV skeleton area. Although autoradiography is an invasive technique, it provides a better resolution than other noninvasive techniques such as magnetic resonance imaging for small brain vessel studies in mice. A decrease in CBF and vascular density may lead to hypoxia-induced neurodegeneration. Interestingly, we previously demonstrated the presence of degenerative neurons as determined by the Fluoro-Jade B method in the subarea of the CA1 region called lacunosum moleculare.⁶ In agreement with our study, a disconnect between neuronal function and blood supply, as well as reduced resting CBF, has been reported in Alzheimer patients at early disease stages and associated with cognitive deterioration.²⁶

Alterations in cerebral autoregulation have been linked to hypertension, diabetes mellitus, ischemic stroke, and Alzheimer disease.²⁷⁻³⁰ To maintain a constant cerebral perfusion, the brain relies on the capacity of cerebral arteries to constrict upon increases in systemic pressure and to dilate when arterial pressure lowers. Our results showing compromised autoregulation in the upper range of arterial pressures would indicate a failure in vasoconstriction of cerebral vessels, which would lead to hyperperfusion and disruption of the blood-brain barrier.³¹ Interestingly, in a murine model of atherosclerosis, which exhibits certain similarities to ours in terms of increased carotid stiffness, increased pulsatility in cerebral vessels, and cognitive decline, it was shown that cerebral arteries displayed increases in vascular compliance,^{32,33} which would be consistent with a failure in vasoconstriction and disruption of the upper limit of autoregulation. Although we have not directly measured the compliance of cerebral arteries in our model, the disruption of endothelial dilatation seen in our mice with carotid calcification would indicate that this is a likely possibility, considering that cerebral endothelial function may modulate cerebrovascular wall biomechanics.³⁴

While other mechanisms may also contribute to impairing cognition, the physiological repercussions of a dysfunctional regulation of CBF are significant considering the brain's high metabolic needs and the fact that even small blood flow reductions can lead to the inhibition of protein synthesis and to neuronal dysfunction.³⁵ In addition, normal CBF is necessary for the removal of metabolic by-products. Thus, the initial appearance of CBF deficits followed by diminished memory recall in our model would suggest that disruption of CBF regulation is a mechanistic link between arterial stiffness and its effects on cognition. In support, a recent clinical study showed that in the Age, Gene/Environment Susceptibility-Reykjavik cohort, the association between high artery stiffness and low memory function included cerebrovascular factors such as increased cerebrovascular resistance and damage to the white matter.³⁶

It is important to note that we have controlled for potential perturbations of physiological parameters that could affect CBF (eg, blood gases, arterial pressure) and that these were found to be comparable between controls and mice with carotid calcification. Further evidence that the CBF deficits detected were not spurious results attributable to nonspecific dysfunction caused during the surgeries is the fact that not all cerebrovascular responses were impaired in our model, as seen by the intact CBF responses to sodium nitroprussiate, which is an endothelium-independent vasodilator.

The absence of detectable microhemorrhages in this model at the young age examined (13–15 weeks) further strengthens the finding that the manifestation of memory deficits is likely related to the dysregulation of CBF and decreased cerebrovascular density. We do not discard the possibility that arterial stiffness could promote the formation of microhemorrhages in humans, as these lesions can be common in older adults (≥ 60 years)³⁷ and in very elderly individuals (90+ years).³⁸ Indeed, microhemorrhages have been associated with increased risk of stroke,³⁹ disruption of white matter structure,⁴⁰ lower cognitive function,⁴¹ and even dementia.³⁸ Given our finding that mice with carotid calcification tended to exhibit impaired CBF in the corpus callosum, the richest region of white matter fibers within the brain, it would be interesting to examine whether arterial stiffness is sufficient to induce microhemorrhages and white matter dysfunction in older animals. We have not considered this possibility in this study to avoid the added confounder of aging and thus to be able to examine the independent effects of carotid stiffening without additional parameters. Besides the issue of aging, our autoregulation results suggest that arterial stiffness accompanied by hypertension may also lead to microhemorrhages. Because we have not seen increases in blood pressure in mice with carotid calcification even beyond 3 weeks after surgery, this could also in part explain the absence of detectable microhemorrhages at this time point in

this model. Thus, to better predict the impact of arterial stiffness on the brain, future studies will have to be conducted in old mice with or without hypertension.

In considering other mechanisms that might damage the brain as a result of arterial stiffness, and in view of the cerebral endothelial dysfunction detected, we examined the blood-brain barrier permeability, which is severely damaged in patients with Alzheimer disease and in elderly individuals, particularly in the hippocampus.^{42,43} Indeed, in addition to the negative consequences of a reduced CBF, the passage of cytotoxic molecules through a leaky blood-brain barrier may further affect neuronal integrity. Our results showed a region-specific increase in blood-brain barrier permeability attributable to carotid stiffness, with significant permeability in the hippocampus and a similar trend in the frontal cortex, a region affected in patients with vascular disorders.^{44,45} The vulnerability of the hippocampus in this carotid stiffness model can be explained by the previously reported increases in vascular superoxide production and microglia activation in this region,⁴⁶ which could damage the cerebral endothelium, the site of the blood-brain barrier. It is also consistent with the observation of impaired spatial memory and the significant reductions in number of cerebral vessels containing collagen type IV also seen in this region.

We expected that the altered cerebrovascular regulation, reduced microvessel density, and the blood-brain barrier compromise would have an impact on A β clearance and thus lead to A β buildup in the brain. Our results showed a modest increase in the ratio A β 40/A β 42 in the frontal cortex, while no significant changes were seen in the hippocampus and plasma. This should not rule out that arterial stiffness could have an impact on A β accumulation in humans. First, endogenous murine amyloid peptides lack the aggregation-prone amino acids that are present in human A β , and their expression is lower compared with humans.^{47,48} One way to reexamine the proposed hypothesis would be to evaluate whether arterial stiffness is capable of exacerbating A β pathology in transgenic murine models of human amyloid overproduction. Indeed, studies in humans have reported associations between pulse wave velocity (a clinical measurement of arterial stiffness) and brain A β burden in nondemented adults,^{49,50} warranting future investigations to better understand this association.

Taken together, our findings suggest that carotid stiffness is sufficient to independently induce deficits in the brain microcirculation and to increase the blood-brain barrier permeability. With a compromise in CBF, the proper delivery of oxygen and nutrients to support neuronal function is disrupted, leading to hippocampal neurodegeneration and cognitive impairments. It should be noted that while these changes seem to appear “early” in this model (2–3 weeks after calcification), it is at this time point that mice with carotid calcification exhibit an

increased beta index comparable to that of a 75 years-old human.⁶ At the same time, the rapid cognitive decline in mice may be explained by the lack of brain and cognitive reserve in rodents. In humans, brain and cognitive reserve provides neuroprotection and compensation in Alzheimer disease and dementia, but also in other brain disorders,⁵¹ and can reduce the effect of Alzheimer pathology on cognition.⁵² Also, the distance between carotid and cerebral arteries is much shorter in mice than in humans, which reduces the dampening capacity of the murine vasculature and makes their brain more vulnerable. Upon technical development of blood pulsatility measures in human cerebral blood vessels, it will be possible to adjust our model and better understand the threshold of stiffness and blood pulsatility that could impact the brain.

Although our study provides new insights on the mechanisms by which arterial function affects the brain, several questions remain unanswered. For example, if the CBF dysregulation were amenable to therapeutic correction, would this prevent or delay the appearance of memory deficits in a context of cerebral inflammation and damaged blood-brain barrier? When should individuals with arterial stiffness qualify for treatments? Which are the best drugs or targets? Answers to these questions will significantly advance our understanding of the impact of arterial stiffness on brain function and help in the development of new strategies to protect the heart and the brain in aging and hypertension.

Acknowledgments

The authors thank Dr Elvire Vaucher (Professor, Ecole d'optométrie, Université de Montréal, Canada) for help with the autoradiography technique, Dr Donna Wilcock (University of Kentucky, USA) for providing assistance for the setup of the microhemorrhages protocol and mouse brain tissue, and Olivia De Montgolfier from Dr Eric Thorin's laboratory (Institut de Cardiologie de Montréal, Canada) for assistance with collagen IV quantification and helpful discussions. We also thank Dr Peter Davies (The Feinstein Institute for Medical Research, New York) for the generous gift of anti-tau antibodies.

Sources of Funding

This research was supported by funding from the Heart and Stroke Foundation of Canada (Girouard), the Fonds de recherche du Québec-Santé (Girouard: # 33237), the Canadian Foundation for Innovation (Girouard: #20089), the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (Planel: #354722), and the Canadian Institutes of Health Research (Ferland: #MOP-126170, Planel: #MOP-106423, #PCN-102993, Girouard: #MOP-285902). Muhire acknowledges support for a Bourse de recrutement aux cycles supérieurs from the Faculty of Medicine, Université de Montréal (2014). Iulita would like to acknowledge support from the Herbert H. Jasper Postdoctoral Research Fellowship in Neurosciences

(2016–2017) from the Groupe de Recherche sur le Système Nerveux Central (GRSNC), Université de Montréal, and for a Bourse Postdoctorale from the Fonds de recherche du Québec - Santé (2016–2019). Youwakim acknowledges support for a Bourse d'Excellence au Recrutement from the Department of Pharmacology and Physiology and the Faculty of Graduate and Postdoctoral Studies of Université de Montréal (2017–2018). Gratuze and Petry were recipients of a Biomedical Doctoral Award from the Alzheimer Society of Canada (2014–2017 and 2012–2015, respectively).

Disclosures

None.

References

- Pase MP, Herbert A, Grima NA, Pipingas A, O'Rourke MF. Arterial stiffness as a cause of cognitive decline and dementia: a systematic review and meta-analysis. *Intern Med J*. 2012;42:808–815.
- Hughes TM, Craft S, Lopez OL. Review of “the potential role of arterial stiffness in the pathogenesis of Alzheimer's disease.” *Neurodegener Dis Manag*. 2015;5:121–135.
- Hanon O, Haulon S, Lenoir H, Seux ML, Rigaud AS, Safar M, Girerd X, Forette F. Relationship between arterial stiffness and cognitive function in elderly subjects with complaints of memory loss. *Stroke*. 2005;36:2193–2197.
- Meyer ML, Palta P, Tanaka H, Deal JA, Wright J, Knopman DS, Griswold ME, Mosley TH, Heiss G. Association of central arterial stiffness and pressure pulsatility with mild cognitive impairment and dementia: the Atherosclerosis Risk in Communities Study-Neurocognitive Study (ARIC-NCs). *J Alzheimers Dis*. 2017;57:195–204.
- Pase MP, Beiser A, Himali JJ, Tsao C, Satizabal CL, Vasan RS, Seshadri S, Mitchell GF. Aortic stiffness and the risk of incident mild cognitive impairment and dementia. *Stroke*. 2016;47:2256–2261.
- Sadekova N, Vallerand D, Guevara E, Lesage F, Girouard H. Carotid calcification in mice: a new model to study the effects of arterial stiffness on the brain. *J Am Heart Assoc*. 2013;2:e000224. DOI: 10.1161/JAHA.113.000224.
- Jurasic MJ, Josef-Golubic S, Sarac R, Lovrencic-Huzjan A, Demarin V. Beta stiffness—setting age standards. *Acta Clin Croat*. 2009;48:253–258.
- Toth P, Tarantini S, Csiszar A, Ungvari Z. Functional vascular contributions to cognitive impairment and dementia: mechanisms and consequences of cerebral autoregulatory dysfunction, endothelial impairment, and neurovascular uncoupling in aging. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2017;312:H1–H20.
- Paulson OB, Strandgaard S, Edvinsson L. Cerebral autoregulation. *Cerebrovasc Brain Metab Rev*. 1990;2:161–192.
- Girouard H, Iadecola C. Neurovascular coupling in the normal brain and in hypertension, stroke, and Alzheimer disease. *J Appl Physiol (1985)*. 2006;100:328–335.
- Faraci FM, Heistad DD. Regulation of the cerebral circulation: role of endothelium and potassium channels. *Physiol Rev*. 1998;78:53–97.
- Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis*. 2010;37:13–25.
- Sagare AP, Bell RD, Zlokovic BV. Neurovascular dysfunction and faulty amyloid beta-peptide clearance in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2:a011452.
- Mawuenyega KG, Sigurdson W, Ovod V, Munsell L, Kasten T, Morris JC, Yarasheski KE, Bateman RJ. Decreased clearance of CNS beta-amyloid in Alzheimer's disease. *Science*. 2010;330:1774.
- Rungby J, Kassem M, Eriksen EF, Danscher G. The von Kossa reaction for calcium deposits: silver lactate staining increases sensitivity and reduces background. *Histochem J*. 1993;25:446–451.
- Joutel A, Monet-Lepretre M, Gosele C, Baron-Menguy C, Hammes A, Schmidt S, Lemaire-Carrette B, Domenga V, Schedl A, Lacombe P, Hubner N. Cerebrovascular dysfunction and microcirculation rarefaction precede white matter lesions in a mouse genetic model of cerebral ischemic small vessel disease. *J Clin Invest*. 2010;120:433–445.

17. Niwa K, Kazama K, Younkin L, Younkin SG, Carlson GA, Iadecola C. Cerebrovascular autoregulation is profoundly impaired in mice overexpressing amyloid precursor protein. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;283:H315–H323.
18. Franciosi S, De Gasperi R, Dickstein DL, English DF, Rocher AB, Janssen WG, Christoffel D, Sosa MA, Hof PR, Buxbaum JD, Elder GA. Pepsin pretreatment allows collagen IV immunostaining of blood vessels in adult mouse brain. *J Neurosci Methods*. 2007;163:76–82.
19. Cifuentes D, Poittevin M, Dere E, Broqueres-You D, Bonnin P, Benessiano J, Pocard M, Mariani J, Kubis N, Merkulova-Rainon T, Levy BI. Hypertension accelerates the progression of Alzheimer-like pathology in a mouse model of the disease. *Hypertension*. 2015;65:218–224.
20. Brown WR, Thore CR. Review: cerebral microvascular pathology in ageing and neurodegeneration. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2011;37:56–74.
21. Petry FR, Pelletier J, Bretteville A, Morin F, Calon F, Hebert SS, Whittington RA, Planel E. Specificity of anti-tau antibodies when analyzing mice models of Alzheimer's disease: problems and solutions. *PLoS One*. 2014;9:e94251.
22. Nagai K, Akishita M, Machida A, Sonohara K, Ohni M, Toba K. Correlation between pulse wave velocity and cognitive function in nonvascular dementia. *J Am Geriatr Soc*. 2004;52:1037–1038.
23. Scuteri A, Tesauro M, Appolloni S, Preziosi F, Brancati AM, Volpe M. Arterial stiffness as an independent predictor of longitudinal changes in cognitive function in the older individual. *J Hypertens*. 2007;25:1035–1040.
24. Iulita MF, Noriega de la Colina A, Girouard H. Arterial stiffness, cognitive impairment and dementia: confounding factor or real risk? *J Neurochem*. 2018;144:527–548.
25. Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol*. 1991;82:239–259.
26. Hanyu H, Sato T, Hirao K, Kanetaka H, Iwamoto T, Koizumi K. The progression of cognitive deterioration and regional cerebral blood flow patterns in Alzheimer's disease: a longitudinal SPECT study. *J Neurol Sci*. 2010;290:96–101.
27. Aries MJ, Elting JW, De Keyser J, Kremer BP, Vroomen PC. Cerebral autoregulation in stroke: a review of transcranial Doppler studies. *Stroke*. 2010;41:2697–2704.
28. Strandgaard S, Olesen J, Skinhoj E, Lassen NA. Autoregulation of brain circulation in severe arterial hypertension. *BMJ*. 1973;1:507–510.
29. den Abeelen AS, Lagro J, van Beek AH, Claassen JA. Impaired cerebral autoregulation and vasomotor reactivity in sporadic Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*. 2014;11:11–17.
30. Mankovsky BN, Piolot R, Mankovsky OL, Ziegler D. Impairment of cerebral autoregulation in diabetic patients with cardiovascular autonomic neuropathy and orthostatic hypotension. *Diabet Med*. 2003;20:119–126.
31. Cipolla MJ. *The Cerebral Circulation*. San Rafael, CA: Morgan and Claypool Publishers; 2009.
32. Bolduc V, Drouin A, Gillis MA, Duquette N, Thorin-Trescases N, Frayne-Robillard I, Des Rosiers C, Tardif JC, Thorin E. Heart rate-associated mechanical stress impairs carotid but not cerebral artery compliance in dyslipidemic atherosclerotic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;301:H2081–H2092.
33. Baraghis E, Bolduc V, Lefebvre J, Srinivasan VJ, Boudoux C, Thorin E, Lesage F. Measurement of cerebral microvascular compliance in a model of atherosclerosis with optical coherence tomography. *Biomed Opt Express*. 2011;2:3079–3093.
34. Bolduc V, Baraghis E, Duquette N, Thorin-Trescases N, Lambert J, Lesage F, Thorin E. 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*. 2012;302:H1330–H1339.
35. Hossmann KA. Glutamate-mediated injury in focal cerebral ischemia: the excitotoxin hypothesis revised. *Brain Pathol*. 1994;4:23–36.
36. Cooper LL, Woodard T, Sigurdsson S, van Buchem MA, Torjesen AA, Inker LA, Aspelund T, Eiriksdottir G, Harris TB, Gudnason V, Launer LJ, Mitchell GF. Cerebrovascular damage mediates relations between aortic stiffness and memory. *Hypertension*. 2016;67:176–182.
37. Poels MM, Ikram MA, van der Lugt A, Hofman A, Krestin GP, Breteler MM, Vernooij MW. Incidence of cerebral microbleeds in the general population: the Rotterdam Scan Study. *Stroke*. 2011;42:656–661.
38. Corrada MM, Sonnen JA, Kim RC, Kawas CH. Microinfarcts are common and strongly related to dementia in the oldest-old: the 90+ study. *Alzheimers Dement*. 2016;12:900–908.
39. Akoudad S, Portegies ML, Koudstaal PJ, Hofman A, van der Lugt A, Ikram MA, Vernooij MW. Cerebral microbleeds are associated with an increased risk of stroke: the Rotterdam study. *Circulation*. 2015;132:509–516.
40. Akoudad S, de Groot M, Koudstaal PJ, van der Lugt A, Niessen WJ, Hofman A, Ikram MA, Vernooij MW. Cerebral microbleeds are related to loss of white matter structural integrity. *Neurology*. 2013;81:1930–1937.
41. Poels MM, Ikram MA, van der Lugt A, Hofman A, Niessen WJ, Krestin GP, Breteler MM, Vernooij MW. Cerebral microbleeds are associated with worse cognitive function: the Rotterdam Scan Study. *Neurology*. 2012;78:326–333.
42. Storck SE, Meister S, Nahrath J, Meissner JN, Schubert N, Di Spiezo A, Baches S, Vandenbroucke RE, Bouter Y, Prikulis I, Korth C, Weggen S, Heimann A, Schwaninger M, Bayer TA, Pietrzik CU. Endothelial LRP1 transports amyloid-beta(1-42) across the blood-brain barrier. *J Clin Invest*. 2016;126:123–136.
43. Montagne A, Barnes SR, Sweeney MD, Halliday MR, Sagare AP, Zhao Z, Toga AW, Jacobs RE, Liu CY, Amezcua L, Harrington MG, Chui HC, Law M, Zlokovic BV. Blood-brain barrier breakdown in the aging human hippocampus. *Neuron*. 2015;85:296–302.
44. Hajjar I, Goldstein FC, Martin GS, Quyyumi AA. Roles of arterial stiffness and blood pressure in hypertension-associated cognitive decline in healthy adults. *Hypertension*. 2016;67:171–175.
45. Oveisgharan S, Hachinski V. Hypertension, executive dysfunction, and progression to dementia: the Canadian Study of Health and Aging. *Arch Neurol*. 2010;67:187–192.
46. Sadekova N, Iulita MF, Vallerand D, Muhire G, Bourmoum M, Claug A, Girouard H. Arterial stiffness induced by carotid calcification leads to cerebral gliosis mediated by oxidative stress. *J Hypertens*. 2018;36:286–298.
47. Lv X, Li W, Luo Y, Wang D, Zhu C, Huang ZX, Tan X. Exploring the differences between mouse mAbeta(1-42) and human hAbeta(1-42) for Alzheimer's disease related properties and neuronal cytotoxicity. *Chem Commun (Camb)*. 2013;49:5865–5867.
48. Jankowsky JL, Younkin LH, Gonzales V, Fadale DJ, Slunt HH, Lester HA, Younkin SG, Borchelt DR. Rodent A beta modulates the solubility and distribution of amyloid deposits in transgenic mice. *J Biol Chem*. 2007;282:22707–22720.
49. Hughes TM, Kuller LH, Barinas-Mitchell EJ, McDade EM, Klunk WE, Cohen AD, Mathis CA, Dekosky ST, Price JC, Lopez OL. Arterial stiffness and beta-amyloid progression in nondemented elderly adults. *JAMA Neurol*. 2014;71:562–568.
50. Hughes TM, Kuller LH, Barinas-Mitchell EJ, Mackey RH, McDade EM, Klunk WE, Aizenstein HJ, Cohen AD, Snitz BE, Mathis CA, Dekosky ST, Lopez OL. Pulse wave velocity is associated with beta-amyloid deposition in the brains of very elderly adults. *Neurology*. 2013;81:1711–1718.
51. Nithianantharajah J, Hannan AJ. The neurobiology of brain and cognitive reserve: mental and physical activity as modulators of brain disorders. *Prog Neurobiol*. 2009;89:369–382.
52. Weiler M, Casseb RF, de Campos BM, de Ligo Teixeira CV, Carletti-Cassani A, Vicentini JE, Magalhaes TNC, de Almeida DQ, Talib LL, Forlenza OV, Balthazar MLF, Castellano G. Cognitive reserve relates to functional network efficiency in Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci*. 2018;10:255.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Data S1.

Supplemental Material

Blood pressure

Animals were acclimated to the testing apparatus during three days prior to blood pressure assessment. Systolic blood pressure was monitored by non-invasive tail-cuff plethysmography (Kent Scientific Corp, USA) two days before the periarterial application of CaCl₂ or NaCl (day 0) and weekly for 3 weeks. Following a period of 10 minutes of acclimation, a minimum of 5 measurements were taken until blood pressure stabilized. Following stabilization, 10 measurements were taken per mouse and averaged for analysis. Measurements were taken at the same time of the day by the same experimenter.

Autoradiography

Resting cerebral blood flow (CBF) was measured 2 weeks after the periarterial application of NaCl or CaCl₂ in awake mice by quantitative autoradiography, using [¹⁴C]IAP (Iodoantipirine 4-N-Methyl-¹⁴C, Perkin Elmer, Canada) as a diffusible tracer. Under isoflurane anaesthesia (induction: 5%, maintenance: 2%), the femoral vein was catheterized for tracer infusion. The femoral artery was catheterized for mean arterial pressure monitoring and blood collection. The discomfort caused by the surgery was treated locally with bupivacaine (Marcaine, CDMV, Canada, 4 mg/kg s.c.). Mice were placed in prone position with their head covered and held under minimal restraint. Body temperature was maintained at 37 °C.

Tracer infusion (1 µCi / 10 g body weight, 8 ml/hour) began two hours after isoflurane anaesthesia was stopped. Arterial blood was collected every 5 seconds during a period of 45 seconds, with the first collection done before tracer infusion. At the end of the 45-second period, mice were decapitated, the brain was quickly removed and frozen in cold isopentane (-30 °C) for 5-10 seconds

and then stored at -80 °C until tissue sectioning. Coronal brain sections were cut on a cryostat at 20- μ m thickness and mounted on glass slides.

Brain sections and ^{14}C standards (American Radiolabeled Chemicals Inc., USA) were exposed to autoradiography films (Kodak BioMax MR Film, USA) during 10 days for densitometry analysis with the MCID™ Densitometry System software (MCID 7.0, Imaging Research Inc, ON, Canada). Plasma was obtained by centrifugation of peripheral blood at 2000 g for 20 minutes, 4°C. Plasma samples were placed in vials in the presence of scintillating liquid (Ultima Gold, PerkinElmer Inc., USA) and radioactivity was counted using a liquid scintillation counter (1219 RachBeta, LKB Wallac, USA). Radioactivity counts obtained were entered into the MCID™ Densitometry System software according to the sampling time (every 5 seconds). The software calculates CBF as a function of the plasma contamination curve (radioactivity counts in plasma as a function of time) and of the intensity of the ^{14}C standards. Brain sections containing the dorsal hippocampus (from Bregma -1.82 to -2.18 mm) were used for analysis in the following regions: visual and somatosensory cortex (VSCx), perirhinal and entorhinal cortex (PECx), CA1 (cornu ammonis area 1), CA2-3 (cornu ammonis area 2-3), DG (dentate gyrus), thalamic nuclei (THA) and corpus callosum (CC). Four brain sections per animal were examined and data from the right hemisphere (corresponding to the side of the calcified carotid) was used for analysis.

In vivo laser Doppler flowmetry

Cerebrovascular autoregulation and CBF responses to whisker stimulation and to endothelium-dependent and independent vasodilators were examined 2 weeks after the periarterial application of NaCl or CaCl₂. Anaesthesia was initiated with isoflurane (induction: 5%, maintenance: 2%) and maintained with alpha-chloralose (50 mg/kg, i.p.) and urethane (750 mg/kg, i.p.). The femoral

artery was cannulated with a heparinized catheter for the monitoring of mean arterial pressure and arterial blood gases. Animals were placed in a stereotax and artificially ventilated through the trachea with a nitrogen/oxygen mixture (Harvard Apparatus, Inspira Advanced Safety Ventilator). Body temperature was maintained at 37 °C with a thermostatically controlled rectal probe.

For analysis of neurovascular coupling and endothelial CBF regulation, a 2x2 mm cranial window was drilled above the right somatosensory cortex. The pia mater was removed and the exposed area was superfused with artificial cerebrospinal fluid (aCSF) (0.5 mL/min, 35°C; composition: NaCl 125 mM, KCl 3 mM, NaHCO₃ 26 mM, NaH₂PO₄·H₂O 1.25 mM, CaCl₂·2H₂O 2 mM, MgCl₂·6H₂O 1mM, glucose 4 mM, ascorbic acid 0.4 mM) in the presence or absence of drugs. A laser Doppler probe (AD Instruments, USA) was placed above the whisker barrel area with the aid of a micromanipulator. Analysis of CBF began 30 minutes after the end of the cranial window procedure and subsequent interruption of isoflurane to allow blood gases to stabilise. Blood gases, pH, mean arterial pressure and CBF at baseline before the stimulations were measured to ensure that physiological parameters were comparable between groups (Supplemental Table 1).

Microhemorrhages

Microhemorrhages were examined with the Prussian blue staining at 3 weeks post-surgery. Brain sections were mounted on microscope slides (Superfrost Plus, Fisher Scientific, USA) and allowed to dry overnight. The next day, they were immersed in a solution of 1% potassium ferrocyanide (Bioshop, Canada) and 1% HCl for 30 minutes. Following this, three washes (5 minutes each) were carried out; two with distilled water and one with tap water followed by immersion in a solution of 1% Neutral Red-1% glacial acetic acid for 2 minutes. Three one-minute washes with tap water were done and the slides were then soaked once in 95% ethanol, once in 100% ethanol

and twice in xylene (5 minutes each) before coverslipping (D.P.X.; Sigma-Aldrich, ON, Canada). Brain sections from a mouse model of hyperhomocysteinemia ¹ kindly provided by Dr. Donna Wilcock (University of Kentucky, USA) were used as a positive control of the Prussian blue protocol. Micrographs were acquired with a Leitz Diaplan microscope equipped with an Olympus DP21 camera (Wild Leitz GmbH, Germany).

Aβ40 and Aβ42 ELISA

Endogenous mouse Aβ40 and Aβ42 were measured by ELISA (KMB3481 and KMB3441, Life Technologies, Invitrogen, USA) at 3 weeks post-surgery. Following decapitation, frontal cortex and hippocampus were dissected from the right hemisphere and frozen at -80 °C until further analysis. Brain tissues were weighed, homogenized in 8X volumes of a guanidine solution (5M guanidine-HCl in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0) and incubated 3 hours at room temperature under agitation. Following centrifugation (16,000 g, 20 minutes) the supernatants were recovered and used for analysis (in duplicate). A separate group of mice was used for plasma Aβ quantification. Blood was collected from the cava vein and plasma was obtained by centrifugation in heparinized tubes (2000 g, 20 minutes). Plasma was diluted in half and processed according to the instructions of the manufacturer. Aβ levels in brains were expressed as pmol/g of brain tissue and the ratio Aβ40/42 was calculated.

Tau Western blot

Body temperature was monitored at sacrifice since hypothermia is known to induce tau hyperphosphorylation ^{2,3}. Mice were killed by decapitation without anaesthesia, as anaesthesia can increase hypothermia-induced tau phosphorylation ⁴. Hippocampal and frontal cortex tissue (right side) were dissected and frozen on dry ice and kept at -80°C until they were homogenized, without

thawing, in RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1% NP-40, 150 mM NaCl, 0.25% Na-deoxycholate, 1 mM EDTA, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM NaF, 1 mM PMSF, 10 µl/ml) supplemented with a protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Western blots were done according to our published protocol⁵. The following primary antibodies were used: AT8 (epitopes pSer202/Thr205, Thermo Fisher Scientific, MN1020), CP13 (epitope pSer202, provided by Dr. Peter Davies), PHF-1 (epitopes pSer396, pSer404, provided by Dr. Peter Davies), Tau1 (dephosphorylated epitopes at Ser195, Ser198, Ser199 and Ser202, clone PC1C6, Millipore, MAB34200) and TauC (A0024, Dako Cytomation for total tau). Phospho-tau densitometry signals were normalized to total tau. Densitometry values were obtained with the Image Gauge software (Fujifilm, USA).

Table S1. Analysis of blood gases, mean arterial pressure and basal CBF in laser Doppler flowmetry studies

	NaCl	CaCl₂	<i>p</i> value
pH	7.36 ± 0.09	7.30 ± 0.03	0.123
pO₂	126.1 ± 7.9	124.7 ± 9.1	0.792
pCO₂	39.8 ± 3.4	42.4 ± 2.3	0.190
Mean arterial pressure	84.0 ± 15.7	69.2 ± 15.6	0.240
CBF at baseline	183.7 ± 44.5	186.0 ± 80.0	0.965

CBF = cerebral blood flow. Data is expressed as mean ± SD and analyzed with a two-tailed Student's t test

Table S2. Quantitative analysis of amyloid- β peptides in brain and plasma

		NaCl	CaCl₂	<i>p</i> value
Hippocampus	Aβ40	174.5 \pm 42.2	175.1 \pm 31.4	0.9770
	Aβ42	18.9 \pm 4.3	17.4 \pm 3.3	0.7587
Frontal cortex	Aβ40	260.7 \pm 51.6	229.4 \pm 67.8	0.2949
	Aβ42	26.0 \pm 5.0	21.1 \pm 6.2	0.1807
Plasma	Aβ40	225.7 \pm 20.1	236.0 \pm 17.8	0.1768
	Aβ42	24.5 \pm 1.6	24.9 \pm 1.6	0.8147

Concentration is expressed in pg/ml/g tissue and data depicted as mean \pm SD. Analysis was done with a two-tailed Student's t test.

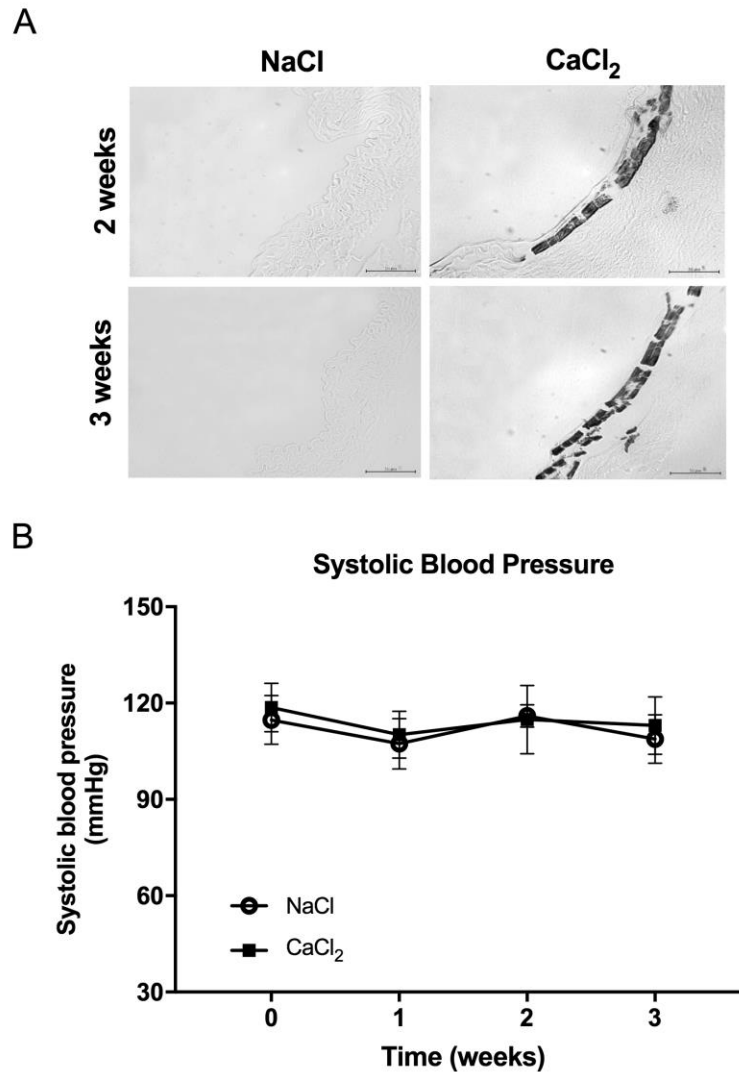
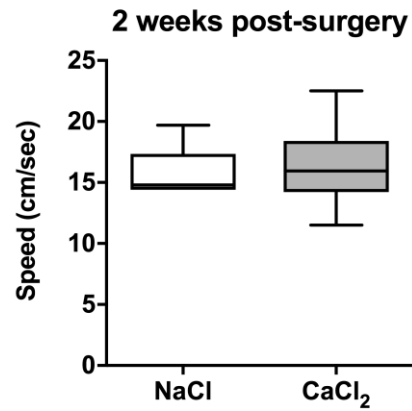


Figure S1. Assessment of calcium deposition and blood pressure. (A) Examination of calcium deposits with the Von Kossa stain at two and three weeks post-calcification in carotid sections from the right hemispheres, in controls (NaCl) and in mice with carotid stiffness (CaCl₂). Scale bar = 50 μ m. (B) Systolic blood pressure (mmHg) was measured with the tail-cuff method. Graph represents mean \pm SD. Data was analyzed with Two Way ANOVA and the Bonferroni correction; $n=5-8$ mice/group.

A



B

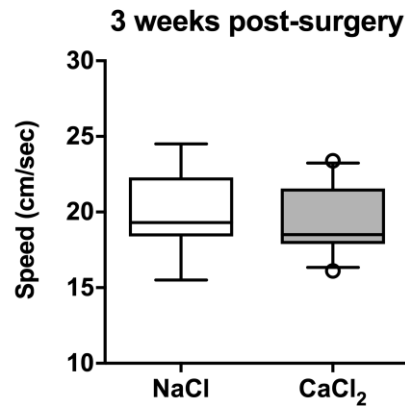


Figure S2. Assessment of locomotor activity. Locomotor activity was evaluated at two (A) and three (B) weeks post-calcification in controls (NaCl) and in mice with carotid stiffness (CaCl₂) by comparing the swimming speed (cm/sec) of mice trained in the Morris Water Maze. Data is displayed in box and whiskers plots, where the median is represented by the horizontal line and the 10th and 90th percentiles extend from the extremes of the box. No significant differences, unpaired Student's t-test; 2 weeks (n=8-9); 3 weeks (n=9-13).

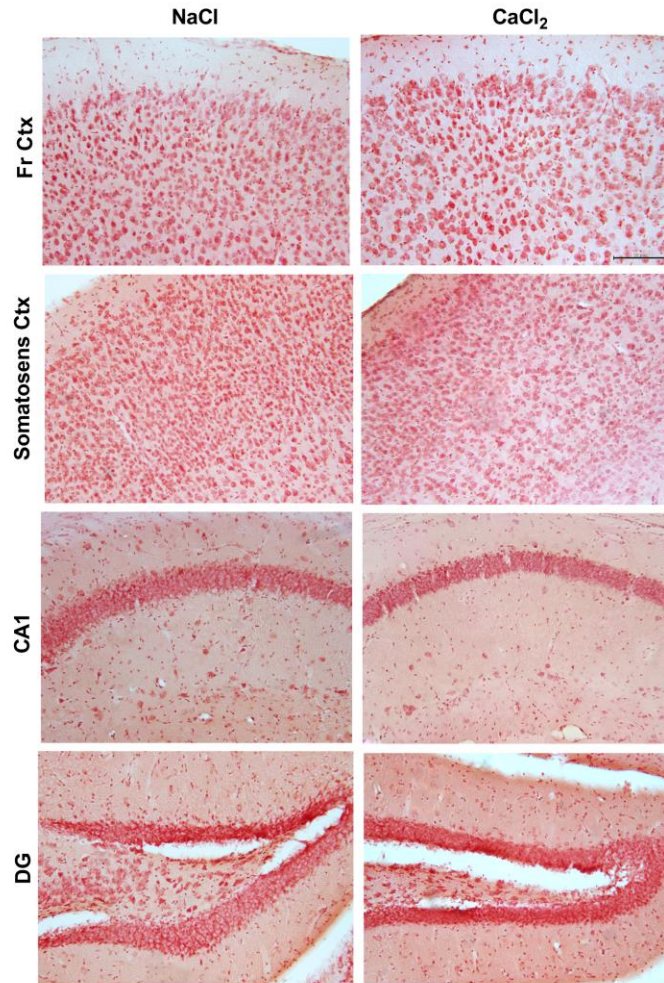


Figure S3. Effect of carotid calcification on cerebral microhemorrhages. Microhemorrhages were examined with the Prussian blue reaction at 3 weeks post-surgery in brain sections from the right hemispheres, in controls (NaCl) and in mice with carotid stiffness (CaCl₂). Tissue was counterstained with 1% Neutral red-1% glacial acetic acid. Fr ctx: frontal cortex; Somatosens ctx: somatosensory cortex; CA1: cornu ammonis 1; DG: dentate gyrus. Scale bar = 50 μ m, magnification = 10X, $n=6$ /group.

Supplemental References:

1. Sudduth TL, Powell DK, Smith CD, Greenstein A, Wilcock DM. Induction of hyperhomocysteinemia models vascular dementia by induction of cerebral microhemorrhages and neuroinflammation. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2013; 33: 708-15.
2. Planel E, Miyasaka T, Launey T, Chui DH, Tanemura K, Sato S, Murayama O, Ishiguro K, Tatebayashi Y, Takashima A. Alterations in glucose metabolism induce hypothermia leading to tau hyperphosphorylation through differential inhibition of kinase and phosphatase activities: implications for Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 2004; 24: 2401-11.
3. El Khoury NB, Gratuze M, Petry F, Papon MA, Julien C, Marcouiller F, Morin F, Nicholls SB, Calon F, Hébert SS, Marette A, Planel E. Hypothermia mediates age-dependent increase of tau phosphorylation in db/db mice. *Neurobiol Dis.* 2016; 88: 55-65.
4. Planel E, Richter KEG, Nolan CE, Finley JE, Liu L, Wen Y, Krishnamurthy P, Herman M, Wang L, Schachter JB, Nelson RB, Lau LF, Duff KE. Anesthesia leads to tau hyperphosphorylation through inhibition of phosphatase activity by hypothermia. *J Neurosci.* 2007; 27: 3090-3097.
5. Petry FR, Pelletier J, Bretteville A, Morin F, Calon F, Hébert SS, Whittington RA, Planel E. Specificity of anti-tau antibodies when analyzing mice models of Alzheimer's disease: problems and solutions. *PLoS One.* 2014; 9: e94251.

Étude 2: Les femelles sont protégées contre les dysfonctions neurovasculaires induites par la rigidité artérielle chez la souris

Par: G. Muhire, D. Vallerand et H. Girouard

Résumé

Les femmes ménopausées présentent plus de risques de développer la démence ¹ et l'AVC ². Chez ces femmes, ces risques sont aussi associés à la rigidité artérielle ³. En effet, la rigidité des grosses artères conduit à une pulsatilité artérielle plus élevée qui endommage la microcirculation ⁴. Dans un modèle animal d'ischémie, les femelles ont montré une protection contre les lésions cérébrovasculaires et cérébrales. L'effet neuroprotecteur était associé aux œstrogènes ¹. Par conséquent, nous avons émis l'hypothèse que les œstrogènes protègent les souris contre les lésions cérébrales associées à la rigidité artérielle. Pour tester cette hypothèse, nous avons utilisé un modèle de rigidité artérielle basé sur la calcification de la carotide. La vulnérabilité du cerveau a d'abord été comparée chez les deux sexes des souris C57BL/6J. Puis, des femelles ovariectomisées (OVX) ont été comparées aux témoins sham ainsi qu'à des femelles OVX recevant de l'estradiol. Le débit sanguin cérébral (CBF) a été évalué grâce à une sonde laser-Doppler sur fenêtre crânienne. Les propriétés mécaniques de l'artère carotide ont été évaluées *ex vivo* à l'aide d'un myographe de pression et la teneur en Ca²⁺ a été déterminée par la méthode colorimétrique o-cresolphtaleine complexone. Les résultats montrent que chez les souris mâles, la rigidité artérielle atténue l'augmentation du CBF induite par la stimulation des moustaches (n=5-6, p <0.05) et la superfusion d'acétylcholine, un vasodilatateur dépendant de l'endothélium (n=5-6, p<0.05). Les souris femelles étaient protégées (n=5-6). Cette protection a été supprimée par une OVX (n=5-6, p<0.05) et restaurée par un traitement à l'œstradiol chez la souris OVX (n=5-6). Cependant, l'estradiol n'a pas réduit la teneur en Ca²⁺ (n=5-6) des artères carotides ni amélioré leurs propriétés mécaniques.

Ces résultats suggèrent que les souris mâles sont plus sujettes aux dysfonctionnements cérébrovasculaires et que les femelles sont protégées par les œstrogènes dans les conditions de rigidité artérielle. Ces données pourraient expliquer l'augmentation de risque AVC et de démences chez les femmes ménopausées comparativement aux hommes du même âge.

Contributions : GM a effectué les chirurgies de calcification et d'ovariectomie. GM et DV ont effectué des expériences et analysé des données. L'étude a été conçue par GM, DV et HG. Tous les auteurs ont contribué à la rédaction et à la révision du manuscrit.

Females are protected from neurovascular dysfunction induced by arterial stiffness in mice

G. Muhire¹, D. Vallerand¹ and H. Girouard¹

¹Department of Pharmacology and Physiology, Université de Montréal, Montréal, Canada.

Abstract

Postmenopausal women are more likely to develop dementia ¹ and stroke ². In these women, the risk is also associated with arterial stiffness ³. The stiffness of large arteries leads to a higher arterial pulsatility that damages the microcirculation ⁴. In an animal model of ischemia, females have shown protection against cerebrovascular and cerebral lesions. The neuroprotective effect was associated with estrogens ⁵. Therefore, we hypothesized that estrogens may protect mice against brain damage associated with arterial stiffness. To test this hypothesis, we used a model of arterial stiffness based on carotid calcification. The vulnerability of the brain was first compared in both sexes of C57BL / 6J mice. Then, ovariectomized females (OVX) were compared to sham controls as well as OVX females receiving estradiol. The cerebral blood flow (CBF) was evaluated using a laser-Doppler probe on cranial window. The mechanical properties of the carotid artery were evaluated *ex vivo* using a pressure myograph and the calcium content was determined by the colorimetric o-cresolphthaleine complexone method. The results show that in male mice, arterial stiffness attenuates the increase in CBF induced by whisker stimulation (n = 5-6, p <0.05) and the superfusion of acetylcholine, an endothelium-dependent vasodilator (n = 5-6, p <0.05). Female mice were protected (n = 5-6). This protection was suppressed by OVX (n = 5-6, p <0.05) and restored by estradiol treatment in OVX mice (n = 5-6). However, estradiol did not reduce the calcium content (n = 5-6) of the carotid arteries nor improve their mechanical properties. These results suggest that male mice are more prone to cerebrovascular dysfunction and that females are

protected by estrogen under arterial stiffness conditions. These data may explain the increased risk of stroke and dementia in postmenopausal women compared to men of the same age.

Keywords: Arterial stiffness; cerebrovascular function; endothelium-dependent dilatation; estrogens.

Introduction

Women have a higher risk of developing Alzheimer's disease ¹ than age matched men ⁶. One important risk factor for dementia is arterial stiffness independently of high blood pressure ⁷. A proposed mechanism that link arterial stiffness and dementia is that cerebrovascular resistance may link elevated carotid-femoral pulse wave velocity (a measure of arterial stiffness in the clinic) and lower performance on memory tests ⁸. Indeed, stiff big arteries lose their capacity to smooth out the fluctuation in blood pressure over the cardiac cycle and ensure a constant tissue perfusion and loss of pulsatility in small vessels. The subsequent increased pulsatility induces downstream vascular alterations and decreases the capacity of small vessels to dilate ⁹, limiting oxygen and nutrients delivery to the cerebral parenchymal tissue. This will affect neuronal functions and ultimately lead to neurodegeneration, cerebral atrophy and the disruption of cognitive processes ¹⁰⁻¹².

Conflicting reports have looked into the sex related differences associated with the level of arterial stiffness. However, there is a clear association between increased arterial stiffness and all-cause and cardiovascular mortality which is almost three-fold higher in women than men ¹³. Some studies reported, a higher arterial stiffness, in women after menopause ¹⁴⁻¹⁸. But these reports were contradicted by reports showing there was no effect of menopause on artery stiffness ¹⁹⁻²¹ attributing the increase to aging. This discrepancy was due to wide age ranges of patients or different measuring techniques used.

Interestingly, female have exhibited protection ischemic brain injury. The neuroprotective effect was associated with estrogens in various animal models of ischemia ⁵. The declining level of estradiol in plasma after ovariectomy was associated with more brain damage under neurodegenerative conditions ²²⁻²⁴ and estradiol treatment in ovariectomized animals reduced brain

damage²². In humans, the estrogen decline after menopause is associated with increased risks of cardiovascular diseases²⁵ and brain disorders²⁶. Also, estrogens act directly on arteries to reduce vascular resistance, enhance elastic properties, reduce collagen deposition and increase elastin deposition in human and animal models²⁷. We recently developed a new murine model of arterial stiffness based on carotid calcification, and using this model we demonstrated that the carotid stiffness induces cerebrovascular dysfunction²⁸ and cognitive impairment¹⁰. In this study, we aimed to better understand sex implication and estrogen effect in the level of induced arterial stiffness but also its consequence on brain homeostasis. Using the calcification model, we sought to determine sex and estrogens impact on the carotid artery calcification and mechanical properties as well as on cerebrovascular reactivity.

Material and methods

Animals

All procedures were approved beforehand by the Animal Care Committee of the Université de Montréal and were performed in accordance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care (Protocol number: 18-128). Ten to twelve-week-old male and female C57BL/6 mice (Charles River Laboratories, Canada) were housed individually in a temperature-controlled room and maintained on a 12-h light/12-h dark cycle with *ad libitum* access to water and to standard rodent diet (Envigo, USA). Following acclimation, mice were randomly assigned to two groups receiving either a periarterial application of NaCl (control group) or CaCl₂ (carotid stiffness group). For each experiment, a minimum of $n= 5-6$ animals was used per group.

Carotid calcification surgery

Animals were handled during the two days preceding the surgery. Carotid calcification was done as described previously²⁹. Briefly, mice were anesthetised with a mixture of ketamine/xylazine

(90 mg/kg; 6 mg/kg, CDMV, Canada and Bayer Inc., Canada, respectively) and the right common carotid artery was carefully isolated and a small piece of sterile parafilm was slid underneath. A sterile gauze (5 mm x 5 mm) soaked in 0.3M CaCl₂ (Sigma- Aldrich, ON, Canada) was applied on the carotid artery for 20 min. The gauze was then removed and the incision sutured. Control animals received a sterile compress soaked in 0.9% NaCl in identical conditions. Carprofen (Rimadyl, CDMV, Canada, 5 mg/kg) was injected subcutaneously as anti-inflammatory after the surgery and was administered every 24 hours during two consecutive days. The day of the surgery mice also received bupivacaine hydrochloride (Marcaine, CDMV, Canada, 4 mg/kg subcutaneous injection) at the site of the incision, and trimethoprim sulfadiazine (Tribrissen, CDMV, Canada 30 mg/kg subcutaneous injection) every 24 hours for 3 consecutive days to prevent infections. The weight of the animals was monitored weekly after the surgery to verify good recovery.

Ovariectomy, estradiol administration, and estradiol assay

Following arterial calcification surgery, an aseptic bilateral ovariectomy was carried via a dorsal incision on female mice (OVX group) as previously described³⁰. Briefly, a 2-3 cm midline incision was made in the skin. One cm lateral of the midline, another incision was made through the fascia. Under this fascia in the abdominal cavity, the adipose tissue surrounding the ovary was pulled out. After the ovary identification, the uterine horn and vessels were ligated 0.5-1 cm proximally of this structure. The ligated ovary and adipose tissue were then sectioned. The same procedure was repeated in the contralateral fascia³⁰. Half of the animals from this group received 17 β -estradiol (1 μ g in 100 μ L in sesame oil sc) (Sigma- Aldrich, USA) administered at 9:00 AM daily for 6 days³¹ (OVX+ estradiol group). The rest of the mice received a vehicle in the same manner (sesame oil, 100 μ L sc; OVX+ vehicle group). A third group was used as control group (CTL group) and did not undergo ovariectomy. At the end of each experiment, blood was collected. Plasma estradiol

levels were measured with ELISA (Cayman Chemical, USA) according to the manufacturer's instructions³¹. Vaginal smear was sampled on female mice to determine the link between estrous cycle stage and cerebrovascular protection as previously described^{32, 33}. Briefly, the vaginal secretion was collected from mice, using the tip of plastic pipette filled with saline 0.9% introduced in the vagina and the liquid was flushed to collect the sample. The final flush containing vaginal fluid was placed on a glass slide. The slide was air dried and then stained with Jorvet stain (Jorgensen Laboratories, USA) for 45 seconds. The slides were rinsed with water, overlaid with a coverslip, and viewed immediately in the microscope at 10 magnification. The stage of the estrous cycle was determined based on the presence or absence of leukocytes, cornified epithelial, and nucleated epithelial cells.

In vivo laser Doppler flowmetry

CBF responses to whisker stimulation, endothelium-dependent and independent relaxation were examined two weeks after surgery. Anesthesia was initiated with isoflurane (induction: 5%, maintenance: 2%) and maintained with alpha-chloralose (50 mg/kg, i.p.) and urethane (750 mg/kg, i.p.). The femoral artery was cannulated with a heparinized catheter for the monitoring of mean arterial pressure and arterial blood gases. Animals were placed in a stereotax and artificially ventilated through the trachea with a nitrogen/oxygen/ CO₂ mixture (Harvard Apparatus, Inspira Advanced Safety Ventilator). Body temperature was maintained at 37 °C with a thermostatically controlled rectal probe. A 2x2 mm cranial window was drilled above the somatosensory cortex. The pia mater was removed and the exposed area was superfused with artificial cerebrospinal fluid (aCSF) (0.5 ml/min, 35°C; composition: NaCl 125 mM, KCl 3 mM, NaHCO₃ 26 mM, NaH₂PO₄H₂O 1.25 mM, CaCl₂2H₂O 2 mM, MgCl₂6H₂O 1mM, glucose 4 mM, ascorbic acid 0.4 mM). A laser Doppler probe (AD Instruments, USA) was placed above the whisker barrel area

(right side) with the aid of a micromanipulator for CBF monitoring. Analysis of CBF responses began 30 minutes after the end of the cranial window procedure to allow blood gases to stabilize. Blood gases were measured at the beginning and at the end of the CBF experiment.

Neurovascular coupling was examined with three whisker stimulations (1-minute duration, spaced every 3 minutes) on the contralateral side from the probe location. Endothelium-dependent CBF responses were measured after the superfusion of acetylcholine (Ach, 10 μ M, Sigma- Aldrich, Canada) during 5 minutes followed by a 15 minutes aCSF superfusion to restore CBF responses to basal levels. Endothelium-independent CBF responses were examined with the superfusion of sodium nitroprusside (SNP 50 μ M, Sigma- Aldrich, Canada), a nitric oxide donor. Relative changes in CBF (% increase in CBF after stimulation) were analyzed with the LabChart6 Pro software (v6.1.3, AD Instruments, USA).

Carotid mechanical properties study

Mechanical properties were assessed as previously described³⁴. Carotid arteries were mounted on a pressure myograph (Living Systems Instrumentation) and pressurized at 60 mmHg. Diameter changes were measured by video microscopy from 60 to 180 mmHg with steps of 20 mmHg in a Ca^{2+} -free physiological salt solution (pH 7.4; 130 mmol/L NaCl, 4.7 mmol/L KCl, 1.18 mmol/L KH_2PO_4 , 1.17 mmol/L MgSO_4 , 14.9 mmol/L NaHCO_3 , 0.023 mmol/L EDTA, and 10 mmol/L glucose) containing 1 mmol/L EGTA to abolish myogenic tone and to only evaluate the mechanical properties of the arteries. The initial diameter of 60 mmHg was noted to assess the carotid's radius. The circumferential wall strain (%) was determined by $(D - D_{\text{initial mm Hg}}) / D_{\text{initial mm Hg}}$, where D is the diameter at a given pressure and $D_{\text{initial mm Hg}}$ is the initial diameter at 60 mmHg. The incremental distensibility (%/mmHg) was determined by $(D_1 - D_0) / (D_1 \times \Delta P) \times 100$, where D_0

and D_1 are the internal diameters before and after pressure increment, respectively, and ΔP is the change in pressure (20 mmHg).

Calcium determination

The carotid tissues were dried at 55 °C in heating blocks and decalcified with formic acid 10% (30 μ l/mg dried tissue) at 4°C overnight. Ca^{2+} released from the lyophilized tissues was determined colorimetrically using a reaction with o-cresolphthalein complexone, according to the manufacturer's specifications (Sigma-Aldrich, Canada). Data were calculated as micrograms per milligrams of dried tissue, using a calibration curve as previously described^{35,36}.

Statistical analysis

Data analysis was performed with the GraphPad Prism software (v5.00a, California, USA). Vascular Ca^{2+} content was assessed by one-way ANOVA with Tukey's post-hoc test. A two-way ANOVA with Bonferroni post-hoc test was used to assess sex and surgery effect and their interaction on cerebrovascular reactivity and for ELISA data analysis. A repeated measures ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test was used for the mechanical properties data. Statistical significance was set at $p < 0.05$. Precise statistical data are reported in the figure legends.

Results

Effect of carotid stiffness on vascular reactivity in male and female mice

There were no differences in CBF increase in responses to whisker stimulation, Ach or SNP between male and female control (NaCl) groups (Figure 1a-c, n=5-6/ group). In male mice, calcification decreased the response to whisker stimulation and Ach (Figure 1 a-b, $p < 0.05$, n=5-6/ group) but did not affect the CBF response to SNP (Figure 1c, n=5-6/ group). Calcification did not affect the response to whisker stimulation, Ach or SNP in female mice (Figure 1a-c, n=5-6/ group). The basal CBF was similar across all groups (Figure 1d, n=5-6/ group).

Effect of ovariectomy and estrogen replacement on vascular reactivity

In order to determine whether the CBF response in calcified female mice was associated with estrogen, we used the menopause model of ovariectomy to deplete estrogen level. Estradiol measures in plasma showed a slight decrease in OVX+ vehicle group compared to intact female mice (Figure 2), but the vaginal smear cytology examination showed the absence of cells suggesting the absence of cycle as a consequence of ovariectomy (Figure 6 e). The estradiol administration increased estradiol level in plasma (Figure 2, ** $p < 0.01$, $n = 5-6$) and restored the estrous cycle as confirmed by the vaginal smear cytology (Figure 6 a-d) in OVX female with and without carotid calcification. In female control group, the CBF responses to whisker stimulation, Ach or SNP was not affected by calcification (Figure 3a-c, $n = 5-6$). However, in the OVX + vehicle group, calcification attenuated the CBF increase in response to whisker stimulation and Ach but not to SNP similarly to male calcified mice (Figure 3a-c, * $p < 0.05$, $n = 5-6$). In addition, we sought to determine whether estradiol replacement could reverse calcification effects observed in OVX + vehicle group. In this group, estradiol treatment increased the CBF response to whisker stimulation and Ach at the level of control group. Also, the basal CBF was similar across all groups (Figure 3d, $n = 5-6$ / group).

Effects of ovariectomy and estrogen replacement on carotid mechanical properties

We determined the carotid compliance and distensibility to assess the mechanical properties in male and female mice. In both sex, calcification reduced compliance as shown by a circumferential decrease in pressure varying from 100-180 mmHg (Figure 4a, c; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, $n = 5$) compared to control (NaCl) groups. Also, carotid calcification decreased the incremental distensibility between 80- 100 mmHg (Figure 4b, d; * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, $n = 5$). There was no sex difference observed, and estradiol treatment did not show any effect on carotid

artery mechanical properties. Finally, ovariectomy did not induce stiffness in female mice without a calcified carotid artery.

Calcium content

The carotid calcium concentration was measured in calcified animals. The results did not show any difference between male and female mice including control, OVX + vehicle and OVX estradiol mice (Figure 5, n= 5-6).

Discussion

In the present study, we investigated sexual dimorphism of cerebrovascular vulnerability to arterial stiffness. We also tested whether estradiol may provide neuroprotection against cerebrovascular dysfunction induced by arterial stiffness. As expected, unlike males, female mice are protected from cerebrovascular injury. In female mice, arterial stiffness did not attenuate the CBF increase induced by whisker or endothelium-dependent stimulations. This protection was suppressed by ovariectomy and was restored by estradiol treatment in OVX mice. However, estrogen did not reduce calcium content in carotid arteries nor improve mechanical properties in this model. These results suggest that estradiol is responsible for the decreased cerebrovascular vulnerability to large artery stiffness in female mice.

In our study, the increase in CBF induced by whisker stimulation, Ach and SNP was not sex related as it was similar in both male and female control groups. Neither did ovariectomy modify this response. Consistent with this, it was reported that resting CBF and CBF response to Ach or whisker stimulation were not different in males, females and ovariectomized mice³⁷ or in rats^{38, 39}. Although we did not find any difference in CBF increase between sexes in our control groups, our findings show the response to whisker stimulation and Ach was impaired in male mice with a calcified carotid artery while it remained comparable to control groups (male and intact female)

and in female mice with a calcified carotid artery. However, the effect of the NO donor, SNP, remained similar across all groups suggesting that arterial stiffness does not alter vascular smooth muscle dependent responses.

Similarly, prior studies have reported the premenopausal female protection from cerebrovascular damage^{37, 40, 41}. The protection from arterial stiffness effects observed in female mice compared to males was abolished by ovariectomy. Estradiol administration to OVX mice restored the estrous cycle, enhanced estradiol in plasma and reversed the cerebrovascular dysfunction previously observed in OVX mice, confirming that estradiol provides protection from cerebrovascular effects of arterial stiffness. This is in agreement with previous reports which showed the estradiol protection against cerebrovascular damage associated with acute⁴⁰ and chronic³⁷ administration of Ang II in female mice. This protection was effective in proestus and estrous phase when estrogen levels in plasma are high⁴⁰. In our study, this protection was not cycle-dependent because the female group mostly in metestrus and diestrus (4 out of 5) were protected. This may be explained by the estrogen chronic treatment which provided protection on a longer period in our study.

Despite a clearly observed effect of ovariectomy in smear cytology examination, the plasma estradiol concentration results did not show any difference between ovary-intact and OVX female. There are two explanations for this observation. Firstly, we used randomly cycling female as control, and after smear cytology examination, very few of them were in the proestrus and estrous, phases with high estradiol concentration in plasma. Secondly, due to antibody cross-reactivity with another steroid, steroid metabolite or plasma compound, it is possible to falsely detect estradiol in OVX mice⁴².

Regarding the mechanical properties, we found that carotid compliance and distensibility were altered in male mice with a stiff carotid artery as previously reported³⁴. These properties were similarly affected in normal and OVX female mice with a calcified carotid artery with or without estradiol replacement. Estradiol did not improve carotid mechanical properties. Two recent studies have reported that estradiol reduces stiffness of pulmonary artery⁴³ and carotid artery⁴⁴. This discrepancy may be explained by the failure to reduce the carotid calcium content inherent to our stiffness model. While in some studies, postmenopausal women display a decline of distensibility⁴⁴ and an increment of arterial stiffness⁴⁵, other authors did not reach the same conclusion¹⁹. For O'Neill *et al.*¹⁹, age rather than menopause itself, had the strongest correlation with arterial stiffness increment. In agreement, a menopause-like condition induced by OVX did not induce stiffness as no difference was found between our control and OVX female groups. This may be due to the young age of animals in our model and the brief period between the calcification surgery and the assessment of stiffness but we do not exclude this possibility in older OVX mice.

Previous studies in our laboratory, using this arterial stiffness model in males have demonstrated that this condition induces neuroinflammation following ROS generation. This inflammation was associated with neurodegeneration in the hippocampus²⁸, cerebrovascular dysfunction and ultimately, memory impairment. As reviewed⁴⁶⁻⁴⁹, estrogen acts at different levels to protect the brain. The neuroprotection mechanism involves direct action on neurons but also on nonneuronal cells. The possible neuroprotective actions include brain perfusion improvement⁵⁰, anti-inflammatory effects^{51, 52}, antioxidant action⁵³, glucose transport enhancement⁵⁴ and antiapoptotic effects⁵⁵.

Conclusion and perspectives

Our study provides evidence that females are protected from deleterious effects of arterial stiffness on cerebrovascular function and that male mice are vulnerable to these effects. This protection in female mice was annihilated by OVX and restored by estradiol treatment. Further studies are needed to determine other mechanisms involved in the oestrogen neuroprotection. Also it would be interesting to see whether this neuroprotection would eventually prevent the cognitive decline we previously observed as a consequence of arterial stiffness. Finally, as estrogen can be produced in brain ^{46, 56}, it is of the highest importance to understand the role of the neuronal derived estradiol compared to the circulating estradiol.

References

1. Rocca WA, Grossardt BR and Shuster LT. Oophorectomy, estrogen, and dementia: a 2014 update. *Molecular and cellular endocrinology*. 2014;389:7-12.
2. Spychala MS, Honarpisheh P and McCullough LD. Sex differences in neuroinflammation and neuroprotection in ischemic stroke. *Journal of neuroscience research*. 2017;95:462-471.
3. DuPont JJ, Kenney RM, Patel AR and Jaffe IZ. Sex differences in mechanisms of arterial stiffness. *British journal of pharmacology*. 2019;176:4208-4225.
4. Mitchell GF, van Buchem MA, Sigurdsson S, Gotal JD, Jonsdottir MK, Kjartansson O, Garcia M, Aspelund T, Harris TB, Gudnason V and Launer LJ. Arterial stiffness, pressure and flow pulsatility and brain structure and function: the Age, Gene/Environment Susceptibility--Reykjavik study. *Brain : a journal of neurology*. 2011;134:3398-407.
5. McCullough LD and Hurn PD. Estrogen and ischemic neuroprotection: an integrated view. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2003;14:228-235.
6. Ferretti MT, Iulita MF, Cavedo E, Chiesa PA, Schumacher Dimech A, Santuccione Chadha A, Baracchi F, Girouard H, Misoch S, Giacobini E, Depypere H and Hampel H. Sex differences in Alzheimer disease - the gateway to precision medicine. *Nature reviews Neurology*. 2018;14:457-469.
7. Nagai K, Akishita M, Machida A, Sonohara K, Ohni M and Toba K. Correlation between pulse wave velocity and cognitive function in nonvascular dementia. *Journal of the American Geriatrics Society*. 2004;52:1037-8.
8. Cooper LL, Woodard T, Sigurdsson S, van Buchem MA, Torjesen AA, Inker LA, Aspelund T, Eiriksdottir G, Harris TB, Gudnason V, Launer LJ and Mitchell GF. Cerebrovascular Damage Mediates Relations Between Aortic Stiffness and Memory. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)*. 2016;67:176-82.
9. Shirwany NA and Zou M-h. Arterial stiffness: a brief review. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2010;31:1267.
10. Muhire G, Iulita MF, Vallerand D, Youwakim J, Gratuze M, Petry FR, Planel E, Ferland G and Girouard H. Arterial Stiffness Due to Carotid Calcification Disrupts Cerebral Blood Flow Regulation and Leads to Cognitive Deficits. *Journal of the American Heart Association*. 2019;8:e011630.
11. Mitchell GF. Effects of central arterial aging on the structure and function of the peripheral vasculature: implications for end-organ damage. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985)*. 2008;105:1652-60.
12. Mitchell GF, van Buchem MA, Sigurdsson S, Gotal JD, Jonsdottir MK, Kjartansson Ó, Garcia M, Aspelund T, Harris TB and Gudnason VJB. Arterial stiffness, pressure and flow pulsatility and brain structure and function: the Age, Gene/Environment Susceptibility--Reykjavik study. 2011;134:3398-3407.
13. Regnault V, Thomas F, Safar ME, Osborne-Pellegrin M, Khalil RA, Pannier B and Lacolley P. Sex difference in cardiovascular risk: role of pulse pressure amplification. *Journal of the American College of Cardiology*. 2012;59:1771-7.
14. Duprez D and Jacobs DR, Jr. Arterial stiffness and left ventricular diastolic function: does sex matter? *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)*. 2012;60:283-4.

15. Gatzka CD, Kingwell BA, Cameron JD, Berry KL, Liang YL, Dewar EM, Reid CM, Jennings GL and Dart AM. Gender differences in the timing of arterial wave reflection beyond differences in body height. *Journal of hypertension*. 2001;19:2197-203.
16. Hayward CS and Kelly RP. Gender-related differences in the central arterial pressure waveform. *Journal of the American College of Cardiology*. 1997;30:1863-71.
17. Shim CY, Park S, Choi D, Yang WI, Cho IJ, Choi EY, Chung N and Ha JW. Sex differences in central hemodynamics and their relationship to left ventricular diastolic function. *Journal of the American College of Cardiology*. 2011;57:1226-33.
18. Sehgel NL, Vatner SF and Meininger GA. "Smooth muscle cell stiffness syndrome"—revisiting the structural basis of arterial stiffness. *Frontiers in physiology*. 2015;6:335.
19. O'Neill S, Liu J, O'Rourke M and Khoo S. The menopausal transition does not appear to accelerate age-related increases in arterial stiffness. *Climacteric : the journal of the International Menopause Society*. 2012;16:62-69.
20. McEniery CM, Yasmin, Hall IR, Qasem A, Wilkinson IB and Cockcroft JR. Normal vascular aging: differential effects on wave reflection and aortic pulse wave velocity: the Anglo-Cardiff Collaborative Trial (ACCT). *Journal of the American College of Cardiology*. 2005;46:1753-60.
21. Mitchell GF, Parise H, Benjamin EJ, Larson MG, Keyes MJ, Vita JA, Vasan RS and Levy D. Changes in arterial stiffness and wave reflection with advancing age in healthy men and women: the Framingham Heart Study. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)*. 2004;43:1239-45.
22. Azcoitia I, Sierra A, Veiga S, Honda S, Harada N and Garcia-Segura LM. Brain aromatase is neuroprotective. *Journal of neurobiology*. 2001;47:318-29.
23. Yue X, Lu M, Lancaster T, Cao P, Honda S, Staufienbiel M, Harada N, Zhong Z, Shen Y and Li R. Brain estrogen deficiency accelerates Abeta plaque formation in an Alzheimer's disease animal model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102:19198-203.
24. Azcoitia I, Fernandez-Galaz C, Sierra A and Garcia-Segura LM. Gonadal hormones affect neuronal vulnerability to excitotoxin-induced degeneration. *Journal of neurocytology*. 1999;28:699-710.
25. Kuhl H. Pharmacology of estrogens and progestogens: influence of different routes of administration. *Climacteric : the journal of the International Menopause Society*. 2005;8 Suppl 1:3-63.
26. Scott E, Zhang QG, Wang R, Vadlamudi R and Brann D. Estrogen neuroprotection and the critical period hypothesis. *Frontiers in neuroendocrinology*. 2012;33:85-104.
27. Rossi P, Frances Y, Kingwell BA and Ahimastos AA. Gender differences in artery wall biomechanical properties throughout life. *Journal of hypertension*. 2011;29:1023-33.
28. Sadekova N, Iulita MF, Vallerand D, Muhire G, Bourmoum M, Claing A and Girouard H. Arterial stiffness induced by carotid calcification leads to cerebral gliosis mediated by oxidative stress. *Journal of hypertension*. 2018;36:286-298.
29. Sadekova N, Vallerand D., Guevara E., Lesage F., Girouard H. Carotid calcification in mice: a new model to study the effects of arterial stiffness on the brain *Journal of the American Heart Association*. 2013.
30. Ström JO, Theodorsson A, Ingberg E, Isaksson I-M and Theodorsson EJJoveJ. Ovariectomy and 17 β -estradiol replacement in rats and mice: a visual demonstration. 2012.

31. Park E-M, Cho S, Frys KA, Glickstein SB, Zhou P, Anrather J, Ross ME and Iadecola C. Inducible nitric oxide synthase contributes to gender differences in ischemic brain injury. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2006;26:392-401.
32. Byers SL, Wiles MV, Dunn SL and Taft RA. Mouse estrous cycle identification tool and images. *PloS one*. 2012;7:e35538.
33. Caligioni CS. Assessing reproductive status/stages in mice. *Current protocols in neuroscience*. 2009:A. 4I. 1-A. 4I. 8.
34. Sadekova N, Vallerand D, Guevara E, Lesage F and Girouard H. Carotid calcification in mice: a new model to study the effects of arterial stiffness on the brain. *Journal of the American Heart Association*. 2013;2:e000224.
35. Essalihi R, Zandvliet ML, Moreau S, Gilbert L-A, Bouvet C, Lenoël C, Nekka F, McKee MD and Moreau P. Distinct effects of amlodipine treatment on vascular elastocalcinosis and stiffness in a rat model of isolated systolic hypertension. *Journal of hypertension*. 2007;25:1879-1886.
36. Essalihi R, Dao HH, Gilbert L-A, Bouvet C, Semerjian Y, McKee MD and Moreau P. Regression of medial elastocalcinosis in rat aorta: a new vascular function for carbonic anhydrase. *Circulation*. 2005;112:1628-1635.
37. Girouard H, Lessard A, Capone C, Milner TA and Iadecola C. The neurovascular dysfunction induced by angiotensin II in the mouse neocortex is sexually dimorphic. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2008;294:H156-63.
38. Watanabe Y, Littleton-Kearney M, Traystman R and Hurn P. Estrogen restores postischemic pial microvascular dilation. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2001;281:H155-H160.
39. Holschneider DP and Scremin OU. Effects of ovariectomy on cerebral blood flow of rats. *Neuroendocrinology*. 1998;67:260-268.
40. Capone C, Anrather J, Milner TA and Iadecola C. Estrous cycle-dependent neurovascular dysfunction induced by angiotensin II in the mouse neocortex. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)*. 2009;54:302-7.
41. Wang Q, Santizo R, Baughman VL, Pelligrino DA and Iadecola C. Estrogen provides neuroprotection in transient forebrain ischemia through perfusion-independent mechanisms in rats. *Stroke*. 1999;30:630-7.
42. Haisenleder DJ, Schoenfelder AH, Marcinko ES, Geddis LM and Marshall JC. Estimation of estradiol in mouse serum samples: evaluation of commercial estradiol immunoassays. *Endocrinology*. 2011;152:4443-4447.
43. Liu A, Tian L, Golob M, Eickhoff JC, Boston M and Chesler NC. 17beta-Estradiol Attenuates Conduit Pulmonary Artery Mechanical Property Changes With Pulmonary Arterial Hypertension. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)*. 2015;66:1082-8.
44. Shufelt C, Elboudwarej O, Johnson BD, Mehta P, Bittner V, Braunstein G, Berga S, Stanczyk F, Dwyer K and Merz CNB. Carotid Artery Distensibility and Hormone Therapy and Menopause: The Los Angeles Atherosclerosis Study (LAAS). *Menopause (New York, NY)*. 2016;23:150.
45. Mitchell GF, Conlin PR, Dunlap ME, Lacourcière Y, Arnold JMO, Ogilvie RI, Neutel J, Izzo JL and Pfeffer MA. Aortic diameter, wall stiffness, and wave reflection in systolic hypertension. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)*. 2008;51:105-111.
46. Azcoitia I, Arevalo MA and Garcia-Segura LM. Neural-derived estradiol regulates brain plasticity. *Journal of chemical neuroanatomy*. 2018;89:53-59.

47. Azcoitia I, Arevalo MA, De Nicola AF and Garcia-Segura LM. Neuroprotective actions of estradiol revisited. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2011;22:467-73.
48. Arevalo MA, Azcoitia I and Garcia-Segura LM. The neuroprotective actions of oestradiol and oestrogen receptors. *Nature reviews Neuroscience*. 2015;16:17-29.
49. Brann DW, Dhandapani K, Wakade C, Mahesh VB and Khan MM. Neurotrophic and neuroprotective actions of estrogen: basic mechanisms and clinical implications. *Steroids*. 2007;72:381-405.
50. Zhang Z-l, Qin P, Liu Y, Zhang L-x, Guo H, Deng Y-l, Hou Y-s, Wang L-y, Miao Y and Ma Y-lJBr. Alleviation of ischaemia-reperfusion injury by endogenous estrogen involves maintaining Bcl-2 expression via the ER α signalling pathway. 2017;1661:15-23.
51. Acaz-Fonseca E, Sanchez-Gonzalez R, Azcoitia I, Arevalo MA, Garcia-Segura LMJM and endocrinology c. Role of astrocytes in the neuroprotective actions of 17 β -estradiol and selective estrogen receptor modulators. 2014;389:48-57.
52. Pratap UP, Patil A, Sharma HR, Hima L, Chockalingam R, Hariharan MM, Shitoot S, Priyanka HP and ThyagaRajan SJBBr. Estrogen-induced neuroprotective and anti-inflammatory effects are dependent on the brain areas of middle-aged female rats. 2016;124:238-253.
53. Lagranha CJ, Silva TLA, Silva SCA, Braz GRF, da Silva AI, Fernandes MP and Sellitti DFJLs. Protective effects of estrogen against cardiovascular disease mediated via oxidative stress in the brain. 2018;192:190-198.
54. Arnold SJNod. Estrogen suppresses the impact of glucose deprivation on astrocytic calcium levels and signaling independently of the nuclear estrogen receptor. 2005;20:82-92.
55. Alexaki V-I, Charalampopoulos I, Kampa M, Vassalou H, Theodoropoulos P, Stathopoulos EN, Hatzoglou A, Gravanis A and Castanas EJTFj. Estrogen exerts neuroprotective effects via membrane estrogen receptors and rapid Akt/NOS activation. 2004;18:1594-1596.
56. Azcoitia I, Yague JG and Garcia-Segura LM. Estradiol synthesis within the human brain. *Neuroscience*. 2011;191:139-47.

Figure and Legends

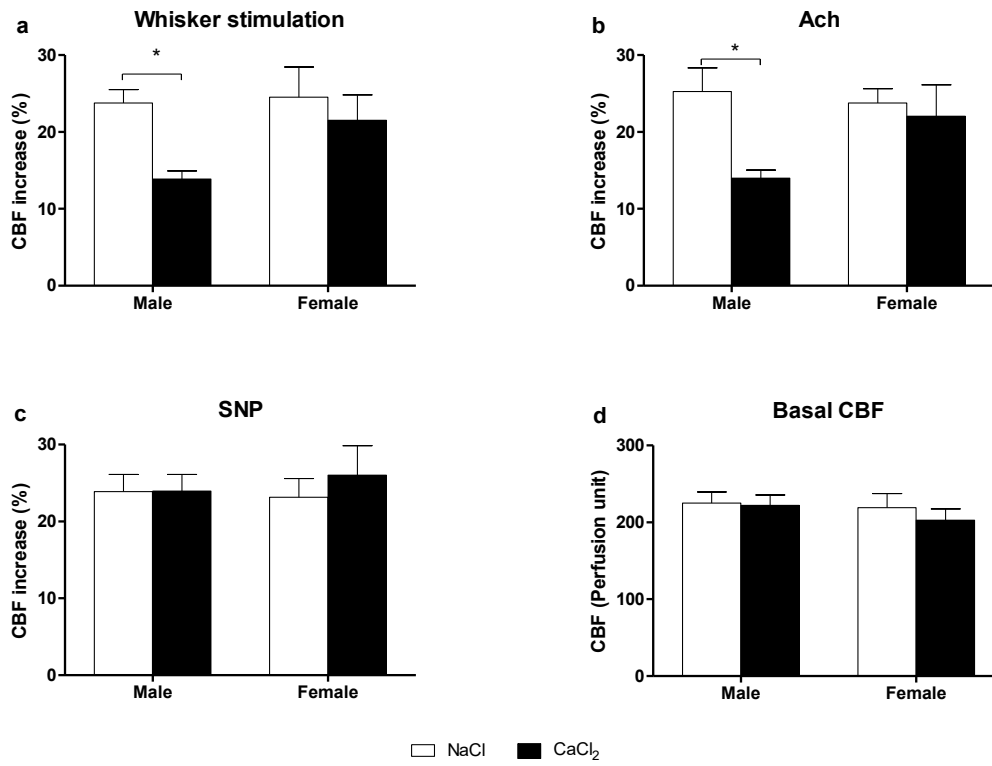


Figure 1. Effect of carotid calcification on cerebrovascular responses in male and female mice. CBF responses to whisker stimulation (a), endothelium-dependent acetylcholine (b), or endothelium-independent SNP (c) and basal CBF (d) were measured by laser Doppler flowmetry two weeks after the periarterial application of NaCl or CaCl₂. Data are means \pm SEM. * $p < 0.05$; two way-ANOVA with Bonferroni post-hoc test; $n = 5-6$ mice.

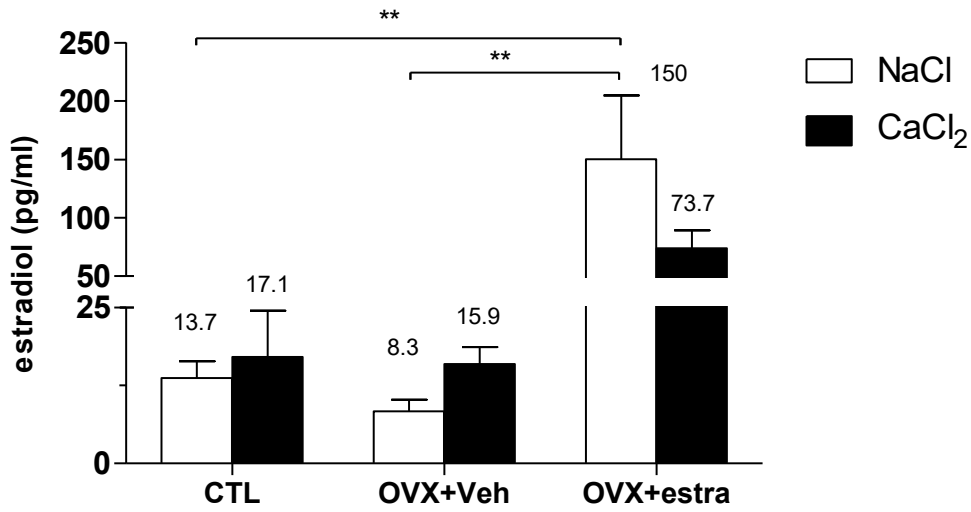


Figure 2. Plasma estradiol measurement in female mice. Estradiol level were measured in non-ovariectomized (CTL) and ovariectomized mice (OVX) with administration of sesame oil (V) or estradiol (E) 1 μ g/100 μ L s.c. for 6 days two weeks after the periarterial application of NaCl or CaCl₂. Data are means \pm SEM. **p < 0.01, two way-ANOVA with Bonferroni post-hoc test; n =5-6 mice.

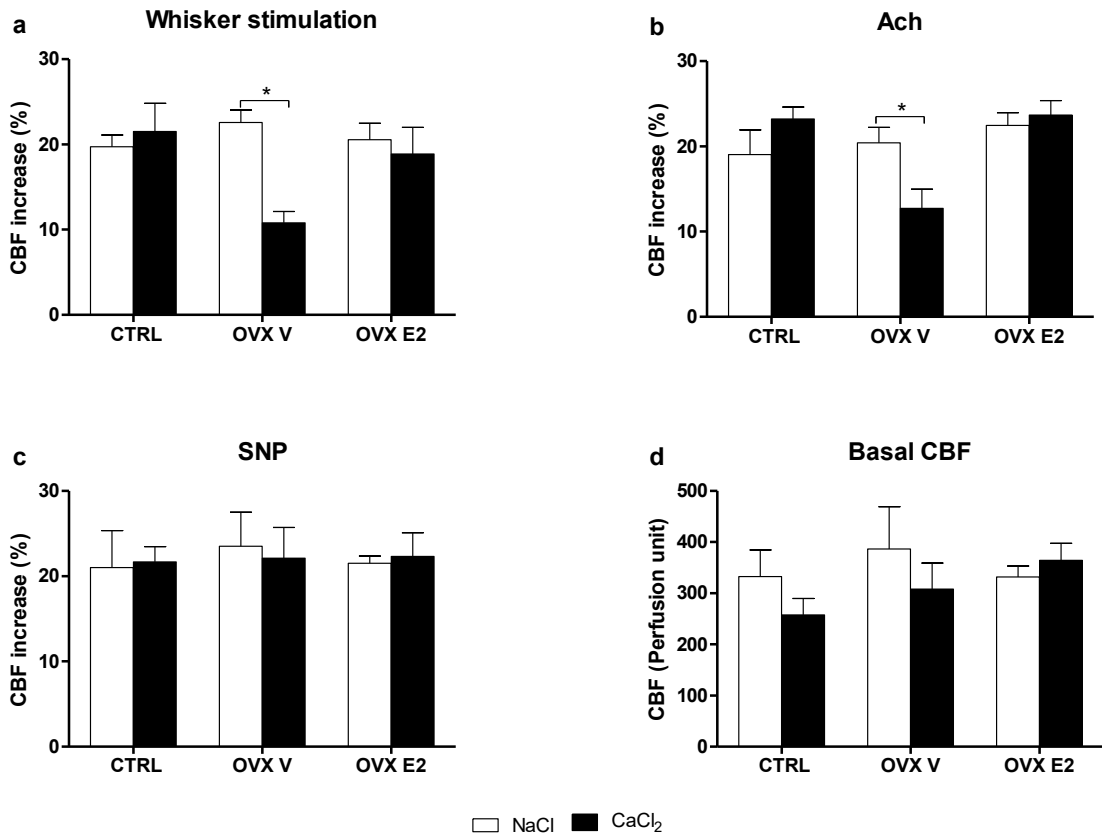


Figure 3. Effect of carotid calcification on cerebrovascular responses in female mice. CBF responses to whisker stimulation (a), endothelium-dependent acetylcholine (b), or endothelium-independent SNP (c) and basal CBF(d) were measured by laser Doppler flowmetry two weeks after the periarterial application of NaCl or CaCl₂ in non-ovariectomized (CTRL) and ovariectomized mice (OVX) with administration of sesame oil (V) or estradiol (E) 1µg/100µL s.c. for 6 days. Data are means ± SEM. *p < 0.05 two-way-ANOVA with Bonferroni post-hoc test; n =5-6 mice.

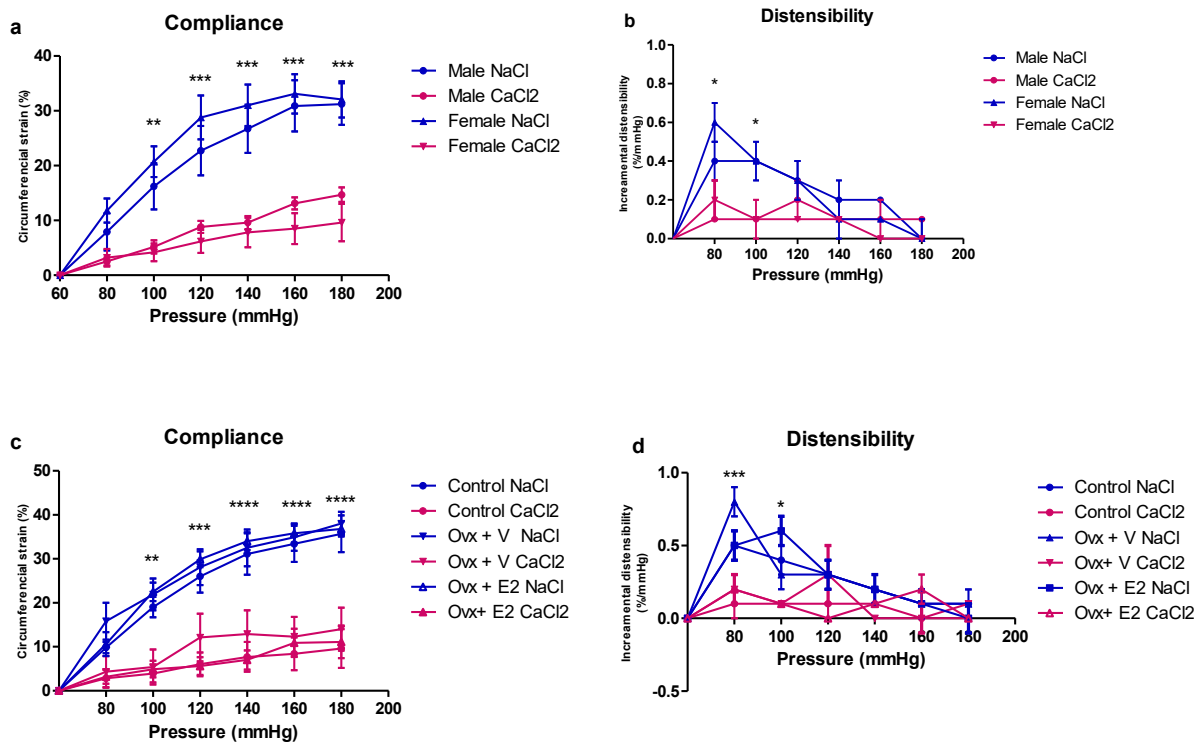


Figure 4. Effect of carotid calcification on mechanical properties. Compliance and distensibility in male and female mice (a,b) and in non-ovariectomized (CTL) and ovariectomized mice (OVX) with administration of sesame oil (V) or estradiol (E) 1 μ g/100 μ L s.c. for 6 days were evaluated by a pressure myograph two weeks after the periarterial application of NaCl or CaCl₂. Data are means \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, two-way-ANOVA with Bonferroni post-hoc test; n =5-6.

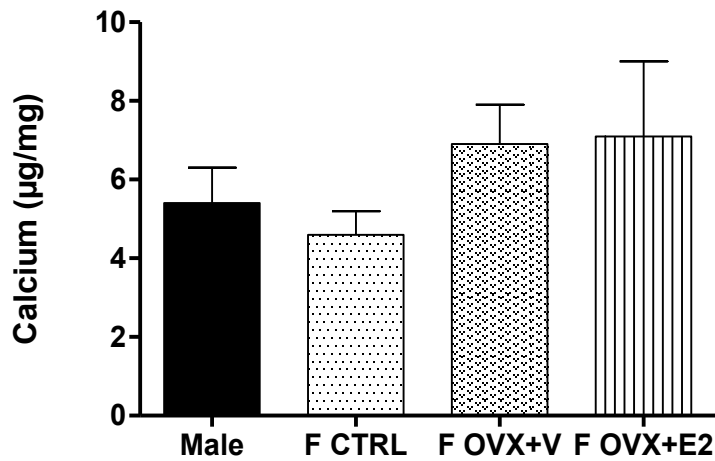


Figure 5. Calcium content in the carotid artery. Calcium content in male, in non-ovariectomized (F CTRL) and ovariectomized mice (OVX) with administration of sesame oil (V) or estradiol (E) 1µg/100µL s.c. for 6 days were evaluated by a colorimetric reaction with o-cresolphthalein complexone two weeks after the periarterial application of CaCl₂. Data are means ± SEM, n= 5–6. One-way ANOVA and Tukey’s post hoc test).

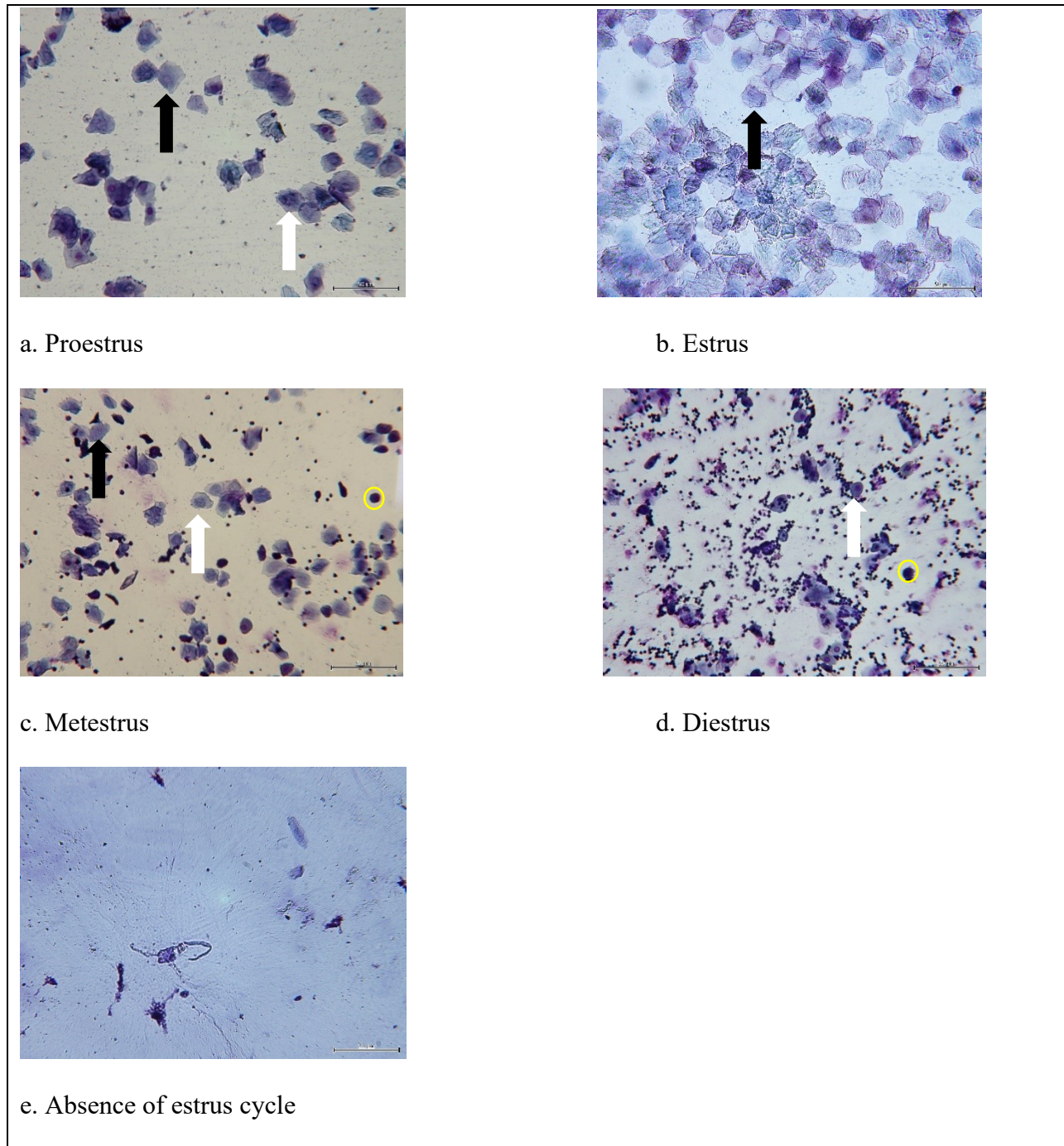


Figure 6. Estrous cycle. Three cell types are identified: nucleated epithelial (white arrow), cornified epithelial (black arrow), and leukocytes (circle). Stages of estrus include proestrus (a), estrus (b), metestrus (c), diestrus (d). Estrous cycle was determined two weeks after ovariectomy by vaginal cytology in non-ovariectomized (a-b) and ovariectomized mice (OVX) with administration of estradiol $1\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ (estrus cycle restored, c-d) or sesame oil (absence cells suggesting the absence of of estrus cycle, e) s.c. for 6 days. Scale = $50\mu\text{m}$, Magnification = 10X (Microscope Diaplan, Leitz).

Étude 3: La VK prévient les troubles cognitifs associés à la rigidité artérielle dans un modèle murin de calcification artérielle

Par : G. Muhire, MC. Racine, B. Ouliass, H. Girouard et G. Ferland

Résumé

Les études épidémiologiques ont démontré une corrélation positive entre la rigidité artérielle et les troubles de la mémoire. La vitamine K(VK) est impliquée dans la prévention de la calcification vasculaire via différentes protéines dépendantes de VK notamment la protéine Gas6 et la protéine S (PS), car elles doivent subir une carboxylation post-traductionnelle pour devenir biologiquement actives. Dans le système vasculaire, Gas6 a une action anti-inflammatoire et favorise la clairance des corps apoptotiques. La PS favorise également la phagocytose des corps apoptotiques par les macrophages. À travers ces actions, Gas6 et PS participent à l'inhibition de la calcification vasculaire. Dans le cerveau, la VK a des effets bénéfiques sur la cognition via les protéines VKD mais également par des actions spécifiques de ses vitamères. Dans cette étude, nous avons examiné si les vitamines K (K₁ et MK4) pouvaient inverser les effets de la rigidité artérielle sur le cerveau dans un modèle murin de rigidité artérielle basé sur la calcification de la carotide. Les souris ont été mises sous régime de K₁ pauvre (0,1 mg / kg), normal (1 mg / kg) ou enrichi (10 mg / kg); et sous régime de MK-4 pauvre (10 mg / kg) normal (50 mg / kg) et enrichi (100 mg / kg). Chaque régime comprenait un groupe contrôle (NaCl) et un groupe avec carotide calcifiée (CaCl₂). Les performances cognitives ont été évaluées avec la piscine de Morris. Le débit sanguin cérébral (CBF) au repos a été déterminé par autoradiographie. La concentration de K₁ et MK-4 dans le cerveau a été mesurée par HPLC. Les protéines dépendantes de VK (Gas6, PS) ont été mesurées par Western blot. Enfin, la teneur en Ca²⁺ a été déterminée par méthode colorimétrique. Les performances d'apprentissage n'étaient pas statistiquement différentes chez les animaux traités

avec le CaCl₂ et les animaux traités avec le NaCl aux doses de K₁ et MK4 étudiées. Cependant, lorsque les groupes ont été combinés, un effet de la diète a été observé et les souris du groupe MK-4 100 présentaient les meilleures performances d'apprentissage ($p < 0.05$). En revanche, une altération de la consolidation de la mémoire a été observée chez des souris nourries avec des régimes faibles en VK (K₁ 0,1 et MK-4 10). Deux semaines après la chirurgie, la calcification de la carotide a atténué significativement le CBF au repos dans plusieurs régions du cerveau, y compris le cortex périrhinal et entorhinal, l'hippocampe et le thalamus ($p < 0.05$) chez les souris ayant un régime K₁ pauvre et normal mais pas dans le régime enrichi de K₁ et les régimes de MK-4 100. La MK-4 s'est révélé être la principale forme de VK dans le cerveau des souris et a augmenté en fonction de l'apport de VK dans l'alimentation. Nos résultats démontrent également une modulation de l'activité des protéines dépendantes de VK, à savoir Gas6 par K₁ et MK-4 et PS par MK-4. La concentration en Ca²⁺ dans l'artère carotide a été réduite à la fois par la K₁ et la MK-4 et ce, de façon dose dépendante. Ces résultats suggèrent que la VK peut atténuer les effets de la calcification vasculaire sur le cerveau et améliorer la fonction cognitive en partie en rétablissant le CBF au repos en limitant la calcification vasculaire mais aussi en augmentant l'activité de la Gas6 et la PS dans le cerveau.

Mots-clés: VK, rigidité artérielle, calcification de la carotide, débit sanguin cérébral au repos, déficience cognitive

Contribution : GM, MCR et BO ont effectué les expériences. GM a analysé des données.

L'étude a été conçue par GM, HG et GF. GM, HG et GF ont contribué à la rédaction et à la révision du manuscrit.

VK prevents cognitive impairment associated with arterial stiffness in a murine model of arterial calcification

G. Muhire¹, MC. Racine², B. Ouliass², H. Girouard¹ and G. Ferland^{2, 3}

¹Department of Pharmacology and Physiology, Université de Montréal, ² Institut de cardiologie Montréal, ³ Department of Nutrition, Université de Montréal, Montréal, Canada

Abstract

Epidemiological studies have pointed to positive correlation between arterial stiffness and memory impairment. Vitamin K is involved in the prevention of vascular calcification via different VK-dependent proteins notably Gas6 and PS, as they need to undergo post-translational carboxylation to become biologically active. In the vascular system, Gas6 has an anti-inflammatory action and promotes the clearance of apoptotic bodies. PS also promotes phagocytosis of apoptotic bodies by macrophages. Through these actions, Gas6 and PS participate in the inhibition of vascular calcification. In the brain, VK has beneficial effects on cognition via VKD proteins but also through specific actions of its vitamers. In this study, we investigated whether vitamin K (K₁ and MK4) could reverse arterial stiffness effects on brain's health in a newly developed murine model of arterial stiffness based on carotid calcification. Mice were put on K₁ - poor (0.1 mg / kg) normal (1 mg / kg) or enriched (10 mg / kg) diets; MK-4 - poor (10 mg / kg) normal (50 mg / kg) and enriched (100 mg / kg) diets. Each diet comprised a sham (NaCl) group and a calcified carotid (CaCl₂) group. Cognitive performance was assessed with the Morris water maze. The resting cerebral blood flow (CBF) was determined by autoradiography. The concentration of K₁ and MK-4 in the brain was measured by HPLC. VK-dependent proteins (Gas6, Protein S) were measured by Western blot. Finally, calcium content was determined by colorimetric method. Learning performances were not statistically different in CaCl₂-treated and NaCl-treated animals at any of

the K₁ and MK4 doses investigated. However, when groups were combined, a diet effect was observed mice from the MK-4 100 mg / kg group showing the best learning performance ($p < 0.05$). In contrast, a memory recall was found to be altered by the calcium treatment, mice fed the lower VK diets (K₁ 0.1 and MK-4 10) showing poorer performances than their corresponding controls ($p < 0.05$). Two weeks post-surgery, the calcium treatment significantly attenuated resting CBF in several brain regions including the perirhinal and entorhinal cortex, hippocampus and thalamus ($p < 0.05$) in mice fed poor and normal K₁ diet but not in enriched K₁ and MK-4 100 diet. MK-4 was found to be the major form of VK in mice brain and increased as a function of VK intake in diet. Our findings also demonstrate the modulation of VK dependent proteins activity namely, Gas6 by both K₁ and MK-4 and PS by MK-4. The calcium concentration in the carotid artery was reduced by both K₁ and MK-4 vitamers ($p < 0.05$). This effect was dose dependent in both vitamers. These results suggest that vitamin K can oppose the effects of vascular calcification on brain and improve cognitive function, in part, by restoring resting CBF, by limiting vascular calcification, and by increasing Gas6 and PS activity in brain.

Keywords: Vitamin K, arterial stiffness, carotid calcification, resting cerebral blood flow, cognitive impairment

Introduction

Vitamin K (VK) has been known for its classical role in coagulation ¹. Recently, other physiological roles of VK have emerged in the nervous ² and the cardiovascular systems ³. In the nervous system, VK is involved in sphingolipid metabolism ⁴ and myelin synthesis ⁵ and MK-4 has a protective action in inflammatory processes ^{6, 7}. Especially, VK was associated to the cognitive impairment prevention in epidemiological ^{8, 9} and animal studies ^{10, 11}. In old rats, a lifetime consumption of a low-VK diet leads to cognitive deficit ¹⁰ while in humans a high VK intake was associated with better cognitive performance in older adults ⁹.

VK modulates the biological activation of VK-dependent proteins (VKDPs) by a post-translational carboxylation that converts their glutamate (Glu) residues into gamma-carboxyglutamate (Gla) ¹². Notably, VKDPs Gas6 and PS and their receptors are expressed in the nervous system ¹³. Gas6 has been shown to possess anti-apoptotic action on neurons ¹⁴⁻¹⁶ and Schwann cells ¹⁷ and it has been involved in processes such as cell proliferation, differentiation ¹⁸, pro-inflammatory cytokines reduction ¹⁹ and myelination regulation ²⁰⁻²³. Protein S has been shown to have antithrombotic action and protects neurons during ischemic brain injury ²⁴ maintain the BBB integrity ²⁵. Protein S also plays an important role in tissue repair processes in the central nervous system by suppressing the proliferation of astrocytes ²⁶ and regulates the quiescence and hippocampal neurogenesis ²⁷. In the vascular system, Gas6 has been shown to inhibit apoptosis and enhance cell survival of vascular smooth muscle ²⁸ and endothelial cells ²⁹ and to promote phagocytosis of apoptotic cells ³⁰. Gas6 is also involved in vascular remodeling and angiogenesis ^{31, 32}. Another VKDP, matrix gla protein, regulates vascular calcification ³³.

VK exists mainly in the form of phylloquinone (K₁) and menaquinone-4 (MK-4). K₁ is synthesized in green plants and menaquinone-4 (MK-4) is found in animal products (meat, dairy products) but

also comes from the conversion of dietary K₁ ³⁴. In the brain, MK-4 is the dominant form of VK (99%) ¹⁰. VK antagonists such as warfarin inhibit vitamin K epoxide reductase enzyme (VKOR). This results in depletion of hydroquinone (KH₂), the cofactor of γ -glutamyl carboxylase (GGCX), necessary for the biological activation of VKDPs ³⁵. The warfarin vascular calcification model is based on this effect and warfarin treatment increases vascular calcification as it generates the production of inactive form of MGP ³⁶. Warfarin also reduces MK-4 biosynthesis in brain ^{11, 37, 38} and ultimately induces cognitive impairment ¹¹.

Arterial stiffness has been associated with cognitive impairment and dementia in epidemiologic studies ³⁹ and it may be a consequence of aging or hypertension. High blood pressure causes damage to the arterial wall, which promotes stiffness, while arterial stiffness increases systolic blood pressure ^{40,41}. Recently, a new model of arterial stiffness was developed. This model is based on the carotid calcification by applying CaCl₂ on the artery, leading to stiffness due to an accumulation of calcium in the arterial wall ⁴². Specifically, arterial stiffness using this model has been shown to induce oxidative stress and inflammation in brain, and neuronal degeneration mostly in the hippocampus which has a paramount role in cognitive functions ⁴². Furthermore, this model has been associated with cognitive deficit ⁴³.

In this study, we investigated the potential for the K vitamers (K₁ and MK4) to reduce carotid calcification and attenuate the previously observed detrimental effects of carotid calcification on cognition. Specifically, we investigated the role of VK in modulating CBF and the potential implication of the VKDPs, Gas6 and PS.

Material and methods

Animals

All procedures were approved by the Animal Care Committee of the research centre of Sacré-Coeur hospital and were performed in accordance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care (Protocol number: 18-128). Ten to twelve-week-old male C57BL/6 mice (Charles River Laboratories, Canada) were housed individually in a temperature-controlled room and maintained on a 12-h light/12-h dark cycle with *ad libitum* access to food and water. Mice were put on K₁ - poor (0.1 mg / kg diet), normal (1 mg / kg diet), or enriched (10 mg / kg diet) diets and MK-4 - poor (10 mg / kg diet), normal (50 mg / kg diet), or enriched (100 mg / kg diet) diets (Research diet, Inc., USA). Each diet comprised a sham (periarterial application of NaCl) group and a calcified carotid (arterial stiffness group, CaCl₂) group. The precise number of animals used per group for each experiment is specified in the figure legends.

Carotid calcification surgery

Animals were handled during the two days preceding the surgery. Carotid calcification was induced as described previously ⁴². Briefly, mice were anaesthetised with a mixture of ketamine/xylazine (90 mg/kg; 6 mg/kg, CDMV, Canada and Bayer Inc., Canada, respectively) and the right common carotid artery was carefully isolated by sliding a small piece of sterile parafilm underneath. A sterile gauze (5 mm x 5 mm) soaked in 0.3M CaCl₂ (Sigma, USA) was applied on the carotid artery for 20 min. The gauze was then removed and the incision sutured. Control animals were treated with a sterile compress soaked in 0.9% NaCl in identical conditions. Carprofen (Rimadyl, CDMV, Canada, 5 mg/kg) was injected subcutaneously after surgery and was administered every 24 hours during two consecutive days to prevent inflammation. On the day of the surgery, mice also received bupivacaine hydrochloride (Marcaine, CDMV, Canada, 4

mg/kg subcutaneous injection) at the site of the incision, and trimethoprim sulfadiazine (Tribrissen, CDMV, Canada 30 mg/kg subcutaneous injection) every 24 hours for 3 consecutive days to prevent infections. The weight of the animals was monitored weekly after the surgery to verify good recovery.

Morris Water Maze

Spatial learning and memory were assessed at three weeks following the periarterial application of NaCl or CaCl₂. The testing arena consisted of a circular pool 160 cm in diameter filled with water made opaque with skim milk powder. The temperature of the water was kept at 18-19 °C. The pool was divided into four virtual quadrants referred as North, South, East, and West. A clear plexiglas escape platform (10 cm diameter) was placed 1.5 cm beneath the surface in the SW quadrant. The test consisted of 5 training days (D1-D5) during which mice were allowed three 60 sec trials per day to find the escape platform. Each trial was 20 min apart. An average of the time spent to locate the platform (latency) during the three trials was calculated per day. The cue and probe tests were conducted on day 6. During the cue test, water was removed so that the escape platform could be visible. Animals with visual impairments were excluded from the analysis. To assess memory recall with the probe test, the platform was removed and two 30 sec trials, separated 60 min apart, were conducted to assess time spent in the target quadrant (the quadrant where the platform was originally located). We also assessed the distance traveled in the target quadrant and the number of crossings of the square corresponding to the initial location of the platform. The combination of the last two parameters was used as a performance index (% of mice with at least 35 % of distance in the target quadrant and at least 2 target crossings) which reflects accuracy in search strategy ⁴⁴. Data was acquired with the Smart video tracking software (Smart V 3.0.01 Panlab/Harvard Apparatus, Barcelona, Spain) which is connected to an overhead camera.

Western blotting

Once the behavior tests were performed, the mice were anesthetized by intraperitoneal injection of a mixture of Ketamine / Xylazine (100/10 mg / kg) and sacrificed. Brain samples were collected, immersed in liquid nitrogen then stored at -80 °C. Brain tissues were mixed with lysis buffer [(50mM Tris, 150mM NaCl, 4.5mM MgCl₂, pH 7.6, adapted from Prieto et al. ⁴⁵ at a ratio of 1ml lysis buffer / 50 µg tissue. The lysis buffer also contained protease inhibitors (0.5 M EDTA, 0.5 M PMSF, 0.7 mg / ml Pepstatin, Leupeptin 2 mg / ml, Aprotinin 10 mg / ml and 0.5M Benzamidine) and phosphatase inhibitors (20 mM β-glycerophosphate, 20 mM NaF, 1 mM OrthoVanadate). The mixture was then sonicated at 1.5 V for 30 seconds, on ice and left on hold for 30 minutes. The samples were then centrifuged at 12,000 rpm, 10 min at 4 °C and the supernatant was collected. The protein concentration was determined by the Lowry method.

For immunoblotting, 50 µg of protein were mixed with a Laemili/ DTT solution, heated at 100 °C for 3 min, and loaded onto an acrylamide gel. The proteins were then transferred to a PVDF membrane (Millipore) at 100V for one hour at 4 °C. Then, the membrane was incubated in blocking solution (skim milk 5% TBST) for one hour at room temperature and incubated with the 1st antibody (Ab) overnight at 4 °C. The membrane was then incubated with the second Ab for one hour at room temperature and finally revealed by chemiluminescence (General HealthCare). The primary antibodies used were against Gas6 (sc-1935, Santa Cruz), Protein S (sc-25836, Santa Cruz), Gla (3570 SC Kiusi Diagnosis). The second antibody was either anti-mouse (sc-2005 SC), anti-rabbit (7074 CS) or anti-goat (sc-2020 SC) depending on the animal's origin of the first antibody. The results were analyzed by ImageJ software version 1.51f, Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA.

Vitamin K determination in brain tissues

The concentrations of K₁ and MK-4 in the brain were measured by HPLC ($n = 6$ /diet group) as previously described¹⁰. Briefly, tissue samples were pulverized in anhydrous Na₂SO₄ and extracted with acetone containing an internal standard [2-methyl-3-(3,7,11,15,19-pentamethyl-2-eicosenyl)-1,4-naphthalenedione] (GL Synthesis, Inc.). Dried extracts were then re-extracted with a mixture of hexane and water before being further purified by solid phase extraction on silica gel columns (ThermoFisher Scientific). A C-18 reverse phase column and fluorescence detection were used for quantitative analysis of K₁ and MK-4. The calibration standard consisted of a mixture of K₁, MK-4, and 2-methyl-3-(3,7,11,15,19-pentamethyl-2-eicosenyl)-1,4-naphthalenedione at 2 ng in 50 μ L. The percent recovery for the samples was calculated from the internal standard and found to be 85–90%.

Autoradiography

Resting cerebral blood flow (CBF) was measured two weeks after the periarterial application of NaCl or CaCl₂ in awake mice by quantitative autoradiography, using [¹⁴C] IAP (Iodoantipirine 4-N-Methyl-¹⁴C, Perkin Elmer, Canada) as a diffusible tracer. The protocol was adapted from that described by Joutel and colleagues⁴⁶. Under isoflurane anesthesia (induction: 5%, maintenance: 2%), a catheter was inserted in the femoral vein for tracer infusion and in the femoral artery for the mean arterial pressure monitoring (LabChart6 Pro software v6.1.3, AD Instruments, USA). The discomfort caused by the surgery was treated locally with bupivacaine (Marcaine, CDMV, Canada, 4 mg/kg s.c.). Mice were held under minimal restraint and allowed to recover with their head covered and a rectal probe to maintain body temperature at 37 °C.

Tracer infusion (1 μ Ci/10g body weight, 8 ml/hour) began two hours after isoflurane anesthesia was stopped. Arterial blood samples were collected every 5 seconds during a period of 45 seconds

in eppendoff tubes. At the end of the 45-second period, mice were decapitated, the brain removed and quickly frozen in cold isopentane (-30 °C) in dry ice for 5-10 seconds and then stored at -80 °C until tissue sectioning. Coronal brain sections were cut on a cryostat at 20 µm thickness and mounted on glass slides. Brain sections were exposed to an autoradiography film (Kodak BioMax MR Film, USA) during 10 days for densitometry analysis with the MCID™ Densitometry System software (MCID 7.0, Imaging Research Inc, ON, Canada). Plasma was obtained by centrifugation at 2000 rpm for 20 min. Plasma samples were placed in vials in the presence of scintillating liquid (Ultima Gold, PerkinElmer Inc, USA) and counted (Liquid scintillation counter 1219 RachBeta, LKB Wallac, USA). Radioactivity counts obtained were entered into the MCID™ Densitometry System software according to the sampling time. The software calculates CBF values as a function of the plasma contamination curve, as well as by the calibration of each film (exposure of a commercially available standard curve on each film). The following regions of interest were examined: VSCx (visual and somatosensory cortex), PECx (perirhinal and entorhinal cortex), CA1 (cornus ammonis area 1), CA2-3 (cornus ammonis area 2-3), DG (dentate gyrus), THA (thalamus), CC (corpus callosum). Four brain sections per animal were used for analysis. The right and left side of the brain were identified. Resting CBF values are expressed in ml/100g/min.

Calcium determination

The carotid tissues were dried at 55 °C in heating blocks and decalcified with formic acid 10% (30µl/mg dried tissue) at 4°C overnight. Calcium released from the lyophilized tissues was determined colorimetrically using a reaction with o-cresolphthalein complexone, according to the manufacturer's specifications (Sigma-Aldrich Co., Oakville, Ontario, Canada). Data were calculated as micrograms per milligrams of dried tissue, using a calibration curve⁴⁷ as previously described⁴⁸.

Statistical analysis

Data analysis was performed with the GraphPad Prism software (v5.00a, California, USA). MK-4, Gas6, PS and calcium were assessed by one-way ANOVA with Tukey's post-hoc test. A two-way ANOVA with Bonferroni post-hoc test was used to assess diet and surgery effect and their interaction. When there was no interaction, an unpaired two-tailed *t*-test to compare NaCl and CaCl₂ groups. A repeated measures ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test was used for the behavior learning data and a Pearson correlation was performed to estimate the linear relationship between MK-4 and learning performances. Criterion performance data were analyzed by Fisher's exact test. Statistical significance was set at $p < 0.05$. Precise statistical data are reported in the figure legends.

Results

Vitamin K in brain

MK-4 was the main form of VK in brain (at least 98.5 %) even when animals were fed exclusively K₁ diet (Table 1). In all diet groups, we did not observe any difference between calcified (CaCl₂) and control mice (NaCl). Therefore, we combined NaCl and CaCl₂ animals to assess the dose effect of K₁ and MK-4 diets on MK-4 concentration in brain. MK-4 concentration in brain increased with K₁ (Figure 1A) and MK-4 (Figure 1B) intake in a dose dependent manner ($p < 0.0001$). Noteworthy, animals that were fed K₁ 10 and MK-4 10 diet had the same MK-4 brain contents.

VK prevents cognitive impairment

Cognitive performances were assessed 3 weeks after calcification surgery using the Morris water maze test. In all VK diets groups, we observed decreasing escape latency over time ($p < 0.0001$; $n = 10-14$). Calcified mice (CaCl₂) showed the same learning abilities as those of control mice

(NaCl), (ns). Given that the calcium treatment did not induce learning impairment during the training period, both NaCl and CaCl₂ groups were combined to evaluate the diet effect on learning performances. Mice on MK-4 100 diet with the highest MK-4 concentration in the brain, displayed better learning abilities ($p < 0.05$) compared to those on the poor VK diet (K₁ 0.1) that had the lowest MK-4 concentration in the brain (Figure 2A). Furthermore, a negative correlation was observed between brain MK-4 concentration and the escape latency on day 2 ($r = -0.25$, $p < 0.05$), implying a delay in the learning process in mice with lower brain MK-4 concentration in brain (Figure 2B).

Memory consolidation was assessed using the probe test on day 6. In all K₁ and MK-4 groups, calcified and control mice spent comparable time lapse in the target quadrant implying that the recall abilities were similar in K₁ (Figure 3A) and MK-4 (Figure 3B) groups. Performance indices which is the combined two parameters i.e > 2 target crossings and $> 35\%$ of the distance travelled in the target quadrant, were poorer in calcified mice receiving K₁ 0.1 (Figure 3C, $p = 0.07$) and MK-4 10 (Figure 3D, $p < 0.05$) diets. In contrast, calcified mice fed normal and enriched K₁ (Figure 3C, $p > 0.05$) and MK-4 (Figure 3D, $p > 0.05$) diets, performed similarly to controls.

VK restored Resting Cerebral blood flow

Resting CBF was assessed by quantitative autoradiography 2 weeks after the calcification surgery. Four diet groups (K₁ 0.1, 1, 10 and MK-4 100) were used for this parameter. In mice fed the K₁ 0.1 and K₁ 1 diets, arterial stiffness decreased resting CBF in different brain regions ($n = 4-8$). Specifically, in mice fed the K₁ 0.1 diet, the decrease was observed in the visual and somatosensory cortex ($p = 0.008$), in the thalamus ($p = 0.006$), in the CA1 ($p = 0.04$), in the DG ($p = 0.04$), in the CC ($p = 0.02$), in the CA2-3 (0.05). In the K₁ 1 diet group, carotid calcification reduced CBF in the visual and somatosensory cortex ($p = 0.04$), in the DG ($p = 0.04$), with trends in CA1 (0.06) and the

perirhinal/entorhinal cortex ($p= 0.09$). CBF was not altered in mice fed the VK rich diet (K_1 10) and the MK-4 100 diet (Figure 4 A-G).

The VK dependent proteins Gas6 and PS

The effect of K_1 and MK-4 on VK dependent proteins Gas6 and PS expression and carboxylation in brain was assessed. For the two proteins, calcified and control mice had similar results, thus we combined both groups and assessed the effect of the individual diets. Neither the K_1 nor the MK-4 significantly affected the expression of Gas6 and PS. In contrast, MK-4 modulated the carboxylation of both proteins. Specifically, Gas6 carboxylation was increased in animals fed the MK-4 100 diet compared to animals fed the MK-4 10 and the MK-4 50 diets ($p < 0.05$, $n=12/\text{group}$), (Figure 5A). PS carboxylation was increased in animals fed the MK-4 50 and the MK-4 100 diets ($p < 0.05$, $n=12/\text{group}$), (Figure 5B) compared to animals fed the MK-4 10 diet.

VK reduced calcification in carotid arteries

Finally, we sought to determine whether VK would have an effect on vascular calcification in our calcification model. Both K_1 (Figure 6A) and MK-4 diets were assessed. Specifically, both K_1 (Figure 6A) and MK-4 (Figure 6B) vitamers were associated with a reduction of calcium concentration in the carotid artery ($p < 0.05$, $n= 5-6$), an effect that was dose-dependent with both K_1 and MK-4 vitamers ($p < 0.05$, $n= 5-6$, Figure 6).

Discussion

In this study, we have shown that MK-4 is the main form of VK in mice brain and its concentration increased as a function of dietary VK, either K_1 or MK-4. Both vitamers K_1 1 in some regions and at high dose K_1 10 and MK-4 100 in all regions assessed, prevented resting CBF impairment and cognitive deficit. Vitamers K_1 and MK-4 did not have any effect on Gas6 and PS expression but

MK-4 modulated both Gas6 and PS carboxylation in the brain. In the carotid, K₁ and MK-4 reduced calcification in a dose dependent manner.

Our findings indicate that MK-4 is the major form of VK in mice brain (at least 98%) even when animals are fed only K₁ in their diet and that MK-4 content increases with K₁ and MK-4 intake. This finding confirms concordant observations in young and old rats^{10,49}. Dietary K₁ is converted to MK-4 by removing the phytyl side chain of K₁ and adding a geranylgeranyl group to the menadione nucleus⁵⁰. UbiA prenyltransferase containing 1 (UBIAD1) was identified as the enzyme catalyzing this menadione conversion^{38, 51}. It is not clear whether the same enzyme converts dietary K₁ to menadione^{5, 52}.

We also investigated whether the K₁ and MK-4 vitamers could attenuate the previously observed cognitive deficits associated with the carotid calcification model used in the present study. All VK diets including poor diets (K₁ 0.1 mg/Kg and MK-4 10 mg/Kg) prevented learning impairment previously observed in this calcification model. Notably, latencies on day 2 were negatively correlated with brain MK-4 content. Although vascular calcification was not associated with impairment, we observed a deficit in memory recall in mice fed the poor VK diets (K₁ 1 and MK-4 10). Performances in the cue trials as well as swimming speed were identical across groups, suggesting that the memory recall deficit could not be attributed to motor or visual deficits. A previous study from our laboratory has demonstrated that a life time consumption of K₁ induced spatial learning impairment in old rats¹⁰. In another recent study, the impact of VK on cognition was assessed in the context of an acute VK following warfarin administration. In this study, rats that were subjected to the VK deficiency displayed poor learning capabilities in the Morris water maze test. The learning impairment was associated with a decrease in MK-4 and sphingolipid concentrations in brain, mainly in the hippocampus, the region which is responsible of cognitive

functions^{11,49}. Vitamin K can modify the activity of galactocerebroside sulfotransferase, the key enzyme of sulfatide synthesis⁵³, a sphingolipid highly present in myelin. Other studies have linked VK with cognitive function in humans. A low K₁ serum concentration has been associated with worse episodic memory performance in older adults⁵⁴. Also, a high dietary VK intake was reported to be associated with fewer and less severe subjective memory complaints⁵⁵, an early manifestation of memory impairment⁵⁶ and with better cognition and behavior among elders⁵⁷, while a low VK intake was observed in patients in early stage of Alzheimer disease⁵⁸.

In the current study, resting CBF was also assessed. For this parameter, K₁ diets (0.1, 1 and 10) and only the highest dose of MK-4 were selected as we looked for the maximum effect of the MK-4. The results show that arterial calcification causes a resting CBF decrease in various brain regions including hippocampus regions involved in cognition. The decrease was observed in K₁ 0.1 and K₁ 1 diets but it was prevented by K₁ 10 and MK-4 100 diets. The physiological consequences of dysfunctional CBF regulation are important considering the high metabolic requirements of the brain and the fact that even small reductions in blood flow can affect protein synthesis and cause neuronal dysfunction⁵⁹. In AD patients, a reduction of resting CBF was associated with cognitive impairment and decline⁶⁰. In A β PP-PS1 mouse model of AD, the CBF reduction was accompanied by a neurogenesis decrease in hippocampus^{61,62}. The role of PS in maintaining blood fluidity and hippocampal neurogenesis²⁷ may explain, at least in part the resting CBF and cognitive deficit prevention by VK in the context of vascular calcification.

Beyond all these mechanisms, VK has an antiinflammatory action *in vitro* and in animals models^{6,7} that are independent of VKDPs.

Our findings also demonstrate that K₁ and MK-4 did not have any effect on the expression of Gas6 and PS, but MK-4 increased their activity in the brain. In the nervous system, Gas6 has anti-

apoptotic effects on neurons ¹⁴⁻¹⁶, Schwann cells ¹⁷. Gas6 reduces the pro-inflammatory cytokines production in macrophages ¹⁹ and influences synaptic plasticity in the hippocampal and cortical neurons ⁶³. The activation of Gas6 receptor Tyro3 which is highly expressed in the hippocampus may participate in memory consolidation process ⁶⁴. Protein S has direct effects on neurons and antithrombotic action and protects neurons during ischemic brain injury ²⁴ maintain the BBB integrity both in vitro and in vivo ²⁵. The BBB maintains the environment which preserves proper functioning of neuronal circuits, synaptic transmission, synaptic remodeling, angiogenesis, and neurogenesis in the adult brain. PS also plays an important role in tissue repair processes in the central nervous system by suppressing the proliferation of astrocytes ²⁶ and regulates the quiescence and hippocampal neurogenesis ²⁷. This neurogenesis in the hippocampus contributes to learning and memory ⁶⁵⁻⁶⁷. These mechanisms could only explain the beneficial effect of MK-4 on the cognition since only this vitamer modulated Gas6 and PS carboxylation.

Finally, calcium content in carotid arteries was measured in animal fed VK (K₁ and MK-4) diets. K₁ and MK-4 decreased calcium concentration in the carotid artery and this, in a dose dependent manner. In support to our findings, Schurgers et al ⁶⁸ have reported that rich diets of both K₁ and MK-4 decreased calcium concentration in rat aorta by 50 % in the warfarin model. Both K₁ and MK-4 function as a cofactor for γ -glutamyl carboxylase ⁶⁹ which provides the essential post-translational carboxylation of MGP, the anticalcification protein ⁷⁰. It has been shown that calcification comes after apoptosis ⁷¹. Gas6 and PS reduce vascular calcification by enhancing the clearance of apoptotic bodies from the vasculature ⁷². Gas6 is also involved in vascular smooth muscle cells ²⁸ and endothelial cells ²⁹ survival and in vascular remodeling ^{31,32} and delays cellular senescence process in the vascular smooth muscle cells ³².

Conclusion and perspectives

In this study we show that MK-4 is the principal form of VK in mice brain and increases as a function of VK intake, confirming what has been reported in rat. We also report that even at low doses, vitamers K1 and MK-4 provide protection against learning abilities deficit in this model of vascular calcification. However, the adverse effect of the model on the performance index is attenuated only when the animals are exposed to medium (K₁ 1) and high K1 (K₁ 10) and high dose MK-4 (MK-4 100). This could be explained by the beneficial effects of these doses on carotid calcification and cerebral blood flow. The participation of the proteins Gas6 and PS remains to be determined but these could intervene in the presence of high doses of MK-4. Given the small size of the mouse tissues, we were unable to obtain enough material for other analyzes such as markers of inflammation and apoptosis, the blood-brain barrier integrity, MGP, etc. Other groups of animals will soon be available to carry out these measurements.

References

1. Ferland G. Vitamin K and brain function. *Seminars in thrombosis and hemostasis*. 2013;39:849-55.
2. Ferland G. Vitamin K, an emerging nutrient in brain function. *BioFactors (Oxford, England)*. 2012;38:151-7.
3. Willems BA, Vermeer C, Reutelingsperger CP and Schurgers LJ. The realm of vitamin K dependent proteins: shifting from coagulation toward calcification. *Molecular nutrition & food research*. 2014;58:1620-35.
4. Denisova NA and Booth SL. Vitamin K and sphingolipid metabolism: evidence to date. *Nutrition reviews*. 2005;63:111-121.
5. Crivello NA, Casseus SL, Peterson JW, Smith DE and Booth SL. Age-and brain region-specific effects of dietary vitamin K on myelin sulfatides. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2010;21:1083-1088.
6. Reddi K, Henderson B, Meghji S, Wilson M, Poole S, Hopper C, Harris M and Hodges S. Interleukin 6 production by lipopolysaccharide-stimulated human fibroblasts is potently inhibited by naphthoquinone (vitamin K) compounds. *Cytokine*. 1995;7:287-290.
7. Moriya M, Nakatsuji Y, Okuno T, Hamasaki T, Sawada M and Sakoda S. Vitamin K2 ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats. *Journal of neuroimmunology*. 2005;170:11-20.
8. Annweiler C, Ferland G, Barberger-Gateau P, Brangier A, Rolland Y and Beauchet O. Vitamin K antagonists and cognitive impairment: results from a cross-sectional pilot study among geriatric patients. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences*. 2015;70:97-101.
9. Chouet J, Ferland G, Feart C, Rolland Y, Presse N, Boucher K, Barberger-Gateau P, Beauchet O and Annweiler C. Dietary Vitamin K Intake Is Associated with Cognition and Behaviour among Geriatric Patients: The CLIP Study. *Nutrients*. 2015;7:6739-50.
10. Carrié I, Bélanger E, Portoukalian J, Rochford J and Ferland G. Lifelong Low-Phylloquinone Intake Is Associated with Cognitive Impairments in Old Rats–3. *The Journal of nutrition*. 2011;141:1495-1501.
11. Tamadon-Nejad S, Ouliass B, Rochford J and Ferland G. Vitamin K Deficiency Induced by Warfarin Is Associated With Cognitive and Behavioral Perturbations, and Alterations in Brain Sphingolipids in Rats. *Frontiers in aging neuroscience*. 2018;10:213.
12. Tie J-K and Stafford D. Functional study of the vitamin K cycle enzymes in live cells *Methods in enzymology*: Elsevier; 2017(584): 349-394.
13. Lemke G. Biology of the TAM receptors. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2013;5:a009076.
14. Pierce A, Bliesner B, Xu M, Nielsen-Preiss S, Lemke G, Tobet S and Wierman ME. Axl and Tyro3 modulate female reproduction by influencing gonadotropin-releasing hormone neuron survival and migration. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)*. 2008;22:2481-95.
15. Yagami T, Ueda K, Asakura K, Sakaeda T, Nakazato H, Kuroda T, Hata S, Sakaguchi G, Itoh N, Nakano T, Kambayashi Y and Tsuzuki H. Gas6 rescues cortical neurons from amyloid beta protein-induced apoptosis. *Neuropharmacology*. 2002;43:1289-96.

16. Yagami T, Ueda K, Asakura K, Okamura N, Sakaeda T, Sakaguchi G, Itoh N, Hashimoto Y, Nakano T and Fujimoto M. Effect of Gas6 on secretory phospholipase A2-IIA-induced apoptosis in cortical neurons. *Brain research*. 2003;985:142-149.
17. Li R, Chen J, Hammonds G, Phillips H, Armanini M, Wood P, Bunge R, Godowski PJ, Sliwkowski MX and Mather JP. Identification of Gas6 as a growth factor for human Schwann cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1996;16:2012-9.
18. Ji R, Meng L, Li Q and Lu Q. TAM receptor deficiency affects adult hippocampal neurogenesis. *Metabolic brain disease*. 2015;30:633-44.
19. Alciato F, Sainaghi PP, Sola D, Castello L and Avanzi GC. TNF-alpha, IL-6, and IL-1 expression is inhibited by GAS6 in monocytes/macrophages. *Journal of leukocyte biology*. 2010;87:869-75.
20. Binder MD, Xiao J, Kemper D, Ma GZ, Murray SS and Kilpatrick TJ. Gas6 increases myelination by oligodendrocytes and its deficiency delays recovery following cuprizone-induced demyelination. *PLoS one*. 2011;6:e17727.
21. Goudarzi S, Rivera A, Butt AM and Hafizi S. Gas6 Promotes Oligodendrogenesis and Myelination in the Adult Central Nervous System and After Lysolecithin-Induced Demyelination. *ASN neuro*. 2016;8.
22. Akkermann R, Aprico A, Perera AA, Bujalka H, Cole AE, Xiao J, Field J, Kilpatrick TJ and Binder MD. The TAM receptor Tyro3 regulates myelination in the central nervous system. *Glia*. 2017;65:581-591.
23. Binder MD, Xiao J, Kemper D, Ma GZ, Murray SS and Kilpatrick TJ. Gas6 increases myelination by oligodendrocytes and its deficiency delays recovery following cuprizone-induced demyelination. *PLoS one*. 2011;6:e17727.
24. Liu D, Guo H, Griffin JH, Fernandez JA and Zlokovic BV. Protein S confers neuronal protection during ischemic/hypoxic injury in mice. *Circulation*. 2003;107:1791-6.
25. Zhu D, Wang Y, Singh I, Bell RD, Deane R, Zhong Z, Sagare A, Winkler EA and Zlokovic BV. Protein S controls hypoxic/ischemic blood-brain barrier disruption through the TAM receptor Tyro3 and sphingosine 1-phosphate receptor. *Blood*. 2010:blood-2010-01-262386.
26. Tomobe YI, Hama H, Sakurai T, Fujimori A, Abe Y and Goto K. Anticoagulant factor protein S inhibits the proliferation of rat astrocytes after injury. *Neuroscience letters*. 1996;214:57-60.
27. Zelentsova K, Talmi Z, Abboud-Jarrous G, Sapir T, Capucha T, Nassar M and Burstyn-Cohen T. Protein S regulates neural stem cell quiescence and neurogenesis. *Stem Cells*. 2017;35:679-693.
28. Melaragno MG, Cavet ME, Yan C, Tai L-K, Jin Z-G, Haendeler J and Berk BC. Gas6 inhibits apoptosis in vascular smooth muscle: role of Axl kinase and Akt. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2004;37:881-887.
29. Hasanbasic I, Cuerquis J, Varnum B and Blostein MD. Intracellular signaling pathways involved in Gas6-Axl-mediated survival of endothelial cells. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2004;287:H1207-H1213.
30. Grommes C, Lee CY, Wilkinson BL, Jiang Q, Koenigsknecht-Talboo JL, Varnum B and Landreth GE. Regulation of microglial phagocytosis and inflammatory gene expression by Gas6 acting on the Axl/Mer family of tyrosine kinases. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*. 2008;3:130-40.

31. Korshunov VA, Mohan AM, Georger MA and Berk BC. Axl, a receptor tyrosine kinase, mediates flow-induced vascular remodeling. *Circulation research*. 2006;98:1446-1452.
32. Jin C-w, Wang H, Chen Y-q, Tang M-x, Fan G-q, Wang Z-h, Li L, Zhang Y, Zhang W and Zhong M. Gas6 delays senescence in vascular smooth muscle cells through the PI3K/Akt/FoxO signaling pathway. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2015;35:1151-1166.
33. Spronk H. Vitamin K epoxide reductase complex and vascular calcification: is this the important link between vitamin K and the arterial vessel wall? *Circulation*. 2006;113:1550.
34. Walther B, Karl JP, Booth SL and Boyaval PJAin. Menaquinones, bacteria, and the food supply: the relevance of dairy and fermented food products to vitamin K requirements. 2013;4:463-473.
35. Aleksandrov AP, Mirkov I, Ninkov M, Mileusnic D, Demenesku J, Subota V, Kataranovski D and Kataranovski M. Effects of warfarin on biological processes other than haemostasis: A review. *Food and Chemical Toxicology*. 2018.
36. Price PA, Faus SA and Williamson MK. Warfarin causes rapid calcification of the elastic lamellae in rat arteries and heart valves. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 1998;18:1400-1407.
37. Davidson RT, Foley AL, Engelke JA and Suttie JW. Conversion of dietary phylloquinone to tissue menaquinone-4 in rats is not dependent on gut bacteria. *The Journal of nutrition*. 1998;128:220-223.
38. Nakagawa K, Hirota Y, Sawada N, Yuge N, Watanabe M, Uchino Y, Okuda N, Shimomura Y, Suhara Y and Okano T. Identification of UBIAD1 as a novel human menaquinone-4 biosynthetic enzyme. *Nature*. 2010;468:117.
39. Pase M, Herbert A, Grima N, Pipingas A and O'rourke M. Arterial stiffness as a cause of cognitive decline and dementia: a systematic review and meta-analysis. *Internal medicine journal*. 2012;42:808-815.
40. AlGhatrif M and Lakatta EG. The conundrum of arterial stiffness, elevated blood pressure, and aging. *Current hypertension reports*. 2015;17:12.
41. Kotsis V, Stabouli S, Karafillis I and Nilsson P. Early vascular aging and the role of central blood pressure. *Journal of hypertension*. 2011;29:1847-1853.
42. Sadekova N, Vallerand D, Guevara E, Lesage F and Girouard H. Carotid calcification in mice: a new model to study the effects of arterial stiffness on the brain. *Journal of the American Heart Association*. 2013;2:e000224.
43. Muhire G, Iulita MF, Vallerand D, Youwakim J, Gratuze M, Petry FR, Planel E, Ferland G and Girouard HJotAHA. Arterial Stiffness Due to Carotid Calcification Disrupts Cerebral Blood Flow Regulation and Leads to Cognitive Deficits. 2019;8:e011630.
44. Gallagher M, Burwell R and Burchinal MR. Severity of spatial learning impairment in aging: development of a learning index for performance in the Morris water maze. *Behavioral neuroscience*. 1993;107:618.
45. Prieto AL, Weber JL, Tracy S, Heeb MJ and Lai C. Gas6, a ligand for the receptor protein-tyrosine kinase Tyro-3, is widely expressed in the central nervous system1. *Brain research*. 1999;816:646-661.
46. Joutel A, Monet-Leprêtre M, Gosele C, Baron-Menguy C, Hammes A, Schmidt S, Lemaire-Carrette B, Domenga V, Schedl A and Lacombe P. Cerebrovascular dysfunction and microcirculation rarefaction precede white matter lesions in a mouse genetic model of cerebral ischemic small vessel disease. *The Journal of clinical investigation*. 2010;120:433-445.

47. Essalihi R, Dao HH, Gilbert L-A, Bouvet C, Semerjian Y, McKee MD and Moreau P. Regression of medial elastocalcinosis in rat aorta: a new vascular function for carbonic anhydrase. *Circulation*. 2005;112:1628-1635.
48. Essalihi R, Zandvliet ML, Moreau S, Gilbert LA, Bouvet C, Lenoel C, Nekka F, McKee MD and Moreau P. Distinct effects of amlodipine treatment on vascular elastocalcinosis and stiffness in a rat model of isolated systolic hypertension. *J Hypertens*. 2007;25:1879-86.
49. Carrie I, Portoukalian J, Vicaretti R, Rochford J, Potvin S and Ferland G. Menaquinone-4 concentration is correlated with sphingolipid concentrations in rat brain. *The Journal of nutrition*. 2004;134:167-172.
50. Al Rajabi A, Booth SL, Peterson JW, Choi SW, Suttie JW, Shea MK, Miao B, Grusak MA and Fu X. Deuterium-Labeled Phylloquinone Has Tissue-Specific Conversion to Menaquinone-4 among Fischer 344 Male Rats, 2. *The Journal of nutrition*. 2012;142:841-845.
51. Hirota Y, Tsugawa N, Nakagawa K, Suhara Y, Tanaka K, Uchino Y, Takeuchi A, Sawada N, Kamao M and Wada A. Menadione (vitamin K3) is a catabolic product of oral phylloquinone (vitamin K1) in the intestine and a circulating precursor of tissue menaquinone-4 (vitamin K2) in rats. *Journal of Biological Chemistry*. 2013;jbc. M113. 477356.
52. Shearer MJ and Okano T. Key Pathways and Regulators of Vitamin K Function and Intermediary Metabolism. *Annual review of nutrition*. 2018.
53. Sundaram K, Fan J-H, Engelke J, Foley A, Suttie J and Lev M. Vitamin K status influences brain sulfatide metabolism in young mice and rats. *The Journal of nutrition*. 1996;126:2746-2751.
54. Presse N, Belleville S, Gaudreau P, Greenwood CE, Kergoat M-J, Morais JA, Payette H, Shatenstein B and Ferland G. Vitamin K status and cognitive function in healthy older adults. *Neurobiology of aging*. 2013;34:2777-2783.
55. Soutif-Veillon A, Ferland G, Rolland Y, Presse N, Boucher K, Féart C and Annweiler C. Increased dietary vitamin K intake is associated with less severe subjective memory complaint among older adults. *Maturitas*. 2016;93:131-136.
56. Jorm AF, Christensen H, Korten A, Jacomb P and Henderson AS. Memory complaints as a precursor of memory impairment in older people: a longitudinal analysis over 7–8 years. *Psychological medicine*. 2001;31:441-449.
57. Chouet J, Ferland G, Féart C, Rolland Y, Presse N, Boucher K, Barberger-Gateau P, Beauchet O and Annweiler C. Dietary vitamin K intake is associated with cognition and behaviour among geriatric patients: the CLIP study. *Nutrients*. 2015;7:6739-6750.
58. Presse N, Shatenstein B, Kergoat M-J and Ferland G. Low vitamin K intakes in community-dwelling elders at an early stage of Alzheimer's disease. *Journal of the American Dietetic Association*. 2008;108:2095-2099.
59. Hossmann KA. Glutamate-mediated injury in focal cerebral ischemia: the excitotoxin hypothesis revised. *Brain Pathology*. 1994;4:23-36.
60. Hanyu H, Sato T, Hirao K, Kanetaka H, Iwamoto T and Koizumi K. The progression of cognitive deterioration and regional cerebral blood flow patterns in Alzheimer's disease: a longitudinal SPECT study. *Journal of the neurological sciences*. 2010;290:96-101.
61. Zerbi V, Jansen D, Wiesmann M, Fang X, Broersen LM, Veltien A, Heerschap A and Kiliaan AJ. Multinutrient diets improve cerebral perfusion and neuroprotection in a murine model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*. 2014;35:600-613.
62. Jansen D, Zerbi V, Arnoldussen IA, Wiesmann M, Rijpmma A, Fang XT, Dederen PJ, Mutsaers MP, Broersen LM and Lütjohann D. Effects of specific multi-nutrient enriched diets on

- cerebral metabolism, cognition and neuropathology in A β PPswe-PS1dE9 mice. *PloS one*. 2013;8:e75393.
63. Prieto AL, O'Dell S, Varnum B and Lai C. Localization and signaling of the receptor protein tyrosine kinase Tyro3 in cortical and hippocampal neurons. *Neuroscience*. 2007;150:319-34.
64. Prieto AL, O'Dell S, Varnum B and Lai C. Localization and signaling of the receptor protein tyrosine kinase Tyro3 in cortical and hippocampal neurons. *Neuroscience*. 2007;150:319-334.
65. Deng W, Aimone JB and Gage FH. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nature reviews neuroscience*. 2010;11:339.
66. Murai K, Qu Q, Sun G, Ye P, Li W, Asuelime G, Sun E, Tsai GE and Shi Y. Nuclear receptor TLX stimulates hippocampal neurogenesis and enhances learning and memory in a transgenic mouse model. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014;111:9115-9120.
67. Shors TJ, Miesegaes G, Beylin A, Zhao M, Rydel T and Gould E. Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature*. 2001;410:372.
68. Schurgers LJ, Spronk HM, Soute BA, Schiffers PM, DeMey JG and Vermeer C. Regression of warfarin-induced medial elastocalcinosis by high intake of vitamin K in rats. *Blood*. 2007;109:2823-2831.
69. Vermeer C. Gamma-carboxyglutamate-containing proteins and the vitamin K-dependent carboxylase. *Biochemical Journal*. 1990;266:625.
70. Murshed M, Schinke T, McKee MD and Karsenty G. Extracellular matrix mineralization is regulated locally; different roles of two gla-containing proteins. *The Journal of cell biology*. 2004;165:625-630.
71. Proudfoot D, Skepper JN, Hegyi L, Bennett MR, Shanahan CM and Weissberg PL. Apoptosis regulates human vascular calcification in vitro: evidence for initiation of vascular calcification by apoptotic bodies. *Circulation research*. 2000;87:1055-1062.
72. Ishimoto Y, Ohashi K, Mizuno K and Nakano T. Promotion of the uptake of PS liposomes and apoptotic cells by a product of growth arrest-specific gene, gas6. *The Journal of Biochemistry*. 2000;127:411-417.

Figures legends and table

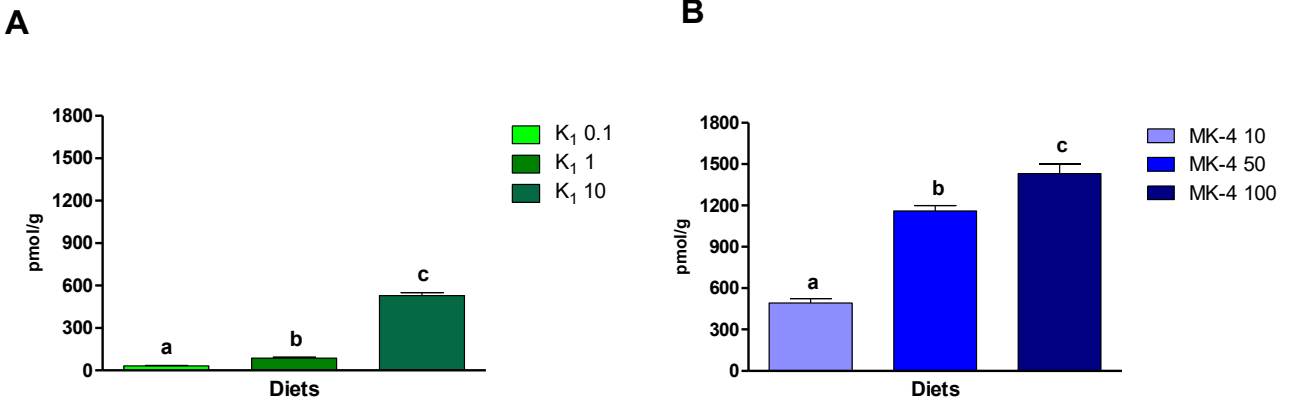


Figure 1. MK-4 status in brain in K₁ (A) and MK-4 (B) diet groups. Data represent NaCl and CaCl₂ groups combined. Values are means \pm SEM, n= 12 mice/group. Means without a common letter (a, b, c) differ, p<0.0001 (one- way ANOVA followed by a Tukey's post-hoc test)

Diets	K ₁ (pmol/g)	MK-4 (pmol/g)	% MK-4 / VK Total
K ₁ - 0.1	0.61 \pm 0.47	33.2 \pm 1.8	98.5
K ₁ - 1	0.28 \pm 0.20	87.9 \pm 2.8	99.7
K ₁ - 10	2.46 \pm 0.17	528.8 \pm 14.1	99.5
MK-4 10	n.d	492.7 \pm 23.7	100
MK-4 50	n.d	1160.8 \pm 27.4	100
MK-4 100	n.d	1431.8 \pm 51.1	100

Table 1: K₁ and MK-4 status and MK-4 % in total VK in brain. Data represent NaCl and CaCl₂ groups combined.

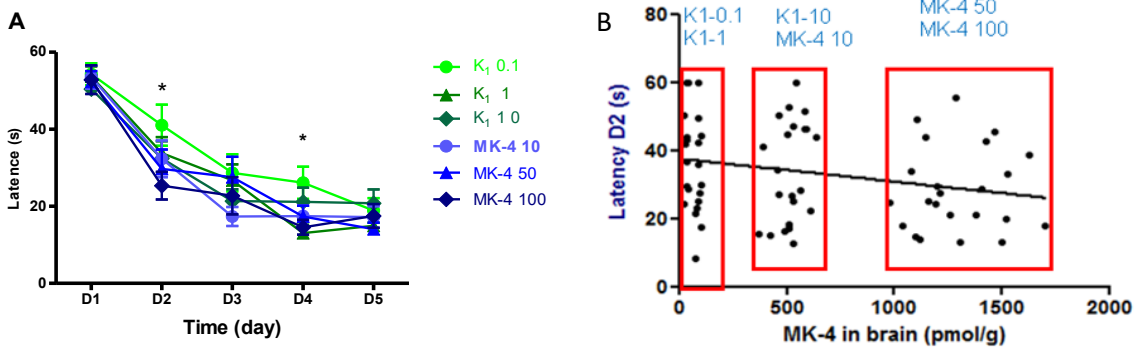


Figure 2. Effect of diet on spatial learning. Learning abilities were examined with the Morris Water Maze test (3 weeks after application of CaCl₂ or NaCl). The test consisted of 5 training days

(D1-D5) during which mice were allowed three 60 sec trials per day to find the escape platform. Each trial was 20 min apart. The average latency across the training was calculated to compare learning performance. (A) NaCl and CaCl₂ groups were combined (n= 22-27 mice/ group) to compare the learning performance between diets, and (B) correlation between learning abilities on day 2 and the MK-4 content in brain. (A) represents mean ± SEM. *p<0.05 (two-way repeated measures ANOVA followed by a Bonferroni post-hoc test) (A) and Pearson correlation r= -0.25, p< 0.05 (B).

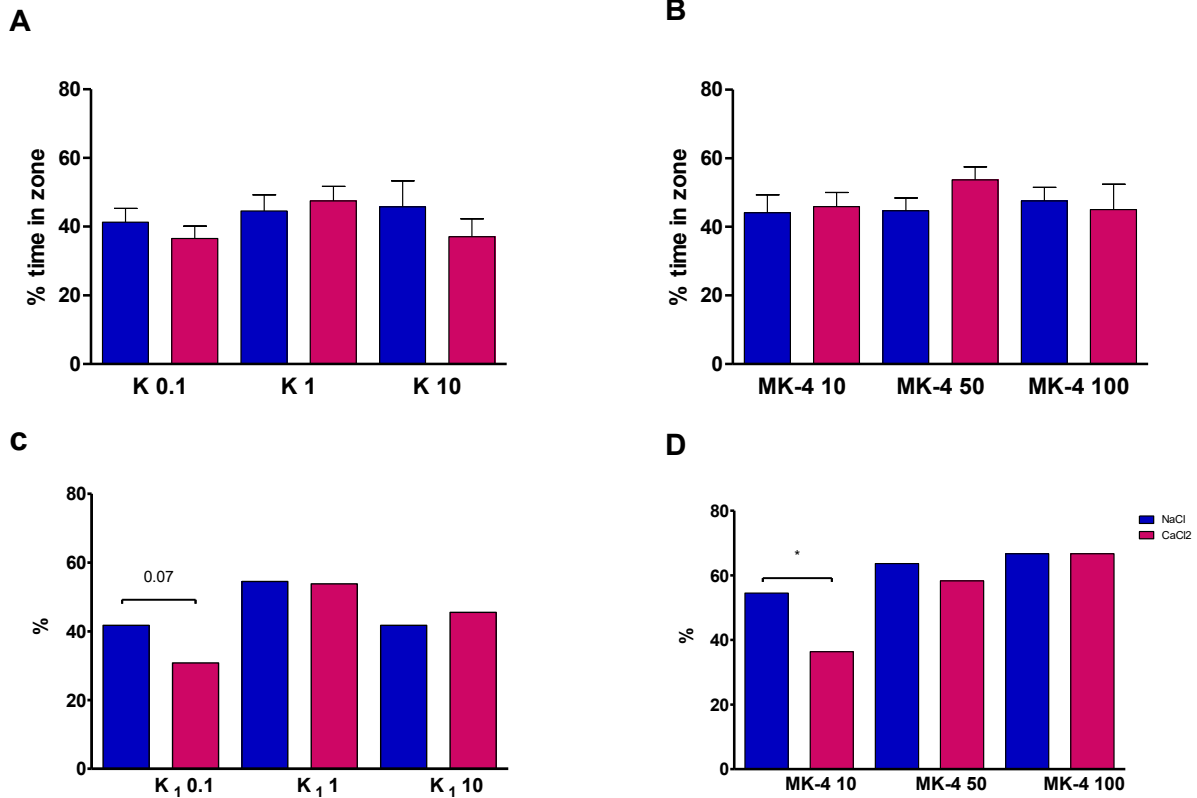


Figure 3. Effect of carotid calcification on memory. For the probe test (day 6), the platform was removed and animals were given two 30 sec trials separated 1 h apart, to assess time spent in the target quadrant (the quadrant where the platform was originally located) in K₁ (A) and MK-4 (B) fed mice, and criterion performance in K₁ (C) and MK-4 (D) fed mice. The criterion was reached when 35% of the path length was traversed in the maze target quadrant and at least two platform crossings occurred (the square corresponding to the initial location of the platform). Graphs represent mean ± SEM (A, B) and % of animals per group (C, D). * p< 0.05 (Fisher's exact test).

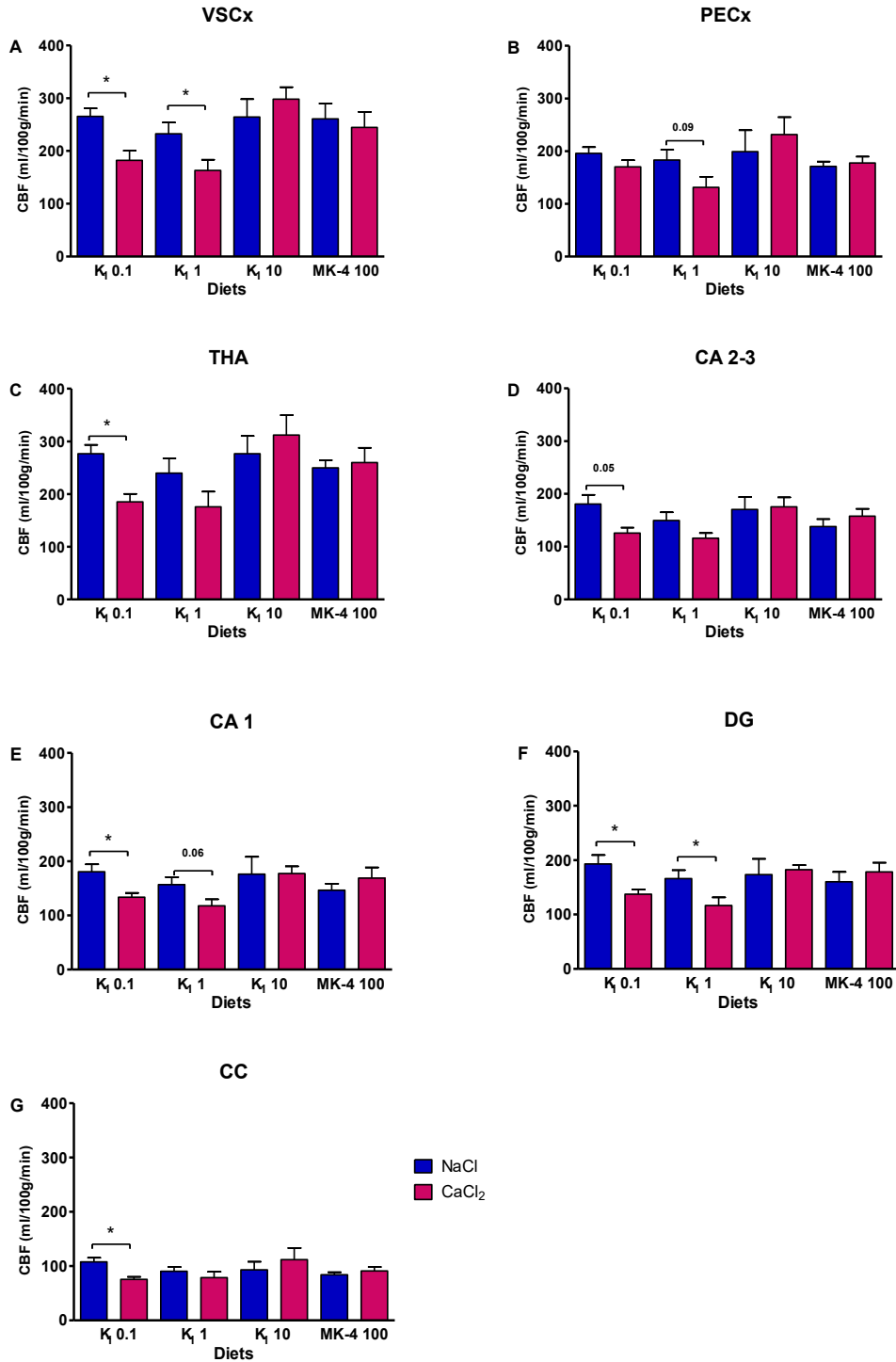
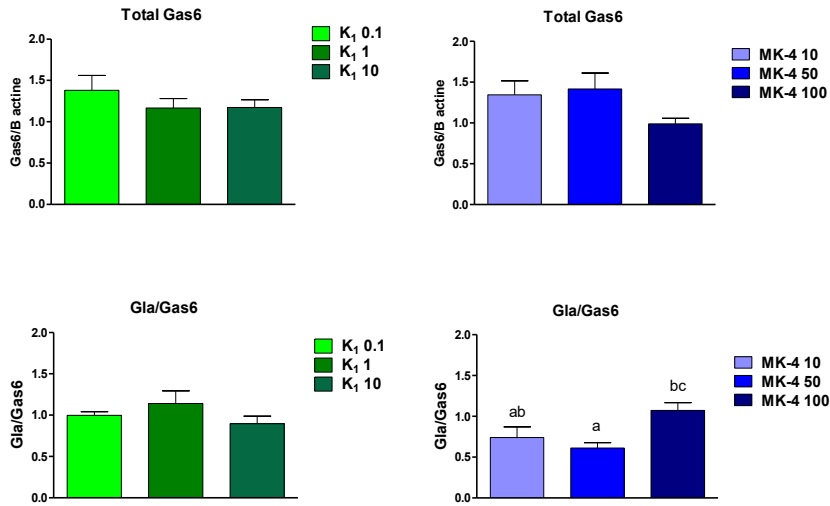


Figure 4. Effect of carotid calcification on resting cerebral blood flow (CBF). Resting CBF was measured by autoradiography using [¹⁴C] iodoantipyrine as a diffusible tracer in awake mice, 2 weeks after application of CaCl₂ or NaCl. CBF was quantified in the following regions from the right hemisphere: (A) visual and somatosensory cortices (VSCx), (B) perirhinal and entorhinal

cortices (PECx), (C) thalamus (THA), (D) CA2-3 (cornu ammonis area 2-3), (E) CA1 (cornu ammonis area 1), (F) dentate gyrus (DG), and (G) corpus callosum (CC). Graph represents mean \pm SEM. * $p < 0.05$ (unpaired Student's t-test two tailed, $n = 4-9$ mice/group). CBF is expressed as ml/100g/min.

A



B

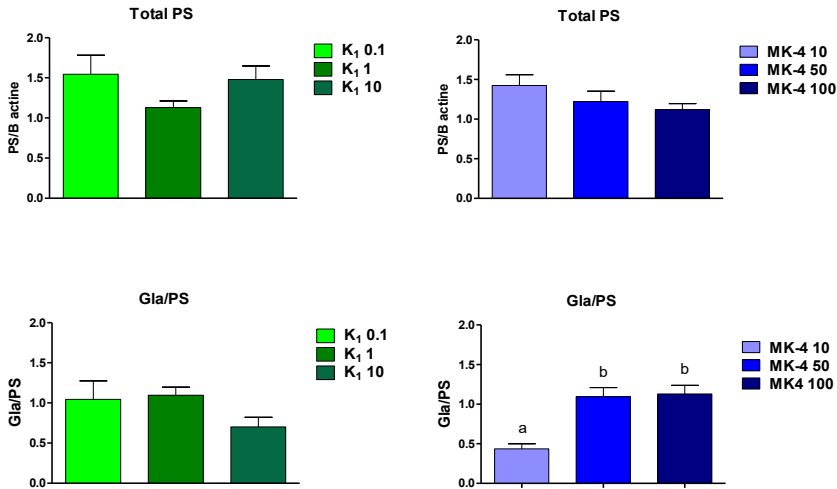


Figure 5. VKDPs activity in brain. Gas6 (A) and PS (B) activity was determined by western blot. For each group, data include NaCl and CaCl₂ animals combined. Values are means \pm SEM, $n = 12$ mice/ group. Means without a common letter (a, b, c) differ, $p < 0.05$ (One-way ANOVA followed by a Tukey's post-hoc test).

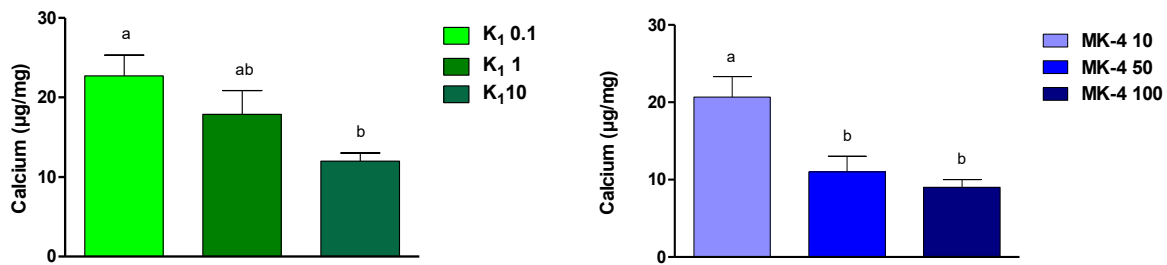


Figure 6. Calcium content in the carotid artery. The prevention efficacy in carotid calcification is presented for K₁ (A) and MK-4 (B). Values are means \pm SEM, n= 5–6. Means without a common letter (a, b) differ, p < 0.05 (One-way ANOVA followed by a Tukey's post hoc test).

Supplementary Figures: Antibody specificity verification

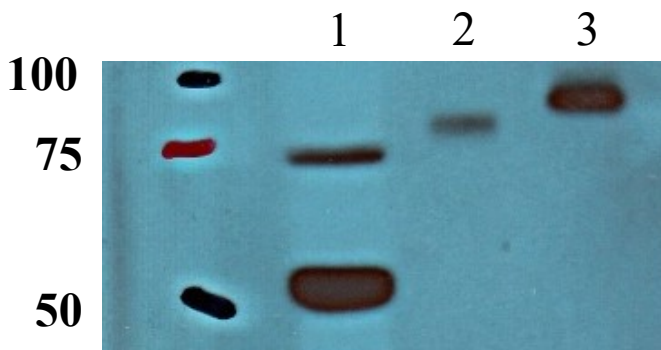


Figure 7: Gla Antibody specificity
 Gla is present in all 3 wells
 Well 1: Homogenate of rat brain
 Well 2: 5ng Recombinant protein S
 Well 3: 5ng Recombinant protein Gas6

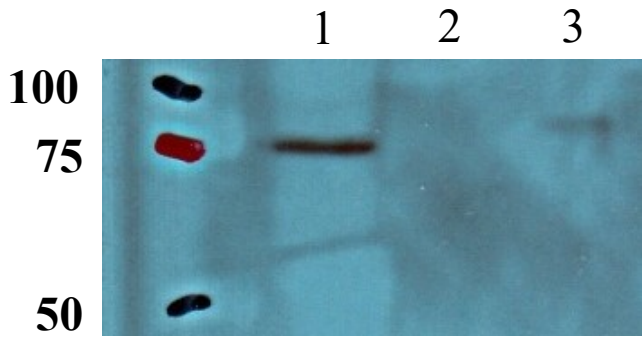


Figure 8: Gas6 Antibody specificity

Gas6 is present in wells 1 and 3

Well 1: Homogenate of rat brain

Well 2: 5ng Recombinant protein S

Well 3: 5ng Recombinant protein Gas6

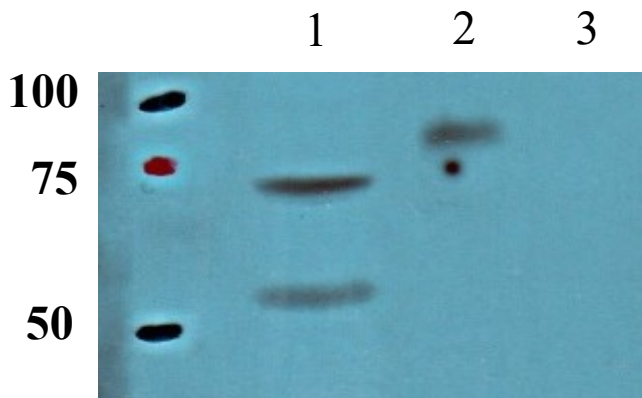


Figure 9: Protein S Antibody specificity

Protein S is present in wells 1 and 2

Well 1: Homogenate of rat brain

Well 2: 5ng Recombinant protein S

Well 3: 5ng Recombinant protein Gas6

TROISIEME PARTIE: DISCUSSION

Dans le but de comprendre les effets de la rigidité artérielle sur le cerveau, nous avons d'abord démontré les effets sur les fonctions cérébrovasculaires, l'intégrité de la BHE et ultérieurement sur la mémoire. Ensuite nous avons démontré que ces effets concernent surtout les mâles et les femelles OVX tandis que les femelles reproductives sont protégées grâce à l'E2. Enfin, nous avons établi que la VK avec ses deux vitamères, VK₁ et MK-4, réduit la calcification vasculaire et prévient les altérations du débit sanguin cérébral ainsi que les troubles cognitifs qui en résultent.

Dans notre première étude, nous avons caractérisé l'impact de la rigidité artérielle sur les fonctions cérébrales. Dans cette étude, nous avons choisi d'utiliser un nouveau modèle murin de rigidité artérielle basé sur la calcification de la carotide. Contrairement à d'autres modèles de rigidité artérielle qui pourraient occasionner des lésions au cerveau par d'autres paramètres que la rigidité elle-même ou affecter la pression artérielle, ce modèle permet d'étudier spécifiquement les effets de la rigidité artérielle sur le cerveau indépendamment de l'âge et de l'augmentation de la pression. Nos résultats indiquent que la rigidité artérielle, indépendamment de l'âge ou de l'augmentation de la pression artérielle, altère la régulation du flux sanguin cérébral et l'intégrité du système vasculaire cérébral, endommageant la BHE et conduisant à des déficits cognitifs. La rigidité artérielle entraîne des altérations significatives du débit sanguin cérébral au repos et des mécanismes régulant le débit sanguin cérébral, y compris l'autorégulation cérébrale, le couplage neurovasculaire et la dilatation dépendante de l'endothélium. A noter que nous avons contrôlé les perturbations potentielles des paramètres physiologiques qui pourraient affecter le flux sanguin cérébral tels que les gaz sanguins et la pression artérielle et que ceux-ci se sont avérés comparables entre les souris témoins et les souris avec calcification artérielle. La diminution du débit sanguin cérébral au repos a été observée dans les régions cérébrales critiques, y compris l'hippocampe et

le cortex perirhinal et entorhinal, qui sont des zones extrêmement importantes pour la mémoire ⁵⁸⁴. Ces déficits sont suivis par des troubles cognitifs. L'hippocampe, une composante anatomique centrale du circuit de mémoire du lobe temporal médial, joue le rôle le plus important dans la génération, l'organisation et le stockage de la mémoire. Par ailleurs, l'hippocampe est l'une des premières structures cérébrales à présenter des modifications neurodégénératives de la maladie d'Alzheimer ⁵⁸⁵.

Alors que d'autres mécanismes peuvent également contribuer à altérer la cognition, les répercussions physiologiques d'une régulation dysfonctionnelle du débit sanguin cérébral sont importantes compte tenu des besoins métaboliques élevés du cerveau et du fait que même de faibles réductions du débit sanguin peuvent inhiber la synthèse protéique et entraîner un dysfonctionnement neuronal ⁵⁸⁶. L'apparition initiale des déficits du débit sanguin cérébral suivie de troubles de la mémoire dans notre modèle, suggérerait que la perturbation de la régulation du débit sanguin cérébral est un lien mécanistique entre la rigidité artérielle et ses effets sur la cognition. Comme dans notre étude, il existe dans la maladie d'Alzheimer, des changements structurels et fonctionnels incluant le débit sanguin cérébral dans le cerveau, lesquels surviennent de 2,3 à 2,9 ans avant le déclin des fonctions cognitives ⁵⁸⁷. Une étude clinique récente a montré que l'association entre l'augmentation de la rigidité artérielle et le déclin cognitif incluait des facteurs cérébrovasculaires tels que l'augmentation de la résistance cérébrovasculaire et les dommages dans la substance blanche ⁵⁸⁸. Chez les humains, la rigidité aortique est à l'origine d'une réduction du débit sanguin cérébral dans le lobe temporal chez les personnes âgées n'ayant pas encore manifesté de troubles cognitifs ⁵⁸⁹.

Pendant les périodes d'activité neuronale intense, il est nécessaire d'ajuster l'apport d'O₂ et de glucose à l'activité neuronale locale grâce à une augmentation adaptative rapide du débit sanguin

cérébral. Ceci est assuré par un mécanisme appelé couplage neurovasculaire. L'hyperémie fonctionnelle résultante est un mécanisme essentiel pour maintenir un microenvironnement optimal du tissu cérébral et assurer ainsi une fonction neuronale normale ⁵⁹⁰. Notre étude a montré que ce mécanisme est altéré suite à la calcification vasculaire tout comme la réactivité vasculaire dépendante de l'endothélium. Cependant, la réponse du débit sanguin cérébral au nitroprussiate de sodium (SNP), donneur du NO et vasodilatateur indépendant de l'endothélium reste intacte, ce qui suggère que les déficits du débit sanguin cérébral détectés ne sont pas liés à un dysfonctionnement du muscle vasculaire lisse.

L'altération du couplage neurovasculaire a été aussi observée chez les patients âgés ⁵⁹¹ et dans le modèle murin de vieillissement ^{219, 592}. Par conséquent, une inadéquation apparaît entre les besoins en O₂ et en glucose des neurones de l'hippocampe qui augmentent pendant l'activité et l'apport sanguin entraînant ainsi les troubles cognitifs ⁵⁹³. Un couplage neurovasculaire altéré peut entraîner une diminution de la distribution des nutriments, une élimination inadéquate des produits métaboliques et une perturbation du microenvironnement local dans les tissus cérébraux, ce qui peut nuire à la fonction neuronale. L'altération du couplage neurovasculaire observée au cours du vieillissement chez les rats a été simulée chez de jeunes souris en stimulant la génération intracellulaire d'anion superoxyde. Le stress oxydatif compromet la signalisation du NO et il en résulte un dysfonctionnement cérébrovasculaire et cognitif ⁵⁹⁴. La production d'anion superoxyde dans l'hippocampe a aussi été rapportée dans le modèle de rigidité artérielle utilisé dans cette étude et était associée à une neurodégénérescence ⁵⁹⁵.

La diminution du débit sanguin cérébral peut aussi s'expliquer par la diminution de la densité vasculaire dans l'hippocampe et le cortex somatosensoriel observée dans notre étude. Ceci est en

accord avec une étude précédente qui a démontré la baisse de la densité artériolaire chez le rat âgé qui pourrait affecter l'apport sanguin ⁵⁹⁶.

L'astrogliose peut également entraîner des processus neuropathologiques, notamment la libération de glutamate excitotoxique, la production de cytokines inflammatoires, la génération de ROS, la dégradation de la BHE et la production d'A β ⁵⁹⁷. En considérant d'autres mécanismes susceptibles d'endommager le cerveau suite à la rigidité artérielle, et au vu de la dysfonction endothéliale cérébrale détectée, nous avons examiné la BHE. Cette barrière est gravement endommagée chez les patients Alzheimer et chez les personnes âgées, en particulier au niveau de l'hippocampe ⁵⁹⁸, ⁵⁹⁹. Nos résultats montrent une augmentation de la perméabilité de la BHE causée par la rigidité artérielle au niveau de l'hippocampe et une tendance similaire dans le cortex frontal, une région particulièrement affectée chez les patients souffrant de troubles vasculaires ^{236, 600}. La vulnérabilité de l'hippocampe dans notre modèle de rigidité artérielle chez la souris peut être expliquée par l'augmentation précédemment rapportée de la production d'anion superoxyde vasculaire et de l'activation des cellules microgliales dans cette région ⁵⁹⁵, qui pourraient endommager l'endothélium cérébral, le site de la BHE. Ceci est également cohérent avec l'altération de la mémoire spatiale et la réduction significative de la densité vasculaire également observées dans cette région.

Dans notre étude, nous avons étudié les changements dans l'hémisphère droit vu que seule la carotide droite était calcifiée dans le modèle et ses effets étaient moins marqués dans l'hémisphère gauche. Cependant, nous pensons que la calcification de la carotide gauche entrainerait des effets similaires à ceux résultants de la calcification de la carotide droite étant donné que la vasculature cérébrale est symétrique à partir des artères carotides et que les pressions artérielles au niveau des deux carotides sont équivalentes.

Nous avons évalué les fonctions cognitives avec la piscine de Morris, test évaluant l'apprentissage dépendant de l'hippocampe ⁶⁰¹, parce que dans le modèle utilisé, la rigidité artérielle entraîne une neurodégénérescence au niveau de l'hippocampe ⁶⁰². Ce test est très sensible aux dommages subis par l'hippocampe ^{603, 604}.

Bien que ce modèle nous ait permis d'étudier les effets spécifiques de la rigidité artérielle, il ne nous a pas permis de vérifier toutes nos hypothèses. Puisque les études chez l'homme ont montré des associations entre la vitesse de l'onde de pouls et la charge A β cérébrale chez les adultes non atteints de démence ^{605, 606}, nous nous attendions à ce que l'altération de la régulation cérébrovasculaire, la diminution de la densité des microvaisseaux et l'altération de la BHE aient un impact sur la clairance de l'A β et conduisent ainsi à une accumulation de l'A β dans le cerveau. Nos résultats ont montré une augmentation modeste du rapport A β 40/A β 42 dans le cortex frontal, alors qu'aucun changement significatif n'a été observé dans l'hippocampe et le plasma. Cela ne devrait pas exclure le fait que la rigidité artérielle pourrait avoir un impact sur l'accumulation d'A β chez l'homme. En effet, l'expression des peptides amyloïdes murins endogènes est inférieure à celle des humains et ils ne possèdent pas les acides aminés susceptibles d'agrèger alors que ces acides aminés sont présents dans l'A β humain ^{607, 608}. Mais aussi, la période de deux semaines après la chirurgie de calcification pourrait être courte pour observer une accumulation d'A β .

Nos observations nous laissaient penser que la rigidité artérielle pouvait induire des microhémorragies cérébrales. En effet, ces lésions sont fréquentes chez les personnes âgées ^{609, 610} et ont été associées à un risque accru d'AVC ⁶¹¹, à une altération de la structure de la substance blanche ⁶¹², à une baisse de performance cognitive ⁶¹³ et même à une démence ⁶¹⁰. Les résultats chez la souris n'ont montré aucune microhémorragie. Nous n'excluons toutefois pas la possibilité que la rigidité artérielle puisse favoriser la formation de microhémorragies chez l'homme ^{614, 615}. Il

serait intéressant d'examiner si la rigidité artérielle est suffisante pour induire des microhémorragies et une altération de la substance blanche chez les animaux plus âgés. Nous n'avons pas envisagé cette possibilité dans cette étude pour éviter le vieillissement comme facteur confondant et pouvoir ainsi examiner les effets indépendants de la rigidité carotidienne, sans paramètres supplémentaires.

Dans notre deuxième étude nous avons cherché à comprendre l'effet du sexe sur la rigidité artérielle et ses conséquences sur le cerveau. Nos résultats montrent que la rigidité artérielle entraîne une altération du couplage neurovasculaire et de la réactivité vasculaire dépendante de l'endothélium chez les souris mâles mais pas chez les souris femelles reproductives. Cette protection a été supprimée par une ovariectomie, mais a été restaurée par un traitement à l'E2 chez les souris ovariectomisées. De même, des études antérieures ont rapporté une résistance des femelles contre les lésions cérébrales ⁶¹⁶⁻⁶¹⁸. Ceci est en accord avec les résultats précédents montrant la protection de l'E2 contre les lésions cérébrovasculaire associées à l'administration aiguë ⁶¹⁶ et chronique ⁶¹⁷ d'Ang II chez les souris femelles. Dans le cas de l'administration aiguë d'Ang II, cette protection était efficace en phase proestrals et œstrals lorsque le taux d'E2 dans le plasma était élevé ⁶¹⁶. Dans notre étude, nous n'avons pas spécifiquement étudié l'effet de la phase du cycle œstral. Cependant, les résultats montrent que la plupart des femelles étaient en metestrus ou diestrus. L'Ang II augmente la production de radicaux libres dans les vaisseaux sanguins cérébraux ⁶¹⁶. Dans une étude antérieure, il a été démontré que les lésions cérébrales associées à la rigidité artérielle sont consécutives à une augmentation du stress oxydatif ⁵⁹⁵. Le stress oxydatif compromet la signalisation du NO et entraîne un dysfonctionnement cérébrovasculaire ⁵⁹⁴. Les œstrogènes inhibent considérablement la production d'anion superoxyde par les mitochondries dans les vaisseaux sanguins cérébraux et les cellules endothéliales ^{386, 619, 620}. Ainsi, les œstrogènes,

en supprimant la génération de radicaux libres, peuvent avoir des effets protecteurs sur la fonction cérébrale. Les œstrogènes augmentent également l'expression de la eNOS, qui favorise la vasodilatation grâce à une augmentation de la production de NO dans le cerveau ³⁷⁶. L'effet protecteur des œstrogènes implique aussi son action sur les astrocytes où l'E2 diminue l'astrogliose et la libération des cytokines inflammatoires ⁶²¹. Les œstrogènes réduisent aussi l'inflammation vasculaire cérébrale ^{622, 623}. L'effet anti-inflammatoire des œstrogènes diminue avec l'âge ^{381, 624}. Enfin, les œstrogènes améliorent le transport du glucose ⁶²⁵ et possèdent une action anti-apoptotique ^{626, 627}.

Concernant les propriétés mécaniques vasculaires, la rigidité artérielle affecte les mâles et les femelles de la même façon. Ni l'ovariectomie, ni l'administration d'E2 n'ont eu d'effet contrairement aux observations dans d'autres modèles de rigidité ^{628, 629}. Aussi dans notre modèle, la calcification est induite directement ce qui suggère que les œstrogènes pourraient agir en amont de la formation de sels de Ca^{2+} dans les vaisseaux sanguins. Pour d'autres auteurs ⁶³⁰, la rigidité artérielle est liée à l'âge plutôt qu'à la ménopause en tant que telle. Ceci est en accord avec notre étude qui a utilisé des animaux jeunes.

Dans cette étude, nous avons combiné le modèle de calcification au modèle d'ovariectomie. Mais, malgré la similitude des profils hormonaux ovariens après l'ablation chirurgicale des ovaires chez la femme et le rongeur, une limite importante de ce modèle réside dans le fait que la plupart des femmes ne subissent pas de ménopause induite par une intervention chirurgicale. La majorité des femmes vivent la ménopause par une transition naturelle résultant du vieillissement ovarien. Ce dernier se traduit par l'épuisement des follicules produisant les œstrogènes, la progestérone et l'androgène ⁶³¹. Un autre modèle permet d'induire une déplétion folliculaire chimiquement par le diépoxyde de 4-vinylcyclohexène (DVC), une substance qui cible de manière sélective les

follicules ovariens primordiaux et primaires chez la souris en accélérant le processus naturel d'atrésie⁶³². Ce modèle reproduit des conditions plus similaires à celles de la majorité des femmes en transition vers la ménopause⁶³³ et est nécessaire chez la souris puisque la sénescence ovarienne arrive très tardivement chez cette espèce. Ainsi, afin d'éviter l'âge comme facteur confondant, nous n'avons pas envisagé d'utiliser des souris âgées dans cette étude. De plus l'évolution de la ménopause chez les souris n'est pas vraiment comparable à celle observée chez les femmes^{632, 634}. Dans notre dernière étude, nous avons voulu étudier la possibilité de prévenir la rigidité artérielle et ses effets notamment sur le cerveau dans notre modèle de rigidité artérielle. Pour cette étude, nous avons choisi d'utiliser la VK vu ses effets bénéfiques sur les fonctions cognitives déjà démontrés dans les travaux précédents dans notre laboratoire mais aussi l'action contre la calcification vasculaire observée dans d'autres modèles animaux et chez l'homme. Nous avons utilisé deux vitamères de VK, la VK₁ normalement trouvée dans l'alimentation et la MK-4 (ménaquinone) surtout synthétisée dans l'organisme à partir de la VK₁. Pour chaque vitamère, nous avons utilisé trois doses (faible, normale et élevée). La dose normale pour la VK₁ correspond à ce qui est recommandé pour les rongeurs et les doses faible et riche ont été déterminées sur la base d'études antérieures réalisées au laboratoire. Les doses pour la MK-4 étaient basées sur la littérature puisqu'il n'existe pas de recommandation pour la MK-4. Cette étude confirme que la VK dans le cerveau est principalement sous forme de MK-4 même quand les animaux ne reçoivent que la VK₁ dans leur régime alimentaire comme précédemment observé chez le rat^{570, 635}. De plus, la teneur en VK dans le cerveau augmentait avec l'apport de VK dans l'alimentation.

La VK améliore aussi les fonctions cognitives dans le contexte de rigidité artérielle. Étonnamment, tous les régimes de VK, y compris les régimes pauvres en VK, ont prévenu les troubles d'apprentissage observés précédemment suite à la calcification carotidienne. Les capacités

d'apprentissage étaient corrélées avec la teneur en VK du cerveau. Contrairement à l'apprentissage, la consolidation de la mémoire était altérée chez des souris nourries avec un régime pauvre en VK (K₁ 0.1 et MK-4 10) lorsqu'elles étaient soumises à une calcification vasculaire. L'effet de la VK sur la cognition a été aussi observé dans deux autres modèles, le modèle de calcification vasculaire de la warfarine ⁶³⁶ et le modèle de déficience alimentaire en VK ⁵⁷⁰, les deux conduisant à une déficience de VK au niveau du cerveau.

Lors de notre première étude, nous avons établi que les troubles cognitifs étaient consécutifs au dysfonctionnement cérébrovasculaire, avec notamment une baisse du débit sanguin cérébral au repos. La baisse du débit sanguin a aussi été associée aux troubles cognitifs dans la maladie d'Alzheimer ⁶³⁷. Dans cette étude, nous démontrons que la VK₁ aux doses normale et enrichie ainsi que la MK-4 à dose élevée, la seule examinée pour ce paramètre, préviennent les troubles du débit sanguin cérébral. Ceci pourrait donc expliquer en partie l'amélioration des fonctions cognitives chez les animaux calcifiés en fonction de la dose alimentaire de VK.

La VK mais surtout la MK-4 a augmenté l'activité des protéines Gas6 et PS dans le cerveau. Les effets de ces protéines incluent l'action anti-apoptotique ⁶³⁸⁻⁶⁴⁰ anti-inflammatoire ⁶⁴¹ ou la neurogenèse pour la Gas6 ⁶⁴²; et une action anti-thrombotique ⁶⁴³, de maintien de l'intégrité de la BHE ⁶⁴⁴ et de neurogenèse ⁵⁵⁸ pour la PS. Certains de ces mécanismes ont été mis en cause dans notre première étude comme participants à l'altération de l'homéostasie cérébrale suite à la rigidité artérielle. L'activité de ces protéines peut donc justifier les effets bénéfiques de la VK observés dans notre étude.

Notre étude a confirmé également la capacité des deux vitamères de VK à réduire la calcification vasculaire comme précédemment décrit par Schurgers *et al.* ⁴⁷⁸ dans le modèle de warfarine. Au niveau vasculaire, la protéine MGP dont l'activité dépend de la VK prévient la calcification

tissulaire ⁶⁴⁵. La Gas6 est aussi présente dans le système vasculaire et exerce une action anti-apoptotique ⁵²⁷. Dans la suite de cette étude, nous allons évaluer l'activité de ces protéines au niveau vasculaire.

Cette étude a démontré que la VK peut prévenir la calcification vasculaire et les troubles cognitifs qui en résultent. Cependant, comme dans la première étude, il serait intéressant de confirmer les effets sur la cognition avec un autre test de comportement. Compte tenu de la petite taille des tissus de la souris, nous n'avons pas pu disposer d'assez de matériel pour toutes les analyses prévues dans notre étude tels que les marqueurs de l'inflammation et de l'apoptose, l'intégrité de la BHE, la MGP, etc. D'autres groupes d'animaux seront bientôt disponibles pour procéder à ces mesures.

CONCLUSION

Le modèle expérimental utilisé nous a permis de mieux caractériser les effets de la rigidité artérielle sur l'homéostasie cérébrale. Ces effets sont indépendants de l'âge et de l'hypertension. Nous avons déterminé que la rigidité artérielle altère la cognition. Les troubles cognitifs sont précédés par l'altération des mécanismes importants que sont le couplage neurovasculaire et la réactivité vasculaire dépendante de l'endothélium ainsi qu'une baisse du débit sanguin cérébral au repos dans les régions du cerveau importantes pour la cognition. L'altération des mécanismes neurovasculaires a été observée chez les souris mâles et les femelles OVX mais pas chez les femelles reproductives et les femelles OVX ayant reçu un traitement d'E2. Enfin, avec deux vitamères de VK (K₁ et MK-4) nous avons réduit la calcification vasculaire et prévenu les troubles cognitifs qui en résultent. La prévention du déclin cognitif a été atteinte au moins partiellement en rétablissant débit sanguin cérébral au repos et en augmentant l'activité de Gas6 et PS dans le cerveau.

LIMITES DE L'ÉTUDE

Les limites de notre étude sont surtout liées au modèle de rigidité artérielle utilisé. Dans ce modèle, la rigidité artérielle survient sur une période plus courte par rapport à la rigidité observée avec le vieillissement ou les maladies chroniques qui elle, s'installe lentement. Cette période (2-3 semaines) pourrait être trop courte pour détecter tous les changements liés à la rigidité artérielle qui normalement apparaissent plus tardivement. Une autre limite concerne aussi le modèle de ménopause induite alors que chez la plupart des femmes la ménopause résulte de la perte progressive des follicules ovariens produisant les hormones sexuelles avec l'âge. Enfin, dans nos études de comportement un seul test a été utilisé.

PERSPECTIVES

Ces études permettent une meilleure compréhension des effets de la rigidité artérielle sur la santé du cerveau, et démontrent le potentiel de la VK et le traitement hormonal par l'œstradiol dans la prévention de ces effets. Cependant, il reste plusieurs questions à explorer. Par exemple, quel est le seuil de rigidité artérielle associé à un dysfonctionnement cérébral? Quels sont les effets sur la structure du polygone de Willis? Quand les personnes présentant une rigidité artérielle devraient-elles commencer le traitement? Le traitement avec l'E2 pourrait-il éventuellement empêcher le déclin cognitif dans ce modèle? Quels sont les autres mécanismes impliqués dans la protection de la VK? D'autres études seront nécessaires pour répondre à ces questions.

References

1. Safar ME, Levy BI and Struijker-Boudier H. Current perspectives on arterial stiffness and pulse pressure in hypertension and cardiovascular diseases. *Circulation*. 2003;107:2864-2869.
2. Safar ME. Systolic blood pressure, pulse pressure and arterial stiffness as cardiovascular risk factors. *Current opinion in nephrology and hypertension*. 2001;10:257-261.
3. Winer N, Weber MA and Sowers JR. The effect of antihypertensive drugs on vascular compliance. *Current hypertension reports*. 2001;3:297.
4. Harvey A, Montezano AC, Lopes RA, Rios F and Touyz RM. Vascular fibrosis in aging and hypertension: molecular mechanisms and clinical implications. *Canadian Journal of Cardiology*. 2016;32:659-668.
5. Van Bortel LM, Struijker-Boudier HA and Safar ME. Pulse pressure, arterial stiffness, and drug treatment of hypertension. *Hypertension*. 2001;38:914-921.
6. Avolio A, Butlin M, Liu Y-Y, Viegas K, Avadhanam B and Lindesay G. Regulation of arterial stiffness: cellular, molecular and neurogenic mechanisms. *Artery Research*. 2011;5:122-127.
7. Townsend RR. Arterial stiffness and chronic kidney disease: lessons from the Chronic Renal Insufficiency Cohort study. *Current opinion in nephrology and hypertension*. 2015;24:47.
8. Hughes TM, Craft S and Lopez OL. Review of 'the potential role of arterial stiffness in the pathogenesis of Alzheimer's disease'. *Neurodegenerative disease management*. 2015;5:121-135.
9. AlGhatrif M and Lakatta EG. The conundrum of arterial stiffness, elevated blood pressure, and aging. *Current hypertension reports*. 2015;17:12.
10. Kotsis V, Stabouli S, Karafillis I and Nilsson P. Early vascular aging and the role of central blood pressure. *Journal of hypertension*. 2011;29:1847-1853.
11. Lakatta EG. The reality of aging viewed from the arterial wall. *Artery research*. 2013;7:73.
12. Wang M, Jiang L, Monticone RE and Lakatta EG. Proinflammation: the key to arterial aging. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2014;25:72-79.
13. Harvey A, Montezano AC and Touyz RM. Vascular biology of ageing—Implications in hypertension. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2015;83:112-121.
14. Seidemann SB, Lighthouse JK and Greif DM. Development and pathologies of the arterial wall. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2014;71:1977-99.
15. Bauer V and Sotniková R. Nitric oxide—the endothelium-derived relaxing factor and its role in endothelial functions. *General physiology and biophysics*. 2010;29:319.
16. Loscalzo J. The identification of nitric oxide as endothelium-derived relaxing factor. *Circulation research*. 2013;113:100-103.
17. Haurani MJ and Pagano PJ. Adventitial fibroblast reactive oxygen species as autocrine and paracrine mediators of remodeling: bellwether for vascular disease? *Cardiovascular research*. 2007;75:679-689.
18. Ruan C-C, Zhu D-L, Chen Q-Z, Chen J, Guo S-J, Li X-D and Gao P-J. Perivascular adipose tissue-derived complement 3 is required for adventitial fibroblast functions and adventitial remodeling in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2010;30:2568-2574.
19. Miao CY and Li ZY. The role of perivascular adipose tissue in vascular smooth muscle cell growth. *British journal of pharmacology*. 2012;165:643-658.

20. Rey FE and Pagano PJ. The reactive adventitia: fibroblast oxidase in vascular function. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2002;22:1962-1971.
21. Khayat MT and Nayeem MA. The Role of Adenosine A2A Receptor, CYP450s, and PPARs in the Regulation of Vascular Tone. *BioMed research international*. 2017;2017.
22. Tykocki N, Boerman E and Jackson W. Smooth Muscle Ion Channels and Regulation of Vascular Tone in Resistance Arteries and Arterioles. *Comprehensive Physiology*. 2017;7:485-581.
23. Loh YC, Tan CS, Ch'ng YS, Yeap ZQ, Ng CH and Yam MF. Overview of the Microenvironment of Vasculature in Vascular Tone Regulation. *International journal of molecular sciences*. 2018;19.
24. Nakajima H and Mochizuki N. Flow pattern-dependent endothelial cell responses through transcriptional regulation. *Cell Cycle*. 2017;16:1893-1901.
25. Takada Y, Shinkai F, Kondo S, Yamamoto S, Tsuboi H, Korenaga R and Ando J. Fluid shear stress increases the expression of thrombomodulin by cultured human endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 1994;205:1345-1352.
26. Kamiya A, Korenaga R and Ando J. Flow-induced Endothelial Gene Regulation *Mechanical Forces and the Endothelium*: CRC Press; 2003: 129-166.
27. Buga GM, Gold ME, Fukuto JM and Ignarro LJ. Shear stress-induced release of nitric oxide from endothelial cells grown on beads. *Hypertension*. 1991;17:187-193.
28. Korenaga R, Ando J, Tsuboi H, Yang W, Sakuma I, Toyooka T and Kamiya A. Laminar flow stimulates ATP-and shear stress-dependent nitric oxide production in cultured bovine endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 1994;198:213-219.
29. White SJ, Hayes EM, Lehoux S, Jeremy JY, Horrevoets AJ and Newby AC. Characterization of the differential response of endothelial cells exposed to normal and elevated laminar shear stress. *Journal of cellular physiology*. 2011;226:2841-2848.
30. Chun T-H, Itoh H, Ogawa Y, Tamura N, Takaya K, Igaki T, Yamashita J, Doi K, Inoue M and Masatsugu KJH. Shear stress augments expression of C-type natriuretic peptide and adrenomedullin. *Hypertension*. 1997;29:1296-1302.
31. Morawietz H, Talanow R, Szibor M, Rueckschloss U, Schubert A, Bartling B, Darmer D and Holtz J. Regulation of the endothelin system by shear stress in human endothelial cells. *The Journal of physiology*. 2000;525:761-770.
32. Endlich K, Muller C, Barthelmebs M and Helwig JJ. Role of shear stress in nitric oxide-dependent modulation of renal angiotensin II vasoconstriction. *British journal of pharmacology*. 1999;127:1929-1935.
33. Yamamoto K and Ando J. New molecular mechanisms for cardiovascular disease: blood flow sensing mechanism in vascular endothelial cells. *Journal of pharmacological sciences*. 2011;116:323-331.
34. Ando J and Yamamoto K. Flow detection and calcium signalling in vascular endothelial cells. *Cardiovascular research*. 2013;99:260-268.
35. Davis MJ and Hill MA. Signaling mechanisms underlying the vascular myogenic response. *Physiological reviews*. 1999;79:387-423.
36. Bayliss WM. On the local reactions of the arterial wall to changes of internal pressure. *The Journal of physiology*. 1902;28:220-231.
37. Pittman RN. The circulatory system and oxygen transport *Regulation of Tissue Oxygenation*: Morgan & Claypool Life Sciences; 2011.
38. Li Y and Pagano PJ. Microvascular NADPH oxidase in health and disease. *Free Radical Biology and Medicine*. 2017;109:33-47.

39. Storch U, Blodow S, Gudermann T and Mederos y Schnitzler MJA, thrombosis,. Cysteinyl Leukotriene 1 Receptors as Novel Mechanosensors Mediating Myogenic Tone Together With Angiotensin II Type 1 Receptors—Brief Report. *Arteriosclerosis, thrombosis, vascular biology* 2015;35:121-126.
40. Artamonov MV, Sonkusare SK, Good ME, Momotani K, Eto M, Isakson BE, Le TH, Cope EL, Derewenda ZS and Derewenda U. RSK2 contributes to myogenic vasoconstriction of resistance arteries by activating smooth muscle myosin and the Na⁺/H⁺ exchanger. *Sci Signal.* 2018;11:eaar3924.
41. Khaddaj Mallat R, Mathew John C, Kendrick DJ and Braun AP. The vascular endothelium: a regulator of arterial tone and interface for the immune system. *Critical reviews in clinical laboratory sciences.* 2017;54:458-470.
42. Feletou M, Köhler R and Vanhoutte PM. Nitric oxide: orchestrator of endothelium-dependent responses. *Annals of medicine.* 2012;44:694-716.
43. Edwards G, Félétou M and Weston AH. Endothelium-derived hyperpolarising factors and associated pathways: a synopsis. *Archiv-European Journal of Physiology.* 2010;459:863-879.
44. Grgic I, Kaistha BP, Hoyer J and Köhler R. Endothelial Ca²⁺-activated K⁺ channels in normal and impaired EDHF–dilator responses–relevance to cardiovascular pathologies and drug discovery. *British journal of pharmacology.* 2009;157:509-526.
45. Feletou M and Vanhoutte PM. EDHF: an update. *Clinical science.* 2009;117:139-155.
46. Vanhoutte P, Shimokawa H, Feletou M and Tang E. Endothelial dysfunction and vascular disease—a 30th anniversary update. *Acta physiologica.* 2017;219:22-96.
47. Daiber A, Steven S, Weber A, Shuvaev VV, Muzykantov VR, Laher I, Li H, Lamas S and Münzel T. Targeting vascular (endothelial) dysfunction. *British journal of pharmacology.* 2017;174:1591-1619.
48. Kleinbongard P, Schulz R, Rassaf T, Lauer T, Dejam A, Jax T, Kumara I, Gharini P, Kabanova S and Özüyaman B. Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase. *Blood.* 2006;107:2943-2951.
49. Ghafourifar P and Richter C. Nitric oxide synthase activity in mitochondria. *FEBS letters.* 1997;418:291-296.
50. Jakala P, Pere E, Lehtinen R, Turpeinen A, Korpela R and Vapaatalo H. Cardiovascular activity of milk casein-derived tripeptides and plant sterols in spontaneously hypertensive rats. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society.* 2009;60:11-20.
51. Moncada S. A2. Nitric oxide and bioenergetics: Physiology and pathophysiology. *Nitric Oxide.* 2007;9.
52. Zhao Y, Vanhoutte PM and Leung SW. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *Journal of pharmacological sciences.* 2015;129:83-94.
53. Yuan XJ, Tod ML, Rubin LJ and Blaustein MP. NO hyperpolarizes pulmonary artery smooth muscle cells and decreases the intracellular Ca²⁺ concentration by activating voltage-gated K⁺ channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1996;93:10489-94.
54. Hellsten Y, Nyberg M, Jensen LG and Mortensen SP. Vasodilator interactions in skeletal muscle blood flow regulation. *The Journal of physiology.* 2012;590:6297-6305.
55. Scotland RS, Madhani M, Chauhan S, Moncada S, Andresen J, Nilsson H, Hobbs AJ and Ahluwalia A. Investigation of vascular responses in endothelial nitric oxide

- synthase/cyclooxygenase-1 double-knockout mice: key role for endothelium-derived hyperpolarizing factor in the regulation of blood pressure in vivo. *Circulation*. 2005;111:796-803.
56. Wang R. Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2002;16:1792-8.
57. Luksha L, Agewall S and Kublickiene K. Endothelium-derived hyperpolarizing factor in vascular physiology and cardiovascular disease. *Atherosclerosis*. 2009;202:330-344.
58. Goto K, Ohtsubo T and Kitazono T. Endothelium-dependent hyperpolarization (EDH) in hypertension: The role of endothelial ion channels. *International journal of molecular sciences*. 2018;19:315.
59. Félétou M. Endothelium-dependent hyperpolarization and endothelial dysfunction. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2016;67:373-387.
60. Michel T and Vanhoutte PM. Cellular signaling and NO production. *Pflügers archiv-European journal of physiology*. 2010;459:807-816.
61. Félétou M and Vanhoutte PM. Endothelium-derived hyperpolarizing factor. *where are we now? Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26:1215-1225.
62. Khazaei M, Moien-Afshari F and Laher I. Vascular endothelial function in health and diseases. *Pathophysiology*. 2008;15:49-67.
63. Fleming I. The factor in EDHF: Cytochrome P450 derived lipid mediators and vascular signaling. *Vascular pharmacology*. 2016;86:31-40.
64. Hansen PB and Schnermann J. Vasoconstrictor and vasodilator effects of adenosine in the kidney. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 2003;285:F590-F599.
65. Ralevic V and Dunn WR. Purinergic transmission in blood vessels. *Autonomic Neuroscience*. 2015;191:48-66.
66. de Lera Ruiz M, Lim Y-H and Zheng JJJomc. Adenosine A_{2A} receptor as a drug discovery target. *Journal of medicinal chemistry*. 2013;57:3623-3650.
67. Hansen PB, Hashimoto S, Oppermann M, Huang Y, Briggs JP and Schnermann J. Vasoconstrictor and vasodilator effects of adenosine in the mouse kidney due to preferential activation of A₁ or A₂ adenosine receptors. *Journal of Pharmacology Experimental Therapeutics* 2005;315:1150-1157.
68. Unic A, Derek L, Hodak N, Marijancevic D, Ceprnja M, Serdar T, Krhac M and Romic Z. Endothelins-clinical perspectives. *Biochemia medica: Biochemia medica*. 2011;21:231-242.
69. Wang Y and Zhao S. Vasoactivators and placental vasoactivity. *Vascular Biology of the Placenta (Eds: DN Granger, J Granger), Morgan & Claypool Life Sciences, San Rafael, CA*. 2010:100.
70. Barton M. The discovery of endothelium-dependent contraction: the legacy of Paul M. Vanhoutte. *Pharmacological research*. 2011;63:455-462.
71. Davenport AP, Hyndman KA, Dhaun N, Southan C, Kohan DE, Pollock JS, Pollock DM, Webb DJ and Maguire JJ. Endothelin. *Pharmacological reviews*. 2016;68:357-418.
72. Bauer J, Ripperger A, Frantz S, Ergün S, Schwedhelm E and Benndorf RA. Pathophysiology of isoprostanes in the cardiovascular system: implications of isoprostane-mediated thromboxane A₂ receptor activation. *British journal of pharmacology*. 2014;171:3115-3131.
73. Korbecki J, Baranowska-Bosiacka I, Gutowska I and Chlubek D. Cyclooxygenase pathways. *Acta Biochimica Polonica*. 2014;61.

74. Sellers MM and Stallone JN. Sympathy for the devil: the role of thromboxane in the regulation of vascular tone and blood pressure. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2008;294:H1978-H1986.
75. Gao Y, Yokota R, Tang S, Ashton AW and Ware JA. Reversal of angiogenesis in vitro, induction of apoptosis, and inhibition of AKT phosphorylation in endothelial cells by thromboxane A(2). *Circ Res*. 2000;87:739-45.
76. Wu C-C, Gupta T, Garcia V, Ding Y and Schwartzman ML. 20-HETE and blood pressure regulation: clinical implications. *Cardiology in review*. 2014;22:1.
77. Zou AP, Fleming JT, Falck JR, Jacobs ER, Gebremedhin D, Harder DR and Roman RJ. 20-HETE is an endogenous inhibitor of the large-conductance Ca(2+)-activated K⁺ channel in renal arterioles. *The American journal of physiology*. 1996;270:R228-37.
78. Ma YH, Gebremedhin D, Schwartzman ML, Falck JR, Clark JE, Masters BS, Harder DR and Roman RJ. 20-Hydroxyecosatetraenoic acid is an endogenous vasoconstrictor of canine renal arcuate arteries. *Circ Res*. 1993;72:126-36.
79. Lassegue B, San Martin A and Griendling KK. Biochemistry, physiology, and pathophysiology of NADPH oxidases in the cardiovascular system. *Circ Res*. 2012;110:1364-90.
80. Montezano AC and Touyz RM. Reactive oxygen species, vascular Noxs, and hypertension: focus on translational and clinical research. *Antioxidants & redox signaling*. 2014;20:164-82.
81. Bedard K and Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*. 2007;87:245-313.
82. Pandey D, Patel A, Patel V, Chen F, Qian J, Wang Y, Barman SA, Venema RC, Stepp DW, Rudic RD and Fulton DJ. Expression and functional significance of NADPH oxidase 5 (Nox5) and its splice variants in human blood vessels. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2012;302:H1919-28.
83. Groemping Y and Rittinger K. Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. *The Biochemical journal*. 2005;386:401-16.
84. Jiang F, Zhang Y and Dusting GJ. NADPH oxidase-mediated redox signaling: roles in cellular stress response, stress tolerance, and tissue repair. *Pharmacol Rev*. 2011;63:218-42.
85. Keller M, Lidington D, Vogel L, Peter BF, Sohn HY, Pagano PJ, Pitson S, Spiegel S, Pohl U and Bolz SS. Sphingosine kinase functionally links elevated transmural pressure and increased reactive oxygen species formation in resistance arteries. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2006;20:702-4.
86. Keller M, Lidington D, Vogel L, Peter BF, Sohn H-Y, Pagano PJ, Pitson S, Spiegel S, Pohl U and Bolz S-S. Sphingosine kinase functionally links elevated transmural pressure and increased reactive oxygen species formation in resistance arteries. *The FASEB journal*. 2006;20:702-704.
87. Tykocki NR, Boerman EM and Jackson WF. Smooth muscle ion channels and regulation of vascular tone in resistance arteries and arterioles. *Comprehensive Physiology*. 2011;7:485-581.
88. Collins JA, Munoz JV, Patel TR, Loukas M and Tubbs RS. The anatomy of the aging aorta. *Clinical Anatomy*. 2014;27:463-466.
89. Donato AJ, Gano LB, Eskurza I, Silver AE, Gates PE, Jablonski K and Seals DR. Vascular endothelial dysfunction with aging: endothelin-1 and endothelial nitric oxide synthase. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2009;297:H425-H432.
90. Galis ZS and Lakatta EG. Increased expression of matrix metalloproteinase-2 in the thickened intima of aged rats. *Hypertension*. 1999.

91. Asai K, Kudej RK, Shen Y-T, Yang G-P, Takagi G, Kudej AB, Geng Y-J, Sato N, Nazareno JB and Vatner DE. Peripheral vascular endothelial dysfunction and apoptosis in old monkeys. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2000;20:1493-1499.
92. Lakatta EG. Altered regulation of matrix metalloproteinase-2 in aortic remodeling during aging. *Hypertension*. 2002.
93. Ziemann SJ, Melenovsky V and Kass DA. Mechanisms, pathophysiology, and therapy of arterial stiffness. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2005;25:932-943.
94. Kim K. Calcification of matrix vesicles in human aortic valve and aortic media. *Federation proceedings*. 1976;35:156-162.
95. Li Z, Froehlich J, Galis ZS and Lakatta EG. Increased expression of matrix metalloproteinase-2 in the thickened intima of aged rats. *Hypertension*. 1999;33:116-123.
96. Wang M, Takagi G, Asai K, Resuello RG, Natividad FF, Vatner DE, Vatner SF and Lakatta EG. Aging increases aortic MMP-2 activity and angiotensin II in nonhuman primates. *Hypertension*. 2003;41:1308-1316.
97. Lakatta EG and Levy D. Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part I: aging arteries: a “set up” for vascular disease. *Circulation*. 2003;107:139-146.
98. Virmani R, Avolio A, Mergner W, Robinowitz M, Herderick E, Cornhill J, Guo S, Liu T, Ou D and O'Rourke M. Effect of aging on aortic morphology in populations with high and low prevalence of hypertension and atherosclerosis. Comparison between occidental and Chinese communities. *The American journal of pathology*. 1991;139:1119.
99. Watanabe M, Sawai T, Nagura H and Suyama K. Age-related alteration of cross-linking amino acids of elastin in human aorta. *The Tohoku journal of experimental medicine*. 1996;180:115-130.
100. Cattell MA, Anderson JC and Hasleton PS. Age-related changes in amounts and concentrations of collagen and elastin in normotensive human thoracic aorta. *Clinica Chimica Acta*. 1996;245:73-84.
101. Thijssen DH, Carter SE and Green DJ. Arterial structure and function in vascular ageing: are you as old as your arteries? *The Journal of physiology*. 2016;594:2275-2284.
102. Bailey AJ. Molecular mechanisms of ageing in connective tissues. *Mechanisms of ageing and development*. 2001;122:735-755.
103. Konova E, Baydanoff S, Atanasova M and Velkova A. Age-related changes in the glycation of human aortic elastin. *Experimental gerontology*. 2004;39:249-254.
104. Jiang L, Zhang J, Monticone RE, Telljohann R, Wu J, Wang M and Lakatta EG. Calpain-1 regulation of matrix metalloproteinase 2 activity in vascular smooth muscle cells facilitates age-associated aortic wall calcification and fibrosis. *Hypertension*. 2012:HYPERENSIONAHA.112.196840.
105. Demer LL and Tintut Y. Vascular calcification: pathobiology of a multifaceted disease. *Circulation*. 2008;117:2938-48.
106. Demer LL. Vascular calcification and osteoporosis: inflammatory responses to oxidized lipids. *International Journal of Epidemiology*. 2002;31:737-741.
107. van Popele NM, Grobbee DE, Bots ML, Asmar R, Topouchian J, Reneman RS, Hoeks AP, van der Kuip DA, Hofman A and Witteman JC. Association between arterial stiffness and atherosclerosis: the Rotterdam Study. *Stroke*. 2001;32:454-460.
108. Niederhoffer N, Lartaud-Idjouadiene I, Giummelly P, Duvivier C, Peslin R and Atkinson J. Calcification of medial elastic fibers and aortic elasticity. *Hypertension*. 1997;29:999-1006.

109. Aikawa E, Aikawa M, Libby P, Figueiredo JL, Rusanescu G, Iwamoto Y, Fukuda D, Kohler RH, Shi GP, Jaffer FA and Weissleder R. Arterial and aortic valve calcification abolished by elastolytic cathepsin S deficiency in chronic renal disease. *Circulation*. 2009;119:1785-94.
110. Hosaka N, Mizobuchi M, Ogata H, Kumata C, Kondo F, Koiwa F, Kinugasa E and Akizawa T. Elastin degradation accelerates phosphate-induced mineralization of vascular smooth muscle cells. *Calcified tissue international*. 2009;85:523-9.
111. Reynolds JL, Joannides AJ, Skepper JN, McNair R, Schurgers LJ, Proudfoot D, Jahnen-Dechent W, Weissberg PL and Shanahan CM. Human vascular smooth muscle cells undergo vesicle-mediated calcification in response to changes in extracellular calcium and phosphate concentrations: a potential mechanism for accelerated vascular calcification in ESRD. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2004;15:2857-2867.
112. Farzaneh-Far A, Proudfoot D, Weissberg PL and Shanahan CM. Matrix gla protein is regulated by a mechanism functionally related to the calcium-sensing receptor. *Biochemical and biophysical research communications*. 2000;277:736-740.
113. Alam M-u, Kirton JP, Wilkinson FL, Towers E, Sinha S, Rouhi M, Vizard TN, Sage AP, Martin D and Ward DT. Calcification is associated with loss of functional calcium-sensing receptor in vascular smooth muscle cells. *Cardiovascular research*. 2008;81:260-268.
114. Rosito GA, Massaro JM, Hoffmann U, Ruberg FL, Mahabadi AA, Vasani RS, O'donnell CJ and Fox CS. Pericardial fat, visceral abdominal fat, cardiovascular disease risk factors, and vascular calcification in a community-based sample: the Framingham Heart Study. *Circulation*. 2008;117:605-613.
115. McCarty MF and DiNicolantonio JJ. The molecular biology and pathophysiology of vascular calcification. *Postgraduate medicine*. 2014;126:54-64.
116. Shanahan CM. Mechanisms of vascular calcification in CKD—evidence for premature ageing? *Nature Reviews Nephrology*. 2013;9:661.
117. El Assar M, Angulo J and Rodriguez-Manas L. Oxidative stress and vascular inflammation in aging. *Free radical biology & medicine*. 2013;65:380-401.
118. Barrows IR, Ramezani A and Raj DS. Inflammation, Immunity, and Oxidative Stress in Hypertension—Partners in Crime? *Advances in chronic kidney disease*. 2019;26:122-130.
119. Aikawa E, Nahrendorf M, Figueiredo JL, Swirski FK, Shtatland T, Kohler RH, Jaffer FA, Aikawa M and Weissleder R. Osteogenesis associates with inflammation in early-stage atherosclerosis evaluated by molecular imaging in vivo. *Circulation*. 2007;116:2841-50.
120. Abdelbaky A, Corsini E, Figueroa AL, Fontanez S, Subramanian S, Ferencik M, Brady TJ, Hoffmann U and Tawakol A. Focal arterial inflammation precedes subsequent calcification in the same location: a longitudinal FDG-PET/CT study. *Circulation Cardiovascular imaging*. 2013;6:747-54.
121. Sun Z. Aging, arterial stiffness, and hypertension. *Hypertension*. 2015;65:252-256.
122. Paneni F, Costantino S and Cosentino F. Molecular pathways of arterial aging. *Clinical science*. 2015;128:69-79.
123. Nilsson PM, Olsen MH and Laurent S. *Early vascular aging (EVA): new directions in cardiovascular protection*: Academic Press; 2015.
124. de Faria AP, Ritter AMV, Sabbatini AR, Corrêa NB, Brunelli V, Modolo R and Moreno H. Dereglulation of soluble adhesion molecules in resistant hypertension and its role in cardiovascular remodeling. *Circulation Journal*. 2016;80:1196-1201.
125. Park S and Lakatta EG. Role of inflammation in the pathogenesis of arterial stiffness. *Yonsei medical journal*. 2012;53:258-261.

126. Ayhan H, Kasapkara HA, Aslan AN, Durmaz T, Keleş T, Akçay M, Bayram NA, Baştuğ S, Bilen E and Sari C. Relationship of neutrophil-to-lymphocyte ratio with aortic stiffness in type 1 diabetes mellitus. *Canadian journal of diabetes*. 2015;39:317-321.
127. Rutsch F, Nitschke Y and Terkeltaub R. Genetics in arterial calcification: pieces of a puzzle and cogs in a wheel. *Circulation research*. 2011;109:578-592.
128. Bachschmid MM, Schildknecht S, Matsui R, Zee R, Haeussler D, A. Cohen R, Pimental D and Loo Bvd. Vascular aging: chronic oxidative stress and impairment of redox signaling—consequences for vascular homeostasis and disease. *Annals of medicine*. 2013;45:17-36.
129. Seals DR, Jablonski KL and Donato AJ. Aging and vascular endothelial function in humans. *Clinical science*. 2011;120:357-375.
130. Campia U, Tesauro M, Di Daniele N and Cardillo C. The vascular endothelin system in obesity and type 2 diabetes: pathophysiology and therapeutic implications. *Life sciences*. 2014;118:149-155.
131. Schinzari F, Iantorno M, Campia U, Mores N, Rovella V, Tesauro M, Di Daniele N and Cardillo C. Vasodilator responses and endothelin-dependent vasoconstriction in metabolically healthy obesity and the metabolic syndrome. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2015;309:E787-E792.
132. Hayoz D and Mazzolai L. Endothelial function, mechanical stress and atherosclerosis *Atherosclerosis, Large Arteries and Cardiovascular Risk*: Karger Publishers; 2007(44): 62-75.
133. del Campo L, Hamczyk MR, Andrés V, Martínez-González J and Rodríguez C. Mechanisms of vascular aging: What can we learn from Hutchinson-Gilford progeria syndrome? *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis (English Edition)*. 2018;30:120-132.
134. Bonetti PO, Lerman LO and Lerman A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2003;23:168-175.
135. Widlansky ME, Gokce N, Keaney JF and Vita JA. The clinical implications of endothelial dysfunction. *Journal of the American College of Cardiology*. 2003;42:1149-1160.
136. Cai H and Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circulation research*. 2000;87:840-844.
137. Nilsson PM, Boutouyrie P, Cunha P, Kotsis V, Narkiewicz K, Parati G, Rietzschel E, Scuteri A and Laurent S. Early vascular ageing in translation: from laboratory investigations to clinical applications in cardiovascular prevention. *Journal of hypertension*. 2013;31:1517-1526.
138. Mozos I and Luca CT. Crosstalk between oxidative and nitrosative stress and arterial stiffness. *Current vascular pharmacology*. 2017;15:446-456.
139. Sindler AL, Delp MD, Reyes R, Wu G and Muller-Delp JM. Effects of ageing and exercise training on eNOS uncoupling in skeletal muscle resistance arterioles. *The Journal of physiology*. 2009;587:3885-3897.
140. Donato AJ, Morgan RG, Walker AE and Lesniewski LA. Cellular and molecular biology of aging endothelial cells. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2015;89:122-135.
141. Sankaralingam S, Xu H and Davidge ST. Arginase contributes to endothelial cell oxidative stress in response to plasma from women with preeclampsia. *Cardiovascular research*. 2009;85:194-203.
142. Nguyen MC, Park JT, Jeon YG, Jeon BH, Hoe KL, Kim YM, Lim HK and Ryoo S. Arginase inhibition restores peroxynitrite-induced endothelial dysfunction via L-arginine-dependent endothelial nitric oxide synthase phosphorylation. *Yonsei medical journal*. 2016;57:1329-1338.

143. Liu L, Yan Y, Zeng M, Zhang J, Hanes MA, Ahearn G, McMahon TJ, Dickfeld T, Marshall HE and Que LG. Essential roles of S-nitrosothiols in vascular homeostasis and endotoxic shock. *Cell*. 2004;116:617-628.
144. Quijano C, Castro L, Peluffo G, Valez V and Radi R. Enhanced mitochondrial superoxide in hyperglycemic endothelial cells: direct measurements and formation of hydrogen peroxide and peroxynitrite. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2007;293:H3404-H3414.
145. Schiffrin EL and Touyz RM. Vascular biology of endothelin. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 1998;32:S2-13.
146. Dimmeler S, Rippmann V, Weiland U, Haendeler J and Zeiher AM. Angiotensin II induces apoptosis of human endothelial cells: protective effect of nitric oxide. *Circulation research*. 1997;81:970-976.
147. Liu H, Li J, Zhao F, Wang H, Qu Y and Mu D. Nitric oxide synthase in hypoxic or ischemic brain injury. *Reviews in the neurosciences*. 2015;26:105-17.
148. Bolanos JP and Almeida A. Roles of nitric oxide in brain hypoxia-ischemia. *Biochimica et biophysica acta*. 1999;1411:415-36.
149. Coutinho JM, Derkatch S, Potvin AR, Tomlinson G, Casaubon LK, Silver FL and Mandell DM. Carotid artery web and ischemic stroke: A case-control study. *Neurology*. 2017;88:65-69.
150. Baradaran H, Al-Dasuqi K, Knight-Greenfield A, Giambone A, Delgado D, Ebani EJ, Kamel H and Gupta A. Association between Carotid Plaque Features on CTA and Cerebrovascular Ischemia: A Systematic Review and Meta-Analysis. *AJNR American journal of neuroradiology*. 2017;38:2321-2326.
151. Rothwell PM. Carotid artery disease and the risk of ischaemic stroke and coronary vascular events. *Cerebrovascular diseases (Basel, Switzerland)*. 2000;10 Suppl 5:21-33.
152. Stewart AD, Millasseau SC, Kearney MT, Ritter JM and Chowienczyk PJ. Effects of inhibition of basal nitric oxide synthesis on carotid-femoral pulse wave velocity and augmentation index in humans. *Hypertension*. 2003;42:915-918.
153. Luft FC. Molecular mechanisms of arterial stiffness: new insights. *Journal of the American Society of Hypertension : JASH*. 2012;6:436-8.
154. Faconti L, Nanino E, Mills CE and Cruickshank KJ. Do arterial stiffness and wave reflection underlie cardiovascular risk in ethnic minorities? *JRSM cardiovascular disease*. 2016;5:2048004016661679.
155. Laurent S, Cockcroft J, Van Bortel L, Boutouyrie P, Giannattasio C, Hayoz D, Pannier B, Vlachopoulos C, Wilkinson I and Struijker-Boudier H. Expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues and clinical applications. *European heart journal*. 2006;27:2588-2605.
156. Tomiyama H and Yamashina A. Non-invasive vascular function tests. *Circulation Journal*. 2010;74:24-33.
157. Ikonomidis I, Makavos G and Lekakis J. Arterial stiffness and coronary artery disease. *Current opinion in cardiology*. 2015;30:422-31.
158. Blacher J, Asmar R, Djane S, London GM and Safar ME. Aortic pulse wave velocity as a marker of cardiovascular risk in hypertensive patients. *Hypertension*. 1999;33:1111-1117.
159. Nemcsik J, Cseprekal O and Tisler A. Measurement of Arterial Stiffness: A Novel Tool of Risk Stratification in Hypertension. *Advances in experimental medicine and biology*. 2017;956:475-488.

160. Sun C-K. Cardio-ankle vascular index (CAVI) as an indicator of arterial stiffness. *Integrated blood pressure control*. 2013;6:27.
161. Muiesan ML, Pasini G, Salvetti M, Calebich S, Zulli R, Castellano M, Rizzoni D, Bettoni G, Cinelli A and Porteri E. Cardiac and vascular structural changes. Prevalence and relation to ambulatory blood pressure in a middle-aged general population in northern Italy: the Vobarno Study. *Hypertension (Dallas, Tex: 1979)*. 1996;27:1046-1052.
162. Lee H-Y and Oh B-H. Aging and arterial stiffness. *Circulation Journal*. 2010;74:2257-2262.
163. Agabiti-Rosei E and Muiesan ML. Carotid atherosclerosis, arterial stiffness and stroke events. *Advances in cardiology*. 2007;44:173-86.
164. Laurent S, Caviezel B, Beck L, Girerd X, Billaud E, Boutouyrie P, Hoeks A and Safar M. Carotid artery distensibility and distending pressure in hypertensive humans. *Hypertension*. 1994;23:878-83.
165. Nichols W and O'Rourke M. Aging, high blood pressure and disease in humans. *McDonald's blood flow in arteries: theoretical, experimental and clinical principles 3rd ed London/Melbourne/Auckland: Lea and Febiger*. 1990:398-420.
166. Nichols WW. Clinical measurement of arterial stiffness obtained from noninvasive pressure waveforms. *American journal of hypertension*. 2005;18:3S-10S.
167. Shirai K, Utino J, Otsuka K and Takata M. A novel blood pressure-independent arterial wall stiffness parameter; cardio-ankle vascular index (CAVI). *Journal of atherosclerosis and thrombosis*. 2006;13:101-7.
168. Yambe T, Yoshizawa M, Saijo Y, Yamaguchi T, Shibata M, Konno S, Nitta S and Kuwayama T. Brachio-ankle pulse wave velocity and cardio-ankle vascular index (CAVI). *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2004;58 Suppl 1:S95-8.
169. Shirai K, Hiruta N, Song M, Kurosu T, Suzuki J, Tomaru T, Miyashita Y, Saiki A, Takahashi M and Suzuki K. Cardio-ankle vascular index (CAVI) as a novel indicator of arterial stiffness: theory, evidence and perspectives. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*. 2011;18:924-938.
170. Simon A, Garipey J, Chironi G, Megnien J-L and Levenson J. Intima-media thickness: a new tool for diagnosis and treatment of cardiovascular risk. *Journal of hypertension*. 2002;20:159-169.
171. Mancini GJ, Dahlöf B and Diez J. Surrogate markers for cardiovascular disease: structural markers. *Circulation: Journal of the American Heart Association*. 2004;109:IV-22-IV-30.
172. Oliver JJ and Webb DJ. Noninvasive assessment of arterial stiffness and risk of atherosclerotic events. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2003.
173. Laurent S. Arterial stiffness: intermediate or surrogate endpoint for cardiovascular events? *European Heart Journal* 2005.
174. Gulbenkian S, Uddman R and Edvinsson L. Neuronal messengers in the human cerebral circulation. *Peptides*. 2001;22:995-1007.
175. Cipolla MJ. The cerebral circulation. *Integrated systems physiology: From molecule to function*. 2009;1:1-59.
176. Edvinsson L. General and comparative anatomy of the cerebral circulation. *Cerebral blood flow and metabolism*. 2002.
177. Van Lieshout JJ, Wieling W, Karemaker JM and Secher NH. Syncope, cerebral perfusion, and oxygenation. *Journal of Applied Physiology*. 2003;94:833-848.

178. Sander D, Winbeck K, Klingelhöfer J and Conrad B. Extent of cerebral white matter lesions is related to changes of circadian blood pressure rhythmicity. *Archives of neurology*. 2000;57:1302-1307.
179. Heistad DD and Kontos HA. Cerebral circulation. *Am Physiol Soc Bethesda*. 1983;3:137-182.
180. Iadecola C. Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *Nature Reviews Neuroscience*. 2004;5:347.
181. Tasker RC. Brain vascular and hydrodynamic physiology. *Seminars in pediatric surgery*. 2013;22:168-173.
182. Paulson O, Strandgaard S and Edvinsson L. Cerebral autoregulation. *Cerebrovascular and brain metabolism reviews*. 1990;2:161-192.
183. Phillips AA, Chan FH, Zheng MMZ, Krassioukov AV and Ainslie PN. Neurovascular coupling in humans: physiology, methodological advances and clinical implications. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2016;36:647-664.
184. Armstead WM and Raghupathi R. Endothelin and the neurovascular unit in pediatric traumatic brain injury. *Neurological research*. 2011;33:127-132.
185. Muoio V, Persson P and Sendeski M. The neurovascular unit—concept review. *Acta physiologica*. 2014;210:790-798.
186. Yamagata K, Andreasson KI, Kaufmann WE, Barnes CA and Worley PF. Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids. *Neuron*. 1993;11:371-86.
187. Niwa K, Araki E, Morham SG, Ross ME and Iadecola C. Cyclooxygenase-2 contributes to functional hyperemia in whisker-barrel cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2000;20:763-70.
188. Lacroix A, Toussay X, Anenberg E, Lecrux C, Ferreiros N, Karagiannis A, Plaisier F, Chausson P, Jarlier F, Burgess SA, Hillman EM, Tegeder I, Murphy TH, Hamel E and Cauli B. COX-2-Derived Prostaglandin E2 Produced by Pyramidal Neurons Contributes to Neurovascular Coupling in the Rodent Cerebral Cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2015;35:11791-810.
189. Kisler K, Nelson AR, Montagne A and Zlokovic BV. Cerebral blood flow regulation and neurovascular dysfunction in Alzheimer disease. *Nature Reviews Neuroscience*. 2017;18:419.
190. Tarantini S, Tran CHT, Gordon GR, Ungvari Z and Csiszar A. Impaired neurovascular coupling in aging and Alzheimer's disease: Contribution of astrocyte dysfunction and endothelial impairment to cognitive decline. *Exp Gerontol*. 2017;94:52-58.
191. Garwood CJ, Ratcliffe LE, Simpson JE, Heath PR, Ince PG and Wharton SB. Review: Astrocytes in Alzheimer's disease and other age-associated dementias: a supporting player with a central role. *Neuropathology and applied neurobiology*. 2017;43:281-298.
192. Filosa JA, Bonev AD, Straub SV, Meredith AL, Wilkerson MK, Aldrich RW and Nelson MT. Local potassium signaling couples neuronal activity to vasodilation in the brain. *Nature neuroscience*. 2006;9:1397.
193. Mishra A, Reynolds JP, Chen Y, Gourine AV, Rusakov DA and Attwell D. Astrocytes mediate neurovascular signaling to capillary pericytes but not to arterioles. *Nature neuroscience*. 2016;19:1619.
194. Longden TA, Dabertrand F, Koide M, Gonzales AL, Tykocki NR, Brayden JE, Hill-Eubanks D and Nelson MT. Capillary K⁺-sensing initiates retrograde hyperpolarization to increase local cerebral blood flow. *Nature neuroscience*. 2017;20:717.

195. Chan BS, Endo S, Kanai N and Schuster VL. Identification of lactate as a driving force for prostanoid transport by prostaglandin transporter PGT. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2002;282:F1097-F1102.
196. Gordon GR, Choi HB, Rungta RL, Ellis-Davies GC and MacVicar BA. Brain metabolism dictates the polarity of astrocyte control over arterioles. *Nature*. 2008;456:745.
197. Girouard H, Bonev AD, Hannah RM, Meredith A, Aldrich RW and Nelson MT. Astrocytic endfoot Ca²⁺ and BK channels determine both arteriolar dilation and constriction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010;107:3811-3816.
198. Quelhas P, Baltazar G and Cairrao E. The Neurovascular Unit: Focus on the Regulation of Arterial Smooth Muscle Cells. *Current neurovascular research*. 2019.
199. Ko KR, Ngai A and Winn HR. Role of adenosine in regulation of regional cerebral blood flow in sensory cortex. *American Journal of Physiology-Heart Circulatory Physiology* 1990;259:H1703-H1708.
200. Liu X, Li C, Gebremedhin D, Hwang SH, Hammock BD, Falck JR, Roman RJ, Harder DR and Koehler RC. Epoxyeicosatrienoic acid-dependent cerebral vasodilation evoked by metabotropic glutamate receptor activation in vivo. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2011;301:H373-81.
201. Andresen J, Shafi NI and Bryan RM, Jr. Endothelial influences on cerebrovascular tone. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985)*. 2006;100:318-27.
202. Peppiatt CM, Howarth C, Mobbs P and Attwell D. Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes. *Nature*. 2006;443:700.
203. Hill RA, Tong L, Yuan P, Murikinati S, Gupta S and Grutzendler J. Regional blood flow in the normal and ischemic brain is controlled by arteriolar smooth muscle cell contractility and not by capillary pericytes. *Neuron*. 2015;87:95-110.
204. Attwell D, Mishra A, Hall CN, O'Farrell FM, Dalkara TJJ, CBF and Metabolism. What is a pericyte? *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2016;36:451-455.
205. Krueger M and Bechmann I. CNS pericytes: concepts, misconceptions, and a way out. *Glia*. 2010;58:1-10.
206. Safar ME, Nilsson PM, Blacher J and Mimran A. Pulse pressure, arterial stiffness, and end-organ damage. *Current hypertension reports*. 2012;14:339-344.
207. Sadekova N, Vallerand D, Guevara E, Lesage F and Girouard H. Carotid calcification in mice: a new model to study the effects of arterial stiffness on the brain. *Journal of the American Heart Association: Cardiovascular and Cerebrovascular Disease*. 2013;2.
208. Mitchell GF. Effects of central arterial aging on the structure and function of the peripheral vasculature: implications for end-organ damage. *Journal of applied physiology*. 2008;105:1652-1660.
209. O'rourke MF and Safar ME. Relationship between aortic stiffening and microvascular disease in brain and kidney: cause and logic of therapy. *Hypertension*. 2005;46:200-204.
210. Tzourio C, Laurent S and Debette S. Is hypertension associated with an accelerated aging of the brain? *Hypertension*. 2014;63:894-903.
211. Gates PE, Strain WD and Shore AC. Human endothelial function and microvascular ageing. *Experimental physiology*. 2009;94:311-316.
212. Wardlaw JM, Smith EE, Biessels GJ, Cordonnier C, Fazekas F, Frayne R, Lindley RI, T O'Brien J, Barkhof F and Benavente OR. Neuroimaging standards for research into small vessel disease and its contribution to ageing and neurodegeneration. *The Lancet Neurology*. 2013;12:822-838.

213. Mitchell GF, van Buchem MA, Sigurdsson S, Gotal JD, Jonsdottir MK, Kjartansson O, Garcia M, Aspelund T, Harris TB, Gudnason V and Launer LJ. Arterial stiffness, pressure and flow pulsatility and brain structure and function: the Age, Gene/Environment Susceptibility--Reykjavik study. *Brain : a journal of neurology*. 2011;134:3398-407.
214. Singer J, Trollor JN, Baune BT, Sachdev PS and Smith E. Arterial stiffness, the brain and cognition: a systematic review. *Ageing research reviews*. 2014;15:16-27.
215. Dichgans M, Wardlaw J, Smith E, Zietemann V, Seshadri S, Sachdev P, Biessels GJ, Fazekas F, Benavente O and Pantoni L. METACOHORTS for the study of vascular disease and its contribution to cognitive decline and neurodegeneration: An initiative of the Joint Programme for Neurodegenerative Disease Research. *Alzheimer's & Dementia*. 2016;12:1235-1249.
216. Pantoni L. Cerebral small vessel disease: from pathogenesis and clinical characteristics to therapeutic challenges. *The Lancet Neurology*. 2010;9:689-701.
217. van Sloten TT, Protogerou AD, Henry RM, Schram MT, Launer LJ and Stehouwer CD. Association between arterial stiffness, cerebral small vessel disease and cognitive impairment: a systematic review and meta-analysis. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2015;53:121-130.
218. Safar M and O'Rourke MF. *Arterial stiffness in hypertension*: Elsevier Health Sciences; 2006.
219. Park L, Anrather J, Girouard H, Zhou P and Iadecola C. Nox2-derived reactive oxygen species mediate neurovascular dysregulation in the aging mouse brain. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2007;27:1908-1918.
220. Modrick ML, Didion SP, Sigmund CD and Faraci FM. Role of oxidative stress and AT1 receptors in cerebral vascular dysfunction with aging. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2009;296:H1914-H1919.
221. Mayhan WG, Arrick DM, Sharpe GM and Sun H. Age-related alterations in reactivity of cerebral arterioles: role of oxidative stress. *Microcirculation*. 2008;15:225-236.
222. Brown WR and Thore CR. Cerebral microvascular pathology in ageing and neurodegeneration. *Neuropathology and applied neurobiology*. 2011;37:56-74.
223. Mosconi L, Mistur R, Switalski R, Tsui WH, Glodzik L, Li Y, Pirraglia E, De Santi S, Reisberg B and Wisniewski T. FDG-PET changes in brain glucose metabolism from normal cognition to pathologically verified Alzheimer's disease. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*. 2009;36:811-822.
224. Yang Y and Rosenberg GA. Blood-brain barrier breakdown in acute and chronic cerebrovascular disease. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2011;42:3323.
225. Saji N, Kimura K, Kawarai T, Shimizu H and Kita Y. Arterial stiffness and progressive neurological deficit in patients with acute deep subcortical infarction. *Stroke*. 2012;43:3088-90.
226. Sugioka K, Hozumi T, Sciacca RR, Miyake Y, Titova I, Gaspard G, Sacco RL, Homma S and Di Tullio MR. Impact of aortic stiffness on ischemic stroke in elderly patients. *Stroke*. 2002;33:2077-2081.
227. Saeed S, Waje-Andreassen U, Fromm A, Øyegarden H, Kokorina MV, Naess H and Gerds E. Early vascular aging in young and middle-aged ischemic stroke patients: the Norwegian Stroke in the Young Study. *PloS one*. 2014;9:e112814.
228. Tsai W-C, Sun Y-T, Liu Y-W, Ho C-S, Chen J-Y, Wang M-C and Tsai L-M. Usefulness of vascular wall deformation for assessment of carotid arterial stiffness and association with previous stroke in elderly. *American journal of hypertension*. 2013;26:770-777.

229. Mattace-Raso FU, van der Cammen TJ, Hofman A, van Popele NM, Bos ML, Schalekamp MA, Asmar R, Reneman RS, Hoeks AP and Breteler MM. Arterial stiffness and risk of coronary heart disease and stroke: the Rotterdam Study. *Circulation*. 2006;113:657-663.
230. Gąsecki D, Rojek A, Kwarciany M, Kubach M, Boutouyrie P, Nyka W, Laurent S and Narkiewicz K. Aortic stiffness predicts functional outcome in patients after ischemic stroke. *Stroke*. 2011;STROKEAHA. 111.633487.
231. Vlachopoulos C, O'Rourke M and Nichols WW. *McDonald's blood flow in arteries: theoretical, experimental and clinical principles*: CRC press; 2011.
232. Laurent S, Boutouyrie P and Lacolley P. Structural and genetic bases of arterial stiffness. *Hypertension*. 2005;45:1050-1055.
233. Redheuil A, Yu W-C, Wu CO, Mousseaux E, de Cesare A, Yan R, Kachenoura N, Bluemke D and Lima JA. Reduced ascending aortic strain and distensibility earliest manifestations of vascular aging in humans. *Hypertension*. 2010;55:319.
234. Vlachopoulos C, Aznaouridis K and Stefanadis C. Prediction of cardiovascular events and all-cause mortality with arterial stiffness: a systematic review and meta-analysis. *Journal of the American College of Cardiology*. 2010;55:1318-1327.
235. Waldstein SR, Rice SC, Thayer JF, Najjar SS, Scuteri A and Zonderman AB. Pulse pressure and pulse wave velocity are related to cognitive decline in the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *Hypertension*. 2008;51:99-104.
236. Hajjar I, Goldstein FC, Martin GS and Quyyumi AA. Roles of arterial stiffness and blood pressure in hypertension-associated cognitive decline in healthy adults. *Hypertension*. 2016;67:171-175.
237. Hanon O, Haulon S, Lenoir H, Seux M-L, Rigaud A-S, Safar M, Girerd X and Forette F. Relationship between arterial stiffness and cognitive function in elderly subjects with complaints of memory loss. *Stroke*. 2005;36:2193-2197.
238. Palta P, Sharrett AR, Wei J, Meyer ML, Kucharska-Newton A, Power MC, Deal JA, Jack CR, Knopman D and Wright J. Central Arterial Stiffness Is Associated With Structural Brain Damage and Poorer Cognitive Performance: The ARIC Study. *Journal of the American Heart Association*. 2019;8:e011045.
239. Di Daniele N, Celotto R, Fegatelli DA, Gabriele M, Rovella V and Scuteri A. Common Carotid Artery Calcification Impacts on Cognitive Function in Older Patients. *High Blood Pressure & Cardiovascular Prevention*. 2019:1-8.
240. Tap L, van Opbroek A, Niessen WJ, Smits M and Mattace-Raso FU. Aortic stiffness and brain integrity in elderly patients with cognitive and functional complaints. *Clinical interventions in aging*. 2018;13:2161.
241. Cooper LL, Woodard T, Sigurdsson S, van Buchem MA, Torjesen AA, Inker LA, Aspelund T, Eiriksdottir G, Harris TB and Gudnason V. Cerebrovascular damage mediates relations between aortic stiffness and memory. *Hypertension*. 2016;67:176-182.
242. Wang Z, Wong A, Liu W, Yang J, Chu WC, Au L, Lau A, Xiong Y and Mok VC. Pulse pressure and cognitive decline in stroke patients with white matter changes. *The Journal of Clinical Hypertension*. 2015;17:694-698.
243. Rouch L, Cestac P, Sallerin B, Andrieu S, Bailly H, Beunardeau M, Cohen A, Dubail D, Hernandez I and Seux M-L. Pulse Wave Velocity Is Associated With Greater Risk of Dementia in Mild Cognitive Impairment Patients. *Hypertension*. 2018;72:1109-1116.
244. Pase MP, Himali JJ, Mitchell GF, Beiser A, Maillard P, Tsao C, Larson MG, DeCarli C, Vasani RS and Seshadri S. Association of aortic stiffness with cognition and brain aging in young

and middle-aged adults: the Framingham Third Generation Cohort Study. *Hypertension*. 2016;67:513-519.

245. Iulita MF, Noriega de la Colina A and Girouard H. Arterial stiffness, cognitive impairment and dementia: confounding factor or real risk? *Journal of neurochemistry*. 2018;144:527-548.

246. J Larner A. Mini-Mental Parkinson (MMP) as a dementia screening test: comparison with the Mini-Mental State Examination (MMSE). *Current aging science*. 2012;5:136-139.

247. Nasreddine ZS, Phillips NA, Bédirian V, Charbonneau S, Whitehead V, Collin I, Cummings JL and Chertkow H. The Montreal Cognitive Assessment, MoCA: a brief screening tool for mild cognitive impairment. *Journal of the American Geriatrics Society*. 2005;53:695-699.

248. Pendlebury ST, Mariz J, Bull L, Mehta Z and Rothwell PM. MoCA, ACE-R, and MMSE versus the National Institute of Neurological Disorders and Stroke–Canadian Stroke Network vascular cognitive impairment harmonization standards neuropsychological battery after tIA and stroke. *Stroke*. 2012;43:464-469.

249. Badji A, Sabra D, Bherer L, Cohen-Adad J, Girouard H and Gauthier CJ. Arterial Stiffness and Brain Integrity: A review of MRI findings. *Ageing research reviews*. 2019.

250. Wåhlin A, Ambarki K, Birgander R, Malm J and Eklund A. Intracranial pulsatility is associated with regional brain volume in elderly individuals. *Neurobiology of aging*. 2014;35:365-372.

251. Marshall RS and Lazar RM. Pumps, aqueducts, and drought management: vascular physiology in vascular cognitive impairment. *Stroke*. 2011;42:221-226.

252. Mitchell GF, van Buchem MA, Sigurdsson S, Gotal JD, Jonsdottir MK, Kjartansson O, Garcia M, Aspelund T, Harris TB and Gudnason V. 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.

253. Toth P, Tarantini S, Csiszar A and Ungvari Z. Functional vascular contributions to cognitive impairment and dementia: mechanisms and consequences of cerebral autoregulatory dysfunction, endothelial impairment, and neurovascular uncoupling in aging. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2017;312:H1-h20.

254. Iadecola C, Park L and Capone C. Threats to the mind: aging, amyloid, and hypertension. *Stroke*. 2009;40:S40-S44.

255. Nation DA, Sweeney MD, Montagne A, Sagare AP, D’Orazio LM, Pachicano M, Sepeshband F, Nelson AR, Buennagel DP and Harrington MG. Blood–brain barrier breakdown is an early biomarker of human cognitive dysfunction. *Nature medicine*. 2019;25:270.

256. Garcia-Polite F, Martorell J, Del Rey-Puech P, Melgar-Lesmes P, O’Brien CC, Roquer J, Ois A, Principe A, Edelman ER and Balcells M. Pulsatility and high shear stress deteriorate barrier phenotype in brain microvascular endothelium. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2017;37:2614-2625.

257. Thorin-Trescases N, de Montgolfier O, Pinçon A, Raignault A, Caland L, Labbé P and Thorin E. Impact of pulse pressure on cerebrovascular events leading to age-related cognitive decline. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2018;314:H1214-H1224.

258. Csipo T, Lipecz A, Fulop GA, Hand RA, Ngo B-TN, Dzialendzik M, Tarantini S, Balasubramanian P, Kiss T and Yabluchanska V. Age-related decline in peripheral vascular health predicts cognitive impairment. *GeroScience*. 2019:1-12.

259. Wardlaw J, Sandercock P, Dennis M and Starr J. Is breakdown of the blood-brain barrier responsible for lacunar stroke, leukoaraiosis, and dementia? *Stroke*. 2003;34:806-812.

260. Rabkin SW. Arterial stiffness: detection and consequences in cognitive impairment and dementia of the elderly. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2012;32:541-549.
261. Iulita MF and Girouard H. Treating hypertension to prevent cognitive decline and dementia: re-opening the debate *Hypertension: from basic research to clinical practice*: Springer; 2016: 447-473.
262. Tully PJ, Hanon O, Cosh S and Tzourio C. Diuretic antihypertensive drugs and incident dementia risk: a systematic review, meta-analysis and meta-regression of prospective studies. *Journal of hypertension*. 2016;34:1027-1035.
263. Kherada N, Heimowitz T and Rosendorff C. Antihypertensive therapies and cognitive function: a review. *Current hypertension reports*. 2015;17:79.
264. Yasar S, Xia J, Yao W, Furberg CD, Xue Q-L, Mercado CI, Fitzpatrick AL, Fried LP, Kawas CH and Sink KM. Antihypertensive drugs decrease risk of Alzheimer disease: Ginkgo Evaluation of Memory Study. *Neurology*. 2013;81:896-903.
265. Rouch L, Cestac P, Hanon O, Ruidavets J-B, Ehlinger V, Gentil C, Cool C, Helmer C, Dartigues J-F and Bouhanick B. Blood pressure and cognitive performances in middle-aged adults: the Aging, Health and Work longitudinal study. *Journal of hypertension*. 2019;37:1244-1253.
266. Peila R, White LR, Masaki K, Petrovitch H and Launer LJ. Reducing the risk of dementia: efficacy of long-term treatment of hypertension. *Stroke*. 2006;37:1165-1170.
267. Chen KH, Henderson VW, Stolwyk RJ, Dennerstein L and Szoek C. Prehypertension in midlife is associated with worse cognition a decade later in middle-aged and older women. *Age and ageing*. 2015;44:439-445.
268. Jennings JR, Muldoon MF, Ryan C, Gach HM, Heim A, Sheu LK and Gianaros PJ. Prehypertensive blood pressures and regional cerebral blood flow independently relate to cognitive performance in midlife. *Journal of the American Heart Association*. 2017;6:e004856.
269. Tan B, Rosenfeldt F, Ou R and Stough C. Evidence and mechanisms for statin-induced cognitive decline. *Expert Review of Clinical Pharmacology*. 2019:1-10.
270. Atkinson J. Animal models of arterial stiffness *Atherosclerosis, Large Arteries and Cardiovascular Risk*: Karger Publishers; 2007(44): 96-116.
271. Pravenec M, Křen V, Landa V, Mlejnek P, Musilová A, Šilhavý J, Šimáková M and Zidek V. Recent progress in the genetics of spontaneously hypertensive rats. *Physiological research*. 2014;63.
272. Tayebati SK, Tomassoni D and Amenta F. Spontaneously hypertensive rat as a model of vascular brain disorder: microanatomy, neurochemistry and behavior. *Journal of the neurological sciences*. 2012;322:241-9.
273. Gao E, Lei YH, Shang X, Huang ZM, Zuo L, Boucher M, Fan Q, Chuprun JK, Ma XL and Koch WJ. A Novel and Efficient Model of Coronary Artery Ligation and Myocardial Infarction in the Mouse Novelty and Significance. *Circulation research*. 2010;107:1445-1453.
274. Saeki A, Recchia F and Kass DA. Systolic flow augmentation in hearts ejecting into a model of stiff aging vasculature: influence on myocardial perfusion-demand balance. *Circulation research*. 1995;76:132-141.
275. Poulet R, Gentile MT, Vecchione C, Distaso M, Aretini A, Fratta L, Russo G, Echart C, Maffei A and De Simoni MG. Acute hypertension induces oxidative stress in brain tissues. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2006;26:253-262.
276. Gentile MT, Poulet R, Di Pardo A, Cifelli G, Maffei A, Vecchione C, Passarelli F, Landolfi A, Carullo P and Lembo G. β -Amyloid deposition in brain is enhanced in mouse models of arterial hypertension. *Neurobiology of aging*. 2009;30:222-228.

277. Price PA, Faus SA and Williamson MK. Warfarin causes rapid calcification of the elastic lamellae in rat arteries and heart valves. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 1998;18:1400-1407.
278. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, Scully S, Tan HL, Xu W and Lacey DL. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes & development*. 1998;12:1260-1268.
279. Pereira L, Lee SY, Gayraud B, Andrikopoulos K, Shapiro SD, Bunton T, Biery NJ, Dietz HC, Sakai LY and Ramirez F. Pathogenetic sequence for aneurysm revealed in mice underexpressing fibrillin-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999;96:3819-3823.
280. Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, Ohyama Y, Kurabayashi M, Kaname T and Kume E. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *nature*. 1997;390:45.
281. Paroni G, Panza F, De Cosmo S, Greco A, Seripa D and Mazzocchi G. Klotho at the Edge of Alzheimer's Disease and Senile Depression. *Molecular neurobiology*. 2018.
282. Qiao J-H, Xie P-Z, Fishbein MC, Kreuzer J, Drake TA, Demer LL and Lusis AJ. Pathology of atheromatous lesions in inbred and genetically engineered mice. Genetic determination of arterial calcification. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 1994;14:1480-1497.
283. Roselaar SE, Kakkanathu PX and Daugherty A. Lymphocyte populations in atherosclerotic lesions of apoE^{-/-} and LDL receptor^{-/-} mice: decreasing density with disease progression. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 1996;16:1013-1018.
284. Spicer S, Lewis S, Tashian R and Schulte B. Mice carrying a CAR-2 null allele lack carbonic anhydrase II immunohistochemically and show vascular calcification. *The American journal of pathology*. 1989;134:947.
285. Kida E, Palmiello S, Golabek AA, Walus M, Wierzba-Bobrowicz T, Rabe A, Albertini G and Wisniewski KE. Carbonic anhydrase II in the developing and adult human brain. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2006;65:664-74.
286. Goritz C, Thiebaut R, Tessier LH, Nieweg K, Moehle C, Buard I, Dupont JL, Schurgers LJ, Schmitz G and Pfrieger FW. Glia-induced neuronal differentiation by transcriptional regulation. *Glia*. 2007;55:1108-22.
287. Shimamura M, Nakagami H, Taniyama Y and Morishita R. Gene therapy for peripheral arterial disease. *Expert opinion on biological therapy*. 2014;14:1175-84.
288. Van der Donckt C, Roth L, Vanhoutte G, Blockx I, Bink DI, Ritz K, Pintelon I, Timmermans JP, Bauters D, Martinet W, Daemen MJ, Verhoye M and De Meyer GR. Fibrillin-1 impairment enhances blood-brain barrier permeability and xanthoma formation in brains of apolipoprotein E-deficient mice. *Neuroscience*. 2015;295:11-22.
289. Olauson H, Mencke R, Hillebrands JL and Larsson TE. Tissue expression and source of circulating alphaKlotho. *Bone*. 2017;100:19-35.
290. Lahiri DK, Chen D, Lahiri P, Rogers JT, Greig NH and Bondy S. Melatonin, metals, and gene expression: implications in aging and neurodegenerative disorders. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2004;1035:216-30.
291. Li DY, Faury G, Taylor DG, Davis EC, Boyle WA, Mecham RP, Stenzel P, Boak B and Keating MT. Novel arterial pathology in mice and humans hemizygous for elastin. *The Journal of clinical investigation*. 1998;102:1783-1787.

292. Wagenseil JE, Ciliberto CH, Knutsen RH, Levy MA, Kovacs A and Mecham RP. Reduced vessel elasticity alters cardiovascular structure and function in newborn mice. *Circulation research*. 2009;104:1217-1224.
293. Faury G, Pezet M, Knutsen RH, Boyle WA, Heximer SP, McLean SE, Minkes RK, Blumer KJ, Kovacs A and Kelly DP. Developmental adaptation of the mouse cardiovascular system to elastin haploinsufficiency. *The Journal of clinical investigation*. 2003;112:1419-1428.
294. Walker AE, Henson GD, Reihl KD, Morgan RG, Dobson PS, Nielson EI, Ling J, Mecham RP, Li DY and Lesniewski LA. Greater impairments in cerebral artery compared with skeletal muscle feed artery endothelial function in a mouse model of increased large artery stiffness. *The Journal of physiology*. 2015;593:1931-1943.
295. Walker AE, Kronquist EK, Chinen KT, Reihl KD, Li DY, Lesniewski LA and Donato AJ. Cerebral and skeletal muscle feed artery vasoconstrictor responses in a mouse model with greater large elastic artery stiffness. *Experimental physiology*. 2019;104:434-442.
296. Knutsen RH, Beeman SC, Broekelmann TJ, Liu D, Tsang KM, Kovacs A, Ye L, Danback JR, Watson A and Wardlaw A. Minoxidil improves vascular compliance, restores cerebral blood flow, and alters extracellular matrix gene expression in a model of chronic vascular stiffness. *American Journal of Physiology-Heart Circulatory Physiology* 2018;315:H18-H32.
297. Towler DA. Calcitropic hormones and arterial physiology: "D"-lightful insights. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2007;18:369-73.
298. Hass G, Landerholm W and Hemmens A. Production of calcific athero-arteriosclerosis and thromboarteritis with nicotine, vitamin D and dietary cholesterol. *The American journal of pathology*. 1966;49:739.
299. Niederhoffer N, Bobryshev YV, Lartaud-Idjouadiene I, Giummelly P and Atkinson J. Aortic calcification produced by vitamin D3 plus nicotine. *Journal of vascular research*. 1997;34:386-398.
300. Wallin R, Wajih N, Greenwood GT and Sane DC. Arterial calcification: a review of mechanisms, animal models, and the prospects for therapy. *Medicinal research reviews*. 2001;21:274-301.
301. Essalihi R, Dao HH, Yamaguchi N and Moreau P. A new model of isolated systolic hypertension induced by chronic warfarin and vitamin K1 treatment. *American journal of hypertension*. 2003;16:103-110.
302. Dao HH, Essalihi R, Bouvet C and Moreau P. Evolution and modulation of age-related medial elastocalcinosis: impact on large artery stiffness and isolated systolic hypertension. *Cardiovascular research*. 2005;66:307-317.
303. Oliveira-da-Silva A, Vieira FB, Cristina-Rodrigues F, Filgueiras CC, Manhaes AC and Abreu-Villaca Y. Increased apoptosis and reduced neuronal and glial densities in the hippocampus due to nicotine and ethanol exposure in adolescent mice. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*. 2009;27:539-48.
304. Shim SB, Lee SH, Chae KR, Kim CK, Hwang DY, Kim BG, Jee SW, Lee SH, Sin JS, Bae CJ, Lee BC, Lee HH and Kim YK. Nicotine leads to improvements in behavioral impairment and an increase in the nicotine acetylcholine receptor in transgenic mice. *Neurochemical research*. 2008;33:1783-8.
305. Benowitz NL. Nicotine addiction. *The New England journal of medicine*. 2010;362:2295-303.

306. Qiao D, Seidler FJ and Slotkin TA. Oxidative mechanisms contributing to the developmental neurotoxicity of nicotine and chlorpyrifos. *Toxicology and applied pharmacology*. 2005;206:17-26.
307. Flaherty ML, Tao H, Haverbusch M, Sekar P, Kleindorfer D, Kissela B, Khatri P, Stettler B, Adeoye O, Moomaw CJ, Broderick JP and Woo D. Warfarin use leads to larger intracerebral hematomas. *Neurology*. 2008;71:1084-9.
308. Briones TL and Darwish H. Vitamin D mitigates age-related cognitive decline through the modulation of pro-inflammatory state and decrease in amyloid burden. *Journal of neuroinflammation*. 2012;9:244.
309. Alisi L, Cao R, De Angelis C, Cafolla A, Caramia F, Cartocci G, Librando A and Fiorelli M. The Relationships Between Vitamin K and Cognition: A Review of Current Evidence. *Frontiers in neurology*. 2019;10:239.
310. Pabbidi MR, Kuppusamy M, Didion SP, Sanapureddy P, Reed JT and Sontakke SP. Sex differences in the vascular function and related mechanisms: role of 17 β -estradiol. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2018;315:H1499-H1518.
311. Duprez D and Jacobs DR, Jr. Arterial stiffness and left ventricular diastolic function: does sex matter? *Hypertension*. 2012;60:283-4.
312. Coutinho T. Arterial stiffness and its clinical implications in women. *Canadian Journal of cardiology*. 2014;30:756-764.
313. Mosca L, Manson JE, Sutherland SE, Langer RD, Manolio T and Barrett-Connor E. Cardiovascular disease in women: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association. *Circulation*. 1997;96:2468-2482.
314. Ahimastos AA, Formosa M, Dart AM and Kingwell BA. Gender differences in large artery stiffness pre-and post puberty. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2003;88:5375-5380.
315. Hickson SS, Miles KL, McDonnell BJ, Cockcroft JR, Wilkinson IB, McEniery CM and Investigators ES. Use of the oral contraceptive pill is associated with increased large artery stiffness in young women: the ENIGMA study. *Journal of hypertension*. 2011;29:1155-1159.
316. Staessen J, Van der Heijden-Spek J, Safar M, Den Hond E, Gasowski J, Fagard R, Wang J, Boudier HS and Van Bortel L. Menopause and the characteristics of the large arteries in a population study. *Journal of human hypertension*. 2001;15:511.
317. Jonason T, Henriksen E, Kangro T, Vessby B and Ringqvist I. Menopause is associated with the stiffness of the common carotid artery in 50-year-old women. *Clinical physiology*. 1998;18:149-155.
318. Nagai Y, Earley CJ, Kemper MK, Bacal CS and Metter EJ. Influence of age and postmenopausal estrogen replacement therapy on carotid arterial stiffness in women. *Cardiovascular research*. 1999;41:307-311.
319. Rajkumar C, Kingwell BA, Cameron JD, Waddell T, Mehra R, Christophidis N, Komesaroff PA, McGrath B, Jennings GL and Sudhir K. Hormonal therapy increases arterial compliance in postmenopausal women. *Journal of the American College of Cardiology* 1997;30:350-356.
320. Waddell TK, Rajkumar C, Cameron JD, Jennings GL, Dart AM and Kingwell BA. Withdrawal of hormonal therapy for 4 weeks decreases arterial compliance in postmenopausal women. *Journal of hypertension*. 1999;17:413-418.
321. dos Santos RL, da Silva FB, Ribeiro RF and Stefanon I. Sex hormones in the cardiovascular system. *Hormone molecular biology and clinical investigation*. 2014;18:89-103.

322. Natoli AK, Medley TL, Ahimastos AA, Drew BG, Thearle DJ, Dilley RJ and Kingwell BA. Sex steroids modulate human aortic smooth muscle cell matrix protein deposition and matrix metalloproteinase expression. *Hypertension*. 2005;46:1129-1134.
323. Forte P, Kneale BJ, Milne E, Chowienczyk PJ, Johnston A, Benjamin N and Ritter JM. Evidence for a difference in nitric oxide biosynthesis between healthy women and men. *Hypertension*. 1998;32:730-734.
324. Collins P, Rosano GM, Sarrel PM, Ulrich L, Adamopoulos S, Beale CM, McNeill JG and Poole-Wilson PA. 17 β -Estradiol attenuates acetylcholine-induced coronary arterial constriction in women but not men with coronary heart disease. *Circulation*. 1995;92:24-30.
325. Kim HP, Lee JY, Jeong JK, Bae SW, Lee HK and Jo I. Nongenomic stimulation of nitric oxide release by estrogen is mediated by estrogen receptor α localized in caveolae. *Biochemical biophysical research communications* 1999;263:257-262.
326. Chambliss KL, Yuhanna IS, Mineo C, Liu P, German Z, Sherman TS, Mendelsohn ME, Anderson RG and Shaul PWJCr. Estrogen receptor α and endothelial nitric oxide synthase are organized into a functional signaling module in caveolae. *Circulation research*. 2000;87:e44-e52.
327. Krippeit-Drews P, Morel N and Godfraind T. Effect of nitric oxide on membrane potential and contraction of rat aorta. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 1992;20:S72-5.
328. Tsang SY, Yao X, Chan HY, Wong CM, Chen ZY, Au CL and Huang Y. Contribution of K⁺ channels to relaxation induced by 17 β -estradiol but not by progesterone in isolated rat mesenteric artery rings. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2003;41:4-13.
329. Collins P, Rosano GM, Jiang C, Lindsay D, Poole-Wilson P and Sarrel P. Cardiovascular protection by oestrogen—a calcium antagonist effect? *The Lancet*. 1993;341:1264-1265.
330. Santos R, Abreu G, Bissoli N and Moyses M. Endothelial mediators of 17 β -estradiol-induced coronary vasodilation in the isolated rat heart. *Brazilian journal of medical and biological research*. 2004;37:569-575.
331. Brosnihan KB, Li P, Figueroa JP, Ganten D and Ferrario CM. Estrogen, nitric oxide, and hypertension differentially modulate agonist-induced contractile responses in female transgenic (mRen2) 27 hypertensive rats. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2008;294:H1995-H2001.
332. Dubey RK and Jackson EK. Estrogen-induced cardiorenal protection: potential cellular, biochemical, and molecular mechanisms. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2001;280:F365-F388.
333. Selles J, Polini N, Alvarez C and Massheimer V. Progesterone and 17 β -estradiol acutely stimulate nitric oxide synthase activity in rat aorta and inhibit platelet aggregation. *Life sciences*. 2001;69:815-827.
334. Crews JK and Khalil RA. Antagonistic effects of 17 β -estradiol, progesterone, and testosterone on Ca²⁺ entry mechanisms of coronary vasoconstriction. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 1999;19:1034-1040.
335. Smiley DA and Khalil RA. Estrogenic compounds, estrogen receptors and vascular cell signaling in the aging blood vessels. *Current medicinal chemistry*. 2009;16:1863-1887.
336. Miller AA, Drummond GR and Sobey CG. Novel isoforms of NADPH-oxidase in cerebral vascular control. *Pharmacology & therapeutics*. 2006;111:928-948.
337. Jones T. Testosterone deficiency: a risk factor for cardiovascular disease? *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2010;21:496-503.

338. Webb CM, Adamson DL, de Zeigler D and Collins P. Effect of acute testosterone on myocardial ischemia in men with coronary artery disease. *The American journal of cardiology*. 1999;83:437-9, a9.
339. English KM, Jones RD, Jones TH, Morice AH and Channer KS. Aging reduces the responsiveness of coronary arteries from male Wistar rats to the vasodilatory action of testosterone. *Clinical science (London, England : 1979)*. 2000;99:77-82.
340. Nettleship J, Jones R, Channer K and Jones T. Testosterone and coronary artery disease *Advances in the management of testosterone deficiency*: Karger Publishers; 2009(37): 91-107.
341. Traish AM, Guay A, Feeley R and Saad F. The dark side of testosterone deficiency: I. Metabolic syndrome and erectile dysfunction. *Journal of andrology*. 2009;30:10-22.
342. Hall J, Jones R, Jones T, Channer K and Peers C. Selective inhibition of L-type Ca²⁺ channels in A7r5 cells by physiological levels of testosterone. *Endocrinology*. 2006;147:2675-2680.
343. Cairrão E, Álvarez E, Santos-Silva AJ and Verde I. Potassium channels are involved in testosterone-induced vasorelaxation of human umbilical artery. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 2008;376:375.
344. Deenadayalu V, Puttabyatappa Y, Liu AT, Stallone JN and White RE. Testosterone-induced relaxation of coronary arteries: activation of BKCa channels via the cGMP-dependent protein kinase. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2011;302:H115-H123.
345. Montano LM, Calixto E, Figueroa A, Flores-Soto E, Carbajal V and Perusquía M. Relaxation of androgens on rat thoracic aorta: testosterone concentration dependent agonist/antagonist L-type Ca²⁺ channel activity, and 5 β -dihydrotestosterone restricted to L-type Ca²⁺ channel blockade. *Endocrinology*. 2008;149:2517-2526.
346. Mukherjee TK, Dinh H, Chaudhuri G and Nathan L. Testosterone attenuates expression of vascular cell adhesion molecule-1 by conversion to estradiol by aromatase in endothelial cells: implications in atherosclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99:4055-60.
347. Nheu L, Nazareth L, Xu GY, Xiao FY, Luo RZ, Komesaroff P and Ling S. Physiological effects of androgens on human vascular endothelial and smooth muscle cells in culture. *Steroids*. 2011;76:1590-6.
348. Malkin CJ, Pugh PJ, Jones RD, Kapoor D, Channer KS and Jones TH. The effect of testosterone replacement on endogenous inflammatory cytokines and lipid profiles in hypogonadal men. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2004;89:3313-8.
349. Ong PJ, Patrizi G, Chong WC, Webb CM, Hayward CS and Collins P. Testosterone enhances flow-mediated brachial artery reactivity in men with coronary artery disease. *The American journal of cardiology*. 2000;85:269-72.
350. White CM, Ferraro-Borgida MJ, Moyna NM, McGill CC, Ahlberg AW, Thompson PD and Heller GV. The effect of pharmacokinetically guided acute intravenous testosterone administration on electrocardiographic and blood pressure variables. *Journal of clinical pharmacology*. 1999;39:1038-43.
351. Whitworth JA, Scoggins BA, Andrews J, Williamson PM and Brown MA. Haemodynamic and metabolic effects of short term administration of synthetic sex steroids in humans. *Clinical and experimental hypertension Part A, Theory and practice*. 1992;14:905-22.

352. Giorgi A, Weatherby RP and Murphy PW. Muscular strength, body composition and health responses to the use of testosterone enanthate: a double blind study. *Journal of science and medicine in sport*. 1999;2:341-55.
353. Freed DL, Banks AJ, Longson D and Burley DM. Anabolic steroids in athletics: crossover double-blind trial on weightlifters. *British medical journal*. 1975;2:471-3.
354. Morishima A, Grumbach MM, Simpson ER, Fisher C and Qin K. Aromatase deficiency in male and female siblings caused by a novel mutation and the physiological role of estrogens. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1995;80:3689-98.
355. Carani C, Qin K, Simoni M, Faustini-Fustini M, Serpente S, Boyd J, Korach KS and Simpson ER. Effect of testosterone and estradiol in a man with aromatase deficiency. *The New England journal of medicine*. 1997;337:91-5.
356. Adamopoulos S, Leftheriotis D, Sbarouni E, Karavolias G and Kremastinos DT. Acute haemodynamic effects of oestrogen administration in male patients with chronic heart failure. *European journal of heart failure*. 2002;4:719-26.
357. Gillies GE and McArthur S. Estrogen actions in the brain and the basis for differential action in men and women: a case for sex-specific medicines. *Pharmacological reviews*. 2010;pr. 109.002071.
358. Letenneur L, Gilleron V, Commenges D, Helmer C, Orgogozo J-M and Dartigues J-F. Are sex and educational level independent predictors of dementia and Alzheimer's disease? Incidence data from the PAQUID project. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 1999;66:177-183.
359. Azad NA, Al Bugami M and Loy-English I. Gender differences in dementia risk factors. *Gender medicine*. 2007;4:120-129.
360. Viña J and Lloret A. Why women have more Alzheimer's disease than men: gender and mitochondrial toxicity of amyloid- β peptide. *Journal of Alzheimer's disease*. 2010;20:S527-S533.
361. Li R, Cui J and Shen Y. Brain sex matters: estrogen in cognition and Alzheimer's disease. *Molecular and cellular endocrinology*. 2014;389:13-21.
362. Nelson LR and Bulun SE. Estrogen production and action. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2001;45:S116-S124.
363. Barakat R, Oakley O, Kim H, Jin J and Ko CJ. Extra-gonadal sites of estrogen biosynthesis and function. *BMB reports*. 2016;49:488.
364. Prange-Kiel J, Wehrenberg U, Jarry H and Rune GM. Para/autocrine regulation of estrogen receptors in hippocampal neurons. *Hippocampus*. 2003;13:226-234.
365. Azcoitia I, Sierra A, Veiga S and GARCIA-SEGURA LM. Aromatase expression by reactive astroglia is neuroprotective. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2003;1007:298-305.
366. Simpson E, Rubin G, Clyne C, Robertson K, O'Donnell L, Davis S and Jones M. Local estrogen biosynthesis in males and females. *Endocrine-related cancer*. 1999;6:131-137.
367. Peterson RS, Lee DW, Fernando G and Schlinger BA. Radial glia express aromatase in the injured zebra finch brain. *Journal of Comparative Neurology*. 2004;475:261-269.
368. Saldanha CJ, Duncan KA and Walters BJ. Neuroprotective actions of brain aromatase. *Frontiers in neuroendocrinology*. 2009;30:106-118.
369. Yague JG, Azcoitia I, DeFelipe J, Garcia-Segura LM and Muñoz A. Aromatase expression in the normal and epileptic human hippocampus. *Brain research*. 2010;1315:41-52.

370. Carswell H, Dominiczak A, García-Segura LM, Harada N, Hutchison J and Macrae I. Brain aromatase expression after experimental stroke: topography and time course. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2005;96:89-91.
371. McCullough LD, Blizzard K, Simpson ER, Öz OK and Hurn PD. Aromatase cytochrome P450 and extragonadal estrogen play a role in ischemic neuroprotection. *Journal of Neuroscience*. 2003;23:8701-8705.
372. Kancheva R, Hill M, Novak Z, Chrastina J, Kancheva L and Starka L. Neuroactive steroids in periphery and cerebrospinal fluid. *Neuroscience*. 2011;191:22-27.
373. Friedlander AH and Jones LJ. The biology, medical management, and podiatric implications of menopause. *Journal of the American Podiatric Medical Association*. 2002;92:437-443.
374. Mealey BL and Moritz AJ. Hormonal influences: effects of diabetes mellitus and endogenous female sex steroid hormones on the periodontium. *Periodontology 2000*. 2003;32:59-81.
375. Yue X, Lu M, Lancaster T, Cao P, Honda S-I, Staufenbiel M, Harada N, Zhong Z, Shen Y and Li R. Brain estrogen deficiency accelerates A β plaque formation in an Alzheimer's disease animal model. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005;102:19198-19203.
376. Duckles SP and Krause DN. Mechanisms of cerebrovascular protection: oestrogen, inflammation and mitochondria. *Acta Physiologica*. 2011;203:149-154.
377. Duckles SP and Krause DN. Cerebrovascular effects of oestrogen: multiplicity of action. *Clinical and experimental pharmacology and physiology*. 2007;34:801-808.
378. Pelligrino DA and Galea E. Estrogen and cerebrovascular physiology and pathophysiology. *The Japanese journal of pharmacology*. 2001;86:137-158.
379. Dan P, Cheung JC, Scriven DR and Moore ED. Epitope-dependent localization of estrogen receptor α , but not- β , in en face arterial endothelium. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2003;284:H1295-H1306.
380. Zhang Q-G, Raz L, Wang R, Han D, De Sevilla L, Yang F, Vadlamudi RK and Brann DW. Estrogen attenuates ischemic oxidative damage via an estrogen receptor α -mediated inhibition of NADPH oxidase activation. *Journal of Neuroscience*. 2009;29:13823-13836.
381. Sunday L, Osuna C, Krause DN and Duckles SP. Age alters cerebrovascular inflammation and effects of estrogen. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2007;292:H2333-H2340.
382. Galea E, Santizo R, Feinstein DL, Adamsom P, Greenwood J, Koenig HM and Pelligrino DA. Estrogen inhibits NF κ B-dependent inflammation in brain endothelium without interfering with I κ B degradation. *Neuroreport*. 2002;13:1469-1472.
383. Santizo RA, Anderson S, Ye S, Koenig HM and Pelligrino DA. Effects of estrogen on leukocyte adhesion after transient forebrain ischemia. *Stroke*. 2000;31:2231-2235.
384. Ospina JA, Brevig HN, Krause DN and Duckles SP. Estrogen suppresses IL-1 β -mediated induction of COX-2 pathway in rat cerebral blood vessels. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2004;286:H2010-H2019.
385. Razmara A, Duckles SP, Krause DN and Procaccio V. Estrogen suppresses brain mitochondrial oxidative stress in female and male rats. *Brain research*. 2007;1176:71-81.
386. Stirone C, Duckles SP, Krause DN and Procaccio V. Estrogen increases mitochondrial efficiency and reduces oxidative stress in cerebral blood vessels. *Molecular pharmacology*. 2005.
387. Bake S and Sohrabji FJE. 17 β -Estradiol differentially regulates blood-brain barrier permeability in young and aging female rats. *Endocrinology*. 2004;145:5471-5475.

388. Liu R, Wen Y, Perez E, Wang X, Day AL, Simpkins JW and Yang S-H. 17 β -Estradiol attenuates blood-brain barrier disruption induced by cerebral ischemia-reperfusion injury in female rats. *Brain research*. 2005;1060:55-61.
389. Wu M, Rementer C and Giachelli CM. Vascular calcification: an update on mechanisms and challenges in treatment. *Calcified tissue international*. 2013;93:365-373.
390. Kranenburg G, Bartstra JW, Weijmans M, de Jong PA, Mali WP, Verhaar HJ, Visseren FL and Spiering W. Bisphosphonates for cardiovascular risk reduction: a systematic review and meta-analysis. *Atherosclerosis*. 2016;252:106-115.
391. Persy V, De Broe M and Ketteler M. Bisphosphonates prevent experimental vascular calcification: treat the bone to cure the vessels? *Kidney international*. 2006;70:1537-1538.
392. Nitta K, Akiba T, Suzuki K, Uchida K, Watanabe R-I, Majima K, Aoki T and Nihei H. Effects of cyclic intermittent etidronate therapy on coronary artery calcification in patients receiving long-term hemodialysis. *American journal of kidney diseases*. 2004;44:680-688.
393. Toussaint ND, Lau KK, Strauss BJ, Polkinghorne KR and Kerr PG. Effect of alendronate on vascular calcification in CKD stages 3 and 4: a pilot randomized controlled trial. *American Journal of Kidney Diseases*. 2010;56:57-68.
394. Gonnelli S, Caffarelli C, Tanzilli L, Pondrelli C, Lucani B, Franci BM and Nuti R. Effects of intravenous zoledronate and ibandronate on carotid intima-media thickness, lipids and FGF-23 in postmenopausal osteoporotic women. *Bone*. 2014;61:27-32.
395. Luckish A, Cernes R, Boaz M, Gavish D, Matas Z, Fux A and Shargorodsky M. Effect of long-term treatment with risedronate on arterial compliance in osteoporotic patients with cardiovascular risk factors. *Bone*. 2008;43:279-83.
396. Koshiyama H, Nakamura Y, Tanaka S and Minamikawa J. Decrease in carotid intima-media thickness after 1-year therapy with etidronate for osteopenia associated with type 2 diabetes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2000;85:2793-6.
397. Celiloglu M, Aydin Y, Balci P and Kolamaz T. The effect of alendronate sodium on carotid artery intima-media thickness and lipid profile in women with postmenopausal osteoporosis. *Menopause (New York, NY)*. 2009;16:689-93.
398. Kanazawa I, Yamaguchi T, Hayashi K, Takase H, Shimizu T and Sugimoto T. Effects of treatment with risedronate and alfacalcidol on progression of atherosclerosis in postmenopausal women with type 2 diabetes mellitus accompanied with osteoporosis. *The American journal of the medical sciences*. 2010;339:519-24.
399. Kawahara T, Nishikawa M, Kawahara C, Inazu T, Sakai K and Suzuki G. Atorvastatin, etidronate, or both in patients at high risk for atherosclerotic aortic plaques: a randomized, controlled trial. *Circulation*. 2013;127:2327-35.
400. Caffarelli C, Montagnani A, Nuti R and Gonnelli S. Bisphosphonates, atherosclerosis and vascular calcification: update and systematic review of clinical studies. *Clinical interventions in aging*. 2017;12:1819.
401. Sirtori CR. The pharmacology of statins. *Pharmacol Res*. 2014;88:3-11.
402. Sinha AK and Mehta JL. Modulation of atherosclerosis, blood pressure and arterial elasticity by statins *Atherosclerosis, Large Arteries and Cardiovascular Risk*: Karger Publishers; 2007(44): 315-330.
403. Daoud A, Jarmolych J, Augustyn J, Fritz K, Singh J and Lee K. Regression of advanced atherosclerosis in swine. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 1976;100:372-379.

404. Faggiotto A and Paoletti R. State-of-the-Art lecture. Statins and blockers of the renin-angiotensin system: vascular protection beyond their primary mode of action. *Hypertension*. 1999;34:987-96.
405. Mehta J, Li D, Chen H, Joseph J and Romeo F. Inhibition of LOX-1 by statins may relate to upregulation of eNOS. *Biochemical and biophysical research communications*. 2001;289:857-861.
406. Delbosc S, Cristol J-P, Descomps B, Mimran A and Jover B. Simvastatin prevents angiotensin II-induced cardiac alteration and oxidative stress. *Hypertension*. 2002;40:142-147.
407. Nickenig G, Bäumer AT, Temur Y, Kebben D, Jockenhövel F and Böhm M. Statin-sensitive dysregulated AT1 receptor function and density in hypercholesterolemic men. *Circulation*. 1999;100:2131-2134.
408. Mundy G, Garrett R, Harris S, Chan J, Chen D, Rossini G, Boyce B, Zhao M and Gutierrez Gl. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. *Science*. 1999;286:1946-1949.
409. Son B-K, Kozaki K, Iijima K, Eto M, Kojima T, Ota H, Senda Y, Maemura K, Nakano T and Akishita M. Statins protect human aortic smooth muscle cells from inorganic phosphate-induced calcification by restoring Gas6-Axl survival pathway. *Circulation research*. 2006;98:1024-1031.
410. Henein M, Granåsen G, Wiklund U, Schmermund A, Guerci A, Erbel R and Raggi P. High dose and long-term statin therapy accelerate coronary artery calcification. *International journal of cardiology*. 2015;184:581-586.
411. Lee D, Joo HJ, Jung H-W and Lim D-S. Investigating potential mediator between statin and coronary artery calcification. *PloS one*. 2018;13:e0203702.
412. Kansui Y, Fujii K, Goto K, Abe I and Iida M. Angiotensin II receptor antagonist improves age-related endothelial dysfunction. *Journal of hypertension*. 2002;20:439-446.
413. Shimizu H, Nakagami H and Morishita R. Bone metabolism and cardiovascular function update. Cross link of hypertension, bone loss and vascular calcification-common back grounds in renin angiotensin system with anti-aging aspect. *Clinical calcium*. 2014;24:53-62.
414. Klemsdal TO, Moan A and Kjeldsen SE. Effects of selective angiotensin II type 1 receptor blockade with losartan on arterial compliance in patients with mild essential hypertension. *Blood pressure*. 1999;8:214-9.
415. Schiffrin EL, Park JB, Intengan HD and Touyz RM. Correction of arterial structure and endothelial dysfunction in human essential hypertension by the angiotensin receptor antagonist losartan. *Circulation*. 2000;101:1653-1659.
416. Safar M, Blacher J, Mourad J and London G. Stiffness of carotid artery wall material and blood pressure in humans: application to antihypertensive therapy and stroke prevention. *Stroke*. 2000;31:782-790.
417. Duprez D, De Buyzere M, Rietzschel ER and Clement DL. Aldosterone and vascular damage. *Current hypertension reports*. 2000;2:327-334.
418. Fleckenstein A, Fleckenstein-Grün G, Frey M and Zorn J. Future directions in the use of calcium antagonists. *American Journal of Cardiology*. 1987;59:B177-B187.
419. Motro M and Shemesh J. Calcium channel blocker nifedipine slows down progression of coronary calcification in hypertensive patients compared with diuretics. *Hypertension*. 2001;37:1410-1413.
420. Hayashi K, Imada T, Yamauchi T, Kido H, Shinyama H, Matzno S, Nakamura N and Kagitani Y. Possible mechanism for the anti-atherosclerotic action of the calcium channel blocker

- AE0047 in cholesterol-fed rabbits. *Clinical and experimental pharmacology and physiology*. 1998;25:17-25.
421. Bank AJ, Wilson RF, Kubo SH, Holte JE, Dresing TJ and Wang H. Direct effects of smooth muscle relaxation and contraction on in vivo human brachial artery elastic properties. *Circulation research*. 1995;77:1008-1016.
422. Hak AE, Pols HA, van Hemert AM, Hofman A and Witteman JC. Progression of aortic calcification is associated with metacarpal bone loss during menopause: a population-based longitudinal study. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2000;20:1926-1931.
423. Jeon G-H, Kim SH, Yun S-C, Chae HD, Kim C-H and Kang BM. Association between serum estradiol level and coronary artery calcification in postmenopausal women. *Menopause* 2010;17:902-907.
424. Manson JE, Allison MA, Rossouw JE, Carr JJ, Langer RD, Hsia J, Kuller LH, Cochrane BB, Hunt JR and Ludlam SE. Estrogen therapy and coronary-artery calcification. *New England Journal of Medicine*. 2007;356:2591-2602.
425. Barrett-Connor E and Laughlin GAJM. Hormone therapy and coronary artery calcification in asymptomatic postmenopausal women: the Rancho Bernardo Study. *Menopause (New York, NY)*. 2005;12:40-48.
426. Akhrass F, Evans AT, Wang Y, Rich S, Kannan C, Fogelfeld L and Mazzone T. Hormone replacement therapy is associated with less coronary atherosclerosis in postmenopausal women. *The Journal of Clinical Endocrinology*. 2003;88:5611-5614.
427. Nanao-Hamai M, Son B-K, Hashizume T, Ogawa S and Akishita M. Protective effects of estrogen against vascular calcification via estrogen receptor α -dependent growth arrest-specific gene 6 transactivation. *Biochemical biophysical research communications* 2016;480:429-435.
428. Peng Y-Q, Xiong D, Lin X, Cui R-R, Xu F, Zhong J-Y, Zhu T, Wu F, Mao M-Z and Liao X-B. Oestrogen inhibits arterial calcification by promoting autophagy. *Scientific Reports*. 2017;7:3549.
429. Osako MK, Nakagami H, Koibuchi N, Shimizu H, Nakagami F, Koriyama H, Shimamura M, Miyake T, Rakugi H and Morishita R. Estrogen inhibits vascular calcification via vascular RANKL system: common mechanism of osteoporosis and vascular calcification. *Circulation research*. 2010;107:466-475.
430. Rocca WA, Grossardt BR and Shuster LT. Oophorectomy, menopause, estrogen treatment, and cognitive aging: clinical evidence for a window of opportunity. *Brain research*. 2011;1379:188-198.
431. Hodis HN, Mack WJ, Henderson VW, Shoupe D, Budoff MJ, Hwang-Levine J, Li Y, Feng M, Dustin L and Kono N. Vascular effects of early versus late postmenopausal treatment with estradiol. *New England Journal of Medicine*. 2016;374:1221-1231.
432. Brinton RD. Estrogen-induced plasticity from cells to circuits: predictions for cognitive function. *Trends in pharmacological sciences*. 2009;30:212-222.
433. Gleason CE, Dowling NM, Wharton W, Manson JE, Miller VM, Atwood CS, Brinton EA, Cedars MI, Lobo RA and Merriam GR. Effects of hormone therapy on cognition and mood in recently postmenopausal women: findings from the randomized, controlled KEEPS–cognitive and affective study. *PLoS medicine*. 2015;12:e1001833.
434. Paige LA, Christensen DJ, Grøn H, Norris JD, Gottlin EB, Padilla KM, Chang C-y, Ballas LM, Hamilton PT and McDonnell DP. Estrogen receptor (ER) modulators each induce distinct conformational changes in ER α and ER β . *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999;96:3999-4004.

435. Bryant HU and Dere WH. Selective estrogen receptor modulators: an alternative to hormone replacement therapy. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 1998;217:45-52.
436. Walsh BW, Kuller LH, Wild RA, Paul S, Farmer M, Lawrence JB, Shah AS and Anderson PW. Effects of raloxifene on serum lipids and coagulation factors in healthy postmenopausal women. *Jama*. 1998;279:1445-1451.
437. Bielak LF, Klee GG, Sheedy PF, Turner ST, Schwartz RS and Peyser PA. Association of fibrinogen with quantity of coronary artery calcification measured by electron beam computed tomography. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2000;20:2167-2171.
438. Khalil RA. Estrogen, vascular estrogen receptor and hormone therapy in postmenopausal vascular disease. *Biochemical pharmacology*. 2013;86:1627-1642.
439. Lu Q, Xiang D-X, Yuan H-Y, Xiao Y, Yuan L-Q and Li H-B. Puerarin attenuates calcification of vascular smooth muscle cells. *The American journal of Chinese medicine*. 2014;42:337-347.
440. Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circulation research*. 2000.
441. Prasad A, Andrews NP, Padder FA, Husain M and Quyyumi AA. Glutathione reverses endothelial dysfunction and improves nitric oxide bioavailability. *J Am Coll Cardiol*. 1999;34:507-14.
442. Andrews NP, Prasad A and Quyyumi AA. N-acetylcysteine improves coronary and peripheral vascular function. *J Am Coll Cardiol*. 2001;37:117-23.
443. Carr A and Frei B. The role of natural antioxidants in preserving the biological activity of endothelium-derived nitric oxide. *Free radical biology & medicine*. 2000;28:1806-14.
444. Gioscia-Ryan RA, LaRocca TJ, Sindler AL, Zigler MC, Murphy MP and Seals DR. Mitochondria-targeted antioxidant (MitoQ) ameliorates age-related arterial endothelial dysfunction in mice. *The Journal of physiology*. 2014;592:2549-2561.
445. Rossman MJ, Santos-Parker JR, Steward CA, Bispham NZ, Cuevas LM, Rosenberg HL, Woodward KA, Chonchol M, Gioscia-Ryan RA and Murphy MP. Chronic supplementation with a mitochondrial antioxidant (MitoQ) improves vascular function in healthy older adults. *Hypertension*. 2018;71:1056-1063.
446. Burnett Jr JC, Higano ST, McKinley LJ and Holmes Jr DR. Long-term L-arginine supplementation improves small-vessel coronary endothelial function in humans. *Circulation*. 1998.
447. Wells A, Swanson G, Fahey T and Smith M. No Effect of L-Arginine on Vascular Stiffness at Rest and During Reactive Hyperemia in Young Healthy Subjects. *International Journal of Exercise Science*. 2019;12:556-566.
448. Lees JS, Chapman FA, Witham MD, Jardine AG and Mark PB. Vitamin K status, supplementation and vascular disease: a systematic review and meta-analysis. *Heart*. 2018;heartjnl-2018-313955.
449. Hasegawa N, Fujie S, Horii N, Miyamoto-Mikami E, Tsuji K, Uchida M, Hamaoka T, Tabata I and Iemitsu M. Effects of Different Exercise Modes on Arterial Stiffness and Nitric Oxide Synthesis. *Medicine and science in sports and exercise*. 2018;50:1177-1185.
450. Laurent P, Marenco P, Castagna O, Smulyan H, Blacher J and Safar ME. Differences in central systolic blood pressure and aortic stiffness between aerobically trained and sedentary individuals. *Journal of the American Society of Hypertension*. 2011;5:85-93.

451. DeVan AE and Seals DR. Vascular health in the ageing athlete. *Experimental physiology*. 2012;97:305-310.
452. Kim H-K, Hwang C-L, Yoo J-K, Hwang M-H, Handberg EM, Petersen JW, Nichols WW, Sofianos S and Christou DD. All-extremity exercise training improves arterial stiffness in older adults. *Medicine and science in sports and exercise*. 2017;49:1404.
453. Tanaka H, DeSouza CA and Seals DR. Absence of age-related increase in central arterial stiffness in physically active women. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 1998;18:127-132.
454. Bjarnegård N, Hedman K and Länne T. Vascular Adaptation to Indoor Cycling Exercise in Premenopausal Women. *International journal of sports medicine*. 2019.
455. Nishiwaki M, Takahara K and Matsumoto N. Arterial stiffness in young adult swimmers. *European journal of applied physiology*. 2017;117:131-138.
456. Montero D, Roche E and Martinez-Rodriguez A. The impact of aerobic exercise training on arterial stiffness in pre-and hypertensive subjects: a systematic review and meta-analysis. *International journal of cardiology*. 2014;173:361-368.
457. Schäfer C, Mayr B, Müller EE, Augner C, Hannemann J, Böger RH, Schönfelder M and Niebauer J. Exercise training prior to night shift work improves physical work capacity and arterial stiffness. *European Journal of Preventive Cardiology*. 0:2047487319848196.
458. Bouaziz W, Lang P-O, Schmitt E, Leprêtre P-M, Lefebvre F, Momas C, Kaltenbach G, Geny B and Vogel T. Effects of a short-term interval aerobic training program with recovery bouts on vascular function in sedentary aged 70 or over: A randomized controlled trial. *Archives of gerontology and geriatrics*. 2019;82:217-225.
459. Miyachi M, Donato AJ, Yamamoto K, Takahashi K, Gates PE, Moreau KL and Tanaka H. Greater age-related reductions in central arterial compliance in resistance-trained men. *Hypertension*. 2003;41:130-135.
460. Miyachi M. Effects of resistance training on arterial stiffness: a meta-analysis. *Br J Sports Med*. 2013;47:393-396.
461. Sardeli AV, Gaspari AF and Chacon-Mikahil MP. Acute, short-, and long-term effects of different types of exercise in central arterial stiffness: a systematic review and meta-analysis. *The Journal of sports medicine and physical fitness*. 2018;58:923-932.
462. Evans W, Willey Q, Hanson ED and Stoner L. Effects of Resistance Training on Arterial Stiffness in Persons at Risk for Cardiovascular Disease: A Meta-analysis. *Sports Medicine*. 2018;48:2785-2795.
463. Fleenor BS, Marshall KD, Durrant JR, Lesniewski LA and Seals DR. Arterial stiffening with ageing is associated with transforming growth factor- β 1-related changes in adventitial collagen: reversal by aerobic exercise. *The Journal of physiology*. 2010;588:3971-3982.
464. Nosaka T, Tanaka H, Watanabe I, Sato M and Matsuda M. Influence of regular exercise on age-related changes in arterial elasticity: mechanistic insights from wall compositions in rat aorta. *Canadian journal of applied physiology*. 2003;28:204-212.
465. Ashor AW, Lara J, Siervo M, Celis-Morales C and Mathers JC. Effects of exercise modalities on arterial stiffness and wave reflection: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *PloS one*. 2014;9:e110034.
466. Niederseer D, Steidle-Kloc E, Mayr M, Müller EE, Cadamuro J, Patsch W, Dela F, Müller E and Niebauer J. Effects of a 12-week alpine skiing intervention on endothelial progenitor cells, peripheral arterial tone and endothelial biomarkers in the elderly. *International journal of cardiology*. 2016;214:343-347.

467. Adams V, Reich B, Uhlemann M and Niebauer J. Molecular effects of exercise training in patients with cardiovascular disease: focus on skeletal muscle, endothelium, and myocardium. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2017;313:H72-H88.
468. Pierce GL, Donato AJ, LaRocca TJ, Eskurza I, Silver AE and Seals DR. Habitually exercising older men do not demonstrate age-associated vascular endothelial oxidative stress. *Aging cell*. 2011;10:1032-1037.
469. Higashi Y and Yoshizumi M. Exercise and endothelial function: role of endothelium-derived nitric oxide and oxidative stress in healthy subjects and hypertensive patients. *Pharmacology & therapeutics*. 2004;102:87-96.
470. Taddei S, Galetta F, Viridis A, Ghiadoni L, Salvetti G, Franzoni F, Giusti C and Salvetti A. Physical activity prevents age-related impairment in nitric oxide availability in elderly athletes. *Circulation*. 2000;101:2896-2901.
471. Fujie S, Sato K, Miyamoto-Mikami E, Hasegawa N, Fujita S, Sanada K, Hamaoka T and Iemitsu M. Reduction of arterial stiffness by exercise training is associated with increasing plasma apelin level in middle-aged and older adults. *PloS one*. 2014;9:e93545.
472. Zhou Q, Chen L, Tang M, Guo Y and Li L. Apelin/APJ system: A novel promising target for anti-aging intervention. *Clinica Chimica Acta*. 2018.
473. Son W-M, Sung K-D, Bharath LP, Choi K-J, Park S-YJC and Hypertension E. Combined exercise training reduces blood pressure, arterial stiffness, and insulin resistance in obese prehypertensive adolescent girls. 2017;39:546-552.
474. Dow CA, Stauffer BL, Brunjes DL, Greiner JJ and DeSouza CA. Regular aerobic exercise reduces endothelin-1-mediated vasoconstrictor tone in overweight and obese adults. *Experimental physiology*. 2017;102:1133-1142.
475. Chatrou ML, Winckers K, Hackeng TM, Reutelingsperger CP and Schurgers LJ. Vascular calcification: the price to pay for anticoagulation therapy with vitamin K-antagonists. *Blood reviews*. 2012;26:155-166.
476. Rosenhek R, Binder T, Porenta G, Lang I, Christ G, Schemper M, Maurer G and Baumgartner H. Predictors of outcome in severe, asymptomatic aortic stenosis. *New England Journal of Medicine*. 2000;343:611-617.
477. Rennenberg R, Kessels A, Schurgers L, Van Engelshoven J, De Leeuw P and Kroon A. Vascular calcifications as a marker of increased cardiovascular risk: a meta-analysis. *Vascular health and risk management*. 2009;5:185.
478. Schurgers LJ, Spronk HM, Soute BA, Schiffers PM, DeMey JG and Vermeer C. Regression of warfarin-induced medial elastocalcinosis by high intake of vitamin K in rats. *Blood*. 2007;109:2823-2831.
479. Mac-Way F, Poulin A, Utescu MS, De Serres SA, Marquis K, Douville P, Desmeules S, Larivière R, Lebel M and Agharazii M. The impact of warfarin on the rate of progression of aortic stiffness in hemodialysis patients: a longitudinal study. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2014;29:2113-2120.
480. Hashmath Z, Lee J, Gaddam S, Ansari B, Oldland G, Javaid K, Mustafa A, Vasim I, Akers S and Chirinos JA. Vitamin K Status, Warfarin Use, and Arterial Stiffness in Heart Failure. *Hypertension*. 2019;73:364-370.
481. Brangier A, Ferland G, Rolland Y, Gautier J, Féart C and Annweiler C. Vitamin K antagonists and cognitive decline in older adults: a 24-month follow-up. *Nutrients*. 2018;10:666.
482. Annweiler C, Ferland G, Barberger-Gateau P, Brangier A, Rolland Y and Beauchet O. Vitamin K antagonists and cognitive impairment: results from a cross-sectional pilot study among

- geriatric patients. *Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences*. 2014;70:97-101.
483. Ferland G, Feart C, Presse N, Lorrain S, Bazin F, Helmer C, Berr C, Annweiler C, Rouaud O and Dartigues J-F. Vitamin K antagonists and cognitive function in older adults: the three-city cohort study. *Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences*. 2015;71:1356-1362.
484. Brangier A, Celle S, Roche F, Beauchet O, Ferland G and Annweiler C. Use of vitamin K antagonists and brain morphological changes in older adults: an exposed/unexposed voxel-based morphometric study. *Dementia and geriatric cognitive disorders*. 2018;45:18-26.
485. Zhang C, Gu Z, Shen L, Pan M-M, Yan Y, Pu J, Liu X and Lin H. Non-vitamin K antagonist oral anticoagulants and cognitive impairment in atrial fibrillation: insights from the meta-analysis of over 90,000 patients of randomized controlled trials and real-world studies. *Frontiers in aging neuroscience*. 2018;10:258.
486. Tamadon-Nejad S, Ouliass B, Rochford J and Ferland G. Vitamin K Deficiency Induced by Warfarin Is Associated With Cognitive and Behavioral Perturbations, and Alterations in Brain Sphingolipids in Rats. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2018;10.
487. Wen L, Chen J, Duan L and Li S. Vitamin K-dependent proteins involved in bone and cardiovascular health. *Molecular medicine reports*. 2018;18:3-15.
488. Shearer MJ and Newman P. Recent trends in the metabolism and cell biology of vitamin K with special reference to vitamin K cycling and MK-4 biosynthesis. *Journal of lipid research*. 2014;55:345-362.
489. Flore R, Ponziani FR, Di Rienzo TA, Zocco MA, Flex A, Gerardino L, Lupascu A, Santoro L, Santoliquido A and Di Stasio E. Something more to say about calcium homeostasis: the role of vitamin K2 in vascular calcification and osteoporosis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2013;17:2433-2440.
490. Tie J-K and Stafford D. Functional study of the vitamin K cycle enzymes in live cells *Methods in enzymology*: Elsevier; 2017(584): 349-394.
491. Fusaro M, Crepaldi G, Maggi S, Galli F, D'Angelo A, Calò L, Giannini S, Miozzo D and Gallieni M. Vitamin K, bone fractures, and vascular calcifications in chronic kidney disease: an important but poorly studied relationship. *Journal of endocrinological investigation*. 2011;34:317-323.
492. Vermeer C and Braam L. Role of K vitamins in the regulation of tissue calcification. *Journal of bone and mineral metabolism*. 2001;19:201-206.
493. Fusaro M, Mereu MC, Aghi A, Iervasi G and Gallieni M. Vitamin K and bone. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism*. 2017;14:200.
494. Tie JK and Stafford DW. Structural and functional insights into enzymes of the vitamin K cycle. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2016;14:236-247.
495. Berkner KLJV and Hormones. Vitamin K-dependent carboxylation. *Vitamins*. 2008;78:131-156.
496. Price PA and Kaneda Y. Vitamin K counteracts the effect of warfarin in liver but not in bone. *Thrombosis research*. 1987;46:121-131.
497. Ulrich M, Knapen M, Erlee MH and Vermeer C. Vitamin K is no antagonist for the action of warfarin in rat osteosarcoma UMR 106. *Thrombosis research*. 1988;50:27-32.
498. Wallin R, Cain D and Sane DC. Matrix Gla protein synthesis and gamma-carboxylation in the aortic vessel wall and proliferating vascular smooth muscle cells. *Thrombosis and haemostasis*. 1999;82:1764-1767.

499. Luo G, D'Souza R, Hogue D and Karsenty G. The matrix Gla protein gene is a marker of the chondrogenesis cell lineage during mouse development. *Journal of Bone and Mineral Research*. 1995;10:325-334.
500. Laizé V, Martel P, Viegas CS, Price PA and Cancela ML. Evolution of matrix and bone γ -carboxyglutamic acid proteins in vertebrates. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280:26659-26668.
501. Berkner KL and Runge KW. The physiology of vitamin K nutriture and vitamin K-dependent protein function in atherosclerosis. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2004;2:2118-32.
502. Aleksandrov AP, Mirkov I, Ninkov M, Mileusnic D, Demenesku J, Subota V, Kataranovski D and Kataranovski M. Effects of warfarin on biological processes other than haemostasis: a review. *Food and chemical toxicology*. 2018;113:19-32.
503. Schurgers LJ, Joosen IA, Laufer EM, Chatrou ML, Herfs M, Winkens MH, Westenfeld R, Veulemans V, Krueger T and Shanahan CM. Vitamin K-antagonists accelerate atherosclerotic calcification and induce a vulnerable plaque phenotype. *PloS one*. 2012;7:e43229.
504. Luo G, Ducy P, McKee MD, Pinero GJ, Loyer E, Behringer RR and Karsenty G. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature*. 1997;386:78.
505. Murshed M, Schinke T, McKee MD and Karsenty G. Extracellular matrix mineralization is regulated locally; different roles of two gla-containing proteins. *The Journal of cell biology*. 2004;165:625-30.
506. Price PA, Si Chan W, Jolson DM and Williamson MK. The elastic lamellae of devitalized arteries calcify when incubated in serum: evidence for a serum calcification factor. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2006;26:1079-1085.
507. Bostrom K, Tsao D, Shen S, Wang Y and Demer LL. Matrix GLA protein modulates differentiation induced by bone morphogenetic protein-2 in C3H10T1/2 cells. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276:14044-52.
508. Zebboudj AF, Imura M and Bostrom K. Matrix GLA protein, a regulatory protein for bone morphogenetic protein-2. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277:4388-94.
509. Roumeliotis S, Dounousi E, Eleftheriadis T and Liakopoulos V. Association of the Inactive Circulating Matrix Gla Protein with Vitamin K Intake, Calcification, Mortality, and Cardiovascular Disease: A Review. *International journal of molecular sciences*. 2019;20:628.
510. Caluwé R, Verbeke F and Devriese ASJNDT. Evaluation of vitamin K status and rationale for vitamin K supplementation in dialysis patients. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2019.
511. Manfioletti G, Brancolini C, Avanzi G and Schneider C. The protein encoded by a growth arrest-specific gene (gas6) is a new member of the vitamin K-dependent proteins related to protein S, a negative coregulator in the blood coagulation cascade. *Molecular and cellular biology*. 1993;13:4976-4985.
512. Wu G, Ma Z, Cheng Y, Hu W, Deng C, Jiang S, Li T, Chen F and Yang Y. Targeting Gas6/TAM in cancer cells and tumor microenvironment. *Molecular cancer*. 2018;17:20.
513. Varnum BC, Young C, Elliott G, Garcia A, Bartley TD, Fridell YW, Hunt RW, Trail G, Clogston C, Toso RJ and et al. Axl receptor tyrosine kinase stimulated by the vitamin K-dependent protein encoded by growth-arrest-specific gene 6. *Nature*. 1995;373:623-6.
514. Stitt TN, Conn G, Gore M, Lai C, Bruno J, Radziejewski C, Mattsson K, Fisher J, Gies DR, Jones PF and et al. The anticoagulation factor protein S and its relative, Gas6, are ligands for the Tyro 3/Axl family of receptor tyrosine kinases. *Cell*. 1995;80:661-70.

515. van der Meer JH, van der Poll T and van't Veer C. TAM receptors, Gas6, and protein S: roles in inflammation and hemostasis. *Blood*. 2014;123:2460-2469.
516. Nagata K, Ohashi K, Nakano T, Arita H, Zong C, Hanafusa H and Mizuno K. Identification of the product of growth arrest-specific gene 6 as a common ligand for Axl, Sky, and Mer receptor tyrosine kinases. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271:30022-7.
517. Angelillo-Scherrer A, Burnier L, Lambrechts D, Fish RJ, Tjwa M, Plaisance S, Sugamele R, DeMol M, Martinez-Soria E and Maxwell PH. Role of Gas6 in erythropoiesis and anemia in mice. *The Journal of clinical investigation*. 2008;118:583-596.
518. Tjwa M, Bellido-Martin L, Lin Y, Lutgens E, Plaisance S, Bono F, Delesque-Touchard N, Herve C, Moura R, Billiau AD, Aparicio C, Levi M, Daemen M, Dewerchin M, Lupu F, Arnout J, Herbert JM, Waer M, Garcia de Frutos P, Dahlback B, Carmeliet P, Hoylaerts MF and Moons L. Gas6 promotes inflammation by enhancing interactions between endothelial cells, platelets, and leukocytes. *Blood*. 2008;111:4096-105.
519. Lutgens E, Tjwa M, Garcia de Frutos P, Wijnands E, Beckers L, Dahlback B, Daemen MJ, Carmeliet P and Moons L. Genetic loss of Gas6 induces plaque stability in experimental atherosclerosis. *The Journal of pathology*. 2008;216:55-63.
520. Laurance S, Lemarié CA and Blostein MD. Growth arrest-specific gene 6 (gas6) and vascular hemostasis. *Advances in nutrition*. 2012;3:196-203.
521. Yanagita M, Arai H, Ishii K, Nakano T, Ohashi K, Mizuno K, Varnum B, Fukatsu A, Doi T and Kita T. Gas6 regulates mesangial cell proliferation through Axl in experimental glomerulonephritis. *The American journal of pathology*. 2001;158:1423-1432.
522. Goruppi S, Ruaro E, Varnum B and Schneider C. Gas6-mediated survival in NIH3T3 cells activates stress signalling cascade and is independent of Ras. *Oncogene*. 1999;18:4224-36.
523. Bellosta P, Zhang Q, Goff SP and Basilico C. Signaling through the ARK tyrosine kinase receptor protects from apoptosis in the absence of growth stimulation. *Oncogene*. 1997;15:2387-97.
524. Goruppi S, Ruaro E and Schneider C. Gas6, the ligand of Axl tyrosine kinase receptor, has mitogenic and survival activities for serum starved NIH3T3 fibroblasts. *Oncogene*. 1996;12:471-480.
525. Qiu C, Zheng H, Tao H, Yu W, Jiang X, Li A, Jin H, Lv A and Li HJM. Vitamin K2 inhibits rat vascular smooth muscle cell calcification by restoring the Gas6/Axl/Akt anti-apoptotic pathway. *Molecular cellular biochemistry* 2017;433:149-159.
526. Nakano T, Kawamoto K, Higashino K-i and Arita H. Prevention of growth arrest-induced cell death of vascular smooth muscle cells by a product of growth arrest-specific gene, gas6. *FEBS letters*. 1996;387:78-80.
527. Ishimoto Y, Ohashi K, Mizuno K and Nakano T. Promotion of the uptake of PS liposomes and apoptotic cells by a product of growth arrest-specific gene, gas6. *The Journal of Biochemistry*. 2000;127:411-417.
528. Proudfoot D, Skepper JN, Hegyi L, Bennett MR, Shanahan CM and Weissberg PL. Apoptosis regulates human vascular calcification in vitro: evidence for initiation of vascular calcification by apoptotic bodies. *Circulation research*. 2000;87:1055-1062.
529. Fridell Y-WC, Villa J, Attar EC and Liu ET. GAS6 induces Axl-mediated chemotaxis of vascular smooth muscle cells. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273:7123-7126.
530. Melaragno MG, Wuthrich DA, Poppa V, Gill D, Lindner V, Berk BC and Corson MA. Increased expression of Axl tyrosine kinase after vascular injury and regulation by G protein-coupled receptor agonists in rats. *Circulation research*. 1998;83:697-704.

531. Alciato F, Sainaghi PP, Sola D, Castello L and Avanzi GC. TNF- α , IL-6, and IL-1 expression is inhibited by GAS6 in monocytes/macrophages. *Journal of leukocyte biology*. 2010;87:869-875.
532. Clauser S, Meilhac O, Bièche I, Raynal P, Bruneval P, Michel J-B, Borgel DJT and haemostasis. Increased secretion of Gas6 by smooth muscle cells in human atherosclerotic carotid plaques. *Thrombosis and haemostasis*. 2012;107:140-149.
533. Holden RM, Héту M-F, Li TY, Ward EC, Couture LE, Herr JE, Christilaw E, Adams MA and Johri AM. Circulating Gas6 is associated with reduced human carotid atherosclerotic plaque burden in high risk cardiac patients. *Clinical biochemistry*. 2019;64:6-11.
534. Lemke G. Biology of the TAM receptors. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2013;5:a009076.
535. Benzakour O, Formstone C, Rahman S, Kanthou C, Dennehy U, Scully M, Kakkar V and Cooper D. Evidence for a protein S receptor (s) on human vascular smooth muscle cells. Analysis of the binding characteristics and mitogenic properties of protein S on human vascular smooth muscle cells. *Biochemical Journal*. 1995;308:481-485.
536. Webb JH, Blom AM and Dahlbäck B. Vitamin K-dependent protein S localizing complement regulator C4b-binding protein to the surface of apoptotic cells. *The Journal of Immunology*. 2002;169:2580-2586.
537. Anderson HA, Maylock CA, Williams JA, Paweletz CP, Shu H and Shacter E. Serum-derived protein S binds to phosphatidylserine and stimulates the phagocytosis of apoptotic cells. *Nature immunology*. 2003;4:87.
538. Viegas CS, Simes DC, Laizé V, Williamson MK, Price PA and Cancela ML. Gla-rich protein (GRP), a new vitamin K-dependent protein identified from sturgeon cartilage and highly conserved in vertebrates. *Journal of biological chemistry*. 2008;283:36655-36664.
539. Viegas CS, Cavaco S, Neves PL, Ferreira A, João A, Williamson MK, Price PA, Cancela ML and Simes DC. Gla-rich protein is a novel vitamin K-dependent protein present in serum that accumulates at sites of pathological calcifications. *The American journal of pathology*. 2009;175:2288-2298.
540. Cavaco S, Viegas CS, Rafael MS, Ramos A, Magalhães J, Blanco FJ, Vermeer C and Simes DC. Gla-rich protein is involved in the cross-talk between calcification and inflammation in osteoarthritis. *Cellular and molecular life sciences*. 2016;73:1051-1065.
541. Viegas CS, Costa RM, Santos L, Videira PA, Silva Z, Araújo N, Macedo AL, Matos AP, Vermeer C and Simes DC. Gla-rich protein function as an anti-inflammatory agent in monocytes/macrophages: Implications for calcification-related chronic inflammatory diseases. *PloS one*. 2017;12:e0177829.
542. Ferland G. Vitamin K, an emerging nutrient in brain function. *Biofactors*. 2012;38:151-157.
543. Allen MP, Linseman DA, Udo H, Xu M, Schaack JB, Varnum B, Kandel ER, Heidenreich KA and Wierman ME. Novel mechanism for gonadotropin-releasing hormone neuronal migration involving Gas6/Ark signaling to p38 mitogen-activated protein kinase. *Molecular cellular biology* 2002;22:599-613.
544. Yagami T, Ueda K, Asakura K, Sakaeda T, Nakazato H, Kuroda T, Hata S, Sakaguchi G, Itoh N and Nakano T. Gas6 rescues cortical neurons from amyloid β protein-induced apoptosis. *Neuropharmacology*. 2002;43:1289-1296.
545. Shankar SL, O'Guin K, Kim M, Varnum B, Lemke G, Brosnan CF and Shafit-Zagardo B. Gas6/Axl signaling activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt1 survival pathway to protect

- oligodendrocytes from tumor necrosis factor α -induced apoptosis. *Journal of Neuroscience*. 2006;26:5638-5648.
546. Grommes C, Lee CD, Wilkinson BL, Jiang Q, Koenigsnecht-Talboo JL, Varnum B and Landreth GE. Regulation of microglial phagocytosis and inflammatory gene expression by Gas6 acting on the Axl/Mer family of tyrosine kinases. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*. 2008;3:130-140.
547. Gruber RC, Ray AK, Johndrow CT, Guzik H, Burek D, De Frutos PG and Shafit-Zagardo B. Targeted GAS6 delivery to the CNS protects axons from damage during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Neuroscience*. 2014;34:16320-16335.
548. Binder MD, Xiao J, Kemper D, Ma GZ, Murray SS and Kilpatrick TJ. Gas6 increases myelination by oligodendrocytes and its deficiency delays recovery following cuprizone-induced demyelination. *PLoS one*. 2011;6:e17727.
549. Tsiperson V, Li X, Schwartz GJ, Raine CS and Shafit-Zagardo B. GAS6 enhances repair following cuprizone-induced demyelination. *PLoS One*. 2010;5:e15748.
550. Goudarzi S, Rivera A, Butt AM and Hafizi S. Gas6 promotes oligodendrogenesis and myelination in the adult central nervous system and after lysolecithin-induced demyelination. *ASN neuro*. 2016;8:1759091416668430.
551. Ray AK, DuBois JC, Gruber RC, Guzik HM, Gulinello ME, Perumal G, Raine C, Kozakiewicz L, Williamson J and Shafit-Zagardo B. Loss of Gas6 and Axl signaling results in extensive axonal damage, motor deficits, prolonged neuroinflammation, and less remyelination following cuprizone exposure. *Glia*. 2017;65:2051-2069.
552. DiScipio AW and Burchard KW. Continuous arteriovenous hemofiltration attenuates polymorphonuclear leukocyte phagocytosis in porcine intra-abdominal sepsis. *American journal of surgery*. 1997;173:174-80.
553. Stitt TN, Conn G, Goret M, Lai C, Bruno J, Radzlejowski C, Mattsson K, Fisher J, Gies DR and Jones PF. The anticoagulation factor protein S and its relative, Gas6, are ligands for the Tyro 3/Axl family of receptor tyrosine kinases. *Cell*. 1995;80:661-670.
554. Zhu D, Wang Y, Singh I, Bell RD, Deane R, Zhong Z, Sagare A, Winkler EA and Zlokovic BV. Protein S controls hypoxic/ischemic blood-brain barrier disruption through the TAM receptor Tyro3 and sphingosine 1-phosphate receptor. *Blood*. 2010;115:4963-4972.
555. Liu D, Guo H, Griffin JH, Fernández JA and Zlokovic BV. Protein S confers neuronal protection during ischemic/hypoxic injury in mice. *Circulation*. 2003;107:1791-1796.
556. Zhong Z, Wang Y, Guo H, Sagare A, Fernández JA, Bell RD, Barrett TM, Griffin JH, Freeman RS and Zlokovic BV. Protein S Protects Neurons from Excitotoxic Injury by Activating the TAM Receptor Tyro3–Phosphatidylinositol 3-Kinase–Akt Pathway through Its Sex Hormone-Binding Globulin-Like Region. *Journal of Neuroscience*. 2010;30:15521-15534.
557. Zhu Y-z, Wang W, Xian N and Wu B. Inhibition of TYRO3/Akt signaling participates in hypoxic injury in hippocampal neurons. *Neural regeneration research*. 2016;11:752.
558. Zelentsova K, Talmi Z, Abboud-Jarrous G, Sapir T, Capucha T, Nassar M and Burstyn-Cohen T. Protein S regulates neural stem cell quiescence and neurogenesis. *Stem Cells*. 2017;35:679-693.
559. Olsen AS and Færgeman NJ. Sphingolipids: membrane microdomains in brain development, function and neurological diseases. *Open biology*. 2017;7:170069.
560. Sahu SK, Hannun YA and Yao N. Emergence of membrane sphingolipids as a potential therapeutic target. *Biochimie*. 2019.

561. Ferland G. Vitamin K and brain function. *Seminars in thrombosis and hemostasis*. 2013;39:849-855.
562. Maceyka M and Spiegel S. Sphingolipid metabolites in inflammatory disease. *Nature*. 2014;510:58.
563. Cutler RG, Kelly J, Storie K, Pedersen WA, Tammara A, Hatanpaa K, Troncoso JC and Mattson MP. Involvement of oxidative stress-induced abnormalities in ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004;101:2070-2075.
564. de Wit NM, Snkhchyan H, den Hoedt S, Wattimena D, de Vos R, Mulder MT, Walter J, Martinez-Martinez P, Hoozemans JJ and Rozemuller A. Altered sphingolipid balance in capillary cerebral amyloid angiopathy. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2017;60:795-807.
565. Lev M and Milford AF. The 3-ketodihydrosphingosine synthetase of *Bacteroides melaninogenicus*: induction by vitamin K. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1973;157:500-508.
566. Sundaram KS and Lev M. Regulation of sulfotransferase activity by vitamin K in mouse brain. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1990;277:109-113.
567. Sundaram K and Lev M. Warfarin administration reduces synthesis of sulfatides and other sphingolipids in mouse brain. *Journal of lipid research*. 1988;29:1475-1479.
568. Sundaram K, Fan J-H, Engelke J, Foley A, Suttie J and Lev M. Vitamin K status influences brain sulfatide metabolism in young mice and rats. *The Journal of nutrition*. 1996;126:2746-2751.
569. Carrie I, Portoukalian J, Vicaretti R, Rochford J, Potvin S and Ferland GJTJon. Menaquinone-4 concentration is correlated with sphingolipid concentrations in rat brain. *The Journal of nutrition*. 2004;134:167-172.
570. Carrié I, Bélanger E, Portoukalian J, Rochford J and Ferland G. Lifelong Low-Phylloquinone Intake Is Associated with Cognitive Impairments in Old Rats—3. *The Journal of nutrition*. 2011;141:1495-1501.
571. Presse N, Shatenstein B, Kergoat M-J and Ferland G. Low vitamin K intakes in community-dwelling elders at an early stage of Alzheimer's disease. *Journal of the American Dietetic Association*. 2008;108:2095-2099.
572. Sato Y, Nakamura R, Satoh M, Fujishita K, Mori S, Ishida S, Yamaguchi T, Inoue K, Nagao T and Ohno Y. Thyroid hormone targets matrix Gla protein gene associated with vascular smooth muscle calcification. *Circulation research*. 2005;97:550-557.
573. Chouet J, Ferland G, Feart C, Rolland Y, Presse N, Boucher K, Barberger-Gateau P, Beauchet O and Annweiler C. Dietary Vitamin K Intake Is Associated with Cognition and Behaviour among Geriatric Patients: The CLIP Study. *Nutrients*. 2015;7:6739-50.
574. Annweiler C, Ferland G, Barberger-Gateau P, Brangier A, Rolland Y and Beauchet O. Vitamin K antagonists and cognitive impairment: results from a cross-sectional pilot study among geriatric patients. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences*. 2015;70:97-101.
575. Brangier A, Ferland G, Rolland Y, Gautier J, Féart C and Annweiler CJN. Vitamin K antagonists and cognitive decline in older adults: a 24-month follow-up. *Nutrients*. 2018;10:666.
576. Li J, Lin JC, Wang H, Peterson JW, Furie BC, Furie B, Booth SL, Volpe JJ and Rosenberg PA. Novel role of vitamin k in preventing oxidative injury to developing oligodendrocytes and neurons. *Journal of Neuroscience*. 2003;23:5816-5826.

577. Nakajima M, Furukawa S, Hayashi K, Yamada A, Kawashima T and Hayashi Y. Age-dependent survival-promoting activity of vitamin K on cultured CNS neurons. *Developmental brain research*. 1993;73:17-23.
578. Reddi K, Henderson B, Meghji S, Wilson M, Poole S, Hopper C, Harris M and Hodges S. Interleukin 6 production by lipopolysaccharide-stimulated human fibroblasts is potently inhibited by naphthoquinone (vitamin K) compounds. *Cytokine*. 1995;7:287-290.
579. Moriya M, Nakatsuji Y, Okuno T, Hamasaki T, Sawada M and Sakoda S. Vitamin K2 ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats. *Journal of neuroimmunology*. 2005;170:11-20.
580. Ohsaki Y, Shirakawa H, Hiwatashi K, Furukawa Y, Mizutani T and Komai M. Vitamin K suppresses lipopolysaccharide-induced inflammation in the rat. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 2006;70:926-932.
581. Ohsaki Y, Shirakawa H, Miura A, Giriwono PE, Sato S, Ohashi A, Iribe M, Goto T and Komai M. Vitamin K suppresses the lipopolysaccharide-induced expression of inflammatory cytokines in cultured macrophage-like cells via the inhibition of the activation of nuclear factor κ B through the repression of IKK α/β phosphorylation. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2010;21:1120-1126.
582. Shea MK, Booth SL, Massaro JM, Jacques PF, D'Agostino Sr RB, Dawson-Hughes B, Ordovas JM, O'Donnell CJ, Kathiresan S and Keaney Jr JF. Vitamin K and vitamin D status: associations with inflammatory markers in the Framingham Offspring Study. *American journal of epidemiology*. 2007;167:313-320.
583. Shea MK, Dallal GE, Dawson-Hughes B, Ordovas JM, O'donnell CJ, Gundberg CM, Peterson JW and Booth SL. Vitamin K, circulating cytokines, and bone mineral density in older men and women-. *The American journal of clinical nutrition*. 2008;88:356-363.
584. Eichenbaum H, Yonelinas AP and Ranganath C. The medial temporal lobe and recognition memory. *Annual review of neuroscience*. 2007;30:123-52.
585. Patel D, Roy A, Kundu M, Jana M, Luan CH, Gonzalez FJ and Pahan K. Aspirin binds to PPAR α to stimulate hippocampal plasticity and protect memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2018;115:E7408-e7417.
586. Hossmann KA. Glutamate-mediated injury in focal cerebral ischemia: the excitotoxin hypothesis revised. *Brain Pathol*. 1994;4:23-36.
587. Clark VH, Resnick SM, Doshi J, Beason-Held LL, Zhou Y, Ferrucci L, Wong DF, Kraut MA and Davatzikos C. Longitudinal imaging pattern analysis (SPARE-CD index) detects early structural and functional changes before cognitive decline in healthy older adults. *Neurobiology of aging*. 2012;33:2733-2745.
588. Cooper LL, Woodard T, Sigurdsson S, van Buchem MA, Torjesen AA, Inker LA, Aspelund T, Eiriksdottir G, Harris TB, Gudnason V, Launer LJ and Mitchell GF. Cerebrovascular Damage Mediates Relations Between Aortic Stiffness and Memory. *Hypertension*. 2016;67:176-82.
589. Jefferson AL, Cambronero FE, Liu D, Moore EE, Neal JE, Terry JG, Nair S, Pechman KR, Rane S and Davis LT. Higher Aortic Stiffness Is Related to Lower Cerebral Blood Flow and Preserved Cerebrovascular Reactivity in Older Adults. *Circulation*. 2018:CIRCULATIONAHA.118.032410.
590. Tarantini S, Valcarcel-Ares NM, Yabluchanskiy A, Fulop GA, Hertelendy P, Gautam T, Farkas E, Perz A, Rabinovitch PS and Sonntag WE. Treatment with the mitochondrial-targeted

- antioxidant peptide SS-31 rescues neurovascular coupling responses and cerebrovascular endothelial function and improves cognition in aged mice. *Aging cell*. 2018;17:e12731.
591. Fabiani M, Gordon BA, Maclin EL, Pearson MA, Brumback-Peltz CR, Low KA, McAuley E, Sutton BP, Kramer AF and Gratton G. Neurovascular coupling in normal aging: a combined optical, ERP and fMRI study. *Neuroimage*. 2014;85:592-607.
592. Toth P, Tarantini S, Tucsek Z, Ashpole NM, Sosnowska D, Gautam T, Ballabh P, Koller A, Sonntag WE and Csiszar A. Resveratrol treatment rescues neurovascular coupling in aged mice: role of improved cerebrovascular endothelial function and downregulation of NADPH oxidase. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2013;306:H299-H308.
593. Mitschelen M, Garteiser P, Carnes B, Farley J, Doblaz S, Demoe J, Warrington J, Yan H, Nicolle M and Towner R. Basal and hypercapnia-altered cerebrovascular perfusion predict mild cognitive impairment in aging rodents. *Neuroscience*. 2009;164:918-928.
594. Lourenço CF, Ledo A, Caetano M, Barbosa RM and Laranjinha J. Age-dependent impairment of neurovascular and neurometabolic coupling in the hippocampus. *Frontiers in physiology*. 2018;9.
595. Sadekova N, Iulita MF, Vallerand D, Muhire G, Bourmoum M, Claing A and Girouard H. Arterial stiffness induced by carotid calcification leads to cerebral gliosis mediated by oxidative stress. *J Hypertens*. 2018;36:286-298.
596. Sonntag WE, Lynch CD, Cooney PT and Hutchins PM. Decreases in cerebral microvasculature with age are associated with the decline in growth hormone and insulin-like growth factor 1. *Endocrinology*. 1997;138:3515-3520.
597. Sofroniew MV. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends in neurosciences*. 2009;32:638-647.
598. Storck SE, Meister S, Nahrath J, Meißner JN, Schubert N, Di Spiezio A, Baches S, Vandenbroucke RE, Bouter Y and Prikulis I. Endothelial LRP1 transports amyloid- β 1-42 across the blood-brain barrier. *The Journal of clinical investigation*. 2016;126:123-136.
599. Montagne A, Barnes SR, Sweeney MD, Halliday MR, Sagare AP, Zhao Z, Toga AW, Jacobs RE, Liu CY and Amezcua L. Blood-brain barrier breakdown in the aging human hippocampus. *Neuron*. 2015;85:296-302.
600. Oveisgharan S and Hachinski V. Hypertension, executive dysfunction, and progression to dementia: the canadian study of health and aging. *Archives of neurology*. 2010;67:187-192.
601. Goodman T, Trouche S, Massou I, Verret L, Zerwas M, Roullet P and Rampon C. Young hippocampal neurons are critical for recent and remote spatial memory in adult mice. *Neuroscience*. 2010;171:769-778.
602. Sadekova N, Vallerand D, Guevara E, Lesage F and Girouard H. Carotid calcification in mice: a new model to study the effects of arterial stiffness on the brain. *Journal of the American Heart Association*. 2013;2:e000224.
603. Morris R, Garrud P, Rawlins Ja and O'Keefe J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature*. 1982;297:681.
604. Bannerman D, Yee B, Good M, Heupel M, Iversen S and Rawlins J. Double dissociation of function within the hippocampus: a comparison of dorsal, ventral, and complete hippocampal cytotoxic lesions. *Behavioral neuroscience*. 1999;113:1170.
605. Hughes TM, Kuller LH, Barinas-Mitchell EJ, McDade EM, Klunk WE, Cohen AD, Mathis CA, DeKosky ST, Price JC and Lopez OL. Arterial stiffness and β -amyloid progression in nondemented elderly adults. *JAMA neurology*. 2014;71:562-568.

606. Hughes TM, Kuller LH, Barinas-Mitchell EJ, Mackey RH, McDade EM, Klunk WE, Aizenstein HJ, Cohen AD, Snitz BE and Mathis CA. Pulse wave velocity is associated with β -amyloid deposition in the brains of very elderly adults. *Neurology*. 2013;81:1711-1718.
607. Lv X, Li W, Luo Y, Wang D, Zhu C, Huang Z-X and Tan X. Exploring the differences between mouse mA β 1–42 and human hA β 1–42 for Alzheimer's disease related properties and neuronal cytotoxicity. *Chemical Communications*. 2013;49:5865-5867.
608. Jankowsky JL, Younkin LH, Gonzales V, Fadale DJ, Slunt HH, Lester HA, Younkin SG and Borchelt DR. Rodent A β modulates the solubility and distribution of amyloid deposits in transgenic mice. *Journal of Biological Chemistry*. 2007.
609. Poels MM, Ikram MA, van der Lugt A, Hofman A, Krestin GP, Breteler MM and Vernooij MW. Incidence of cerebral microbleeds in the general population: the Rotterdam Scan Study. *Stroke*. 2011;42:656-61.
610. Corrada MM, Sonnen JA, Kim RC and Kawas CH. Microinfarcts are common and strongly related to dementia in the oldest-old: The 90+ study. *Alzheimers Dement*. 2016;12:900-8.
611. Akoudad S, Portegies ML, Koudstaal PJ, Hofman A, van der Lugt A, Ikram MA and Vernooij MW. Cerebral Microbleeds Are Associated With an Increased Risk of Stroke: The Rotterdam Study. *Circulation*. 2015;132:509-16.
612. Akoudad S, de Groot M, Koudstaal PJ, van der Lugt A, Niessen WJ, Hofman A, Ikram MA and Vernooij MW. Cerebral microbleeds are related to loss of white matter structural integrity. *Neurology*. 2013;81:1930-7.
613. Poels MM, Ikram MA, van der Lugt A, Hofman A, Niessen WJ, Krestin GP, Breteler MM and Vernooij MW. Cerebral microbleeds are associated with worse cognitive function: the Rotterdam Scan Study. *Neurology*. 2012;78:326-33.
614. Ding J, Mitchell GF, Bots ML, Sigurdsson S, Harris TB, Garcia M, Eiriksdottir G, van Buchem MA, Gudnason V and Launer LJ. Carotid arterial stiffness and risk of incident cerebral microbleeds in older people: the Age, Gene/Environment Susceptibility (AGES)-Reykjavik study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015;35:1889-95.
615. Kinjo Y, Ishida A, Kinjo K and Ohya Y. A high normal ankle-brachial index combined with a high pulse wave velocity is associated with cerebral microbleeds. *J Hypertens*. 2016;34:1586-93.
616. Capone C, Anrather J, Milner TA and Iadecola C. Estrous cycle-dependent neurovascular dysfunction induced by angiotensin II in the mouse neocortex. *Hypertension*. 2009;54:302-7.
617. Girouard H, Lessard A, Capone C, Milner TA and Iadecola C. The neurovascular dysfunction induced by angiotensin II in the mouse neocortex is sexually dimorphic. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2008;294:H156-63.
618. Wang Q, Santizo R, Baughman VL, Pelligrino DA and Iadecola C. Estrogen provides neuroprotection in transient forebrain ischemia through perfusion-independent mechanisms in rats. *Stroke*. 1999;30:630-7.
619. Razmara A, Sunday L, Stirone C, Wang XB, Krause DN, Duckles SP and Procaccio V. Mitochondrial effects of estrogen are mediated by estrogen receptor α in brain endothelial cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2008;325:782-790.
620. Guo J, Krause DN, Horne J, Weiss JH, Li X and Duckles SP. Estrogen-receptor-mediated protection of cerebral endothelial cell viability and mitochondrial function after ischemic insult in vitro. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2010;30:545-554.

621. Acaz-Fonseca E, Sanchez-Gonzalez R, Azcoitia I, Arevalo MA and Garcia-Segura LM. Role of astrocytes in the neuroprotective actions of 17 β -estradiol and selective estrogen receptor modulators. *Molecular and cellular endocrinology*. 2014;389:48-57.
622. Sunday L, Tran MM, Krause DN and Duckles SP. Estrogen and progestagens differentially modulate vascular proinflammatory factors. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2006;291:E261-E267.
623. Ospina JA, Brevig HN, Krause DN and Duckles SP. Estrogen suppresses IL-1b-mediated induction of COX-2 pathway in rat cerebral blood vessels. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2004;55:H2010.
624. Miller AP, Feng W, Xing D, Weathington NM, Blalock JE, Chen Y-F and Oparil S. Estrogen modulates inflammatory mediator expression and neutrophil chemotaxis in injured arteries. *Circulation*. 2004;110:1664-1669.
625. Shi J, Zhang Y and Simpkins J. Effects of 17 β -estradiol on glucose transporter 1 expression and endothelial cell survival following focal ischemia in the rats. *Experimental brain research*. 1997;117:200-206.
626. Mattson MP, Robinson N and Guo Q. Estrogens stabilize mitochondrial function and protect neural cells against the pro-apoptotic action of mutant presenilin-1. *Neuroreport*. 1997;8:3817-3821.
627. Garcia-Segura LM, Cardona-Gomez P, Naftolin F and Chowen JA. Estradiol upregulates Bcl-2 expression in adult brain neurons. *Neuroreport*. 1998;9:593-597.
628. Liu A, Tian L, Golob M, Eickhoff JC, Boston M and Chesler NC. 17beta-Estradiol Attenuates Conduit Pulmonary Artery Mechanical Property Changes With Pulmonary Arterial Hypertension. *Hypertension*. 2015;66:1082-8.
629. Shufelt C, Elboudwarej O, Johnson BD, Mehta P, Bittner V, Braunstein G, Berga S, Stanczyk F, Dwyer K and Merz CNB. Carotid Artery Distensibility and Hormone Therapy and Menopause: The Los Angeles Atherosclerosis Study (LAAS). *Menopause (New York, NY)*. 2016;23:150.
630. O'Neill S, Liu J, O'Rourke M and Khoo S. The menopausal transition does not appear to accelerate age-related increases in arterial stiffness. *Climacteric*. 2012;16:62-69.
631. Kritz-Silverstein D, Barrett-Connor E and Wingard DL. Hysterectomy, oophorectomy, and heart disease risk factors in older women. *American Journal of Public Health*. 1997;87:676-680.
632. Mayer LP, Devine PJ, Dyer CA and Hoyer PB. The follicle-deplete mouse ovary produces androgen. *Biology of reproduction*. 2004;71:130-138.
633. Koebele SV and Bimonte-Nelson HA. Modeling menopause: The utility of rodents in translational behavioral endocrinology research. *Maturitas*. 2016;87:5-17.
634. Mayer LP, Pearsall NA, Christian PJ, Devine PJ, Payne CM, McCuskey MK, Marion SL, Sipes IG and Hoyer PB. Long-term effects of ovarian follicular depletion in rats by 4-vinylcyclohexene diepoxide. *Reproductive Toxicology*. 2002;16:775-781.
635. Carrie I, Portoukalian J, Vicaretti R, Rochford J, Potvin S and Ferland G. Menaquinone-4 concentration is correlated with sphingolipid concentrations in rat brain. *The Journal of nutrition*. 2004;134:167-172.
636. Tamadon-Nejad S, Ouliass B, Rochford J and Ferland G. Vitamin K Deficiency Induced by Warfarin Is Associated With Cognitive and Behavioral Perturbations, and Alterations in Brain Sphingolipids in Rats. *Frontiers in aging neuroscience*. 2018;10:213.

637. Hanyu H, Sato T, Hirao K, Kanetaka H, Iwamoto T and Koizumi K. The progression of cognitive deterioration and regional cerebral blood flow patterns in Alzheimer's disease: a longitudinal SPECT study. *Journal of the neurological sciences*. 2010;290:96-101.
638. Pierce A, Bliesner B, Xu M, Nielsen-Preiss S, Lemke G, Tobet S and Wierman ME. Axl and Tyro3 modulate female reproduction by influencing gonadotropin-releasing hormone neuron survival and migration. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)*. 2008;22:2481-95.
639. Yagami T, Ueda K, Asakura K, Sakaeda T, Nakazato H, Kuroda T, Hata S, Sakaguchi G, Itoh N, Nakano T, Kambayashi Y and Tsuzuki H. Gas6 rescues cortical neurons from amyloid beta protein-induced apoptosis. *Neuropharmacology*. 2002;43:1289-96.
640. Yagami T, Ueda K, Asakura K, Okamura N, Sakaeda T, Sakaguchi G, Itoh N, Hashimoto Y, Nakano T and Fujimoto M. Effect of Gas6 on secretory phospholipase A2-IIA-induced apoptosis in cortical neurons. *Brain research*. 2003;985:142-149.
641. Alciato F, Sainaghi PP, Sola D, Castello L and Avanzi GC. TNF-alpha, IL-6, and IL-1 expression is inhibited by GAS6 in monocytes/macrophages. *Journal of leukocyte biology*. 2010;87:869-75.
642. Ji R, Meng L, Li Q and Lu Q. TAM receptor deficiency affects adult hippocampal neurogenesis. *Metabolic brain disease*. 2015;30:633-44.
643. Liu D, Guo H, Griffin JH, Fernandez JA and Zlokovic BV. Protein S confers neuronal protection during ischemic/hypoxic injury in mice. *Circulation*. 2003;107:1791-6.
644. Zhu D, Wang Y, Singh I, Bell RD, Deane R, Zhong Z, Sagare A, Winkler EA and Zlokovic BV. Protein S controls hypoxic/ischemic blood-brain barrier disruption through the TAM receptor Tyro3 and sphingosine 1-phosphate receptor. *Blood*. 2010:blood-2010-01-262386.
645. Murshed M, Schinke T, McKee MD and Karsenty G. Extracellular matrix mineralization is regulated locally; different roles of two gla-containing proteins. *The Journal of cell biology*. 2004;165:625-630.