

Université de Montréal

**Impact du stress oxydant et de l'athérosclérose sur la
fonction vasculaire cérébrale au cours du vieillissement.**

par

Annick Drouin

Département de Physiologie, Université de Montréal
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Doctorat
en Physiologie

Octobre, 2009

© Annick Drouin, 2009

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Impact du stress oxydant et de l'athérosclérose sur la fonction vasculaire cérébrale au
cours du vieillissement.

présentée par :

Annick Drouin

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Réjean Couture, président-rapporteur

Dr. Éric Thorin, directeur de recherche

Dr. Hélène Girouard, membre du jury

Dr. Bernard Lévy, examinateur externe

Dr. Marc Servant, représentant du doyen de la FES

Résumé

Dans les neurones et les cellules vasculaires cérébrales, les dérivés réactifs de l'oxygène jouent un double rôle puisqu'ils peuvent avoir à la fois des effets bénéfiques, à faibles concentrations, et des effets délétères, à des concentrations élevées. Chez la souris, la circulation cérébrale se distingue des autres lits vasculaires puisque le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est le principal médiateur endothélial relaxant endogène. L'objectif de notre première étude a été de caractériser l'implication physiologique du H_2O_2 dérivé de la eNOS dans la fonction endothéliale cérébrale de la souris. Nous avons voulu identifier les mécanismes impliqués dans la dilatation induite par l'augmentation de débit intra-luminal (*flow-mediated dilation*, FMD). La FMD est la réponse à un stimulus physiologique endothélial la plus représentative de la situation *in vivo*. Nous avons démontré que le H_2O_2 , et non le monoxyde d'azote (NO), dérivant de l'activation de la eNOS cérébrale, est le principal médiateur de la FMD. Cependant, nous connaissons très peu de données sur l'évolution de la voie du H_2O_2 au cours du vieillissement qu'il soit associé ou non aux facteurs de risque pour les maladies cardiovasculaires.

Au cours du vieillissement, au niveau périphérique, les facteurs endothéliaux constricteurs ou dilatateurs évoluent en fonction de l'augmentation de stress oxydant. La présence de facteurs de risque pour les maladies cardiovasculaires, telle que l'hypercholestérolémie, pourrait accentuer l'augmentation du stress oxydant et ainsi accélérer la dysfonction endothéliale. Au niveau cérébral, très peu de données sont disponibles. Dans le cadre de notre deuxième étude, nous avons émis l'hypothèse qu'un déséquilibre des facteurs endothéliaux pourrait être à l'origine (1) de la dysfonction endothéliale cérébrale observée au cours du vieillissement et (2) de la dysfonction endothéliale précoce qui apparaît en présence d'athérosclérose. Nos résultats ont montré que l'augmentation de stress oxydant associée au vieillissement conduit à une libération endogène accrue de TXA_2 qui diminue la voie du H_2O_2 au niveau cérébral et, par conséquent, réduit la dilatation dépendante de l'endothélium. De plus, la présence d'athérosclérose accélère l'apparition de la dysfonction endothéliale cérébrale. Le rôle clé joué par le stress oxydant a été confirmé par un traitement préventif avec l'antioxydant

catéchine qui a permis de renverser tous les effets délétères de l'athérosclérose sur les fonctions endothéliales cérébrales.

Finalement, la dysfonction endothéliale cérébrale précoce, associée avec l'athérosclérose, pourrait non seulement augmenter l'incidence de développer des accidents vasculaires cérébraux (AVC) mais aussi induire une diminution du débit sanguin cérébral et, ultimement, affecter les fonctions neuronales. Dans le cadre de notre troisième étude, nous avons émis l'hypothèse que l'augmentation de stress oxydant est associée avec une diminution du débit sanguin cérébral et un déclin subséquent des fonctions cognitives. Nous avons utilisé des souris athérosclérotiques âgées de 3 mois que nous avons soumises, ou pas, à un traitement chronique à la catéchine. Nos travaux montrent qu'un traitement préventif avec la catéchine peut prévenir les effets néfastes de l'athérosclérose sur la FMD, le débit sanguin et le déclin des fonctions cognitives qui est normalement associé au vieillissement.

Nos résultats ont permis de distinguer l'effet du vieillissement des effets de l'athérosclérose sur les fonctions vasculaires cérébrales. Le traitement préventif avec la catéchine a eu des effets bénéfiques marqués sur la fonction endothéliale cérébrale, le débit sanguin cérébral et les fonctions cognitives, démontrant le rôle clé de l'environnement *redox* dans la régulation des fonctions cérébrales.

Mots-clés : Circulation cérébrale, peroxyde d'hydrogène, endothélium, vieillissement, athérosclérose, fonction cérébrale.

Abstract

Reactive oxygen species can have different roles in neurons and cerebral vascular cells as low concentrations are beneficial while unlikable effects are observed at higher concentrations. Mice cerebral circulation is different from other vascular beds as hydrogen peroxide (H_2O_2) is a major endogenous endothelium-derived relaxing factor. The objective of our first study was to characterize the physiological implication of H_2O_2 derived from eNOS activation in mice cerebral arteries. We tried to identify the mechanisms implicated in flow-mediated dilation (FMD), the most physiological reactive endothelial function. Our study suggested that H_2O_2 , but not nitric oxide, derived from cerebral eNOS activity was the main factor implicated in the regulation of FMD. However, the evolution of this dilatory pathway through ageing associated or not with risk factors for cardiovascular diseases is poorly understood.

Ageing is associated with increase oxidative stress and endothelial dysfunction, the later characterized by an imbalance in the release of endothelial constricting and relaxing factors. Risk factors for cardiovascular diseases, such as hypercholesterolemia, can increase oxidative stress and could hasten endothelial dysfunction. However, the evolution of the endothelial factors through ageing, particularly H_2O_2 dilatory pathway, in the cerebral circulation is still not well described. In our second study, we hypothesise that alterations in endothelial factors might be responsible for (1) cerebral endothelial dysfunction observed during ageing and (2) the accelerated endothelial dysfunction associated with atherosclerosis. Our results suggested that increased in oxidative stress associated with ageing leads to the release of endogenous TXA_2 , which in turn, reduces eNOS activity and, consequently, reduces endothelial-dependent dilation. Furthermore, we found that oxidative stress increase associated with atherosclerosis hastens cerebral endothelial dysfunction in mice. The implication of oxidative stress was confirmed by the beneficial effect of the antioxidant catechin on atherosclerosis associated cerebral endothelial function.

Finally, premature cerebral endothelial dysfunction observed during atherosclerosis could not only be associated with increase stroke incidence but also associated with a reduction in cerebral blood flow and, ultimately, a decrease in cognitive

function. For our third study, we hypothesise that oxidative stress increase during atherosclerosis is associated with reduced cerebral blood flow and an accelerated cognitive function decline normally associated with ageing. We treated 3 month-old atherosclerotic mice with the antioxidant catechin and used untreated mice as controls. Our results suggested that catechin treatment can prevent the decrease in FMD, the decrease in cerebral blood flow and cognitive function decline observed during atherosclerosis.

Taken together, our study allows to distinguish the effect of ageing and atherosclerosis on cerebrovascular function. Catechin treatment had beneficial effects on endothelial dilation, cerebral blood flow and cognitive function suggesting that the *redox* environment is a key player in the regulation of cerebral function.

Keywords : Cerebral circulation, hydrogen peroxide, endothelium, ageing, atherosclerosis, cerebral function.

Table des matières

RÉSUMÉ	III
ABSTRACT	V
TABLE DES MATIÈRES	VII
LISTE DES TABLES	XI
LISTE DES FIGURES	XII
ABRÉVIATIONS	XIII
REMERCIEMENTS	XIX
REVUE DE LA LITTÉRATURE	22
1 REVUE DE LA LITTÉRATURE	23
1.1 LA CIRCULATION CEREBRALE	23
1.1.1 <i>Particularités des artères cérébrales</i>	23
1.1.2 <i>L'autorégulation</i>	26
1.1.2.1 La réponse myogénique.....	27
1.1.3 <i>L'hyperémie fonctionnelle</i>	27
1.2 LES TYPES CELLULAIRES DU CERVEAU	29
1.2.1 <i>Les neurones</i>	30
1.2.2 <i>Les astrocytes</i>	31
1.2.3 <i>L'endothélium et la barrière hémato-encéphalique</i>	32
1.3 LES FONCTIONS DE L'ENDOTHELIUM VASCULAIRE CEREBRAL.....	34
1.3.1 <i>Les facteurs dilatateurs dérivés de l'endothélium (EDRF) cérébraux</i>	34
1.3.1.1 Le monoxyde d'azote (NO) et les NO synthases	36
1.3.1.2 Les dérivés de la COX et des cytochromes P450	39
1.3.1.3 Les EDHF.....	42
1.3.1.4 Les dérivés réactifs de l'oxygène (DRO)	43
1.3.2 <i>Les facteurs constricteurs dérivés de l'endothélium (EDCF) cérébraux</i>	46
1.3.2.1 Le Thromboxane A ₂ (TXA ₂) et autres dérivés de l'AA	46
1.3.2.2 Les dérivés réactifs de l'oxygène (DRO)	48
1.3.2.3 L'endothéline de type 1 (ET-1).....	49
1.3.2.4 L'angiotensine II (ANG II).....	50
1.3.3 <i>L'impact des cellules endothéliales sur les artères cérébrales</i>	51

1.3.3.1	Le tonus myogénique (TM).....	52
1.3.3.2	Vasodilatation/Vasoconstriction	54
1.3.3.3	Les dilatations et contractions induites par le débit sanguin (FMD/FMC).....	55
1.4	LE VIEILLISSEMENT VASCULAIRE ENDOTHELIAL ET CEREBRAL	57
1.4.1	<i>Radicaux libres et stress oxydant</i>	60
1.4.2	<i>Théorie radicalaire du vieillissement</i>	63
1.4.3	<i>Maladies associées au vieillissement cérébral</i>	66
1.5	L'ATHEROSCLEROSE	67
1.5.1	<i>Implication de l'athérosclérose au niveau cérébral</i>	70
1.5.2	<i>L'athérosclérose et les COX</i>	72
1.5.3	<i>L'athérosclérose et le NO</i>	75
1.6	LES ANTIOXYDANTS.....	76
1.6.1	<i>Les antioxydants endogènes</i>	76
1.6.1.1	Les antioxydants endogènes enzymatiques.....	76
1.6.1.2	Les antioxydants endogènes non-enzymatiques	77
1.6.2	<i>Les antioxydants exogènes</i>	78
1.6.2.1	Les polyphénols et les catéchines	78
1.6.2.2	Les Polyphénols et la fonction endothéliale.....	79
1.6.2.3	L'effet des polyphénols sur le développement de l'athérosclérose	82
1.6.2.4	Les polyphénols, le vieillissement et les maladies neurodégénératives.....	85
2	RAISONNEMENT ET DEMARCHE	88
3	MATERIELS ET METHODES	92
3.1	CONDITIONS EXPERIMENTALES.....	92
3.2	MODELE ANIMAL.....	92
3.2.1	<i>Souris témoins</i>	92
3.2.2	<i>Souris athérosclérotiques (ATX)</i>	92
3.2.3	<i>Traitement avec un antioxydant</i>	93
3.3	PRESSIONS ET PRELEVEMENT SANGUINS.....	94
3.3.1	<i>Dosages sanguins</i>	94
3.4	QUANTIFICATION DE LA PLAQUE AORTIQUE	94
3.5	ÉTUDES DE REACTIVITE	94
3.5.1	<i>Prélèvement des artères cérébrales</i>	97
3.5.2	<i>Principe de l'artériographe</i>	97
3.5.2.1	Description du montage.....	97
3.5.3	<i>Modification effectuée pour les études de débit</i>	99

3.5.4	<i>Protocole de réactivité</i>	99
3.5.5	<i>Protocole des études de débit</i>	100
3.5.6	<i>Utilisation d'inhibiteurs</i>	102
3.5.6.1	Étude #1.....	102
3.5.6.2	Études #2 et #3.....	103
3.6	ÉTUDES DE FLUORESCENCE.....	103
3.6.1	<i>Principe de la fluorescence</i>	103
3.6.2	<i>Protocole des études de fluorescence</i>	104
3.7	ÉTUDES DE STRESS OXYDATIF.....	106
3.7.1	<i>Préparation des tissus</i>	106
3.7.2	<i>Protocole utilisé pour le marquage de l'anion superoxide</i>	106
3.8	ÉTUDES DE DEBIT SANGUIN CEREBRAL.....	107
3.8.1	<i>Principe du laser Doppler</i>	107
3.8.2	<i>Protocole des études de débit sanguin cérébral</i>	108
3.9	ÉTUDES DE COMPORTEMENT.....	108
3.9.1	<i>Principe du Water maze</i>	109
3.9.2	<i>Protocole effectué</i>	109
3.10	ANALYSES DE L'EXPRESSION DES PROTEINES PAR WESTERN BLOT.....	110
3.10.1	<i>Isolation des vaisseaux cérébraux</i>	110
3.10.2	<i>Extraction des protéines</i>	111
3.10.3	<i>Expression des protéines (Western blot)</i>	111
3.11	CALCULS ET STATISTIQUES.....	112
4	ARTICLES	115
	ÉTUDE # 1.....	115
	ÉTUDE # 2.....	148
	ÉTUDE # 3.....	181
5	DISCUSSION	216
5.1	LES DRO AU NIVEAU CEREBRAL : EFFETS BENEFIQUES OU DELETERES ?.....	216
5.1.1	<i>Le H₂O₂ en tant que médiateur</i>	216
5.1.2	<i>Mais qu'en est-il du NO ?</i>	218
5.1.3	<i>Les effets néfastes des DRO</i>	218
5.2	L'IMPACT DU VIEILLISSEMENT ET DE L'ATHEROSCLEROSE SUR LA VOIE DU H ₂ O ₂	220

5.3	IMPACT DU VIEILLISSEMENT ET DE L'ATHEROSCLEROSE SUR LA LIBERATION DES FACTEURS ENDOTHELIAUX CEREBRAUX.....	221
5.3.1	<i>Le stress oxydant, la NOS et le TXA₂ : à qui la victoire?.....</i>	223
5.4	DES CELLULES ENDOTHELIALES ET/OU LES NEURONES, QUI CONTROLENT LE DEBIT SANGUIN CEREBRAL ?.....	224
5.4.1	<i>Débit sanguin et fonctions cognitives, quel est le lien?.....</i>	226
5.5	LA CATECHINE DANS LA PROTECTION DES FACTEURS ENDOTHELIAUX ET DES FONCTIONS COGNITIVES.....	227
5.6	LIMITATIONS DES ETUDES.....	228
6	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	231
7	BIBLIOGRAPHIE.....	234

Liste des tables

Table 1. Dosages des niveaux de cholestérol, de LDL et de triglycérides (TG) contenus dans le sérum de tous les modèles de souris utilisés au cours des différentes études.	93
---	----

Liste des figures

Figure 1. Schématisation de la circulation cérébrale montrant les particularités des artères piales et des artérioles pénétrantes ainsi que la proximité des astrocytes.....	25
Figure 2. Représentation schématique des différents EDRF et EDCF identifiés au cours des dernières années.....	35
Figure 3. Résumé du mécanisme d'activation de la NOS et de dilatation du NO dans les cellules endothéliales cérébrales.....	37
Figure 4. Schématisation du métabolisme de l'AA par la COX-1.....	40
Figure 5. Représentation schématique des différentes sources ainsi que des différents mécanismes d'action du H ₂ O ₂ dans les cellules vasculaires.....	45
Figure 6. Changement de diamètre dans les artères cérébrales de souris suite à (A) une augmentation de pression à débit constant et (B) une augmentation de débit sans changement de pression intra-luminale.	53
Figure 7. Les différentes sources et réponses aux DRO. En condition normale, la production de DRO et la capacité antioxydante sont en équilibre et l'homéostasie cellulaire est maintenue. Lorsque l'équilibre est perdu (soit à la hausse ou à la baisse), l'homéostasie est altérée et des maladies, le vieillissement, puis la mort cellulaire surviennent.....	61
Figure 8. Section longitudinale d'une artère montrant le développement et la progression de l'athérosclérose	68
Figure 9. Effets des polyphénols sur la libération de médiateurs endothéliaux.....	81
Figure 10. Effet des polyphénols sur le développement et la progression de l'athérosclérose.....	84
Figure 11. Base du cerveau montrant les principales artères. Les artères postérieures et moyennes ont été utilisées dans cette étude.....	96
Figure 12. (A) Représentation graphique des composantes du montage de l'artériographe. (B) Représentation graphique des changements effectués sur l'artériographe pour les études de la fonction endothéliale en fonction de l'augmentation de débit.....	98
Figure 13. Exemple de protocole utilisé pour les études de réactivité.....	101
Figure 14. Représentation du système «HyperSwitch» utilisé lors des études de fluorescence	105

Abréviations

AA	Acide arachidonique
A ₂ A	Récepteur de l'adénosine
AC	Adénylate cyclase
ACE	Enzyme de conversion de l'angiotensine
ACh	Acétylcholine
AD	Maladie d'Alzheimer
ADP	Adénosine diphosphate
ADMA	Diméthylarginine asymétrique
ADN	Acide désoxyribonucléique
AGE	« <i>Advanced glycation endproducts</i> »
AMPc	3',5'-adénosine monophosphate cyclique
Ang II	Angiotensine II
Ang III	Angiotensine III
Ang IV	Angiotensine IV
APA	Apamine
APO	Apocynine
AT	Récepteur de l'angiotensine
ATX	Souris athérosclérotiques
ATP	Adénosine triphosphate
AVC	Accident vasculaire cérébral
BBB	Barrière hémato-encéphalique
BH ₄	Tétrahydrobioptérine
BK	Bradykinine
BK _{ca}	Canaux potassiques à grande conductance
Ca ²⁺	Ion calcium
CaM	Calmoduline
Cav-1	Cavéoline-1
CGRP	Gène de la calcitonine
ChAT	Choline acetyltransférase
Chtx	Charybdotoxine

Cl ⁻	Ion chlore
CNP	Peptide natriurétique de type C
CO ₂	Dioxyde de carbone
COX	Cyclooxygénase
CYP	Cytochrome
DAF-2	4,5-diaminofluoresceine diacétate
DAG	Diacylglycérol
D _{ap}	Diamètre après l'expérience
D _{av}	Diamètre avant l'expérience
DCFDA	5-(et-6)-chlorométhyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacétate, acétyl ester
DETC	Diéthylthiocarbamate d'argent
DHE	Dihydroéthidium
D _{max}	Diamètre maximal
D _{min}	Diamètre minimal
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DRO	Dérivés réactifs de l'oxygène
DTT	Dithiothréitol
D _v	Diamètre variable
ECE	Enzyme de conversion de l'endothéline
EDCF	Facteur de constriction dérivé de l'endothélium
EDHF	Facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium
EDRF	Facteur relaxant dérivé de l'endothélium
EDTA	Acide éthylène diamine tétra-acétique
EET	Acide époxieicosatriénoïque
EGTA	Acide éthylène glycol-bis (2-aminoéthyléther)-N,N,N',N'-tétraacétique
eNOS	Isoforme endothéliale de la monoxyde d'azote synthase
ET	Endothéline
FAD	Flavine adénine dinucléotide
FMC	Contraction induite par l'augmentation de débit
FMD	Dilatation induite par l'augmentation de débit
FMN	Flavine mononucléotide

FUR	Furegrelate
G	Protéine de type G
GABA	Acide gamma-aminobutyrique
GCs	Guanylate cyclase soluble
GFAP	Protéine acide gliale fibrillaire
GMPc	3'-5'-guanosine monophosphate cyclique
GTP	Guanosine tri-phosphate
H ⁺	Ion hydrogène
HETE	Acides hydroxyéicosatétraenoïques
HDL	Lipoprotéine de haute densité
HNE	4-hydroxynonanal
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
Hrp	Horseradish peroxydase
IK _{ca}	Canaux potassiques à conductance intermédiaire
INDO	Indométhacine
iNOS	Isoforme inductible de la monoxyde d'azote synthase
IP ₃	Inositol triphosphate
JAM	<i>Junctional adhesion molecule</i>
K ⁺	Ion potassique
K _{atp}	Canaux potassique sensible à l'ATP
KCl	Chlorure de potassium
LDL	Lipoprotéines de faible densité
L-NNA	N ^o -nitro-L-arginine
L-NAME	L- nitro-L-arginine méthyl ester
L-MMA	N-monométhyl-L-arginine
LOX	Lipoxygénase
MAP	Pression artérielle moyenne
MCA	Artères cérébrales moyennes
MCP-1	Protéine chémoattractante monocytaire de type 1
MDA	Malondialdéhyde
MLC	Chaîne légère de myosine

mtADN	ADN mitochondrial
MWM	<i>Morris Water Maze</i>
N ₂	Azote
Na ⁺	Ion sodium
NaCl	Chlorure de sodium
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
nNOS	Isoforme neuronale de la monoxyde d'azote synthase
NO	Monoxyde d'azote
NO·	Radical du monoxyde d'azote
NOS	Monoxyde d'azote synthase
O ₂ ⁻	Anion superoxyde
O ₂	Oxygène
OCT	<i>Optimal Cutting Temperature compound</i>
ODQ	1H-[1,2,4]Oxadiazolo-[4,3a]quinoxalin-1-one
OH·	Radical hydroxyle
ONOO ⁻	Péroxynitrite
P450	Cytochrome P450
Pav	Pression intra-artérielle
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCO ₂	Pression partielle du dioxyde de carbone
PE	Phényléphrine
PEG-Cat	PEG-catalase
PGD ₂	Prostaglandine de type D ₂
PGE ₂	Prostaglandine de type E ₂
PGF _{2α}	Prostaglandine de type F _{2α}
PGI ₂	Prostacycline
PGH ₂	Prostaglandine de type H ₂
PGs	Prostaglandines
PI3-k	Phosphatidylinositol-3-kinase
PKA	Protéine kinase A dépendante de l'AMPc
PKC	Protéine kinase de type C

PKG	Protéine kinase G dépendante de la GMPc
PLA ₂	Phospholipase de type A ₂
PLC	Phospholipase de type C
PMT	<i>Photon multiplier transmitter</i>
PO ₂	Pression partielle de l'oxygène
PSS	Solution physiologique saline
PTIO	2-Phényl-4,4,5,5-tétraméthyl-imidazoline-1-oxyl 3-oxide
PUFA	Acide gras polyinsaturé
PYR	Pyruvate
R	Récepteur
RAGE	Récepteur des AGEs
SK _{ca}	Canaux potassiques à petite conductance
SNC	Système nerveux central
SOD	Superoxyde dismutase
TB	Triciribine
TBST	<i>Buffer Saline Tris/Tween-20</i>
TG	Triglycérides
TM	Tonus myogénique
TXA ₂	Thromboxane
VCAM-1	Molécule d'adhésion cellulaire vasculaire de type 1
VIP	Peptide intestinal vasoactif
WT	Souris témoin
XO	Xanthine oxydase

Je dédie ce travail à mes parents, Nicole et Donald, sans qui rien de tous cela n'aurait été possible. À mon conjoint, Pascal, qui m'a épaulé dans les moments difficiles. Sans oublier Caroline, Frédéric qui m'ont encouragé et soutenu.

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier les membres du jury, le Dr. Réjean Couture, la Dr. Hélène Girouard et le Dr. Bernard Lévy, qui ont pris le temps de lire et de commenter mes travaux. Ce sont des chercheurs très impliqués dans le milieu académique, et leur temps est très précieux. Merci d'en avoir consacré une partie à l'évaluation de mes compétences. Cela m'a aidée à devenir une personne plus accomplie.

Je voudrais ensuite remercier mon directeur de recherche, mon mentor, Éric Thorin. Il m'a pris sous son aile alors que j'étais toute petite (au niveau des connaissances, bien sûr) et il m'a conduit tranquillement à développer ma curiosité intellectuelle. Merci Éric de m'avoir donné ma chance et d'avoir vu le potentiel qui résidait en moi. Au sein de ton laboratoire, j'ai pu développer ma confiance et mes méthodes de travail; on peut dire que c'est ton enseignement qui m'aura permis de trouver ma voie. Merci de nous encourager à voir le monde et l'implication de notre recherche au niveau mondial (jusqu'en Australie). C'est formidable de travailler avec quelqu'un qui croit en toi et qui a confiance en tes moyens. Merci de nous préparer à affronter le domaine scientifique et de faire de nous de petits chercheurs en devenir !!

Nathalie Trescasses, collègue, patron, amie, confidente, aide et mentor; tu joues plusieurs rôles au sein de ce laboratoire. Tu es toujours disponible et souvent la personne ressource en résolution de problèmes, qu'ils soient petits ou énormes. Ta méthode de travail rigoureuse et ta mémoire sans faille (pour les dates de fête entre autres) sont des exemples à suivre. Un énorme merci Nathalie.

Nada, plus qu'une collègue, tu as toujours été une amie pour moi. Sans crainte, je peux aller vers toi pour déverser ma colère contre les westerns ou les petits bobos de la vie. J'espère t'avoir apporté le même soutien au cours de tes études. Toujours occupée à courir dans tous les sens et ce, même lorsque tu portes des talons hauts. Tu es vraiment une personne à couper le souffle. Merci Nada d'avoir été là, pas seulement d'avoir partagé tes connaissances, mais aussi d'avoir été une amie.

Albert, merci d'avoir été présent dans les moments difficiles. Tu es le seul à m'avoir épaulé dans les moments de « *guerre froide* ». Tu es une personne sur qui je pourrai toujours compter et avec qui, malgré la bonne différence d'âge, je partage beaucoup d'affinités. Je suis convaincue que tu as un bel avenir et je te souhaite le meilleur avec tes trois « *N* » ; tu le mérites amplement. Je serai toujours prête à t'aider et à t'épauler.

Virginie, cette fille discrète et surprenante. J'ai bien aimé étudier à tes côtés et m'amuser à défendre nos idées contre Albert. Tu as un bel avenir devant toi, sois ambitieuse, tu es capable d'accomplir tout ce que tu souhaites. Je suis très choyée d'avoir fait ta connaissance.

François, nous avons partagé trop peu de temps. J'aurais bien aimé t'épauler dans les hauts et les bas de ton projet. Cher « *rayon de soleil* », tout ira bien et tu seras un excellent biochimiste clinique, j'en suis certaine. Ton arrivée a amené une autre dynamique dans le laboratoire et ce fut très agréable d'apprendre à te connaître.

Nour, le plus jeune, le petit dernier mais pourtant le plus impliqué socialement, je te souhaite de trouver ta voie et d'obtenir tout le succès que tu voudras. Ne t'en fais pas, tout ira pour le mieux. Merci d'avoir apporté une toute autre dynamique au laboratoire.

J'aimerais aussi dire merci aux étudiants qui m'ont précédée Stéphane, Marie-Ève, Guillaume et Stéphanie. Vous m'avez permis, bien malgré vous, de forger mon caractère. Pas facile d'arriver dans un laboratoire avec des gens aussi déterminés.

Je souhaite aussi remercier les personnes qui ont de près ou de loin aidé à mettre au point des techniques clés pour les différentes études : Marc-Antoine Gillis, Louis Villeneuve, Édith Hamel, Priscilla Fernandes, Élisabeth Bélanger et Guylaine Ferland. Ces personnes ne m'ont pas seulement aidée au niveau technique mais ont agi en tant que références dans leur domaine. Ce sont de vraies inspirations et des références incroyables.

J'ai tout de même gardé le meilleur pour la fin; ma famille et mes ami(e)s. Tout d'abord un énorme merci à mes parents, Nicole et Donald. Je vous dois tout. Vous m'avez inculqué des valeurs qui m'aideront tout au long de ma vie et qui font de moi ce que je suis. Vous m'avez encouragée, autant financièrement que moralement, dans toutes les étapes de ma vie et mon doctorat ne fait pas exception. Merci d'avoir fait de moi ce que je suis et de m'avoir stimulée à aller de l'avant. Merci d'avoir eu confiance et d'avoir été fiers de ce que je suis et de ce que je deviendrai. Merci Caroline, Philippe et Rafaële. Caro, tu as toujours été un excellent modèle pour moi, si persévérante et déterminée. Frédéric, même si c'est malgré toi, ton sentiment protecteur est très apprécié. Vous m'avez toujours encouragée et permis de relativiser mes problèmes; il ne faut pas négliger cette implication. Je sais que vous serez toujours là pour moi et je ferai la même chose pour vous.

Pascal, mon meilleur ami et mon amour, merci. Sans toi, rien ne serait pareil. Tu as subi mon humeur, tu m'as épaulée dans toutes les situations, tu m'as aidée dans les hauts et les bas de mon doctorat et tu m'as accompagnée lors de multiples périples. Tu me complètes et c'est simple, je t'adore. Merci de faire partie de ma vie.

Merci à tous les autres membres de ma famille, ma belle famille et mes ami(e)s qui ont su m'épauler, m'écouter et me supporter durant ces deux dernières années et les nombreuses autres précédentes. Ils m'ont rendu la vie plus agréable et plus facile. Toujours prêts à apporter des solutions, à me changer les idées ou encore, à écouter mes histoires de souris, auxquelles ils ne comprenaient presque rien la plupart du temps.

En terminant, merci aux Instituts de Recherche en Santé du Canada (IRSC) pour leur support financier tout au long de mon doctorat. Cela m'a permis de me concentrer uniquement à mes études et de faire avancer mes travaux beaucoup plus rapidement.

Revue de la littérature

1 Revue de la littérature

Ma thèse porte sur l'évolution de la fonction endothéliale cérébrale au cours du vieillissement. Mes travaux ont tenté d'établir un lien entre la fonction endothéliale, le débit sanguin cérébral et la fonction cognitive, en présence d'un facteur de risque pour les maladies cardiovasculaires tel que l'athérosclérose. Dans cette thèse, vous pourrez lire les différents résultats obtenus au cours de mes études, qui font l'objet de trois articles. Je ferai d'abord une introduction afin de vous familiariser avec tous les sujets traités. Celle-ci sera suivie des trois articles sur lesquels ont porté mes travaux et je terminerai par une discussion résumant l'ensemble des données en exposant leurs points forts et leurs points faibles, ainsi que leur implication dans un contexte scientifique.

1.1 La circulation cérébrale

Il faut, tout d'abord, dissocier la circulation cérébrale de la circulation périphérique. La plus grande particularité du cerveau est sans aucun doute le fait que celui-ci possède une quantité limitée de réserve énergétique; son intégrité dépend donc de l'apport constant d'oxygène (O_2) et de glucose (Guyton & Hall 2000). Le cerveau représente environ 2% du poids corporel humain mais reçoit près de 15% du volume de sang éjecté par le cœur à chaque battement (Williams & Leggett 1989). Les vaisseaux cérébraux sont ainsi dotés de mécanismes adaptatifs tels que l'autorégulation du débit sanguin qui permettent d'assurer une perfusion adéquate et de maintenir l'homéostasie du cerveau.

1.1.1 Particularités des artères cérébrales

Lorsqu'on parle de la circulation cérébrale, cela inclut la macrocirculation (les artères carotidiennes et leurs prolongements) et la microcirculation (l'artère «*piale*», les artérioles pénétrantes, les capillaires et les veinules, voir figure 1). L'organisation du système vasculaire cérébral est très particulière puisque l'apport sanguin du cerveau tout entier provient de deux artères carotidiennes et de deux artères vertébrales. Les artères vertébrales et carotidiennes s'unissent, *via* les artères communicantes postérieures, afin de former le cercle de Willis et donner naissance aux artères cérébrales antérieures, antérieures communicantes, moyennes ainsi que leurs branches à partir des quelles

émergent les artères piales puis les artérioles pénétrantes (Crossman & Neavy 2004). Ce sont les artérioles pénétrantes qui entrent dans le cerveau afin de permettre l'irrigation (Iadecola & Davisson 2008). L'arrangement des veines cérébrales est également particulier : les artères «*piales*» ne sont pas jumelées avec les veines «*piales*». Le drainage veineux cérébral se divise en deux groupes, soit le drainage superficiel et le drainage profond. Le système superficiel est composé de sinus veineux localisés sur la surface de la matière cérébrale alors que le système profond est composé de veines pénétrant dans le cerveau se déversant dans la veine de «*Galen*». Les deux systèmes fusionnent et déversent leurs contenus dans les deux veines jugulaires qui descendent parallèlement aux artères carotidiennes, afin de drainer le sang dans la veine cave (Allroggen & Abbott 2000).

Dans le corps humain, les artères ont deux principales fonctions. Tout d'abord, elles doivent livrer le sang à partir du ventricule gauche jusqu'aux différents organes et tissus en fonction de leurs besoins. Ensuite, elles doivent être capables d'absorber les pulsations générées par le cœur de façon à assurer un débit sanguin continu ou presque continu (O'Rourke 2007). Au niveau cérébral, cela prend une toute autre expression puisque le débit sanguin doit absolument être maintenu constant. Un concept majeur en physiologie est que les grosses artères sont des artères de conductance alors que les petites artères (< 200 μm) régulent la résistance vasculaire. Toutefois, il a été démontré que dans la circulation cérébrale, les grosses artères et les artères «*piales*» comptent pour le 2/3 de la résistance vasculaire (Tamaki & Heistad 1986; Faraci & Heistad 1990). Les vaisseaux à l'extérieur du cerveau ont donc une grande influence sur le débit sanguin cérébral. De plus, les grosses artères cérébrales sont plus susceptibles de développer des lésions athérosclérotiques que les petites artères intracrâniennes (Faraci & Heistad 1990).

Puisque les artères cérébrales sont capables de réagir aux variations de pH, à un certain nombre de composés chimiques ainsi qu'aux changements intra-artériels de débit et de pression (Ngai & Winn 1995), le contrôle de la pression par la macrocirculation cérébrale s'effectue par des mécanismes intrinsèques tel que l'autorégulation et l'hyperémie fonctionnelle (Kulik *et al.* 2008). Le principal mécanisme impliqué dans la régulation constante du débit sanguin cérébral est sans aucun doute le phénomène d'autorégulation qui permet de dissocier la pression artérielle du débit sanguin cérébral (Cipolla 2007).

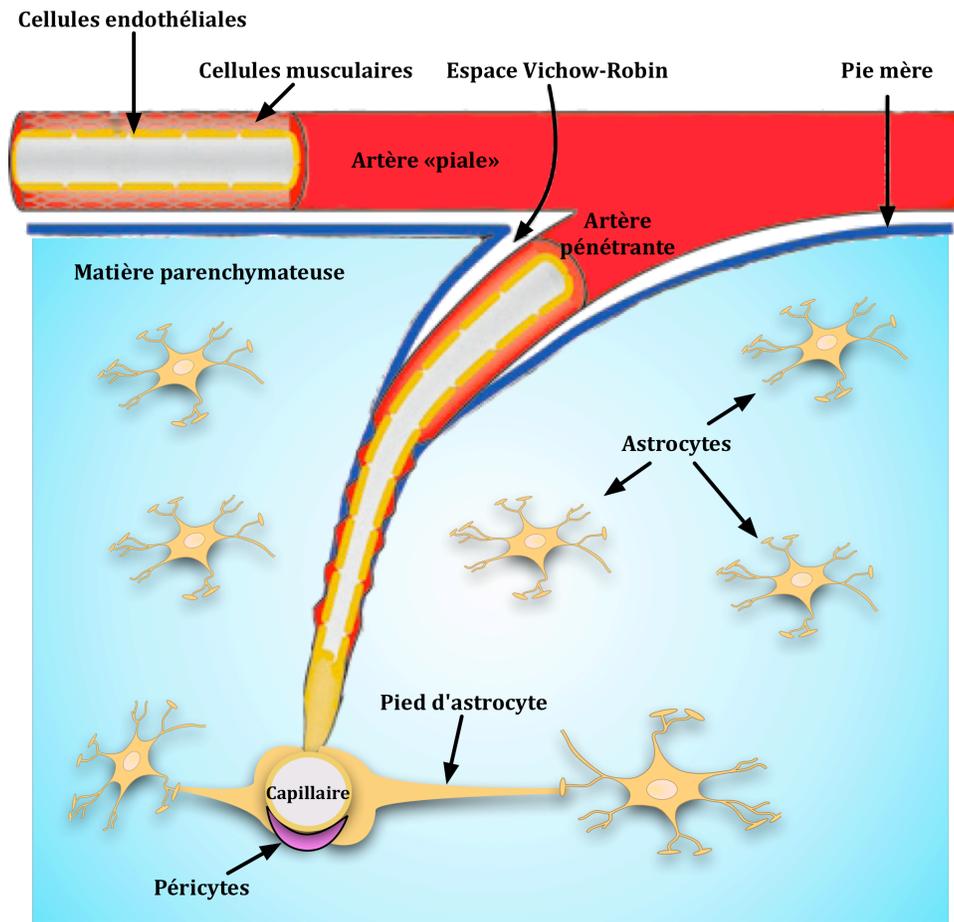


Figure 1. Schématisation de la circulation cérébrale montrant les particularités des artères piales et des artérioles pénétrantes ainsi que la proximité des astrocytes.

1.1.2 L'autorégulation

La pression artérielle, un déterminant majeur du débit sanguin cérébral, varie au cours des activités quotidiennes et influence le débit sanguin cérébral. Une augmentation ou diminution du débit sanguin cérébral pourrait s'avérer très dommageable au niveau central. L'autorégulation permet de maintenir l'homéostasie cérébrale dans un intervalle de pression systolique assez large, de 60 à 150 mm Hg (Paulson *et al.* 1990). Si la pression diminue sous la barre des 60 mm Hg, l'autorégulation n'est alors plus efficace et on obtient une baisse de débit. À l'opposé, lorsque la pression systémique dépasse la capacité d'autorégulation, le débit sanguin cérébral augmente de façon passive jusqu'à la rupture de l'artère (Faraci & Heistad 1990; Paulson *et al.* 1990). En cas d'hypertension artérielle, la limite supérieure de l'autorégulation peut être modifiée par le système sympathique, protégeant ainsi le cerveau contre l'augmentation de pression. Le système parasympathique ne semble pas jouer de rôle dans le processus de l'autorégulation mais pourrait être impliqué lors de certaines pathologies telles que l'ischémie et les migraines (Hamel 2006).

L'autorégulation réfère à cette capacité des artères d'adapter leur diamètre (leur résistance) aux différents changements de pression afin de maintenir le débit constant. Non seulement ce mécanisme permet de maintenir le débit sanguin cérébral constant indépendamment des variations de pressions artérielles, mais il protège aussi la microcirculation contre les dommages associés à l'augmentation de pression (Iadecola & Nedergaard 2007). La base cellulaire de l'autorégulation réside dans la capacité intrinsèque des cellules musculaires lisses vasculaires à se contracter suite à une augmentation de pression ou à se relaxer lors d'une diminution de pression. Ce phénomène est aussi appelé tonus myogénique et a été décrit pour la première fois par le Dr. Bayliss en 1902 (Bayliss 1902). L'endothélium vasculaire cérébral, par la relâche de médiateurs vasoactifs, peut aussi influencer l'autorégulation (Faraci 1992). L'implication de l'endothélium sera discutée ultérieurement dans cette thèse.

1.1.2.1 La réponse myogénique

On doit distinguer la réponse myogénique du tonus myogénique. Le tonus myogénique reflète un niveau de contraction atteint par une artère lorsqu'elle est exposée à un niveau constant de pression. La réponse myogénique correspond plutôt à une altération du tonus myogénique, en réponse à des variations de pression (Davis & Hill 1999). La réponse myogénique repose sur le principe qu'une augmentation de la pression intravasculaire induit une contraction des artérioles afin de diminuer le débit sanguin et de rétablir la pression intravasculaire dans les capillaires (Guyton & Hall 2000). La réponse myogénique possède plusieurs fonctions dont la régulation de la perfusion tissulaire, la protection des capillaires contre les fluctuations de pression systémique et l'envoi d'un signal impliqué dans la régulation de la pression systémique (Schubert *et al.* 2008).

Remarquablement, depuis sa découverte en 1902, notre compréhension de ce phénomène reste encore très incomplète. Un changement de tension à l'intérieur de l'artère semble être à l'origine des réponses myogéniques, puisque l'altération de la tension intravasculaire, mais non les variations de la longueur de la cellule, induisent une modulation du Ca^{2+} intracellulaire des cellules musculaires lisses vasculaires (Brayden *et al.* 2008). Plusieurs études ont tenté d'identifier la structure capable de percevoir les changements de tension et de les transformer en stimuli biochimiques, sans toutefois fournir d'évidences claires (Spofford & Chilian 2003; Inoue *et al.* 2004; Brayden *et al.* 2008). En 1984, une étude célèbre effectuée par le groupe de Harder a montré que l'augmentation de la pression intra-artérielle à elle seule pouvait induire la dépolarisation des cellules, stimuler l'influx calcique et la vasoconstriction (Harder 1984). Il faut toutefois noter que les cellules endothéliales exercent également un contrôle puissant sur le tonus vasculaire, en relâchant plusieurs agents vasodilatateurs et vasoconstricteurs (Andresen *et al.* 2006).

1.1.3 L'hyperémie fonctionnelle

Une des fonctions les plus surprenantes et fondamentales de la circulation corporelle est l'habileté de chaque tissu à contrôler son propre débit sanguin en réponse à la demande métabolique. Le cerveau consomme environ 3,5 ml d'oxygène / 100 g de

tissu/ minute. Toutefois, le débit sanguin est très hétérogène à l'intérieur du cerveau et varie énormément en fonction de la demande métabolique des différentes régions de celui-ci en étant 4 fois plus grande dans la matière grise que dans la matière blanche. Ce phénomène est appelé hyperémie fonctionnelle et son fonctionnement reste encore inconnu.

L'hyperémie fonctionnelle est un autre moyen intrinsèque, en plus de l'autorégulation, qui permet un contrôle pointu du débit sanguin au niveau cérébral. L'hyperémie fonctionnelle est basée sur la théorie métabolique qui stipule qu'une substance vasodilatatrice diffuse dans l'espace interstitiel afin d'induire une dilatation des cellules musculaires lisses des artérioles de façon proportionnelle à la demande métabolique (Iadecola & Nedergaard 2007). Voilà plus de 100 ans que les Drs Roy et Sherrington ont proposé que les neurones libèrent des agents dans l'espace extracellulaire qui, par diffusion, peuvent induire une dilatation des vaisseaux (Roy & Sherrington 1890). Bien que la diffusion d'une substance vasoactive ne semble pas être assez rapide pour être efficace, plusieurs évidences viennent appuyer cette théorie (Drake & Iadecola 2007). En effet, plusieurs agents tels que l'O₂ et l'adénosine, ont été proposés pour expliquer l'augmentation du débit sanguin cérébral suite à une activation du métabolisme neuronal.

Il a été amplement suggéré que la consommation d'O₂ pourrait engendrer l'augmentation du débit sanguin cérébral. Toutefois, des études ont montré qu'il n'y avait aucune relation entre l'intensité de la consommation d'O₂ et l'intensité de l'augmentation du débit sanguin cérébral (Mintun *et al.* 2001). En revanche, la possibilité que la diminution d'O₂ soit impliquée dans l'hyperémie fonctionnelle n'est pas exclue. L'accumulation d'adénosine, due à une augmentation de la consommation d'adénosine triphosphate (ATP), est aussi un excellent candidat de l'hyperémie fonctionnelle, puisqu'il a été démontré qu'une inhibition des récepteurs de l'adénosine (A_{2A}) a pour effet de diminuer le débit sanguin cérébral (Phillis 2004). Les niveaux d'hydrogène (H⁺), d'ions potassiques (K⁺), le monoxyde d'azote (NO), les prostaglandines et les acides époxyéicosatriénoïques (EET) ont aussi été suggérés comme potentiellement impliqués dans l'hyperémie fonctionnelle (Iadecola & Nedergaard 2007). Toutefois, aucun mécanisme n'est encore à ce jour clairement défini. Plusieurs types cellulaires ont été impliqués dans l'hyperémie fonctionnelle dont les neurones, les astrocytes et les cellules

musculaires lisses vasculaires (Takano *et al.* 2006) et leur implication dans l'hyperémie fonctionnelle sera décrite ultérieurement (voir section 1.2).

Le contrôle du débit sanguin, par le phénomène d'autorégulation (incluant la réponse myogénique et l'implication endothéliale) et l'hyperémie fonctionnelle, est primordial au niveau cérébral puisque le cerveau nécessite un apport constant d'O₂ et de nutriments. Les artères cérébrales, à cause de leur organisation et de leurs mécanismes adaptatifs, peuvent réagir aux changements intra-artériels et effectuer un contrôle précis du débit sanguin cérébral. Toutefois, la régulation du débit sanguin est plus complexe encore et d'autres types cellulaires, tels que les neurones et les astrocytes, peuvent aussi avoir une influence sur le tonus vasculaire.

1.2 Les types cellulaires du cerveau

Au niveau cérébral, les vaisseaux sanguins sont entourés de pieds d'astrocytes, de péricytes et de neurones pouvant tous influencer le tonus vasculaire. Les cellules neuronales ont historiquement été identifiées comme l'unité fonctionnelle du cerveau (Lok *et al.* 2007). Ainsi, la majorité des traitements développés contre les maladies du système nerveux central étaient basés sur la préservation des neurones. Toutefois, les études cliniques de ces traitements montraient alors peu ou pas d'effet bénéfique (Lok *et al.* 2007). Il a donc été nécessaire d'attendre les études menées par le Dr. Krimer et ses collègues qui ont démontré que les neurones dopaminergiques centraux entraient en contact direct avec la lame basale des vaisseaux et que la micro-injection de dopamine pouvait induire une vasoconstriction prononcée (Krimer *et al.* 1998). Alors que ces études suggèrent une communication directe des neurones avec les vaisseaux sanguins, d'autres, telles que celle menée par le Dr. Filosa, suggèrent que les neurones agissent sur les vaisseaux *via* l'activation des astrocytes (Filosa & Blanco 2007). Or, ces évidences démontrent que les fonctions cérébrales semblent être régulées par un complexe incluant les neurones, les astrocytes et les cellules endothéliales. Ce complexe a alors été nommé : l'unité neuro-vasculaire (Iadecola 2004; Abbott *et al.* 2006). En plus de leurs associations

physiques, les composantes cellulaires de l'unité neuro-vasculaire interagissent entre elles par des mécanismes de rétro-contrôles positifs et négatifs afin de réguler les différentes fonctions cérébrales.

1.2.1 Les neurones

Le neurone est l'unité signalétique de la neurotransmission et un type cellulaire clé au sein du système nerveux. Les neurones sont disposés sous forme de circuits et communiquent entre eux par l'entremise des synapses. Cette communication nécessite la propagation d'un signal électrique rapide sous forme de potentiel d'action tout au long de l'axone. Ce potentiel d'action engendre une dépolarisation du neurone pré-synaptique puis la libération d'un neurotransmetteur capable à son tour de dépolariser le neurone post-synaptique, propageant ainsi l'influx nerveux dans un deuxième neurone (Allen & Barres 2009). Comme les neurones ne peuvent faire des réserves d'énergie, ils sont très sensibles aux diminutions de l'apport sanguin.

Les fibres nerveuses sur les vaisseaux sanguins ont été identifiées pour la première fois par Thomas Willis vers la fin des années 1600. Depuis, plusieurs études ont documenté la présence d'innervation neuronale sur les artères extra-parenchymateuses (Hamel 2006). Les neurones sécrètent des neurotransmetteurs tels que l'acétylcholine (ACh), l'acide gamma-aminobutyrique (GABA) et les catécholamines qui possèdent tous des propriétés vasoactives. Le glutamate, qui n'est pas vasoactif, peut également être sécrété et est capable d'induire la libération d'autres neurotransmetteurs (Lok *et al.* 2007). C'est à travers ces neurotransmetteurs que les neurones peuvent influencer de façon directe le tonus vasculaire cérébral. En effet, il a été démontré que la stimulation pharmacologique d'un neurone glutaminergique engendre une libération de monoxyde d'azote (NO) et une vasodilatation subséquente (Rancillac *et al.* 2006). Cependant, l'interaction directe entre les neurones et la circulation cérébrale reste encore à démontrer (Iadecola & Nedergaard 2007). Il a été établi que l'augmentation de Ca^{2+} intra-astrocytaire précédait invariablement la vasodilatation des artères suite à la stimulation neuronale (Filosa *et al.* 2006). Par conséquent, il est concevable que la libération de neurotransmetteurs puisse augmenter la concentration de Ca^{2+} intracellulaire des astrocytes causant l'activation de la cyclooxygénase ou des canaux potassiques à grande

conductance et une vasodilatation des artères (Girouard *et al.* ; Takano *et al.* 2006; Iadecola & Nedergaard 2007).

1.2.2 Les astrocytes

Les astrocytes sont présents en bien plus grand nombre que les neurones dans le cerveau des mammifères et, sans leur présence, les neurones meurent (Allen & Barres 2009). Les astrocytes sont moins sensibles que les neurones à la privation d'O₂ et de glucose puisqu'ils ont la possibilité d'emmagasiner du glucose sous forme de glycogène; de plus ils nécessitent moins d'énergie pour fonctionner (Rossi *et al.* 2007). Les astrocytes ont comme fonction de supporter la neurotransmission, de maintenir la balance ionique de l'espace extracellulaire et de réguler la vitesse de propagation du potentiel d'action neuronal. En effet, comme ils ont une grande perméabilité au K⁺, ils sont importants dans la régulation de la concentration de K⁺ extracellulaire, ce qui leur permet de maintenir l'excitabilité neuronale (Koehler *et al.* 2006). Les astrocytes fournissent les substrats pour la neurotransmission, maintiennent une barrière physique entre les neurones et régulent l'excès de neurotransmetteurs dans l'espace extracellulaire (dégradation et recapture des neurotransmetteurs). Bien qu'ils n'aient pas la possibilité d'émettre des potentiels d'action, les astrocytes sont liés entre eux par les jonctions gap et peuvent donc communiquer *via* la propagation calcique : une augmentation de Ca²⁺ dans les astrocytes induit une augmentation de Ca²⁺ dans les astrocytes adjacents (Dani *et al.* 1992).

Les artères et artérioles cérébrales sont séparées de la matière parenchymateuse par une extension de l'espace sub-arachnoïdique appelé l'espace Virchow-Robin (voir figure 1) (Iadecola & Nedergaard 2007). Alors que les artères cérébrales pénètrent dans le cerveau, la lame basale des artères entre directement en contact avec les astrocytes péri-vasculaires. À ce stade, les astrocytes peuvent influencer l'expression phénotypique des cellules endothéliales et guider la formation des capillaires lors de l'angiogénèse (Koehler *et al.* 2009). À cause de leur étroite relation avec les neurones et les vaisseaux, les astrocytes sont les candidats idéaux pour influencer le contrôle du débit sanguin cérébral. En effet, plusieurs études montrent l'implication des astrocytes dans le couplage neuro-vasculaire (Filosa *et al.* 2006).

1.2.3 L'endothélium et la barrière hémato-encéphalique

Les artères et artérioles cérébrales sont pourvues d'une monocouche de cellules endothéliales et d'une ou plusieurs couches de cellules musculaires lisses (éléments contractiles du vaisseau). L'endothélium est constitué d'une monocouche cellulaire qui tapisse la surface intérieure des vaisseaux sanguins. En plus de fournir une barrière protectrice pour les tissus, il possède des propriétés anticoagulantes et génère un bon nombre d'autacoïdes qui régulent le tonus vasculaire et l'homéostasie des tissus. L'endothélium, en tant qu'organe biologique, contribue à la balance locale des médiateurs pro- et anti-inflammatoires, au maintien de la perméabilité vasculaire ainsi qu'à la prolifération cellulaire (Tritto & Ambrosio 1999). La surface endothéliale varie significativement en fonction de sa localisation anatomique. Au niveau cérébral, l'endothélium ne contient pas de fenestration, possède très peu de vésicules de pinocytose et, à cause de sa grande demande métabolique, possède de 5 à 6 fois plus de mitochondries que les cellules endothéliales périphériques (Kulik *et al.* 2008).

Le concept d'une barrière anatomique entre le cerveau et le sang a été formulé après que le Dr. Paul Ehrlich ait observé que l'injection d'un marqueur fluorescent intraveineux était capable de marquer tous les organes mais pas le cerveau, sauf si le marqueur était injecté directement dans le liquide cébrospinal (Hawkins & Davis 2005; Lok *et al.* 2007). Il a alors été établi que toutes les artères cérébrales contiennent une couche de cellules endothéliales spéciales, constituant la barrière hémato encéphalique («*blood brain barrier*», BBB) (Roggendorf & Cervos-Navarro 1977). La BBB est une barrière anatomique qui filtre et empêche les substances de passer librement du sang au liquide extracellulaire de la substance grise. Elle isole ainsi la substance grise et lui permet d'avoir un milieu intérieur différent du reste de l'organisme. La BBB est présente dans toutes les structures cérébrales à l'exception de certaines régions du système des ventricules, soit l'aire postrema, l'éminence médiane, la neurohypophyse, l'organe subfornical, la glande pinéale et la lamina terminalis (Lok *et al.* 2007). À ces endroits spécifiques, le cerveau possède des récepteurs sensoriels qui lui permettent de répondre aux changements de concentration du glucose, de pH, de pCO₂ et d'osmolarité sanguine. Les réponses perçues permettent d'envoyer les signaux nerveux et hormonaux nécessaires à la régulation de chacun des facteurs (Guyton & Hall 2000). La BBB isole et protège les

cellules neuronales des variations de nutriments ainsi que des influences de plusieurs composés endogènes et exogènes circulants. Elle protège donc les tissus neuronaux contre les toxines et tamponne les variations de la composition sanguine (Wolburg & Lippoldt 2002). Même si la BBB est aussi présente dans les veines cérébrales, ces dernières sont souvent le site de rupture de cette barrière (Mayhan & Heistad 1986).

L'intégrité de la BBB dépend de la liaison entre les astrocytes et les cellules de la microvasculature cérébrale. En fait, les cellules endothéliales sont intimement associées aux pieds des astrocytes par les jonctions serrées («*tight junctions*»). À cause de leur association, les cellules endothéliales cérébrales et les astrocytes scellent la voie paracellulaire et obligent les substances à être transportées à travers la membrane et le cytosol. L'étanchéité de la BBB dépend donc de la sélectivité de ces jonctions serrées. Plusieurs protéines transmembranaires sont impliquées dans la composition des jonctions serrées telles que l'occludine, les claudines et les «*junctional adhesion molecule*» (JAM). De plus, des protéines cytoplasmiques accessoires telles que les «zona occludens» de type 1, 2 et 3 sont aussi impliquées dans la formation des jonctions serrées (Abbott *et al.* 2006; Allen & Barres 2009).

Grâce aux jonctions serrées, seules les substances liposolubles et les substances possédant un transporteur peuvent traverser la BBB. Cette dernière laisse donc passer librement l'O₂, le CO₂, l'alcool, la nicotine, les anesthésiques circulants et d'autres molécules lipophiles. Le glucose, les acides aminés essentiels et certains électrolytes traversent la barrière par diffusion facilitée, leur conférant une grande spécificité.

En résumé, les neurones, les astrocytes et les cellules endothéliales cérébrales (formant l'unité neuro-vasculaire) sont donc tous impliqués dans le contrôle du débit sanguin cérébral. Toutefois, le fonctionnement de l'unité neuro-vasculaire reste mal connu. L'endothélium vasculaire cérébral, avec la présence de la BBB, influence énormément le débit sanguin cérébral et permet de maintenir l'homéostasie centrale.

1.3 Les fonctions de l'endothélium vasculaire cérébral

L'endothélium joue un rôle essentiel au niveau cérébral puisqu'il est impliqué dans la régulation du tonus vasculaire. Tel que démontré au niveau périphérique, l'intégrité endothéliale est définie par la balance entre la biodisponibilité des facteurs constricteurs dérivés de l'endothélium (EDCF) et des facteurs relaxants dérivés de l'endothélium (EDRF) (voir figure 2) (Herrmann & Lerman 2001). La dysfonction endothéliale cérébrale a été observée lors de plusieurs conditions pathologiques telles que l'hypertension (Iadecola & Davisson 2008) et le diabète (Fujii *et al.* 1992). Conséquemment, il est rapidement devenu évident que l'endothélium représentait non seulement un élément essentiel de l'homéostasie neuronale mais aussi un élément central du contrôle de l'intégrité vasculaire. Le Dr. Lee a été le premier à étudier la fonction de l'endothélium cérébral *in vitro* (Lee 1980). Ses études, et bien d'autres, ont permis de faire la distinction entre les facteurs vasodilatateurs et les facteurs vasoconstricteurs cérébraux.

1.3.1 Les facteurs dilatateurs dérivés de l'endothélium (EDRF) cérébraux

Les cellules endothéliales cérébrales sont impliquées dans plusieurs mécanismes physiologiques et sont capables de libérer des facteurs vasodilatateurs regroupés sous le nom d'EDRF. Les EDRF sont libérés en conditions physiologiques et leur inhibition est souvent associée aux conditions pathologiques. En 1982, le groupe du Dr. Vanhoutte (De Mey & Vanhoutte 1982) a proposé trois voies distinctes impliquées dans la dilatation dépendante de l'endothélium. Cette hypothèse, qui reste encore valide aujourd'hui au niveau cérébral et au niveau périphérique, propose comme facteurs dilatateurs le NO, les dérivés de la cyclo-oxygénase (COX) et le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF). A ces trois EDRF, on peut ajouter les dérivés réactifs de l'oxygène (DRO) (Wei & Kontos 1990; Paravicini *et al.* 2004) dont le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), qui peuvent aussi agir en tant que médiateurs actifs au niveau cérébral (voir figure 2).

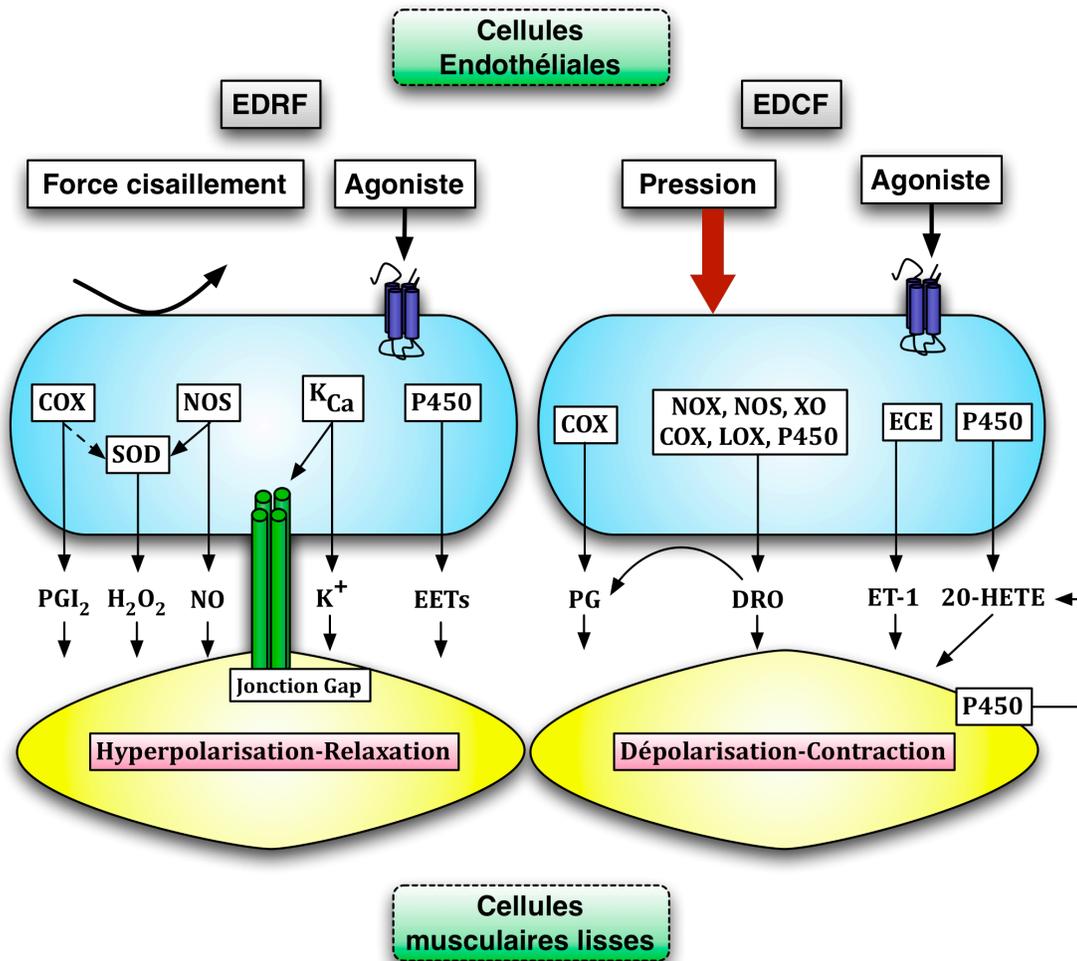


Figure 2. Représentation schématique des différents EDRF et EDCF identifiés au cours des dernières années. COX, cyclooxygénase ; NOS, monoxyde d'azote synthase; SOD, superoxyde dismutase ; PGI₂, prostacycline; H₂O₂, peroxyde d'hydrogène; NO, monoxyde d'azote; DRO, dérivés réactifs de l'oxygène; EET, acides epoxyéicosatrienoïques; 20-HETE, acides hydroxyéicosatetraenoïques; ECE, enzyme de conversion de l'endothéline; ET-1, endothelin-1; P450, cytochrome P450; PG, prostaglandines; XO, xanthine oxydase ; K_{Ca}, canaux potassiques sensible au calcium ; K⁺, ion potassique ; LOX, lipoxgénase.

1.3.1.1 Le monoxyde d'azote (NO) et les NO synthases

Le rôle obligatoire dilatateur de l'endothélium grâce à la libération d'un EDRF a été proposé pour la première fois en 1980 par le Dr. Furchgott (Furchgott & Zawadzki 1980). Après la démonstration que le NO était un EDRF en 1988 (voir Palmer et Moncada), il est rapidement devenu évident que le NO était plus qu'un facteur endothélial dilatateur, puisque celui-ci a été associé à presque toutes les fonctions biologiques, de l'acquisition de la mémoire et l'érection (Vanhoutte 2009b). De plus, le NO est sécrété dans la lumière du vaisseau où il exerce un effet autocrine et sur les cellules circulantes inhibant l'adhésion des leucocytes et l'agrégation plaquettaire. Le NO est synthétisé à partir de l'acide aminé L-arginine par la famille des NO synthase (NOS). Trois isoformes de la NOS ayant des structures et des activités catalytiques similaires sont aujourd'hui connues : la forme neuronale (nNOS ou NOS1), la forme inductible (iNOS ou NOS2) et la forme endothéliale (eNOS ou NOS3). En condition physiologique, la nNOS ainsi que la eNOS sont constitutivement exprimées dans les neurones et vaisseaux cérébraux, respectivement. Bien que le NO soit un important régulateur de la circulation cérébrale, l'importance relative de la eNOS et de la nNOS dans le contrôle du débit sanguin cérébral *in vivo* est encore inconnue. Au sein de l'artère, il existe plusieurs façons de réguler la fonction de la NOS (voir figure 3). Tout d'abord, la eNOS est située dans les caveolae des membranes plasmiques où elle est associée avec la cavéoline de type 1 (Cav-1) (voir figure 3). Cette interaction a pour effet d'inhiber la production de NO (Bruckdorfer 2005). De plus, plusieurs agonistes des récepteurs aux protéines G engendrent une augmentation de Ca^{2+} intracellulaire et permettent ainsi une activation de la eNOS. En effet, le Ca^{2+} , une fois lié à la calmoduline, déstabilise le complexe eNOS/Cav-1 permettant ainsi l'alignement de ses sous-unités et son activation (Michel *et al.* 1997; Sessa 2004). Dans les artères cérébrales, la production de NO peut aussi dépendre de l'activation de la protéine Akt et/ou de la protéine phosphatidylinositol-3-kinase (PI3-kinase) (Drouin & Thorin 2009). Il a été démontré que la PI3-kinase active (phosphoryle) la protéine Akt qui elle, *via* une phosphorylation, augmente la sensibilité de la eNOS pour le Ca^{2+} pouvant ainsi faciliter son activation (voir figure 3) (Dimmeler *et al.* 1999; Andresen *et al.* 2006).

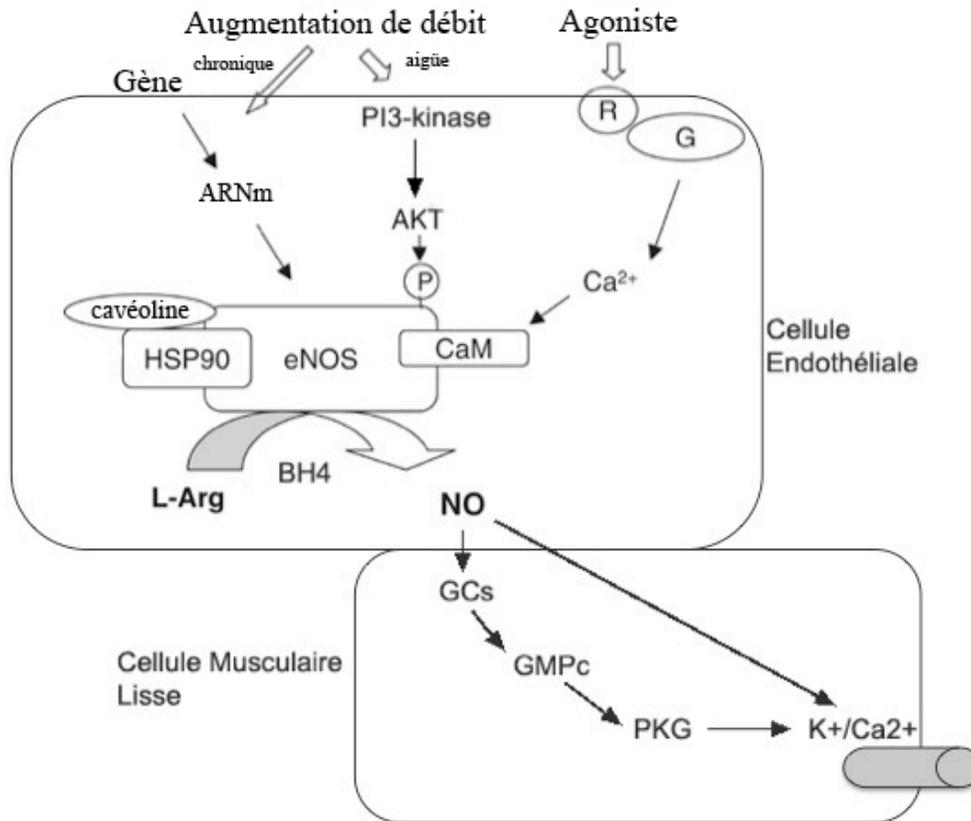


Figure 3. Résumé du mécanisme d'activation de la NOS et de dilatation du NO dans les cellules endothéliales cérébrales. CaM, calmoduline ; R, récepteur ; G, protéine G ; Ca²⁺, ion calcique ; AKT, protéine Akt ; eNOS, NO synthase de type endothéliale ; BH₄, tétrahydrobioptérine ; GCs, guanylate cyclase soluble ; GMPc, guanidine monophosphate cyclase, PKG, protéine kinase de type G ; K⁺, ion potassique ; L-Arg, L-arginine ; ARNm, ARN de type messenger.

La NOS fonctionnelle est un dimère formé de deux sous-unités identiques de 140 Kd liées entre elles par des ponts disulfures (Fleming & Busse 1999b). Elle possède un domaine hydrolase contenant des sites de liaison pour le groupement hème, la L-arginine et la tétrahydrobioptérine (BH₄) ainsi qu'un domaine réductase contenant des sites de liaison pour le FMN, le FAD, le NADPH et la calmoduline (Bruckdorfer 2005). La déplétion expérimentale des cofacteurs de la eNOS peut mener à la formation de radicaux libres tels que l'anion superoxyde (O₂⁻) plutôt qu'à la formation de NO. Par exemple, au niveau cérébral aussi bien qu'au niveau périphérique, la NOS a été identifiée comme une source de production de l'anion superoxyde (O₂⁻) autant en condition physiologique qu'en condition pathologique (Pou *et al.* 1992; Stroes *et al.* 1998; Pou *et al.* 1999; Porasuphatana *et al.* 2003; Drouin *et al.* 2007). Même s'il a été proposé par quelques études que la diminution du niveau de L-arginine pouvait être à l'origine de la production de radicaux libres par la NOS, les recherches actuelles indiquent que c'est plutôt le BH₄ qui semble réguler la balance de NO et d'O₂⁻ produits par la eNOS (Wever *et al.* 1997; Alp & Channon 2004; Cai 2005).

Suite à l'activation de la NOS, le NO diffuse jusqu'aux cellules musculaires lisses vasculaires où il se lie à la guanylate cyclase soluble (GCs) induisant ainsi une augmentation des niveaux de guanosine monophosphate cyclique (GMPc). Le GMPc active à son tour la protéine kinase G (PKG) provoquant ainsi une ouverture des canaux K⁺ ou encore une diminution de la sensibilité de l'élément contractile au Ca²⁺ et une relaxation vasculaire (voir figure 3) (Andresen *et al.* 2006). Toutefois, il a été démontré que le NO peut aussi induire une hyperpolarisation des cellules musculaires vasculaires par un mécanisme indépendant du GMPc (Feletou & Vanhoutte 2006).

Le NO peut être libéré *via* une stimulation des cellules endothéliales par un agoniste tel l'ACh ou la bradykinine (BK). Toutefois, le facteur physiologique le plus important pour induire la libération de NO est sans doute l'augmentation des forces de cisaillement, c'est-à-dire la distorsion tangentielle produite sur les cellules endothéliales suite à une augmentation de débit sanguin. De plus, il a été démontré que les souris génétiquement modifiées qui n'expriment pas la eNOS (eNOS^{-/-}) deviennent hypertendues (Huang *et al.* 1995) illustrant le rôle du NO dans le contrôle de la pression artérielle systémique (Crimi *et al.* 2007). Au niveau cérébral, la libération de NO est très

impliquée dans le développement du tonus vasculaire puisque l'inhibition pharmacologique de la NOS contracte les artères et diminue le débit sanguin cérébral (Moncada *et al.* 1988). Plusieurs composés chimiques des analogues de la L-arginine, soit la N^ω-nitro-L-arginine (L-NNA), L-nitro-arginine méthyl ester (L-NAME) ou la N^G-monométhyl-L-arginine (L-MMA) peuvent inhiber la NOS (Fleming & Busse 1999a). De plus, un composé endogène a aussi été identifié pouvant inhiber la NOS, le diméthylarginine asymétrique (ADMA) (Bruckdorfer 2005).

1.3.1.2 Les dérivées de la COX et des cytochromes P450

La voie de la cyclo-oxygénase (COX), responsable de la production des prostanoides, a été la première documentée et reste encore aujourd'hui une des plus étudiées. La première étape consiste à libérer l'acide arachidonique (AA) des phospholipides membranaires par la phospholipase A₂ (PLA₂). Une fois libérée, la COX peut métaboliser l'AA afin de produire des prostaglandines de type G₂ ou H₂, selon le type cellulaire et l'état physiologique/pathologique (Salinas *et al.* 2007; Tang & Vanhoutte 2009). La prostaglandine H₂ (PGH₂) est très instable et est rapidement convertie en d'autres produits tels que la prostacycline (PGI₂) par la prostacycline synthase ou encore en prostaglandines E₂, D₂ et thromboxane (TXA₂) par des synthases spécifiques (Figure 4) (Salinas *et al.* 2007). Les produits dilatateurs dérivés de la COX incluent la prostacycline (PGI₂) ainsi que les prostaglandines E₂ et D₂. La PGI₂ est sans aucun doute le plus étudié des vasodilatateurs de l'endothélium cérébrovasculaire.

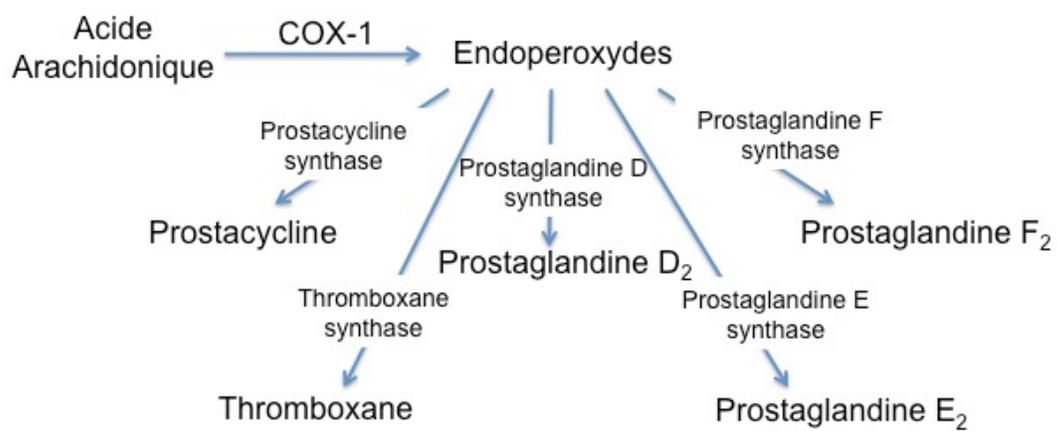


Figure 4. Schématisation du métabolisme de l'AA par la COX-1.

Une fois libérée, la PGI₂ active un récepteur IP sur les cellules musculaires lisses vasculaires permettant d'activer l'adénylate cyclase (AC), augmentant ainsi la quantité d'AMP cyclique et l'activité de la protéine kinase A (PKA). La PKA ouvre les canaux K⁺, causant une hyperpolarisation et une dilatation (Andresen *et al.* 2006). La PGI₂ joue un rôle important dans la vasodilatation induite par une augmentation de débit sanguin cérébral, mais son implication semble diminuer lorsque la dilatation est induite par un médiateur humoral (Feletou & Vanhoutte 2009). Il a été démontré que l'inhibition des COX (surtout COX-2) peut causer une faible mais néanmoins significative augmentation de la pression artérielle chez le rat (Salinas *et al.* 2007), suggérant ainsi une implication de la PGI₂ et de la PGE₂ dans le contrôle du tonus vasculaire et de la pression sanguine (Sellers & Stallone 2008). Dans la plupart des vaisseaux sanguins, la contribution de la PGI₂ dans la dilatation dépendante de l'endothélium est moindre mais son action synergique avec le NO afin d'inhiber l'agrégation plaquettaire est non négligeable (Brandes *et al.* 2005).

Trois isoformes de la COX sont exprimées dans les cellules vasculaires cérébrales : COX-1, COX-2 et COX-3. Généralement, COX-1 est considérée comme stable et est constitutivement exprimée dans les cellules endothéliales et dans les plaquettes. Même si COX-2 n'est pas exprimée dans tous les tissus en condition physiologique, elle est constitutivement exprimée dans les cellules cérébrales (Parfenova *et al.* 1997). La dernière venue de la classe est la COX-3 qui a été identifiée dans les vaisseaux cérébraux de chien et plus précisément dans les cellules endothéliales cérébrales en culture (Chandrasekharan *et al.* 2002; Kis *et al.* 2005). Toutefois, le rôle fonctionnel et l'existence de la COX-3 chez l'humain n'ont pas encore été démontrés.

La famille des cytochromes P450 peut aussi métaboliser l'AA afin de libérer les acides hydroxyéicosatétraenoïques (20-HETE) et epoxyéicosatrienoïques (EET). Au niveau cérébral, ces deux composés ont démontré, respectivement, des propriétés vasoconstrictrices et vasodilatatrices (Miyata & Roman 2005; Fang *et al.* 2006; Drouin *et al.* 2007). Les deux isoformes des EET prédominants au niveau cérébral sont le 11,12-EET et le 14,15-EET. Une fois sécrétés par les cellules endothéliales, ces EET ouvrent les canaux potassiques (K⁺) à grande conductance sensibles aux Ca²⁺ (BK_{Ca}) qui sont situés sur les cellules musculaires lisses (Campbell *et al.* 1996). L'ouverture de ces canaux

engendre une hyperpolarisation, c'est-à-dire une sortie d'ions K^+ de la cellule, et, par conséquent, une fermeture des canaux calciques dépendant du voltage résultant en une dilatation des vaisseaux cérébraux. Les EET ne régulent pas seulement le débit sanguin, mais limitent l'agrégation plaquettaire, augmentent la sensibilité à l'insuline et possèdent des effets anti-inflammatoires (Feletou & Vanhoutte 2009). Les EET sont aussi synthétisés dans les astrocytes et pourraient donc être impliqués dans le couplage du débit sanguin avec l'activité neuronale (Filosa & Blanco 2007).

1.3.1.3 Les EDHF

Dans plusieurs lits vasculaires, l'ACh, l'ATP, la substance P ainsi que d'autres substances vasodilatatrices induisent une hyperpolarisation dépendante de l'endothélium qui contribue à la relaxation vasculaire. Le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF) se définit comme un médiateur de la relaxation vasculaire non attribuable au NO ou aux dérivés des prostaglandines, même si ces dernières, tel que discuté dans les précédents paragraphes, peuvent induire une hyperpolarisation des cellules musculaires lisses. Même s'il était connu que les cellules musculaires lisses cérébrales peuvent être hyperpolarisées par des mécanismes endothéliaux, ce n'est qu'en 1995 que sont apparues les premières évidences de l'existence d'un EDHF au niveau cérébral (Petersson *et al.* 1995).

L'EDHF nécessite une augmentation de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire endothélial pour induire l'hyperpolarisation de la cellule endothéliale qui se propage ensuite dans les cellules musculaires lisses. Dans la plupart des lits vasculaires, l'hyperpolarisation nécessite l'activation des canaux K^+ sensibles aux Ca^{2+} de petite conductance (SK_{Ca} qui sont bloqués par l'apamine ou la scyllatoxine) et/ou de conductance intermédiaire (IK_{Ca} qui sont bloqués par la charybdotoxine ou le TRAM-34), sans toutefois nécessiter l'activation des canaux K^+ sensibles au Ca^{2+} de grande conductance (BK_{Ca} qui sont bloqués par l'ibériotoxine) (Feletou & Vanhoutte 2006). SK_{Ca} et IK_{Ca} sont exprimés sur les cellules endothéliales alors que BK_{Ca} se retrouvent seulement sur les cellules musculaires lisses vasculaires (Marchenko & Sage 1996; Quignard *et al.* 2000). Mais comment l'hyperpolarisation des cellules endothéliales par SK_{Ca} et IK_{Ca} est-elle

propagée aux cellules musculaires lisses vasculaires ? Au niveau cérébral, deux mécanismes ont été proposés :

(1) L'hyperpolarisation pourrait être transmise directement aux cellules musculaires lisses par les jonctions Gap (Segal & Beny 1992). Les jonctions Gap sont formées de 2 connexines (Cx37 et Cx40) créant un pore qui permet le transfert d'ions responsables de l'hyperpolarisation des cellules musculaires lisses, propageant ainsi la diminution de Ca^{2+} intracellulaire et la dilatation (Feletou & Vanhoutte 2009). Plus le vaisseau est petit, plus le nombre de jonctions Gap est important (Feletou & Vanhoutte 2006). Toutefois, les expériences conduites *in vivo* ne montrent pas un rôle prédominant des jonctions Gap dans la dilatation associée à l'EDHF (Edwards *et al.* 1998).

(2) L'accumulation d'ions K^+ dans l'espace intercellulaire active les canaux K^+ et/ou la pompe Na^+/K^+ -ATPase produisant ainsi une hyperpolarisation des cellules musculaires lisses, une diminution de Ca^{2+} intracellulaire et une dilatation : une augmentation modérée de la concentration de K^+ extracellulaire (de 1 à 15 mmol/L) peut causer une vasodilatation importante des cellules musculaires lisses vasculaires (Feletou & Vanhoutte 2006).

Dans les artères cérébrales, outre l'ion K^+ , d'autres substances ont été proposées comme EDHF. Par exemple, les BK_{Ca} peuvent être activés par le GMPc, le peptide natriurétique de type C (CNP) ou le produit des lipoxigénases (le 11,12-EET) (Wei *et al.* 1994; Li & Campbell 1997; Faraci *et al.* 2001). Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) a aussi été proposé comme candidat potentiel pour l'EDHF dans plusieurs études et sera décrit dans la prochaine section.

1.3.1.4 Les dérivés réactifs de l'oxygène (DRO)

Outre les trois EDRF conventionnels (NO, PGI_2 , EDHF), d'autres molécules libérées par les cellules endothéliales peuvent aussi avoir des effets vasodilatateurs. Les molécules réactives dérivées de l'oxygène (DRO) contiennent une, ou plus d'une, paire(s)

d'électrons libres et incluent des espèces telles que l'anion superoxyde (O_2^-) et l'ion hydroxyle (OH^-), le H_2O_2 , le NO^- et l' $ONOO^-$. Même si le H_2O_2 est décrit comme un DRO, il ne possède pas d'électron libre, ce qui le rend plus stable et moins réactif (Ardanaz & Pagano 2006). En condition physiologique, les DRO sont produits en faible concentration et ils sont impliqués dans la signalisation moléculaire en régulant, entre autre, la contraction et la relaxation des cellules musculaires lisses vasculaires. L' O_2^- , le H_2O_2 et le OH^- sont de bons vasodilatateurs cérébraux et représentent des molécules importantes dans la régulation du débit sanguin cérébral (Paravicini *et al.* 2004). Ils sont aussi impliqués dans le remodelage vasculaire des artères cérébrales induit par l'angiotensine II (Ang II) (Schiffrin & Touyz 2004). En condition pathologique telle que l'athérosclérose, l'augmentation de la production des DRO engendre une dysfonction endothéliale et un remodelage vasculaire. À ce stade, ils sont impliqués dans l'oxydation des lipoprotéines, l'activation de l'apoptose, l'augmentation de l'expression des molécules d'adhésion, dans l'activation des processus de remodelage et la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires (Terashvili *et al.* 2006).

On compte plusieurs sources de DRO dans les cellules vasculaires cérébrales, incluant les enzymes mitochondriales, la xanthine oxydase, la NADPH oxydase et la NOS découplée (Faraci 2006). Il a été démontré que les cytokines, les facteurs de croissance, les agonistes des récepteurs couplés aux protéines G et les forces de cisaillement peuvent induire la libération de faibles niveaux de O_2^- et de H_2O_2 (Rhee *et al.* 2003). Des études récentes ont montré que l'application *in vivo* de la superoxyde dismutase (SOD) avait pour action d'augmenter le débit sanguin cérébral (Terashvili *et al.* 2006) suggérant une implication de l' O_2^- et du H_2O_2 dans la régulation du tonus vasculaire cérébral. Le H_2O_2 est une petite molécule diffusible qui peut être synthétisée et détruite rapidement en réponse à un stimulus externe. Le H_2O_2 remplit donc tous les critères pour être considéré comme un messager intracellulaire. Plusieurs études montrent que les artères cérébrales dilatent en réponse à l'application exogène d' H_2O_2 (Wei & Kontos 1990; Drouin *et al.* 2007). De plus, *in vivo*, l'application de H_2O_2 induit une dilatation de l'artère basilaire de rat (Yang *et al.* 1998). Bien que l'action paracrine vasculaire du H_2O_2 soit le sujet de plusieurs études, son mécanisme d'action ainsi que sa source sont encore très contestés (voir figure 5).

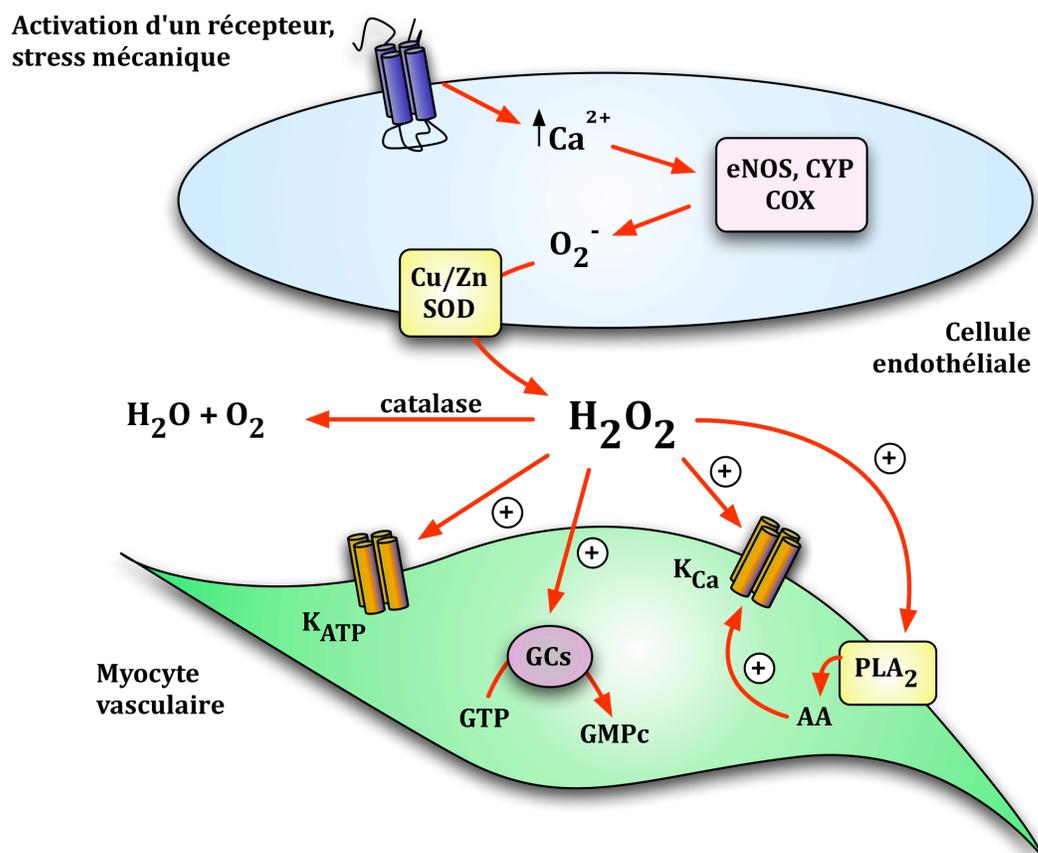


Figure 5. Représentation schématique des différentes sources ainsi que des différents mécanismes d'action du H_2O_2 dans les cellules vasculaires. eNOS, isoforme endothéliale de la monoxyde d'azote synthase ; COX, cyclooxygénase ; CYP, cytochrome P450 ; O_2^- , anion superoxyde ; SOD, superoxyde dismutase ; H_2O_2 , peroxyde d'hydrogène ; H_2O , eau ; O_2 , oxygène ; GCs, guanylate cyclase soluble ; GMPC, 3'-5'-guanosine monophosphate cyclique ; GTP, guanosine tri-phosphate ; AA, acide arachidonique, PLA₂, phospholipase de type A₂ ; K_{ATP}, canaux potassiques sensibles à l'adénosine triphosphate ; K_{Ca}, canaux potassiques sensibles au calcium.

Certaines études montrent que la dilatation induite par le H_2O_2 serait effectuée par les canaux potassiques (Iida & Katusic 2000) alors que d'autres ont suggéré que la dilatation serait dépendante du GMPc (Drouin *et al.* 2007). Le H_2O_2 est un EDRF majeur au niveau cérébral puisque son inhibition réduit de plus de 50% la dilatation (Drouin *et al.* 2007).

1.3.2 Les facteurs constricteurs dérivés de l'endothélium (EDCF) cérébraux

Il a été suggéré, qu'en plus de libérer des EDRF et induire une relaxation, les cellules endothéliales pourraient aussi induire une contraction des cellules musculaires lisses environnantes. Ces réponses ont été attribuées à la production de facteurs diffusibles constricteurs dérivés de l'endothélium (EDCF) (voir figure 2), tel qu'identifié par le Dr. Vanhoutte en 1982 (De Mey & Vanhoutte 1982). Théoriquement, la contraction dépendante de l'endothélium pourrait être expliquée soit par l'absence d'EDRF ou encore par la production d'un EDCF (Vanhoutte & Tang 2008). Au niveau cérébral, certaines substances ont été identifiées comme EDCF potentiels tels que le TXA_2 , l'Ang II, l'endothéline de type 1 (ET-1), plusieurs dérivés de l'AA et les DRO (figure 2) (Yanagisawa *et al.* 1988; Vanhoutte & Tang 2008).

1.3.2.1 Le Thromboxane A_2 (TXA_2) et autres dérivées de l'AA

Tel que discuté précédemment, l'AA peut être métabolisé, entre autres, par les COX et les cytochromes P450. La COX transforme l'AA en endoperoxydes, qui eux-mêmes peuvent causer une contraction du muscle lisse vasculaire, ou encore être convertis en PGI_2 , thromboxane A_2 (TXA_2), PGD_2 , PGE_2 ou prostaglandines $F_{2\alpha}$, par leurs enzymes respectives (voir figure 4) (Bos *et al.* 2004). Normalement, les produits constricteurs dérivés de la COX incluent la prostaglandine $F_{2\alpha}$ et le TXA_2 . La COX est exprimée dans les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses vasculaires et les plaquettes. Le TXA_2 est le produit majeur des plaquettes et peut aussi être libéré par les cellules endothéliales (Sellers & Stallone 2008).

Si le TXA_2 est d'abord impliqué dans l'agrégation plaquettaire, il peut aussi produire une vasoconstriction des artères cérébrales. Effectivement, il a été démontré que

dans l'artère basilaire du chien, les vasoconstrictions dépendantes de l'endothélium (induite par l'AA et le calcium ionophore A23187) peuvent être prévenues aussi bien par les inhibiteurs de la COX que par les inhibiteurs de la thromboxane synthase (Katusic *et al.* 1988). De plus, ces réponses vasoconstrictrices peuvent être observées chez les souris déficientes en COX-2 (COX-2^{-/-}) mais pas chez les souris déficientes en COX-1 (COX-1^{-/-}), suggérant que la COX-1 serait à l'origine de ces vasoconstrictions (Vanhoutte 2009a). Bien que le TXA₂ induise une vasoconstriction, l'inhibition de la thromboxane synthase ou du récepteur au TXA₂ n'influence pas la pression artérielle chez l'animal ou chez l'homme, mettant ainsi en doute l'implication du TXA₂ dans le contrôle du tonus vasculaire (Sellers & Stallone 2008). L'augmentation de la production de TXA₂ semble jouer un rôle important dans plusieurs maladies cardiovasculaires telles que la défaillance cardiaque, l'athérosclérose et l'hypertension (Sellers & Stallone 2008). Au niveau cérébral, les productions de TXA₂ et de NO sont plus élevées que dans les autres lits vasculaires, suggérant ainsi un contrôle plus intense des niveaux de contraction et dilatation des artères cérébrales et une implication possible de ces composées dans les maladies neurodégénératives (Neppl *et al.* 2009).

L'action vasoconstrictrice du TXA₂ passe par le récepteur TP (récepteur prostanoïde au TXA₂), situé sur les cellules musculaires lisses vasculaires. Le récepteur TP est couplé à une protéine Gq qui active la phospholipase de type C (PLC). La PLC hydrolyse le phosphoinositol en deux composants, le diacylglycérol (DAG) et le second messenger inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃) (Sellers & Stallone 2008). Ces deux molécules activent différentes voies de signalisation intracellulaire menant à une vasoconstriction des cellules musculaires lisses. L'activation du récepteur TP engendre une augmentation de Ca²⁺ provenant de l'ouverture des canaux calciques sensibles au voltage et une augmentation de la sensibilité des myofilaments par la Rho-kinase (Vanhoutte & Tang 2008). Bien que le TXA₂ se lie préférentiellement au récepteur TP, d'autres dérivés de l'AA, tels que le 8-isoprostane, la PGI₂ et la PGF_{2α}, peuvent aussi lier le récepteur et induire une vasoconstriction (Feletou *et al.* 2009; Vanhoutte 2009a).

Outre les dérivés des COX, d'autres métabolites de l'AA tels que le 20-HETE peuvent avoir un effet vasoconstricteur au niveau cérébral. Le 20-HETE, un métabolite de l'AA par les cytochromes P450, contribue au phénomène d'autorégulation, module la

prolifération cellulaire et joue un rôle dans la régulation de la pression et de la réponse myogénique (Roman 2002). Le 20-HETE a montré des effets vasoconstricteurs dans les artères rénales, mésentériques et cérébrales (Miyata & Roman 2005). Plusieurs mécanismes ont été suggérés pour l'induction de la vasoconstriction par le 20-HETE : (1) une activation de la protéine kinase C (PKC), une activation de la Rho kinase et de la voie des protéines mitogènes activées (MAP) kinases (Sun *et al.* 1999; Randriamboavonjy *et al.* 2003), (2) un blocage des BK_{Ca} induisant ainsi une dépolarisation des cellules musculaires lisses vasculaires et une augmentation du Ca²⁺ intracellulaire (Lange *et al.* 1997) ou (3) un effet direct sur les canaux calciques de type L (Gebremedhin *et al.* 1998).

1.3.2.2 Les dérivés réactifs de l'oxygène (DRO)

L'O₂⁻ a des effets vasculaires très complexes puisqu'il peut induire une vasodilatation à de faibles concentrations, alors qu'à de fortes concentrations, il peut induire une vasoconstriction (Faraci 2006). Il est difficile d'établir un lien solide entre une augmentation du stress oxydant et d'EDCF puisque les réponses des DRO sont très hétérogènes dans les différents lits vasculaires. Toutefois, certaines études ont montré que les contractions dépendantes de l'endothélium de l'artère basilaire de chien peuvent être inhibées par l'addition de la superoxyde dismutase (SOD, qui métabolise l'O₂⁻ pour former du H₂O₂) mais pas par la catalase (qui décompose le H₂O₂ en H₂O et en O₂) ou la déféroxamine (qui inhibe la production d'OH⁻), suggérant que l'O₂⁻, mais pas le H₂O₂ ou l'OH⁻, pourrait être un EDCF dans les artères cérébrales (Katusic & Vanhoutte 1989). Toutefois, la présence concomitante d'antioxydants endogènes tels que la SOD confère une demi-vie extrêmement courte à l'O₂⁻, ce qui rend peu probable son implication comme EDCF *in vivo* (Tang & Vanhoutte 2009). En plus de leurs effets aigus sur les vaisseaux, les DRO peuvent aussi avoir des effets chroniques en influençant l'expression génique, la perméabilité vasculaire et la structure vasculaire (Faraci 2006).

La peroxydation lipidique des acides gras polyinsaturés par les DRO peut mener à la formation d'isoprostanes qui sont capables d'induire une vasoconstriction (Tang & Vanhoutte 2009). Toutefois, il a été suggéré que cette constriction passe par le récepteur du TXA₂ ou encore *via* une induction de la libération de TXA₂ à partir de l'endothélium

(Faraci 2006). Les isoprostanes sont maintenant très utilisés comme marqueurs de stress oxydant (Tang & Vanhoutte 2009).

1.3.2.3 L'endothéline de type 1 (ET-1)

Tout comme les autres EDCF et EDRF, l'ET-1 n'est pas stockée dans les cellules endothéliales mais synthétisée *de novo* en réponse à de nombreux stimuli tels que les médiateurs inflammatoires (par exemple : les cytokines, le TGF- β) ou encore un faible «shear stress» (Le Brocq *et al.* 2008). L'endothéline est un peptide de 21 acides aminés qui est synthétisé sous forme de deux précurseurs inactifs, la préproendothéline et la proendothéline (Yanagisawa *et al.* 1988). Les cellules endothéliales cérébrales possèdent l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE) et peuvent produire de l'ET à partir de ses précurseurs (Kis *et al.* 2006). Trois différents isoformes de l'ET, encodées à partir de différents gènes, ont été identifiées, l'ET-1, l'ET-2 et l'ET-3. L'ET-1 et l'ET-3 ont été identifiées dans les neurones et les astrocytes (Cardell *et al.* 1994). En condition normale, ET-1 ne semble pas contribuer à la régulation du débit sanguin cérébral (Andresen *et al.* 2006), suggérant que l'ET-1 est seulement libérée dans des conditions pathologiques. En plus d'induire une vasoconstriction puissante, l'ET-1 stimule la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires et la libération de médiateurs inflammatoires tels que IL-1, IL-6 et IL-8 (Crimi *et al.* 2007).

Deux récepteurs à l'ET ont été identifiés : ET_A et ET_B (Arai *et al.* 1990) (Sakurai *et al.* 1990) qui sont tous deux couplés aux protéines G. Alors que ET_A semble être seulement exprimé sur les cellules musculaires lisses vasculaires, ET_B a aussi été identifié sur les cellules endothéliales, les astrocytes et les neurones (Cardell *et al.* 1994). ET-1 contracte de façon très prononcée les artères cérébrales *via* l'activation du récepteur ET_A. Plusieurs voies sont alors activées : (1) ET-1 stimule la PLC induisant ainsi la libération de IP₃ et la libération des réserves de Ca²⁺ intracellulaire. Cela permet une augmentation de la phosphorylation des chaînes légères de la myosine et une contraction ; (2) ET-1 active la voie des Rho/Rho-kinases induisant une inhibition de la phosphatase des chaînes légères de la myosine. En conséquence, l'ET-1 augmente la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine (MLC) par une augmentation du Ca²⁺ intracellulaire, ce qui inhibe l'activation de la Rho/Rho kinase *via* l'inhibition de la MLC phosphatase ; (3)

ET-1 peut aussi activer les canaux chlore (Cl^-) et promouvoir la contraction des vaisseaux cérébraux en augmentant le flux de Cl^- en dehors des cellules musculaires lisses vasculaires (Zubkov *et al.* 2004). L'activation du récepteur ET_B par l'ET-1 peut engendrer deux réactions contradictoires en fonction de la localisation du récepteur. Sur les cellules musculaires lisses vasculaires, ET_B induit une vasoconstriction suivant le même mécanisme qu' ET_A . Toutefois, sur les cellules endothéliales, ET_B induit une vasodilatation en favorisant la relâche de NO et de PGI_2 (Ortega Mateo & de Artinano 1997). Cette relaxation est cependant de courte durée tant *in vivo* qu'*in vitro* (Thorin *et al.* 2000).

1.3.2.4 L'angiotensine II (ANG II)

Le système rénine-angiotensine est un système hormonal dans lequel l'angiotensinogène et la rénine sont libérés dans la circulation à partir du foie et des reins respectivement. Le produit résultant est l'angiotensine I, un décapeptide biologiquement inactif qui est ensuite clivé par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) dans les cellules endothéliales afin de produire l'angiotensine II (Ang II) (Guyton & Hall 2000). L'angiotensine est capable de produire une vasoconstriction des artères cérébrales *in vitro* (Edvinsson *et al.* 1979) aussi bien qu'*in vivo* (Wei *et al.* 1978); toutefois l'angiotensine circulante ne traverse pas la barrière BBB (Faraci & Heistad 1990; Maktabi *et al.* 1990). Des études récentes ont révélé la présence d'un système rénine-angiotensine indépendant dans le système nerveux central contenant les mêmes intermédiaires que le système conventionnel (Kis *et al.* 2006). Les cellules endothéliales cérébrales sont grandement impliquées dans ce système, car elles produisent l'ACE. De plus, très récemment, la présence d'angiotensinogène et de rénine dans les cellules endothéliales cérébrales, neuronales et astrocytaires a été démontrée (Kis *et al.* 2006). Ce mécanisme semble toutefois délétère puisque qu'il engendre une augmentation de la pression pulsée, marqueur prédictif des accidents vasculaires cérébraux (AVC) et de la dysfonction cognitive (Waldstein *et al.* 2008).

L'Ang II se lie aux récepteurs de type I (AT_1) ou II (AT_2) qui sont couplés aux protéines G. Les deux types de récepteurs ont été identifiés sur les cellules vasculaires

cérébrales (Ardaillou 1999). Certaines études suggèrent que la stimulation de AT₂ pourrait être bénéfique lors de l'ischémie cérébrale (Li *et al.* 2005; Gelosa *et al.* 2009), mais le rôle du récepteur AT₂ est encore incertain. Le rôle d'AT₁ sur les cellules endothéliales est, quant à lui, beaucoup plus connu et pourrait être impliqué dans plusieurs pathologies cérébrovasculaires. L'activation du récepteur AT₁ induit la stimulation de la PLC, une augmentation de Ca²⁺ cytoplasmique et subséquemment une activation de PKC afin d'induire une vasoconstriction. La PKC peut aussi phosphoryler la sous-unité p47^{phox} de la NADPH oxydase engendrant une production de DRO (Bedard & Krause 2007). De ce fait, on peut considérer l'Ang II comme un médiateur du stress oxydant (Girouard *et al.* 2006). Dans le système rénine-angiotensine indépendant du cerveau, en plus de l'Ang II, d'autres peptides actifs dérivés de l'angiotensine, tels que l'Ang III et l'Ang IV, ont aussi été observés dans le cerveau. Alors que le rôle de l'Ang III est encore peu connu, l'Ang IV a soulevé beaucoup d'intérêt durant les dernières années puisque son action cardiovasculaire s'oppose à celle de l'Ang II (Feterik *et al.* 2000). En effet, au niveau cérébral, l'activation du récepteur AT₁ par l'Ang II est associée à une vasoconstriction et à une réduction du débit sanguin cérébral, alors que l'angiotensine IV semble induire une augmentation du débit sanguin cérébral et une vasodilatation *via* sa liaison au récepteur de la Bradykinine et une libération subséquente de NO (Feterik *et al.* 2000).

1.3.3 L'impact des cellules endothéliales sur les artères cérébrales

Une des premières interrogations en science neurologique est la relation entre le débit sanguin cérébral et la survie neuronale (Toda & Okamura 1998). Le débit sanguin est contrôlé physiologiquement par le tonus vasculaire des cellules musculaires lisses (Toda & Okamura 1998). Au cours des années, différentes études ont montré que les forces physiques (l'augmentation des forces de cisaillement), les hormones circulantes (catécholamines, vasopressine), les produits des plaquettes (sérotonine, adénosine diphosphate) ainsi que certains autacoïdes (histamine, bradykinine) sont capables d'influencer le tonus vasculaire *via* des propriétés dépendantes de l'endothélium (Vanhoutte 2009b). D'autres études suggèrent que le contrôle métabolique serait attribuable à l'unité neuro-vasculaire, c'est-à-dire que les médiateurs neuronaux et

astrocytaires agissent au niveau des cellules musculaires lisses et produisent une vasodilatation ou vasoconstriction (Andresen *et al.* 2006). En réalité, c'est la sommation de tous ces facteurs qui permet, d'une façon assez complexe, de réguler les principales fonctions des artères cérébrales.

1.3.3.1 Le tonus myogénique (TM)

Au niveau périphérique, il existe une règle selon laquelle l'intensité du tonus myogénique (TM) est inversement proportionnelle au diamètre de l'artère ; les artères de conductance n'ont pas de tonus au contraire des artères de résistance. Le TM se définit comme le niveau de contraction des cellules musculaires lisses des artères à une pression intra-vasculaire physiologique (Bayliss 1902). Cette adaptation des cellules musculaires lisses vasculaires est caractérisée par une diminution du diamètre du vaisseau suite à une augmentation de sa pression interne et d'une augmentation du diamètre du vaisseau suite à une diminution de la pression intra-luminale. Sans le tonus myogénique, les artères collapseraient et l'éjection sanguine cardiaque serait insuffisante pour assurer une circulation adéquate (Bevan & Laher 1991). Le TM est donc considéré comme une contraction de base permettant aux artères de s'adapter rapidement aux besoins métaboliques du tissu. Ce tonus basal est contrôlé par le système nerveux, le système neurohumoral ainsi que par la pression et le débit sanguin ; ces deux derniers interagissent en permanence dans les vaisseaux sanguins. En effet, la pression induit une constriction du muscle lisse vasculaire alors que le débit sanguin, par l'intermédiaire des forces de cisaillement stimule l'endothélium qui synthétise des agents vasoactifs essentiellement dilatateurs (voir figure 6) (Henrion 2005). C'est la sommation des deux facteurs qui détermine l'intensité du TM.

Trois types de cellules influencent la régulation du TM, les neurones, les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses. Tout d'abord, il a été démontré que les neurones peuvent moduler le TM par la sécrétion des peptides vasodilatateurs tels que la substance P, le polypeptide vasoactif intestinal (VIP) et le peptide relié au gène de la calcitonine (CGRP) (Okamura *et al.* 2002). De plus, ils peuvent induire la libération d'EDRFs tels que le NO afin de contribuer au contrôle du débit sanguin (Okamura *et al.* 2002).

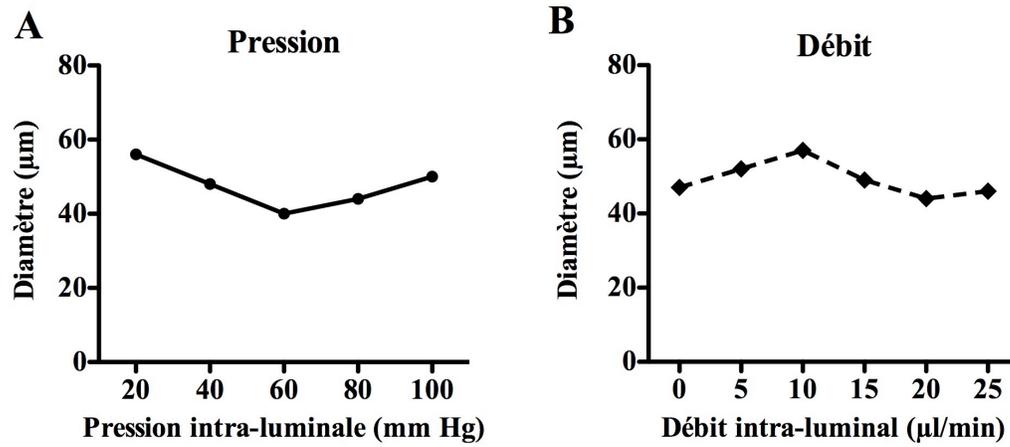


Figure 6. Changement de diamètre dans les artères cérébrales de souris suite à (A) une augmentation de pression à débit constant et (B) une augmentation de débit sans changement de pression intra-luminale [inspiré de (Ngai & Winn 1995)].

De même, l'endothélium vasculaire peut influencer grandement le développement du TM par la libération d'EDRF et d'EDCF tels que le NO et le 20-HETE (Gebremedhin *et al.* 2000). Le diamètre obtenu, suite à la libération des différents EDRF et EDCF, permet de maintenir un débit sanguin idéal dans les tissus subjacents. Ainsi, il a été suggéré qu'une dysfonction des EDRF pourrait induire une augmentation de la résistance vasculaire et donc une diminution du débit sanguin dans certaines régions du cerveau, pouvant mettre en jeu la survie neuronale (Toda & Okamura 1998).

Finalelement, il a été établi que le TM est associé à une dépolarisation membranaire des cellules musculaires lisses vasculaires démontrant ainsi leur implication dans la régulation du débit et de la pression sanguine. Effectivement, l'augmentation de pression induit, dans les cellules musculaires lisses, une entrée de Ca^{2+} intracellulaire *via* les canaux Ca^{2+} dépendants du voltage et donc une contraction. Cependant, le mécanisme de dépolarisation ainsi que son importance dans le développement de la réponse myogénique sont encore le sujet de débats (Schubert & Mulvany 1999; Henrion 2005).

1.3.3.2 Vasodilatation/Vasoconstriction

Suite à l'application d'agonistes, la libération des différents facteurs endothéliaux (EDRF/EDCF) induit une vasoconstriction ou vasodilatation, selon le cas échéant. La vasodilatation induite *in vitro* par l'ACh dans les artères cérébrales de souris peut être complètement inhibée par une combinaison de L-NNA (inhibition de la eNOS), d'indométhacine (inhibition des COX) et de KCl (inhibition des EDHF) (Drouin *et al.* 2007), démontrant que le tonus vasculaire cérébral reflète la sommation des voies de vasoconstriction et de vasodilatation. Des changements dans la libération de ces facteurs jouent un rôle important dans la régulation de la résistance vasculaire de la microcirculation cérébrale (Faraci & Heistad 1990). Par exemple, dans le cerveau tout comme dans la majorité des tissus, la PGI_2 est le métabolite majeur de l'AA alors que le TXA_2 est produit en moindre quantité (Sellers & Stallone 2008). Ces deux composés ont des effets vasculaires opposés suggérant qu'une balance dans la libération de PGI_2 et de TXA_2 est nécessaire au maintien de l'homéostasie. C'est donc la sommation de la

libération des EDRF et EDCF qui permet d'optimiser la régulation du tonus vasculaire cérébral.

Plusieurs substances telles que l'ACh, la BK, l'ATP et l'ADP peuvent induire la libération des EDRF et EDCF des vaisseaux cérébraux *via* l'activation de leurs récepteurs respectifs. En plus de tous ces stimuli chimiques, un stimulus physique comme l'augmentation des forces de cisaillement mérite une attention spéciale. Les forces de cisaillement associées à l'augmentation du débit sanguin stimulent l'endothélium et induisent une vasodilatation. Cette dilatation est probablement l'estimation la plus physiologique de la fonction endothéliale et sera discutée dans le prochain paragraphe.

En résumé, les voies de signalisation induites par les agonistes ou par les forces de cisaillement se chevauchent afin de contrôler avec précision le débit sanguin et d'optimiser la perfusion cérébrale.

1.3.3.3 Les dilatations et contractions induites par le débit sanguin (FMD/FMC)

L'augmentation du débit sanguin dans les capillaires, aussi bien au niveau cérébral qu'en périphérie, nécessite une coordination vasculaire complexe. Le contrôle de la circulation ne dépend pas seulement de la dilatation des capillaires, mais aussi de la dilatation des artères plus larges situées en amont (Segal & Casper 1992). Cette dilatation peut être associée à une augmentation des forces de cisaillement qui déforment, de façon mécanique, l'endothélium et induisent une dilatation des artères (Koller *et al.* 1993). En effet, le sang circulant dans les vaisseaux sanguins exerce de façon continue une force tangentielle sur les cellules endothéliales appelée «*shear stress*» ou force de cisaillement. Cette force est un puissant vasodilatateur et plusieurs études l'ont démontré aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*. Cette dilatation induite par le débit («*flow-mediated dilation*», FMD) est dépendante de l'endothélium et nécessite la libération des EDRF (Bevan & Laher 1991; Bevan & Henrion 1994; Le Brocq *et al.* 2008). Il a été suggéré que la présence de mécanorécepteurs sur les parois cellulaires pourrait réagir aux déformations tangentielles créées par les variations de débit en induisant la libération d'EDRF ou d'EDCF. L'identité et la localisation exacte de ces mécanorécepteurs sont encore indéterminées. Plusieurs candidats potentiels, aussi bien sur les cellules musculaires lisses que sur les cellules endothéliales ont été suggérés, incluant les protéines G, certains canaux ioniques, les

intégrines, les cadhérines, les caveolae et les récepteurs tyrosine kinase (Rubanyi *et al.* 1990; Fisher *et al.* 2001; Resnick *et al.* 2003).

Bien que la dilatation des artères en réponse à l'augmentation des forces de cisaillement soit clairement dépendante de l'endothélium, les EDRF impliqués dans cette dilatation restent encore incertains (Fujii *et al.* 1992). Les facteurs endothéliaux libérés par l'augmentation de débit agissent directement au niveau du muscle lisse et produisent une vasodilatation. Toutefois, il a été suggéré que l'augmentation des forces de cisaillement pourrait également induire la libération d'EDCF, potentialiser le TM et mener à une contraction. En effet, lorsque l'endothélium est expérimentalement soumis à des valeurs très élevées de «*shear stress*», ou lors de pathologies telles que l'hypertension, l'augmentation de débit peut induire une vasoconstriction («*flow-mediated constriction*», FMC) (Bevan & Henrion 1994). Il a aussi été démontré que la FMD observée dans les artères cérébrales de rats pouvait être changée en FMC suite à la diminution de la production de NO et à l'augmentation de la production de TXA₂ (Bagi *et al.* 2001). Cependant, la FMC a également été rapportée dans les artères cérébrales de rat en condition physiologique, montrant une réponse hétérogène des artères cérébrales à l'augmentation de débit (Bryan *et al.* 2001). Cette FMC semble être indépendante de l'endothélium et requérir l'activation des intégrines pour le transfert du signal (Bryan *et al.* 2001).

Il est maintenant bien établi que les zones du système vasculaire, telles que les bifurcations ou les embranchements, soumises à des forces de cisaillement non laminaires sont particulièrement vulnérables au développement de la dysfonction endothéliale (Le Brocq *et al.* 2008). En effet, les forces de cisaillement constantes (laminaires) maintiennent l'homéostasie de l'endothélium vasculaire et empêchent la prolifération et l'apoptose cellulaires, la coagulation, l'adhésion leucocytaire ainsi que l'athérogénèse (Resnick *et al.* 2000). Toutefois, des forces de cisaillement non laminaire et une diminution de l'activation des mécanorécepteurs engendrent une diminution de Ca²⁺ et une diminution de la phosphorylation de plusieurs protéines comme Akt et PKC résultant en une diminution de la production d'EDRF et à long terme, une dysfonction endothéliale et prédisposition à l'athérosclérose. Les effets des forces de cisaillement non laminaires sur les artères cérébrales sont toutefois peu connus.

En résumé, les différents types cellulaires cérébraux qui forment l'unité neuro-vasculaire — les neurones, les astrocytes et les cellules endothéliales — sont intimement impliqués dans le maintien de l'homéostasie cérébrale en régulant la constance du débit sanguin cérébral en fonction des variations de pressions (autorégulation) et de la demande métabolique (hyperémie fonctionnelle). Les cellules endothéliales contribuent au développement du tonus myogénique, aux réponses dilatatrices ou constrictrices (FMD ou FMC) par la libération d'agents vasodilatateurs et vasoconstricteurs (appelés respectivement EDRF et EDCF). Tous ces mécanismes sont indispensables afin de maintenir l'homéostasie cérébrale et la fonction neuronale constante. Toutefois, l'organisme est exposé à plusieurs stress aussi bien exogènes et qu'endogènes qui affectent ces mécanismes de régulation. Le simple processus de vieillissement engendre une déficience dans le fonctionnement de ces mécanismes, dysfonction qui semble être un précurseur dans le développement de plusieurs pathologies telles que la maladie d'Alzheimer, l'athérosclérose et l'accident vasculaire cérébral.

1.4 Le vieillissement vasculaire endothélial et cérébral

La notion de vieillissement fait référence au processus qui mène inévitablement l'organisme à ne plus assurer son équilibre physiologique, le conduisant progressivement à la mort. C'est donc une accumulation, plus ou moins aléatoire, de divers changements à travers le temps. Chez l'homme, le vieillissement est un processus complexe, lent et progressif associé à divers facteurs biologiques et environnementaux. Alors que certains de ces changements n'ont pas d'influence majeure sur les cellules, la majorité de ceux-ci augmentent les chances de développer une maladie ou encore de mourir (Harman 2001). Il est difficile, voire impossible, d'imaginer une cause unique pour le vieillissement, cependant, il est généralement accepté que ce sont les dommages moléculaires accumulés dans plusieurs systèmes cellulaires qui en sont l'origine (Trifunovic & Larsson 2008). Ainsi toute condition, environnementale ou génétique, qui augmente l'exposition cellulaire à des agressions, qui diminue la capacité de défense ou de réparation des cellules se traduit par un vieillissement accéléré (Barouki 2006).

Le processus du vieillissement affecte chaque organe du corps humain d'une façon différente. Le cerveau comprend de nombreuses cellules neuronales qui ne peuvent être remplacées suite aux dommages cellulaires. La perte progressive de neurones, le rétrécissement des cellules neuronales, la réduction de la densité des axones et la diminution du nombre des fibres de myéline sont des phénomènes fréquemment observés au cours du processus de vieillissement cérébral (Galluzzi *et al.* 2008). De plus, des études récentes ont démontré des changements de densité neuronale lors de plusieurs maladies neurologiques telles que la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson ; il a donc été suggéré que la perte de synapses neuronales pourrait être à l'origine du déclin des fonctions cognitives et de la mémoire qui est normalement associé au processus du vieillissement (Lister & Barnes 2009). En effet, à mesure que l'on vieillit, plusieurs aspects du processus de l'intégration de l'information incluant la vitesse, la capacité de mémoire, la mémoire à long terme deviennent moins efficaces (Park & Reuter-Lorenz 2009).

En plus de la perte neuronale, le vieillissement cérébral normal, c'est-à-dire en absence de pathologies telles que l'athérosclérose ou la démence, est associé avec une diminution de débit sanguin cérébral (Kalaria 1996) sans toutefois affecter l'efficacité du phénomène d'autorégulation (Carey *et al.* 2000). Cette diminution de débit sanguin cérébral peut être associée aux changements morphologiques vasculaires qui apparaissent de façon progressive au cours du vieillissement et qui altèrent la fonction des artères cérébrales. En effet, au cours du vieillissement, les artères présentent une augmentation de l'épaisseur de la media, de la quantité de collagène et du nombre de cellules musculaires lisses vasculaires, le tout résultant en une augmentation de la rigidité artérielle ou encore en une perte d'élasticité des parois vasculaires (Matz *et al.* 2000). On observe aussi un amincissement de la couche de cellules endothéliales cérébrales (Kalaria 1996). Tous ces changements morphologiques influencent de façon plus ou moins directe la fonction vasculaire cérébrale. Par exemple, plusieurs études ont montré que les vasodilatations dépendantes de l'endothélium diminuent progressivement avec l'âge, aussi bien au niveau périphérique que central (Hatake *et al.* 1990; Brandes *et al.* 2005; Krummen *et al.* 2005; Gendron *et al.* 2007; Vanhoutte *et al.* 2009), alors que d'autres ont montré une augmentation de la réponse vasoconstrictrice des artères cérébrales (Mayhan *et al.* 1990).

Toutefois, la dilatation indépendante de l'endothélium ne semble pas être affectée par le vieillissement (Shirasaki *et al.* 1986). Ainsi, les diminutions de débit sanguin cérébral pourraient être la conséquence d'une combinaison des changements morphologiques structuraux (perte d'élasticité) ainsi que de l'altération de la fonction des cellules endothéliales. Certaines études ont suggéré qu'une diminution du nombre de récepteurs ou d'affinité de l'agoniste pour son récepteur serait impliquée dans la dysfonction endothéliale cérébrale observée lors du vieillissement (Matz *et al.* 2000). Toutefois, plusieurs évidences montrent que la dysfonction endothéliale associée au vieillissement est corrélée avec une diminution de la libération d'EDRF et une augmentation de la production d'EDCF (Brandes *et al.* 2005; Vanhoutte *et al.* 2009).

Au niveau cérébral, le NO est un médiateur important. Or, le vieillissement endothélial cérébral implique une diminution de la libération de NO qui peut être expliquée par plusieurs mécanismes. Parmi ceux-ci, on compte une diminution de la biodisponibilité du NO *via* l'augmentation de O_2^- (Csiszar *et al.* 2007) et une diminution de la production de NO soit *via* l'augmentation de la concentration plasmatique des analogues de la L-arginine endogènes (Katusic 2007), *via* une réduction de l'expression de eNOS (Csiszar *et al.* 2002) ou encore *via* une diminution de l'activité de la NOS (Cernadas *et al.* 1998).

En somme, puisque le vieillissement affecte les cellules endothéliales cérébrales, il influence leurs réponses aux stress et aux forces de cisaillement, et mène à une diminution du débit sanguin cérébral. Il est possible d'imaginer que le vieillissement des cellules endothéliales cérébrales, qui engendre une diminution de la perfusion locale, puisse contribuer au déclin de la transmission neuronale et des fonctions cognitives (Kalaria 1996). Ainsi, la plupart des dommages cérébraux pourraient dériver de la détérioration des cellules endothéliales et d'une dysfonction de la réponse vasculaire (Yu & Chung 2001). À cause de tous ces changements, le vieillissement est un des facteurs de risque très important pour les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives. Toutefois, les mécanismes responsables du vieillissement restent encore à déterminer. Des évidences suggèrent que l'augmentation des dommages oxydants, principalement au niveau endothélial, serait à l'origine du vieillissement (Brandes *et al.* 2005).

1.4.1 Radicaux libres et stress oxydant

Toutes les cellules vasculaires ont le potentiel de produire des DRO, toutefois, en condition physiologique, la production la plus abondante de DRO se fait sans aucun doute dans les mitochondries qui utilisent 90% de l' O_2 du corps (voir figure 7). En plus de la formation intracellulaire de DRO, les radicaux libres peuvent dériver des sources environnementales telles que la lumière ultraviolette, les radiations ionisantes et divers polluants (voir figure 7) (Wickens 2001). La découverte de la SOD, dont le substrat unique est le radical O_2^- , a contribué à établir la réalité biologique des radicaux libres et leurs rôles possibles physiologiques (McCord & Fridovich 1969). Il a donc été établi que l'organisme possède un équilibre entre la production de DRO et la capacité de les éliminer suggérant un rôle physiologique des DRO dans les cellules. Par exemple, il a été démontré que l' OH^- peut activer la GCs et induire la formation de GMPc (Mittal & Murad 1977). Des effets similaires ont été observés avec le H_2O_2 (White *et al.* 1976; Drouin *et al.* 2007). Plus simplement, la découverte du NO montre bien que les DRO peuvent avoir des effets biologiques important dans la régulation du tonus vasculaire et de l'agrégation plaquettaire. Au fil du temps plusieurs fonctions biologiques ont été attribuées aux DRO incluant : la régulation du tonus vasculaire, la potentialisation du signal de transduction de récepteurs membranaires variés, incluant le récepteur pour les antigènes, et le maintien de l'homéostasie *redox* (Droge 2002).

Lorsque les DRO commencent à s'accumuler dans la cellule, ils peuvent être neutralisés par des molécules antioxydantes endogènes telles que le glutathion, la catalase et la superoxyde dismutase (SOD) (Barouki 2006). Le maintien de l'équilibre dit *redox* est primordial puisque la balance entre les avantages et les désavantages des DRO est clairement un aspect important de la santé et de la maladie (Steinbeck *et al.* 1993; Droge 2002). L'analyse de l'expression de 6 347 gènes de souris a montré que le vieillissement des cellules musculaires squelettiques et des cellules cérébrales était associé avec une augmentation des facteurs inductibles par le stress et un profil inflammatoire élevé (Lee *et al.* 1999; Droge 2002).

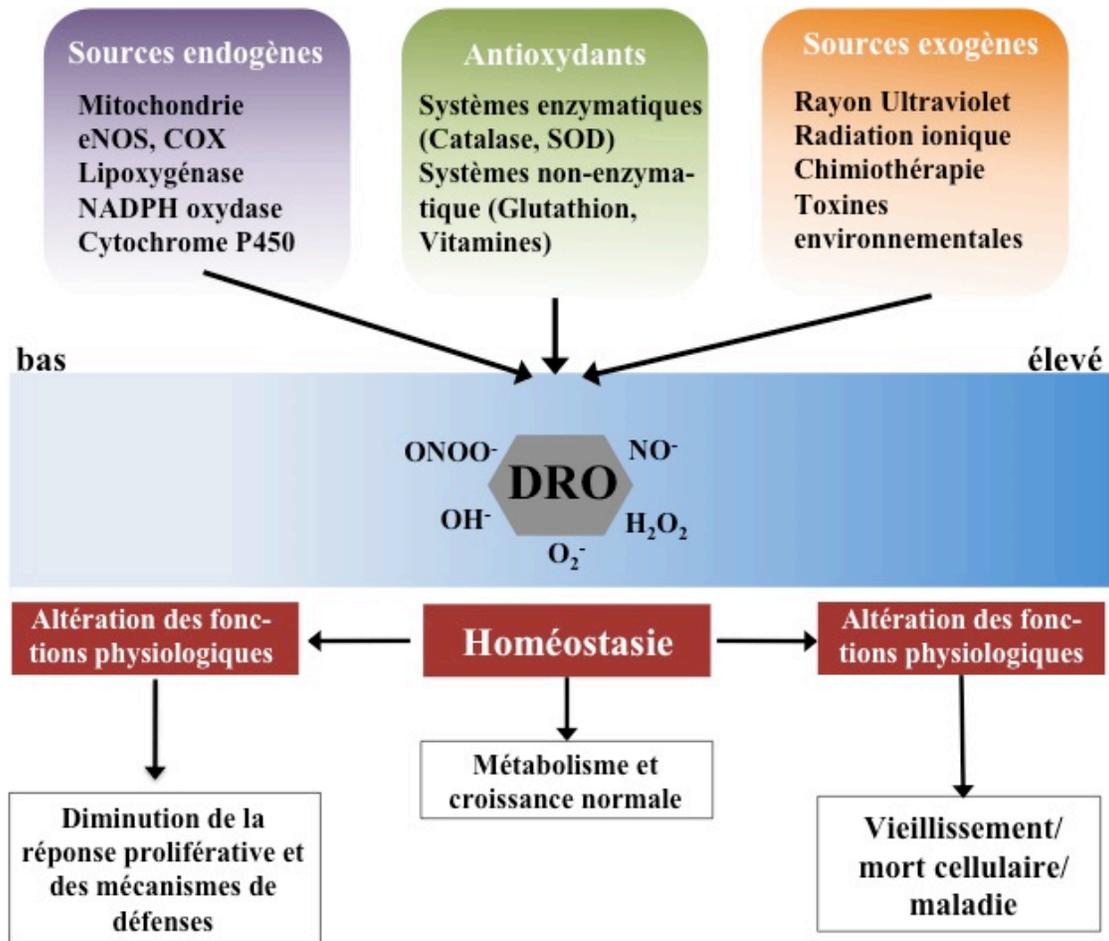


Figure 7. Les différentes sources et réponses aux DRO. En condition normale, la production de DRO et la capacité antioxydante sont en équilibre et l'homéostasie cellulaire est maintenue. Lorsque l'équilibre est perdu (soit à la hausse ou à la baisse), l'homéostasie est altérée et des maladies, le vieillissement, puis la mort cellulaire surviennent.

L'équilibre *redox* peut donc être altéré dans des conditions pathologiques telles que l'athérosclérose, la maladie d'Alzheimer ou encore simplement par le processus du vieillissement ; on parle alors de stress oxydant (Matz *et al.* 2000). Le stress oxydant est communément défini comme un déséquilibre entre la formation de radicaux libres et la capacité des antioxydants d'un organisme, d'une cellule ou d'un compartiment cellulaire. Les cellules endothéliales cérébrales sont très vulnérables face au stress oxydant puisqu'elles possèdent un métabolisme de consommation d'O₂ très élevé et une faible capacité antioxydante (Matz *et al.* 2000). De plus, la membrane des cellules endothéliales cérébrales contient une grande quantité d'acides gras polyinsaturés (PUFA), ce qui les rend extrêmement sensibles à la peroxydation lipidique. Or, une augmentation de la formation de DRO supérieure à la capacité des antioxydants peut altérer les fonctions physiologiques cellulaires *via* l'oxydation des lipides, des protéines ou de l'ADN.

La peroxydation lipidique survient lorsqu'un DRO attire un H⁺ d'un résidu carbone sur les chaînes d'acides gras diminuant irréversiblement la fluidité et l'élasticité membranaire (Wickens 2001). Plus l'acide gras possède un nombre élevé de double liaison, plus il est facile d'y enlever un H⁺, ce qui explique pourquoi les PUFA sont particulièrement prédisposés à la peroxydation lipidique (Pratico 2008). En plus des dommages membranaires, la peroxydation lipidique induit la libération de plusieurs produits tels que le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonanal (HNE) qui peuvent se lier aux protéines et altérer leurs fonctions (Adibhatla & Hatcher 2008). Le stress oxydant peut aussi affecter les protéines. En effet, les «*advanced glycation endproducts*» (AGEs) résultent d'une réaction de glycation non enzymatique irréversible des protéines (Brownlee *et al.* 1984). Les AGEs s'accumulent avec l'âge mais la présence de stress oxydant et d'hyperglycémie accélèrent leur formation. Lors de la liaison à leur récepteur (RAGE) (Neeper *et al.* 1992), qui est exprimé sur les cellules musculaires lisses, les cellules endothéliales et les neurones (Brett *et al.* 1993), les AGEs induisent à leur tour la libération de radicaux libres (Mullarkey *et al.* 1990). Les AGEs participent ainsi au développement de plusieurs maladies associées au vieillissement tel que les maladies cardiovasculaires (Zieman & Kass 2004), les accidents vasculaires cérébraux (AVC) (Zimmerman *et al.* 1995) et la maladie d'Alzheimer (Srikanth *et al.* 2009). Toutefois, les DRO peuvent aussi réagir directement avec les protéines, incluant les enzymes, afin de les

oxyder et former des groupements carbonyles. On retrouve par exemple une accumulation de ces groupements dans les cellules cérébrales de sujets atteints de la maladie d'Alzheimer (Hensley *et al.* 1995). L'ADN est également très susceptible aux attaques radicalaires. Cette réaction peut enlever une base ou encore causer une brisure de l'ADN (Ames *et al.* 1993). Même si les mécanismes de réparation de l'ADN peuvent palier l'attaque du stress oxydant, l'accumulation des dommages à l'ADN semble jouer un rôle majeur dans le processus du vieillissement (Randerath *et al.* 1995; Wickens 2001).

En résumé, les DRO sont soit bénéfiques ou néfastes selon leur concentration et l'efficacité des mécanismes antioxydants. Si la formation de DRO excède la capacité antioxydante (situation de stress oxydant), des dommages moléculaires (au niveau des lipides, des acides nucléiques, des AGEs et des protéines) surviennent (Biesalski 2002). Le stress oxydant semble être un élément commun impliqué dans plusieurs maladies et dans le vieillissement cellulaire cérébral (Chrissobolis & Faraci 2008). La théorie radicalaire, émise par le Dr. Harman avant même que la pertinence biologique des radicaux libres eût été démontrée, tente d'expliquer le processus du vieillissement par l'accumulation de molécules oxydées dans l'organisme (Harman 1957).

1.4.2 Théorie radicalaire du vieillissement

La théorie des radicaux libres provient de la prémisse qu'un processus commun et susceptible d'être modifié, aussi bien génétiquement que par l'environnement, est responsable du vieillissement et de la mort des êtres vivants (Harman 2001). Lorsque le Dr Harman a découvert que l'irradiation des organismes vivants accélère le processus du vieillissement, il a émis l'hypothèse que les effets délétères des DRO sur plusieurs types cellulaires pouvait être le véritable responsable biologique du vieillissement (Harman 1957). La théorie a ensuite été approfondie par la suggestion que les DRO étaient produits par les mitochondries et que la longévité pouvait être corrélée aux dommages mitochondriaux par le stress oxydant (Medvedev 1990; Soberman 2003; Kirkwood 2005). L'observation que les espèces ayant une moins grande activité métabolique et une défense

antioxydante plus développée, telles que les tortues, vivent plus longtemps que les autres, vient appuyer la théorie radicalaire du vieillissement (Harman 1993; Biesalski 2002).

Le Dr. Harman a donc proposé que la force majeure sous-jacente du processus du vieillissement soit une accumulation des dommages cellulaires causés par l'attaque des radicaux libres. Les recherches ont montré que 90% de la réduction de l'O₂ se produit dans les mitochondries et que cela entraîne la production des DRO (Harman 1993; Trifunovic & Larsson 2008). Ainsi, les mutations augmentant la production de DRO par les mitochondries joue un grand rôle dans le processus du vieillissement. Cette théorie est très intéressante puisque, outre le noyau, les mitochondries sont les seules organelles possédant leur propre ADN (mtADN) ; elles possèdent donc la possibilité d'introduire des dommages irréversibles dans le génome (Reeve *et al.* 2008; Trifunovic & Larsson 2008). Cependant, ces théories s'appliquent-elles aux cellules vasculaires cérébrales ?

Il a été mentionné précédemment que le cerveau est plus susceptible aux attaques oxydantes que les autres lits vasculaires puisqu'il possède une faible quantité d'antioxydants, un plus grand nombre de mitochondries et une plus grande concentration de PUFA (qui sont plus prédisposé à l'oxydation que les autres acides gras). Or, il a été démontré que l'augmentation de la production de DRO associé au vieillissement est aussi présente au niveau cérébral (Kregel & Zhang 2007); il est donc tout à fait possible que le stress oxydant puisse induire des dommages dans les cellules cérébrales et jouer un rôle dans la pathogénèse des maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer (Kidd 2008) et la maladie de Parkinson (Ebadi & Sharma 2006). De plus, des indications des effets néfastes des DRO, tels que l'oxydation des protéines, la peroxydation lipidique, ont été détectées dans le cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Hamdheydari *et al.* 2003).

Toutefois, au niveau cérébral, une autre théorie du vieillissement mérite d'être soulevée, une théorie impliquant le NO. En effet, l'augmentation de la production de NO dans plusieurs maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer, suggère l'implication du composé NO dans la perte neuronale (McCann *et al.* 2005). Le NO libéré à forte concentration par les macrophages activés exprimant la NOS inductible est une molécule toxique, possédant ainsi des propriétés pro-oxydantes lors de sa liaison avec l'O₂⁻ (Brandes *et al.* 2005). De plus, nous savons

aujourd'hui que le NO libéré à des concentrations physiologiques par les cellules exprimant la eNOS ou la nNOS, est important dans la régulation de plusieurs fonctions cérébrales telles que la potentialisation à long terme de la mémoire (Garthwaite *et al.* 1988), le contrôle de la libération de GABA ainsi que de l'inhibition de la libération de norépinephrine et de dopamine (Hamel 2006). Il est donc possible que la surproduction de NO puisse produire des dommages neuronaux et altérer les structures cérébrales au cours du vieillissement. Plusieurs études ont en effet démontré que le NO peut jouer un rôle dans la mort des cellules neuronales, entraînant ainsi l'apparition de maladies telles que la maladie de Parkinson suite à la perte de neurones du système dopaminergique (Przedborski *et al.* 1996).

Le NO peut causer la mort des neurones par deux mécanismes distincts, par (1) la formation de ONOO⁻ causant de la toxicité et (2) la combinaison du NO avec les groupes hèmes des mitochondries, bloquant ainsi la respiration cellulaire (McCann *et al.* 2005). Lors de la maladie d'Alzheimer, qui est très souvent associée au vieillissement, on remarque la présence d'astrocytes réactifs (c'est-à-dire des astrocytes exprimant l'interleukine de type 1 ; IL-1). IL-1 est connue pour induire l'expression de la iNOS et créer une augmentation accrue de la production de NO (Meini *et al.* 2008). Au cours du vieillissement, l'augmentation de ces astrocytes réactifs est documentée et pourrait être associée à la perte neuronale (McCann *et al.* 2005). De plus, il a été démontré que la production de NO provenant de la nNOS pourrait être responsable des dommages à l'ADN observés lors de la maladie de Parkinson (Przedborski *et al.* 1996; Hoang *et al.* 2009).

Comme le NO entre dans la catégorie des DRO, il est tout à fait possible que ces deux théories soient complémentaires au niveau cérébral. En effet, la formation de ONOO⁻ nécessite la production accrue aussi bien de NO que de O₂⁻. Or, la surproduction de O₂⁻ par les mitochondries, tel que proposé par le Dr. Harman (Harman 1957), engendre une dysfonction des astrocytes ainsi qu'une surproduction de NO menant à la formation de ONOO⁻. S'il est difficile d'imaginer une cause unique au processus du vieillissement, la théorie du stress oxydant et celle du NO fournissent certaines informations quant aux mécanismes menant au vieillissement et aux maladies qui lui sont associées.

1.4.3 Maladies associées au vieillissement cérébral

Toutes les définitions pour expliquer le processus du vieillissement oublient souvent de répondre à la question fondamentale : pouvons-nous vraiment mourir de vieillesse ou l'apparition de maladies associées au vieillissement est-elle inévitable ? Pour répondre à cette question, il faudrait pouvoir différencier les changements cellulaires cérébraux apparaissant au cours du vieillissement normal de ceux causés par la présence d'une maladie affectant le cerveau telle que la maladie d'Alzheimer (Galluzzi *et al.* 2008). Il est cependant très difficile de dissocier les changements reliés au vieillissement de ceux causés par les maladies (Kregel & Zhang 2007).

L'augmentation de stress oxydant, les dommages moléculaires ainsi que la diminution de la capacité de réparation des cellules sont associés au vieillissement. Or, ce sont aussi ces mécanismes qui favorisent le développement de maladies aussi bien au niveau cardiovasculaire que neurologique (Donato *et al.* 2007). Plusieurs maladies se développent à un âge avancé, le vieillissement est donc considéré comme un facteur de risque important dans la genèse de la majorité des maladies. La maladie d'Alzheimer est la plus grande cause de démence cérébrovasculaire et le vieillissement est un facteur de risque primaire de cette maladie (Harman 2006). La maladie d'Alzheimer est de plus en plus présente, affectant près de 16 millions de personnes à travers le monde (Pratico 2008). La maladie d'Alzheimer est une dégénérescence progressive du cerveau affectant le contrôle de la mémoire et des fonctions cognitives. Dans le cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer, plusieurs évidences d'attaques oxydantes, avec des plaques de β amyloïde et des enchevêtrements neuronal fibreux dans les neurones ont été rapportés (Pratico & Sung 2004). Une autre maladie neurodégénérative associée au vieillissement est la maladie de Parkinson. La maladie de Parkinson est une dégénération sélective des neurones dopaminergiques induisant une bradykinésie, des tremblements et une rigidité des membres. La génération de radicaux libres et la peroxydation lipidique semblent être impliquées dans le développement de cette maladie (Adibhatla & Hatcher 2008). Au niveau cardiovasculaire, le même phénomène se produit, puisque l'augmentation de DRO est un facteur de risque important dans plusieurs maladies: l'athérosclérose est un très bon exemple puisque l'augmentation du stress oxydant est primordiale pour sa genèse et son développement. Bien que l'athérosclérose soit principalement à l'origine d'une

dysfonction périphérique, elle pourrait entraîner au cours du vieillissement une hypoperfusion cérébrale soutenue et affecter les neurones (Kalaria 1996).

En résumé, le vieillissement est donc inévitable. C'est un désordre moléculaire et cellulaire progressif qui augmente la vulnérabilité de l'organisme à développer des maladies. La théorie radicalaire implique que l'augmentation de stress oxydant ainsi que la diminution de la quantité d'antioxydants endogènes soient à l'origine du processus du vieillissement. Or, le cerveau est très vulnérable au stress oxydant, l'attaque oxydante de l'unité neurovasculaire (neurones, astrocytes et cellules endothéliales) engendrant une diminution de la réponse aux stimuli qui pourrait être associée à une diminution des fonctions cognitives.

1.5 L'athérosclérose

Le vieillissement cellulaire, caractérisé par une diminution des capacités antioxydantes, une augmentation de la production de DRO et une dysfonction endothéliale, est un facteur de risque majeur dans le développement de l'athérosclérose (Collins *et al.* 2009a). L'athérosclérose est une maladie inflammatoire progressive qui affecte les artères de conductance. Elle débute par une réponse inflammatoire protectrice face à un dommage endothélial et progresse vers la formation d'une plaque athéromateuse qui, graduellement, diminue la lumière du vaisseau (voir figure 8) (Cipollone & Fazia 2006). Lors de la première phase du développement de l'athérosclérose, les médiateurs de l'inflammation et les cytokines induisent une dysfonction endothéliale stimulant ainsi l'accumulation dans la paroi artérielle des lipoprotéines de faible densité (LDL), un des transporteurs majeurs de cholestérol dans la circulation (Croce & Libby 2007). Les LDL sont capables de diffuser librement à travers la paroi artérielle, toutefois, à force d'être exposés aux DRO, les LDL deviennent oxydées (voir figure 8) (Naseem 2005).

Progression de l'athérosclérose

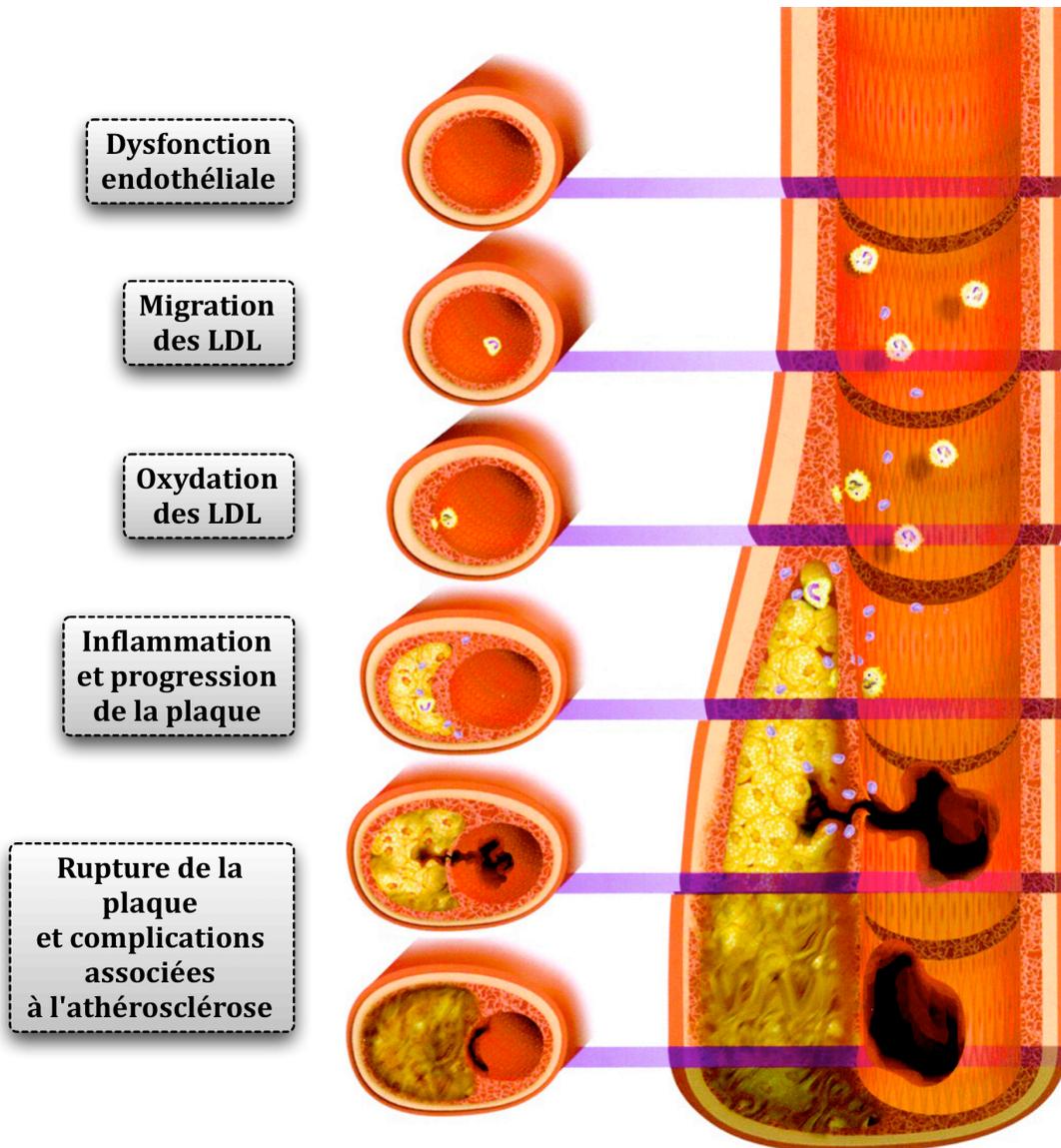


Figure 8. Section longitudinale d'une artère montrant le développement et la progression de l'athérosclérose [inspiré de (Croce & Libby 2007)].

Ces LDL oxydées sont très dommageables puisqu'elles sont capables de promouvoir l'adhésion des monocytes, la production des molécules d'adhésion telles que la protéine chémo-attractante monocyttaire de type 1 (MCP-1), ainsi que la différenciation des monocytes en macrophages qui initie la formation des cellules spumeuses (Berliner *et al.* 1990; Naseem 2005). Le milieu pro-inflammatoire ainsi créé stimule la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires et la déposition de collagène et/ou d'élastine menant à l'expansion de la plaque athéromateuse (voir figure 8) (Croce & Libby 2007). La réponse inflammatoire est une réaction physiologique normale d'un tissu endommagé qui essaie de maintenir son homéostasie (Cipollone & Fazia 2006). Cette réaction implique une perte des propriétés contractiles des cellules musculaires lisses vasculaires au dépend d'un phénotype cellulaire fibreux, c'est-à-dire, la formation d'une chape fibreuse recouvrant les lésions adipeuses (Naseem 2005).

Les dommages endothéliaux sont donc responsables du développement et de la localisation des plaques d'athéromes (Boyle *et al.* 1997). La dysfonction endothéliale est un terme largement utilisé dans la littérature qui décrit toute forme anormale de l'activité endothéliale incluant un déséquilibre entre la libération des EDRF/EDCF et l'augmentation de l'expression des molécules d'adhésion (Le Brocq *et al.* 2008). Le Dr Ross et ses collègues ont montré que les dommages endothéliaux incluent une altération de la perméabilité des cellules endothéliales permettant ainsi une interaction entre les composants sanguins et la paroi artérielle (Ross & Glomset 1973). C'est donc l'habileté des cellules endothéliales à rétablir leur intégrité qui semble être critique dans l'initiation et la progression de l'athérosclérose (Boyle *et al.* 1997). Les augmentations de la pression artérielle, de la concentration sanguine de LDL oxydées, des toxines ingérées lors de la consommation de cigarettes ou encore l'élévation du glucose sanguin sont toutes reconnues comme des causes possibles de ces dommages endothéliaux (Boyle *et al.* 1997; Naseem 2005). Les dommages physiques, causés par les forces de cisaillement élevées ou un débit sanguin turbulent sont aussi une cause fréquente de dysfonction endothéliale (Boyle *et al.* 1997). Comme les lésions athéromateuses semblent plus sévères aux points d'embranchements, les fluctuations des forces de cisaillement semblent être très impliquées non seulement dans l'initiation mais aussi dans le développement de l'athérosclérose (Boyle *et al.* 1997).

1.5.1 Implication de l'athérosclérose au niveau cérébral

Le cerveau étant le deuxième organe qui possède la plus grande concentration de lipides (après le tissu adipeux), le contrôle du métabolisme des lipides peut avoir une grande importance sur la progression de l'athérosclérose au niveau cérébral (Adibhatla & Hatcher 2008). Des évidences récentes montrent que l'hypercholestérolémie induit un stress oxydant ainsi qu'un phénotype pro-inflammatoire et pro-thrombogénique dans la micro-circulation cérébrale, ce qui suggère que les cellules endothéliales cérébrales réagiraient de la même façon que les cellules endothéliales périphériques à l'augmentation sanguine de cholestérol (Ishikawa *et al.* 2004). Toutefois, à cause du phénomène d'autorégulation, les cellules endothéliales cérébrales sont exposées à un débit sanguin constant, sans variation de pression et probablement plus laminaire, ce qui leur procure une certaine protection contre le développement des plaques athéromateuses. De plus, il a été démontré que l'exposition *in vitro* des cellules endothéliales cérébrales aux LDL a pour effet de diminuer la fluidité des membranes, d'augmenter la production de NO et de DRO, suggérant un lien entre l'augmentation de l'oxydation des LDL et l'altération des fonctions des cellules endothéliales cérébrales (Hamdheydari *et al.* 2003). La présence de LDL oxydées entraîne une diminution de la dilatation dépendante de l'endothélium et mène à un découplage de la eNOS dans les artères carotidiennes, mais pas dans les artères basilaires, suggérant que les artères intracrâniennes sont relativement protégées de l'athérosclérose *via* une résistance endothéliale vis à vis des dommages oxydants (Napoli *et al.* 1997; Vergnani *et al.* 2000).

L'athérosclérose évolue silencieusement pendant plusieurs décennies avant d'être révélée à l'occasion d'une de ses complications telles que l'infarctus du myocarde, l'embolie pulmonaire ou l'accident vasculaire cérébral (AVC). L'athérosclérose est donc un facteur de risque important pour les AVC qui sont la 3^e cause de décès au niveau mondial (Vaughan *et al.* 2001). La plupart des infarctus du myocarde ou des AVC résultent d'une rupture de la plaque qui est la complication principale de l'athérosclérose (Nanetti *et al.* 2007). Toutes les plaques athéromateuses ne sont pas identiques et varient dans leurs compositions (nombre de macrophages, de lipides et épaisseur de la chape

fibreuse) (Naseem 2005). L'instabilité et la vulnérabilité des plaques sont influencées par l'épaisseur de la chape fibreuse, par la présence d'inflammation dans la chape fibreuse, par le contenu en cellules adipeuses, par le nombre de monocytes et de macrophages ainsi que par la présence de remodelage dans la paroi vasculaire (Vaughan *et al.* 2001; Fowler *et al.* 2006). Les plaques ayant une mince chape fibreuse, une grande quantité de cellules adipeuses et de macrophages sont plus vulnérables au détachement de la plaque ou aux fissures mécaniques. La rupture de la plaque crée un thrombus qui peut alors migrer dans la circulation et bloquer une artère coronaire (et conduire à l'infarctus du myocarde), une artère pulmonaire (créant une embolie) ou encore migrer vers le cerveau (et générer un AVC) (Naseem 2005).

Les maladies neurodégénératives peuvent aussi être associées à l'athérosclérose. En fait, plusieurs évidences montrent un lien entre le développement de la maladie d'Alzheimer et de l'athérosclérose (Refolo *et al.* 2000; Sparks *et al.* 2000; de la Torre 2002) suggérant qu'un mécanisme commun pourrait opérer dans les deux maladies (Hamdheydari *et al.* 2003). Par exemple, il est possible d'observer la formation de plaque dite *sénile* lors de la maladie d'Alzheimer. L'apolipoprotéine E (ApoE) peut interagir avec le précurseur de la protéine amyloïde (APP) et le β amyloïde, favorisant ainsi la formation de la plaque sénile (Haas *et al.* 1997). Plusieurs composants du métabolisme des lipides sont associés avec la maladie d'Alzheimer (Carter 2007). En effet, la maladie d'Alzheimer est souvent associée avec des changements des niveaux de HDL et de LDL suggérant que le métabolisme des lipides est altéré lors de cette maladie. De plus, il a été démontré que la consommation d'une diète riche en cholestérol était corrélée avec une augmentation des niveaux de β amyloïde dans le cerveau et une augmentation des risques de développer la maladie d'Alzheimer (Martins *et al.* 2006). Il est maintenant reconnu que les individus ayant des maladies cardiovasculaires montrent souvent des dépôts neuronaux de β amyloïde similaires à celles observées lors de la maladie d'Alzheimer (Sparks *et al.* 2000).

Les statines (ou inhibiteurs de la HMG-CoA réductase) sont utilisées pour traiter l'hypercholestérolémie chez des patients qui risqueraient de développer une maladie cardiovasculaire. Les statines agissent en diminuant les LDL, en réduisant la progression de la plaque athéromateuse et les marqueurs vasculaires de l'inflammation et en

améliorant la fonction endothéliale (Ludman *et al.* 2009). Même si les statines ne diminuent pas les niveaux circulants de lipides, elles ont un effet positif sur la stabilisation de la plaque (Fowler *et al.* 2006). Des études cliniques ont montré que l'utilisation de statines est associée avec une réduction des AVC (Vaughan *et al.* 2001). Les statines pourraient avoir des effets neuroprotecteurs indépendants de leurs effets sur le cholestérol, incluant une augmentation de la biodisponibilité du NO ainsi que des actions anti-oxydantes, anti-inflammatoires et anti-thrombotiques (Fowler *et al.* 2006). L'impact des statines sur la fonction cognitive reste encore controversé. En effet, alors que certaines études montrent des effets bénéfiques des statines sur la fonction cognitive et la maladie d'Alzheimer autant dans le modèle animal (Tong *et al.* 2009) que chez l'humain (Wolozin *et al.* 2000; Dufouil *et al.* 2005; Sparks *et al.* 2005; Haag *et al.* 2009), d'autres études, effectuées chez un grand nombre de patients suggèrent toutefois aucun effet bénéfique des statines sur les fonctions cognitives (Trompet *et al.* ; Collins *et al.* 2004).

En résumé, l'athérosclérose, *via* la dyslipidémie et l'augmentation de stress oxydant, est une maladie qui affecte aussi bien les cellules endothéliales périphériques que cérébrales. Or, même si les artères cérébrales semblent avoir quelques mécanismes de protection contre le développement des plaques, il est possible d'observer la formation de plaques cérébrales lors de certaines maladies telle que la maladie d'Alzheimer. Les complications de l'athérosclérose, dont la rupture des plaques, sont le facteur de risque majeur des AVC et pourraient augmenter le risque de développer des maladies neurodégénératives.

1.5.2 L'athérosclérose et les COX

Les prostanoides jouent un rôle important non seulement dans la régulation des processus physiologiques des vaisseaux sanguins (vasodilatation/vasoconstriction), mais aussi dans le développement de l'athérosclérose (inflammation/agrégation plaquettaire/adhésion et migration des leucocytes) (Upmacis *et al.* 2006). Le TXA₂ et la PGI₂ sont sans doute les prostanoides les plus impliqués dans le contrôle du système cardiovasculaire (Cheng *et al.* 2002). Ces prostanoides sont sécrétés autant par les

plaquettes sanguines que par l'endothélium vasculaire et possèdent des effets vasculaires opposés ; la balance entre le TXA₂ et la PGI₂ influence donc le contrôle de l'homéostasie vasculaire (Iniguez *et al.* 2008).

Il a été démontré que des niveaux élevés de LDL sont associés avec une augmentation de la production de TXA₂, alors que les niveaux élevés de HDL sont associés avec une diminution de la production de TXA₂ (Beitz *et al.* 1993). Des études effectuées chez la souris n'exprimant pas le récepteur aux LDL, un modèle de souris très utilisé pour l'étude de l'athérosclérose, ont montré que l'inhibition simultanée de COX-1 et COX-2, mais pas l'inhibition de COX-2 seulement, pouvait ralentir la progression de l'athérosclérose (Pratico *et al.* 2001). COX-1 est reconnue pour sa libération de TXA₂ et son inhibition par l'aspirine est associée avec une diminution de l'incidence des maladies cardiovasculaires (Wu 2003). De plus, il a été démontré que l'utilisation d'antagonistes du récepteur TP, le récepteur du TXA₂, diminue la progression de l'athérosclérose chez la souris (Cayatte *et al.* 2000). Ce phénomène a aussi été observé chez les souris qui n'expriment pas le récepteur TP (Kobayashi *et al.* 2004) suggérant que l'augmentation de la production de TXA₂ est responsable, en partie, de la progression de l'athérosclérose. Récemment, un inhibiteur du récepteur du TXA₂, le terutroban, a montré des effets bénéfiques dans le traitement des AVC (Chamorro 2009), renforçant l'idée que le TXA₂ est impliqué dans la progression de l'athérosclérose. Les effets délétères du TXA₂ sont d'autant plus importants qu'il a été démontré que l'activation du récepteur TP augmente l'activité de la NADPH oxydase et induit la formation de O₂⁻ (Muzaffar *et al.* 2004). La production de O₂⁻ est ensuite capable d'interagir avec le NO mais aussi avec la eNOS afin de la découpler et induire à son tour la production de O₂⁻ (Nepl *et al.* 2009).

Une étude sur le rofecoxib, un inhibiteur de la COX-2, a révélé que l'utilisation de ce médicament était associée avec une augmentation des risques de développer un infarctus du myocarde ou encore un AVC, ce qui en a entraîné le retrait du marché (Fitzgerald 2004). Cette étude suggère qu'en condition pathologique, la production de PGI₂ par la COX-2 viendrait contrebalancer les effets délétères de la production de TXA₂ par la COX-1 (Fitzgerald 2004). En effet, le TXA₂ et la PGI₂ ont des effets opposés sur la progression de l'athérosclérose. Par exemple, chez les souris athérosclérotiques, l'inhibition du récepteur du TXA₂ retarde significativement la progression de

l'athérosclérose alors que l'inhibition du récepteur de la PGI₂ accélère son développement (Kobayashi *et al.* 2004).

Les COX sont aussi un élément central dans le développement du traitement d'une multitude de maladies dont les maladies neuro-inflammatoires et neuro-dégénératives (Minghetti 2004). Par exemple, l'expression de la COX-1 et de la COX-2 varie lors de la progression de la maladie d'Alzheimer. Au début, lorsqu'il a peu de β amyloïde et d'enchevêtrements neuronaux fibreux, la COX-2 est surexprimée dans les neurones suggérant des signes d'inflammation. Or, au cours de la progression de la maladie, l'expression de COX-1 augmente essayant de palier l'augmentation de COX-2 (Hoozemans *et al.* 2008). De plus, suite à l'ischémie cérébrale, toutes les cellules montrent une augmentation de COX-2 qui semble être associée avec une augmentation des dommages tissulaires (Candelario-Jalil & Fiebich 2008). Chez la souris, au niveau vasculaire cérébral, il a été proposé que l'augmentation de la production de TXA₂, *via* la stimulation de son récepteur, engendrait une augmentation de stress oxydant, une diminution de la production de NO et, ultimement, une diminution des fonctions cognitives (Neppl *et al.* 2009). Toutefois, chez l'humain, le rôle exact des COX dans la diminution des fonctions cognitives reste indéterminé. Une étude clinique prospective a démontré que la prise de médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens (reconnu pour leurs effets sur les COX) avait peu d'effet sur le développement de la maladie d'Alzheimer (in 't Veld *et al.* 1998). L'étude plus approfondie de l'évolution des COX et de leurs métabolites lors de maladies neurodégénératives ou lors de l'ischémie cérébrale pourrait peut-être mener à l'élaboration de traitements préventifs.

En résumé, le débalancement entre la production de TXA₂ et de PGI₂ influence la progression de l'athérosclérose et les maladies neurologiques. Ce mécanisme fait partie d'une avenue thérapeutique qui est présentement utilisée aussi bien au niveau périphérique que cérébral.

1.5.3 L'athérosclérose et le NO

La diminution de la biodisponibilité du NO est reconnue comme un élément central dans le développement de plusieurs maladies cardiovasculaires telles que l'athérosclérose, le diabète et l'hypertension. Toutefois, nous ne pouvons toujours pas affirmer que la perte de NO soit la cause ou encore le résultat d'une dysfonction endothéliale (Naseem 2005). La diminution de la production de NO est majoritairement associée à son inactivation par l' O_2^- suite à une augmentation de la production de DRO (Crimi *et al.* 2007). La concentration locale d' O_2^- est donc un déterminant majeur de la demi-vie biologique du NO (Chrissobolis & Faraci 2008). De plus, les niveaux plasmatiques d'arginine asymétrique diméthyle (ADMA), un inhibiteur endogène de la NOS, sont plus élevés chez les patients hypercholestérolémiques et athérosclérotiques (Napoli *et al.* 2006). En condition normale, le NO inhibe la progression de la plaque d'athérome (antiprolifération/antiplaquettaire); une diminution de la production de NO peut réduire ces mécanismes protecteurs et prédisposer les artères au développement de l'athérosclérose (Liu & Huang 2008).

Chez les souris surexprimant l'apolipoprotéine E (ApoE) alimentées avec une diète riche en cholestérol, le fait d'enlever l'expression génique de la eNOS ou encore de la nNOS entraîne un développement précoce des lésions athérosclérotiques. Toutefois, dans ce même modèle de souris, le fait d'enlever la iNOS produit l'effet inverse (Kuhlencordt *et al.* 2001). Les souris n'exprimant pas la eNOS deviennent hypertendues, présentent une dysfonction endothéliale et montrent une augmentation de la taille de l'infarctus cérébral en réponse à des attaques vasculaires telles que l'ischémie ou les AVC (Huang *et al.* 1996; Moroi *et al.* 1998). Toutefois, cette augmentation de la taille de l'infarctus cérébral en réponse à des attaques vasculaires n'est pas observée chez les souris n'exprimant pas la nNOS (Liu & Huang 2008). Ces évidences suggèrent que les 3 types de NOS peuvent avoir un impact différent sur le développement de l'athérosclérose et des AVC. Comme le NO joue un rôle biologique primordial au niveau cérébral, la diminution du NO affecte aussi bien les fonctions vasculaires que la fonction neuronale, pouvant ainsi contribuer au déclin des fonctions cognitives (Park *et al.* 2008). L'inhibition de la synthèse de NO réduit la compliance vasculaire, augmente la résistance vasculaire et limite le débit sanguin cérébral (Napoli *et al.* 2006). Par exemple, les souris n'exprimant

pas la eNOS ont une diminution du débit sanguin cérébral comparativement aux souris de type sauvage confirmant le rôle de la eNOS dans la vasodilatation et dans la préservation du débit sanguin (Huang *et al.* 1996).

En conclusion, l'athérosclérose se traduit par un développement progressif d'une plaque dans les artères de conductance. La dysfonction endothéliale, caractérisée par une augmentation de la production de TXA₂ et une diminution de NO, est responsable de l'initiation et de la progression de la maladie. La présence de LDL oxydé et de DRO entraîne des effets néfastes aussi bien au niveau périphérique que cérébral, conduisant graduellement à l'athérosclérose et à des complications létales incluant l'AVC.

1.6 Les antioxydants

L'hypothèse du Dr Harman, impliquant les DRO dans le processus du vieillissement, a encouragé les recherches sur l'effet des DRO sur les systèmes biologiques. Ces recherches ont mené à la découverte de la SOD, une enzyme endogène antioxydante, démontrant ainsi que le corps humain possède un système de défense contre les attaques des DRO (McCord & Fridovich 1969). Le terme antioxydant réfère à n'importe quelle molécule capable de stabiliser ou de désactiver les DRO avant qu'ils n'attaquent les cellules (Kaliora *et al.* 2006).

1.6.1 Les antioxydants endogènes

1.6.1.1 Les antioxydants endogènes enzymatiques

Une des caractéristiques du cerveau, comparativement aux autres organes tels que le foie ou le rein, est qu'il possède une capacité antioxydante plus faible (Cui *et al.* 2004). Le système endogène cérébral inclut aussi bien des antioxydants enzymatiques (la SOD, la glutathion peroxydase et la catalase), que non enzymatiques (le glutathion et la mélatonine) (Valko *et al.* 2007). La SOD est une enzyme capable de transformer l'O₂⁻ en H₂O₂. La détoxification du H₂O₂ est effectuée par la catalase qui le décompose en eau et en oxygène ou encore par la glutathion peroxydase qui peut le réduire (Flohe *et al.* 1973). Toutefois, la principale défense endogène enzymatique dans les cellules endothéliales est

sans doute le système du glutathion (GSH) qui inclut la glutathion peroxydase (GPx) et la glutathion s-transférase (GST) (Chaudière & Ferrari-Iliou 1999; Dickinson & Forman 2002; Liu *et al.* 2004). Le système du GSH diminue avec l'âge dans le cerveau de la souris et a été associé à plusieurs maladies neurodégénératives incluant la maladie d'Alzheimer et le Parkinson.

1.6.1.2 Les antioxydants endogènes non-enzymatiques

Les antioxydants endogènes non-enzymatiques agissent en permettant l'oxydation de leur propre molécule afin de produire des molécules faiblement énergétiques incapables de propager la réaction en chaîne de la formation de radicaux libres (Cui *et al.* 2004). Ces molécules se divisent en deux types, les antioxydants liposolubles et les antioxydants hydrosolubles. Dans le corps, les antioxydants endogènes liposolubles majeurs sont la mélatonine et la coenzyme Q. Les antioxydants hydrosolubles incluent le glutathion, l'acide urique et la bilirubine (Frei 1991). Ces différents antioxydants peuvent avoir des actions variées. Par exemple, le glutathion, qui est le majeur antioxydant soluble des cellules, agit de plusieurs façons: (1) il est un cofacteur de plusieurs enzymes détoxifiantes (telles que la glutathion peroxydase), (2) il se lie directement à l' OH^\cdot et l' O_2^\cdot pour les inactiver et (3) il est capable de régénérer les antioxydants les plus importants tels que la vitamine E et la vitamine C (Valko *et al.* 2007). La régulation des antioxydants du cerveau varie selon l'espèce, selon la région du cerveau et selon le sous-type cellulaire. Par exemple, les neurones contiennent principalement de l'acide ascorbique alors que les cellules gliales contiennent en majorité du glutathion (Rice *et al.* 2002).

Une substance endogène libérée par la glande pinéale, la mélatonine, soulève également un intérêt particulier au niveau du système nerveux puisqu'elle possède des capacités antioxydantes puissantes (Srinivasan 2002). La mélatonine est capable de traverser la BBB et de piéger les radicaux libres afin de protéger l'ADN, les protéines et les lipides membranaires contre les attaques oxydantes (Abe *et al.* 1994; Pieri *et al.* 1994; Tan *et al.* 1994). La mélatonine est aussi capable de stimuler l'activité de la glutathion peroxydase (Barlow-Walden *et al.* 1995). De plus, comme son expression dans le cerveau diminue de façon significative avec l'âge, cela pourrait contribuer au développement de

maladies neurodégénératives (Reiter 1995).

1.6.2 Les antioxydants exogènes

Les antioxydants exogènes représentent toute substance provenant de l'apport nutritionnel ou pharmacologique, incluant la vitamine E, la vitamine C et les polyphénols, pouvant agir en tant qu'agents antioxydants. Les antioxydants exogènes peuvent neutraliser directement les DRO ou encore augmenter la défense endogène (Kaliora *et al.* 2006).

1.6.2.1 Les polyphénols et les catéchines

Le « *paradoxe français* », vient de l'observation que les Français, comparativement aux autres populations, ont un risque moins élevé de développer des maladies cardiovasculaires malgré leur consommation plus élevée d'acides gras saturés (St Leger *et al.* 1979). Les effets cardiovasculaires bénéfiques ont été attribués à la consommation de vin, plus particulièrement aux composants non alcooliques contenus dans le vin, les phénols (Renaud & de Lorgeril 1992; Rimm *et al.* 1996; Dohadwala & Vita 2009). En effet, le vin contient un grand nombre de composés phénoliques incluant les polyphénols et les acides phénoliques. Les polyphénols sont catégorisés en deux familles, les flavonoïdes et les non-flavonoïdes. Dans le régime alimentaire, les sources de polyphénols incluent les fruits, les légumes, les céréales, le thé, les jus de fruits ainsi que les produits dérivés du raisin et du cacao (Stoclet *et al.* 2004). *In vivo*, l'activité des polyphénols est dépendante de leur biodisponibilité. L'absorption intestinale est donc l'étape limitante des effets protecteurs des polyphénols (Stoclet *et al.* 2004). De plus, les polyphénols sont hautement métabolisés, et par conséquent, leur absorption dans l'intestin, le sang et le cerveau est très faible (Ghosh & Scheepens 2009). Par exemple, les catéchines, qui composent la majorité des polyphénols flavonoïdes contenus dans le thé vert (Sutherland *et al.* 2006), une fois ingérée, sont métabolisées en 4 principaux composés: l'(-)-épigallocatechine-3-gallate, l'(-)-épigallocatechine, l'(-)-épicatéchine-3-gallate et l'(-)-épicatéchine (Kimura *et al.* 2002).

Toutefois, il a été démontré que l'administration orale de peau de raisin a pour effet de diminuer la pression systolique, la pression diastolique et la pression moyenne dans deux modèles distincts d'hypertension (Soares De Moura *et al.* 2002; Stoclet *et al.*

2004). Au niveau cérébral, les polyphénols, incluant les catéchines, ont montré des effets bénéfiques sur le vieillissement neuronal, les AVC et même la démence (Ghosh & Scheepens 2009; Joseph *et al.* 2009). Plusieurs mécanismes ont été proposés afin d'expliquer les effets protecteurs des polyphénols. Par exemple, les polyphénols possèdent des propriétés antioxydantes qui protègent les vaisseaux et les neurones contre les attaques oxydantes (Stoclet *et al.* 2004). Les effets antioxydants des catéchines incluent la neutralisation directe des DRO, l'inhibition des enzymes pro-oxydantes et l'induction de l'expression des enzymes du système antioxydant (Mandel *et al.* 2004). Effectivement, des études ont montré qu'une simple dose de thé peut augmenter la capacité antioxydante dans le plasma dans les 30 à 60 minutes après son ingestion (Khan & Mukhtar 2007). De plus, les souris ayant consommé 0.2% de catéchine dans l'eau de boisson ont des niveaux circulants de SOD, de catalase et de glutathion peroxydase significativement plus élevés (Babu & Liu 2008).

En résumé, les polyphénols, incluant les catéchines, possèdent des effets antioxydants qui pourraient être bénéfiques sur la dysfonction endothéliale en diminuant les marqueurs de stress oxydant, l'inflammation vasculaire et en améliorant le profil lipidique pour ainsi prévenir les maladies cardiovasculaires, les cancers, les dommages neuronaux et la baisse des fonctions cognitives.

1.6.2.2 Les Polyphénols et la fonction endothéliale

Au cours des dernières années, plusieurs études ont été effectuées concernant l'impact des antioxydants sur la fonction endothéliale (Naseem 2005). Il a été démontré que l'ajout de polyphénols, sur des cellules endothéliales en culture, augmente l'expression protéique de NOS et la production de NO (Dohadwala & Vita 2009). De plus, *in vitro*, l'addition de catéchines sur l'aorte de rat induit une dilatation dépendante de la production de NO (voir figure 9) (Andriambelason *et al.* 1999). Alors que le mécanisme précis par lequel les polyphénols améliorent la fonction endothéliale n'est pas clairement défini, des évidences montrent que la dilatation induite par la catéchine implique l'endothélium vasculaire ainsi que la voie PI₃K/Akt/NO (Lorenz *et al.* 2004). De plus, puisque les polyphénols agissent directement au niveau de l'O₂⁻, ils peuvent moduler

la biodisponibilité du NO. Il a aussi été suggéré que l'action positive des polyphénols sur le NO était plutôt de stabiliser les niveaux de BH₄ et, conséquemment, la dimérisation de la NOS (Huang *et al.* 2000). Ces résultats suggèrent que les polyphénols, incluant les catéchines, modulent la fonction endothéliale par la voie de la eNOS puisqu'ils peuvent augmenter la quantité de NO *via* l'inactivation de l'O₂⁻, l'augmentation de la phosphorylation de Akt (Ndiaye *et al.* 2003) ou l'augmentation de l'expression de la eNOS (Wallerath *et al.* 2003).

Les polyphénols ont un effet antioxydant par leurs interactions directes avec l'O₂⁻ et les autres DRO tels que OH⁻ et ONOO⁻. Tel que discuté précédemment, cela peut protéger les facteurs endothéliaux tels que le NO mais peut aussi avoir une influence sur la production de la PGI₂ (voir figure 9) (Stoclet *et al.* 2004). *In vitro*, il a été démontré que la catéchine est capable de stimuler la production de PGI₂ dans les cellules endothéliales aortique bovines (BAEC) (Mizugaki *et al.* 2000).

De plus, il a été démontré que les catéchines peuvent supprimer la libération de l'AA et l'activité de la thromboxane synthase, résultant en une diminution de la production de TXA₂ (Choi *et al.* 2002); les catéchines possèdent ainsi des effets antiplaquettaires. Elles régulent donc positivement la balance PGI₂/TXA₂ et, par conséquent, protègent la fonction endothéliale (Babu & Liu 2008). En plus d'augmenter la production de PGI₂, les polyphénols diminuent aussi la production d'ET-1. En effet, les extraits de vin rouge peuvent inhiber la libération d'ET-1 et la transcription du gène de la prépro-endothéline (Corder *et al.* 2001).

En plus de leurs effets sur les facteurs endothéliaux, les polyphénols peuvent aussi protéger l'endothélium *via* leurs effets sur les LDL oxydées, qui jouent un rôle précurseur dans la dysfonction endothéliale. Il a été démontré que la dysfonction endothéliale induite par les LDL oxydées peut être renversée par les antioxydants polyphénoliques (de Nigris *et al.* 2007) et les flavonoïdes (Schroeter *et al.* 2006).

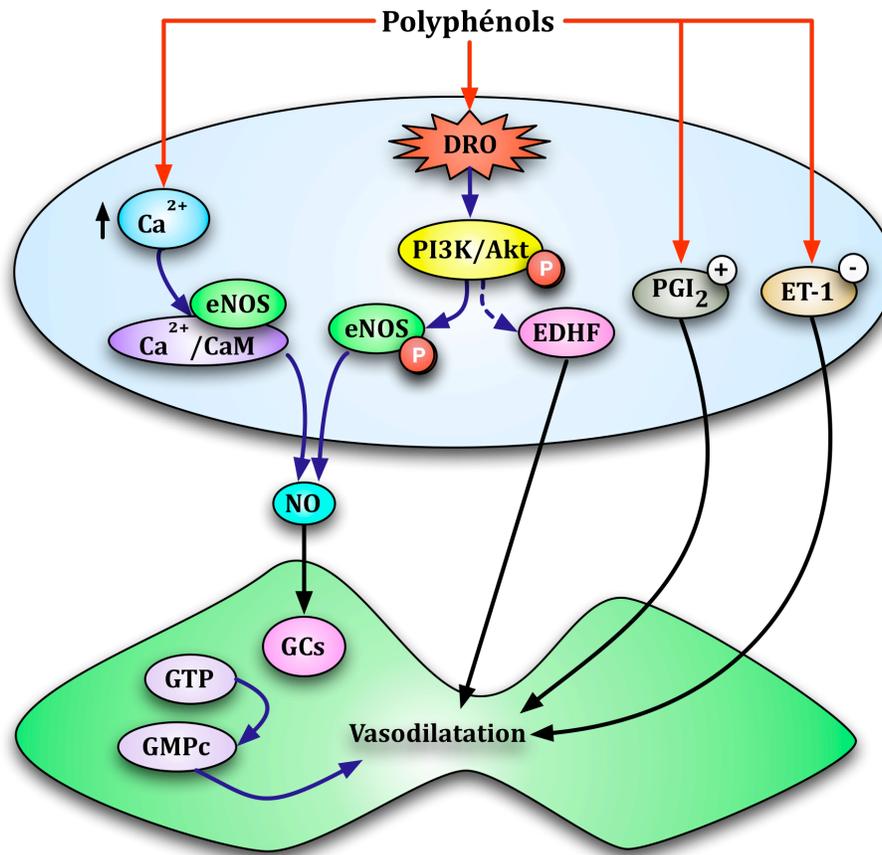


Figure 9. Effets des polyphénols sur la libération de médiateurs endothéliaux.

Les études *in vitro* aussi bien qu'*in vivo* ont aussi rapporté des effets bénéfiques des catéchines sur l'agrégation plaquettaire (Babu & Liu 2008). De plus, l'administration de catéchines diminue l'expression de VCAM-1, une molécule critique de l'adhésion plaquettaire dont l'expression est augmentée dans les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses lors de l'athérosclérose (Suzuki *et al.* 2009).

En résumé, les polyphénols ont donc plusieurs effets sur la fonction endothéliale incluant une augmentation de la formation de médiateurs vasodilatateurs, une diminution de la formation de médiateurs vasoconstricteurs et des effets anti-thrombotiques (Stoclet *et al.* 2004).

1.6.2.3 L'effet des polyphénols sur le développement de l'athérosclérose

Dans les études chez l'animal, les polyphénols sont les antioxydants qui ont montré le plus d'effets bénéfiques dans un contexte d'athérosclérose (voir figure 10). En effet, les polyphénols sont capables de réduire l'oxydation des LDL, de diminuer l'agrégation plaquettaire ainsi que d'inhiber la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses vasculaires (voir figure 10). De plus, ils sont associés avec une augmentation de la biodisponibilité du NO et une augmentation des fonctions endothéliales; ils sont donc favorables à la réduction de l'athérosclérose et à la prévention des maladies cardiovasculaires (Lefevre *et al.* 2007).

Des études ont montré que la catéchine peut diminuer l'oxydation des LDL chez l'animal et *in vitro* (Babu & Liu 2008). En effet, les souris hypercholestérolémiques qui ont consommé des polyphénols durant 6 semaines présentent une diminution de l'oxydation des LDL ainsi qu'une réduction accrue des lésions athérosclérotiques (Hayek *et al.* 1997). De plus, chez l'animal, il a été démontré que la consommation de breuvages contenant des polyphénols entraîne une réduction de la plaque athérosclérotique (Vinson *et al.* 2001). Certaines études ont montré une diminution des lésions athérosclérotiques suite à la consommation de polyphénols sans variation dans la quantité de LDL oxydées (Stocker & O'Halloran 2004), suggérant différents mécanismes d'action des polyphénols dans un contexte d'athérosclérose.

Les polyphénols peuvent affecter le métabolisme des lipides afin de prévenir l'apparition des plaques chez les souris hypercholestérolémiques (Khan *et al.* 1992). En effet, l'apport de polyphénols diminue l'absorption de triglycérides ainsi que de cholestérol et augmente l'excrétion de lipides (Khan & Mukhtar 2007). Les polyphénols peuvent moduler le métabolisme du cholestérol en affectant sa biosynthèse, son absorption, son excrétion et les récepteurs des LDL contribuant ainsi aux effets anti-hypercholestérolémiques. Les polyphénols sont donc capables de réduire les niveaux de cholestérol sanguin et de prévenir la déposition de cholestérol dans différents tissus (Babu & Liu 2008). De plus, les polyphénols peuvent réguler positivement l'expression des récepteurs aux LDL modulant ainsi la biosynthèse, l'excrétion et la gestion des lipides (Babu & Liu 2008). Aussi bien chez l'humain que chez l'animal, la consommation de catéchines peut affecter le ratio de LDL/HDL en favorisant la production de HDL (Kono *et al.* 1996; Babu *et al.* 2006).

Les polyphénols peuvent aussi jouer au niveau de l'activation des cellules endothéliales puisqu'ils sont capables de réduire l'adhésion des monocytes sur la surface endothéliale et de bloquer l'expression des cytokines (Dohadwala & Vita 2009). *In vitro*, la catéchine peut inhiber l'adhésion des leucocytes *via* la diminution de l'expression des molécules d'adhésion cellulaires vasculaires de type 1 (VCAM-1), une molécule d'adhésion dont l'expression est augmentée en condition pathologique (Ludwig *et al.* 2004). De plus, les polyphénols peuvent inhiber l'invasion des cellules musculaires lisses vasculaires et stabiliser la chape fibreuse de la plaque (Babu & Liu 2008) (voir figure 10).

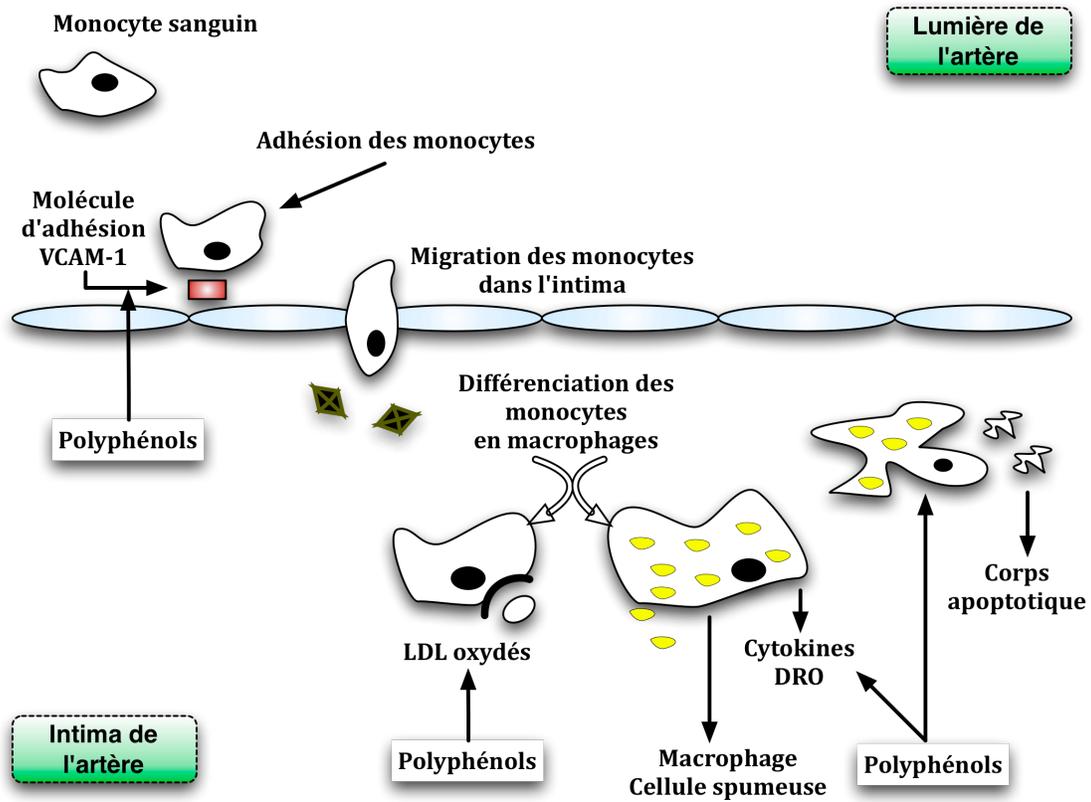


Figure 10. Effet des polyphénols sur le développement et la progression de l'athérosclérose.

1.6.2.4 Les polyphénols, le vieillissement et les maladies neurodégénératives

Si l'on applique la théorie du Dr Harman, les radicaux libres et le stress oxydant seraient responsables des changements menant à la détérioration des fonctions cérébrales et à la neurodégénération observées lors du vieillissement. Les premières évidences des effets bénéfiques des polyphénols sur les fonctions cérébrales ont été démontrées au cours des années 1950 (Da Re *et al.* 1959). Historiquement, les effets biologiques des polyphénols, incluant ceux sur le cerveau, étaient attribués à leurs propriétés antioxydantes *via* l'inactivation des DRO et leur influence sur le statut *redox* de la cellule (Matsuoka *et al.* 1995; Stoclet *et al.* 2004; Pollard *et al.* 2006). Au fil du temps, il a été démontré que les polyphénols peuvent interagir avec les voies neuronales de signalisation intracellulaire pouvant jouer un rôle dans le contrôle de la survie des neurones et la potentialisation à long terme de la mémoire (Vauzour *et al.* 2007; Spencer 2009). Ainsi, l'apport nutritionnel de polyphénols a montré des effets bénéfiques contre la mort neuronale et le processus inflammatoire neuronal, proposant un mécanisme de protection contre des maladies neurodégénératives (Joseph *et al.* 2009) et une meilleure préservation des fonctions cognitives (Letenneur *et al.* 2007).

Mais comment les polyphénols exercent-ils leurs effets positifs sur les fonctions cérébrales ? Pour avoir un effet, les polyphénols doivent être capables d'agir directement sur le cerveau ou encore d'induire des changements périphériques qui auront un impact sur les fonctions cérébrales. Récemment, il a été démontré que les catéchines peuvent pénétrer la BBB et pourraient ainsi avoir des effets sur la protection neuronale (Matsuoka *et al.* 1995; Lee *et al.* 2000). Il est donc possible que les flavonoïdes soient bénéfiques pour la mémoire *via* leur habileté à moduler les aspects cellulaires et moléculaires du processus de la mémoire. Des études montrent que les polyphénols sont capables d'agir à plusieurs niveaux, ils peuvent par exemple moduler la libération de neurotransmetteurs tels que le NO et le glutamate, stimuler la neurogenèse de l'hippocampe et moduler la signalisation neuronale (Spencer 2009). Augmenter la biodisponibilité du NO par les polyphénols peut avoir des effets considérables au niveau cérébral. Par exemple, le resvératrol, un polyphénol non flavonoïde, en favorisant la production de NO, est capable de réduire la perte neuronale associée à l'ischémie chez le lapin (Kiziltepe *et al.* 2004) et

le cochon (Toumpoulis & Anagnostopoulos 2004). Les études ont aussi démontré que la consommation de flavonoïdes améliore la fonction vasculaire (Chan *et al.* 2008) et le débit sanguin cérébral (Francis *et al.* 2006). Chez le rat, il a été démontré que l'augmentation du débit sanguin peut aussi influencer la mémoire (Mitschelen *et al.* 2009). Mis ensembles, ces résultats suggèrent que la modulation de débit sanguin par les polyphénols pourrait avoir un effet bénéfique sur les fonctions cognitives. Toutefois, le mécanisme exact reste encore incertain.

L'administration chronique de catéchines dans l'eau de boisson des rats hypertendus a montré une diminution de l'incidence d'AVC ainsi qu'une diminution du volume de zone de l'infarctus (Uchida *et al.* 1995; Sutherland *et al.* 2006). De plus, la catéchine injectée en intraveineuse chez le rat (Matsuoka *et al.* 1995) ou en intrapéritonéale chez le hamster (Lee *et al.* 2000), améliore la fonction cognitive et réduit les dommages neuronaux. Les mécanismes suggérés pour expliquer la protection neuronale par les catéchines sont l'augmentation de débit sanguin cérébral (conséquence d'une augmentation de la eNOS), ainsi qu'une diminution de la neurotoxicité (conséquence d'une baisse de l'expression protéique et de l'activité de la iNOS) (Sutherland *et al.* 2005). Des effets anti-inflammatoires ont également été attribués aux catéchines, et seraient dus à une diminution de la production d'éicosanoïdes. Ce mécanisme pourrait aussi être impliqué dans la protection neuronale (Hong *et al.* 2000a)

En résumé, les antioxydants, aussi bien endogènes qu'exogènes, ont une influence primordiale sur le développement des maladies. Les polyphénols, et en particulier la catéchine, possèdent des propriétés antioxydantes très intéressantes permettant ainsi des effets bénéfiques au niveau de l'endothélium cérébral et des neurones. L'apport régulier de polyphénols dans le régime alimentaire prévient le déclin des fonctions cérébrales associé au vieillissement ainsi que le développement et la progression de l'athérosclérose.

Raisonnement et démarche

2 Raisonnement et démarche

La régulation du débit sanguin par la circulation cérébrale joue un rôle primordial dans l'apport énergétique constant nécessaire à la survie des cellules neuronales. Au cours du vieillissement, le stress oxydant augmente et la dysfonction endothéliale progresse, au niveau périphérique et central. Le stress oxydant associé aux facteurs de risque pour les maladies cardiovasculaires, tels que l'hypercholestérolémie, pourrait donc accélérer la dysfonction endothéliale des artères cérébrales et accentuer le déclin des fonctions cognitives, deux phénomènes normalement associés au processus du vieillissement. Toutefois, il existe peu de données dans la littérature portant sur l'évolution de la fonction endothéliale cérébrale au cours du vieillissement normal, ou associée à des facteurs de risque pour les maladies cardiovasculaires. Les dérivés réactifs de l'oxygène jouent un rôle contradictoire puisqu'ils peuvent avoir des effets bénéfiques, à faible concentration, et des effets délétères, à grande concentration, dans les neurones et les cellules vasculaires cérébrales. Le cerveau ayant une capacité antioxydante plus faible que les autres organes et une grande vulnérabilité face au stress oxydant, il est très important d'évaluer l'impact des changements oxydatifs sur la circulation cérébrale au cours du vieillissement. Les trois études présentées dans cette thèse ont pour objectif commun d'étudier la fonction endothéliale cérébrale et son évolution avec l'âge, en présence ou non d'athérosclérose. Nous avons tenté de déterminer les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la dysfonction endothéliale prématurée ainsi que son impact sur le débit sanguin cérébral et la fonction cognitive.

Étude # 1

Les DRO sont largement impliqués dans les fonctions physiologiques et sont donc essentiels. Au niveau cérébral, l' O_2^- et le H_2O_2 ont montré des propriétés vasodilatatrices intéressantes: nous avons démontré (Drouin *et al.* 2007) que dans les artères cérébrales de souris jeunes, la dilatation induite par l'ACh était due à une combinaison de facteurs endothéliaux incluant le H_2O_2 (mais pas le NO) dérivé de la eNOS, la prostacycline et l'EDHF. L'implication du H_2O_2 comme médiateur d'une réponse physiologique est innovante puisque le dogme (Alp & Channon 2004; Kawashima & Yokoyama 2004)

stipule que la NOS produirait du H₂O₂ plutôt que du NO seulement lors de son découplage dans les conditions pathologiques. L'objectif de cette première étude était de caractériser l'implication physiologique du H₂O₂ dérivé de la NOS dans la fonction endothéliale cérébrale de la souris, en condition physiologique, et en réponse à un stimulus plus physiologique que l'addition d'ACh. Nous avons voulu identifier les mécanismes impliqués dans la dilatation induite par l'augmentation de débit sanguin (FMD, ou dilatation dépendante de l'endothélium reproduite *in vitro* par un changement de débit intraluminal). La FMD est la réponse à un stimulus endothélial la plus représentative de la situation *in vivo* et donc un paramètre de choix à déterminer. De plus, il a été démontré que la NOS est la principale voie enzymatique endothéliale activée durant la FMD dans les artères cérébrales (Koller *et al.* 1994; Joannides *et al.* 1995). À l'aide de différents inhibiteurs pharmacologiques, nous avons défini les voies impliquées dans la FMD des artères cérébrales de souris. Nous avons identifié le H₂O₂, dérivé de l'activation de la eNOS, en tant que principal médiateur de la FMD. Cette voie de dilatation est importante puisqu'elle pourrait être très susceptible aux changements d'environnement *redox* et influencerait le débit sanguin cérébral.

Étude # 2

L'endothélium est un système dynamique continuellement exposé à des dommages et à des réparations. Des études de notre laboratoire ont décrit les changements dans la contribution des différents facteurs vasculaires endothéliaux au cours de la maturation vasculaire (Krummen *et al.* 2005; Gendron *et al.* 2007). Ces données concernaient des artères périphériques mais nous ne connaissons pas l'évolution des facteurs endothéliaux au niveau cérébral. Compte tenu de la vulnérabilité des cellules endothéliales cérébrales aux DRO, l'apparition de stress oxydant, associé à l'âge ou dû à la présence de maladie cardiovasculaire, pourrait mener à une altération de la voie du H₂O₂ engendrant ainsi une dysfonction endothéliale précoce. Nous avons émis l'hypothèse qu'un déséquilibre des facteurs endothéliaux (diminution d'EDRF et augmentation d'EDCF) pourrait être à l'origine (1) de la dysfonction endothéliale cérébrale observée au cours du vieillissement et (2) de la dysfonction endothéliale précoce qui apparaît en présence d'athérosclérose. L'objectif de cette étude était de déterminer

l'impact de l'augmentation de stress oxydant associé à l'athérosclérose, une maladie affectant principalement les artères périphériques, sur les différents facteurs endothéliaux cérébraux. L'athérosclérose a été associée à une augmentation de la production de TXA₂ (Kobayashi *et al.* 2004; Sellers & Stallone 2008) et une diminution de l'activité de la NOS (Kawashima & Yokoyama 2004). De plus, des études dans notre laboratoire ont montré qu'au niveau périphérique, l'inhibition pharmacologique de la NOS permettait de révéler la production du TXA₂ ainsi qu'une augmentation de la production des DRO par les cellules endothéliales (Gendron & Thorin 2007). Or, en condition pathologique, la dysfonction endothéliale précoce de la eNOS, pourrait être la conséquence d'une augmentation de la production de TXA₂.

Étude # 3

La dysfonction endothéliale cérébrale précoce associée à l'athérosclérose pourrait non seulement augmenter l'incidence des AVC mais aussi induire une diminution du débit sanguin cérébral et, ultimement, affecter les fonctions neuronales. Sachant que le vieillissement est associé à une diminution des fonctions neuronales, nous avons émis l'hypothèse que l'augmentation de stress oxydant, à l'origine de la dysfonction endothéliale cérébrale prématurée observée lors de l'athérosclérose était associée à une diminution du débit sanguin cérébral et un déclin subséquent des fonctions cognitives. Nous avons utilisé des souris saines et athérosclérotiques âgées de 3 mois que nous avons soumises, ou pas, à un traitement chronique à la catéchine pendant 3 mois. Nous avons observé les effets de l'âge, de l'athérosclérose et du traitement sur la fonction endothéliale cérébrale (FMD et activité de la eNOS *via* la production de H₂O₂), le débit sanguin cérébral, la mémoire et la capacité d'apprentissage. Cette étude avait pour objectif d'établir un lien entre l'augmentation de stress oxydant, la dysfonction endothéliale précoce, la diminution de débit sanguin et la perte de fonction cognitive hâtive, et de démontrer que la dysfonction endothéliale pourrait entraîner une dysfonction neuronale.

Matériels et Méthodes

3 Matériels et Méthodes

Dans cette section, il sera question des méthodes et des protocoles utilisés au cours des différentes études. Les différents modèles animaux seront décrits suivis de chacune des techniques utilisées.

3.1 Conditions expérimentales

Toutes les expériences et les procédures utilisées sont en accord avec notre guide institutionnel de la protection des animaux ainsi qu'avec le «*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of Canada*».

3.2 Modèle animal

Les expériences ont été effectuées sur des artères de souris mâles âgées de trois, six et douze mois (± 7 jours). Deux modèles de souris ont été utilisés, des souris témoins (WT) C57BL/6 (Charles River Laboratories, St-Constant, Québec, Canada) et des souris C57BL/6-LDLr^{-/-}ApoB^{+/+} (ATX) : ces dernières n'expriment pas le récepteur aux LDL mais expriment l'apolipoprotéine humaine B-100 (Sanan *et al.* 1998).

3.2.1 Souris témoins

Les souris témoins utilisées dans les études #1 et #2 sont des souris mâles de type C57Bl/6. Au cours de leur développement les souris ont vécu dans un environnement dépourvu d'agent pathogène et soumises à un cycle de 12 heures de lumière par jour. Une diète régulière et de l'eau de boisson conventionnelle leur étaient données. Le poids moyen des souris était de 26 ± 1 g, 37 ± 2 g et 46 ± 3 g à 3, 6 et 12 mois, respectivement. Dans l'étude #2, les souris témoins de 3, 6 et 12 mois ont été utilisées comme modèle de vieillissement sans exposition aux facteurs de risque.

3.2.2 Souris athérosclérotiques (ATX)

Les souris ATX ont initialement été généreusement fournies par le Dr.Hobbs (University of Texas Southwestern, Dallas, TX) en 2003, puis la colonie a été maintenue dans notre animalerie. Le poids moyen des souris est respectivement de 25 ± 1 g, 31 ± 2 g et 39 ± 2 g à 3, 6 et 12 mois. Les niveaux de cholestérol et de triglycérides contenus dans le

sérum sont entre 4 et 9 fois plus élevés chez les souris ATX comparativement aux souris témoins (voir Table 1). Les souris ATX représentent un modèle idéal pour l'étude de l'athérosclérose puisqu'elles développent spontanément des plaques d'athérome dès l'âge de 6 mois, alors qu'elles sont dans les mêmes conditions que les souris témoins. Les souris ATX ont été utilisées dans des études #2 et #3.

3.2.3 Traitement avec un antioxydant

Afin d'étudier l'implication du stress oxydant dans le processus de maturation et de vieillissement des artères cérébrales, dans un contexte d'athérosclérose, nous avons effectué, dans les études #2 et #3, des traitements avec l'antioxydant catéchine (Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, Ontario, Canada). Dès l'âge de 3 mois, les souris ATX ont reçu un traitement de 30 mg/kg/jour de catéchine dans l'eau de boisson jusqu'à l'âge de 6 ou 12 mois. Le traitement n'a pas affecté le poids des souris ATX (34 ± 2 g *versus* 31 ± 2 g et 33 ± 1 g *versus* 39 ± 2 g, pour les souris âgées respectivement de 6 et 12 mois, traitées ou pas) ni les niveaux de cholestérol et de triglycérides contenus dans le sérum (voir Table 1). L'eau de boisson contenant la catéchine a été remplacée une fois par semaine.

Table 1. Dosages des niveaux de cholestérol, de LDL et de triglycérides (TG) contenus dans le sérum de tous les modèles de souris utilisés au cours des différentes études.

	Cholestérol total	LDL	TG
3 m/o WT	2,1±0,2	0,5±0,2	0,7±0,1
6 m/o WT	3,1±0,1	1,1±0,1	0,7±0,1
12 m/o WT	4,5±0,2	2,5±0,2	0,4±0,1
3 m/o ATX	16,6±2,0*	10,2±1,6*	6,2±0,5*
6 m/o ATX	20,2± 2,2	12,4±1,1	7,5±0,8
12 m/o ATX	23,3±3,4*	14,2±2,1*	9,5±0,9*
6 m/o ATX+CAT	20,1±1,3	12,7±1,0	8,5±0,8
12 m/o ATX+CAT	23,5±3,2*	15,1±2,2*	9,7±1,3*

* P<0,05 vs WT du même âge

3.3 Pressions et prélèvement sanguins

Afin de déterminer la pression artérielle et les pressions partielles du cœur lors des études #2 et #3, nous avons effectué des études de Millard tel que précédemment décrit (Drouin *et al.* 2008). Les souris ont été anesthésiées avec de l'isoflurane (2.5%) dans l'oxygène (O₂; 0.5 L/min). Un cathéter de type «Millard» a été inséré dans l'artère carotide gauche et la pression artérielle a été enregistrée. Le cathéter a ensuite été inséré dans le ventricule gauche du cœur où la fonction et le rythme cardiaque ont été enregistrés. Puis, le sang a été prélevé directement dans le ventricule gauche du cœur de la souris pour des dosages ultérieurs.

3.3.1 Dosages sanguins

Nous avons déterminé les niveaux de cholestérols, HDL, LDL et de triglycérides contenus dans le sérum des souris aux différents âges. Après une incubation à température pièce de 30 minutes permettant la coagulation, le sang a été centrifugé à 13,000 rotations par minute (rpm) durant 10 minutes à 4°C. Le sérum a été prélevé et immédiatement congelé à -80°C. Le surnageant (sérum) recueilli a ensuite été utilisé pour les différents dosages.

3.4 Quantification de la plaque aortique

L'effet d'un traitement antioxydant sur la formation de plaque aortique chez les souris ATX a été analysé, de façon semi-quantitative, lors des études #2 et #3. L'aorte entière (abdominale et thoracique) a été prélevée et nettoyée des corps gras et tissus fibreux externes. L'artère a ensuite été ouverte longitudinalement dans un pétri et prise en photo. La quantification de la plaque a été effectuée en utilisant le logiciel Adobe Photoshop CS3. L'aire de la plaque est exprimée en pourcentage d'aire totale du segment d'aorte prélevé.

3.5 Études de réactivité

À travers les études de cette thèse, nous avons étudié la fonction endothéliale cérébrale en fonction de l'âge et de la dyslipidémie. Plusieurs méthodes peuvent être adoptées pour l'étude de la réactivité vasculaire et chacune d'elle présente ses avantages et ses inconvénients. La méthode la plus physiologique est sans aucun doute le laser

doppler qui est non invasif. Toutefois, cette technique est indirecte puisqu'elle permet de mesurer l'augmentation du débit sanguin et, par conséquent, la dilatation. De plus, l'utilisation d'inhibiteurs est très restreinte surtout lorsqu'on travaille chez l'humain.

Au niveau cérébral, à cause de la boîte crânienne, il est plus difficile d'observer la réactivité vasculaire *in vivo*. Il existe tout de même la méthode de la fenêtre crânienne qui consiste à enlever la boîte crânienne tout en maintenant l'homéostasie. Par celle-ci, il est possible d'observer le comportement des vaisseaux suite au stimulus appliqué.

Compte tenu de la complexité de ces méthodes et de leurs restrictions, les études *in vitro* sont beaucoup plus fréquentes. Le myographe est sans doute la plus utilisée de ces méthodes et permet de mesurer l'activité des cellules musculaires lisses et des cellules endothéliales. Le montage utilisé permet d'étudier la capacité de contraction de l'ensemble des cellules d'un vaisseau isolé. La dilatation peut aussi être estimée suite à l'analyse du niveau de contraction de l'artère. Cet appareil est basé sur l'étirement du vaisseau et les résultats obtenus dépendent du degré d'étirement initial.

Il existe aussi le myographe pressurisé, aussi appelé artériographe, qui permet de mesurer la réactivité vasculaire dans des conditions plus physiologiques puisque l'artère est soumise à une pression intra-murale similaire à celle retrouvée *in vivo*. Afin d'évaluer la fonction endothéliale cérébrale, nous avons donc décidé d'utiliser cette méthode pour toutes les études de réactivité, selon des protocoles bien établis (Krummen *et al.* 2005; Drouin *et al.* 2007; Gendron *et al.* 2007). Les prochains paragraphes décriront en détail la méthode de l'artériographe telle qu'utilisée dans notre laboratoire ainsi que les différents inhibiteurs nécessaires à la réalisation des 3 études incluses dans cette thèse.

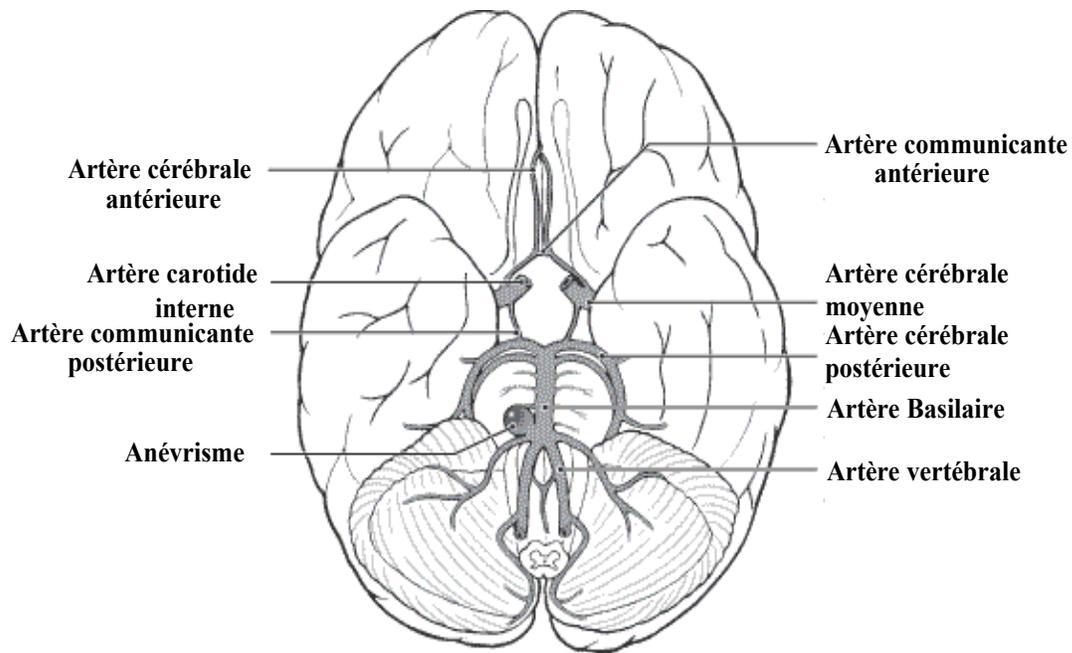


Figure 11. Base du cerveau montrant les principales artères. Les artères postérieures et moyennes ont été utilisées dans cette étude [inspiré de (Ontario 2007)].

3.5.1 Prélèvement des artères cérébrales.

Les souris ont été anesthésiées par une inhalation de dioxyde de carbone (CO₂). Le cerveau a rapidement été prélevé de la cavité crânienne et placé dans une solution physiologique saline (PSS) de la composition suivante (mmol/L): NaCl 130, KCl 4.7, CaCl₂ 1.6, MgSO₄ 1.17, NaHCO₃ 14.9, KH₂PO₄ 1.18, EDTA 0.026, glucose 10 à 4°C. Des segments de l'artère cérébrale «postérieure», «postérieure communicante» et des artères cérébrales moyennes (voir figure 11) (diamètre moyen de 136±2 µm lorsque pressurisées à 60 mm Hg) ont été prélevés du cerveau et maintenus à 4°C pour des protocoles effectués le jour même. Le cerveau a été immédiatement congelé dans l'azote liquide pour des études ultérieures.

3.5.2 Principe de l'artériographe

Cette méthode permet d'étudier la fonction vasculaire en visualisant la dilatation ou la contraction sur un moniteur suite à l'addition d'un agoniste ou encore suite à l'augmentation du débit de perfusion. Elle permet aussi de maintenir une artère pressurisée en conditions optimales, à 37°C et sous oxygène (PO₂= 150 mm Hg). Cette méthode permet de reproduire l'environnement des artères *in vivo* et d'observer la réactivité vasculaire dans un contexte quasi physiologique.

3.5.2.1 Description du montage

L'artère est montée dans une cuve contenant 10 ml de PSS avec 12% d'oxygène (O₂), 5% de dioxyde de carbone (CO₂) et 83% d'azote (N₂) et maintenue à 37°C à un pH de 7.4 (Living System, Burlington, Vermont, U.S.A.). Le montage utilisé contient une paire de micropipettes en verre qui sont perfusées avec du PSS (voir Figure 12A). La partie supérieure de l'artère est placée sur la micropipette supérieure, ligaturée puis perfusée afin d'y enlever tous les résidus de sang. La deuxième extrémité de l'artère est alors placée et ligaturée sur la micropipette inférieure du montage.

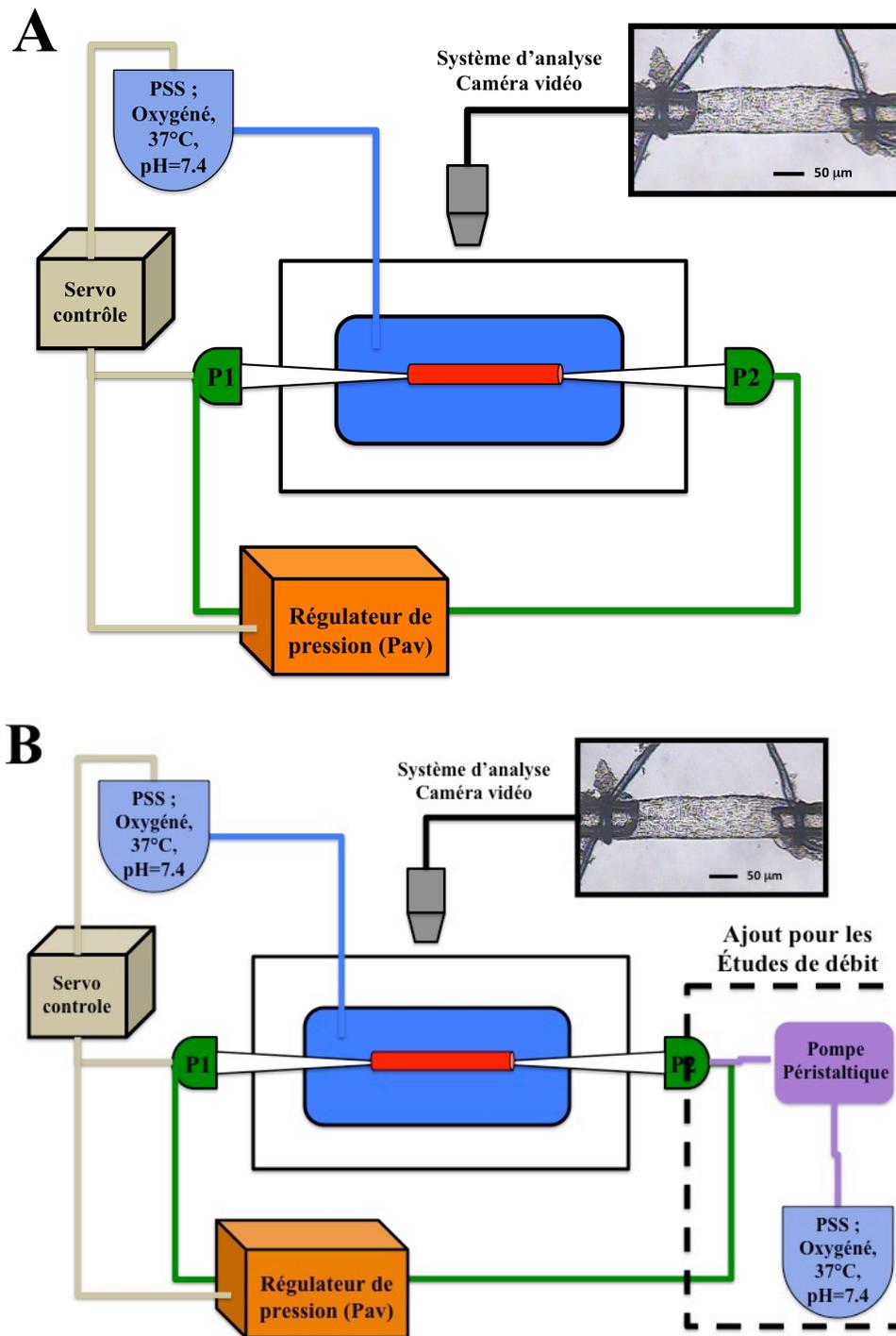


Figure 12. (A) Représentation graphique des composantes du montage de l'artériographe.

(B) Représentation graphique des changements effectués sur l'artériographe pour les études de la fonction endothéliale en fonction de l'augmentation de débit.

Les micropipettes inférieure et supérieure sont chacune reliées à un capteur de pression, P1 et P2 (Abott system, USA); les capteurs sont reliés à un module de contrôle automatique de la pression (Living System, Burlington, Vermont, U.S.A.). Le module de contrôle permet de maintenir une pression intra-artérielle (P_{av}) constante. La pression intra-artérielle idéale varie en fonction du lit vasculaire étudié. Afin de déterminer cette pression, des études d'optimisation doivent être effectuées au préalable. En fonction d'une variation de pression intra-luminale, l'artère ajustera son diamètre afin de maintenir le débit constant, selon le principe du tonus myogénique. En variant la pression, nous serons donc capables d'obtenir une courbe pression-diamètre. C'est en travaillant avec une pression située dans le plateau de cette courbe que l'artère sera plus réactive. Pour les artères cérébrales de souris, la pression idéale est d'environ 60 mm Hg, soit approximativement la pression physiologique des artères cérébrales de souris (Faraci & Heistad 1990).

3.5.3 Modification effectuée pour les études de débit

L'augmentation de débit sanguin cérébral induit une vasodilatation dépendante de l'endothélium, tel qu'étudié lors des études #1 et #3. L'artériographe permet d'observer les changements induits spécifiquement par l'augmentation de débit sans variation de pression qui, tel que décrit précédemment, peut faire varier le diamètre. Pour ce faire, nous avons ajouté une pompe péristaltique à l'extrémité opposée du module de contrôle de la pression (voir figure 12B). Suite à l'augmentation de débit, le module de contrôle de la pression pourra créer une pression négative équivalente à l'augmentation de pression créée par l'augmentation de débit permettant de maintenir constante la pression à l'intérieur de l'artère (soit $P_{av} = 60$ mm Hg). Le module de contrôle de la pression est capable de maintenir la P_{av} constante selon l'équation suivante : $P_{av} = (P1+P2)/2$.

3.5.4 Protocole de réactivité

Une fois l'artère montée dans l'artériographe, celle-ci est maintenue à une pression constante de 60 mm Hg. Une période d'équilibration de 40 minutes est allouée avant le début des expériences afin de permettre le développement du tonus myogénique (TM) qui est calculé selon l'équation suivante : $((D_{\text{après}} - D_{\text{avant}})/D_{\text{max}}) * 100$, où D_{avant} est le diamètre de l'artère avant l'équilibration, $D_{\text{après}}$ est le diamètre de l'artère après le temps

d'équilibration et D_{\max} représente le diamètre maximal de l'artère obtenu à partir d'une solution ne contenant pas de calcium de la composition suivante (mmol/L): NaCl 130, KCl 4.7, $MgSO_4$ 1.17, $NaHCO_3$ 14.9, KH_2PO_4 1.18, EDTA 0.026, EGTA 1, glucose 10. Suite à l'équilibration, les artères sont pré-contractées à la phényléphrine (PE; de 10 à 30 $\mu\text{mol/L}$), un agoniste des récepteurs α_1 -adrénergiques situés sur les cellules musculaires lisses des vaisseaux. Une contraction supérieure à 40% du diamètre initial est considérée comme acceptable. Les changements de diamètre (dilatation) associés à l'addition de concentrations croissantes d'acétylcholine (ACh; 0.1 nmol/L à 30 $\mu\text{mol/L}$) sont enregistrés en utilisant un moniteur vidéo analyseur de dimensions (Living System, Burlington, Vermont, U.S.A.). À la fin de chaque protocole, la solution contenue dans le bain a été changée pour une solution sans calcium afin d'obtenir le diamètre maximal passif de l'artère. Les résultats sont exprimés en pourcentage de dilatation maximale et représentés en graphiques de type courbes concentration-réponse. La figure 13 schématise le protocole utilisé pour les études de réactivité.

3.5.5 Protocole des études de débit

Quelques modifications du protocole ont dû être effectuées pour les études de dilatations induites par l'augmentation de débit. Suite à une période d'équilibration de 40 minutes, les artères sont pré-contractées à la phényléphrine et soumises à l'augmentation constante (+2 $\mu\text{l/min}$) de débit (Flow; 0 à 10 $\mu\text{l/min}$). La dilatation induite par le débit a été enregistrée sur le moniteur vidéo analyseur de dimensions. Chaque augmentation de 2 $\mu\text{l/min}$ a été maintenue de 3 à 5 minutes afin de permettre une dilatation optimale. Les forces de cisaillements ont été calculées pour chacune des conditions selon l'équation suivante: $t = 4\eta Q/\pi r^3$ où t est la force de cisaillement (dyn/cm^2), η représente la viscosité (qui dans nos conditions est égale à 0.8 cp (Shiple *et al.* 2005)), Q représente le débit ($\mu\text{l/min}$) à l'intérieur du vaisseau et r équivaut au rayon (μm) interne du vaisseau.

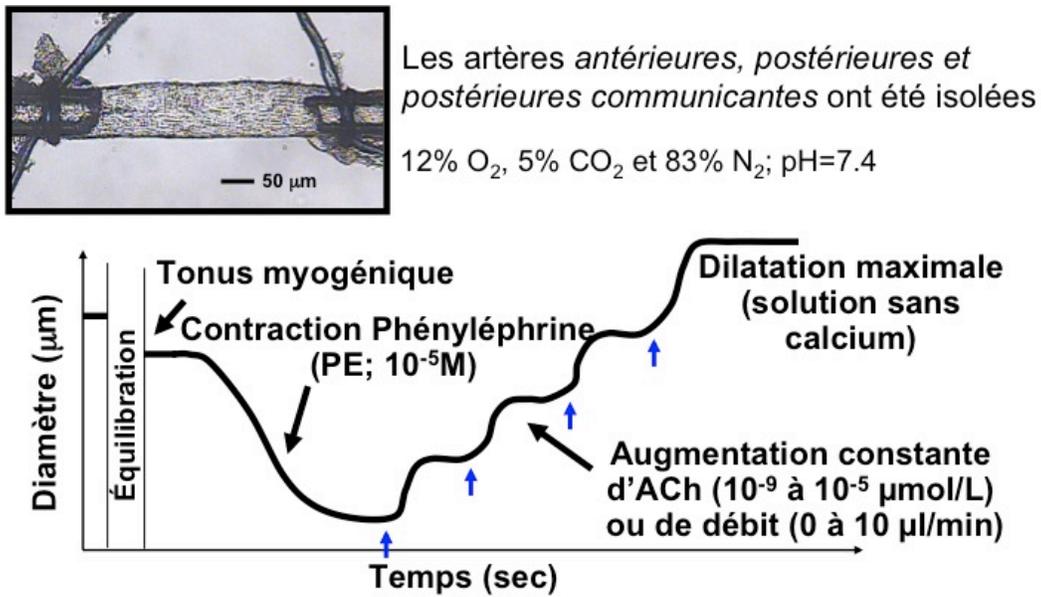


Figure 13. Exemple de protocole utilisé pour les études de réactivité.

Dans nos études, les forces de cisaillement calculées sont comparables à celles appliquées en conditions physiologiques sur des artérioles de tailles comparables, entre 0 et 70 dyn/cm² (Papaioannou *et al.* 2006). À la fin de chaque protocole, la solution contenue dans le bain a été changée pour une solution sans calcium afin d'obtenir le diamètre maximal passif de l'artère. Les résultats sont exprimés en pourcentage de dilatation maximale et représentés en graphiques de courbes débit-réponse.

3.5.6 Utilisation d'inhibiteurs

3.5.6.1 Étude #1

Dans l'étude #1, nous avons déterminé l'implication du H₂O₂ et son mécanisme d'action dans la vasodilatation cérébrale induite par l'augmentation de débit. L'utilisation de différents inhibiteurs nous a permis de déterminer la cascade d'événements menant à la dilatation. Nous avons utilisé : (1) la PEG-Catalase (PEG-CAT, 100U/mL), qui est la forme liposoluble de la catalase permettant de dégrader le H₂O₂ en eau et en oxygène; (2) le 2-Phenyl-4,4,5,5-tetramethyl-imidazole-1-oxyl 3-oxide (PTIO, 100µmol/L), un piègeur du NO; (3) le pyruvate (PYR, 3 mmol/L), un piègeur des peroxydes et du peroxydrite; (4) l'1H-[1,2,4]Oxadiazolo-[4,3a]quinoxalin-1-one (ODQ, 10 µmol/L), un inhibiteur de la guanylate cyclase soluble; (5) la tétrahydrobioptérine (BH₄, 1 mmol/L), un cofacteur essentiel de la eNOS; (6) le diéthylthiocarbamate d'argent (DETC, 1 mmol/L), un chélateur de cuivre utilisé dans nos études en tant qu'inhibiteur indirect de la SOD; (7) l'apocynine (APO, 10 µmol/L), un inhibiteur de la NADPH oxydase; (8) la triciribine (TB, 1 µmol/L (Shein *et al.* 2007)), un inhibiteur de la protéine Akt; (9) le DT-3 (25 nmol/L), un inhibiteur perméable de la protéine kinase G (PKG) (Dostmann *et al.* 2000); (10) la L-arginine (5 mmol/L), précurseur de NO; (11) le detaNONOate (0.1 µmol/L), un donneur du monoxyde d'azote (NO) ainsi que de différentes combinaisons de ces composés.

3.5.6.2 Études #2 et #3

Afin de déterminer l'implication de la COX et/ou de la eNOS dans la vasodilatation des artères cérébrales de la souris, nous avons eu recours à certains inhibiteurs tels que : un inhibiteur de la NOS, le *n*-nitro-L-arginine (L-NNA, 10 $\mu\text{mol/L}$); un inhibiteur de la formation des prostanoides endogènes, l'indométhacine (INDO, 10 $\mu\text{mol/L}$) et un inhibiteur de la thromboxane synthase, le furegrelate (FUR, 10 $\mu\text{mol/L}$). Toutes les drogues utilisées dans les études #1, #2 et #3 ont été préparées dans l'eau doublement distillée sauf pour l'INDO qui a été préparé dans l'éthanol ainsi que le DETC et l'ODQ qui ont été dissous dans le DMSO. L'ACh, le BH₄, l'INDO, le L-NNA, l'ODQ, le DETC, la PEG-catalase, le PTIO, le PYR, l'APO, L-arginine, le detaNONOate et la PE proviennent de chez Sigma-Aldrich Canada Ltd. (Oakville, Ontario, Canada). Le DT-3 et la TB proviennent de chez Calbiochem EMD Chemicals Inc. (San Diego, CA, USA). Toutes les drogues ont été ajoutées directement dans le bain de l'artériographe (du côté extraluminal) 30 minutes avant le début des expériences et la concentration finale d'éthanol ou de DMSO dans le bain n'a pas excédé 0.01%.

3.6 Études de fluorescence

J'ai développé une méthode permettant de mesurer le diamètre et de quantifier, de façon simultanée, la libération de H₂O₂ ou de NO suite à une stimulation (ACh ou débit) sur des artères isolées pressurisées en utilisant des marqueurs fluorescents sensibles au H₂O₂ ou au NO. Les prochains paragraphes expliqueront le principe de la méthode ainsi que les détails du protocole utilisé.

3.6.1 Principe de la fluorescence

Le système utilisé comprend une caméra vidéo et un tube photomultiplicateur (PMT), ce qui permet d'enregistrer simultanément la fluorescence et la dilatation vasculaire (Ionoptix, Milton, MA, USA). Ces deux composants sont reliés au microscope inversé sur lequel on peut fixer l'artériographe. Le microscope est aussi relié au système «HyperSwitch» (voir Figure 15) (Ionoptix, Milton, MA, USA) qui permet de filtrer la

lumière à la longueur d'onde désirée. C'est avec ces longueurs d'onde que nous pourrions exciter le marqueur fluorescent avec lequel nous avons chargé l'artère. Au fur et à mesure que nous allons exciter le marqueur fluorescent chargé dans le vaisseau, le PMT pourra recueillir la lumière émise par le marqueur. Un filtre localisé derrière l'objectif élimine tout rayonnement ultra-violet restant qui pourrait endommager les yeux de l'observateur. Tous ces systèmes sont reliés à un ordinateur qui permet d'acquérir simultanément la dilatation, la pression et la fluorescence. On obtient ainsi une analyse de façon semi-quantitative.

Dans les études #1 et #2 nous avons utilisé deux marqueurs fluorescents, le 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluoresceine diacetate acétyl ester CMH₂DCFDA et le diaminofluoresceine –2 diacetate (DAF-2). Le CMH₂DCFDA est un indicateur des ROS alors que le DAF-2 réagit avec le NO. Les deux composés ne sont pas fluorescents à la base mais perméables aux membranes cellulaires. Une fois à l'intérieur de la cellule, le groupe «*diacetate*» est hydrolysé par des estérases cytosoliques. Les composés deviennent alors non perméables et restent à l'intérieur de la cellule. Une fois liés (au H₂O₂ ou au NO), les composés sont fluorescents. Lorsqu'ils sont excités à une longueur d'onde de 415-420 nm, les composés émettent de la fluorescence à une longueur d'onde de 520 nm.

3.6.2 Protocole des études de fluorescence

Les artères ont été isolées à partir de cerveaux de souris WT ou ATX tel que précédemment décrit. Les artères ont été montées et pressurisées à 60 mmHg sur un artériographe dans une solution de PSS oxygénée et maintenue à 37°C (pH 7.4). Le CMH₂DCFDA (5 µmol/L), qui réagit en présence de H₂O₂ (Chaytor *et al.* 2003; Hatoum *et al.* 2006; Drouin *et al.* 2007), ou le DAF-2 (10 µmol/L), qui réagit en présence de NO (Sylvester *et al.* 2002; Drouin *et al.* 2007), a été ajouté du côté extraluminal de l'artère 30 minutes avant le début de chaque expérience.

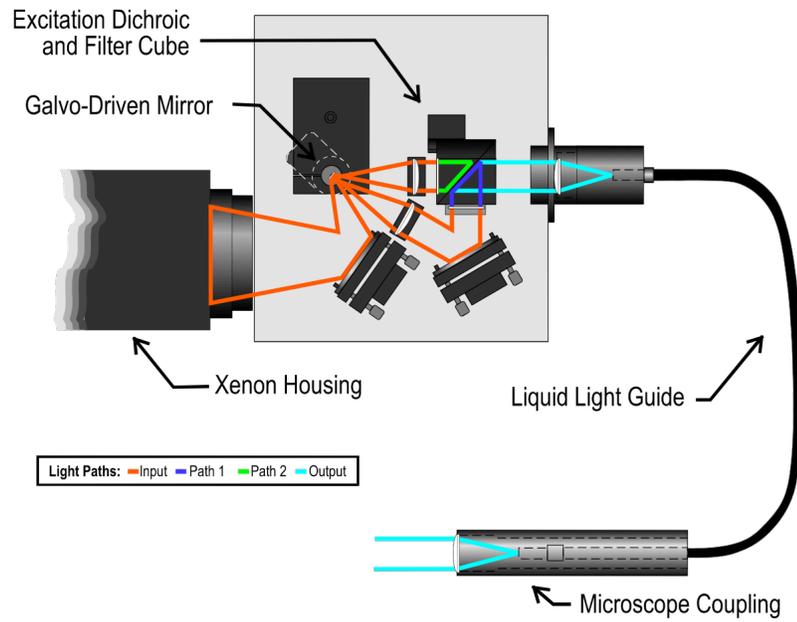


Figure 14. Représentation du système «HyperSwitch» utilisé lors des études de fluorescence (www.IonOptix.com)

Les vaisseaux ont été lavés trois fois avec du PSS, contractés avec la PE (10 $\mu\text{mol/L}$) et soumis à une augmentation de la concentration d'ACh (10 $\mu\text{mol/L}$) ou à une augmentation constante de débit (0 à 10 $\mu\text{l/min}$), en mesurant simultanément le diamètre et les variations d'intensité de la fluorescence émise par la dichlorofluorescéine contenue dans les cellules. Avant chaque expérience, l'état basal de fluorescence a été enregistré et les résultats représentent la différence de fluorescence entre l'artère stimulée à l'ACh ou au débit et l'état basal de cette même artère au début de l'expérience. Le CMH₂DCFDA provient de Molecular Probe (Eugene, OR, U.S.A.) et le DAF-2 de Calbiochem (San Diego, CA, U.S.A.). Les agents ont été préparés dans le DMSO le jour même et avec une concentration finale de DMSO dans le bain de l'artériographe inférieure à 0,01%.

3.7 Études de stress oxydatif

Dans les études #2 et #3, nous avons effectué des traitements avec la catéchine. Afin de confirmer la nature antioxydante du traitement, un marquage avec le dihydroéthidium (DHE ; Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA), un marqueur fluorescent de l'anion superoxyde (O_2^-) a été réalisé. Les prochains paragraphes décriront les procédures effectuées et les principes de cette méthode.

3.7.1 Préparation des tissus

Les aortes de souris WT ou ATX âgées de 3, 6 ou 12 mois ont été prélevées et délicatement nettoyées des tissus et corps gras environnants. Un segment de l'aorte thoracique a été fixé avec du «Optimal Cutting Temperature compound» (OCT) et immédiatement congelé à -80°C . Des coupes aortiques de 20 μm d'épaisseur ont été effectuées à l'aide d'un «Cryostat» et immédiatement placées sur des lames histologiques chargées positivement (Fisher Scientific, Ottawa, Ontario, Canada).

3.7.2 Protocole utilisé pour le marquage de l'anion superoxyde

Des marquages au DHE ont été effectués tel que décrit précédemment (Lauzier *et al.* 2007). Suite à une fixation des coupes à l'acétone pendant 10 minutes, les coupes ont été incubées durant 15 minutes avec une solution de DHE (5 $\mu\text{mol/L}$), un marqueur de l'anion superoxyde, et de To-Pro-3 iodide (2 $\mu\text{mol/L}$, Molecular Probes, Eugene, Oregon,

USA), un marqueur des acides nucléiques. Cette étape a été suivie de 3 lavages dans du PBS de la composition suivante : 136.8 mmol/L de NaCl, 8 mmol/L de Na₂HPO₄, 2.7 mmol/L de KCL, 1.5 mmol/L KH₂PO₄ (pH de 7.4). Les intensités de fluorescence du DHE et du To-Pro-3 ont été lues par microscopie confocale (λ_{ex} : 510 nm et λ_{em} : 590 nm pour le DHE; λ_{ex} : 642 nm et λ_{em} : 661 nm pour le To-Pro-3). Les images ont été prises avec un objectif de 40X et analysées avec le logiciel Image J afin de quantifier la fluorescence moyenne à l'intérieur des noyaux. Les résultats sont exprimés en moyennes de fluorescence de trois segments d'aorte pour chaque animal.

3.8 Études de débit sanguin cérébral

Le *laser Doppler* est utilisé depuis 1977 pour l'étude de la microcirculation de nombreux organes. Il permet par une méthode non invasive, la mesure en continu de la perfusion de la microcirculation. Nous l'avons utilisé pour l'étude du débit sanguin cérébral dans l'étude #3. Les prochains paragraphes discuteront du principe du *laser Doppler* ainsi que du protocole utilisé.

3.8.1 Principe du *laser Doppler*

Le *laser Doppler* est une technique optique fondée sur la mesure du décalage entre les fréquences de faisceaux laser éclairant des particules entraînées par un fluide. Ainsi, en mesurant la vitesse des particules dans le fluide, on peut connaître la vitesse du fluide. Comme son nom l'indique, il fonctionne sur le principe de l'effet Doppler. En fonction de la vitesse des particules se trouvant dans le fluide, la lumière diffusée par celles-ci n'aura pas la même longueur d'onde. Lorsque le faisceau incident rencontre une structure immobile, sa direction est modifiée, mais pas sa longueur d'onde. En revanche, lorsqu'il rencontre une particule mobile, il est réfléchi avec une modification de longueur d'onde proportionnelle à la vitesse de la particule heurtée. La lumière réfléchie par les cellules fixes et les cellules mobiles est recueillie par des fibres optiques distinctes, puis transmise pour analyse par un ordinateur.

Le groupe du Dr. Faraci utilise une autre technique soit la «*video microscopy*». Grâce à cette technique, ils sont capables de mesurer d'une façon simultanée l'augmentation de débit sanguin cérébral et le diamètre de l'artère. De plus, par cette

technique, qui consiste à enlever une petite partie de la boîte crânienne afin d'exposer les artères parenchymateuses, il est possible de regarder en temps réel l'augmentation de diamètre du vaisseau et du débit sanguin dans une seule et même artère de plus petit diamètre que la technique de l'artériographe nous le permet. De plus, l'artère reste dans son environnement, moins d'erreurs induites par la manipulation sont présentes.

Toutefois, même si cette méthode aurait été idéale pour nos études, nous ne possédons pas le matériel nécessaire. Or, une méthode de laser doppler (voir description ci-dessous) a été effectué en parallèle aux études de réactivité.

3.8.2 Protocole des études de débit sanguin cérébral

Cette méthode a été effectuée en collaboration avec le laboratoire du Dr. Édith Hamel (Nicolakakis *et al.* 2008). Les souris ont été anesthésiées avec une combinaison (50:50) de Kétamine (200 µg/kg, i.p, Bioniche, Belleville, Ontario, Canada) et de Xylazine (40µg/kg, i.p, Bayer, Toronto, Ontario, Canada). Les souris ont été immobilisées sur un montage stéréotaxique et l'os de la cavité crânienne au-dessus du cortex pariétal a été aminci à l'aide d'une roulette dentaire jusqu'à l'obtention d'une certaine translucidité. La température corporelle a été maintenue à 37°C à l'aide d'un bloc chauffant, toutefois, la pression partielle sanguine en oxygène (PO₂) et en dioxyde de carbone (PCO₂) n'a pas été enregistrée. Les changements de débit sanguin cérébraux ont été enregistrés (Transonic Systems) avant, durant et après la stimulation des moustaches (20 secondes avec une fréquence de 8–10 Hz) du côté opposé. L'expérience de stimulation a été répétée 4 à 6 fois par souris avec des intervalles de 30 à 45 secondes. Les valeurs représentent la moyenne des stimulations pour chaque souris. Les changements de débit sanguin cérébraux sont exprimés en pourcentage d'augmentation par rapport à la valeur de base.

3.9 Études de comportement

Plusieurs types d'expériences peuvent être effectuées afin de déterminer la capacité d'apprentissage et de la mémoire. Dans l'étude #3, nous avons utilisé celle du «Morris Water Maze (MWM)». Le MWM est utilisé afin de déterminer la capacité d'apprentissage dépendante de l'hippocampe incluant la mémoire spatiale, la mémoire à long terme et la mémoire spatiale à long terme. Ce test est aussi utilisé afin de déterminer

la capacité d'apprentissage. L'avantage du MWM par rapport aux autres tests est qu'il est impossible pour l'animal lors du MWM d'avoir recours à des indices locaux tels que l'odorat ou encore suivre la trace d'un autre animal. De plus, l'animal doit vite faire des progrès s'il veut s'en sortir rapidement. Comme les souris ont l'instinct naturel de nager, cela ne cause pas de détresse à l'animal. Cependant, les souris n'étant pas confortables dans l'eau, elles sont très motivées à sortir de l'eau le plus rapidement possible. Cette méthode a tout de même des limitations puisque quelques souris ont tendance à se laisser flotter et à attendre que l'on vienne les chercher. Les prochains paragraphes concerneront la méthode du MWM.

3.9.1 Principe du Water maze

Une souris est placée dans une petite piscine d'eau, d'un diamètre de 4 à 6 pi et de 2 pi de profondeur. La piscine contient une plate-forme cachée par seulement quelques millimètres d'eau. Des repères visuels, tels que des formes colorées, sont placés sur les rebords de la piscine, dans le champ visuel de l'animal. Une fois relâchée dans la piscine, la souris nage et tente de trouver la plate-forme afin de sortir. Plusieurs paramètres sont enregistrés, tels que le temps requis et la distance parcourue pour trouver la plate-forme. Comme la plate-forme est toujours au même endroit, la souris trouve la plate-forme de plus en plus rapidement au cours des différents essais. Cette amélioration de la performance survient car la souris a appris où la plate-forme se cache et, avec les repères, est capable de la trouver plus rapidement à partir de n'importe quel point dans la piscine.

3.9.2 Protocole effectué

Tel que précédemment décrit (Nicolakakis *et al.* 2008), six jours d'études consécutifs sont nécessaires pour effectuer ce protocole. Chaque jour, les expériences doivent être effectuées à la même heure de la journée. Quotidiennement, chaque souris est soumise à 4 essais dans la piscine. À chaque essai, la souris est déposée à différents endroits dans la piscine. Le temps, la distance, le temps passé dans chaque quadrant ainsi que le chemin parcouru sont enregistrés par une caméra vidéo placée au dessus de la piscine. Afin de rendre inconfortable les souris et de les motiver à trouver la sortie, la température de l'eau est maintenue à 19°C. Dans cette étude, les souris utilisées étaient de

couleur brune ou noire, et un peu de lait en poudre a été ajouté dans l'eau de la piscine afin de créer le contraste nécessaire pour que la vidéo puisse récolter les données. La façon classique de déterminer la capacité de mémoire est de calculer la latence, soit le temps nécessaire à la souris pour trouver la plate-forme. Au sixième jour, des tests de références sont effectués. Le premier test consiste en une référence positive où la plate-forme est visible pour l'animal et donc plus facile à trouver. Le deuxième test consiste en un contrôle négatif, où la plate-forme n'est pas dans la piscine. Si la souris a vraiment appris son emplacement, elle ira tout de suite nager à l'emplacement habituel de la plate-forme.

3.10 Analyses de l'expression des protéines par Western blot

Dans les études #2 et #3, nous avons observé des changements d'expression de protéines impliquées dans la dilatation. Nous avons préalablement isolé les vaisseaux sanguins à partir des cerveaux récoltés et nous en avons extrait les protéines. Les prochains paragraphes décrivent cette méthode.

3.10.1 Isolation des vaisseaux cérébraux

Cette technique d'isolation a été inspirée d'un article publié en 2004 (Li *et al.* 2004). Deux cerveaux de souris du même groupe ont été combinés et homogénéisés avec un instrument de type «Potter» dans du PBS 0.01 M (pH 7.4) froid. L'homogénat a ensuite été centrifugé à une vitesse de 3,500 rpm durant 5 minutes à une température de 4°C. Le surnageant a été jetté et le culot a été resuspendu dans du PBS puis centrifugé. Des lavages ont été répétés trois ou quatre fois, jusqu'à l'obtention d'un culot dépourvu de sang. Puis, le culot a ensuite été resuspendu dans du PBS et délicatement étendu sur une solution de dextran 15% (ayant une masse moléculaire de 43 kDa) dans un tube de centrifugation. Le tout a été centrifugé à une vitesse de 5,000 rpm durant 30 minutes, à une température de 4°C, afin de séparer les couches par un gradient de concentration. Le culot, contenant les vaisseaux d'intérêt, a été recueilli à travers une mèche de nylon ayant des pores de 50 µm. Les vaisseaux isolés sur la mèche contenaient un mélange d'artères, d'artérioles, de capillaires, de veinules et de veines.

3.10.2 Extraction des protéines

Les protéines ont été extraites à partir des vaisseaux recueillis sur la mèche. Le culot contenant les vaisseaux a été récupéré et resuspendu pour 30 minutes à 4 °C dans un tampon de lyse de composition suivante: 50 mmol/L de Tris-HCl, 20 mmol/L de β -glycérophosphate, 20 mmol/L de NaF, 5 mmol/L d'EDTA, 10 mmol/L d'EGTA, 1 mmol/L de Na_3VO_4 , 10 mmol/L de benzamidine, 5 mmol/L de dithiothréitol (DTT), 0.5 mmol/L de PMSF, 10 mg/ml de leupeptine, 1 mmol/L de microcystine LR, and 1% (v/v) de Triton X-100. Les échantillons ont été soumis à un choc mécanique puis thermique (gelés dans l'azote liquide puis chauffés à 37 °C durant 30 secondes). Cette étape a été répétée 3 fois pour chacune des conditions. Les échantillons ont été ensuite centrifugés durant 10 minutes à une vitesse de 13,000 rpm à une température de 4 °C. Le surnageant contenant les protéines a été récupéré. Afin de déterminer la concentration en protéines de nos échantillons, une courbe standard (12 points) de la densité optique en fonction de différentes concentrations connues de la protéine α -globuline, a été construite (0-25 $\mu\text{g/ml}$). Le dosage en teneur protéique des échantillons a été réalisé par la méthode de Bradford et les protéines ont été congelées à -80°C pour une utilisation ultérieure.

3.10.3 Expression des protéines (Western blot)

Les niveaux d'expression de la protéine NOS endothéliale (eNOS), neuronal (nNOS) et inducible (iNOS), de la cyclo-oxygénase de type 1 et 2 (COX-1 et COX-2), superoxyde dismutase de type manganèse (Mn-SOD) ainsi que de la sous-unité p22 de la NADPH oxydase (p22^{phox}) ont été déterminés dans le lysat cellulaire en utilisant respectivement les anticorps suivants : anti-eNOS (1: 250, BD Transduction Laboratories, Franklin Lakes, NJ, USA), anti-nNOS (1: 200, Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA), anti-iNOS (1: 1000, Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA;), anti-COX-1 (1: 250, Cayman Chemical, Arbor, MI, USA), anti-COX-2 (1: 1000, Cayman Chemical, Arbor, MI, USA), anti-Mn-SOD (1: 1000, Stressgen, Ann Arbor, Michigan, USA), anti- p22^{phox} (1: 200, Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA). 50 μg de protéines ont été solubilisées dans un tampon Laemli contenant 0.1% (v/v) de β -mercaptoéthanol. Les échantillons ont été déposés sur un mini gel SDS-PAGE contenant 10% d'acrylamide. Après avoir migré (45

min, 200 mA), les protéines ont été transférées (100 V, 4°C pendant 90 min) sur une membrane de nitrocellulose (0,2 µm) dans un tampon de transfert contenant 25 mmol/L de Tris-HCl, 200 mmol/L de glycine et 5% de méthanol. La membrane a ensuite été bloquée pendant 2 heures dans une solution de blocage [5% (w/v) de lait en poudre (Carnation) dissout dans 25 mmol/L de Tris (pH = 7.5 à 20°C), 150 mmol/L de NaCl (TBS) et 0.05% (v/v) de tween-20 (TBST)] puis incubée en présence du premier anticorps pendant 16 heures à 4°C dans une solution de TBST contenant 5% de BSA (Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, Ontario, Canada) ou de lait en poudre, selon les recommandations de la compagnie. Après trois lavages avec le TBST (10 min chacun), la membrane a été bloquée de nouveau durant 10 min avec le TBST contenant 5 % de lait en poudre. Le second anticorps [(conjugué à l'enzyme Horseradish peroxidase (Hrp)] (Jackson laboratory, Bar Harbor, Maine, USA) a été ajouté à la solution de blocage à une dilution de 1: 100 000 pendant 2 heures supplémentaires, à la température de la pièce. La chemiluminescence du second anticorps a été détectée en utilisant le ECL comme substrat et visualisée sur un film BioMax ML (Kodak).

Afin de pouvoir quantifier la quantité de protéines exprimées, nous avons utilisé la même technique avec un gène rapporteur, le GAPDH, qui est présent dans toutes les cellules endothéliales. Les anticorps utilisés précédemment ont été lavés de la membrane en lavant celle-ci deux fois pendant 15 minutes à la température de la pièce avec du NaOH 0,2 N (Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, Ontario, Canada). La membrane a ensuite été bloquée avec la solution de blocage et incubée avec le premier anticorps dirigé contre la protéine GAPDH (Ambion, Austin, TX, USA) à une dilution de 1 :100 000, puis lavée et incubée avec le second anticorps (conjugué à l'enzyme Hrp, Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA), tel que décrit précédemment.

3.11 Calculs et statistiques

Pour toutes les études effectuées, la lettre «n» fait référence au nombre de souris utilisées pour chacun des protocoles. Les valeurs expriment la moyenne ± SEM. Les variations de diamètre sont exprimées en pourcentage du diamètre maximal (% D_{max}) selon l'équation suivante : $((D_v - D_{min}) / (D_{max} - D_{min})) * 100$; où D_v= le diamètre qui varie en

fonction de l'agoniste ou du débit, D_{\min} = le diamètre minimal obtenu lors de la pré-constriction et le D_{\max} = le diamètre maximal obtenu dans une solution sans calcium. Le tonus myogénique est exprimé en % du D_{\max} et calculé selon l'équation suivante : $((D_{\text{av}} - D_{\text{ap}})/D_{\max}) * 100$, où D_{av} = le diamètre avant la période d'équilibration, D_{ap} = le diamètre après l'équilibration et D_{\max} = le diamètre maximal. Les analyses statistiques utilisées pour la comparaison des différentes données sont détaillées dans la section "Statistical analysis" de chaque manuscript.

Articles

4 Articles

Étude # 1

Apport original et contribution des co-auteurs :

La contribution du premier auteur, Annick Drouin, est majeure puisqu'elle a effectué la totalité des expérimentations et elle a participé à la rédaction du manuscrit. Le Dr. Éric Thorin a supervisé l'étude et a contribué à la rédaction/ révision du manuscrit.

Permission de l'éditeur

1. Identification de la revue ou du livre

Stroke, University of Western Ontario Research Park 100 Collip Circle, Suite
116 London, ON, Canada N6G 4X8

2. Identification de l'éditeur ou des éditeurs

Lippincott Williams & Wilkins

3. Identification de l'article

Annick Drouin, Eric Thorin. Flow-induced dilation is mediated by Akt-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase-derived hydrogen peroxide in mouse cerebral arteries.

Stroke. 2009 May;40(5):1827-33.

4. Accord de l'éditeur

(voir page suivante)

WOLTERS KLUWER HEALTH LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Oct 08, 2009

This is a License Agreement between Annick Drouin ("You") and Wolters Kluwer Health ("Wolters Kluwer Health") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Wolters Kluwer Health, and the payment terms and conditions. All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

License Number	2264261143230
License date	Sep 08, 2009
Licensed content Publisher	Wolters Kluwer Health
Licensed content publication	Stroke
Licensed content title	Flow-Induced Dilation Is Mediated by Akt-Dependent Activation of Endothelial Nitric Oxide Synthase-Derived Hydrogen Peroxide in Mouse Cerebral Arteries
Licensed content author	Annick Drouin
Licensed content date	May 1, 2009
Volume Number	40
Issue Number	5
Type of Use	Dissertation/Thesis
Requestor type	Individual
Title of your thesis	Impact du stress oxydant et de l'athérosclérose sur la fonction cérébrale au cours du vieillissement.
Expected completion date	Oct 2009
Estimated size(pages)	250

**Flow-induced dilation is mediated by Akt-dependent activation
of eNOS-derived H₂O₂ in mouse cerebral arteries**

Annick Drouin, MSc, Eric Thorin, PhD.

Université de Montréal, Department of Surgery, Institut de Cardiologie de Montréal,
Centre de recherche, Montréal, Québec, Canada,

Corresponding author:

Dr. Eric Thorin, Institut de Cardiologie de Montréal, centre de recherche, 5000, rue
Bélanger, Montréal, Québec, H1T 1C8, Canada. Tel.: (514) 376-3330; fax.: (514) 376-
1355

Funding

This work has been supported in part by the Foundation of Montreal Heart Institute, the Heart and Stroke Foundation of Quebec and the Canadian Institute for Health Research (MOP87388). A. Drouin holds the *Frederick Banting and Charles Best Canada Graduate Scholarships - Doctoral Award* in association with the Canadian Institute for Health Research.

Flow-induced dilation is mediated by Akt-dependent activation of eNOS-derived H₂O₂ in mouse cerebral arteries

Cover title: H₂O₂ induces FMD in mouse cerebral arteries

List: Number of table: 1
Number of figures: 5

Key words: Endothelium, nitric oxide, resistance arteries, oxygen radicals.

Purpose. Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) produces superoxide under physiological conditions leading to H₂O₂-dependent dilations to acetylcholine in isolated mouse cerebral arteries. The purpose of this study was to investigate whether H₂O₂ was involved in flow-mediated dilation (FMD). **Methods.** Cerebral arteries were isolated from 12±2 week-old C57Bl/6 male mice. FMD (0 to 10 µl/min, 2-µl step-increase at constant internal pressure) were induced in vessels pre-constricted with phenylephrine (30 µM). Simultaneously to diameter acquisition, H₂O₂ or NO production was detected by the fluorescent dyes CMH₂CFDA or DAF-2, respectively. Results are expressed as mean±SEM of n = 6 to 8 mice. **Results.** FMD (at 10 µl/min, 25±3% of maximal diameter) were prevented (P<0.05) by endothelium removal (6±1%) or eNOS inhibition with N-nitro-L-arginine (L-NNA; 11±1%), but not by the specific NO scavenger 2-phenyl-4,4,5,5-tetramethyl-imidazole-1-oxyl3-oxide (PTIO; 24±3%). Addition of PEG-catalase and silver diethyldithio-carbamate (DETC; superoxide dismutase inhibitor) reduced (P<0.05) FMD to 10±2% and 15±1%, respectively. Simultaneously to FMD, H₂O₂-associated rise in fluorescence (+133±19 a.u.) was prevented by L-NNA, PEG-catalase and DETC (+55±10, +64±4 and +50±10 a.u., respectively; P<0.05). Inhibition of FMD by PEG-catalase was fully restored by the addition of tetrahydrobiopterin, a cofactor of eNOS (23±3%); this functional reversal in dilation was associated with the simultaneous increase in NO-associated fluorescence (+418±58 a.u., P<0.05), which was prevented by PTIO (+93±26 a.u.). Akt-inhibition with triciribine prevented FMD and H₂O₂-associated rise in fluorescence (3±1% and +23±4 a.u., respectively, P<0.05), but not ACh-induced dilation. **Conclusion.** In healthy C57Bl/6 mouse cerebral arteries, Akt-dependent activation of eNOS-derived H₂O₂ mediates flow-dependent dilation.

Introduction

Shear stress is one of the most important physiological stimuli for vasodilation and is greatly implicated in the regulation of vascular tone and vascular homeostasis by contributing to the maintenance of organ perfusion and vascular integrity^{1,2}. Several studies have evaluated the implication of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and cyclo-oxygenase (COX) derivatives in flow-mediated dilation (FMD)³⁻⁶. However, the implication of each endothelium-dependent relaxing factor (EDRF) varies among vascular beds and pathological states^{3,7-11}.

The release of superoxide ($O_2^{\cdot-}$) has been reported during FMD both in peripheral^{12,13} and cerebral arteries^{14,15}. Although an increase in ROS is traditionally considered as a pathological response, recent investigations show that ROS are implicated in the regulation of vascular function^{12, 16-18}. It is unclear however, if this concept applies to the physiological regulation of vascular tone and FMD. In a recent study, our group showed that hydrogen peroxide (H_2O_2) is an EDRF produced by eNOS activity following muscarinic receptor stimulation¹⁹. H_2O_2 was also reported to induce endothelium-dependent and independent dilation in healthy rat cerebral arteries¹⁸ and identified as an EDRF in FMD of human coronary arteries¹. These results led to the hypothesis that H_2O_2 could be physiologically implicated in the regulation of cerebral arteries.

The origin of $O_2^{\cdot-}$ that leads to the physiological formation of H_2O_2 is still unsettled. eNOS, however, is able to generate $O_2^{\cdot-}$ during enzymatic cycling^{20,21}. The eNOS-dependent generation of $O_2^{\cdot-}$ is nonetheless proposed to be functionally significant only in pathological conditions and related to the limited availability of L-arginine, the substrate of eNOS, as well as of its essential cofactor tetrahydrobiopterin (BH_4)^{22,23}. In a recent

study, Shimokawa's group suggested that the NOSs system has diverse vasodilator functions depending on the vessel size leading to superoxide production rather than NO in small vessels²⁴. There is therefore a need for determining the physiological role of eNOS derived H₂O₂ in FMD in cerebral arteries.

We hypothesized that eNOS produces physiologically relevant levels of free radicals leading to H₂O₂-dependent FMD in healthy mouse cerebral arteries.

Materials and methods

Animals and tissues preparation. The procedures and protocols were performed in accordance with our institutional guidelines and the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* of Canada. Experiments were conducted on cerebral arteries isolated from 3 month-old male C57BL/6 mice (29 ± 1 g, $n = 66$; Charles River Laboratories, Quebec, Canada) using a method previously described¹⁹. Mice were euthanized by CO₂ inhalation and the brain was rapidly removed and placed in ice-cold physiological salt solution (PSS) of the following composition (mmol/L): NaCl 130, KCl 4.7, CaCl₂ 1.6, MgSO₄ 1.17, NaHCO₃ 14.9, KH₂PO₄ 1.18, EDTA 0.026, glucose 10. In all experiments, the PSS was oxygenated by a gas mixture containing 12% O₂, 5% CO₂ and 83% N₂ generating a pO₂ of 150 ± 10 mm Hg. Cerebral arteries (*anterior*, *posterior* and *posterior communicating*; internal diameter of 136 ± 2 μm when pressurized at 60 mm Hg) were carefully isolated, cannulated at both ends and pressurized at 60 mm Hg on a pressure myograph (Living Systems Instrumentation, Burlington, USA).

Reactivity studies. An equilibration period of 40 min was allowed before starting the experiment and the resulting myogenic tone was measured $((D_{\text{after}} - D_{\text{before}})/D_{\text{max}}) * 100$, where D_{before} is the diameter before equilibration, D_{after} is the diameter after equilibration time and D_{max} is the maximal diameter obtained in Ca²⁺-free solution. Similar levels of pre-constrictions with phenylephrine (PE; 10 to 30 $\mu\text{mol/L}$; table 1) were obtained before each experiment. FMD was induced using a flow control peristaltic pump (Living Systems Instrumentation, Burlington, USA) directly connected to the pressured myograph. A single cumulative FMD curve (0 to 10 $\mu\text{l/min}$, 2- μl step-increase at constant

internal pressure) was performed on each segment. Two minutes were allowed for each 2- μ l step-increase. Shear stress was calculated using the following equation: $t = 4\eta Q/\pi r^3$ where t is the shear stress (dyn/cm²), η the viscosity (0.8 cp⁵), Q is the flow rate through the lumen and r is the inside radius. In this study, the calculated shear stress was comparable to the physiological value of shear stress in arterioles of this size²⁵.

We used 1) PEG-catalase (50 and 100 U/mL), 2) *N*^o-nitro-L-arginine (L-NNA; 10 μ mol/L), an eNOS inhibitor, 3) pyruvate (3 mmol/L), a H₂O₂ scavenger²⁶, 4) silver diethyldithiocarbamate (DETC; 1 mmol/L), a superoxide dismutase (SOD) inhibitor, 5) 2-phenyl-4,4,5,5-tetramethyl-imidazoline-1-oxyl 3-oxide (PTIO; 100 μ mol/L), a NO scavenger, 6) indomethacin (10 μ mol/L), a non specific COX inhibitor, 7) 1H-[1,2,4]-oxadiazole-4,3-aquinoxalin-1-one (ODQ; 10 μ mol/L), a soluble guanylate cyclase inhibitor, 8) triciribine (TB; 1 μ mol/L²⁷), an Akt protein inhibitor, 9) DT-3 (25 nmol/L), a cell-permeant G protein kinase (PKG) inhibitor²⁸, 10) tetrahydrobiopterin (BH₄; 1 mmol/L), 11) apocynin (10 μ mol/L), a NAD(P)H oxidases inhibitor, 12) L-arginine (5 mmol/L) and 13) detaNONOate (0.1 μ mol/L), a NO donor. Acetylcholine (ACh; 30 μ mol/L) and hydrogen peroxide (H₂O₂; 10 μ mol/L) were also used to induce dilation. All drugs were purchased from Sigma-Aldrich Canada Ltd. (Oakville, Ontario, Canada), except for triciribine and DT-3, which were purchased from Calbiochem EMD Chemicals Inc. (San Diego, CA, USA). All drugs were directly added to the bath chamber (extra-luminal) and the final concentration of ethanol or DMSO never exceeded 0.01%.

Fluorescence studies. Pressurized cerebral arteries were incubated in oxygenated PSS (37°C) containing either 5 μ mol/L of 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-

dichlorodihydrofluorescein diacetate acetyl ester (DCF-DA, a ROS-reacting fluorescent dye; Molecular Probe, OR, U.S.A. ^{19,29,30}) or 10 $\mu\text{mol/L}$ of 4,5-diaminofluorescein diacetate (DAF-2, a NO-reacting fluorescent dye; Calbiochem, CA, U.S.A. ^{19,31}) 30 min before the beginning of the experiment, with or without inhibitors. Vessels were then washed with PSS, pre-constricted with PE and dilated with flow (0 to 10 $\mu\text{l/min}$) or with a single dose of ACh (30 $\mu\text{mol/L}$) while recording simultaneously the changes in diameter and in fluorescence intensities of fluorescein retained intracellularly after cleavage of the acetate moieties. Fluorescence intensities at 492-495 nm (excitation) were measured at 520 nm with an IonOptix Acquire system (IonOptix, MA, U.S.A.). Before each experiment, basal fluorescence intensity was recorded. Results represent differences between stimulated and basal intensity.

Statistics. *n* refers to the number of animals used in each protocol. Continuous variables are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). The maximal diameter (D_{max}) was determined by changing the PSS to a Ca^{2+} -free PSS ¹⁹. Dilations are expressed with the following equation: $((D_f - D_{\text{min}})/(D_{\text{max}} - D_{\text{min}})) * 100$; where D_f is the diameter obtain at each flow value and D_{min} is the diameter of PE-induced constriction. One way ANOVA were performed to compare the effect of the different inhibitors on FMD curves and the increase in fluorescence intensity at a flow rate of 10 $\mu\text{l/min}$. Differences were considered to be statistically significant when the *P*-value was <0.05 (Scheffe's *F* test).

Results

Implication of H₂O₂ and eNOS in FMD.

Flow-mediated dilations of cerebral arteries were reduced by NOS inhibition with L-NNA, (10 µmol/L) (figure 1A; table 1). The NO scavenger PTIO (100 µmol/L), however, had no impact on the dilation induced by flow (figure 1A; table 1). The cell permeable PEG-catalase (50 and 100 U/ml) reduced FMD in a dose-dependent manner (figure 1; table 1). The likely involvement of H₂O₂ was further confirmed by the inhibitory effect of pyruvate (3 mmol/L), a H₂O₂ scavenger, and DETC (1 mmol/L), a SOD inhibitor (figure 1B; table 1).

To confirm these pharmacological data, H₂O₂ production was assessed in pressurized vessels after incorporation of the fluorescent ROS-reactive dye, DCF-DA^{19,29,30}. FMD was associated with an increase in fluorescence intensity: ROS-dependent signals (figure 2 A and C) were abolished by L-NNA, PEG-catalase, DETC and pyruvate, demonstrating the specificity of the dye for H₂O₂ in our experimental conditions. Apocynin, a NAD(P)H oxidase inhibitor, neither reduced FMD (table 1) nor DCF-DA fluorescence (figure 2C).

Nitric oxide production was assessed after incorporation of the fluorescent NO-reactive dye, DAF-2¹⁹. FMD was not associated with an increase in fluorescence intensity, which was unaffected by the addition of PEG-catalase and DETC (figure 2 B and D).

In contrast, addition of the NO donor detaNONOate (0.1 µmol/L) induced a potent dilation of 73±5% of D_{max} and increased DAF-associated fluorescence by 959±47 a.u (n=4). These responses were reduced (P<0.05) by addition of PTIO (46±6% and 88±24 a.u, respectively).

Effects of BH₄ on eNOS activity and NO production.

Addition of BH₄ (1 mmol/L) did not alter FMD (figure 3 A; table 1) but led to the production of NO, as revealed by the appearance of a strong DAF-2-associated fluorescence that was prevented by PTIO and L-NNA (figure 2 B and D). While PTIO or PEG-catalase did not alter FMD in the presence of BH₄ (table 1), the dilation to flow was prevented by combining PTIO and PEG-catalase (table 1). This was associated with a reduction in both NO- and H₂O₂-associated fluorescence from 418±58 and 571±94 a.u. to 45±4 and 58±20 a.u., respectively (P<0.05).

In contrast to BH₄, L-arginine (5 mmol/L) neither affected FMD (10 µl/min; table 1) nor NO-associated fluorescence (26±4 a.u.).

Vasodilator mechanism of action of H₂O₂.

ODQ (1 µmol/L), an inhibitor of the sGC, reduced the dilation triggered by flow as efficiently as endothelial denudation (figure 3 B and 4; table 1). ODQ however, did not prevent H₂O₂-associated rise in fluorescence (figure 3 C). In the presence of BH₄, ODQ still reduced FMD (figure 3 A). PKG inhibition with DT-3 reduced FMD, but not the H₂O₂-associated rise in fluorescence (figure 3 B and C).

Endothelial regulation of FMD.

FMD was strongly reduced by L-NNA, with no additive effects of indomethacin, suggesting no involvement of COX-derivatives during FMD of mouse cerebral arteries (figure 4). FMD and its associated increase in H₂O₂-fluorescence were abolished by Akt inhibition with TB (figure 5 A and C; table 1). In contrast, TB only limited ACh-induced

endothelium-dependent dilation (30 $\mu\text{mol/L}$), and its associated increase in H_2O_2 -fluorescence (figure 5 B and D).

Impact of eNOS activity on myogenic tone.

L-NNA, PEG-catalase, DETC and ODQ increased myogenic tone (MT), while Akt inhibition and PTIO had no effect (table 1). The rise in MT induced by L-NNA was prevented by COX-1/2 inhibition, suggesting that addition of L-NNA reveals a COX-derived contracting factor (table 1).

Exogenous H_2O_2 dilation.

Exogenous H_2O_2 (10 $\mu\text{mol/L}$, n=4) induced a large dilation ($65\pm 4\%$). Addition of L-NNA or BH_4 did not affect this response ($60\pm 6\%$ and $52\pm 7\%$, respectively). Addition of ODQ, however, prevented H_2O_2 -induced dilation ($6\pm 2\%$).

Discussion

The main finding of the present study is that FMD is mediated by H_2O_2 derived from eNOS activity in pressurized cerebral arteries isolated from young and healthy C57Bl/6 mice. FMD was sensitive to eNOS inhibition and H_2O_2 scavengers, and associated with an increase in H_2O_2 -associated fluorescence. In addition, Akt-dependent activation of eNOS is mandatory for FMD, unlike for ACh-induced dilation. These results support the concept that eNOS-derived H_2O_2 is a physiologically relevant signaling molecule in healthy mice.

Endothelium removal abolished FMD in cerebral artery consistent with previous reports^{5,7,13,32}. Inhibition of eNOS by L-NNA limited the dilation similarly to H_2O_2 scavengers, while PTIO, a NO scavenger, had no impact. These results strongly suggest that H_2O_2 originates from stimulated eNOS activity and is responsible for FMD in mouse cerebral arteries. This hypothesis is supported by the absence of H_2O_2 -associated fluorescence in cerebral arteries incubated in the presence of L-NNA and PEG-catalase, and by the demonstration that FMD is not associated with an increase in NO-associated fluorescence. These data are in line with recent work showing that H_2O_2 is an important signaling molecule in cerebral¹⁴ and peripheral³³ arteries.

We¹⁹ and others^{1,34} previously reported that H_2O_2 is an EDRF derived from eNOS activity following acetylcholine-induced dilation of mouse arteries. It is known that eNOS is able to generate O_2^- during enzymatic cycling^{20,21}. The eNOS-dependent generation of O_2^- is proposed, however, to be only functionally significant in pathological conditions and related to the limited availability of eNOS cofactors^{22,23}. In this study, the addition of BH_4 , but not L-arginine, induced an increase in NO-associated fluorescence, but neither BH_4 nor L-arginine had significant effect on the extent of FMD. This increase in NO-

associated fluorescence intensity was blocked by PTIO and L-NNA, confirming that eNOS produces NO in the presence of an excess of BH₄. The level of BH₄ is significantly lower in the brain than in other mouse organs as previously reported by Heales's group³⁵; this could be a reason for the preferential production of H₂O₂, but it remains to be demonstrated. The NAD(P)H oxidase is known to be a source of superoxide and H₂O₂ during endothelium-dependent dilation of rat cerebral arteries¹⁴. In our hands, apocynin failed to reduce FMD as well as the increase in H₂O₂-associated fluorescence, suggesting no involvement of the activity of the NAD(P)H oxidase in the H₂O₂-dependent dilation of mouse cerebral arteries.

Our data, those of Rosenblum¹⁵ and of Sobey's group¹⁴, demonstrate that free radicals are involved in the physiological regulation of the cerebrovascular tone. Free radicals, however, are commonly associated with endothelial dysfunction and cellular damages triggered by oxidative stress³⁴. Many physiological regulatory effects are mediated by H₂O₂ and other ROS that are chemically derived from superoxide³⁶. NAD(P)H, for example, is essential for the regeneration of GSH from GSSG, reactivation of H₂O₂-inactivated catalase and regeneration of thioredoxin³⁷. It is therefore essential to maintain adequate levels of NAD(P)H as well as the normal function of these enzymes. Hence, controlled production of free radicals has a physiological meaning, while unregulated oxidative stress is deleterious.

The fact that PTIO addition blocked the rise in NO-associated fluorescence following the addition of detaNONOate demonstrates the specificity of DAF-2 dye for NO, as previously discussed¹⁹. DCF-DA is known to recognize all ROS species at high concentrations such as O₂⁻, OH⁻ and H₂O₂ with a greater specificity for ONOO⁻³⁸. DCF-

DA fluorescence signal was, however, abolished by PEG-catalase, pyruvate and DETC, but not PTIO (data not showed), demonstrating a greater selectivity of the dye for H₂O₂ than NO or its derived reactive nitrogen species. Hence, in these healthy arteries, and in our experimental conditions, peroxynitrites are not produced.

The mechanism of eNOS activation by flow is not fully understood. It has been proposed that Akt-dependent phosphorylation of eNOS is essential for NO production¹⁴. Our study demonstrates that FMD is abolished by Akt inhibition and this was associated with a reduction in H₂O₂-associated fluorescence. Thus shear stress-dependent activation of Akt is responsible for eNOS activation. To support this hypothesis, we used another Akt inhibitor (LY294002). LY294002, however, is also a PI3-K inhibitor and reduced the pre-contraction induced by PE (data not shown), preventing its use. In contrast to flow, muscarinic receptor activation directly promotes eNOS activation without requiring Akt-dependent activation. Importantly, neither the dilation nor H₂O₂-associated fluorescence was abolished by Akt inhibition following muscarinic receptor stimulation. Akt inhibition reduced nonetheless ACh-dependent dilation, suggesting that there is a basal level of Akt activity influencing eNOS cycling.

Addition of ODQ to block the sGC, abrogated FMD without affecting H₂O₂-associated fluorescence. Furthermore, exogenous H₂O₂-induced dilation was unaffected by L-NNA or BH₄, but prevented by ODQ, which is in agreement with our previous report¹⁹. To further validate the involvement of the cGMP pathway in FMD, we used a PKG inhibitor. FMD dilation, but not H₂O₂ production, was abolished by DT-3, confirming the implication of cGMP in H₂O₂-dependent FMD. In the presence of BH₄, FMD was also

abolished by ODQ, confirming that H_2O_2 shares with NO a similar vasodilator pathway^{18,39}.

FMD was not completely blocked by L-NNA, with no additive effects of indomethacin, suggesting the involvement of another EDRF. Previous studies^{1,7} suggested the role of an EDHF during FMD. This factor may account for the residual response obtained in the presence of L-NNA. It is also interesting that COX inhibition had no effect on FMD. This is another difference with ACh-induced endothelium dependent dilation of cerebral arteries where prostacyclin significantly contributes to this response¹⁹. Like in our previous report¹⁹, myogenic tone was increased by L-NNA but reduced by combining indomethacin, suggesting that in the absence of NO, a COX-derived contracting factor is produced or its effect revealed. We observed the same response in renal arteries⁴⁰, which suggests that both constrictors and dilators co-exist to regulate tone. In age and in the presence of risk factor for cardiovascular diseases, the expression of these contracting factors dominate as a consequence of a reduced NOS activity^{41,42,43}.

In conclusion, our results suggest that flow triggers Akt-dependent eNOS activation leading to a dilation essentially induced by H_2O_2 in pressurized cerebral arteries isolated from healthy and young C57Bl/6 mice. Like NO, H_2O_2 activates the sGC. Our results highlight the multifaceted function of eNOS in its mechanisms of regulation of vascular function.

References

1. Miura H, Bosnjak JJ, Ning G, Saito T, Miura M, Gutterman DD. Role for hydrogen peroxide in flow-induced dilation of human coronary arterioles. *Circ Res*. 2003;**92**:e31-e40.
2. Phillips SA, Hatoum OA, Gutterman DD. The mechanism of flow-induced dilation in human adipose arterioles involves hydrogen peroxide during CAD. *Am J Physiol*. 2007;**292**:H93-H100.
3. Joannides R, Haefeli WE, Linder L, Richard V, Bakkali EH, Thuillez C, Lüscher TF. Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation*. 1995;**91**:1314-1319.
4. Koller A, Sun D, Huang A, Kaley G. Corelease of nitric oxide and prostaglandins mediates flow-dependent dilation of rat gracilis muscle arterioles. *Am J Physiol*. 1994;**267**:H326-H332.
5. Shipley RD, Kim SJ, Muller-Delp JM. Time course of flow-induced vasodilation in skeletal muscle: contributions of dilator and constrictor mechanisms. *Am J Physiol*. 2005;**288**:H1499-H1507.
6. Fujii K, Heistad DD, Faraci FM. Flow-mediated dilatation of the basilar artery in vivo. *Circ Res*. 1991;**69**:697-705.
7. Miura H, Wachtel RE, Liu Y, Loberiza FR Jr, Saito T, Miura M, Gutterman DD. Flow-induced dilation of human coronary arterioles: important role of Ca(2+)-activated K(+) channels. *Circulation*. 2001;**103**:1992-1998.
8. Kuo L, Chilian WM, Davis MJ. Interaction of pressure- and flow-induced responses in porcine coronary resistance vessels. *Am J Physiol*. 1991;**261**:H1706-H1715.

9. Koller A, Sun D, Kaley G. Role of shear stress and endothelial prostaglandins in flow- and viscosity-induced dilation of arterioles in vitro. *Circ Res.* 1993;**72**:1276-1284.
10. Muller-Delp JM, Spier SA, Ramsey MW, Delp MD. Aging impairs endothelium-dependent vasodilation in rat skeletal muscle arterioles. *Am J Physiol.* 2002;**283**:H1662-H1672.
11. Sun D, Liu H, Yan C, Jacobson A, Ojaimi C, Huang A, Kaley G. COX-2 contributes to the maintenance of flow-induced dilation in arterioles of eNOS-knockout mice. *Am J Physiol.* 2006;**291**:H1429-H1435.
12. Laurindo FR, Pedro Mde A, Barbeiro HV, Pileggi F, Carvalho MH, Augusto O, da Luz PL. Vascular free radical release. Ex vivo and in vivo evidence for a flow-dependent endothelial mechanism. *Circ Res.* 1994;**74**:700-709.
13. Liu Y, Zhao H, Li H, Kalyanaraman B, Nicolos AC, Gutterman DD. Mitochondrial sources of H₂O₂ generation play a key role in flow-mediated dilation in human coronary resistance arteries. *Circ Res.* 2003;**93**:573-580.
14. Paravicini TM, Miller AA, Drummond GR, Sobey CG. Flow-induced cerebral vasodilation *in vivo* involves activation of phosphatidylinositol-3 kinase, NADPH-oxidase, and nitric oxide synthase. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism.* 2006;**26**:836-845.
15. Rosenblum WI. Hydroxyl radical mediates the endothelium-dependent relaxation produced by bradykinin in mouse cerebral arterioles. *Circ Res.* 1987;**61**:601-603.
16. Rush JW, Ford RJ. Nitric oxide, oxidative stress and vascular endothelium in health and hypertension. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2007;**37**:185-192.

17. Ungvari Z, Wolin MS, Csiszar A. Mechanosensitive production of reactive oxygen species in endothelial and smooth muscle cells: role in microvascular remodeling? *Antioxid Redox Signal*. 2006;**8**:1121-1129.
18. Sobey CG, Heistad DD, Faraci FM. Mechanisms of bradykinin-induced cerebral vasodilatation in rats. *Stroke*. 1997;**28**:2290-2295.
19. Drouin A, Thorin-Trescases N, Hamel E, Falck JR, Thorin E. Endothelial nitric oxide synthase activation leads to dilatory H₂O₂ production in mouse cerebral arteries. *Cardiovasc Res*. 2007;**73**:73-81.
20. Porasuphatana S, Tsai P, Rosen GM. The generation of free radicals by nitric oxide synthase. *Comp Biochem Phys Part C*. 2003;**134**:281-289.
21. Stroes E, Hijmering M, van Zandvoort M, Wever R, Rabelink TJ, Faassen EE. Origin of superoxide production by endothelial nitric oxide synthase. *FEBS Letters*. 1998;**438**:161-164.
22. Alp NJ, Chanon KM. Regulation of endothelial nitric oxide synthase by tetrahydrobiopterin in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;**24**:1-9.
23. Katusic ZS, d'Uscio LV. Tetrahydrobiopterin: mediator of endothelial protection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;**24**:397-398.
24. Takaki A, Morikawa K, Tsutsui M, Murayama Y, Tekes E, Yamagishi H, Ohashi J, Yada T, Yanagihara N, Shimokawa H. Crucial role of nitric oxide synthases system in endothelium-dependent hyperpolarization in mice. *J Exp Med*. 2008;**205**:2053-2063.
25. Papaioannou TG, Karatzis EN, Vavuranakis M, Lekakis JP, Stefanadis C. Assessment of vascular wall shear stress and implications for atherosclerotic disease. *Int J Cardiol*. 2006 ;**113**:12-8. *Review*

26. Mallet RT, Sun J, Knott EM, Sharma AB, Olivencia-Yurvati AH. Metabolic cardioprotection by pyruvate: recent progress. *Exp Biol Med.* 2005;**230**:435-443.
27. Shein NA, Tsenter J, Alexandrovich AG, Horowitz M, Shohami E. Akt phosphorylation is required for heat acclimation-induced neuroprotection. *J Neurochem.* 2007;**103**:1523-1529.
28. Dostmann WRG, Taylor MS, Nickl CK, Brayden JE, Frank R, Tegge WJ. Highly specific, membrane-permeant peptide blockers of cGMP-dependent protein kinase I α inhibit NO-induced cerebral dilation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;**97**:14772-14777.
29. Hatoum OA, Otterson MF, Kopelman D, Miura H, Sukhotnik I, Larsen BT, Selle RM, Moulder JE, Guterman DD. Radiation induces endothelial dysfunction in murine intestinal arterioles via enhanced production of reactive oxygen species. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;**26**:287-294.
30. Chaytor AT, Edwards DH, Bakker LM, Griffith TM. Distinct hyperpolarizing and relaxant roles for gap junctions and endothelium-derived H₂O₂ in NO-independent relaxations of rabbit arteries. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;**100**:15212-15217.
31. Sylvester FA, Stepp DW, Frisbee JC, Lombard JH. High-salt diet depresses acetylcholine reactivity proximal to NOS activation in cerebral arteries. *Am J Physiol.* 2002;**283**:H353-H363.
32. Bergaya S, Hilgers RH, Meneton P, Dong Y, Bloch-Faure M, Inagami T, Alhenc-Gelas F, Lévy BI, Boulanger CM. Flow-dependent dilation mediated by endogenous kinins requires angiotensin AT₂ receptors. *Circ Res.* 2004;**94**:1623-1629.
33. Matoba T, Shimokawa H. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in animals and humans. *J Pharmacol Sci.* 2003;**92**:1-6.

34. Faraci FM. Reactive oxygen species: influence on cerebral vascular tone. *J Appl Physiol.* 2006;**100**:739-743.
35. Lam AAJ, Hyland K, Heales SJR. Tetrahydrobiopterin availability, nitric oxide metabolism and glutathione status in the hph-1 mouse; implications for the pathogenesis and treatment of tetrahydrobiopterin deficiency states. *J Inherit Metab Dis.* 2007;**30**:256-262.
36. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002;**82**:47-95.
37. Ying W. NAD⁻/NADH and NADP⁻/NADPH in cellular functions and cell death: regulation and biological consequences. *Antiox Redox Signal.* 2008;**10**:179-206.
38. Rodriguez J, Specian V, Maloney R, Jourdeuil D, Feelisch M. Performance of diamino fluorophores for the localization of sources and targets of nitric oxide. *Free Radic Biol Med.* 2005;**38**:356-368.
39. Iesaki T, Gupte SA, Kaminski PM, Wolin MS. Inhibition of guanylate cyclase stimulation by NO and bovine arterial relaxation to peroxynitrite and H₂O₂. *Am J Physiol.* 1999;**46**:H978-H985.
40. Gendron ME, Thorin E. A change in the redox environment and thromboxane A₂ production precede endothelial dysfunction in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;**293**:H2508-H2515.
41. Auch-Schwelk W, Katusic ZS, Vanhoutte PM. Thromboxane A₂ receptor antagonists inhibit endothelium-dependent contractions. *Hypertension.* 1990;**15**: 699–703.

42. Yang D, Feletou M, Levens N, Zhang JN, Vanhoutte PM. A diffusible substance(s) mediates endothelium-dependent contractions in the aorta of SHR. *Hypertension*. 2003;**41**: 143–148.
43. Quyyumi AA, Dakak N, Andrews NP, Husain S, Arora S, Gilligan DM, Panza JA, Cannon RO 3rd. Nitric oxide activity in human coronary circulation. Impact of risk factors for coronary atherosclerosis. *J Clin Invest* 1995;**95**:1747–1755.

Figure 1. Flow-mediated endothelium-dependent dilations of C57Bl/6 mouse pressurized cerebral arteries: (A) effect of L-NNA (10 $\mu\text{mol/L}$), PEG-catalase (100 U/ml) and the NO scavenger PTIO (100 $\mu\text{mol/L}$). (B) Scavenging of H_2O_2 by pyruvate (3 mmol/L) or SOD inactivation by DETC (1 mmol/L). *: $P < 0.05$ compared to control (“n” numbers are in Table 1).

Figure 2. Representative changes in fluorescence intensities induced by flow (4, 6 and 8 $\mu\text{l/min}$) in pressurized mouse cerebral arteries. Arteries were loaded with (A) DCF-DA (5 $\mu\text{mol/L}$) before (control) and after incubation with PEG-catalase and (B) DAF-2 (10 $\mu\text{mol/L}$) before (control) and after addition of BH_4 . (C) Average increases in fluorescence intensities of arteries loaded with DCF-DA or (D) DAF-2 during flow-mediated dilation (10 $\mu\text{l/min}$) (n = 3 to 5 per group). *: $P < 0.05$ compared to control; †: $P < 0.05$ compared to BH_4 .

Figure 3. Effects of BH_4 (1 mmol/L), a NOS cofactor, DT-3, a protein kinase G inhibitor (25 nmol/L), and ODQ, a soluble guanylate cyclase inhibitor (1 $\mu\text{mol/L}$), on (A and B) flow-mediated dilation, and (C) changes in fluorescence intensities induced by flow (10 $\mu\text{l/min}$) in pressurized mouse cerebral arteries loaded with DCF-DA (5 $\mu\text{mol/L}$) (“n” numbers are reported in Table 1). *: $P < 0.05$ compared to control.

Figure 4. Effect of removal of the endothelium (-Endo), L-NNA (10 $\mu\text{mol/L}$) and addition of indomethacin (10 $\mu\text{mol/L}$) on flow-mediated dilations of pressurized cerebral arteries isolated from C57Bl/6 mice. (“n” numbers are reported in Table 1) *: $P < 0.05$ compared to control.

Figure 5. Effect of removal of the endothelium (-Endo) and triciribine, an inhibitor of Akt (TB; 1 $\mu\text{mol/L}$) on (A) FMD (10 $\mu\text{l/min}$) and (B) endothelium-dependent ACh-induced (30 $\mu\text{mol/L}$) dilation of pressurized cerebral arteries isolated from C57Bl/6 mice. Effect of TB on H_2O_2 -associated rise in fluorescence induced by (C) FMD (10 $\mu\text{l/min}$), and (D) ACh (30 $\mu\text{mol/L}$). (“n” numbers are in Table 1). *: $P < 0.05$ compared to control; †: $P < 0.05$ compared to FMD.

Table 1. Myogenic tone (MT), contraction with phenylephrine (PE; 10 or 30 $\mu\text{mol/L}$) and maximal dilation to FMD (10 $\mu\text{l/min}$) of cerebral arteries isolated from C57Bl/6 male mice. MT, PE and FMD are expressed as the percentage of the maximal diameter.

Groups	MT (%)	PE (%)	FMD (%)	N
Control conditions	8 \pm 1	40 \pm 2	25 \pm 3	13
+ L-NNA (10 $\mu\text{mol/L}$)	21 \pm 4*	46 \pm 5	11 \pm 1*	12
+ PEG-catalase (50 U/mL)	15 \pm 3*	43 \pm 3	16 \pm 1*	12
+ PEG-catalase (100 U/mL)	19 \pm 7*	46 \pm 3	10 \pm 2*	3
+ BH ₄ (1 mmol/L)	16 \pm 3*	42 \pm 4	28 \pm 3	11
+ L-arginine (5 $\mu\text{mol/L}$)	12 \pm 8	49 \pm 5	24 \pm 1	6
+ PTIO (100 $\mu\text{mol/L}$)	8 \pm 2	40 \pm 4	26 \pm 2	8
+ ODQ (1 $\mu\text{mol/L}$)	25 \pm 12*	49 \pm 4	4 \pm 2*	4
+ DT-3 (25 nmol/L)	7 \pm 2	39 \pm 6	11 \pm 1*	3
+ BH ₄ + PTIO	15 \pm 4*	39 \pm 7	20 \pm 4	5
+ BH ₄ + PEG-catalase	18 \pm 5*	45 \pm 5	26 \pm 3	6
+ BH ₄ + ODQ	12 \pm 5	45 \pm 4	7 \pm 2*	5
+ BH ₄ + L-NNA	17 \pm 4*	44 \pm 3	11 \pm 2*	4
+ BH ₄ + PTIO + PEG-catalase	21 \pm 9*	47 \pm 5	9 \pm 2*	5
+ Pyruvate (3 mmol/L)	8 \pm 2	42 \pm 3	15 \pm 2*	6
+ DETC (1 mmol/L)	15 \pm 2*	47 \pm 3	15 \pm 1*	9
+ L-NNA + indomethacin (10 $\mu\text{mol/L}$)	8 \pm 3	36 \pm 3	10 \pm 3*	5
+ PEG-catalase + PTIO	7 \pm 2	39 \pm 4	14 \pm 3*	4
+ Triciribine (TB; 1 $\mu\text{mol/L}$)	11 \pm 3	45 \pm 5	3 \pm 1*	4
+ Apocynin (10 $\mu\text{mol/L}$)	12 \pm 5	45 \pm 4	33 \pm 4	4
- Endothelium	12 \pm 5	39 \pm 9	6 \pm 1*	5

Data are expressed as mean \pm s.e.m. *: P < 0.05 compared to Control conditions.

Figure 1

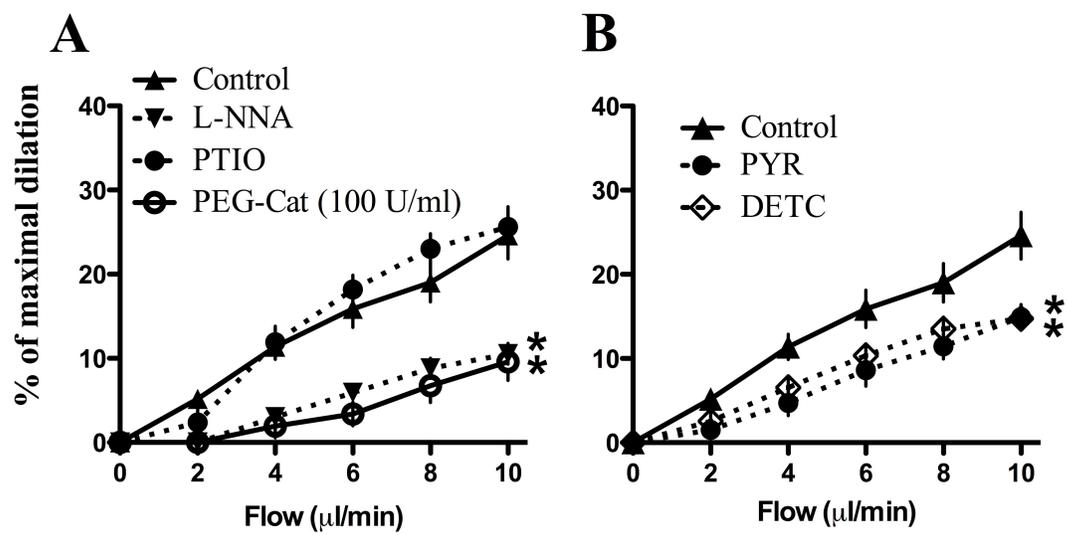


Figure 2

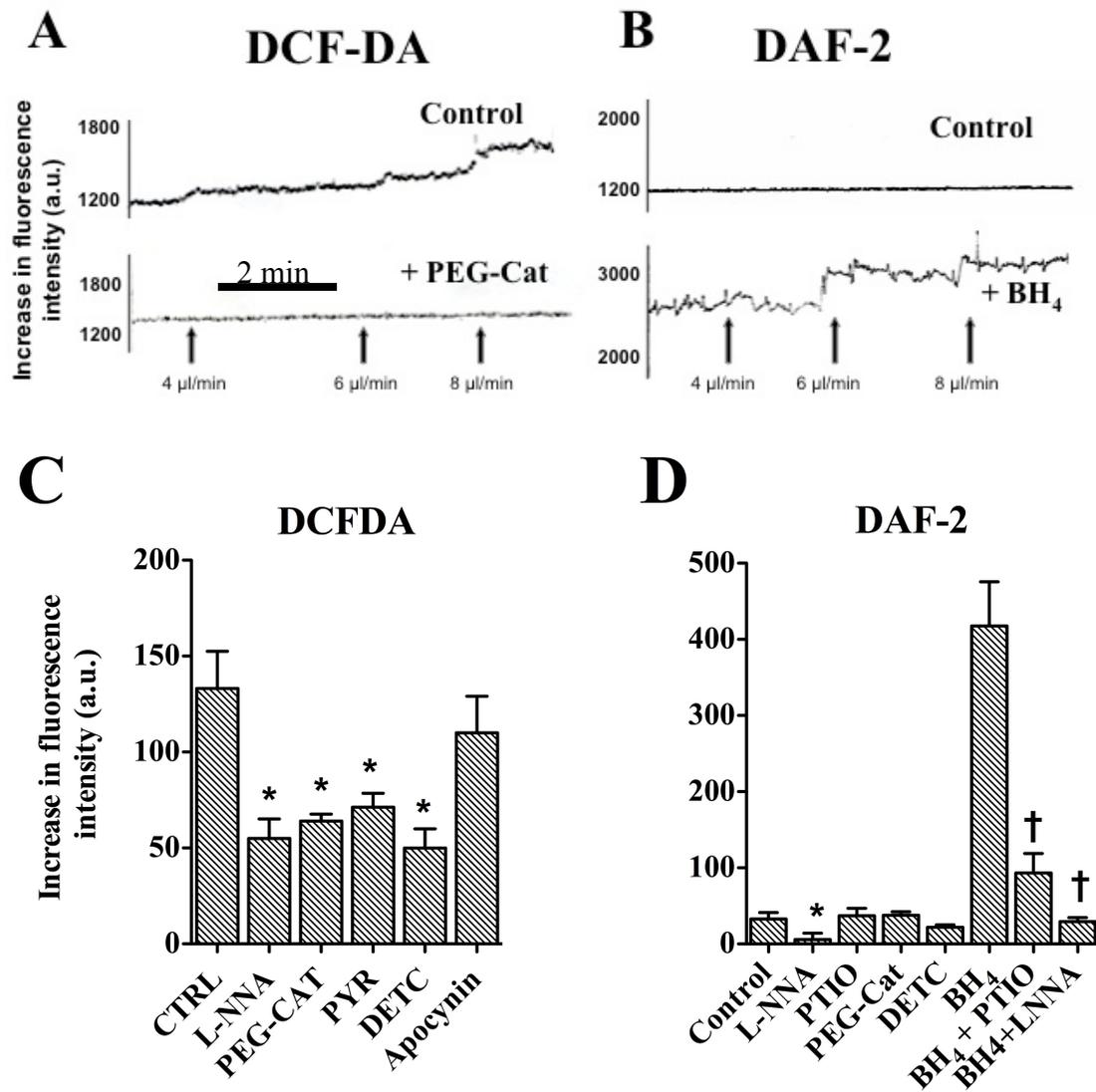


Figure 3

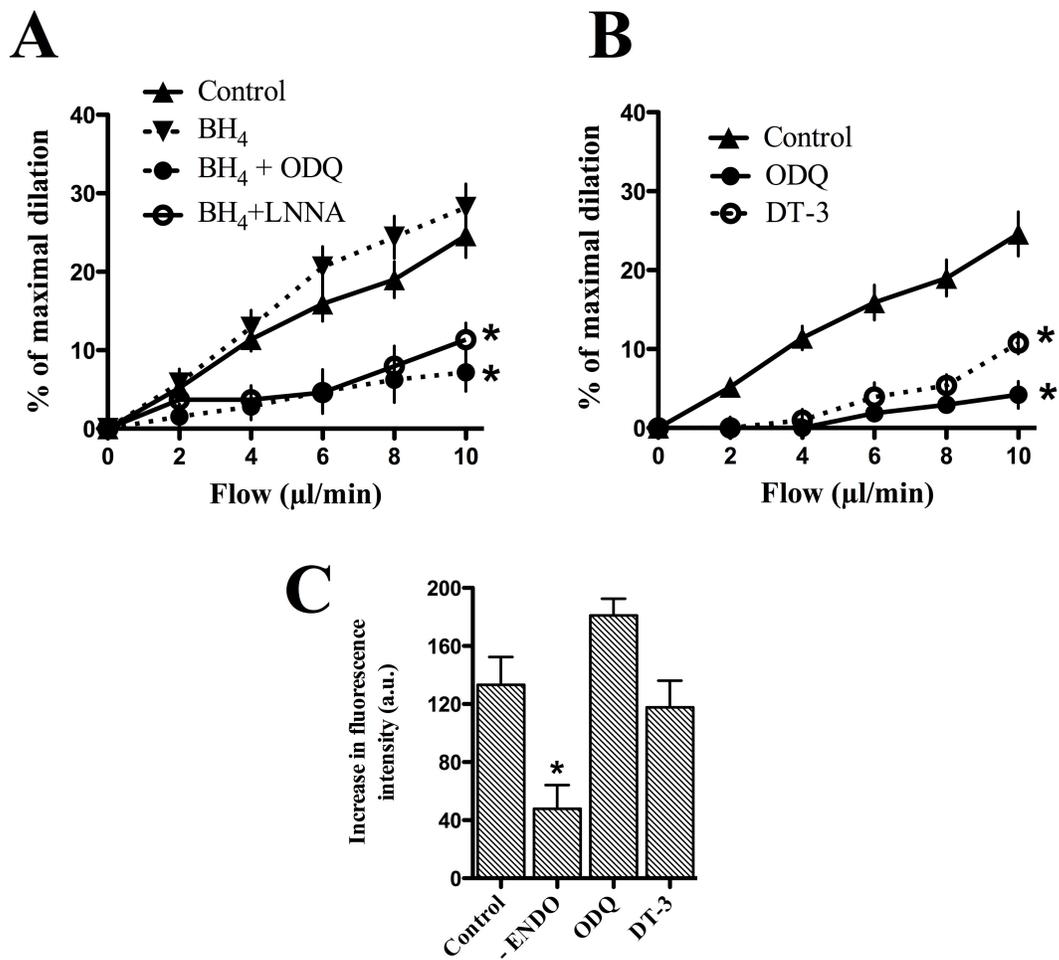


Figure 4

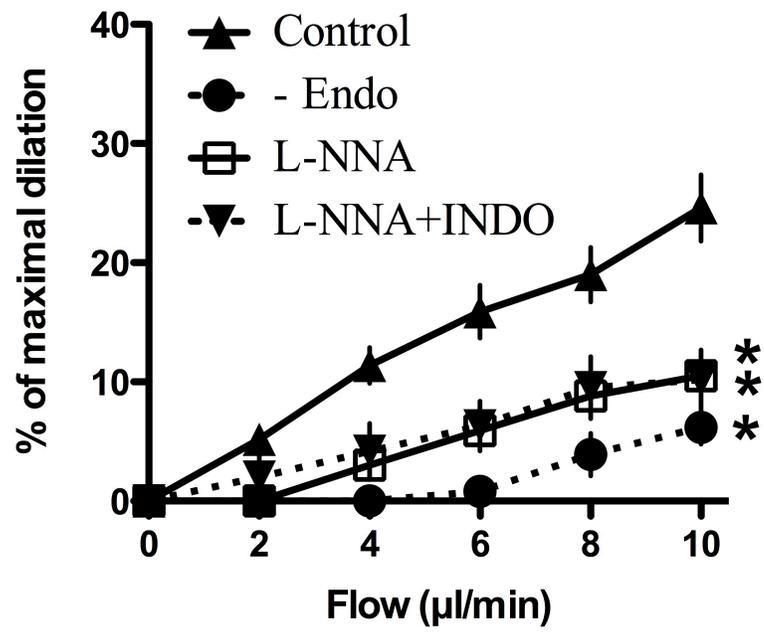
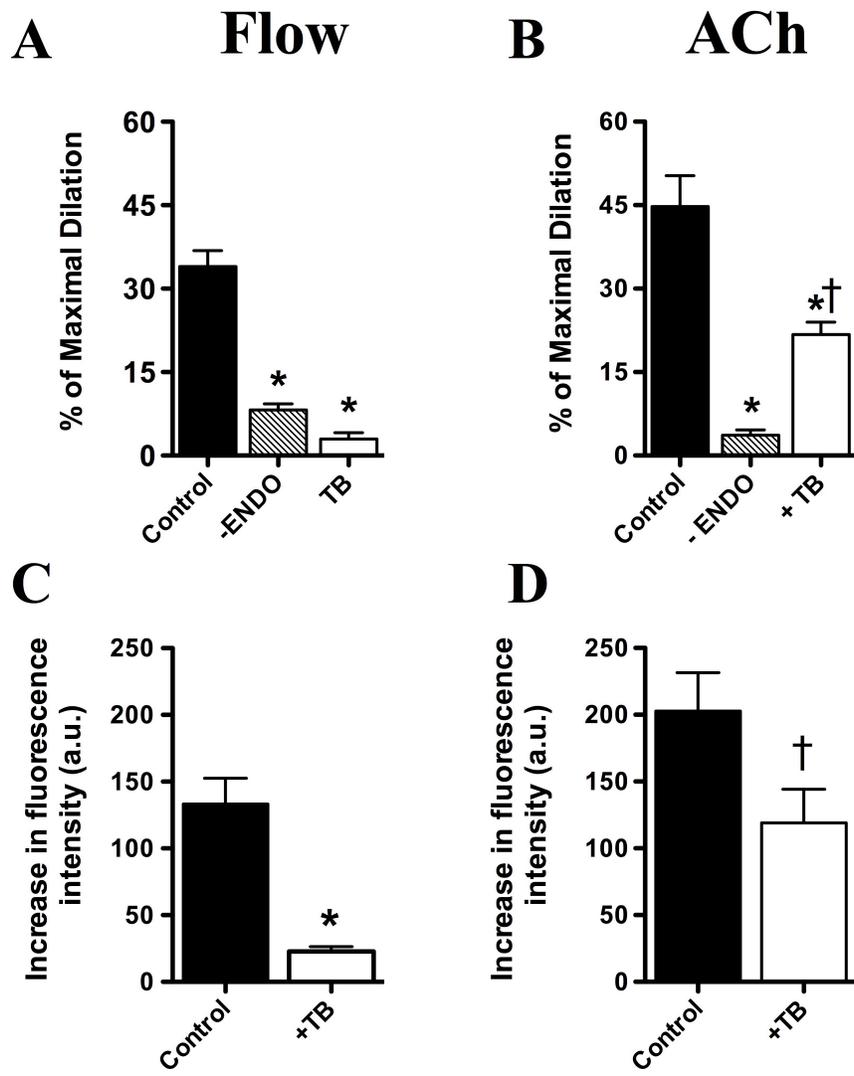


Figure 5



Étude # 2

Apport original et contribution des co-auteurs:

La contribution du premier auteur, Annick Drouin, est majeure puisqu'elle a effectué la presque totalité des expériences et elle a participé à la rédaction du manuscrit. M. Marc-Antoine Gillis a participé à l'acquisition des pressions artérielles et des paramètres hémodynamiques par la technique de «*Millard*». M. Louis Villeneuve et le Dr. Nathalie Trescases-Thorin ont participé à l'acquisition des images fluorescentes par microscopie confocale. M. Albert Nguyen a contribué à la rédaction du manuscrit. Mme Anick Fortier a effectué les analyses statistiques. Le Dr. Éric Thorin a supervisé l'étude et a contribué à la rédaction/ révision du manuscrit.

Permission de l'éditeur

1. Identification de la revue ou du livre

Cardiovascular Research, Institute of Physiology, Medical Faculty, Justus Liebig University, Aulweg 129, 35392 Giessen, Germany

2. Identification de l'éditeur ou des éditeurs

Oxford Journals

3. Identification de l'article

Ros and thromboxane A2 impair cerebrovascular endothelial function in ageing atherosclerotic mice.

Annick Drouin, Marc-Antoine Gillis, Nathalie Thorin-Trescases, Louis Villeneuve, Albert Nguyen and Eric Thorin.

Soumis au journal *Cardiovascular Research* en Février 2010

4. Accord de l'éditeur

L'étudiante, Annick Drouin, est autorisée à inclure l'article ci-dessus dans sa thèse de doctorat qui a pour titre: *Impact du stress oxydant et de l'athérosclérose sur la fonction cérébrale au cours du vieillissement.*

ROS and thromboxane A₂ impair cerebrovascular endothelial function in ageing atherosclerotic mice

Annick Drouin, Marc-Antoine Gillis, Nathalie Thorin-Trescases, Louis Villeneuve, Albert Nguyen and Eric Thorin.

Université de Montréal, Department of Surgery and Research Center, Institut de Cardiologie de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Total word count: 5 730

Total number of figures: 4

Corresponding author:

Dr. Eric Thorin, Institut de Cardiologie de Montréal, centre de recherche, 5000, rue Bélanger, Montréal, Québec, H1T 1C8, Canada. Tel.: (514) 376-3330; fax: (514) 376-1355

ROS and thromboxane A₂ impair cerebrovascular endothelial function in ageing atherosclerotic mice

Annick Drouin, Marc-Antoine Gillis, Nathalie Thorin-Trescases, Louis Villeneuve and Eric Thorin

Aims. Thromboxane (TXA₂) is a potent pro-oxidant and pro-inflammatory endogenous vasoconstrictor, which contribution to the regulation of peripheral vascular tone increases with age. This contribution is potentiated in pro-atherogenic conditions, while that of eNOS is reduced. We hypothesized that the rise in oxidative stress associated with age and severe dyslipidemia extends the negative effects of TXA₂ to the cerebral circulation.

Methods and results. Three-m/o atherosclerotic (ATX: LDLR^{-/-}ApoB^{+/+}) mice were treated with the antioxidant polyphenol catechin (30 mg/kg/day) for 9 months. C57Bl/6 (WT) mice were used as controls. Endothelium-dependent dilations (EDD) to acetylcholine (ACh) were recorded in isolated pressurized cerebral arteries. At 12-m/o, ATX mice developed systemic hypertension and aortic ROS and fatty streaks accumulated. The age-associated decrease in EDD in WT was accelerated in ATX. NOS inhibition (by L-NNA) reduced EDD in arteries from WT mice and from 3-m/o ATX, suggesting eNOS dysfunction in aged ATX mice. COX inhibition (by indomethacin; INDO) but not thromboxane synthase inhibition (by furegrelate; FUR) reduced EDD in arteries from 3-m/o WT. However, FUR and INDO improved EDD at 12-m/o in WT and in ATX mice, suggesting a progressive anti-dilatory role of TXA₂ with age and dyslipidemia. Catechin reduced blood pressure, aortic ROS and plaque area and normalized ACh-induced EDD. In catechin-treated mice, L-NNA addition reduced EDD

while FUR and INDO were inactive. This was accompanied by a reduction of 80% of serum level of TXB₂.

Conclusion. Age and oxidative stress reduce cerebral eNOS activity likely by stimulating TXA₂ production and the associated functional damages to the cardiovascular system.

Key words: COX-1/2 • Prostacyclin synthase • Thromboxane synthase • eNOS • Catechin

Introduction

Vascular endothelial dysfunction is a normal consequence of healthy ageing but it appears prematurely in chronic inflammatory diseases such as atherosclerosis, hypertension or following a stroke ^{1,2}. Endothelial dysfunction is characterized by an imbalance between endothelium-derived relaxing factors (EDRF)—nitric oxide (NO), prostacyclin and endothelium derived hyperpolarizing factors (EDHF)—and constricting factors (EDCF) such as thromboxane A₂ (TXA₂). The rise in reactive oxygen species (ROS) production associated with age and risk factors for cardiovascular diseases (CVD) leads to a reduction in NO synthesis and eNOS activity ^{3,4}. This has been clearly demonstrated in dyslipidaemic mice ⁵ and in hypertensive patients ⁶, in whom the loss of this dilatory stimulus on the arteries is consequently associated with a rise in constricting TXA₂ ⁷, partly compensated by the expression of dilatory EDHF ⁸. In hypertensive rats, aspirin reduces blood pressure and oxidative stress, possibly due to the reduction in TXA₂ production ⁹. In addition, we reported that both endogenous and exogenous TXA₂ increase ROS production in mouse arteries ¹⁰. Therefore, all these observations suggest that the rise in oxidative stress associated with risk factors for CVD inactivates NO and impairs eNOS function, promoting TXA₂ production, which further contributes to the rise in ROS and endothelial dysfunction.

In mouse cerebral arteries, eNOS, COX and EDHF are important regulators of tone in response to acetylcholine (ACh) and flow ^{11,12}. In these vessels, however, we demonstrated that eNOS stimulation leads to the production of vasodilatory H₂O₂ rather than NO ^{11,12}, as in other mouse and human arteries ^{13,14}. One would therefore expect that cerebral eNOS activity is highly sensitive to the *redox* environment. In agreement with

this hypothesis, a recent study demonstrates that sustained drinking of green tea, rich in anti-oxidant polyphenols, reduces the incidence of ischemic stroke¹⁵. The link between a cerebral eNOS dysfunction, a rise in ROS and TXA₂ has, however, not been defined.

We therefore hypothesized that in the cerebral circulation and in a pro-oxidant environment, a loss of eNOS function is associated with an increased contribution of the thromboxane synthase activity, perpetuating the vicious circle of oxidative stress and worsening the endothelial dysfunction. To validate this hypothesis, chronic treatment with the antioxidant polyphenol catechin and acute TXA₂ synthase inhibition were used on cerebral arteries of severely dyslipidaemic mice. The results support the concept that with dyslipidaemia and atherosclerosis, eNOS dysfunction mirrors the rise in thromboxane synthase activity, promoting cerebral endothelial dysfunction.

Materials and methods

Animals and tissues preparation. The procedures and protocols were performed in accordance with our institutional guidelines and the *National Institutes of Health (NIH) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. We used 3- and 12-month old (m/o) C57Bl/6 male mice (WT, 29 ± 1 g and 46 ± 3 g, respectively, $n=20$, Charles River Laboratories, St-Constant, Qc, Canada) and atherosclerotic mice (ATX, 25 ± 1 g and 39 ± 2 g respectively, $n=20$). ATX mice are knockout for the LDL receptor but express the human apolipoprotein B-100 gene (LDLR^{-/-} hApoB^{+/+} ¹⁶) and were generously provided by Dr. Hobbs (University of Texas Southwestern, Dallas, TX, USA). An additional group of ATX mice received an antioxidant treatment during 9 months (from 3- to 12-m/o, $n=20$), *i.e.* catechin in the drinking water (ATX+CAT; 30 mg/kg/day).

Systemic pressure and serum parameters. At the age of 3 and 12 months, mice were sacrificed by exsanguination under deep anesthesia (isoflurane) after monitoring heart rate (HR) and blood pressure using a Millar catheter inserted into the left carotid artery. Serum was collected from blood sample and frozen at -80°C . Total cholesterol, LDL and triglycerides were measured in the hospital biochemical laboratory ⁵. Serum levels of the stable metabolite of TXA₂ (11-dehydro-thromboxane B₂) were quantified using an ELISA according to the protocol provided by the manufacturer (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI).

Reactivity studies. The brain was rapidly removed from the cranial cavity and placed in ice-cold physiological salt solution (PSS) of the following composition (mmol/L): NaCl

130, KCl 4.7, CaCl₂ 1.6, MgSO₄ 1.17, NaHCO₃ 14.9, KH₂PO₄ 1.18, EDTA 0.026, glucose 10. Cerebral arteries were isolated, cannulated at both ends and pressurized at 60 mm Hg in no-flow condition (average internal diameter of 136±2 µm; n=60) in PSS oxygenated by a gas mixture containing 12% O₂, 5% CO₂ and 83% of N₂, generating a pO₂ of 150±10 mm Hg, as previously described^{11, 12}. An equilibration period of 40 min was allowed before starting the experiments, period during which myogenic tone develops. In order to obtain a similar pre-constriction level in all the arteries tested (from 40-50%), the vessels were contracted with phenylephrine (PE; 10 to 30 µmol/L). Then, a single cumulative concentration-response curve to acetylcholine (ACh; 1 nmol/L to 30 µmol/L) was performed on each segment. We used (1) *N*^w-nitro-L-arginine (L-NNA; 10 µmol/L) a NOS inhibitor; (2) indomethacin (INDO; 10 µmol/L) a COX inhibitor, (3) furegrelate (FUR; 10 µmol/L) a thromboxane synthase inhibitor, and (4) apocynin (APO; 10µmol/L), a NADP(H) oxidase inhibitor. PE, ACh INDO, FUR, APO and L-NNA were purchased from Sigma-Aldrich Canada Ltd. (Oakville, Ontario, Canada).

Fluorescent measurement of H₂O₂. We previously demonstrated that in mouse cerebral arteries, ACh-induced dilation is mediated by eNOS-derived H₂O₂^{11, 12}, and we reported the method to measure simultaneously the dilation and the production of H₂O₂, using a fluorescent probe, the 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate acetyl ester (DCF-DA, Molecular Probe, OR, U.S.A.) . In our model, DCF-DA is specific for H₂O₂^{11, 12}. Pressurized cerebral arteries were incubated in oxygenated PSS (37°C) containing 5 µmol/L of DCF-DA. After 30-40 min equilibration time, vessels were washed with PSS, pre-constricted with PE and dilated with ACh while recording

simultaneously the changes in diameter and in fluorescence intensities of H₂O₂-dichlorofluorescein retained intracellularly after cleavage of the acetate moieties. Fluorescence intensities (I_{Ex} 492-495 nm) were measured at 520 nm with an IonOptix Acquire system (IonOptix, MA, U.S.A.). Before each experiment, basal fluorescence intensity was recorded. Results represent differences between stimulated and basal intensity.

Western blots. Whole brain vessels were isolated as previously described¹⁷. Briefly, two brains from each group were pooled, homogenized with a loosely fitting Dounce tissue grinder in ice-cold 0.01 M (pH 7.4) PBS, and centrifuged at 3,500 rpm for 5 min at 4°C. The pellet was then suspended in PBS, gently layered over 15% dextran (molecular mass, 43 kDa) solution and finally centrifuged at 5,000 rpm for 30 min at 4°C. Pellets containing blood vessels were collected over a 50- μ m nylon mesh. Proteins were isolated from the vessels following 30 min incubation in a lysis buffer of the following composition (mmol/L): 50 Tris-HCl, 20 β -glycerophosphate, 20 NaF, 5 EDTA, 10 EGTA, 1 Na₃VO₄, 10 benzamidin, 5 dithiothreitol, 0.5 PMSF, 0.02 leupeptin, 1 microcystin LR, and 1% (v/v) Triton X-100. For Western blot analysis, proteins (50 μ g/lane) were subjected to SDS-PAGE, using a discontinuous buffer system (Laemmli), in 10-20% gradient acrylamide gels and transferred to nitrocellulose. Blots were incubated with the primary antibodies [rabbit polyclonal anti-endothelial NOS (eNOS), 1:200, BD Transduction Laboratories, Franklin Lakes, NJ, USA; rabbit polyclonal anti-inducible NOS (iNOS), 1: 1000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; rabbit-polyclonal anti-COX-1, 1:1000, Cayman Chemical, Arbor, MI, USA; rabbit-polyclonal

anti-COX-2, 1:1000, Cayman Chemical, Arbor, MI, USA; goat-polyclonal anti-PGI₂ synthase, 1:200, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA]. Equal protein loading was established with GAPDH (mouse polyclonal anti-GAPDH, 1:100 000, Abcam, Cambridge, MA, USA).

Plaques area quantification. Thoracic aortas were removed from the mice and carefully dissected from surrounding tissues. The vessels were opened, pinned and a picture was taken. Plaque area quantification was calculated with Photoshop software and expressed in percentage of total aorta area.

Quantification of superoxide production. Concomitant with aortic plaque quantification, the oxidative putrescent probe dihydroethidium (DHE; Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, ON, Canada) was used to evaluate *in situ* superoxide (O₂⁻) production on aorta sections¹⁸. DHE is a cell permeable dye that is oxidized by O₂⁻ to ethidium bromide, which subsequently intercalates with DNA and is trapped within cell nuclei. DNA counterstaining was performed using ToPro-3 (Molecular Probe, Burlington, ON, Canada). Unfixed frozen aorta segments were cut into 20- μ m thick sections. Sections were double stained with a mixture of 5 μ mol/L DHE and 2 μ mol/L To-Pro 3. Sections were incubated in a light-protected chamber at 37°C for 15 min, washed with PBS, mounted on positively charged slides (Fisher Scientific, Ottawa, Ontario, Canada) and antifading medium. Fluorescence was visualized using a scanning confocal microscope LMS 510 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) with a 40x/1.4 Plan-Apochromat objective (λ_{Ex} 490 nm, λ_{Em} 520 nm). Acquisition settings of the camera were identical for all

images. Computer-based analysis was performed using Image J software and calculated by the following equation: $I = \sum I / (A/N)$, where I is the fluorescence intensity, $\sum I$ is the summation of all nuclei intensity, A is the total area of the nuclei and N is the number of positive nuclei. Data are expressed as an average of total nuclei fluorescence.

Statistics. « n » refers to the number of animals used in each protocol. Continuous variables are expressed as means \pm standard error of the mean (SEM). The maximal diameter (D_{\max}) was determined by changing the PSS to a Ca^{2+} -free PSS^{11, 12}. Myogenic tone and dilations were expressed as percentage of the D_{\max} . The effect of age and atherosclerosis on the different parameters used in this paper was studied using two-way ANOVA. Paired signed rank test was performed to study the effects of L-NNA, FUR, APO and INDO on ACh-induced dilations, MT and fluorescence increase. The effect of catechin treatment was evaluated by Mann-Whitney/Wilcoxon test. The results were considered to be statistically significant when the P value was <0.05 .

Results

Heart rate and blood pressure

HR was not affected by ageing in WT but it tended to decrease ($p=0.06$) in 12-m/o ATX mice (Table 1). Arterial blood pressure increased with age in both WT and ATX mice. At 3 months, however, ATX mice were already hypertensive compared to WT mice (Table 1). Catechin maintained blood pressure to values measured in 3-m/o WT, without affecting HR at 12 months (Table 1).

Serum parameters

ATX mice are severely dyslipidaemic at both 3 and 12 months of age, compared to WT mice (Table 1), and catechin did not affect cholesterol and triglycerides levels (Table 1). Serum thromboxane B₂ (the stable metabolite of TXA₂) levels were unaffected by age or dyslipidaemia (Table 1). Following catechin treatment, however, TXB₂ levels were reduced by 80% in the serum of ATX mice (Table 1).

Plaque area and superoxide production

WT mice did not develop atherosclerotic plaque with age, in contrast to ATX mice (Fig. 1A and B). Catechin significantly reduced plaque formation by 35% (Fig. 1A and B). Superoxide production, assessed by DHE staining, was significantly higher in 12-m/o compared to 3-m/o WT (Fig. 1C). DHE staining was already greater at 3 months in ATX than in WT mice and increased further with age. Catechin normalized superoxide production in 12-m/o ATX mice to 3-m/o WT values (Fig. 1C).

Myogenic tone response

The physiological response of resistance arteries to a rise in intraluminal pressure is an increase in myogenic tone (MT), i.e. a reduction in diameter. The MT of cerebral arteries induced by a pressure of 60 mm Hg was greater in ATX than WT mice at both ages while ageing alone had no effect (Table 2). L-NNA increased MT in cerebral arteries isolated from WT mice only, suggesting an impaired resting eNOS function in ATX mice (Table 2). The increased MT in arteries isolated from ATX was eliminated by INDO or FUR addition, while these agents had no effect on MT in WT mice, suggesting a role for TXA₂ in ATX. At the end of the 9-month treatment period with catechin, MT of vessels isolated from ATX mice was normalized to WT values, sensitive to L-NNA, but unaffected by INDO or FUR (Table 2), suggesting the reversal by the antioxidant of eNOS dysfunction and the role of TXA₂.

Endothelial function

In arteries isolated from 3-m/o WT mice, endothelium-dependent dilations (EDD) induced by ACh were equally reduced in the presence of L-NNA or INDO, while FUR had no effect (Fig. 2). EDD were lower in vessels isolated from 3-m/o ATX mice compared to 3-m/o WT. In addition, L-NNA further reduced EDD, while both INDO and FUR increased EDD to 3-m/o WT level (Fig. 2). With age, EDD decreased by ≈50% in arteries from WT mice and were almost abolished in ATX (Fig. 2). L-NNA only reduced EDD from arteries of aged WT mice. In both groups of aged mice, however, both INDO and FUR improved EDD. Catechin prevented the further decline in EDD with age in ATX

mice, restored the inhibitory effect of L-NNA and eliminated the effects of INDO and FUR (Fig. 2).

eNOS-derived H₂O₂ production

We recently demonstrated¹² that eNOS-derived H₂O₂ production is a key EDRF in young and healthy mouse cerebral arteries. We therefore investigated eNOS function by simultaneous recording of H₂O₂ production and ACh-mediated dilation. Concomitant with a lower ACh-induced dilation, H₂O₂ production was reduced in 12 m/o WT mice and in 3 and 12 m/o ATX mice when compared to 3 m/o WT mice (Fig. 3). Similarly to the dilatory responses, the inhibition of H₂O₂ production induced by L-NNA was lowered in 12-m/o WT and in 3-m/o ATX mice when compared to 3-m/o WT, revealing a premature eNOS dysfunction in ATX mice (Fig. 3). In arteries isolated from 12-m/o WT and 3-m/o ATX mice, COX inhibition restored eNOS function as demonstrated by the increase in H₂O₂-associated fluorescence in the presence of INDO. This improvement was specific to eNOS since the combination of INDO plus L-NNA prevented the rise in H₂O₂-associated fluorescence induced by ACh in the arteries of these mice.

eNOS function was abolished in 12-m/o ATX mice since the H₂O₂-associated fluorescence signal induced by ACh was unaffected by L-NNA (Fig. 3). Neither INDO and L-NNA, nor their combination, altered the signal. Therefore, the rise in H₂O₂-associated fluorescence induced by ACh was not associated with an activation of eNOS; it was, however, abolished by apocynin (APO), a NADP(H) oxidase inhibitor, while APO had no effects in the other groups (Fig. 3).

Following the treatment with catechin, eNOS function was restored, in accordance with the dilatory responses presented in Fig. 2: the increase in H₂O₂-associated fluorescence induced by ACh was abolished by L-NNA (Fig. 3). Furthermore, neither INDO nor APO affected the fluorescent signals in arteries isolated from catechin-treated mice (Fig. 3).

Proteins expression

Both COX-1 and COX-2 protein expressions were higher at 3 months in ATX than WT mice (Fig. 4). With age, COX-1 and COX-2 expression rose in WT mice and further in ATX mice (Fig. 4A and B). Catechin tended to prevent the expression of COX-1 (Fig. 4A), while it tended to normalize to 3-m/o ATX level ($p=0.06$) the rise in COX-2 expression (Fig. 4B). PGI₂ synthase protein expression decreased in ATX but was not significantly reduced with ageing (Fig. 4C). Catechin treatment did not reverse PGI₂ synthase protein level. Age, ATX and catechin did not affect the expression of iNOS and eNOS protein (data not shown).

Discussion

Premature age-related endothelial dysfunction develops with chronic inflammatory cardiovascular diseases. Because of the central regulatory role of the endothelium on the maintenance of the arterial wall integrity¹, understanding the origin of the declining endothelial function is of tremendous clinical interest. In the present study, we demonstrate that the age- and oxidative stress-related cerebral endothelial dysfunction in WT mice occurs prematurely in ATX mice due to a reduction in eNOS activity and a rise in TXA₂. This is accompanied by severe atheroma and hypertension. Our data demonstrate that chronic preventive catechin treatment, a dietary polyphenol, prevents the cerebral endothelial eNOS dysfunction associated with severe dyslipidemia, reduces plaque size, ROS formation and normalizes blood pressure.

The normal function of eNOS generates dilatory H₂O₂ in mouse cerebral arteries in response to ACh¹². In the present study, in young WT mice, INDO but not FUR decreased the dilation as much as eNOS inhibition, the remaining of the dilation being EDHF-dependent. This is in accordance with the involvement of eNOS, prostacyclin and EDHF, three dilatory endothelial factors, in the response to ACh¹² and tone regulation. With age, they vanish one after the other, starting with prostacyclin, followed by the EDHF and finally eNOS activity¹⁹. In cerebral arteries of 12-m/o WT mice, eNOS associated dilation and H₂O₂ release are reduced by ≈50%. PGI₂ synthase protein levels were decreased (fig. 4C) while INDO and FUR restored the normal dilatation. This suggests that, with age, in the cerebral arteries, prostacyclin is absent and TXA₂ dominates. The increased oxidative stress in ATX could accelerate the endothelial

dysfunction. In cerebral vessel isolated from 3-m/o ATX, the amplitude of the dilation associated with eNOS-derived H_2O_2 was also reduced by $\approx 50\%$, both INDO and FUR addition restore the dilation and eNOS activity while PGI_2 synthase expression was very low. In cerebral arteries from 3-m/o ATX, inhibition of eNOS by L-NNA leaves a small but significant dilatation, likely EDHF, a component that has vanished in 12-m/o WT mice.

This early, reversible cerebral endothelial dysfunction observed in 3-m/o ATX is indeed in sharp contrast with the almost complete loss of ACh-induced EDD in arteries isolated from 12-m/o ATX mice. In these arteries, INDO and FUR only slightly improve EDD to ACh, the production of H_2O_2 becomes insensitive to L-NNA, and is not recovered in the presence of INDO, suggesting that with age irreversible damages appears. Interestingly, the rise in eNOS-derived H_2O_2 was abolished by APO, suggesting that in cerebral arteries isolated from 12-m/o ATX mice (unlike in any other groups), the NADP(H) oxidase is activated and ROS are generated. It has been shown that NADP(H) oxidase was partly responsible for flow-mediated dilation in rat brain arteries *in vivo*²⁰, a mechanism absent in isolated mouse cerebral arteries¹¹. Therefore, our present data are the first to demonstrate that ACh-induced EDD in cerebral arteries of ATX mice evolve from being dependent on eNOS to NADP(H) oxidase activity.

This switch from eNOS to NADP(H) oxidase in aging ATX mice must contribute to the change in the *redox* environment. It has been shown that aging limits the ability of antioxidant enzymes to up-regulate in response to an acute and short term pro-atherogenic

challenge²¹. In our experimental conditions, however, this unbalance towards pro-oxidation was likely the result of a long-term pro-atherogenic stimulus leading to chronic damage. This, was completely reversed by chronic preventive antioxidant treatment with catechin, a scavenger of superoxide anions²². Beneficial effect of catechin was associated with reduces aortic plaque formation, superoxide production and prevented hypertension in ATX mice. The antioxidant treatment preserved ACh-induced EDD to the level of arteries isolated from age-matched WT. This was associated with the prevention of eNOS dysfunction and a lack of NADP(H) oxidase involvement. There are numerous reports showing that antioxidants preserve or improve eNOS function either directly or by increasing NO bio-availability, and reduce the development of atherosclerosis and inflammation²³⁻²⁸. Catechin treatment did not change iNOS or eNOS protein expression in cerebral arteries (data not shown), but preserved eNOS activity. The acute inhibitory effects of ROS on eNOS dilatory efficacy is well accepted and has been demonstrated in patients with hypertension⁶ and atherosclerosis^{29,30}.

In cerebral arteries, INDO reduced EDD in 3-m/o WT while it increased EDD in 3-m/o ATX and 12-m/o WT, suggesting the involvement of PGI₂ in EDD from 3-m/o WT but not in 12-m/o WT or 3-m/o ATX. Furthermore, FUR had no effect on EDD of 3-m/o WT but restored EDD in 3-m/o ATX and 12-m/o WT. This suggests that with age and ATX, COX activity leads to TXA₂ production rather than prostacyclin. Previous studies suggest that TXA₂ production not only competes with but also lowers eNOS activity *via* an increase in ROS following receptor activation^{10,31}. In our hands, cerebral arteries isolated from 3-m/o ATX and 12-m/o WT exhibited endothelial dysfunction. Prevention of TXA₂

release with INDO or FUR improved EDD function in 3-m/o ATX and 12-m/o WT. The acute reduction of TXA₂ release with FUR is sufficient to restore eNOS-derived H₂O₂ production in 3-m/o ATX and 12-m/o WT. A decrease in ROS production associated with reduced TXA₂ could protect eNOS function and, thus, rescues endothelial function¹⁰. The only discordance between the aged WT and young ATX mice concerns the resting activity of eNOS evaluated by the measurement of MT. MT was increased by L-NNA, but insensitive to INDO and FUR at both ages in WT mice. However, MT is already maximal in 3-m/o ATX mice and is normalized by INDO and FUR, but unaffected by L-NNA, suggesting basal eNOS activity dysfunction in these mice. Thus, in dyslipidemic mice, the impact of TXA₂ on the regulation of basal vascular diameter is likely already maximal. We propose that with age, TXA₂ and ROS production could induce damages that cannot be reversed acutely¹.

In 12-m/o ATX, FUR increased EDD and reduced MT, suggesting a major role for TXA₂ in these arteries. The effect of FUR was similar to the effect of catechin, reinforcing the concept of TXA₂-dependent ROS release. Catechin preserved eNOS function and likely prevented the increase in TXA₂ production *via* its antioxidant effect. In agreement with these molecular changes in eNOS function and TXA₂ production, the evolution of the atheroma plaque was slowed by catechin, although dyslipidemia was not affected. Beneficial effect of catechin was associated with a normalization of COX-1 protein expression to the level of 3-m/o WT, suggesting that oxidative stress, but not age, was responsible for this rise. Furthermore, catechin also limited the expression of COX-2, but not the age-dependent rise in its expression. It has been reported that catechin could

reduce the expression of COX-2 in prostate carcinoma and dendritic cells^{32,33}. Together, these results suggest that the rise in COX protein associated with oxidative stress can be prevented by early catechin treatment in mice. In ATX mice, the reduction in COX expression by catechin was not selective to one isoform and was accompanied by a strong reduction in serum TXB₂ levels. The increase in serum TXB₂ was increased by oxidative stress but insensitive to ageing. Because TXA₂ is a potent vasoconstrictor and increases oxidative stress¹⁰, we would like to propose that these effects of catechin could contribute, together with the maintained eNOS function, to the reduction in blood pressure in catechin-treated ATX mice. In pre-hypertensive rat, chronic aspirin treatment has been shown to reduce oxidative stress and to limit the rise in blood pressure with time⁹.

In conclusion, in our model of severe human dyslipidemia, aging leads to atherosclerosis and cerebral dysfunction. Catechin, used in prevention, slowed the progression of atherosclerosis and the associated hypertension. These antioxidant effects were associated with a reduction in the role of the TXA₂ pathway and a protection of the cerebrovascular endothelial eNOS function.

Sources of Funding

This work was supported in part by the Foundation of the Montreal Heart Institute, the Heart and Stroke Foundation of Quebec and the Canadian Institutes of Health Research (MOP87388). A. Drouin holds the *Frederick Banting and Charles Best Canada Graduate Scholarships - Doctoral Award* in association with the Canadian Institutes of Health Research.

Conflict of Interest

None declared.

References

1. Thorin E, Thorin-Trescases N. Vascular endothelial ageing, heartbeat after heartbeat. *Cardiovasc Res*. 2009;**84**:24-32.
2. Thomas SR, Chen K, Keane JF, Jr. Oxidative stress and endothelial nitric oxide bioactivity. *Antioxid Redox Signal*. 2003;**5**:181-194.
3. Schulz E, Anter E, Keane JF, Jr. Oxidative stress, antioxidants, and endothelial function. *Curr Med Chem*. 2004;**11**:1093-1104.
4. Napoli C, Ignarro LJ. Nitric oxide and atherosclerosis. *Nitric Oxide*. 2001;**5**:88-97.
5. Gendron ME, Thorin-Trescases N, Villeneuve L, Thorin E. Aging associated with mild dyslipidemia reveals that cox-2 preserves dilation despite endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;**292**:H451-458.
6. Taddei S, Viridis A, Ghiadoni L, Magagna A, Salvetti A. Vitamin c improves endothelium-dependent vasodilation by restoring nitric oxide activity in essential hypertension. *Circulation*. 1998;**97**:2222-2229.
7. Taddei S, Viridis A, Ghiadoni L, Magagna A, Salvetti A. Cyclooxygenase inhibition restores nitric oxide activity in essential hypertension. *Hypertension*. 1997;**29**:274-279.
8. Taddei S, Versari D, Cipriano A, Ghiadoni L, Galetta F, Franzoni F, Magagna A, Viridis A, Salvetti A. Identification of a cytochrome p450 2c9-derived endothelium-derived hyperpolarizing factor in essential hypertensive patients. *J Am Coll Cardiol*. 2006;**48**:508-515.
9. Wu R, Lamontagne D, de Champlain J. Antioxidative properties of acetylsalicylic acid on vascular tissues from normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Circulation*. 2002;**105**:387-392.
10. Gendron ME, Thorin E. A change in the redox environment and thromboxane a2 production precede endothelial dysfunction in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;**293**:H2508-2515.
11. Drouin A, Thorin E. Flow-induced dilation is mediated by akt-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase-derived hydrogen peroxide in mouse cerebral arteries. *Stroke*. 2009;**40**:1827-1833.

12. Drouin A, Thorin-Trescases N, Hamel E, Falck JR, Thorin E. Endothelial nitric oxide synthase activation leads to dilatatory h₂O₂ production in mouse cerebral arteries. *Cardiovasc Res*. 2007;**73**:73-81.
13. Matoba T, Shimokawa H. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in animals and humans. *J Pharmacol Sci*. 2003;**92**:1-6.
14. Miura H, Bosnjak JJ, Ning G, Saito T, Miura M, Gutterman DD. Role for hydrogen peroxide in flow-induced dilation of human coronary arterioles. *Circ Res*. 2003;**92**:e31-40.
15. Liang W, Lee AH, Binns CW, Huang R, Hu D, Zhou Q. Tea consumption and ischemic stroke risk: A case-control study in southern china. *Stroke*. 2009;**40**:2480-2485.
16. Sanan DA, Newland DL, Tao R, Marcovina S, Wang J, Mooser V, Hammer RE, Hobbs HH. Low density lipoprotein receptor-negative mice expressing human apolipoprotein b-100 develop complex atherosclerotic lesions on a chow diet: No accentuation by apolipoprotein(a). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;**95**:4544-4549.
17. Li X, Geary GG, Gonzales RJ, Krause DN, Duckles SP. Effect of estrogen on cerebrovascular prostaglandins is amplified in mice with dysfunctional nos. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;**287**:H588-594.
18. Lauzier B, Sicard P, Bouchot O, Delemasure S, Menetrier F, Moreau D, Vergely C, Rochette L. After four hours of cold ischemia and cardioplegic protocol, the heart can still be rescued with postconditioning. *Transplantation*. 2007;**84**:1474-1482.
19. Krummen S, Drouin A, Gendron ME, Falck JR, Thorin E. Ros-sensitive cytochrome p450 activity maintains endothelial dilatation in ageing but is transitory in dyslipidaemic mice. *Br J Pharmacol*. 2006;**147**:897-904.
20. Paravicini TM, Miller AA, Drummond GR, Sobey CG. Flow-induced cerebral vasodilatation in vivo involves activation of phosphatidylinositol-3 kinase, nadph-oxidase, and nitric oxide synthase. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2006;**26**:836-845.
21. Collins AR, Lyon CJ, Xia X, Liu JZ, Tangirala RK, Yin F, Boyadjian R, Bikineyeva A, Pratico D, Harrison DG, Hsueh WA. Age-accelerated

- atherosclerosis correlates with failure to upregulate antioxidant genes. *Circ Res.* 2009;**104**:e42-54.
22. Robak J, Gryglewski RJ. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem Pharmacol.* 1988;**37**:837-841.
 23. Zhang WJ, Bird KE, McMillen TS, LeBoeuf RC, Hagen TM, Frei B. Dietary alpha-lipoic acid supplementation inhibits atherosclerotic lesion development in apolipoprotein e-deficient and apolipoprotein e/low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation.* 2008;**117**:421-428.
 24. Lorenz M, Wessler S, Follmann E, Michaelis W, Dusterhoft T, Baumann G, Stangl K, Stangl V. A constituent of green tea, epigallocatechin-3-gallate, activates endothelial nitric oxide synthase by a phosphatidylinositol-3-oh-kinase-, camp-dependent protein kinase-, and akt-dependent pathway and leads to endothelial-dependent vasorelaxation. *J Biol Chem.* 2004;**279**:6190-6195.
 25. Ludwig A, Lorenz M, Grimbo N, Steinle F, Meiners S, Bartsch C, Stangl K, Baumann G, Stangl V. The tea flavonoid epigallocatechin-3-gallate reduces cytokine-induced vcam-1 expression and monocyte adhesion to endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;**316**:659-665.
 26. Leikert JF, Rathel TR, Wohlfart P, Cheynier V, Vollmar AM, Dirsch VM. Red wine polyphenols enhance endothelial nitric oxide synthase expression and subsequent nitric oxide release from endothelial cells. *Circulation.* 2002;**106**:1614-1617.
 27. Hayek T, Fuhrman B, Vaya J, Rosenblat M, Belinky P, Coleman R, Elis A, Aviram M. Reduced progression of atherosclerosis in apolipoprotein e-deficient mice following consumption of red wine, or its polyphenols quercetin or catechin, is associated with reduced susceptibility of ldl to oxidation and aggregation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;**17**:2744-2752.
 28. Crawford RS, Kirk EA, Rosenfeld ME, LeBoeuf RC, Chait A. Dietary antioxidants inhibit development of fatty streak lesions in the ldl receptor-deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;**18**:1506-1513.

29. Heitzer T, Yla Herttuala S, Wild E, Luoma J, Drexler H. Effect of vitamin e on endothelial vasodilator function in patients with hypercholesterolemia, chronic smoking or both. *J Am Coll Cardiol*. 1999;**33**:499-505.
30. Motoyama T, Kawano H, Kugiyama K, Hirashima O, Ohgushi M, Tsunoda R, Moriyama Y, Miyao Y, Yoshimura M, Ogawa H, Yasue H. Vitamin e administration improves impairment of endothelium-dependent vasodilation in patients with coronary spastic angina. *J Am Coll Cardiol*. 1998;**32**:1672-1679.
31. Neppl RL, Lubomirov LT, Momotani K, Pfitzer G, Eto M, Somlyo AV. Thromboxane a₂-induced bi-directional regulation of cerebral arterial tone. *J Biol Chem*. 2009;**284**:6348-6360.
32. Hussain T, Gupta S, Adhami VM, Mukhtar H. Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate selectively inhibits cox-2 without affecting cox-1 expression in human prostate carcinoma cells. *Int J Cancer*. 2005;**113**:660-669.
33. Jeong YI, Jung ID, Lee JS, Lee CM, Lee JD, Park YM. (-)-epigallocatechin gallate suppresses indoleamine 2,3-dioxygenase expression in murine dendritic cells: Evidences for the cox-2 and stat1 as potential targets. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;**354**:1004-1009.

Figure Legends

Figure 1. (A) Effect of 9-months catechin treatment on the plaque area of mice aorta (n=6). (B) Representative picture of the aorta of 12 m/o WT; 12 m/o ATX and 12 m/o ATX treated for 9 months with catechin (ATX+CAT). (C) Effect of 9-months catechin treatment on aortic superoxide production quantified by DHE staining (n=4). *p<0.05 versus 3-m/o WT; †p<0.05 versus 12-m/o WT; ‡p<0.05 versus 3-m/o ATX; § p<0.05 versus 12-m/o ATX.

Figure 2. ACh-induced dilations of mice cerebral arteries. Effect of *N*-nitro-*L*-arginine (L-NNA; 10 µmol/L), indomethacin (INDO; 10 µmol/L), furegrelate (FUR; 10 µmol/L) and catechin treatment for 9 months (ATX+CAT) on EDD in mice cerebral arteries of 3 and 12 m/o WT and 3 and 12 m/o ATX mice (n=6 to 8). *p<0.05 versus control; †p<0.05 versus 3-m/o WT; ‡p<0.05 versus 3-m/o ATX; § p<0.05 versus 12-m/o WT; || p<0.05 versus 12-m/o ATX.

Figure 3. Effect of ageing and catechin (CAT) treatment on DCFDA-associated fluorescence increase (arbitrary units, a.u.) following ACh stimulation (30 µmol/L). Effect of *N*-nitro-*L*-arginine (L-NNA; 10 µmol/L), indomethacin (INDO; 10 µmol/L) or apocynin (APO; 10 µmol/L) on the fluorescent signal in mice cerebral arteries (n=6 to 8). *p<0.05 versus control; †p<0.05 versus INDO; ‡p<0.05 versus 3-m/o WT; § p<0.05 versus 12-m/o ATX.

Figure 4. Effect of ageing and catechin (CAT) treatment on whole brain vessels protein expression of (A) COX-1, (B) COX-2 and (C) PGI₂ synthase of wild-type (WT) and atherosclerotic (ATX) mice. COX expressions are normalized to GAPDH protein expression (n=3). *p<0.05 versus 3-m/o WT; †p<0.05 versus 3-m/o ATX; ‡p<0.05 versus 12-m/o WT.

Table 1. Effect of ageing and catechin treatment on hemodynamic parameters and serum levels of cholesterol, triglycerides and thromboxane A₂ (TXA₂).

	3-m/o WT	12-m/o WT	3-m/o ATX	12-m/o ATX	12-m/o ATX+ CAT
<i>Hemodynamic parameters</i>					
<i>Heart rate (bpm)</i>	377±19	375±29	371±22	304±18	300±17
<i>DAP (mmHg)</i>	59±3	73±1 *	73±2*	81±2 †‡	64±6 §
<i>SAP (mmHg)</i>	94±2	111±3 *	106±3*	122±3 †‡	99±6 §
<i>MAP (mmHg)</i>	71±3	86±2 *	84±3*	95±2 †‡	76±5 §
<i>Serum levels</i>					
<i>Cholesterol (mmol/L)</i>	2.1±0.1	4.5±0.2	16.6±2.0*	23.3±3.4 ‡	23.5±3.2
<i>LDL (mmol/L)</i>	0.5±0.1	2.5±0.2	10.3±1.6*	14.2±2.1 ‡	15.1±2.2
<i>HDL (mmol/L)</i>	1.3±0.1	1.8±0.1	1.7±0.1	2.1±0.2	1.9±0.1
<i>Triglycerides (mmol/L)</i>	0.7±0.1	0.4±0.1	6.2±0.5*	9.5±0.9 †‡	9.7±1.3
<i>TXB₂ (pg/ml)</i>	19±2	20±3	22±9	20±2	4±1 §

WT: wild-type mice; ATX: atherosclerotic mice; HDL: High-density lipoprotein; LDL: Low-density lipoprotein; SAP: systolic arterial pressure; DAP: diastolic arterial pressure; MAP: mean arterial pressure; bpm: beat per minute. *P<0.05 versus 3-m/o WT; †P<0.05 versus 3-m/o ATX; ‡P<0.05 versus 12-m/o WT; § P<0.05 versus 12-m/o ATX; n=8

Table 2. Effect of eNOS, COX and TXA₂ synthase inhibition with L-NNA, indomethacin (INDO) and furegrelate (FUR) respectively, on cerebral myogenic tone (MT, %).

	MT (%)	MT+LNNA (%)	MT+INDO (%)	MT+FUR (%)
<u>WT mice</u>				
3-m/o	14±5	43±6 §	16±2	16±2
12-m/o	10±3	48±1 §	13±3	7±1
<u>ATX mice</u>				
3-m/o	34±3*	44±1	9±1 §	10±1 §
12-m/o	37±3†	32±2	13±2 §	14±2 §
<u>ATX +CAT mice</u>				
12-m/o	17±2‡	55±4 §	15±2	15±2

WT: wild-type mice; ATX: atherosclerotic mice; ATX+CAT: ATX mice treated with catechin; *p<0.05 versus 3-m/o WT; †p<0.05 versus 12-m/o WT; ‡p<0.05 versus 12-m/o ATX; §p<0.05 versus MT; n=8.

Figure 1

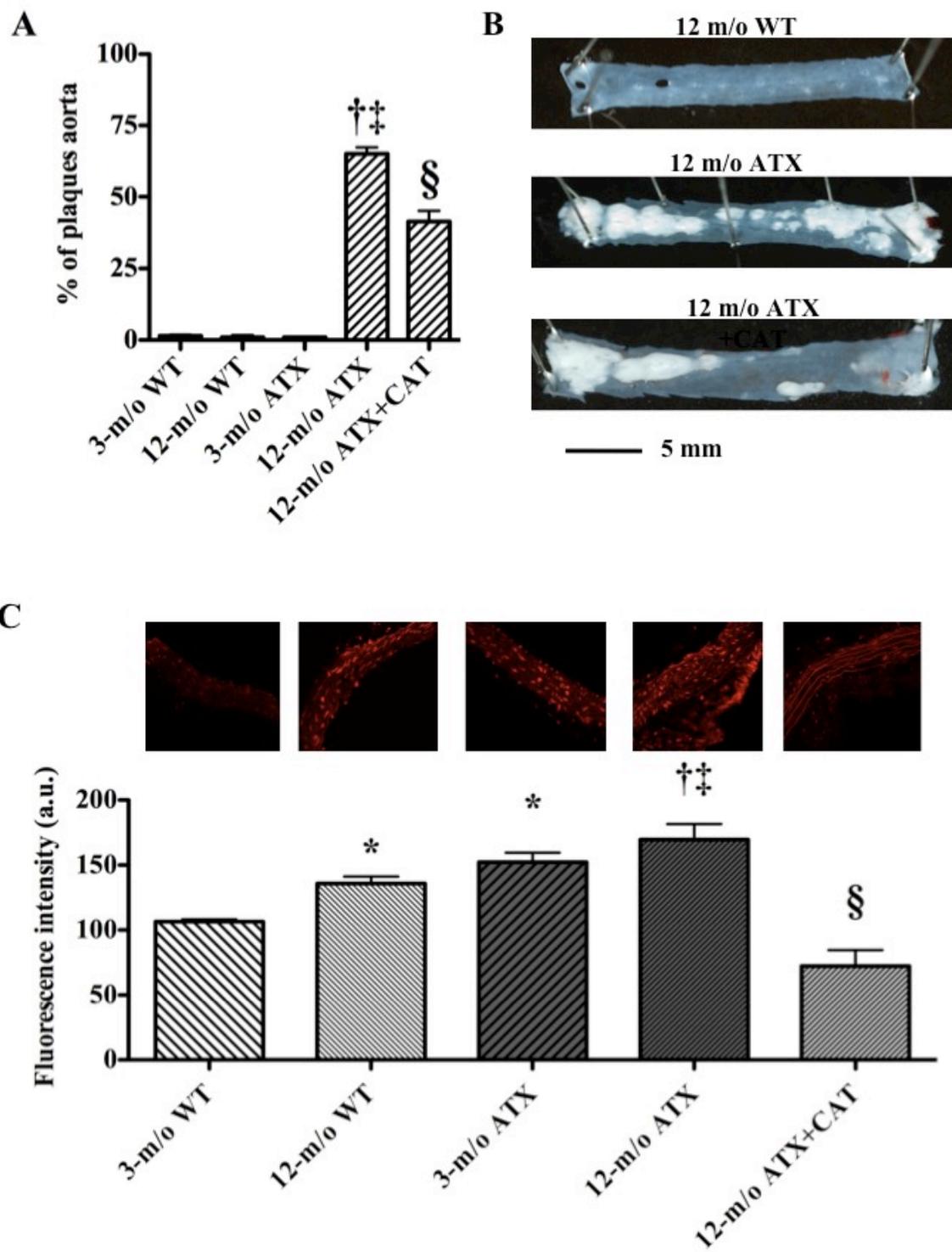


Figure 2

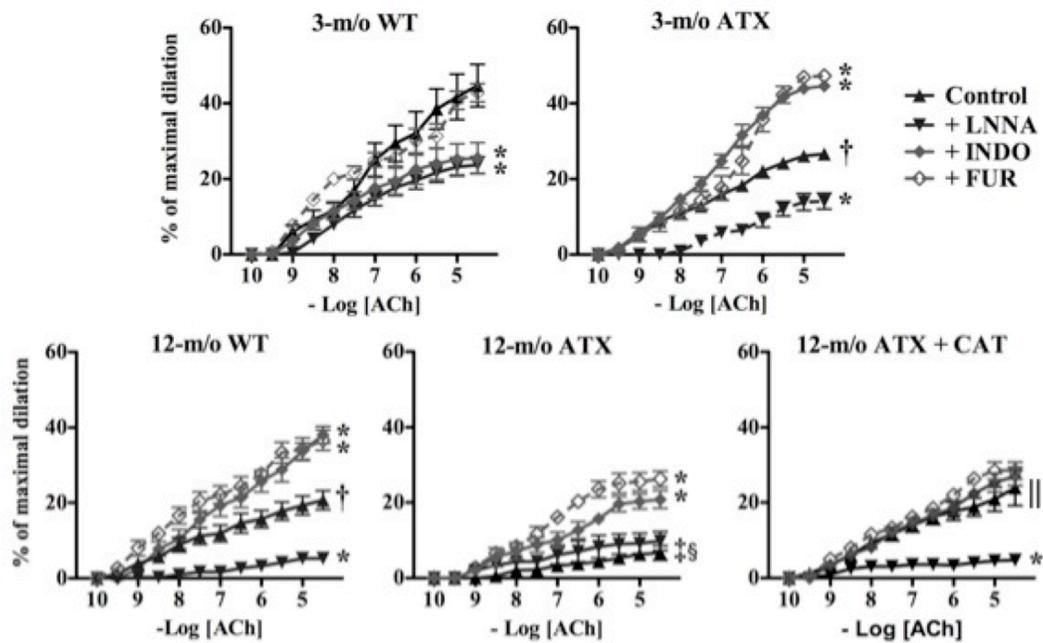


Figure 3

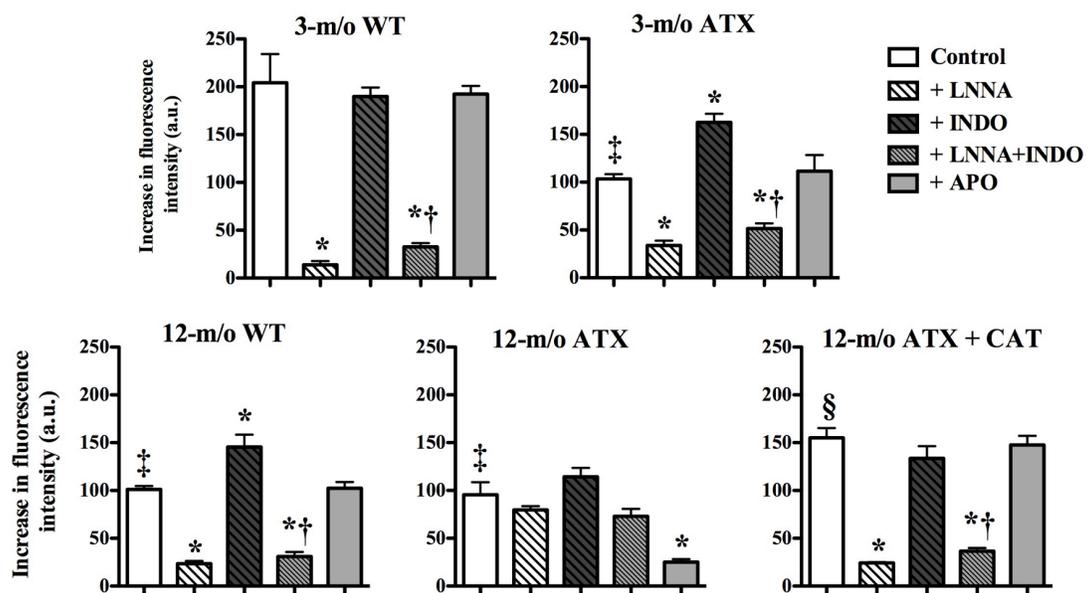
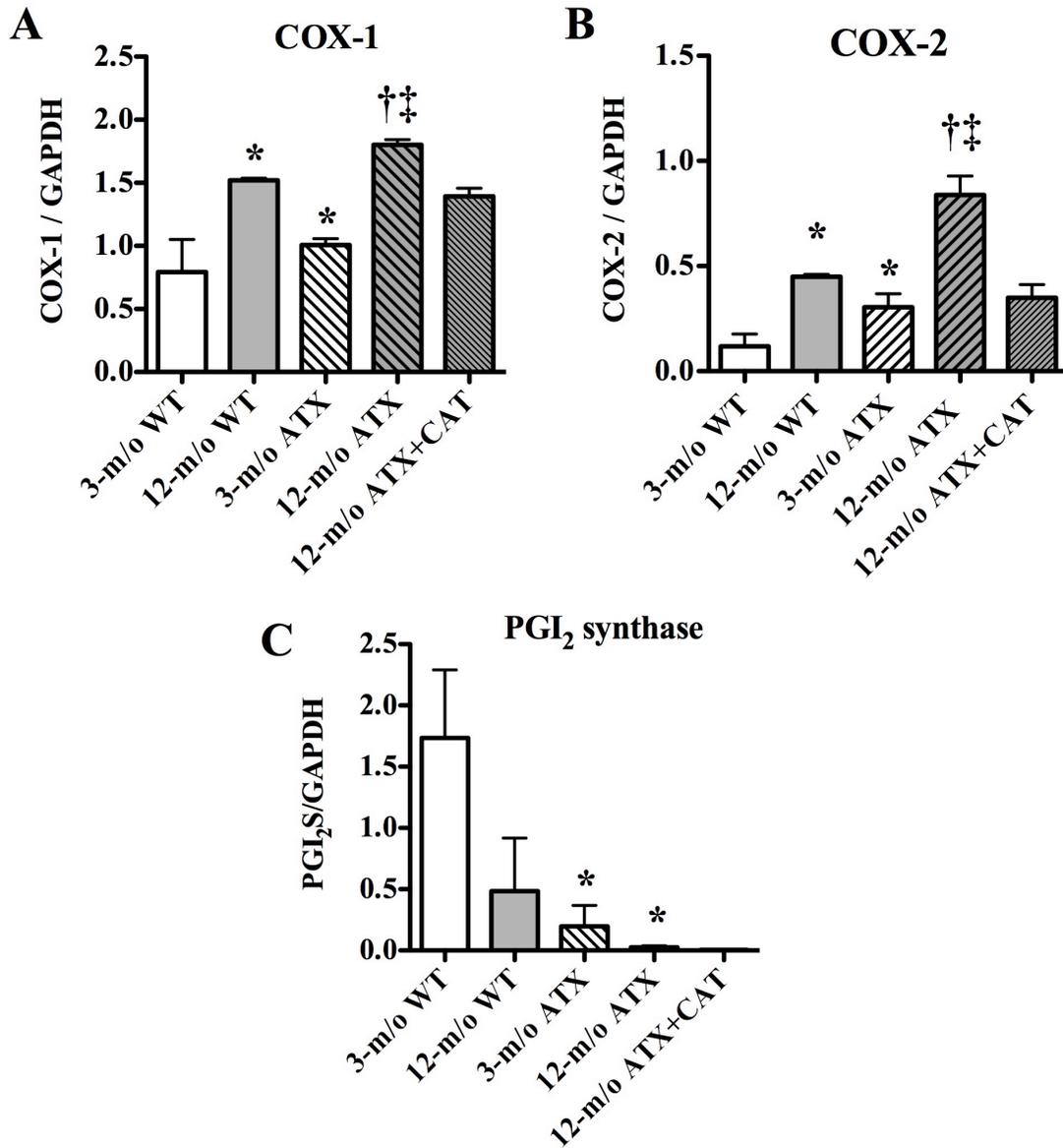


Figure 4



Étude # 3

Apport original et contribution des co-auteurs:

La contribution du premier auteur, Annick Drouin, est considérable puisque cet article a été effectué en collaboration avec deux autres laboratoires soit celui du Dr. Édith Hamel et celui du Dr. Guylaine Ferland. Annick Drouin a tout de même effectué la majorité des expériences et elle a participé à la rédaction du manuscrit. Mme Priscilla Fernandes a participé à l'acquisition des débits sanguins cérébraux par des études de laser Doppler. Mme Élisabeth Bélanger a participé à l'acquisition des données de comportements par le test de Morris Water Maze. M. Marc-Antoine Gillis a participé à l'acquisition des pressions artérielles et des paramètres hémodynamiques par la technique de «*Millard*». M. Louis Villeneuve et le Dr. Nathalie Trescases-Thorin ont participé à l'acquisition des images fluorescentes par microscopie confocale. Mme Anick Fortier a effectué les analyses statistiques. Le Dr Édith Hamel et le Dr. Guylaine Ferland ont fourni le matériel et des idées pour les études de laser Doppler et les études de Morris Water Maze, respectivement. Le Dr. Éric Thorin a supervisé l'étude et a contribué à la rédaction/ révision du manuscrit.

Permission de l'éditeur

1. Identification de la revue ou du livre

The FASEB Journal, 9650 Rockville Pike, Bethesda, MD 208143998, USA

2. Identification de l'éditeur ou des éditeurs

FASEB Journal

3. Identification de l'article

Catechin treatment improves flow-mediated dilation, cerebral blood flow and cognitive function in atherosclerotic mice.

Annick Drouin, Élisabeth Bélanger, Priscilla Fernandes, Marc-Antoine Gillis, Nathalie Thorin-Trescases, Louis Villeneuve, Edith Hamel, Guylaine Ferland, Eric Thorin.

Soumis au *FASEB journal* en Février 2010

4. Accord de l'éditeur

L'étudiante, Annick Drouin, est autorisée à inclure l'article ci-dessus dans sa thèse de doctorat qui a pour titre: *Impact du stress oxydant et de l'athérosclérose sur la fonction cérébrale au cours du vieillissement.*

Catechin treatment improves flow-mediated dilation, cerebral blood flow and cognitive function in atherosclerotic mice

Annick Drouin¹, MSc, Élisabeth Bélanger², MSc, Priscilla Fernandes³, MSc, Marc-Antoine Gillis¹, MSc, Nathalie Thorin-Trescases¹, PhD, Louis Villeneuve¹, MSc, Edith Hamel³, PhD, Guylaine Ferland², PhD, Eric Thorin¹, PhD.

¹Université de Montréal, Department of Surgery, Institut de Cardiologie de Montréal, Centre de recherche, Montréal, Québec, Canada, ²Université de Montréal, Faculté de Médecine, Département de Nutrition, Montréal, Québec, Canada, ³Institut Neurologique de Montréal, McGill University, Montréal, Québec, Canada.

Word count: 5 940

Corresponding author:

Dr. Eric Thorin, Institut de Cardiologie de Montréal, centre de recherche, 5000, rue Bélanger, Montréal, Québec, H1T 1C8, Canada. Tel.: (514) 376-3330; fax.: (514) 376-1355

Abstract

Background. Age-related decline in cerebrovascular endothelial function and cerebral blood flow (CBF) are associated with an excess in free radical production. Severe dyslipidemia could hasten these dysfunctions and lead to neuronal loss and vascular dementia. **Purpose.** We hypothesized that a chronic treatment with the antioxidant catechin would prevent endothelial dysfunction, maintain CBF and protect cognitive functions in atherosclerotic (ATX) mice. **Methods.** ATX (C57Bl/6-LDLR^{-/-}ApoB^{+/+}; 3 month-old, m/o) male mice were treated with catechin (30 mg/kg/day) for 3 months. C57Bl/6 (WT, 3 and 6-m/o) mice were used as controls. Flow-mediated dilations (FMD, 0 to 10 μ l/min) were recorded in pressurized isolated cerebral arteries. Increases in CBF induced by whisker stimulation were measured by laser Doppler flowmetry. Morris water maze test was used to evaluate the learning capacities. **Results.** Aortic atherosclerotic plaque rose from 1 \pm 1 to 14 \pm 4% in ATX mice, from 3 to 6-m/o ($p < 0.05$). Catechin limited to 4 \pm 1% the progression of the lesion ($p < 0.05$), and reduced by 50% aortic superoxide staining in ATX mice. FMD declined in 6-m/o ATX (14 \pm 2%; $p < 0.05$) compared to 6-m/o WT (22 \pm 4%). The increase in CBF was similar at 3 and 6 m/o in WT mice (32 \pm 1 and 29 \pm 1%), but lower ($p < 0.05$) at 3 and 6 m/o in ATX mice (25 \pm 1 and 20 \pm 1%, respectively). Catechin restored ($p < 0.05$) FMD (30 \pm 2%) and CBF (30 \pm 2%) in 6-m/o ATX mice. In addition, cognitive functions were improved ($p < 0.05$) by catechin treatment in ATX mice. **Conclusion.** Chronic preventive catechin treatment of ATX mice prevents cerebrovascular dysfunctions and the associated decline in cognitive capacities. **Key words:** Endothelial function, cerebral blood flow, atherosclerosis, oxidative stress.

Introduction

One of the primary concerns in neurological sciences is the relationship between cerebral blood flow and nerve cell survival ¹. The increase in cerebral blood flow (CBF) produced by brain activity, or functional hyperemia, is an example of the close interaction between neurons and blood vessels ². The neurovascular unit – including neurons, astrocytes and endothelial cells – physiologically controls CBF. Endothelial cells play an important role in CBF regulation by releasing many vasoactive factors such as NO, PGI₂ and TXA₂ ¹. The release of these endothelium-derived relaxing (EDRF) or constricting (EDCF) factors evolves through aging and diseases such as atherosclerosis ^{3,4}, and is characterized by a reduction in EDRF production and a rise in EDCF. An alteration in the integrity of the neurovascular unit would likely perturb the delivery of substrates to brain cells and, thus, might contribute to neuronal degeneration.

Atherosclerosis is a major risk factor for stroke and has been associated with a decrease in NO production and a higher ROS generation, which both could promote a decrease in CBF ^{5,6}. Atherosclerotic plaque progression in carotid arteries is associated with ischemic stroke and reduced perfusion to the brain, which is a major contributor to cognitive decline and a critical determining factor for dementia ⁷. Because the brain is more vulnerable to oxidative stress than other organs ⁸, ROS have been considered to attack neurons and to induce neurodegenerative disease including Alzheimer's disease and Parkinsonism ⁹. ROS are likely contributing to the cognitive decline in the early stages of these neurodegenerative diseases ¹⁰.

Catechin is a polyphenol antioxidant that has been shown to slow the atherogenic process ¹¹ and the decline in the learning ability associated with brain hypoperfusion ¹².

Simply by drinking green tea, polyphenols can cross the blood brain barrier and display neuroprotective effects in rats, partly by improving endothelial function *via* a reduction in lipid peroxidation^{13,14}. A recent clinical study suggests that daily green tea consumption reduces the risk of stroke¹⁵. In this study, we therefore hypothesized that chronic treatment with catechin would protect endothelial cell function and thus prevent atherosclerotic-associated decline in cerebral blood flow and ultimately improve cognitive function.

Materials and methods

Animals and tissues preparation. The procedures and protocols were performed in accordance with our institutional guidelines and the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* of Canada. Animals were kept under standard conditions (24°C; 12:12h light/dark cycle). We used 3 and 6 month-old (m/o) C57Bl/6 male mice (WT, 29±1 g and 37±2 g, respectively, n = 32; Charles River Laboratories, St-Constant, Qc, Canada) and atherosclerotic mice (ATX, 25±1g and 31±2g respectively, n = 34); the latter are knockout for the LDL receptor but express the human apolipoprotein B-100 gene (LDLR^{-/-} hApoB^{+/+}). ATX mice were generously provided by Dr.Hobbs (University of Texas Southwestern, Dallas, TX, USA). A group of ATX mice received a chronic treatment (from 3 to 6 m/o) with the antioxidant catechin (ATX+CAT; 30 mg/kg/day as previously described¹⁶ in the drinking water, 34±2g; n = 42).

Blood pressure and blood analyses. At the age of 3 and 6 months, mice were sacrificed by exsanguination under anesthesia (isoflurane), after monitoring heart rate (HR) and cardiac function using a Millar catheter inserted in the left ventricle *via* the carotid artery. Serum was collected from blood sample and frozen at -80°C. Total cholesterol, LDL and triglycerides were measured in the biochemical laboratory of the hospital¹⁶.

Reactivity studies. The brain was rapidly removed from the cranial cavity and placed in an ice-cold physiological salt solution (PSS) of the following composition (mmol/L): NaCl 130, KCl 4.7, CaCl₂ 1.6, MgSO₄ 1.17, NaHCO₃ 14.9, KH₂PO₄ 1.18, EDTA 0.026,

glucose 10. Cerebral arteries were isolated, cannulated at both ends and pressurized at 60 mm Hg (internal diameter of $136 \pm 2 \mu\text{m}$; $n=15$) in PSS oxygenated by a gas mixture containing 12% O_2 , 5% CO_2 and 83% of N_2 , generating a pO_2 of $150 \pm 10 \text{ mm Hg}$ ($n=5$)¹⁷. An equilibration period of 40 min was allowed before starting the experiment that permits myogenic tone to develop. Then, the arteries were pre-constricted with phenylephrine (PE) using a concentration from 10 to 30 $\mu\text{mol/L}$, in order to obtain a similar level of tone in all groups. FMD was induced using a flow control peristaltic pump (Living Systems Instrumentation, Burlington, USA) directly connected to the pressured myograph¹⁷. A single cumulative FMD curve (from 0 to 10 $\mu\text{l/min}$, 2- μl step-increase at constant internal pressure) was performed on each segment, as previously described¹⁷. Shear stress was calculated using the following equation: $t = 4\eta Q/\pi r^3$ where t is the shear stress (dyn/cm^2), η the viscosity (0.8 cp ¹⁷), Q is the flow rate through the lumen and r is the inside radius. During the experiments, shear stress never exceeded 70 dyn/cm^2 . L - N^w -nitro- L -arginine (L -NNA; 10 $\mu\text{mol/L}$) was used to investigate the implication of NOS in FMD. PE and L -NNA were purchased from Sigma-Aldrich Canada Ltd. (Oakville, Ontario, Canada).

Western blot. Whole brain vessels were isolated as previously described¹⁸. Proteins were extracted from the vessels after 30 min incubation in a lysis buffer of the following composition (mmol/L): 50 Tris-HCl, 20 β -glycerophosphate, 20 NaF, 5 EDTA, 10 EGTA, 1 Na_3VO_4 , 10 benzamidin, 5 dithiothreitol, 0.5 PMSF, 0.02 leupeptin, 1 microcystin LR, and 1% (v/v) Triton X-100. For Western blot analysis, proteins (60 $\mu\text{g/lane}$) were subjected to SDS-PAGE, using a discontinuous buffer system (Laemmli), in 4-15% gradient acrylamide gels and transferred to nitrocellulose. Blots were incubated with the

primary antibodies [anti-endothelial NOS (eNOS), 1:250, BD Transduction Laboratories, Franklin Lakes, NJ, USA; anti-inducible NOS (iNOS), 1:1000, Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA; anti-type 2 superoxide dismutase (Mn SOD), 1:1000, Stressgen, Ann Arbor, Michigan, USA]. Equal protein loading was verified by normalizing protein expression to GAPDH expression (anti-GAPDH, 1: 100 000, Abcam, Cambridge, MA, USA).

Plaque area quantification. The thoracic aorta was removed from mice and carefully dissected from surrounding tissues. The vessel was opened longitudinally and a picture was taken. Plaque area quantification was calculated using Photoshop software and expressed in percentage of aorta area.

Quantification of superoxide production. The oxidative fluorescent probe dihydroethidium (DHE; Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, On, Canada) was used to evaluate *in situ* superoxide (O_2^-) production on aorta sections¹⁹. DHE is a cell permeable dye that is oxidized by O_2^- to ethidium bromide, which subsequently intercalates with DNA and is trapped within cell nuclei. DNA counterstaining was performed using ToPro-3 (Molecular Probe, Burlington, USA). Unfixed frozen aortic segments were cut into 20- μ m thick sections. Sections were double stained with a mixture of 5 μ mol/L DHE and 2 μ mol/L ToPro-3. Fluorescence was visualized with a scanning confocal microscope LMS 510 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) with a 40x/1.4 Plan-Apochromat objective (I_{Ex} : 490 nm, I_{Em} : 520 nm). Acquisition settings of the camera were identical for all images. Computer-based analysis was performed using Image J software and calculated by the following equation: $I = \sum I / (A/N)$, where I is the fluorescence intensity, $\sum I$ is the

summation of all nuclei intensity, A is the total area of the nuclei and N is the number of nuclei used. Data are expressed as an average of total nuclei fluorescence.

Morris water maze. Mice were tested for their learning abilities using a Morris water maze (MWM) apparatus (160 cm in diameter and 45 cm high)²⁰. The maze was located in a quiet test room, surrounded by 4 visual cues on the pool border. All groups were tested for 5 consecutive days in a circular pool filled with water (19°C, clouded with powdered skim milk), pool that contained a transparent platform (10 cm in diameter) submerged 1.5 cm below the water surface in the center of the northwest quadrant^{21, 22}. Mice were randomly started from each of the four positions (south, east, west and north) and they used visuo-spatial cues to find the hidden platform that remained in the same quadrant throughout testing. Their movements were automatically recorded using HVS 2020 tracker and analysed by the Water 2020 software (HVS Image, Hampton, United Kingdom). Escape latencies, i.e. the time needed to find the platform (maximum 120 s) from the four start points, were measured individually, on each day and used to plot a learning curve.

On the 6th day animals were administered two cue trials (30 s in duration) in which the platform was made visible by lowering the water level 2 cm below the top of the platform. The cue trials was conducted to confirm the absence of physical and visual incapacities.

Laser Doppler flowmetry. Laser Doppler flowmetry was used for measurement of CBF (Transonic Systems)²³. Anesthetized mice (ketamine, 80 mg/kg, i.p.; Wyeth) were fixed in a stereotaxic frame and the bone over the barrel cortex was thinned to translucency

using a dental drill. Body temperature was maintained at 37°C using a heating pad. Changes in CBF before, during, and after whisker stimulation (20 s at 8–10 Hz) were recorded, with four to six recordings acquired every 30–40 s and averaged for each mouse. Cortical CBF change was expressed as percentage increase relative to baseline. The relationship between parameters measured individually in arteries and CBF changes was analyzed with the Pearson correlation coefficient.

Statistics. «*n*» refers to the number of animals used in each protocol. Continuous variables are expressed as means \pm standard error of the mean (SEM). The maximal diameter (D_{\max}) was determined by changing the PSS to a Ca^{2+} -free PSS¹⁷. Myogenic tone and dilations are expressed as percentage of the D_{\max} . The effect of age and atherosclerosis on the different parameters used in this study was analyzed using a two-way ANOVA. Paired signed rank test was performed to study the effects of L-NNA on FMD and MT. The effect of catechin treatment was evaluated by Mann-Whitney/Wilcoxon test. Performances in the Morris Water maze were evaluated by two-way (learning curve) and one-way (cue test) ANOVA and Tukey's test as *post hoc* test (Sigma Stat 2.0; SPSS, Chicago, IL). The results were considered to be statistically significant when the *P* value was <0.05 .

Results

Heart rate (HR) and cardiac function.

The HR was stable in WT and ATX mice, at 3- and 6-m/o (Table 1). Systolic, diastolic and mean arterial pressures were increased in ATX 3-m/o and 6-m/o but not in aged-matched WT mice (Table 1). Catechin treatment had no effect on the hemodynamic parameters (Table 1). Our group has previously published 3-m/o results in another study.

Serum analyses and plaque area.

ATX mice had higher cholesterol, LDL and triglyceride levels at 3-m/o and 6-m/o compared to WT mice (Table 1). HDL level were unchanged. The 3-month treatment period with catechin did not affect cholesterol, LDL, HDL and triglycerides levels (Table 1). The plaque area was small and similar in WT mice and 3 m/o ATX mice, while it increased significantly in 6 m/o ATX mice. Catechin limited plaque growth in 6-m/o ATX (figure 1A). Our group has previously published 3-m/o results in another study.

Superoxide production.

In adult WT mice, aortic superoxide production (assessed by DHE staining) was not different from young mice (figure 1B). In contrast, in ATX mice, superoxide production was more elevated in 3-m/o mice and did not increase further at 6 month of age. Catechin treatment significantly reduced superoxide production in 6-m/o ATX mice (figure 1B).

Changes in myogenic tone.

MT is the contractile response of resistance arteries to an increase in intraluminal pressure. Compared to 3-m/o WT, MT was increased in cerebral arteries isolated from ATX mice at 3- and 6-m/o but not significantly in 6-m/o WT (figure 2A). Inhibition of the basal production of NO by L-NNA increased MT in 3- and 6-m/o WT mice. In contrast, L-NNA had no effect on the MT of arteries isolated from ATX mice at both ages (figure 2A). Catechin treatment prevented MT increase in 6-m/o ATX and restored the inhibitory effect of L-NNA (figure 2A).

Flow-mediated dilation (FMD).

Dilatory responses to flow increases were similar in 3- and 6-m/o WT mice and in 3-m/o ATX mice (figure 2B). These responses, however, were significantly reduced in arteries isolated from 6-m/o ATX mice (figure 2B). Since in cerebral arteries FMD are largely dependent on the activation of the eNOS pathway^{17, 24, 25}, we tested the effects of L-NNA; in these conditions, FMD were significantly reduced by L-NNA in vessels isolated from 3- and 6-m/o WT mice. This inhibition was of a lesser extent at 3 months in arteries isolated from ATX mice, suggestive of a premature decline in eNOS function in severely dyslipidemic mice. In cerebral arteries isolated from 6-m/o ATX mice, however, eNOS inhibition did not further reduce FMD (figure 2B). Three months treatment with catechin restored both FMD and eNOS function (figure 2B).

CBF measures.

The increase in CBF following neuronal activity ensures adequate oxygen and glucose supply to activate brain areas. Following whisker stimulation, the increase in CBF was

significantly reduced in 6-m/o WT and 3-m/o ATX; this impaired response was exacerbated in 6-m/o ATX (figure 3). Catechin treatment restored the response to a similar level of that measured in 6-m/o WT mice (figure 3).

Learning.

The duration time for each mouse to find the hidden/submersed platform (escape latency, in seconds) decreased throughout the five days of the test in both types of mice, at both ages, demonstrating learning capacity (figure 4). The calculated slopes of the escape latency curves illustrate a decrease in the learning capacity in 6-m/o ATX compared to 3-m/o ATX (figure 4B). Travel distances (path) were also gradually reduced during the five-day trial (Figure 4C). Catechin treatment improved the learning capacity, as shown by an reduced in the escape latency curve slope and path curve when compared to untreated mice (figure 4B). Physical or visual incapacity to reach the platform was ruled out because all mice swam at the same speed and they all found the visible platform in the cue trial (data not shown).

Western Blot.

eNOS protein expression decreased in whole cerebral vessels isolated from 3-m/o ATX compared to 3-m/o WT (figure 5A). eNOS expression was not further affected in 6-m/o ATX mice. In WT mice, eNOS tended to be reduced at 6 months of age, ($p=0.06$). In contrast, in both WT and ATX mice, iNOS expression increased when compared to 3-m/o WT (figure 5B), suggestive of a pro-inflammatory phenotype with the progression of age and with dyslipidemia, respectively. The expression of the nNOS isoform (figure 5C),

however, did not significantly vary in WT mice, while it increased in ATX mice between the age of 3 to 6 months of age. Finally, Mn-SOD expression increased with the progression of age in cerebral vessels isolated from WT mice. The expression of MnSOD was greater at 3 months in ATX mice compared to WT mice and further increased with age (figure 5D). While catechin treatment did not affect eNOS and nNOS protein expressions, it tended to reduce that of iNOS (figure 5B; $p=0.06$) and it significantly increased Mn-SOD expression (figure 5D).

Discussion

Our results strongly suggest that an increase in oxidative stress plays a role in eNOS dysfunction leading to the reduced endothelial dilation to flow. We also observed a lower increase in CBF and a loss in cognitive functions in ATX mice. Accordingly, chronic antioxidant treatment with catechin prevented these declines in functions in severely dyslipidemic mice.

An increase in flow is one of the most physiological stimuli to study endothelial dilatory function *in vitro*. In cerebral arteries, FMD is implicated in various physiological phenomena such as CBF autoregulation and functional hyperemia²⁶. When neurons increase their metabolic demand, there is an increase in blood flow^{27,28}. This small initial increase in blood flow is able to induce dilation in the upstream vessels, which further increases flow to match the metabolic demand. In peripheral arteries FMD depends on endothelial release of NO^{24,25}. In mouse cerebral arteries, however, we recently reported that FMD depends on eNOS-derived H₂O₂ rather than NO¹⁷. In the present study, eNOS activity is largely responsible for FMD as L-NNA strongly reduced this response in 3- and 6-m/o WT mice, and to a lesser extent, in 3-m/o ATX mice (Fig. 2B). In contrast, L-NNA was inactive in vessels isolated from 6-m/o ATX suggesting that eNOS becomes dysfunctional. The progressive decline in FMD is therefore likely related to the loss in eNOS function by the augmented oxidative environment. This could explain the reduced CBF response observed in these mice with established atherosclerosis. In 3-m/o ATX and 6-m/o WT, however, we observed a reduced CBF response while FMD *in vitro* was not yet affected. These results suggest therefore that, *in vivo*, the overall communication

system within the neurovascular unit is more affected by oxidative stress than a single element, the endothelial cells.

Through the basal activity of eNOS, the endothelium is a strong regulator of the MT *in vitro*²⁹. In our study, the MT induced by an intraluminal pressure of 60 mm Hg was greater in 3- and 6-m/o ATX mice, but not in 6-m/o WT, when compared to 3-m/o WT. This suggests that the resting eNOS function was decreased in atherosclerotic conditions. Accordingly, inhibition of eNOS with L-NNA did not affect MT in ATX mice at both ages. Altogether, our data on FMD and MT point to a decrease in eNOS function as soon as at the age of 3 months in ATX mice, while it is unaffected in WT mice up to 6 months of age.

Atherosclerosis is associated with an increase in ROS production³⁰. In our 3-m/o pre-atherosclerotic mice, oxidative stress is elevated by severe dyslipidemia, and not magnified when the plaque is established in the aorta (Fig. 1B). This is mirrored by the cerebral expression of eNOS protein, which is lower and not further reduced at 6 months. The fact that the expression of the MnSOD protein increased prematurely in ATX, but only at 6 months in WT mice, is another indication that it might be the rise in oxidative stress that inactivates eNOS reducing the dilation and promoting MT: the rise in MnSOD is likely a protective compensatory mechanism preserving endothelial function in the face of an increased oxidative stress. This compensation is however, only effective in cerebral arteries of WT mice. This may be explained by the delayed increase in cerebral iNOS without change in nNOS expression in WT mice (Fig 5), in contrast to ATX mice, suggestive of a premature pro-inflammatory phenotype expression in ATX mice.

The central role of oxidative stress in eNOS dysfunction and altered FMD in ATX mice is confirmed by the fact that chronic preventive antioxidant treatment with catechin reduced aortic superoxide staining, reduced MT, and restored FMD in 6-m/o ATX: this was associated with a further increase in MnSOD expression, while iNOS decreased, and a restored sensitivity to L-NNA, suggesting that by reducing oxidative stress, the eNOS functions were rescued. Indeed, the normalization of the endothelial function was not associated by an increase in eNOS protein expression. Catechin is known to stimulate the expression of endogenous antioxidant enzymes including catalase, SOD and glutathione peroxidase^{31,32}. The increase in Mn-SOD expression induced by catechin in the mouse cerebral circulation likely contributes to the beneficial effect of the antioxidant on FMD and on NOS function in general.

As eNOS regulates basal tone (MT) and is largely responsible for FMD, the eNOS dysfunction in the upstream vessels might influence the control of CBF in small arteries of the parenchyma in ATX mice. In the present study, the increase in CBF—that ensures adequate oxygen and glucose supply to activated brain areas—in response to neuronal activity was slightly but significantly reduced with adulthood in WT mice. This reduction in CBF was very significant in 3-m/o ATX mice and further impaired at 6 months (Fig 3). The central role of oxidative stress in the reduction of CBF responses in ATX mice is confirmed by the beneficial effect of catechin that prevented the decline in CBF observed 6-m/o ATX mice. This normalization of the CBF response might as well be affected by the preserved eNOS function and FMD of the upstream cerebral arteries from catechin-treated ATX mice.

Brain hypoperfusion³³ and ROS generation¹⁰ have been proposed to cause neurodegenerative diseases such as Alzheimer disease and Parkinsonism⁹. In agreement with these previous works, our data demonstrate that severe dyslipidemia is associated with a decline in the cognitive function between the age of 3 and 6 months (figure 4B). It has been reported previously that LDLR^{-/-} mice display hippocampal-dependent memory dysfunctions³⁴. This loss of cognitive function appears to be associated with the rise in oxidative stress and the associated loss of eNOS function. This is supported by several supportive data: 1) WT mice did not lose learning capacities, while in these mice the reduction of CBF was limited and the maximal eNOS function was maintained. 2) Catechin treatment had an impact on cognitive functions, CBF responses and eNOS function in 6-m/o ATX mice. Altogether, our data are the first to demonstrate a link between *in vitro* endothelial function, *in vivo* CBF responses and cognitive functions.

One limitation of our model is that we cannot differentiate nNOS from eNOS activity in isolated cerebral arteries. NO, derived from nNOS activity, is indeed a key molecule in the neurovascular coupling, which has been identified as both a mediator and a modulator of the vascular responses that accompany the increased neuronal activity³⁵,³⁶. Reduced NO bioavailability derived from increased oxidative stress, resulting from nNOS dysfunction or ONOO⁻ formation, has been involved in cerebrovascular dysfunction³⁷. Therefore, severe dyslipidemia may affect NOS functions impairing both the neurovascular unit communications *via* nNOS and the vascular response (*via* eNOS). This hypothesis would have to be tested in eNOS and nNOS knockout mice exposed to severe dyslipidemia. Nonetheless, our data are strongly suggestive of eNOS/nNOS dysfunction in ATX mice.

In our study, 3-month treatment with catechin prevented plaque progression by 70%, normalized endothelial function and reduced iNOS expression. Mn-SOD protein expression was up-regulated by catechin treatment. Mn-SOD is inducible and its expression is up-regulated in a context of inflammation and oxidative stress³⁸⁻⁴¹. However, catechin is also known to stimulate the expression of endogenous antioxidant enzymes including catalase, SOD and glutathione peroxidase^{31, 32, 42, 43}. The increase in Mn-SOD expression induced by catechin in the mouse cerebral circulation likely contributes to the beneficial effect of the antioxidant on FMD and on NOS function in general. Although we did not verify the implication of other SOD, an increase in either or all SOD isoforms could indeed improve H₂O₂ production and participate in the normalization of FMD responses by catechin in 6-m/o ATX mice. This is consistent with a previous study suggesting that SOD applied topically to the cerebral cortex prevented endothelial dysfunction⁴⁴.

In conclusion, our results demonstrated that oxidative stress associated with atherogenesis in severely dyslipidemic mice reduces FMD, CBF responses, as well as impairs cognitive function. Chronic treatment with the polyphenol catechin did not affect dyslipidemia but restored FMD, CBF responses and cognitive functions, while it prevented plaque progression; all these effects were accompanied by a significant reduction in oxidative stress. We therefore suggest that early control of ROS production could be beneficial in preventing cognitive dysfunction associated with risk factors for cardiovascular diseases such as dyslipidemia.

Funding

This work has been supported in part by the Foundation of Montreal Heart Institute, the Heart and Stroke Foundation of Quebec and the Canadian Institutes of Health Research (MOP87388). A. Drouin holds the *Frederick Banting and Charles Best Canada Graduate Scholarships - Doctoral Award* in association with the Canadian Institute for Health Research.

References

1. Toda N, Okamura T. Cerebral vasodilators. *Jpn J Pharmacol*. 1998;76:349-367
2. Girouard H, Iadecola C. Neurovascular coupling in the normal brain and in hypertension, stroke, and alzheimer disease. *J Appl Physiol*. 2006;100:328-335
3. Gendron ME, Thorin-Trescases N, Villeneuve L, Thorin E. Aging associated with mild dyslipidemia reveals that cox-2 preserves dilation despite endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;292:H451-458
4. Krummen S, Falck JR, Thorin E. Two distinct pathways account for edhf-dependent dilatation in the gracilis artery of dyslipidaemic hapob^{+/+} mice. *Br J Pharmacol*. 2005;145:264-270
5. Crimi E, Ignarro LJ, Napoli C. Microcirculation and oxidative stress. *Free Radic Res*. 2007;41:1364-1375
6. Kalaria RN. Cerebral vessels in ageing and alzheimer's disease. *Pharmacol Ther*. 1996;72:193-214
7. Komatani A, Yamaguchi K, Sugai Y, Takanashi T, Kera M, Shinohara M, Kawakatsu S. Assessment of demented patients by dynamic spect of inhaled xenon-133. *J Nucl Med*. 1988;29:1621-1626
8. Matz RL, Schott C, Stoclet JC, Andriantsitohaina R. Age-related endothelial dysfunction with respect to nitric oxide, endothelium-derived hyperpolarizing factor and cyclooxygenase products. *Physiol Res*. 2000;49:11-18
9. Ohwada K, Takeda H, Yamazaki M, Isogai H, Nakano M, Shimomura M, Fukui K, Urano S. Pyrroloquinoline quinone (pqq) prevents cognitive deficit caused by oxidative stress in rats. *J Clin Biochem Nutr*. 2008;42:29-34
10. Hamel E, Nicolakakis N, Aboukassim T, Ongali B, Tong XK. Oxidative stress and cerebrovascular dysfunction in mouse models of alzheimer's disease. *Exp Physiol*. 2008;93:116-120
11. Kaliora AC, Dedoussis GV, Schmidt H. Dietary antioxidants in preventing atherogenesis. *Atherosclerosis*. 2006;187:1-17

12. Yan X, Zhang JJ, Li X, Lei Z, Dong S, Hui L. Green tea polyphenols inhibit cognitive impairment induced by chronic cerebral hypoperfusion via modulating oxidative stress. *J Nutr Biochem*. 2009
13. Haque AM, Hashimoto M, Katakura M, Tanabe Y, Hara Y, Shido O. Long-term administration of green tea catechins improves spatial cognition learning ability in rats. *J Nutr*. 2006;136:1043-1047
14. Hong JT, Ryu SR, Kim HJ, Lee JK, Lee SH, Kim DB, Yun YP, Ryu JH, Lee BM, Kim PY. Neuroprotective effect of green tea extract in experimental ischemia-reperfusion brain injury. *Brain Res Bull*. 2000;53:743-749
15. Liang W, Lee AH, Binns CW, Huang R, Hu D, Zhou Q. Tea consumption and ischemic stroke risk: A case-control study in southern china. *Stroke*. 2009;40:2480-2485
16. Gendron ME, Thorin E. A change in the redox environment and thromboxane a2 production precede endothelial dysfunction in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;293:H2508-2515
17. Drouin A, Thorin E. Flow-induced dilation is mediated by akt-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase-derived hydrogen peroxide in mouse cerebral arteries. *Stroke*. 2009;40:1827-1833
18. Li X, Geary GG, Gonzales RJ, Krause DN, Duckles SP. Effect of estrogen on cerebrovascular prostaglandins is amplified in mice with dysfunctional nos. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;287:H588-594
19. Lauzier B, Sicard P, Bouchot O, Delemasure S, Menetrier F, Moreau D, Vergely C, Rochette L. After four hours of cold ischemia and cardioplegic protocol, the heart can still be rescued with postconditioning. *Transplantation*. 2007;84:1474-1482
20. Rowe WB, Spreckmeester E, Meaney MJ, Quirion R, Rochford J. Reactivity to novelty in cognitively-impaired and cognitively-unimpaired aged rats and young rats. *Neuroscience*. 1998;83:669-680
21. Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods*. 1984;11:47-60

22. Brouillette J, Quirion R. The common environmental pollutant dioxin-induced memory deficits by altering estrogen pathways and a major route of retinol transport involving transthyretin. *Neurotoxicology*. 2008;29:318-327
23. Nicolakakis N, Aboukassim T, Ongali B, Lecrux C, Fernandes P, Rosa-Neto P, Tong XK, Hamel E. Complete rescue of cerebrovascular function in aged alzheimer's disease transgenic mice by antioxidants and pioglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist. *J Neurosci*. 2008;28:9287-9296
24. Koller A, Sun D, Huang A, Kaley G. Corelease of nitric oxide and prostaglandins mediates flow-dependent dilation of rat gracilis muscle arterioles. *Am J Physiol*. 1994;267:H326-332
25. Joannides R, Haefeli WE, Linder L, Richard V, Bakkali EH, Thuillez C, Luscher TF. Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation*. 1995;91:1314-1319
26. Guyton AC, Hall JE. *Textbook of medical physiology*. W.B. Saunders Company; 2000.
27. Rancillac A, Rossier J, Guille M, Tong XK, Geoffroy H, Amatore C, Arbault S, Hamel E, Cauli B. Glutamatergic control of microvascular tone by distinct gaba neurons in the cerebellum. *J Neurosci*. 2006;26:6997-7006
28. Hamel E. Perivascular nerves and the regulation of cerebrovascular tone. *J Appl Physiol*. 2006;100:1059-1064
29. Henrion D. Pressure and flow-dependent tone in resistance arteries. Role of myogenic tone. *Arch Mal Coeur Vaiss*. 2005;98:913-921
30. Harman D. Free radical involvement in aging. Pathophysiology and therapeutic implications. *Drugs Aging*. 1993;3:60-80
31. Chan P, Cheng JT, Tsai JC, Lien GS, Chen FC, Kao PF, Liu JC, Chen YJ, Hsieh MH. Effect of catechin on the activity and gene expression of superoxide dismutase in cultured rat brain astrocytes. *Neurosci Lett*. 2002;328:281-284
32. Kim CY, Lee C, Park GH, Jang JH. Neuroprotective effect of epigallocatechin-3-gallate against beta-amyloid-induced oxidative and nitrosative cell death via augmentation of antioxidant defense capacity. *Arch Pharm Res*. 2009;32:869-881

33. Hong JT, Ryu SR, Kim HJ, Lee SH, Lee BM, Kim PY. Involvement of cortical damage in the ischemia/reperfusion-induced memory impairment of wistar rats. *Arch Pharm Res.* 2000;23:413-417
34. Mulder M, Jansen PJ, Janssen BJ, van de Berg WD, van der Boom H, Havekes LM, de Kloet RE, Ramaekers FC, Blokland A. Low-density lipoprotein receptor-knockout mice display impaired spatial memory associated with a decreased synaptic density in the hippocampus. *Neurobiol Dis.* 2004;16:212-219
35. Iadecola C, Zhang F. Permissive and obligatory roles of NO in cerebrovascular responses to hypercapnia and acetylcholine. *Am J Physiol.* 1996;271:R990-1001
36. Lindauer U, Megow D, Matsuda H, Dirnagl U. Nitric oxide: A modulator, but not a mediator, of neurovascular coupling in rat somatosensory cortex. *Am J Physiol.* 1999;277:H799-811
37. Park L, Anrather J, Zhou P, Frys K, Pitstick R, Younkin S, Carlson GA, Iadecola C. NADPH-oxidase-derived reactive oxygen species mediate the cerebrovascular dysfunction induced by the amyloid beta peptide. *J Neurosci.* 2005;25:1769-1777
38. Willcox BJ, Curb JD, Rodriguez BL. Antioxidants in cardiovascular health and disease: Key lessons from epidemiologic studies. *Am J Cardiol.* 2008;101:75D-86D
39. Dougall WC, Nick HS. Manganese superoxide dismutase: A hepatic acute phase protein regulated by interleukin-6 and glucocorticoids. *Endocrinology.* 1991;129:2376-2384
40. Kumagai Y, Mizukado S, Nagafune J, Shinyashiki M, Homma-Takeda S, Shimojo N. Post-transcriptional elevation of mouse brain Mn-SOD protein by mercuric chloride. *Brain Res.* 1997;769:178-182
41. Baud O, Haynes RF, Wang H, Folkerth RD, Li J, Volpe JJ, Rosenberg PA. Developmental up-regulation of MnSOD in rat oligodendrocytes confers protection against oxidative injury. *Eur J Neurosci.* 2004;20:29-40
42. Mandel S, Weinreb O, Amit T, Youdim MB. Cell signaling pathways in the neuroprotective actions of the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate: Implications for neurodegenerative diseases. *J Neurochem.* 2004;88:1555-1569

43. Robb EL, Winkelmoen L, Visanji N, Brotchie J, Stuart JA. Dietary resveratrol administration increases mnsod expression and activity in mouse brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;372:254-259
44. Iadecola C, Zhang F, Niwa K, Eckman C, Turner SK, Fischer E, Younkin S, Borchelt DR, Hsiao KK, Carlson GA. Sod1 rescues cerebral endothelial dysfunction in mice overexpressing amyloid precursor protein. *Nat Neurosci.* 1999;2:157-161

Legends

Figure 1. Effect of a 3-month treatment with the antioxidant catechin on (A) plaque area in the thoracic aorta and (B) superoxide production quantified by DHE staining of aortic histological sections of 3- and 6-m/o wild-type (WT) and atherosclerotic (ATX) mice (n=5). * $p < 0.05$ versus 3-m/o WT; † $p < 0.05$ versus 3-m/o ATX; ‡ $p < 0.05$ versus 6-m/o WT; § $p < 0.05$ versus 6-m/o ATX.

Figure 2. Effect of a 3-month catechin treatment and acute addition of N^W -nitro-L-arginine (L-NNA; 10 $\mu\text{mol/L}$) on (A) cerebral artery myogenic tone (MT) induced by an intraluminal pressure of 60 mm Hg and (B) flow-mediated dilation (FMD, 0 to 10 $\mu\text{l/min}$) in pressurized cerebral arteries isolated from 3- and 6-m/o wild-type (WT) and atherosclerotic (ATX) mice (n=6). * $p < 0.05$ versus 3-m/o WT; † $p < 0.05$ versus 3-m/o ATX; ‡ $p < 0.05$ versus 6-m/o WT; § $p < 0.05$ versus 6-m/o ATX; || $p < 0.05$ versus MT; # $p < 0.05$ versus control.

Figure 3. Effect of a 3-month catechin treatment on the increase in cerebral blood flow (CBF) following whisker stimulation (n=6) of 3- and 6-m/o wild-type (WT) and atherosclerotic (ATX) mice. * $p < 0.05$ versus 3-m/o WT; † $p < 0.05$ versus 3-m/o ATX; ‡ $p < 0.05$ versus 6-m/o WT; § $p < 0.05$ versus 6-m/o ATX.

Figure 4. Effect of a 3-month catechin treatment on (A) the learning capacities (escape latency, in seconds), (B) the deduced slopes of the escape latency curves and (C) the path

(in cm), in 3- and 6-m/o wild-type (WT) and atherosclerotic (ATX) mice (n=18). * $p < 0.05$ versus 3-m/o ATX; † $p < 0.05$ versus 3-m/o ATX; ‡ $p < 0.05$ versus 6-m/o ATX.

Figure 5. Effect of a 3-month catechin treatment on (A) eNOS, (B) iNOS, (C) nNOS, and (D) Mn-SOD protein expression in cerebral arteries of 3- and 6-m/o (WT) and atherosclerotic (ATX) mice. * $p < 0.05$ vs 3-m/o WT; † $p < 0.05$ vs 6-m/o WT; ‡ $p < 0.05$ vs 3-m/o ATX; § $p < 0.05$ vs 6-m/o ATX.

Table 1. Effect of ageing and catechin treatment on hemodynamic parameters and serum levels of cholesterol and triglycerides in wild-type (WT) and atherosclerotic (ATX) mice.

	3 m/o WT	6 m/o WT	3 m/o ATX	6 m/o ATX	6 m/o ATX+CAT
<u>Hemodynamic</u>					
<u>parameters</u>					
<i>HR (bpm)</i>	377±19	330±5	371±22	349±11	354±9
<i>SAP (mmHg)</i>	94±2	94±3	106±3 *	119±3 †	131±5
<i>DAP (mmHg)</i>	59±3	63±3	73±2 *	82±2 †	90±4
<i>MAP (mmHg)</i>	71±3	67±6	84±3 *	94±2 †	103±4
<u>Serum levels</u>					
<i>Cholesterol (mmol/L)</i>	2.1±0.1	3.1±0.1	16.6±2.0*	20.1±2.2†	20.1±1.3
<i>LDL (mmol/L)</i>	0.5±0.1	1.2±0.1	10.3±1.6*	12.4±1.1†	12.7±1.0
<i>HDL (mmol/L)</i>	1.3±0.1	1.7±0.1	1.7±0.1	1.9±0.1	1.7±0.1
<i>Triglycerides (mmol/L)</i>	0.7±0.1	0.7±0.2	6.2±0.5 *	7.5±0.8 †	8.5±0.8

HR: Heart Rate; SAP: systolic arterial pressure; DAP: diastolic arterial pressure; MAP: mean arterial pressure; LDL: Low-density lipoprotein; HDL: High-density lipoprotein; bpm: beat per minute. *p<0.05 versus 3-m/o WT; †p<0.05 versus 6-m/o WT; n=8-10

Figure 1.

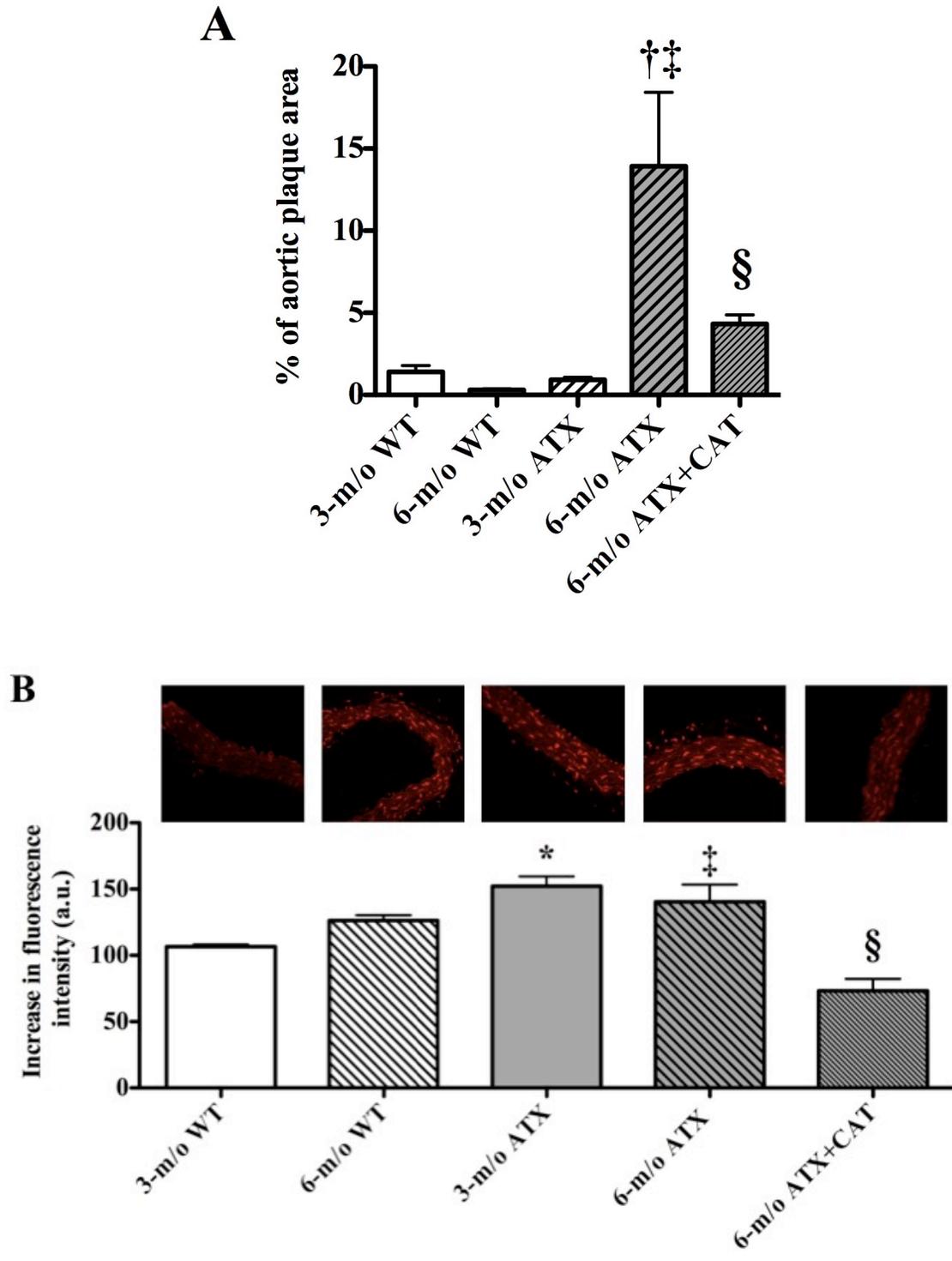


Figure 2.

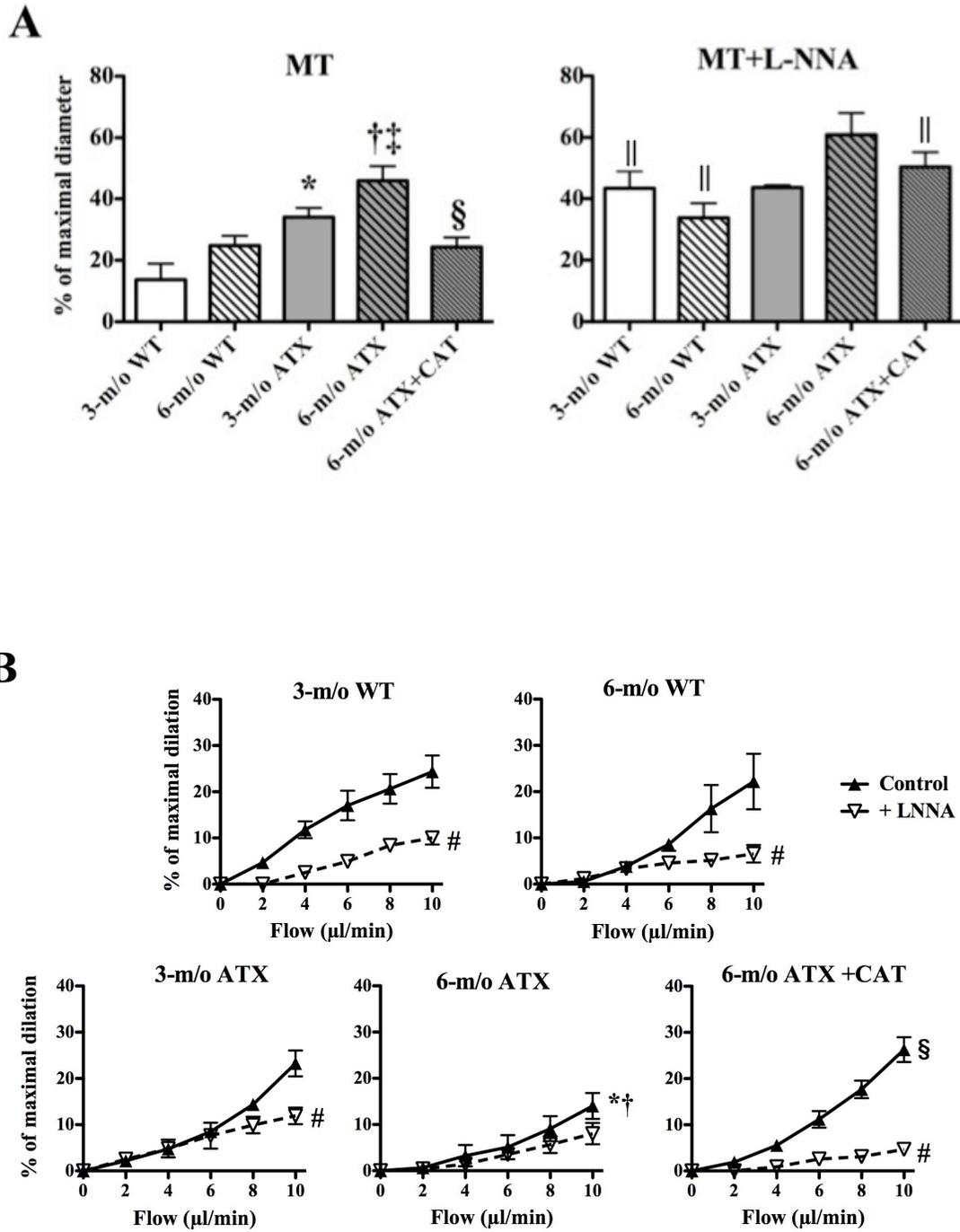


Figure 3.

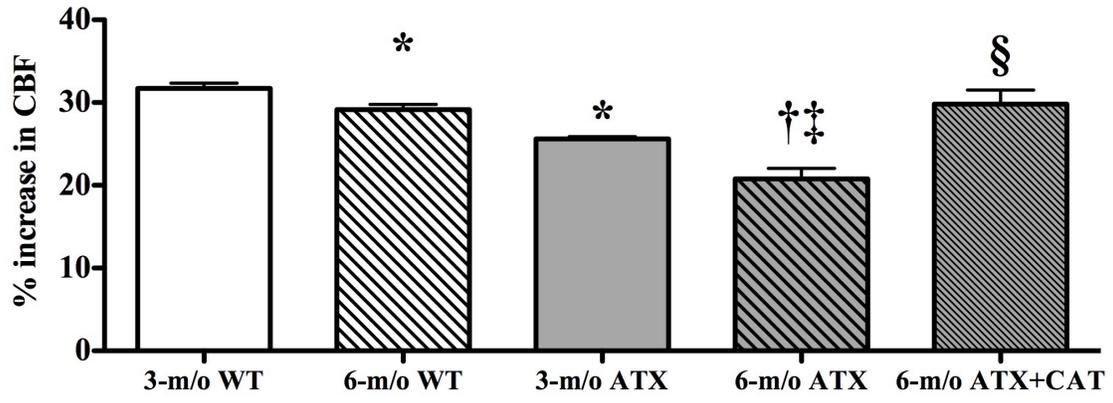
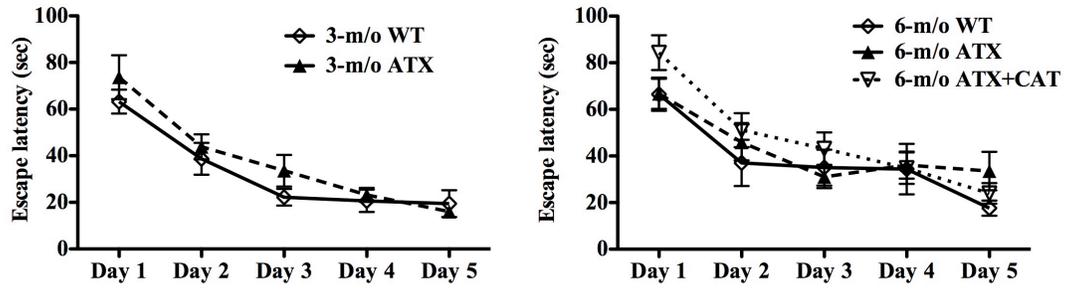
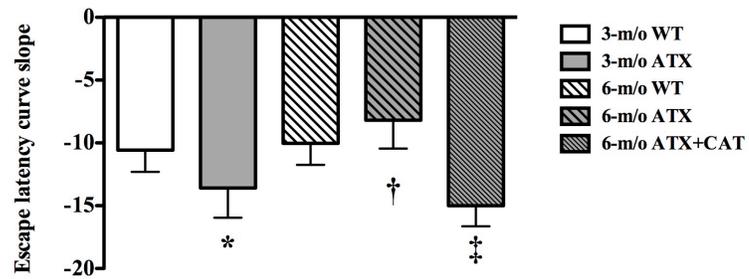


Figure 4.

A



B



C

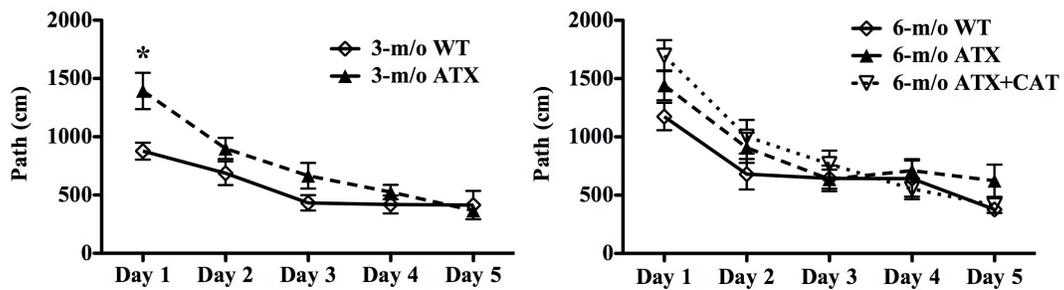
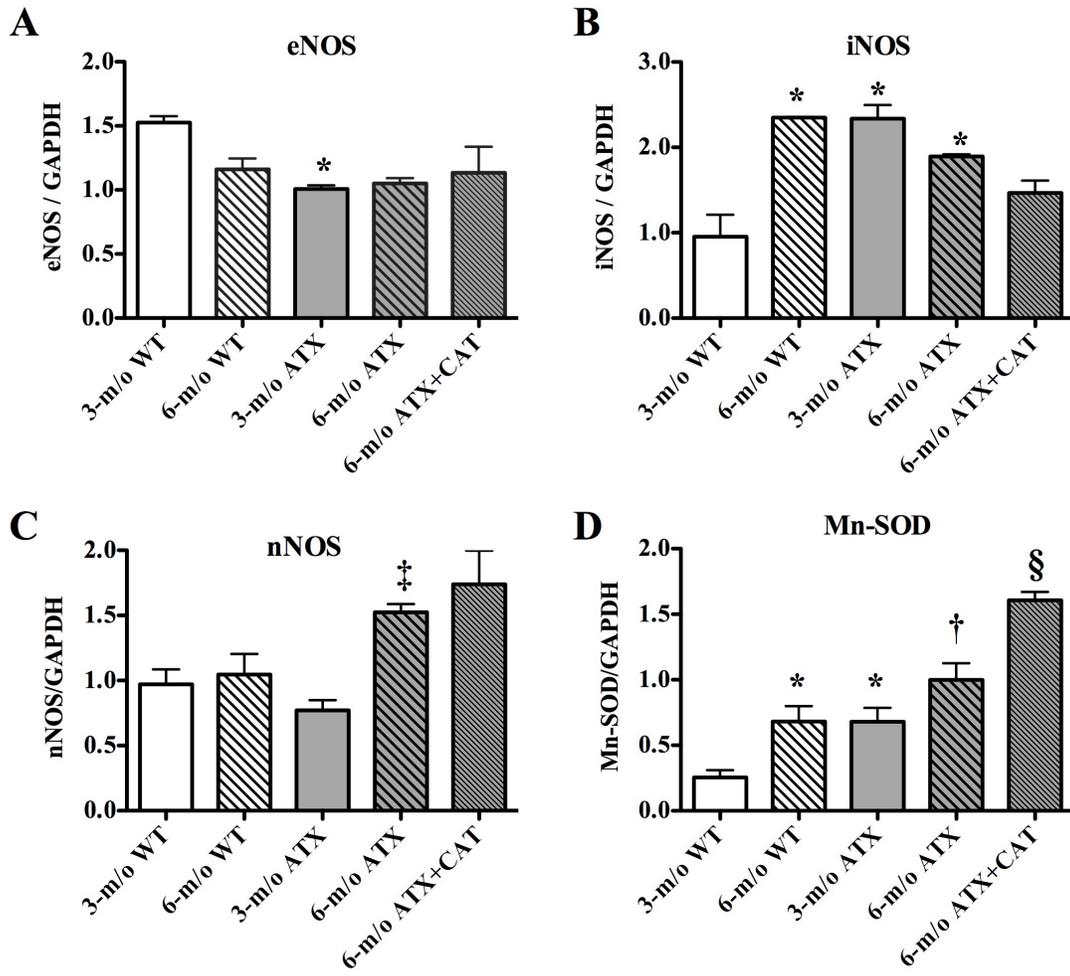


Figure 5.



Discussion

5 Discussion

Dans cette section, je discuterai des différents résultats de mes travaux et tenterai de montrer le lien entre les trois différentes études présentées dans cette thèse. Tout en mesurant les forces et les faiblesses de mes travaux, je tenterai d'élucider l'impact des facteurs de risque pour les maladies cardiovasculaires et du stress oxydant sur la fonction cérébrale endothéliale et son influence sur les fonctions cognitives. J'essaierai de démontrer comment une diminution de la fonction endothéliale, en association avec une augmentation de stress oxydant, peut mener à une réduction du débit sanguin cérébral et ultimement, à une perte des fonctions cognitives.

5.1 Les DRO au niveau cérébral : effets bénéfiques ou délétères ?

5.1.1 Le H₂O₂ en tant que médiateur.

Nous avons démontré au cours de l'étude #1 que le H₂O₂ était un médiateur endothélial essentiel au niveau cérébral chez les souris saines. Ce médiateur est responsable aussi bien de la dilatation induite par l'acétylcholine (Drouin *et al.* 2007) que de la dilatation induite par un stimulus physiologique (FMD) (Drouin & Thorin 2009). Le Dr Shimokawa et ses collègues ont démontré ce même mécanisme à plusieurs reprises dans les artères de résistance périphériques, suggérant que les DRO peuvent agir en tant que facteurs endothéliaux (Shimokawa & Morikawa 2005; Takaki *et al.* 2008; Yada *et al.* 2008). Même si ces études ont toutes été effectuées chez la souris, le rôle dilatateur du H₂O₂ a aussi été suggéré dans les artères coronaires et intestinales de patients, démontrant la possibilité que les DRO puissent réguler la fonction endothéliale humaine (Sato *et al.* 2003; Hatoum *et al.* 2005). Toutefois, ces études portent à croire que seules de faibles quantités de DRO produites peuvent être bénéfiques.

Le H₂O₂ est plus stable et réagit moins avec l'O₂⁻ que le NO. Il est donc avantageux pour le cerveau, un organe possédant une faible capacité antioxydante, de favoriser ce médiateur endothélial. En condition physiologique, plusieurs sources de DRO ont été identifiées, telles que la NADPH oxydase (Paravicini *et al.* 2006) et les

mitochondries (Harman 1993). Dans l'étude #1, nous avons démontré que le H_2O_2 produit dans les artères cérébrales provient de la eNOS. La NOS est une enzyme similaire à la NADPH oxydase qui fonctionne par transfert d'électrons à partir du NADPH et, par conséquent, qui est capable de produire $l'O_2^-$ (Stroes *et al.* 1998). Au niveau périphérique, en condition physiologique, la NOS est sous forme de dimère et libère du NO (Takaki *et al.* 2008). Il a été suggéré que dans des conditions pathologiques, le découplage de la NOS mènerait à la formation de DRO (Cai 2005). Le BH_4 est le cofacteur essentiel de la NOS et, selon la littérature, serait important dans la régulation de la production de $l'O_2^- / NO$ (Wever *et al.* 1997). Des études ont montré que les niveaux de BH_4 sont plus faibles au niveau cérébral que dans les autres lits vasculaires (Yoshida *et al.* 2000). Le BH_4 peut réagir avec $l'O_2^-$ afin de former le BH_3 . Comme le cerveau a une capacité antioxydante réduite, le BH_4 , pourrait se lier préférentiellement à $l'O_2^-$ plutôt qu'à la NOS et induire son découplage. De plus, les niveaux de BH_4 sont affectés par les hauts taux de glucose. Par exemple, lors du diabète, où les niveaux de glucose circulants sont très élevés, l'expression de BH_4 au niveau périphérique est grandement diminuée (Sasaki *et al.* 2008). Les neurones sont incapables d'emmagasiner le glucose et nécessite son apport constant en provenance de la circulation sanguine. Les cellules endothéliales cérébrales étant directement en contact avec le sang, leur niveau de BH_4 pourrait être affecté par cet apport constant de glucose contrairement aux cellules endothéliales des autres organes. Il en résulterait une formation privilégiée de $l'O_2^-$ plutôt que de NO dans les cellules cérébrales. Toutefois, la raison exacte d'une diminution du niveau de BH_4 dans les cellules endothéliales cérébrales est encore incertaine.

Les souris déficientes en SOD ont une fonction endothéliale diminuée (Faraci & Didion 2004). De plus, l'application exogène de SOD semble augmenter la dilatation dépendante de l'endothélium cérébral (Terashvili *et al.* 2006). Il est donc fortement suggéré que le H_2O_2 ait des effets importants physiologiques sur les vaisseaux au niveau cérébral. Cependant, le H_2O_2 reste un DRO et peut avoir des effets néfastes notamment lors de la réaction de Fenton : c'est la réaction d'oxydation du H_2O_2 avec un ion ferreux aboutissant à la formation du radical OH^- qui est un oxydant beaucoup plus puissant que le H_2O_2 (Guyton & Hall 2000).

En définitive, bien que le H₂O₂ fasse partie de la catégorie des DRO, il est chimiquement plus stable et moins dommageable que les autres DRO. Ainsi, il est logique que le H₂O₂ soit un médiateur de choix dans un système hautement susceptible à l'augmentation du stress oxydant tel que le cerveau.

5.1.2 Mais qu'en est-il du NO ?

Mes études ont démontré que le NO n'est pas impliqué dans la dilatation endothéliale cérébrale, mais est présent au niveau périphérique (Drouin *et al.* 2007). Toutefois, le NO reste un modulateur important au niveau cérébral. En effet, lors de l'hyperémie fonctionnelle observée par laser doppler (tel que dans l'étude #3), il a été démontré que le NO était le médiateur libéré pour induire la vasodilatation suite à la stimulation neuronale (Okamura *et al.* 2002). De plus, le NO est nécessaire à plusieurs fonctions neuronales dont la mémoire (Vanhoutte 2009b). Il a été démontré que la eNOS et la iNOS sont plus susceptibles au découplage que la nNOS (Pou *et al.* 1999). Les neurones, qui contiennent beaucoup de nNOS, pourraient être à l'origine de cette production de NO. Il est donc possible qu'à l'intérieur des neurones, le NO soit un médiateur important mais que dans les cellules endothéliales, le H₂O₂ prime.

5.1.3 Les effets néfastes des DRO.

En réalité, les études montrent que ce n'est pas la grande quantité de DRO qui est néfaste, mais bien le déséquilibre entre la production de DRO et la capacité antioxydante (Droge 2002). Tant que la présence d'antioxydant est capable de protéger les tissus contre les attaques oxydantes, les DRO ne sont pas néfastes. Or, le cerveau est sensible aux attaques oxydantes et possède une capacité antioxydante réduite. De plus, nous avons démontré que les DRO sont impliqués dans la régulation des fonctions endothéliales suggérant que les enzymes libérant les DRO sont aussi présentes au niveau cérébral.

L'augmentation de DRO a effectivement été observée lors de plusieurs pathologies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson et les démences vasculaires (Matz *et al.* 2000). En effet, les traitements à la vitamine C et E ont

montré des effets bénéfiques chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer montrant que la balance entre les DRO et le système endogène antioxydant est affectée lors de ces pathologies (Joseph *et al.* 2009; Spencer 2009). De plus, nos études (études #2 et #3) ont montré que dans un contexte de stress oxydant élevé, tel que l'athérosclérose, la consommation de catéchine permet de rétablir la FMD ainsi que la dilatation dépendante de l'endothélium induite par l'ACh. La théorie du vieillissement est un autre bon exemple de cette modification de l'équilibre *redox* des cellules. Cette théorie, telle qu'émise par Harman, stipule que l'augmentation des DRO est susceptible de causer des dommages irréversibles menant à la diminution des fonctions cellulaires et au vieillissement cellulaire augmentant ainsi les chances de développer des maladies. Le vieillissement est par conséquent un facteur de risque important des maladies neurodégénératives, puisqu'une fois oxydés, les neurones ne possèdent pas la capacité de se régénérer. Lors des études #2 et #3, nous avons démontré que l'athérosclérose, peut affecter les cellules endothéliales cérébrales. En effet, nous avons pu remarquer que la présence de plaques athérosclérotiques au niveau périphérique accentue le stress oxydant endothélial, induit une dysfonction endothéliale et une augmentation du TM dans les artères cérébrales. Or, la simple présence de facteurs de risque pour les maladies cardiovasculaires peut mener à la détérioration de la fonction des cellules endothéliales cérébrales et ultimement à la dégénérescence neuronale.

En définitive, les DRO sont des molécules qui, en condition physiologique, sont essentielles. En effet, outre leurs implications dans la dilatation, les DRO sont aussi impliquées dans la défense contre les pathogènes (Rhee 2006). Le facteur endothélial relaxant par excellence, le NO, est lui-même un DRO. Chaque organe possède des particularités et doit avoir des mécanismes qui lui sont propres afin de maximiser ses fonctions. Or, comme toutes substances, lorsque les DRO sont libérés en excès, ils peuvent devenir néfastes. En fait, je crois que c'est le débalancement de l'équilibre *redox* qui entraîne des dommages aux composantes cellulaires.

5.2 L'impact du vieillissement et de l'athérosclérose sur la voie du H₂O₂.

La voie du H₂O₂ est responsable de 50% de la dilatation dépendante de l'endothélium au niveau cérébral; la PGI₂ et l'EDHF étant responsables du reste (Drouin *et al.* 2007). Lors des études #2 et #3, nous avons démontré qu'au cours du vieillissement chez les souris de type sauvage, la fonction de la eNOS et la production de H₂O₂ étaient diminuées, mais néanmoins toujours présentes. En revanche, dans un contexte d'athérosclérose, nous avons observé que la voie de la NOS était largement diminuée dès l'âge de 6 mois (étude #2) et complètement abolie à l'âge de 12 mois (étude #3). De plus, chez les souris athérosclérotiques âgées de 12 mois, l'augmentation de H₂O₂ observée lors de la faible dilatation était complètement insensible à l'inhibiteur de la NOS (L-NNA), ce qui n'était pas le cas chez les vieilles souris de type sauvage. Ces résultats suggèrent que le vieillissement serait moins susceptible d'affecter la voie de la NOS que l'athérosclérose ou, autrement dit, que l'athérosclérose accélère le processus du vieillissement cellulaire. L'augmentation de la production de DRO et la diminution de la capacité antioxydante sont à l'origine des maladies cardiovasculaires (Collins *et al.* 2009a). Il semble donc que la dysfonction de la NOS dépende de la balance entre les deux composantes de l'équilibre *redox*.

Les dysfonctions endothéliales surviennent de façon précoce en présence d'athérosclérose autant au niveau périphérique (Gendron *et al.* 2007) que cérébral (études #2 et #3). Cela suggère que la présence de l'athérosclérose produit beaucoup plus de DRO que le simple vieillissement. Lors des études #2 et #3, nous avons observé que l'augmentation de stress oxydant, aussi bien à 6 mois qu'à 12 mois chez les souris saines, était accélérée (présence de stress oxydant dès 3 mois) et potentialisée par la présence d'athérosclérose. Plus les niveaux de DRO sont élevés, plus les risques d'affecter la NOS sont grands. Dans nos deux études, nous avons pu observer que les niveaux protéiques de la eNOS ne semblaient pas affectés par le stress oxydant. Toutefois, lors de l'étude #2 nous avons mesuré que l'activité de la eNOS était diminuée au cours du vieillissement et d'une façon accélérée en présence de maladie.

Ainsi, l'athérosclérose affecte la voie du H₂O₂ plus que le vieillissement. Mes études montrent que le vieillissement affecte la voie du H₂O₂ à l'âge de 12 mois

seulement alors que l'athérosclérose la diminue à 3 mois et l'abolit à l'âge de 12 mois. L'athérosclérose induit donc des changements irréversibles et est donc plus dommageable que le vieillissement seul.

5.3 Impact du vieillissement et de l'athérosclérose sur la libération des facteurs endothéliaux cérébraux.

Dans le système vasculaire, la eNOS fonctionne en synergie ou en compétition avec les autres facteurs endothéliaux. Par exemple, au niveau périphérique, il a été démontré que l'inhibition pharmacologique de la NOS révèle la présence du TXA₂, un facteur vasoconstricteur (Gendron & Thorin 2007). De plus, il existe des mécanismes de compensation puisque l'inhibition d'un seul des EDRF augmente la participation des autres EDRF lors de la stimulation de l'endothélium à l'ACh afin de maintenir la dilatation (Meng *et al.* 1998; Thorin *et al.* 1998; Gendron *et al.* 2007). Par exemple, dans l'artère fémorale chez les souris saines, l'inhibition de la NOS entraîne une compensation par l'EDHF afin de maintenir la dilatation maximale (Krummen *et al.* 2005). Mais est-ce le cas au niveau cérébral ?

Lors de précédents travaux, nous avons démontré que la dilatation dépendante de l'endothélium cérébral, dans nos conditions expérimentales, était dépendante de trois voies distinctes, soient la NOS, la PGI₂ et l'EDHF (dans notre cas les EET) (Drouin *et al.* 2007). L'inhibition d'un seul facteur, contrairement à la circulation périphérique, n'induit pas de compensation par les autres EDRF, mais entraîne une diminution de la dilatation maximale. Cette propriété des artères cérébrales les rend plus vulnérables puisque l'absence de l'un de ces facteurs réduit la capacité de dilatation de l'endothélium.

Outre la diminution d'EDRF, la production d'EDCF peut mener à une diminution de la dilatation maximale. Lors de l'étude #2, nous avons observé que l'athérosclérose, aussi bien que le vieillissement, en plus de réduire l'activité de la NOS, pouvait induire la libération de TXA₂, diminuant ainsi la dilatation globale. Ce phénomène a été observé à 12 mois chez la souris saine et à 3 mois chez la souris ATX, démontrant que l'athérosclérose, bien qu'étant une maladie périphérique, affecte la libération d'EDCF au

niveau des cellules endothéliales cérébrales. L'augmentation d'EDCF avec la maladie et le vieillissement, a précédemment été démontrée (Gendron *et al.* 2007). Toutefois, cela semble arriver de façon plus tardive au niveau périphérique puisque dans les artères rénales de souris athérosclérotiques, l'augmentation d'EDCF survient à 6 mois, alors que nous l'avons observée dès 3 mois dans les artères cérébrales. Mais quel est l'élément déclencheur de l'augmentation de la libération d'EDCF ?

Il est possible d'imaginer que l'augmentation des DRO puisse affecter le statut des cellules endothéliales et modifier ou influencer la composition enzymatique des cellules. Prenons l'exemple du TXA₂ et de la PGI₂. Ces deux composés proviennent de la COX. Or, la libération de ces facteurs varie en fonction de l'état pathologique et de la localisation de la cellule. Par exemple, en condition physiologique, les plaquettes libèrent préférentiellement du TXA₂ alors que les cellules endothéliales libèrent préférentiellement de la PGI₂. Le choix du médiateur libéré ne dépend pas seulement de l'isoforme de la COX puisque les trois types libèrent le même composé, soit la PGH₂ (voir figure 4). Le choix du médiateur libéré dépend plutôt de la présence ou non des différentes enzymes synthases qui sont présentes autour de la COX (dans notre cas la thromboxane et la prostacycline synthases). Or, lors de l'athérosclérose, il y aurait, au niveau périphérique, une augmentation de la présence de thromboxane synthase et une augmentation de la libération de TXA₂ qui est impliqué dans l'athérogénèse (Wu 2003). On peut donc considérer que l'augmentation de stress oxydant fasse varier la composition cellulaire de ces enzymes. En effet, les DRO peuvent oxyder non seulement les lipides, mais aussi l'ADN et les protéines (incluant les enzymes). Les DRO ont ainsi la capacité d'influencer la composition enzymatique des cellules et peuvent ainsi affecter les facteurs endothéliaux. Lors des études #2 et #3, nous avons montré que la présence d'athérosclérose pouvait augmenter la formation de DRO plus rapidement et plus fortement que le vieillissement, autant au niveau périphérique (DHE aortique) que cérébral (iNOS et Mn-SOD). Cette forte augmentation de DRO, associée à l'athérosclérose, pourrait donc être responsable de la dysfonction endothéliale précoce et des changements de libérations des différents EDRF/EDCF au niveau cérébral.

Toutefois, il faut noter que, dans nos études, les changements de réactivité n'impliquaient pas les cellules musculaires lisses vasculaires puisqu'en condition basale

(en absence d'inhibiteur) la contraction induite par la phényléphrine (10 μ M) ne semblait pas être affectée par le vieillissement. Il est, par conséquent, possible qu'*in vivo* les astrocytes ou les neurones compensent la perte du facteur manquant et permettent la dilatation maximale malgré la présence de maladie. Comme nous travaillons sur un système isolé, il nous est impossible de vérifier cette hypothèse.

En considérant tous ces résultats, je crois que le vieillissement induit des changements dans la libération EDCF/EDRF en favorisant la libération d'EDCF aux dépens des EDRF. Ces changements sont particuliers au type cellulaire étudié et varient en fonction de l'environnement dans lequel on évolue. L'apparition de facteurs de risque accélère l'apparition de ces changements et induit une libération précoce d'EDCF consécutive d'une accentuation de la production de DRO.

5.3.1 Le stress oxydant, la NOS et le TXA₂ : à qui la victoire?

Lors de l'étude #2, en présence du vieillissement et/ou de l'athérosclérose, nous avons observé une augmentation de stress oxydant, une production précoce de TXA₂ ainsi qu'une diminution de l'activité de la NOS. Mais lequel de ces facteurs a la plus grande influence ?

Il a été démontré que, dans les artères rénales de souris, l'inhibition pharmacologique de la NOS révèle la présence de TXA₂ suite à une stimulation par l'ACh. Cette même étude suggère que l'activation du récepteur TP par le TXA₂ induit la production de DRO qui affecte par la suite les autres facteurs endothéliaux (Gendron & Thorin 2007). Au niveau cérébral, la production de NO et de TXA₂ semble plus importante que dans les autres lits vasculaires (Neppl *et al.* 2009). Or, il a été proposé, au niveau cérébral chez le rat, que l'augmentation de TXA₂, en se liant à son récepteur produit une augmentation de O₂⁻ et une diminution de la dilatation dépendante de la NOS (Neppl *et al.* 2009). Il est suggéré que l'O₂⁻ peut agir directement sur la NOS ou encore diminuer la biodisponibilité de NO. Mis ensemble, ces résultats suggèrent que l'augmentation de DRO induit une libération de TXA₂, qui lorsque liée à son récepteur induit à son tour une augmentation de DRO capable de diminuer l'activité de la NOS.

Nous entrons dans un cercle vicieux puisque la NOS elle même, au niveau cérébral, peut libérer à son tour de l' O_2^- .

Les résultats obtenus dans l'étude #2 sont en accord avec ce mécanisme, puisque lorsque la quantité de O_2^- est augmentée (augmentation du marquage au DHE) l'inhibition de la thromboxane synthase ou de la COX est capable de rétablir non seulement la dilatation, mais aussi l'activité de la NOS. Toutefois, lorsque la quantité de DRO devient trop importante, un point de non retour est atteint (12-m/o ATX) où l'inhibition de la production de TXA_2 n'est plus capable de rétablir l'activité de la NOS. Ce mécanisme ne semble pas présent chez les souris jeunes et saines puisque l'inhibition des COX réduit la dilatation, démontrant l'implication de la PGI_2 à cet âge. L'inhibition de la thromboxane synthase n'a, quant à elle, aucun effet sur la dilatation.

Tel que mentionné précédemment, chez les souris 12-m/o ATX, la NOS est devenue dysfonctionnelle et ceci est associé à l'apparition de la NADPH oxydase (sensible à l'apocynine) comme source des DRO mesurés. Ainsi, avec la maladie et le vieillissement nous entrons dans un cercle vicieux menant à la détérioration des cellules endothéliales. Le stress oxydant semble donc être l'élément déclencheur et le TXA_2 autant que la NOS sont les médiateurs qui contribuent à la détérioration des fonctions endothéliales cérébrales.

5.4 Des cellules endothéliales et/ou les neurones, qui contrôlent le débit sanguin cérébral ?

Le débit sanguin au niveau cérébral doit être constant, puisque les cellules cérébrales (en dehors des astrocytes) n'ont pas la capacité d'emmagasiner l'énergie. Dans l'étude #3, nous avons observé que l'augmentation de débit sanguin, suite à l'augmentation métabolique neuronale, ou hyperémie fonctionnelle, était diminuée par le vieillissement et l'athérosclérose. L'augmentation de débit sanguin suite à la stimulation des moustaches fait appel à l'unité neurovasculaire afin de créer une augmentation locale de débit. Une diminution de débit, telle que mesurée par laser doppler, est donc conséquente d'une diminution de la stimulation des vaisseaux par les neurones. Mais comment ?

Le stress oxydant a été associé avec le vieillissement, l'athérosclérose ainsi qu'à plusieurs maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer (Pratico 2008) et le Parkinsonisme (Mandel *et al.* 2006). La plupart des DRO sont liposolubles et peuvent facilement traverser la BBB et atteindre les neurones. Cela induit donc une peroxydation lipidique et une perte de la fonction neuronale. Il est toutefois peu clair si la dégénérescence neuronale est une cause ou encore une conséquence de la diminution du débit sanguin. Il a également été proposé par le Dr. Filosa que l'augmentation de débit sanguin lors de l'hyperémie fonctionnelle nécessite l'activation des astrocytes (Filosa & Blanco 2007). Une diminution de la réponse hyperémique pourrait donc aussi être la conséquence d'une dysfonction astrocytaire liée à une augmentation du stress oxydant. Ainsi, les facteurs de risque des maladies cardiovasculaires qui induisent une augmentation de la production de DRO pourraient donc influencer la survie neuronale ou astrocytaire et, conséquemment, le débit sanguin cérébral.

Lors de l'hyperémie fonctionnelle, l'augmentation locale de débit est nécessaire afin de répondre à l'augmentation de la demande métabolique et implique la dilatation des vaisseaux en amont. Au niveau périphérique, la dilatation rétrograde s'effectue par l'augmentation des forces de cisaillements qui induisent une dilatation (FMD) dépendante de l'endothélium vasculaire (Guyton & Hall 2000). Toutefois, le mécanisme exact de la dilatation rétrograde au niveau cérébrale n'est pas encore défini. Au cours de l'étude #3, nous avons montré que dès l'âge de 6 mois, les souris ATX avaient une diminution de la réponse aux forces de cisaillements (une diminution de la FMD), ce qui n'était pas observé à 3 mois chez les souris ATX ni à 6 mois chez les souris de type sauvage. Or, le débit sanguin cérébral (CBF) suite à l'augmentation de la demande métabolique était diminué dès l'âge de 3 mois chez les souris ATX ainsi que chez les souris 6-m/o WT. Bien que significative, cette diminution de débit sanguin n'est que de 3 % chez les souris WT âgées de 6 mois et de 6 % chez les souris ATX âgées de 3 mois. En revanche, chez les souris ATX âgées de 6 mois, où nous avons observé une dysfonction significative de la FMD, la diminution de débit sanguin est beaucoup plus importante (11%). Ces résultats suggèrent que les cellules endothéliales et neuronales sont impliquées dans la régulation du débit sanguin cérébral. Une possibilité pour expliquer la baisse précoce de débit sanguin cérébral sans diminution de la FMD est que les neurones sont plus susceptibles au

stress oxydant et sont affectés par les DRO avant les cellules endothéliales. Si l'augmentation de stress oxydant persiste, la dysfonction de FMD survient et, conséquemment, les dommages sont plus importants. Toutefois, comme les études de FMD et de CBF n'ont pas été effectuées dans les mêmes artères (dans les grosses artères et dans les artères parenchymateuses, respectivement), il est aussi possible que leurs réaction face à l'augmentation de DRO soit différente ou encore qu'aucun lien ne puisse être établi entre ces deux mécanismes.

Les neurones et les cellules endothéliales ont donc des actions bien différentes dans le contrôle du débit sanguin. Alors que les neurones induisent une dilatation locale aiguë, les cellules endothéliales contrôlent la dilatation des vaisseaux en amont afin de permettre l'augmentation de débit sanguin soutenue. Je crois qu'il existe un contrôle partagé entre les cellules endothéliales et les neurones dans le contrôle du débit sanguin cérébral. Ainsi, la perte de l'un ou l'autre des mécanismes de contrôle peut affecter, d'une façon plus ou moins importante, le débit sanguin cérébral.

5.4.1 Débit sanguin et fonctions cognitives, quel est le lien?

Il a été démontré que l'hypoperfusion lors de l'ischémie cérébrale est une cause de la mort neuronale (Hong *et al.* 2000a). Toutefois, lors de maladies affectant les artères périphériques telles que l'athérosclérose, la simple diminution de débit sanguin peut-elle affecter la fonction cognitive?

Nous avons démontré dans l'étude #3 que la fonction cognitive estimée par le test du Water maze était diminuée chez les souris ATX âgées de 6 mois alors qu'elle n'était pas affectée chez les souris de type sauvage âgées de 6 mois. Nous avons précédemment discuté que le débit sanguin était toutefois altéré chez les souris ATX âgées de 3 mois et les souris WT âgées de 6 mois. Rappelons que les changements de débit à l'âge de 3 mois chez les souris ATX et les souris WT âgées de 6 mois sont faibles (diminution de 6% et 3%, respectivement) alors qu'ils étaient beaucoup plus prononcés chez les souris ATX âgées de 6 mois (11%). Ces résultats suggèrent qu'il pourrait exister des mécanismes de compensation provenant de l'unité neurovasculaire. Ces mécanismes permettraient de maintenir une perfusion sanguine adéquate jusqu'à un seuil où les fonctions cognitives

seraient altérées. Tel que décrit précédemment, le seuil critique pourrait être une dysfonction de la FMD, qui, lorsqu'elle est présente, diminuerait la dilatation des vaisseaux en amont et empêcherait l'augmentation de débit sanguin nécessaire au maintien des fonctions cognitives. Cette théorie est appuyée par les résultats obtenus lors de l'étude #3 qui montrent qu'un traitement préventif avec la catéchine est associé avec une préservation de la fonction endothéliale et une amélioration des fonctions cognitives chez les souris ATX âgées de 6 mois. Selon cette hypothèse, il est possible d'imaginer que la baisse des capacités d'apprentissage observée à 6 mois chez les souris ATX serait amplifiée chez les souris ATX âgées de 12 mois, en présence d'un fort stress oxydant et d'une dysfonction endothéliale totale.

En résumé, je propose que même si les neurones sont plus sensibles à l'augmentation de DRO, les dommages doivent atteindre un certain seuil avant de pouvoir influencer la capacité d'apprentissage. Je pense que la diminution de débit sanguin et l'augmentation de DRO peuvent toutes deux induire la perte neuronale *in vivo* et influencer les fonctions cognitives.

5.5 La catéchine dans la protection des facteurs endothéliaux et des fonctions cognitives.

Dans les études #2 et #3 nous avons utilisé un antioxydant, la catéchine. L'inhibition de la production d' O_2^- (démontrée par la diminution des marquages au DHE ; études #2 et #3) par la catéchine est associée avec une amélioration de la fonction endothéliale cérébrale, du débit sanguin et de la fonction cognitive. Dans nos études, la catéchine a été administrée de façon préventive dans le but d'empêcher l'établissement des dysfonctions associées au vieillissement et à l'athérosclérose. Dans nos conditions expérimentales, l'utilisation de la catéchine a permis de protéger la voie du H_2O_2 (et donc de la NOS) tel que démontré dans l'étude #2. Mais comment ?

Nous avons pu remarquer lors de l'étude #2 que la catéchine diminue la formation de TXA_2 et rétablit l'activité de la NOS. Elle diminue également la taille de la plaque athérosclérotique, abaisse la pression artérielle (étude #2) ainsi que le tonus vasculaire de

base (TM) chez les souris ATX. L'antioxydant est donc capable de diminuer l'impact de l'athérosclérose sur les fonctions cardiovasculaires. Nous avons aussi observé dans les études #2 et #3, qu'un traitement chronique à la catéchine pouvait rétablir la dilatation dépendante de l'endothélium qu'elle soit induite par les forces de cisaillements ou par l'ACh. En accord avec nos résultats, il a précédemment été démontré que la catéchine pouvait avoir des effets bénéfiques sur la fonction endothéliale (Stoclet *et al.* 2004). Il a aussi été démontré que la catéchine peut augmenter l'expression de la NOS et diminuer la production de TXA₂ (Choi *et al.* 2002; Dohadwala & Vita 2009). Dans les études #2 et #3, nous avons également observé qu'au niveau systémique, la catéchine diminuait la production de TXA₂ sans toutefois influencer l'expression protéique de la eNOS ou encore de la iNOS. En plus d'augmenter la fonction endothéliale, la consommation de catéchine semble aussi augmenter la défense antioxydante au niveau cérébral tel que suggéré par l'augmentation protéique de la Mn-SOD (étude #3). Il a précédemment été rapporté que la catéchine pouvait augmenter la capacité antioxydante au niveau périphérique (Mandel *et al.* 2004). Finalement, la consommation de catéchine a aussi rétabli le débit sanguin cérébral ainsi que la fonction cognitive. Tous ces résultats suggèrent que l'augmentation de DRO puisse influencer tous ces phénomènes. Ainsi, la diminution de DRO pourrait avoir des effets positifs au niveau endothélial et neuronal.

En définitive, un traitement préventif avec la catéchine a eu d'excellentes répercussions au niveau cérébral. Le traitement a permis de contrer l'accélération du déclin des fonctions endothéliales et cognitives associée à l'athérosclérose.

5.6 Limitations des études

Bien que nos études proposent des explications concernant l'évolution des facteurs endothéliaux cérébraux et leurs impacts sur la fonction cognitive, ces études font face à certaines limitations. Tout d'abord, nous travaillons dans un système isolé et au niveau cérébral, la présence de l'unité neurovasculaire a une grande influence sur le débit sanguin. Or, dans toutes les études nous avons regardé les facteurs de façon indépendante ce qui ne reflète pas nécessairement la situation *in vivo*. Pour améliorer notre connaissance des phénomènes *in vivo*, nous pourrions tout d'abord traiter les souris ATX

avec un inhibiteur de TXA₂, tel que l'indométhacine ou encore le térutroban (un inhibiteur du récepteur TP récemment développé). Comme nous avons identifié le TXA₂ en tant qu'élément central de la dysfonction endothéliale, cela nous permettrait d'éclaircir le rôle du TXA₂ dans la progression du déclin des fonctions endothéliales et cognitives chez la souris. De plus, nous pourrions mesurer la densité neuronale ou encore l'activité des astrocytes. Une diminution de la densité neuronale ou astrocytaire nous permettrait de mieux comprendre le lien entre la diminution de débit sanguin et les fonctions cognitives. Toutes ces méthodes devraient être effectuées *in vivo* afin de bien comprendre les mécanismes impliqués, et les résultats pourraient nous éclairer quant à la fiabilité de nos hypothèses.

Ensuite, il ne faut pas négliger que les études ont été effectuées chez la souris. L'extrapolation chez l'humain est risquée. Toutefois, certaines études effectuées chez l'humain montrent que l'H₂O₂ dérivé de la NOS est un mécanisme impliqué dans la dilatation des artères coronaires de patients (Sato *et al.* 2003). De plus, récemment, un médicament contre le récepteur de TXA₂, le térutroban, a été utilisé pour des études cliniques de phase 3 (l'étude PERFORM) chez des patients ayant eu des AVC afin d'empêcher les récives (Bousser *et al.* 2009). Les résultats de cette étude ne sont toutefois pas encore connus. Finalement, des études épidémiologiques chez l'humain ont associé l'augmentation de DRO, l'hypertension et l'athérosclérose avec une incidence accrue de développer de maladies neurodégénératives (Valko *et al.* 2007). Malgré ces quelques évidences chez l'humain, les souris utilisées pour les études expérimentales évoluent dans un environnement contrôlé et possèdent un bagage génétique identique, ce qui n'est pas le cas chez l'humain. En effet, les différences génétiques, le mode de vie et l'environnement peuvent influencer l'évolution de la fonction endothéliale.

L'utilisation de la catéchine a aussi ses limites. Or, l'utilisation de ce composé, bien qu'il ait plusieurs effets bénéfiques sur l'athérosclérose peut avoir plusieurs effets indirects, c'est-à-dire autres que l'inactivation des composés radicalaires. En effet, contrairement aux autres composés antioxydants endogènes, la catéchine a aussi des propriétés anti-inflammatoires et anti-thrombogéniques (Suzuki *et al.* 2009), qui pourraient indirectement offrir des effets bénéfiques sur la fonction vasculaires. De plus, il faut noter que des études non publiées dans notre laboratoire ont montré que le traitement

chronique avec la catéchine avait des effets bénéfiques chez les souris ATX mais des effets délétères chez les souris de types sauvages. La différence de résultats dépend de l'état cellulaire *redox* initial de la souris. Les résultats d'un traitement antioxydant doivent donc être considérés avec précaution.

6 Conclusions et perspectives

Dans nos études, nous avons identifié le H_2O_2 dérivé de l'activité de la NOS en tant que médiateur principal de la dilatation induite par les forces de cisaillements. De plus, nous avons déterminé l'impact du vieillissement et de l'athérosclérose sur la fonction endothéliale cérébrale. Nous avons montré que le vieillissement des cellules endothéliales cérébrales était associé avec une libération de TXA_2 accrue et une diminution de la voie du H_2O_2 qui sont toutes deux conséquentes d'une augmentation de stress oxydant. La présence d'un facteur de risque pour les maladies cardiovasculaires telles que l'athérosclérose accentue la production de DRO et induit une dysfonction endothéliale précoce qui peut être prévenue par un traitement antioxydant avec la catéchine. Nous avons aussi démontré que l'augmentation du stress oxydant, associé à l'athérosclérose, a pour effet d'accélérer la dysfonction de la FMD entraînant une diminution du débit sanguin et, ultimement, une diminution des fonctions cognitives précoces qui sont normalement associées au vieillissement. Un traitement chronique préventif avec l'antioxydant catéchine, permet de renverser la dysfonction endothéliale, la diminution de débit sanguin cérébral ainsi que d'améliorer les fonctions cognitives.

Ces travaux ont donc permis de distinguer l'effet du vieillissement des effets de l'athérosclérose sur les fonctions vasculaires cérébrales. De plus, nos études permettent d'obtenir plus d'informations sur l'impact de l'athérosclérose, le facteur de risque le plus important pour le développement des AVC, sur la fonction endothéliale cérébrale. Nous avons été capables de renverser les effets néfastes du TXA_2 et du stress oxydant sur la fonction endothéliale vasculaire par un traitement chronique à la catéchine. Le traitement ayant aussi eu des effets bénéfiques sur le débit sanguin cérébral et la fonction cognitive, nous pouvons émettre l'hypothèse selon laquelle un inhibiteur de TXA_2 pourrait avoir non seulement des effets bénéfiques sur le développement des AVC en présence d'athérosclérose mais aussi sur le déclin du débit sanguin cérébral et des fonctions cognitives présentant ainsi une nouvelle avenue de traitement au niveau cérébral.

Toutefois, en considérant les études effectuées, il serait très intéressant d'aller mesurer l'implication des neurones et des astrocytes dans le contrôle de la fonction vasculaire cérébrale. De plus, il serait intéressant de mesurer l'influence de

l'athérosclérose sur ces types cellulaires. En effet, je crois que mes études ont montré que l'unité neurovasculaire joue un rôle central dans la régulation des fonctions cérébrales. L'impact des cellules endothéliales est non négligeable, toutefois, nous devons considérer les autres types cellulaires cérébraux qui pourraient, *in vivo*, influencer le contrôle de l'hyperémie fonctionnelle. Comme le stress oxydant est impliqué dans le développement des maladies neurodégénératives, il me semble très important de déterminer l'impact des DRO sur les autres types cellulaires impliqués dans le contrôle du débit sanguin.

Les effets des antioxydants au niveau cérébral ont été très importants. Tel que discuté précédemment, la catéchine pourrait avoir des effets autres que la simple inactivation des composés radicalaires. Or, je crois qu'il serait opportun d'effectuer les mêmes études avec un composé ayant seulement des propriétés antioxydantes tel que le N-acétylcystéine. Ces études permettraient de déterminer si les DRO sont au centre de tous ces effets ou bien si les effets anti-thrombogéniques et anti-plaquettaires de la catéchine font d'elle un composé unique ayant des effets bénéfiques marqués autant au niveau périphérique que central dans un contexte d'athérosclérose.

Finalement, tel que discuté précédemment, il faudrait effectuer un traitement chronique avec un inhibiteur du récepteur du TXA₂ et voir les effets sur la fonction cognitive. Selon mes études, je crois qu'il serait bénéfique, dans un contexte d'athérosclérose, d'utiliser un inhibiteur du TXA₂ afin de prévenir les complications au niveau cérébral. Comme l'athérosclérose est un facteur de risque majeur pour le développement des AVC, non seulement l'inhibiteur du TXA₂ pourrait diminuer les récurrences d'événements cardiovasculaires, et peut-être même, diminuer les complications associées à l'athérosclérose.

En somme, toutes ces études mèneraient à une compréhension plus approfondie du mécanisme de régulation du débit sanguin cérébral ainsi que de son évolution à travers l'âge et les maladies. Nous pourrions ainsi trouver une nouvelle avenue de traitement et, peut-être, prévenir les complications associées à l'athérosclérose telles que l'AVC et le développement de maladie neurodégénératives.

Références

7 Bibliographie

- Abbott NJ, Ronnback L , Hansson E (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci.* **7**, 41-53.
- Abe M, Reiter RJ, Orhii PB, Hara M , Poeggeler B (1994). Inhibitory effect of melatonin on cataract formation in newborn rats: evidence for an antioxidative role for melatonin. *J Pineal Res.* **17**, 94-100.
- Adibhatla RM , Hatcher JF (2008). Altered Lipid Metabolism in Brain Injury and Disorders. *Subcell Biochem.* **48**, nihpa41041.
- Allen NJ , Barres BA (2009). Neuroscience: Glia - more than just brain glue. *Nature.* **457**, 675-677.
- Allroggen H , Abbott RJ (2000). Cerebral venous sinus thrombosis. *Postgrad Med J.* **76**, 12-15.
- Alp NJ , Channon KM (2004). Regulation of endothelial nitric oxide synthase by tetrahydrobiopterin in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **24**, 413-420.
- Ames BN, Shigenaga MK , Hagen TM (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**, 7915-7922.
- Andresen J, Shafi NI , Bryan RM, Jr. (2006). Endothelial influences on cerebrovascular tone. *J Appl Physiol.* **100**, 318-327.
- Andriambeloson E, Stoclet JC , Andriantsitohaina R (1999). Mechanism of endothelial nitric oxide-dependent vasorelaxation induced by wine polyphenols in rat thoracic aorta. *J Cardiovasc Pharmacol.* **33**, 248-254.
- Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H , Nakanishi S (1990). Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature.* **348**, 730-732.
- Ardailou R (1999). Angiotensin II receptors. *J Am Soc Nephrol.* **10 Suppl 11**, S30-39.
- Ardanaz N , Pagano PJ (2006). Hydrogen peroxide as a paracrine vascular mediator: regulation and signaling leading to dysfunction. *Exp Biol Med (Maywood).* **231**, 237-251.
- Babu PV , Liu D (2008). Green tea catechins and cardiovascular health: an update. *Curr Med Chem.* **15**, 1840-1850.
- Babu PV, Sabitha KE , Shyamaladevi CS (2006). Therapeutic effect of green tea extract on advanced glycation and cross-linking of collagen in the aorta of streptozotocin diabetic rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* **33**, 351-357.
- Bagi Z, Ungvari Z, Szollar L , Koller A (2001). Flow-induced constriction in arterioles of hyperhomocysteinemic rats is due to impaired nitric oxide and enhanced thromboxane A(2) mediation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **21**, 233-237.
- Barlow-Walden LR, Reiter RJ, Abe M, Pablos M, Menendez-Pelaez A, Chen LD , Poeggeler B (1995). Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity. *Neurochem Int.* **26**, 497-502.
- Barouki R (2006). [Ageing free radicals and cellular stress]. *Med Sci (Paris).* **22**, 266-272.
- Baud O, Haynes RF, Wang H, Folkerth RD, Li J, Volpe JJ , Rosenberg PA (2004). Developmental up-regulation of MnSOD in rat oligodendrocytes confers protection against oxidative injury. *Eur J Neurosci.* **20**, 29-40.
- Bayliss V (1902). On the local reactions of the arterial wall to changes of internal pressure. *J Physiol.* **28**, 220-231.

- Bedard K , Krause KH (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* **87**, 245-313.
- Beitz A, Perova N, Nikitina N, Beitz J, Scherbakova I, Giessler C , Mest HJ (1993). Lipoproteins from normolipidemic and dyslipidemic subjects modify the thromboxane A2 generation by platelets in clotting human blood. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* **48**, 475-479.
- Berliner JA, Territo MC, Sevanian A, Ramin S, Kim JA, Bamshad B, Esterson M , Fogelman AM (1990). Minimally modified low density lipoprotein stimulates monocyte endothelial interactions. *J Clin Invest.* **85**, 1260-1266.
- Bevan JA , Henrion D (1994). Pharmacological implications of the flow-dependence of vascular smooth muscle tone. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **34**, 173-190.
- Bevan JA , Laher I (1991). Pressure and flow-dependent vascular tone. *FASEB J.* **5**, 2267-2273.
- Biesalski HK (2002). Free radical theory of aging. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* **5**, 5-10.
- Bos CL, Richel DJ, Ritsema T, Peppelenbosch MP , Versteeg HH (2004). Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction. *Int J Biochem Cell Biol.* **36**, 1187-1205.
- Bousser MG, Amarenco P, Chamorro A, Fisher M, Ford I, Fox K, Hennerici M, Mattle HP , Rothwell PM (2009). The Prevention of cerebrovascular and cardiovascular Events of ischemic origin with teRutroban in patients with a history oF ischemic strOke or tRansient ischeMic attack (PERFORM) study: baseline characteristics of the population. *Cerebrovasc Dis.* **27**, 608-613.
- Boyle EM, Jr., Lille ST, Allaire E, Clowes AW , Verrier ED (1997). Endothelial cell injury in cardiovascular surgery: atherosclerosis. *Ann Thorac Surg.* **63**, 885-894.
- Brandes RP, Fleming I , Busse R (2005). Endothelial aging. *Cardiovasc Res.* **66**, 286-294.
- Brayden JE, Earley S, Nelson MT , Reading S (2008). Transient receptor potential (TRP) channels, vascular tone and autoregulation of cerebral blood flow. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* **35**, 1116-1120.
- Brett J, Schmidt AM, Yan SD, Zou YS, Weidman E, Pinsky D, Nowygrod R, Nepper M, Przysiecki C, Shaw A , et al. (1993). Survey of the distribution of a newly characterized receptor for advanced glycation end products in tissues. *Am J Pathol.* **143**, 1699-1712.
- Brouillette J , Quirion R (2008). The common environmental pollutant dioxin-induced memory deficits by altering estrogen pathways and a major route of retinol transport involving transthyretin. *Neurotoxicology.* **29**, 318-327.
- Brownlee M, Vlassara H , Cerami A (1984). Nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications. *Ann Intern Med.* **101**, 527-537.
- Bruckdorfer R (2005). The basics about nitric oxide. *Mol Aspects Med.* **26**, 3-31.
- Bryan RM, Jr., Marrelli SP, Steenberg ML, Schildmeyer LA , Johnson TD (2001). Effects of luminal shear stress on cerebral arteries and arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **280**, H2011-2022.
- Cai H (2005). Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: origins, mechanisms, and consequences. *Cardiovasc Res.* **68**, 26-36.
- Campbell WB, Gebremedhin D, Pratt PF , Harder DR (1996). Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Circ Res.* **78**, 415-423.
- Candelario-Jalil E , Fiebich BL (2008). Cyclooxygenase inhibition in ischemic brain injury. *Curr Pharm Des.* **14**, 1401-1418.

- Cardell LO, Uddman R, Edvinsson L (1994). Endothelins: a role in cerebrovascular disease? *Cephalalgia*. **14**, 259-265.
- Carey BJ, Eames PJ, Blake MJ, Panerai RB, Potter JF (2000). Dynamic cerebral autoregulation is unaffected by aging. *Stroke*. **31**, 2895-2900.
- Carter CJ (2007). Convergence of genes implicated in Alzheimer's disease on the cerebral cholesterol shuttle: APP, cholesterol, lipoproteins, and atherosclerosis. *Neurochem Int*. **50**, 12-38.
- Cayatte AJ, Du Y, Oliver-Krasinski J, Lavielle G, Verbeuren TJ, Cohen RA (2000). The thromboxane receptor antagonist S18886 but not aspirin inhibits atherogenesis in apo E-deficient mice: evidence that eicosanoids other than thromboxane contribute to atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **20**, 1724-1728.
- Cernadas MR, Sanchez de Miguel L, Garcia-Duran M, Gonzalez-Fernandez F, Millas I, Monton M, Rodrigo J, Rico L, Fernandez P, de Frutos T, Rodriguez-Feo JA, Guerra J, Caramelo C, Casado S, Lopez F (1998). Expression of constitutive and inducible nitric oxide synthases in the vascular wall of young and aging rats. *Circ Res*. **83**, 279-286.
- Chamorro A (2009). TP receptor antagonism: a new concept in atherothrombosis and stroke prevention. *Cerebrovasc Dis*. **27 Suppl 3**, 20-27.
- Chan P, Cheng JT, Tsai JC, Lien GS, Chen FC, Kao PF, Liu JC, Chen YJ, Hsieh MH (2002). Effect of catechin on the activity and gene expression of superoxide dismutase in cultured rat brain astrocytes. *Neurosci Lett*. **328**, 281-284.
- Chan SL, Capdeville-Atkinson C, Atkinson J (2008). Red wine polyphenols improve endothelium-dependent dilation in rat cerebral arterioles. *J Cardiovasc Pharmacol*. **51**, 553-558.
- Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, Simmons DL (2002). COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **99**, 13926-13931.
- Chaudiere J, Ferrari-Iliou R (1999). Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food Chem Toxicol*. **37**, 949-962.
- Chaytor AT, Edwards DH, Bakker LM, Griffith TM (2003). Distinct hyperpolarizing and relaxant roles for gap junctions and endothelium-derived H₂O₂ in NO-independent relaxations of rabbit arteries. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **100**, 15212-15217.
- Cheng Y, Austin SC, Rocca B, Koller BH, Coffman TM, Grosser T, Lawson JA, FitzGerald GA (2002). Role of prostacyclin in the cardiovascular response to thromboxane A₂. *Science*. **296**, 539-541.
- Choi JH, Chang HW, Rhee SJ (2002). Effect of green tea catechin on arachidonic acid cascade in chronic cadmium-poisoned rats. *Asia Pac J Clin Nutr*. **11**, 292-297.
- Chrissobolis S, Faraci FM (2008). The role of oxidative stress and NADPH oxidase in cerebrovascular disease. *Trends Mol Med*. **14**, 495-502.
- Cipolla MJ (2007). Cerebrovascular function in pregnancy and eclampsia. *Hypertension*. **50**, 14-24.
- Cipollone F, Fazio ML (2006). COX-2 and atherosclerosis. *J Cardiovasc Pharmacol*. **47 Suppl 1**, S26-36.
- Collins AR, Lyon CJ, Xia X, Liu JZ, Tangirala RK, Yin F, Boyadjian R, Bikineyeva A, Pratico D, Harrison DG, Hsueh WA (2009a). Age-accelerated atherosclerosis correlates with failure to upregulate antioxidant genes. *Circ Res*. **104**, e42-54.
- Collins AR, Lyon CJ, Xia X, Liu JZ, Tangirala RK, Yin F, Boyadjian R, Bikineyeva A, Pratico D, Harrison DG, Hsueh WA (2009b). Age-Accelerated Atherosclerosis Correlates With Failure to Upregulate Antioxidant Genes. *Circ Res*.

- Collins R, Armitage J, Parish S, Sleight P, Peto R (2004). Effects of cholesterol-lowering with simvastatin on stroke and other major vascular events in 20536 people with cerebrovascular disease or other high-risk conditions. *Lancet*. **363**, 757-767.
- Corder R, Douthwaite JA, Lees DM, Khan NQ, Viseu Dos Santos AC, Wood EG, Carrier MJ (2001). Endothelin-1 synthesis reduced by red wine. *Nature*. **414**, 863-864.
- Crawford RS, Kirk EA, Rosenfeld ME, LeBoeuf RC, Chait A (1998). Dietary antioxidants inhibit development of fatty streak lesions in the LDL receptor-deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **18**, 1506-1513.
- Crimi E, Ignarro LJ, Napoli C (2007). Microcirculation and oxidative stress. *Free Radic Res*. **41**, 1364-1375.
- Croce K, Libby P (2007). Intertwining of thrombosis and inflammation in atherosclerosis. *Curr Opin Hematol*. **14**, 55-61.
- Crossman AR, Neavy D (2004). *Neuroanatomie*: Elsevier SAS.
- Csiszar A, Labinsky N, Orosz Z, Xiangmin Z, Buffenstein R, Ungvari Z (2007). Vascular aging in the longest-living rodent, the naked mole rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **293**, H919-927.
- Csiszar A, Ungvari Z, Edwards JG, Kaminski P, Wolin MS, Koller A, Kaley G (2002). Aging-induced phenotypic changes and oxidative stress impair coronary arteriolar function. *Circ Res*. **90**, 1159-1166.
- Cui K, Luo X, Xu K, Ven Murthy MR (2004). Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. **28**, 771-799.
- Da Re P, Verlicchi L, Setnikar I, Murmann W, Magistretti MJ (1959). N-Substituted 7-methoxy-8-aminomethyl-chromones and flavones: new brain-stem stimulants. *Nature*. **184(Suppl 6)**, 362-363.
- Dani JW, Chernjavsky A, Smith SJ (1992). Neuronal activity triggers calcium waves in hippocampal astrocyte networks. *Neuron*. **8**, 429-440.
- Davis MJ, Hill MA (1999). Signaling mechanisms underlying the vascular myogenic response. *Physiol Rev*. **79**, 387-423.
- de la Torre JC (2002). Alzheimer disease as a vascular disorder: nosological evidence. *Stroke*. **33**, 1152-1162.
- De Mey JG, Vanhoutte PM (1982). Heterogeneous behavior of the canine arterial and venous wall. Importance of the endothelium. *Circ Res*. **51**, 439-447.
- de Nigris F, Williams-Ignarro S, Sica V, Lerman LO, D'Armiento FP, Byrns RE, Casamassimi A, Carpentiero D, Schiano C, Sumi D, Fiorito C, Ignarro LJ, Napoli C (2007). Effects of a pomegranate fruit extract rich in punicalagin on oxidation-sensitive genes and eNOS activity at sites of perturbed shear stress and atherogenesis. *Cardiovasc Res*. **73**, 414-423.
- Dickinson DA, Forman HJ (2002). Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochem Pharmacol*. **64**, 1019-1026.
- Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM (1999). Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*. **399**, 601-605.
- Dohadwala MM, Vita JA (2009). Grapes and cardiovascular disease. *J Nutr*. **139**, 1788S-1793S.
- Donato AJ, Eskurza I, Silver AE, Levy AS, Pierce GL, Gates PE, Seals DR (2007). Direct evidence of endothelial oxidative stress with aging in humans: relation to impaired endothelium-dependent dilation and upregulation of nuclear factor-kappaB. *Circ Res*. **100**, 1659-1666.

- Dostmann WR, Taylor MS, Nickl CK, Brayden JE, Frank R , Tegge WJ (2000). Highly specific, membrane-permeant peptide blockers of cGMP-dependent protein kinase I α inhibit NO-induced cerebral dilation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **97**, 14772-14777.
- Dougall WC , Nick HS (1991). Manganese superoxide dismutase: a hepatic acute phase protein regulated by interleukin-6 and glucocorticoids. *Endocrinology*. **129**, 2376-2384.
- Drake CT , Iadecola C (2007). The role of neuronal signaling in controlling cerebral blood flow. *Brain Lang*. **102**, 141-152.
- Droge W (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. **82**, 47-95.
- Drouin A, Gendron ME, Thorin E, Gillis MA, Mahlberg-Gaudin F , Tardif JC (2008). Chronic heart rate reduction by ivabradine prevents endothelial dysfunction in dyslipidaemic mice. *Br J Pharmacol*. **154**, 749-757.
- Drouin A , Thorin E (2009). Flow-induced dilation is mediated by Akt-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase-derived hydrogen peroxide in mouse cerebral arteries. *Stroke*. **40**, 1827-1833.
- Drouin A, Thorin-Trescases N, Hamel E, Falck JR , Thorin E (2007). Endothelial nitric oxide synthase activation leads to dilatory H₂O₂ production in mouse cerebral arteries. *Cardiovasc Res*. **73**, 73-81.
- Dufouil C, Richard F, Fievet N, Dartigues JF, Ritchie K, Tzourio C, Amouyel P , Alperovitch A (2005). APOE genotype, cholesterol level, lipid-lowering treatment, and dementia: the Three-City Study. *Neurology*. **64**, 1531-1538.
- Ebadi M , Sharma S (2006). Metallothioneins 1 and 2 attenuate peroxynitrite-induced oxidative stress in Parkinson disease. *Exp Biol Med (Maywood)*. **231**, 1576-1583.
- Edvinsson L, Hardebo JE , Owman C (1979). Effects of angiotensin II on cerebral blood vessels. *Acta Physiol Scand*. **105**, 381-383.
- Edwards G, Dora KA, Gardener MJ, Garland CJ , Weston AH (1998). K⁺ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature*. **396**, 269-272.
- Fang X, Faraci FM, Kaduce TL, Harmon S, Modrick ML, Hu S, Moore SA, Falck JR, Weintraub NL , Spector AA (2006). 20-Hydroxyeicosatetraenoic acid is a potent dilator of mouse basilar artery: role of cyclooxygenase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **291**, H2301-2307.
- Faraci FM (1992). Regulation of the cerebral circulation by endothelium. *Pharmacol Ther*. **56**, 1-22.
- Faraci FM (2006). Reactive oxygen species: influence on cerebral vascular tone. *J Appl Physiol*. **100**, 739-743.
- Faraci FM , Didion SP (2004). Vascular protection: superoxide dismutase isoforms in the vessel wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **24**, 1367-1373.
- Faraci FM , Heistad DD (1990). Regulation of large cerebral arteries and cerebral microvascular pressure. *Circ Res*. **66**, 8-17.
- Faraci FM, Sobey CG, Chrissobolis S, Lund DD, Heistad DD , Weintraub NL (2001). Arachidonate dilates basilar artery by lipoxygenase-dependent mechanism and activation of K⁽⁺⁾ channels. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. **281**, R246-253.
- Feletou M , Vanhoutte PM (2006). Endothelium-derived hyperpolarizing factor: where are we now? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **26**, 1215-1225.
- Feletou M , Vanhoutte PM (2009). EDHF: an update. *Clin Sci (Lond)*. **117**, 139-155.
- Feletou M, Verbeuren TJ , Vanhoutte PM (2009). Endothelium-dependent contractions in SHR: a tale of prostanoid TP and IP receptors. *Br J Pharmacol*. **156**, 563-574.

- Feterik K, Smith L , Katusic ZS (2000). Angiotensin-(1-7) causes endothelium-dependent relaxation in canine middle cerebral artery. *Brain Res.* **873**, 75-82.
- Filosa JA , Blanco VM (2007). Neurovascular coupling in the mammalian brain. *Exp Physiol.* **92**, 641-646.
- Filosa JA, Bonev AD, Straub SV, Meredith AL, Wilkerson MK, Aldrich RW , Nelson MT (2006). Local potassium signaling couples neuronal activity to vasodilation in the brain. *Nat Neurosci.* **9**, 1397-1403.
- Fisher AB, Chien S, Barakat AI , Nerem RM (2001). Endothelial cellular response to altered shear stress. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **281**, L529-533.
- Fitzgerald GA (2004). Coxibs and cardiovascular disease. *N Engl J Med.* **351**, 1709-1711.
- Fleming I , Busse R (1999a). NO: the primary EDRF. *J Mol Cell Cardiol.* **31**, 5-14.
- Fleming I , Busse R (1999b). Signal transduction of eNOS activation. *Cardiovasc Res.* **43**, 532-541.
- Flohe L, Gunzler WA , Schock HH (1973). Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS Lett.* **32**, 132-134.
- Fowler SB, Kelly M, Ruh D , Johnson-Wells D (2006). Management of lipid disorders for stroke prevention. *J Neurosci Nurs.* **38**, 282-287, 295.
- Francis ST, Head K, Morris PG , Macdonald IA (2006). The effect of flavanol-rich cocoa on the fMRI response to a cognitive task in healthy young people. *J Cardiovasc Pharmacol.* **47 Suppl 2**, S215-220.
- Frei B (1991). Ascorbic acid protects lipids in human plasma and low-density lipoprotein against oxidative damage. *Am J Clin Nutr.* **54**, 1113S-1118S.
- Fujii K, Heistad DD , Faraci FM (1992). Effect of diabetes mellitus on flow-mediated and endothelium-dependent dilatation of the rat basilar artery. *Stroke.* **23**, 1494-1498.
- Furchgott RF , Zawadzki JV (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* **288**, 373-376.
- Galluzzi S, Beltramello A, Filippi M , Frisoni GB (2008). Aging. *Neurol Sci.* **29 Suppl 3**, 296-300.
- Garthwaite J, Charles SL , Chess-Williams R (1988). Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature.* **336**, 385-388.
- Gebremedhin D, Lange AR, Lowry TF, Taheri MR, Birks EK, Hudetz AG, Narayanan J, Falck JR, Okamoto H, Roman RJ, Nithipatikom K, Campbell WB , Harder DR (2000). Production of 20-HETE and its role in autoregulation of cerebral blood flow. *Circ Res.* **87**, 60-65.
- Gebremedhin D, Lange AR, Narayanan J, Aebly MR, Jacobs ER , Harder DR (1998). Cat cerebral arterial smooth muscle cells express cytochrome P450 4A2 enzyme and produce the vasoconstrictor 20-HETE which enhances L-type Ca²⁺ current. *J Physiol.* **507 (Pt 3)**, 771-781.
- Gelosa P, Pignieri A, Fandriks L, de Gasparo M, Hallberg A, Banfi C, Castiglioni L, Turolo L, Guerrini U, Tremoli E , Sironi L (2009). Stimulation of AT2 receptor exerts beneficial effects in stroke-prone rats: focus on renal damage. *J Hypertens.* **27**, 2444-2451.
- Gendron ME , Thorin E (2007). A change in the redox environment and thromboxane A2 production precede endothelial dysfunction in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **293**, H2508-2515.
- Gendron ME, Thorin-Trescases N, Villeneuve L , Thorin E (2007). Aging associated with mild dyslipidemia reveals that COX-2 preserves dilation despite endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **292**, H451-458.

- Ghosh D , Scheepens A (2009). Vascular action of polyphenols. *Mol Nutr Food Res.* **53**, 322-331.
- Girouard H, Bonev AD, Hannah RM, Meredith A, Aldrich RW , Nelson MT Astrocytic endfoot Ca²⁺ and BK channels determine both arteriolar dilation and constriction. *Proc Natl Acad Sci U S A.*
- Girouard H , Iadecola C (2006). Neurovascular coupling in the normal brain and in hypertension, stroke, and Alzheimer disease. *J Appl Physiol.* **100**, 328-335.
- Girouard H, Park L, Anrather J, Zhou P , Iadecola C (2006). Angiotensin II attenuates endothelium-dependent responses in the cerebral microcirculation through nox-2-derived radicals. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **26**, 826-832.
- Guyton AC , Hall JE (2000). *Textbook of medical physiology*: W.B. Saunders Company.
- Haag MD, Hofman A, Koudstaal PJ, Stricker BH , Breteler MM (2009). Statins are associated with a reduced risk of Alzheimer disease regardless of lipophilicity. The Rotterdam Study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* **80**, 13-17.
- Haas C, Cazorla P, Miguel CD, Valdivieso F , Vazquez J (1997). Apolipoprotein E forms stable complexes with recombinant Alzheimer's disease beta-amyloid precursor protein. *Biochem J.* **325 (Pt 1)**, 169-175.
- Hamdheydari L, Christov A, Ottman T, Hensley K , Grammas P (2003). Oxidized LDLs affect nitric oxide and radical generation in brain endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **311**, 486-490.
- Hamel E (2006). Perivascular nerves and the regulation of cerebrovascular tone. *J Appl Physiol.* **100**, 1059-1064.
- Hamel E, Nicolakakis N, Aboulkassim T, Ongali B , Tong XK (2008). Oxidative stress and cerebrovascular dysfunction in mouse models of Alzheimer's disease. *Exp Physiol.* **93**, 116-120.
- Haque AM, Hashimoto M, Katakura M, Tanabe Y, Hara Y , Shido O (2006). Long-term administration of green tea catechins improves spatial cognition learning ability in rats. *J Nutr.* **136**, 1043-1047.
- Harder DR (1984). Pressure-dependent membrane depolarization in cat middle cerebral artery. *Circ Res.* **55**, 197-202.
- Harman D (1957). Prolongation of the normal life span by radiation protection chemicals. *J Gerontol.* **12**, 257-263.
- Harman D (1993). Free radical involvement in aging. Pathophysiology and therapeutic implications. *Drugs Aging.* **3**, 60-80.
- Harman D (2001). Aging: overview. *Ann N Y Acad Sci.* **928**, 1-21.
- Harman D (2006). Alzheimer's disease pathogenesis: role of aging. *Ann N Y Acad Sci.* **1067**, 454-460.
- Hatake K, Kakishita E, Wakabayashi I, Sakiyama N , Hishida S (1990). Effect of aging on endothelium-dependent vascular relaxation of isolated human basilar artery to thrombin and bradykinin. *Stroke.* **21**, 1039-1043.
- Hatoum OA, Binion DG, Miura H, Telford G, Otterson MF , Gutterman DD (2005). Role of hydrogen peroxide in ACh-induced dilation of human submucosal intestinal microvessels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **288**, H48-54.
- Hatoum OA, Otterson MF, Kopelman D, Miura H, Sukhotnik I, Larsen BT, Selle RM, Moulder JE , Gutterman DD (2006). Radiation induces endothelial dysfunction in murine intestinal arterioles via enhanced production of reactive oxygen species. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **26**, 287-294.
- Hawkins BT , Davis TP (2005). The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev.* **57**, 173-185.
- Hayek T, Fuhrman B, Vaya J, Rosenblat M, Belinky P, Coleman R, Elis A , Aviram M (1997). Reduced progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice

- following consumption of red wine, or its polyphenols quercetin or catechin, is associated with reduced susceptibility of LDL to oxidation and aggregation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **17**, 2744-2752.
- Heitzer T, Yla Herttuala S, Wild E, Luoma J, Drexler H (1999). Effect of vitamin E on endothelial vasodilator function in patients with hypercholesterolemia, chronic smoking or both. *J Am Coll Cardiol.* **33**, 499-505.
- Henrion D (2005). Pressure and flow-dependent tone in resistance arteries. Role of myogenic tone. *Arch Mal Coeur Vaiss.* **98**, 913-921.
- Hensley K, Hall N, Subramaniam R, Cole P, Harris M, Aksenov M, Aksenova M, Gabbita SP, Wu JF, Carney JM, et al. (1995). Brain regional correspondence between Alzheimer's disease histopathology and biomarkers of protein oxidation. *J Neurochem.* **65**, 2146-2156.
- Herrmann J, Lerman A (2001). The endothelium: dysfunction and beyond. *J Nucl Cardiol.* **8**, 197-206.
- Hoang T, Choi DK, Nagai M, Wu DC, Nagata T, Prou D, Wilson GL, Vila M, Jackson-Lewis V, Dawson VL, Dawson TM, Chesselet MF, Przedborski S (2009). Neuronal NOS and cyclooxygenase-2 contribute to DNA damage in a mouse model of Parkinson disease. *Free Radic Biol Med.* **47**, 1049-1056.
- Hong JT, Ryu SR, Kim HJ, Lee JK, Lee SH, Kim DB, Yun YP, Ryu JH, Lee BM, Kim PY (2000a). Neuroprotective effect of green tea extract in experimental ischemia-reperfusion brain injury. *Brain Res Bull.* **53**, 743-749.
- Hong JT, Ryu SR, Kim HJ, Lee SH, Lee BM, Kim PY (2000b). Involvement of cortical damage in the ischemia/reperfusion-induced memory impairment of Wistar rats. *Arch Pharm Res.* **23**, 413-417.
- Hoozemans JJ, Rozemuller JM, van Haastert ES, Veerhuis R, Eikelenboom P (2008). Cyclooxygenase-1 and -2 in the different stages of Alzheimer's disease pathology. *Curr Pharm Des.* **14**, 1419-1427.
- Huang A, Vita JA, Venema RC, Keaney JF, Jr. (2000). Ascorbic acid enhances endothelial nitric-oxide synthase activity by increasing intracellular tetrahydrobiopterin. *J Biol Chem.* **275**, 17399-17406.
- Huang PL, Huang Z, Mashimo H, Bloch KD, Moskowitz MA, Bevan JA, Fishman MC (1995). Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature.* **377**, 239-242.
- Huang Z, Huang PL, Ma J, Meng W, Ayata C, Fishman MC, Moskowitz MA (1996). Enlarged infarcts in endothelial nitric oxide synthase knockout mice are attenuated by nitro-L-arginine. *J Cereb Blood Flow Metab.* **16**, 981-987.
- Hussain T, Gupta S, Adhami VM, Mukhtar H (2005). Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate selectively inhibits COX-2 without affecting COX-1 expression in human prostate carcinoma cells. *Int J Cancer.* **113**, 660-669.
- Iadecola C (2004). Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci.* **5**, 347-360.
- Iadecola C, Davisson RL (2008). Hypertension and cerebrovascular dysfunction. *Cell Metab.* **7**, 476-484.
- Iadecola C, Nedergaard M (2007). Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nat Neurosci.* **10**, 1369-1376.
- Iadecola C, Zhang F (1996). Permissive and obligatory roles of NO in cerebrovascular responses to hypercapnia and acetylcholine. *Am J Physiol.* **271**, R990-1001.
- Iadecola C, Zhang F, Niwa K, Eckman C, Turner SK, Fischer E, Younkin S, Borchelt DR, Hsiao KK, Carlson GA (1999). SOD1 rescues cerebral endothelial dysfunction in mice overexpressing amyloid precursor protein. *Nat Neurosci.* **2**, 157-161.

- Iida Y , Katusic ZS (2000). Mechanisms of cerebral arterial relaxations to hydrogen peroxide. *Stroke*. **31**, 2224-2230.
- in 't Veld BA, Launer LJ, Hoes AW, Ott A, Hofman A, Breteler MM , Stricker BH (1998). NSAIDs and incident Alzheimer's disease. The Rotterdam Study. *Neurobiol Aging*. **19**, 607-611.
- Iniguez MA, Cacheiro-Llaguno C, Cuesta N, Diaz-Munoz MD , Fresno M (2008). Prostanoid function and cardiovascular disease. *Arch Physiol Biochem*. **114**, 201-209.
- Inoue R, Morita H , Ito Y (2004). Newly emerging Ca²⁺ entry channel molecules that regulate the vascular tone. *Expert Opin Ther Targets*. **8**, 321-334.
- Ishikawa M, Stokes KY, Zhang JH, Nanda A , Granger DN (2004). Cerebral microvascular responses to hypercholesterolemia: roles of NADPH oxidase and P-selectin. *Circ Res*. **94**, 239-244.
- Jeong YI, Jung ID, Lee JS, Lee CM, Lee JD , Park YM (2007). (-)-Epigallocatechin gallate suppresses indoleamine 2,3-dioxygenase expression in murine dendritic cells: evidences for the COX-2 and STAT1 as potential targets. *Biochem Biophys Res Commun*. **354**, 1004-1009.
- Joannides R, Haefeli WE, Linder L, Richard V, Bakkali EH, Thuillez C , Luscher TF (1995). Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation*. **91**, 1314-1319.
- Joseph JA, Shukitt-Hale B , Willis LM (2009). Grape juice, berries, and walnuts affect brain aging and behavior. *J Nutr*. **139**, 1813S-1817S.
- Kalaria RN (1996). Cerebral vessels in ageing and Alzheimer's disease. *Pharmacol Ther*. **72**, 193-214.
- Kaliora AC, Dedoussis GV , Schmidt H (2006). Dietary antioxidants in preventing atherogenesis. *Atherosclerosis*. **187**, 1-17.
- Katusic ZS (2007). Mechanisms of endothelial dysfunction induced by aging: role of arginase I. *Circ Res*. **101**, 640-641.
- Katusic ZS, Shepherd JT , Vanhoutte PM (1988). Endothelium-dependent contractions to calcium ionophore A23187, arachidonic acid, and acetylcholine in canine basilar arteries. *Stroke*. **19**, 476-479.
- Katusic ZS , Vanhoutte PM (1989). Superoxide anion is an endothelium-derived contracting factor. *Am J Physiol*. **257**, H33-37.
- Kawashima S , Yokoyama M (2004). Dysfunction of endothelial nitric oxide synthase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **24**, 998-1005.
- Khan N , Mukhtar H (2007). Tea polyphenols for health promotion. *Life Sci*. **81**, 519-533.
- Khan SG, Katiyar SK, Agarwal R , Mukhtar H (1992). Enhancement of antioxidant and phase II enzymes by oral feeding of green tea polyphenols in drinking water to SKH-1 hairless mice: possible role in cancer chemoprevention. *Cancer Res*. **52**, 4050-4052.
- Kidd PM (2008). Alzheimer's disease, amnesic mild cognitive impairment, and age-associated memory impairment: current understanding and progress toward integrative prevention. *Altern Med Rev*. **13**, 85-115.
- Kim CY, Lee C, Park GH , Jang JH (2009). Neuroprotective effect of epigallocatechin-3-gallate against beta-amyloid-induced oxidative and nitrosative cell death via augmentation of antioxidant defense capacity. *Arch Pharm Res*. **32**, 869-881.
- Kimura M, Umegaki K, Kasuya Y, Sugisawa A , Higuchi M (2002). The relation between single/double or repeated tea catechin ingestions and plasma antioxidant activity in humans. *Eur J Clin Nutr*. **56**, 1186-1193.
- Kirkwood TB (2005). Understanding the odd science of aging. *Cell*. **120**, 437-447.

- Kis B, Chen L, Ueta Y, Busija DW (2006). Autocrine peptide mediators of cerebral endothelial cells and their role in the regulation of blood-brain barrier. *Peptides*. **27**, 211-222.
- Kis B, Snipes JA, Simandle SA, Busija DW (2005). Acetaminophen-sensitive prostaglandin production in rat cerebral endothelial cells. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. **288**, R897-902.
- Kiziltepe U, Turan NN, Han U, Ulus AT, Akar F (2004). Resveratrol, a red wine polyphenol, protects spinal cord from ischemia-reperfusion injury. *J Vasc Surg*. **40**, 138-145.
- Kobayashi T, Tahara Y, Matsumoto M, Iguchi M, Sano H, Murayama T, Arai H, Oida H, Yurugi-Kobayashi T, Yamashita JK, Katagiri H, Majima M, Yokode M, Kita T, Narumiya S (2004). Roles of thromboxane A₂ and prostacyclin in the development of atherosclerosis in apoE-deficient mice. *J Clin Invest*. **114**, 784-794.
- Koehler RC, Gebremedhin D, Harder DR (2006). Role of astrocytes in cerebrovascular regulation. *J Appl Physiol*. **100**, 307-317.
- Koehler RC, Roman RJ, Harder DR (2009). Astrocytes and the regulation of cerebral blood flow. *Trends Neurosci*. **32**, 160-169.
- Koller A, Sun D, Huang A, Kaley G (1994). Corelease of nitric oxide and prostaglandins mediates flow-dependent dilation of rat gracilis muscle arterioles. *Am J Physiol*. **267**, H326-332.
- Koller A, Sun D, Kaley G (1993). Role of shear stress and endothelial prostaglandins in flow- and viscosity-induced dilation of arterioles in vitro. *Circ Res*. **72**, 1276-1284.
- Komatani A, Yamaguchi K, Sugai Y, Takanashi T, Kera M, Shinohara M, Kawakatsu S (1988). Assessment of demented patients by dynamic SPECT of inhaled xenon-133. *J Nucl Med*. **29**, 1621-1626.
- Kono S, Shinchi K, Wakabayashi K, Honjo S, Todoroki I, Sakurai Y, Imanishi K, Nishikawa H, Ogawa S, Katsurada M (1996). Relation of green tea consumption to serum lipids and lipoproteins in Japanese men. *J Epidemiol*. **6**, 128-133.
- Kregel KC, Zhang HJ (2007). An integrated view of oxidative stress in aging: basic mechanisms, functional effects, and pathological considerations. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. **292**, R18-36.
- Krimer LS, Muly EC, 3rd, Williams GV, Goldman-Rakic PS (1998). Dopaminergic regulation of cerebral cortical microcirculation. *Nat Neurosci*. **1**, 286-289.
- Krummen S, Drouin A, Gendron ME, Falck JR, Thorin E (2006). ROS-sensitive cytochrome P450 activity maintains endothelial dilatation in ageing but is transitory in dyslipidaemic mice. *Br J Pharmacol*. **147**, 897-904.
- Krummen S, Falck JR, Thorin E (2005). Two distinct pathways account for EDHF-dependent dilatation in the gracilis artery of dyslipidaemic hApoB^{+/+} mice. *Br J Pharmacol*. **145**, 264-270.
- Kuhlencordt PJ, Chen J, Han F, Astern J, Huang PL (2001). Genetic deficiency of inducible nitric oxide synthase reduces atherosclerosis and lowers plasma lipid peroxides in apolipoprotein E-knockout mice. *Circulation*. **103**, 3099-3104.
- Kulik T, Kusano Y, Aronhime S, Sandler AL, Winn HR (2008). Regulation of cerebral vasculature in normal and ischemic brain. *Neuropharmacology*. **55**, 281-288.
- Kumagai Y, Mizukado S, Nagafune J, Shinyashiki M, Homma-Takeda S, Shimojo N (1997). Post-transcriptional elevation of mouse brain Mn-SOD protein by mercuric chloride. *Brain Res*. **769**, 178-182.
- Lange A, Gebremedhin D, Narayanan J, Harder D (1997). 20-Hydroxyeicosatetraenoic acid-induced vasoconstriction and inhibition of potassium current in cerebral

- vascular smooth muscle is dependent on activation of protein kinase C. *J Biol Chem.* **272**, 27345-27352.
- Lauzier B, Sicard P, Bouchot O, Delemasure S, Menetrier F, Moreau D, Vergely C , Rochette L (2007). After four hours of cold ischemia and cardioplegic protocol, the heart can still be rescued with postconditioning. *Transplantation.* **84**, 1474-1482.
- Le Brocq M, Leslie SJ, Milliken P , Megson IL (2008). Endothelial dysfunction: from molecular mechanisms to measurement, clinical implications, and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal.* **10**, 1631-1674.
- Lee CK, Klopp RG, Weindruch R , Prolla TA (1999). Gene expression profile of aging and its retardation by caloric restriction. *Science.* **285**, 1390-1393.
- Lee S, Suh S , Kim S (2000). Protective effects of the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate against hippocampal neuronal damage after transient global ischemia in gerbils. *Neurosci Lett.* **287**, 191-194.
- Lee TJ (1980). Direct evidence against acetylcholine as the dilator transmitter in the cat cerebral artery. *Eur J Pharmacol.* **68**, 393-394.
- Lefevre J, Michaud SE, Haddad P, Dussault S, Menard C, Groleau J, Turgeon J , Rivard A (2007). Moderate consumption of red wine (cabernet sauvignon) improves ischemia-induced neovascularization in ApoE-deficient mice: effect on endothelial progenitor cells and nitric oxide. *FASEB J.* **21**, 3845-3852.
- Leikert JF, Rathel TR, Wohlfart P, Cheynier V, Vollmar AM , Dirsch VM (2002). Red wine polyphenols enhance endothelial nitric oxide synthase expression and subsequent nitric oxide release from endothelial cells. *Circulation.* **106**, 1614-1617.
- Letenneur L, Proust-Lima C, Le Gouge A, Dartigues JF , Barberger-Gateau P (2007). Flavonoid intake and cognitive decline over a 10-year period. *Am J Epidemiol.* **165**, 1364-1371.
- Li J, Culman J, Hortnagl H, Zhao Y, Gerova N, Timm M, Blume A, Zimmermann M, Seidel K, Dirnagl U , Unger T (2005). Angiotensin AT2 receptor protects against cerebral ischemia-induced neuronal injury. *FASEB J.* **19**, 617-619.
- Li PL , Campbell WB (1997). Epoxyeicosatrienoic acids activate K⁺ channels in coronary smooth muscle through a guanine nucleotide binding protein. *Circ Res.* **80**, 877-884.
- Li X, Geary GG, Gonzales RJ, Krause DN , Duckles SP (2004). Effect of estrogen on cerebrovascular prostaglandins is amplified in mice with dysfunctional NOS. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **287**, H588-594.
- Liang W, Lee AH, Binns CW, Huang R, Hu D , Zhou Q (2009). Tea consumption and ischemic stroke risk: a case-control study in southern China. *Stroke.* **40**, 2480-2485.
- Lindauer U, Megow D, Matsuda H , Dirnagl U (1999). Nitric oxide: a modulator, but not a mediator, of neurovascular coupling in rat somatosensory cortex. *Am J Physiol.* **277**, H799-811.
- Lister JP , Barnes CA (2009). Neurobiological changes in the hippocampus during normative aging. *Arch Neurol.* **66**, 829-833.
- Liu H, Wang H, Shenvi S, Hagen TM , Liu RM (2004). Glutathione metabolism during aging and in Alzheimer disease. *Ann N Y Acad Sci.* **1019**, 346-349.
- Liu VW , Huang PL (2008). Cardiovascular roles of nitric oxide: a review of insights from nitric oxide synthase gene disrupted mice. *Cardiovasc Res.* **77**, 19-29.
- Lok J, Gupta P, Guo S, Kim WJ, Whalen MJ, van Leyen K , Lo EH (2007). Cell-cell signaling in the neurovascular unit. *Neurochem Res.* **32**, 2032-2045.

- Lorenz M, Wessler S, Follmann E, Michaelis W, Dusterhoft T, Baumann G, Stangl K, Stangl V (2004). A constituent of green tea, epigallocatechin-3-gallate, activates endothelial nitric oxide synthase by a phosphatidylinositol-3-OH-kinase-, cAMP-dependent protein kinase-, and Akt-dependent pathway and leads to endothelial-dependent vasorelaxation. *J Biol Chem.* **279**, 6190-6195.
- Ludman A, Venugopal V, Yellon DM, Hausenloy DJ (2009). Statins and cardioprotection--more than just lipid lowering? *Pharmacol Ther.* **122**, 30-43.
- Ludwig A, Lorenz M, Grimbo N, Steinle F, Meiners S, Bartsch C, Stangl K, Baumann G, Stangl V (2004). The tea flavonoid epigallocatechin-3-gallate reduces cytokine-induced VCAM-1 expression and monocyte adhesion to endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **316**, 659-665.
- Maktabi MA, Heistad DD, Faraci FM (1990). Effects of angiotensin II on blood flow to choroid plexus. *Am J Physiol.* **258**, H414-418.
- Mandel S, Amit T, Reznichenko L, Weinreb O, Youdim MB (2006). Green tea catechins as brain-permeable, natural iron chelators-antioxidants for the treatment of neurodegenerative disorders. *Mol Nutr Food Res.* **50**, 229-234.
- Mandel S, Weinreb O, Amit T, Youdim MB (2004). Cell signaling pathways in the neuroprotective actions of the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate: implications for neurodegenerative diseases. *J Neurochem.* **88**, 1555-1569.
- Marchenko SM, Sage SO (1996). Calcium-activated potassium channels in the endothelium of intact rat aorta. *J Physiol.* **492 (Pt 1)**, 53-60.
- Martins IJ, Hone E, Foster JK, Sunram-Lea SI, Gnjec A, Fuller SJ, Nolan D, Gandy SE, Martins RN (2006). Apolipoprotein E, cholesterol metabolism, diabetes, and the convergence of risk factors for Alzheimer's disease and cardiovascular disease. *Mol Psychiatry.* **11**, 721-736.
- Matoba T, Shimokawa H (2003). Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in animals and humans. *J Pharmacol Sci.* **92**, 1-6.
- Matsuoka Y, Hasegawa H, Okuda S, Muraki T, Uruno T, Kubota K (1995). Ameliorative effects of tea catechins on active oxygen-related nerve cell injuries. *J Pharmacol Exp Ther.* **274**, 602-608.
- Matz RL, Schott C, Stoclet JC, Andriantsitohaina R (2000). Age-related endothelial dysfunction with respect to nitric oxide, endothelium-derived hyperpolarizing factor and cyclooxygenase products. *Physiol Res.* **49**, 11-18.
- Mayhan WG, Faraci FM, Baumbach GL, Heistad DD (1990). Effects of aging on responses of cerebral arterioles. *Am J Physiol.* **258**, H1138-1143.
- Mayhan WG, Heistad DD (1986). Role of veins and cerebral venous pressure in disruption of the blood-brain barrier. *Circ Res.* **59**, 216-220.
- McCann SM, Mastronardi C, de Laurentiis A, Rettori V (2005). The nitric oxide theory of aging revisited. *Ann N Y Acad Sci.* **1057**, 64-84.
- McCord JM, Fridovich I (1969). The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. *J Biol Chem.* **244**, 6056-6063.
- Medvedev ZA (1990). An attempt at a rational classification of theories of ageing. *Biol Rev Camb Philos Soc.* **65**, 375-398.
- Meini A, Sticozzi C, Massai L, Palmi M (2008). A nitric oxide/Ca(2+)/calmodulin/ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway is involved in the mitogenic effect of IL-1beta in human astrocytoma cells. *Br J Pharmacol.* **153**, 1706-1717.
- Meng W, Ayata C, Waeber C, Huang PL, Moskowitz MA (1998). Neuronal NOS-cGMP-dependent ACh-induced relaxation in pial arterioles of endothelial NOS knockout mice. *Am J Physiol.* **274**, H411-415.

- Michel JB, Feron O, Sacks D, Michel T (1997). Reciprocal regulation of endothelial nitric-oxide synthase by Ca²⁺-calmodulin and caveolin. *J Biol Chem.* **272**, 15583-15586.
- Minghetti L (2004). Cyclooxygenase-2 (COX-2) in inflammatory and degenerative brain diseases. *J Neuropathol Exp Neurol.* **63**, 901-910.
- Mintun MA, Lundstrom BN, Snyder AZ, Vlassenko AG, Shulman GL, Raichle ME (2001). Blood flow and oxygen delivery to human brain during functional activity: theoretical modeling and experimental data. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**, 6859-6864.
- Mitschelen M, Garteiser P, Carnes BA, Farley JA, Doblaz S, Demoe JH, Warrington JP, Yan H, Nicolle MM, Towner R, Sonntag WE (2009). Basal and hypercapnia-altered cerebrovascular perfusion predict mild cognitive impairment in aging rodents. *Neuroscience.* **164**, 918-928.
- Mittal CK, Murad F (1977). Activation of guanylate cyclase by superoxide dismutase and hydroxyl radical: a physiological regulator of guanosine 3',5'-monophosphate formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **74**, 4360-4364.
- Miura H, Bosnjak JJ, Ning G, Saito T, Miura M, Gutterman DD (2003). Role for hydrogen peroxide in flow-induced dilation of human coronary arterioles. *Circ Res.* **92**, e31-40.
- Miyata N, Roman RJ (2005). Role of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE) in vascular system. *J Smooth Muscle Res.* **41**, 175-193.
- Mizugaki M, Ishizawa F, Yamazaki T, Hishinuma T (2000). Epigallocatechin gallate increase the prostacyclin production of bovine aortic endothelial cells. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **62**, 157-164.
- Moncada S, Radomski MW, Palmer RM (1988). Endothelium-derived relaxing factor. Identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function. *Biochem Pharmacol.* **37**, 2495-2501.
- Moroi M, Zhang L, Yasuda T, Virmani R, Gold HK, Fishman MC, Huang PL (1998). Interaction of genetic deficiency of endothelial nitric oxide, gender, and pregnancy in vascular response to injury in mice. *J Clin Invest.* **101**, 1225-1232.
- Morris R (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods.* **11**, 47-60.
- Motoyama T, Kawano H, Kugiyama K, Hirashima O, Ohgushi M, Tsunoda R, Moriyama Y, Miyao Y, Yoshimura M, Ogawa H, Yasue H (1998). Vitamin E administration improves impairment of endothelium-dependent vasodilation in patients with coronary spastic angina. *J Am Coll Cardiol.* **32**, 1672-1679.
- Mulder M, Jansen PJ, Janssen BJ, van de Berg WD, van der Boom H, Havekes LM, de Kloet RE, Ramaekers FC, Blokland A (2004). Low-density lipoprotein receptor-knockout mice display impaired spatial memory associated with a decreased synaptic density in the hippocampus. *Neurobiol Dis.* **16**, 212-219.
- Mullarkey CJ, Edelstein D, Brownlee M (1990). Free radical generation by early glycation products: a mechanism for accelerated atherogenesis in diabetes. *Biochem Biophys Res Commun.* **173**, 932-939.
- Muzaffar S, Shukla N, Lobo C, Angelini GD, Jeremy JY (2004). Iloprost inhibits superoxide formation and gp91phox expression induced by the thromboxane A2 analogue U46619, 8-isoprostane F2alpha, prostaglandin F2alpha, cytokines and endotoxin in the pig pulmonary artery. *Br J Pharmacol.* **141**, 488-496.
- Nanetti L, Taffi R, Vignini A, Moroni C, Raffaelli F, Bacchetti T, Silvestrini M, Provinciali L, Mazzanti L (2007). Reactive oxygen species plasmatic levels in ischemic stroke. *Mol Cell Biochem.* **303**, 19-25.

- Napoli C, de Nigris F, Williams-Ignarro S, Pignalosa O, Sica V, Ignarro LJ (2006). Nitric oxide and atherosclerosis: an update. *Nitric Oxide*. **15**, 265-279.
- Napoli C, Ignarro LJ (2001). Nitric oxide and atherosclerosis. *Nitric Oxide*. **5**, 88-97.
- Napoli C, Paterno R, Faraci FM, Taguchi H, Postiglione A, Heistad DD (1997). Mildly oxidized low-density lipoprotein impairs responses of carotid but not basilar artery in rabbits. *Stroke*. **28**, 2266-2271; discussion 2271-2262.
- Naseem KM (2005). The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. *Mol Aspects Med*. **26**, 33-65.
- Ndiaye M, Chataigneau T, Andriantsitohaina R, Stoclet JC, Schini-Kerth VB (2003). Red wine polyphenols cause endothelium-dependent EDHF-mediated relaxations in porcine coronary arteries via a redox-sensitive mechanism. *Biochem Biophys Res Commun*. **310**, 371-377.
- Neeper M, Schmidt AM, Brett J, Yan SD, Wang F, Pan YC, Elliston K, Stern D, Shaw A (1992). Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *J Biol Chem*. **267**, 14998-15004.
- Nepl RL, Lubomirov LT, Momotani K, Pfitzer G, Eto M, Somlyo AV (2009). Thromboxane A₂-induced bi-directional regulation of cerebral arterial tone. *J Biol Chem*. **284**, 6348-6360.
- Ngai AC, Winn HR (1995). Modulation of cerebral arteriolar diameter by intraluminal flow and pressure. *Circ Res*. **77**, 832-840.
- Nicolakakis N, Aboukassim T, Ongali B, Lecrux C, Fernandes P, Rosa-Neto P, Tong XK, Hamel E (2008). Complete rescue of cerebrovascular function in aged Alzheimer's disease transgenic mice by antioxidants and pioglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist. *J Neurosci*. **28**, 9287-9296.
- O'Rourke MF (2007). Arterial aging: pathophysiological principles. *Vasc Med*. **12**, 329-341.
- Ohwada K, Takeda H, Yamazaki M, Isogai H, Nakano M, Shimomura M, Fukui K, Urano S (2008). Pyrroloquinoline Quinone (PQQ) Prevents Cognitive Deficit Caused by Oxidative Stress in Rats. *J Clin Biochem Nutr*. **42**, 29-34.
- Okamura T, Ayajiki K, Fujioka H, Shinozaki K, Toda N (2002). Neurogenic cerebral vasodilation mediated by nitric oxide. *Jpn J Pharmacol*. **88**, 32-38.
- Ontario QsPf (2007). Workplace Safety and Insurance Appeals Tribunal ed^eds). Toronto: www.wsiat.on.ca
- Ortega Mateo A, de Artinano AA (1997). Highlights on endothelins: a review. *Pharmacol Res*. **36**, 339-351.
- Papaioannou TG, Karatzis EN, Vavuranakis M, Lekakis JP, Stefanadis C (2006). Assessment of vascular wall shear stress and implications for atherosclerotic disease. *Int J Cardiol*. **113**, 12-18.
- Paravicini TM, Drummond GR, Sobey CG (2004). Reactive oxygen species in the cerebral circulation: physiological roles and therapeutic implications for hypertension and stroke. *Drugs*. **64**, 2143-2157.
- Paravicini TM, Miller AA, Drummond GR, Sobey CG (2006). Flow-induced cerebral vasodilatation in vivo involves activation of phosphatidylinositol-3 kinase, NADPH-oxidase, and nitric oxide synthase. *J Cereb Blood Flow Metab*. **26**, 836-845.
- Parfenova H, Eidson TH, Leffler CW (1997). Upregulation of COX-2 in cerebral microvascular endothelial cells by smooth muscle cell signals. *Am J Physiol*. **273**, C277-288.
- Park DC, Reuter-Lorenz P (2009). The adaptive brain: aging and neurocognitive scaffolding. *Annu Rev Psychol*. **60**, 173-196.

- Park L, Anrather J, Zhou P, Frys K, Pitstick R, Younkin S, Carlson GA, Iadecola C (2005). NADPH-oxidase-derived reactive oxygen species mediate the cerebrovascular dysfunction induced by the amyloid beta peptide. *J Neurosci.* **25**, 1769-1777.
- Park L, Zhou P, Pitstick R, Capone C, Anrather J, Norris EH, Younkin L, Younkin S, Carlson G, McEwen BS, Iadecola C (2008). Nox2-derived radicals contribute to neurovascular and behavioral dysfunction in mice overexpressing the amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **105**, 1347-1352.
- Paulson OB, Strandgaard S, Edvinsson L (1990). Cerebral autoregulation. *Cerebrovasc Brain Metab Rev.* **2**, 161-192.
- Petersson J, Zygmunt PM, Brandt L, Hogestatt ED (1995). Substance P-induced relaxation and hyperpolarization in human cerebral arteries. *Br J Pharmacol.* **115**, 889-894.
- Phillis JW (2004). Adenosine and adenine nucleotides as regulators of cerebral blood flow: roles of acidosis, cell swelling, and KATP channels. *Crit Rev Neurobiol.* **16**, 237-270.
- Pieri C, Marra M, Moroni F, Recchioni R, Marcheselli F (1994). Melatonin: a peroxy radical scavenger more effective than vitamin E. *Life Sci.* **55**, PL271-276.
- Pollard SE, Kuhnle GG, Vauzour D, Vafeiadou K, Tzounis X, Whiteman M, Rice-Evans C, Spencer JP (2006). The reaction of flavonoid metabolites with peroxynitrite. *Biochem Biophys Res Commun.* **350**, 960-968.
- Porasuphatana S, Tsai P, Rosen GM (2003). The generation of free radicals by nitric oxide synthase. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* **134**, 281-289.
- Pou S, Keaton L, Surichamorn W, Rosen GM (1999). Mechanism of superoxide generation by neuronal nitric-oxide synthase. *J Biol Chem.* **274**, 9573-9580.
- Pou S, Pou WS, Bredt DS, Snyder SH, Rosen GM (1992). Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase. *J Biol Chem.* **267**, 24173-24176.
- Pratico D (2008). Evidence of oxidative stress in Alzheimer's disease brain and antioxidant therapy: lights and shadows. *Ann N Y Acad Sci.* **1147**, 70-78.
- Pratico D, Sung S (2004). Lipid peroxidation and oxidative imbalance: early functional events in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* **6**, 171-175.
- Pratico D, Tillmann C, Zhang ZB, Li H, FitzGerald GA (2001). Acceleration of atherogenesis by COX-1-dependent prostanoid formation in low density lipoprotein receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**, 3358-3363.
- Przedborski S, Jackson-Lewis V, Yokoyama R, Shibata T, Dawson VL, Dawson TM (1996). Role of neuronal nitric oxide in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced dopaminergic neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**, 4565-4571.
- Quignard JF, Feletou M, Edwards G, Duhault J, Weston AH, Vanhoutte PM (2000). Role of endothelial cell hyperpolarization in EDHF-mediated responses in the guinea-pig carotid artery. *Br J Pharmacol.* **129**, 1103-1112.
- Rancillac A, Rossier J, Guille M, Tong XK, Geoffroy H, Amatore C, Arbault S, Hamel E, Cauli B (2006). Glutamatergic Control of Microvascular Tone by Distinct GABA Neurons in the Cerebellum. *J Neurosci.* **26**, 6997-7006.
- Randerath E, Watson WP, Zhou GD, Chang J, Randerath K (1995). Intensification and depletion of specific bulky renal DNA adducts (I-compounds) following exposure of male F344 rats to the renal carcinogen ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA). *Mutat Res.* **341**, 265-279.
- Randriamboavonjy V, Busse R, Fleming I (2003). 20-HETE-induced contraction of small coronary arteries depends on the activation of Rho-kinase. *Hypertension.* **41**, 801-806.

- Reeve AK, Krishnan KJ, Turnbull D (2008). Mitochondrial DNA mutations in disease, aging, and neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci.* **1147**, 21-29.
- Refolo LM, Malester B, LaFrancois J, Bryant-Thomas T, Wang R, Tint GS, Sambamurti K, Duff K, Pappolla MA (2000). Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model. *Neurobiol Dis.* **7**, 321-331.
- Reiter RJ (1995). The pineal gland and melatonin in relation to aging: a summary of the theories and of the data. *Exp Gerontol.* **30**, 199-212.
- Renaud S, de Lorgeril M (1992). Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet.* **339**, 1523-1526.
- Resnick N, Yahav H, Schubert S, Wolfowitz E, Shay A (2000). Signalling pathways in vascular endothelium activated by shear stress: relevance to atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* **11**, 167-177.
- Resnick N, Yahav H, Shay-Salit A, Shushy M, Schubert S, Zilberman LC, Wolfowitz E (2003). Fluid shear stress and the vascular endothelium: for better and for worse. *Prog Biophys Mol Biol.* **81**, 177-199.
- Rhee SG (2006). Cell signaling. H₂O₂, a necessary evil for cell signaling. *Science.* **312**, 1882-1883.
- Rhee SG, Chang TS, Bae YS, Lee SR, Kang SW (2003). Cellular regulation by hydrogen peroxide. *J Am Soc Nephrol.* **14**, S211-215.
- Rice ME, Forman RE, Chen BT, Avshalumov MV, Cragg SJ, Drew KL (2002). Brain antioxidant regulation in mammals and anoxia-tolerant reptiles: balanced for neuroprotection and neuromodulation. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* **133**, 515-525.
- Rimm EB, Klatsky A, Grobbee D, Stampfer MJ (1996). Review of moderate alcohol consumption and reduced risk of coronary heart disease: is the effect due to beer, wine, or spirits. *BMJ.* **312**, 731-736.
- Robak J, Gryglewski RJ (1988). Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem Pharmacol.* **37**, 837-841.
- Robb EL, Winkelmoen L, Visanji N, Brotchie J, Stuart JA (2008). Dietary resveratrol administration increases MnSOD expression and activity in mouse brain. *Biochem Biophys Res Commun.* **372**, 254-259.
- Roggendorf W, Cervos-Navarro J (1977). Ultrastructure of arterioles in the cat brain. *Cell Tissue Res.* **178**, 495-515.
- Roman RJ (2002). P-450 metabolites of arachidonic acid in the control of cardiovascular function. *Physiol Rev.* **82**, 131-185.
- Ross R, Glomset JA (1973). Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science.* **180**, 1332-1339.
- Rossi DJ, Brady JD, Mohr C (2007). Astrocyte metabolism and signaling during brain ischemia. *Nat Neurosci.* **10**, 1377-1386.
- Rowe WB, Spreekmeester E, Meaney MJ, Quirion R, Rochford J (1998). Reactivity to novelty in cognitively-impaired and cognitively-unimpaired aged rats and young rats. *Neuroscience.* **83**, 669-680.
- Roy CS, Sherrington CS (1890). On the Regulation of the Blood-supply of the Brain. *J Physiol.* **11**, 85-158 117.
- Rubanyi GM, Freay AD, Kauser K, Johns A, Harder DR (1990). Mechanoreception by the endothelium: mediators and mechanisms of pressure- and flow-induced vascular responses. *Blood Vessels.* **27**, 246-257.

- Sakurai T, Yanagisawa M, Takawa Y, Miyazaki H, Kimura S, Goto K, Masaki T (1990). Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature*. **348**, 732-735.
- Salinas G, Rangasetty UC, Uretsky BF, Birnbaum Y (2007). The cyclooxygenase 2 (COX-2) story: it's time to explain, not inflame. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. **12**, 98-111.
- Sanan DA, Newland DL, Tao R, Marcovina S, Wang J, Mooser V, Hammer RE, Hobbs HH (1998). Low density lipoprotein receptor-negative mice expressing human apolipoprotein B-100 develop complex atherosclerotic lesions on a chow diet: no accentuation by apolipoprotein(a). *Proc Natl Acad Sci U S A*. **95**, 4544-4549.
- Sasaki N, Yamashita T, Takaya T, Shinohara M, Shiraki R, Takeda M, Emoto N, Fukatsu A, Hayashi T, Ikemoto K, Nomura T, Yokoyama M, Hirata K, Kawashima S (2008). Augmentation of vascular remodeling by uncoupled endothelial nitric oxide synthase in a mouse model of diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **28**, 1068-1076.
- Sato A, Sakuma I, Gutterman DD (2003). Mechanism of dilation to reactive oxygen species in human coronary arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **285**, H2345-2354.
- Schiffirin EL, Touyz RM (2004). From bedside to bench to bedside: role of renin-angiotensin-aldosterone system in remodeling of resistance arteries in hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **287**, H435-446.
- Schroeter H, Heiss C, Balzer J, Kleinbongard P, Keen CL, Hollenberg NK, Sies H, Kwik-Uribe C, Schmitz HH, Kelm M (2006). (-)-Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **103**, 1024-1029.
- Schubert R, Lidington D, Bolz SS (2008). The emerging role of Ca²⁺ sensitivity regulation in promoting myogenic vasoconstriction. *Cardiovasc Res*. **77**, 8-18.
- Schubert R, Mulvany MJ (1999). The myogenic response: established facts and attractive hypotheses. *Clin Sci (Lond)*. **96**, 313-326.
- Schulz E, Anter E, Keane JF, Jr. (2004). Oxidative stress, antioxidants, and endothelial function. *Curr Med Chem*. **11**, 1093-1104.
- Segal S, Casper RF (1992). Progesterone supplementation increases luteal phase endometrial thickness and oestradiol levels in in-vitro fertilization. *Hum Reprod*. **7**, 1210-1213.
- Segal SS, Beny JL (1992). Intracellular recording and dye transfer in arterioles during blood flow control. *Am J Physiol*. **263**, H1-7.
- Sellers MM, Stallone JN (2008). Sympathy for the devil: the role of thromboxane in the regulation of vascular tone and blood pressure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **294**, H1978-1986.
- Sessa WC (2004). eNOS at a glance. *J Cell Sci*. **117**, 2427-2429.
- Shein NA, Tsenter J, Alexandrovich AG, Horowitz M, Shohami E (2007). Akt phosphorylation is required for heat acclimation-induced neuroprotection. *J Neurochem*. **103**, 1523-1529.
- Shimokawa H, Morikawa K (2005). Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in animals and humans. *J Mol Cell Cardiol*. **39**, 725-732.
- Shipley RD, Kim SJ, Muller-Delp JM (2005). Time course of flow-induced vasodilation in skeletal muscle: contributions of dilator and constrictor mechanisms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **288**, H1499-1507.
- Shirasaki Y, Su C, Lee TJ, Kolm P, Cline WH, Jr., Nickols GA (1986). Endothelial modulation of vascular relaxation to nitrovasodilators in aging and hypertension. *J Pharmacol Exp Ther*. **239**, 861-866.

- Soares De Moura R, Costa Viana FS, Souza MA, Kovary K, Guedes DC, Oliveira EP, Rubenich LM, Carvalho LC, Oliveira RM, Tano T, Gusmao Correia ML (2002). Antihypertensive, vasodilator and antioxidant effects of a vinifera grape skin extract. *J Pharm Pharmacol.* **54**, 1515-1520.
- Soberman RJ (2003). The expanding network of redox signaling: new observations, complexities, and perspectives. *J Clin Invest.* **111**, 571-574.
- Sparks DL, Martin TA, Gross DR, Hunsaker JC, 3rd (2000). Link between heart disease, cholesterol, and Alzheimer's disease: a review. *Microsc Res Tech.* **50**, 287-290.
- Sparks DL, Sabbagh MN, Connor DJ, Lopez J, Launer LJ, Browne P, Wasser D, Johnson-Traver S, Lochhead J, Ziolkowski C (2005). Atorvastatin for the treatment of mild to moderate Alzheimer disease: preliminary results. *Arch Neurol.* **62**, 753-757.
- Spencer JP (2009). The impact of flavonoids on memory: physiological and molecular considerations. *Chem Soc Rev.* **38**, 1152-1161.
- Spofford CM, Chilian WM (2003). Mechanotransduction via the elastin-laminin receptor (ELR) in resistance arteries. *J Biomech.* **36**, 645-652.
- Srikanth V, Maczurek A, Phan T, Steele M, Westcott B, Juskiw D, Munch G (2009). Advanced glycation endproducts and their receptor RAGE in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.*
- Srinivasan V (2002). Melatonin oxidative stress and neurodegenerative diseases. *Indian J Exp Biol.* **40**, 668-679.
- St Leger AS, Cochrane AL, Moore F (1979). Factors associated with cardiac mortality in developed countries with particular reference to the consumption of wine. *Lancet.* **1**, 1017-1020.
- Steinbeck MJ, Khan AU, Karnovsky MJ (1993). Extracellular production of singlet oxygen by stimulated macrophages quantified using 9,10-diphenylanthracene and perylene in a polystyrene film. *J Biol Chem.* **268**, 15649-15654.
- Stocker R, O'Halloran RA (2004). Dealccoholized red wine decreases atherosclerosis in apolipoprotein E gene-deficient mice independently of inhibition of lipid peroxidation in the artery wall. *Am J Clin Nutr.* **79**, 123-130.
- Stoclet JC, Chataigneau T, Ndiaye M, Oak MH, El Bedoui J, Chataigneau M, Schini-Kerth VB (2004). Vascular protection by dietary polyphenols. *Eur J Pharmacol.* **500**, 299-313.
- Stroes E, Hijmering M, van Zandvoort M, Wever R, Rabelink TJ, van Faassen EE (1998). Origin of superoxide production by endothelial nitric oxide synthase. *FEBS Lett.* **438**, 161-164.
- Sun CW, Falck JR, Harder DR, Roman RJ (1999). Role of tyrosine kinase and PKC in the vasoconstrictor response to 20-HETE in renal arterioles. *Hypertension.* **33**, 414-418.
- Sutherland BA, Rahman RM, Appleton I (2006). Mechanisms of action of green tea catechins, with a focus on ischemia-induced neurodegeneration. *J Nutr Biochem.* **17**, 291-306.
- Sutherland BA, Shaw OM, Clarkson AN, Jackson DN, Sammut IA, Appleton I (2005). Neuroprotective effects of (-)-epigallocatechin gallate following hypoxia-ischemia-induced brain damage: novel mechanisms of action. *FASEB J.* **19**, 258-260.
- Suzuki J, Isobe M, Morishita R, Nagai R (2009). Tea polyphenols regulate key mediators on inflammatory cardiovascular diseases. *Mediators Inflamm.* **2009**, 494928.

- Sylvester FA, Stepp DW, Frisbee JC, Lombard JH (2002). High-salt diet depresses acetylcholine reactivity proximal to NOS activation in cerebral arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **283**, H353-363.
- Taddei S, Versari D, Cipriano A, Ghiadoni L, Galetta F, Franzoni F, Magagna A, Viridis A, Salvetti A (2006). Identification of a cytochrome P450 2C9-derived endothelium-derived hyperpolarizing factor in essential hypertensive patients. *J Am Coll Cardiol.* **48**, 508-515.
- Taddei S, Viridis A, Ghiadoni L, Magagna A, Salvetti A (1997). Cyclooxygenase inhibition restores nitric oxide activity in essential hypertension. *Hypertension.* **29**, 274-279.
- Taddei S, Viridis A, Ghiadoni L, Magagna A, Salvetti A (1998). Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation by restoring nitric oxide activity in essential hypertension. *Circulation.* **97**, 2222-2229.
- Takaki A, Morikawa K, Tsutsui M, Murayama Y, Tekes E, Yamagishi H, Ohashi J, Yada T, Yanagihara N, Shimokawa H (2008). Crucial role of nitric oxide synthases system in endothelium-dependent hyperpolarization in mice. *J Exp Med.* **205**, 2053-2063.
- Takano T, Tian GF, Peng W, Lou N, Libionka W, Han X, Nedergaard M (2006). Astrocyte-mediated control of cerebral blood flow. *Nat Neurosci.* **9**, 260-267.
- Tamaki K, Heistad DD (1986). Response of cerebral arteries to sympathetic stimulation during acute hypertension. *Hypertension.* **8**, 911-917.
- Tan D, Reiter RJ, Chen LD, Poeggeler B, Manchester LC, Barlow-Walden LR (1994). Both physiological and pharmacological levels of melatonin reduce DNA adduct formation induced by the carcinogen safrole. *Carcinogenesis.* **15**, 215-218.
- Tang EH, Vanhoutte PM (2009). Prostanoids and reactive oxygen species: team players in endothelium-dependent contractions. *Pharmacol Ther.* **122**, 140-149.
- Terashvili M, Pratt PF, Gebremedhin D, Narayanan J, Harder DR (2006). Reactive oxygen species cerebral autoregulation in health and disease. *Pediatr Clin North Am.* **53**, 1029-1037, xi.
- Thomas SR, Chen K, Keaney JF, Jr. (2003). Oxidative stress and endothelial nitric oxide bioactivity. *Antioxid Redox Signal.* **5**, 181-194.
- Thorin E, Huang PL, Fishman MC, Bevan JA (1998). Nitric oxide inhibits alpha2-adrenoceptor-mediated endothelium-dependent vasodilation. *Circ Res.* **82**, 1323-1329.
- Thorin E, Lucas M, Cernacek P, Dupuis J (2000). Role of ET(A) receptors in the regulation of vascular reactivity in rats with congestive heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **279**, H844-851.
- Thorin E, Thorin-Trescases N (2009). Vascular endothelial ageing, heartbeat after heartbeat. *Cardiovasc Res.*
- Toda N, Okamura T (1998). Cerebral vasodilators. *Jpn J Pharmacol.* **76**, 349-367.
- Tong XK, Nicolakakis N, Fernandes P, Ongali B, Brouillette J, Quirion R, Hamel E (2009). Simvastatin improves cerebrovascular function and counters soluble amyloid-beta, inflammation and oxidative stress in aged APP mice. *Neurobiol Dis.* **35**, 406-414.
- Toumpoulis IK, Anagnostopoulos CE (2004). Rapid ischemic preconditioning for spinal cord protection after transient aortic occlusion. *Anesthesiology.* **101**, 261-262; author reply 262.
- Trifunovic A, Larsson NG (2008). Mitochondrial dysfunction as a cause of ageing. *J Intern Med.* **263**, 167-178.
- Tritto I, Ambrosio G (1999). Spotlight on microcirculation: an update. *Cardiovasc Res.* **42**, 600-606.

- Trompet S, van Vliet P, de Craen AJ, Jolles J, Buckley BM, Murphy MB, Ford I, Macfarlane PW, Sattar N, Packard CJ, Stott DJ, Shepherd J, Bollen EL, Blauw GJ, Jukema JW, Westendorp RG. Pravastatin and cognitive function in the elderly. Results of the PROSPER study. *J Neurol.* **257**, 85-90.
- Uchida S, Ozaki M, Akashi T, Yamashita K, Niwa M, Taniyama K (1995). Effects of (-)-epigallocatechin-3-O-gallate (green tea tannin) on the life span of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl.* **22**, S302-303.
- Upmacis RK, Deeb RS, Hajjar DP (2006). Oxidative alterations of cyclooxygenase during atherogenesis. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **80**, 1-14.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* **39**, 44-84.
- Vanhoutte PM (2009a). COX-1 and vascular disease. *Clin Pharmacol Ther.* **86**, 212-215.
- Vanhoutte PM (2009b). How We Learned to Say NO. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **29**, 1156-1160.
- Vanhoutte PM, Shimokawa H, Tang EH, Feletou M (2009). Endothelial dysfunction and vascular disease. *Acta Physiol (Oxf).* **196**, 193-222.
- Vanhoutte PM, Tang EH (2008). Endothelium-dependent contractions: when a good guy turns bad! *J Physiol.* **586**, 5295-5304.
- Vaughan CJ, Delanty N, Basson CT (2001). Statin therapy and stroke prevention. *Curr Opin Cardiol.* **16**, 219-224.
- Vauzour D, Vafeiadou K, Rice-Evans C, Williams RJ, Spencer JP (2007). Activation of pro-survival Akt and ERK1/2 signalling pathways underlie the anti-apoptotic effects of flavanones in cortical neurons. *J Neurochem.* **103**, 1355-1367.
- Vergnani L, Hatrik S, Ricci F, Passaro A, Manzoli N, Zuliani G, Brovkovich V, Fellin R, Malinski T (2000). Effect of native and oxidized low-density lipoprotein on endothelial nitric oxide and superoxide production: key role of L-arginine availability. *Circulation.* **101**, 1261-1266.
- Vinson JA, Teufel K, Wu N (2001). Red wine, dealcoholized red wine, and especially grape juice, inhibit atherosclerosis in a hamster model. *Atherosclerosis.* **156**, 67-72.
- Waldstein SR, Rice SC, Thayer JF, Najjar SS, Scuteri A, Zonderman AB (2008). Pulse pressure and pulse wave velocity are related to cognitive decline in the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *Hypertension.* **51**, 99-104.
- Wallerath T, Poleo D, Li H, Forstermann U (2003). Red wine increases the expression of human endothelial nitric oxide synthase: a mechanism that may contribute to its beneficial cardiovascular effects. *J Am Coll Cardiol.* **41**, 471-478.
- Wei CM, Hu S, Miller VM, Burnett JC, Jr. (1994). Vascular actions of C-type natriuretic peptide in isolated porcine coronary arteries and coronary vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **205**, 765-771.
- Wei EP, Kontos HA (1990). H₂O₂ and endothelium-dependent cerebral arteriolar dilation. Implications for the identity of endothelium-derived relaxing factor generated by acetylcholine. *Hypertension.* **16**, 162-169.
- Wei EP, Kontos HA, Patterson JL, Jr. (1978). Vasoconstrictor effect of angiotensin on pial arteries. *Stroke.* **9**, 487-489.
- Wever RM, van Dam T, van Rijn HJ, de Groot F, Rabelink TJ (1997). Tetrahydrobiopterin regulates superoxide and nitric oxide generation by recombinant endothelial nitric oxide synthase. *Biochem Biophys Res Commun.* **237**, 340-344.

- White AA, Crawford KM, Patt CS, Lad PJ (1976). Activation of soluble guanylate cyclase from rat lung by incubation or by hydrogen peroxide. *J Biol Chem.* **251**, 7304-7312.
- Wickens AP (2001). Ageing and the free radical theory. *Respir Physiol.* **128**, 379-391.
- Willcox BJ, Curb JD, Rodriguez BL (2008). Antioxidants in cardiovascular health and disease: key lessons from epidemiologic studies. *Am J Cardiol.* **101**, 75D-86D.
- Williams LR, Leggett RW (1989). Reference values for resting blood flow to organs of man. *Clin Phys Physiol Meas.* **10**, 187-217.
- Wolburg H, Lippoldt A (2002). Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation. *Vascul Pharmacol.* **38**, 323-337.
- Wolozin B, Kellman W, Ruosseau P, Celesia GG, Siegel G (2000). Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arch Neurol.* **57**, 1439-1443.
- Wu KK (2003). Aspirin and other cyclooxygenase inhibitors: new therapeutic insights. *Semin Vasc Med.* **3**, 107-112.
- Wu R, Lamontagne D, de Champlain J (2002). Antioxidative properties of acetylsalicylic Acid on vascular tissues from normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Circulation.* **105**, 387-392.
- Yada T, Shimokawa H, Morikawa K, Takaki A, Shinozaki Y, Mori H, Goto M, Ogasawara Y, Kajiya F (2008). Role of Cu,Zn-SOD in the synthesis of endogenous vasodilator hydrogen peroxide during reactive hyperemia in mouse mesenteric microcirculation in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **294**, H441-448.
- Yan X, Zhang JJ, Li X, Lei Z, Dong S, Hui L (2009). Green tea polyphenols inhibit cognitive impairment induced by chronic cerebral hypoperfusion via modulating oxidative stress. *J Nutr Biochem.*
- Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T (1988). A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature.* **332**, 411-415.
- Yang ZW, Zhang A, Altura BT, Altura BM (1998). Endothelium-dependent relaxation to hydrogen peroxide in canine basilar artery: a potential new cerebral dilator mechanism. *Brain Res Bull.* **47**, 257-263.
- Yoshida YI, Eda S, Masada M (2000). Alterations of tetrahydrobiopterin biosynthesis and pteridine levels in mouse tissues during growth and aging. *Brain Dev.* **22 Suppl 1**, S45-49.
- Yu BP, Chung HY (2001). Oxidative stress and vascular aging. *Diabetes Res Clin Pract.* **54 Suppl 2**, S73-80.
- Zhang WJ, Bird KE, McMillen TS, LeBoeuf RC, Hagen TM, Frei B (2008). Dietary alpha-lipoic acid supplementation inhibits atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E-deficient and apolipoprotein E/low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation.* **117**, 421-428.
- Zieman SJ, Kass DA (2004). Advanced glycation endproduct crosslinking in the cardiovascular system: potential therapeutic target for cardiovascular disease. *Drugs.* **64**, 459-470.
- Zimmerman GA, Meistrell M, 3rd, Bloom O, Cockroft KM, Bianchi M, Risucci D, Broome J, Farmer P, Cerami A, Vlassara H, et al. (1995). Neurotoxicity of advanced glycation endproducts during focal stroke and neuroprotective effects of aminoguanidine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92**, 3744-3748.
- Zubkov A, Miao L, Zhang J (2004). Signal transduction of ET-1 in contraction of cerebral arteries. *J Cardiovasc Pharmacol.* **44 Suppl 1**, S24-26.