

Université de Montréal

**Relation entre la structure et la fonction des artères
cérébrales dans l'athérosclérose
Impact des traitements cardioprotecteurs**

par

Virginie Bolduc

Département de Pharmacologie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de Doctorat
en Pharmacologie

Décembre, 2011

© Virginie Bolduc, 2011

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :
Relation entre la structure et la fonction des artères cérébrales dans l'athérosclérose
Impact des traitements cardioprotecteurs

Présentée par :
Virginie Bolduc

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Jonathan Ledoux, président-rapporteur
Eric Thorin, directeur de recherche
Christine Des Rosiers, co-directeur
Hélène Girouard, membre du jury
Stéphanie Lehoux, examinateur externe

Résumé

Le processus de l'athérosclérose est associé à des changements vasculaires structuraux et mécaniques dont la rigidification carotidienne et aortique. Ce phénomène est bien connu et contraste avec l'augmentation paradoxale de la distensibilité cérébrovasculaire observée dans les artères cérébrales exposées aux facteurs de risque cardiovasculaire, tels que l'hypertension. L'impact de l'athérosclérose sur le remodelage, la compliance et la fonction des artères cérébrales est inconnu. En ciblant l'endothélium, l'athérosclérose induit une dysfonction endothéliale cérébrale sévère qui interfère avec le contrôle du débit sanguin cérébral et ultimement avec les fonctions cognitives. Dans les artères cérébrales, le remodelage de la paroi artérielle est toujours accompagné d'une perte des fonctions vasodilatatrices, ce qui suggère que ces deux événements sont au cœur d'un cercle vicieux. Nos études visent à vérifier l'hypothèse selon laquelle le remodelage de la paroi est déterminé par la fonction endothéliale au niveau cérébrovasculaire alors qu'au niveau de la carotide, le stress mécanique du pouls sanguin régule les propriétés structurales et biomécaniques.

Afin de vérifier cette hypothèse, dans une première étude, nous avons sélectionné trois interventions thérapeutiques aux mécanismes d'action différents qui modulent la fonction endothéliale indirectement en diminuant le stress mécanique exercé sur la paroi *via* une diminution de la fréquence cardiaque. Suite à un traitement chronique de trois mois chez la souris athérosclérotique, LDLr^{-/-}; hApoB-100^{+/+}, l'efficacité de l'ivabradine, du métoprolol et de l'exercice physique volontaire dans la prévention de l'augmentation de la compliance cérébrovasculaire s'est avérée proportionnelle à l'étendue des bénéfices sur la fonction endothéliale. La rigidification carotidienne n'a été prévenue que par les interventions qui réduisent vraiment la fréquence cardiaque, c'est-à-dire l'ivabradine et le métoprolol. Dans une deuxième étude, nous avons confirmé nos résultats en utilisant un traitement antioxydant dans le but de cibler plus directement l'endothélium. La catéchine ne réduit pas la fréquence cardiaque, mais elle est reconnue pour protéger l'endothélium cérébral en neutralisant le stress oxydant. Ainsi, la carotide est restée rigide alors que le remodelage cérébral a été prévenu. Une

technique d'imagerie novatrice, la tomographie par cohérence optique, nous a permis de valider nos observations *in vivo* et de proposer que la catéchine prévient l'hypoperfusion du cerveau en protégeant la fonction endothéliale et l'intégrité de la paroi vasculaire cérébrale. Finalement, les deux études identifient la métalloprotéinase de type 9 comme un joueur potentiellement impliqué dans l'augmentation de la compliance cérébrovasculaire.

Nos études démontrent que les changements structuraux et biomécaniques affectant la paroi des artères cérébrales sont indubitablement dépendants de l'endothélium alors que dans la carotide, le stress mécanique est le paramètre le plus déterminant. Somme toute, en protégeant indirectement l'endothélium cérébral on empêche les processus de remodelage, telle que l'activation de la métalloprotéinase de type 9.

De nombreuses études ont suggéré l'implication des dysfonctions cérébrovasculaires dans la maladie d'Alzheimer. En effet, les affections vasculaires qui compromettent chroniquement le débit sanguin cérébral, telles la dysfonction endothéliale et la réduction de la lumière artérielle, vont entraîner un déficit métabolique des neurones à l'origine de la neurodégénérescence. Les traitements préventifs cardioprotecteurs, tels que l'ivabradine, l'exercice physique et la catéchine améliorent la fonction endothéliale, la structure et la biomécanique des artères cérébrales, et pourraient donc prévenir l'hypoperfusion chronique du cerveau et le déclin cognitif dans l'athérosclérose.

Mots-clés : circulation cérébrale, compliance, remodelage vasculaire, fonction endothéliale, débit sanguin cérébral, métalloprotéinases, fréquence cardiaque, stress oxydant.

Abstract

Large artery stiffness and endothelial dysfunction are markers of atherosclerosis. Stiffening of the carotid arteries contrast with the paradoxical increase in distensibility of cerebral arteries that was reported in the presence of risk factors for cardiovascular diseases, such as hypertension. However, our knowledge concerning the influence of atherosclerosis on cerebrovascular compliance and structure remains incomplete. By targeting the endothelium, atherosclerosis induces a severe cerebral endothelial dysfunction affecting chronically the cerebral blood flow and potentially leading to cognitive dysfunctions. Few studies have shown that the paradoxical increase in cerebrovascular distensibility is consistently reported in animal model of risk factors for cardiovascular diseases exhibiting a cerebral endothelial dysfunction. That being said, we hypothesized that the compliance and structure of cerebral arteries is essentially controlled by the endothelium.

To validate our hypothesis, in a first study, we selected three distinct therapeutic approaches that modulated the cerebral endothelial function and the mechanical stress imposed to the vascular wall by lowering heart rate in a mouse model of atherosclerosis, LDLr^{-/-}; hApoB-100^{+/+} during three months. Ivabradine, metoprolol and voluntary physical training protected, with different efficiencies, the cerebral flow-mediated dilation and this was reflected by a prevention, or not, of the increase in compliance. A 13.5 % heart rate reduction with ivabradine and metoprolol limited carotid artery stiffening. Voluntary physical training did not induce an overall reduction of heart rate explaining the lack of effect on carotid mechanics and suggesting that carotids compliance is more influenced by the mechanical stress imposed to the vascular wall by the cardiac cycle.

In a second study, we confirmed our previous findings using a dietary approach that targeted more directly the endothelium, the polyphenol antioxidant catechin. Catechin was previously proven, by us and others, to reverse endothelial dysfunction, reduce inflammation and neutralize reactive oxygen species in diverse vascular beds from animal models of atherosclerosis. Accordingly, we found that catechin prevents adverse cerebral wall remodeling but, again, without a significant heart rate reduction, carotids

remained stiff. We also integrated a new live imaging technology allowing us to confirm our findings *in vivo* and to demonstrate that endothelial, structural and mechanical protection by catechin can result in an improvement of basal cerebral blood flow.

Finally, both studies identified metalloproteinase -9 as a potential player in the process leading the weakening of the cerebral artery walls.

Taken together, our studies highlight that structural and biomechanical alterations are genuinely triggered by endothelial dysfunction. In carotids, mechanical stress seems to be the main factor controlling remodeling. In essence, indirect protection of the endothelium impedes in cerebral vessels the remodeling processes, such as the activation of metalloproteinase -9.

Numerous studies have revealed that vascular, especially cerebral endothelial dysfunction is implicated in the pathogenesis of Alzheimer's disease. When brain perfusion is compromised, the suboptimal energy delivery causes neuronal death. Deleterious cerebrovascular outcomes that promote the impairment of vasodilation and the encroachment of the lumen will limit cerebral blood flow in a chronic manner. Chronic treatment with ivabradine, voluntary physical training and catechin preserved the endothelial function, the structure and the mechanics of cerebral arteries, which guarantees a closer management of cerebral blood flow in atherosclerotic mice and a reduce propensity to develop cognitive deficiency.

Keywords : cerebral circulation, compliance, vascular remodeling, endothelial dysfunction, cerebral blood flow, metalloproteinases, heart rate, oxidative stress.

Table des matières

Résumé	iii
Abstract	v
Table des matières.....	vii
Liste des tableaux	xii
Liste des figures	xiii
Abréviations.....	xv
Remerciements	xxi
1. Introduction	28
1.1. La circulation cérébrale.....	28
1.1.1. L'anatomie cérébrovasculaire	28
1.1.2. La structure des artères cérébrales	31
1.1.3. La mécanique des artères cérébrales	32
1.1.3.1. Comment mesurer les propriétés mécaniques des artères.....	33
1.1.4. La vasoréactivité des artères cérébrales	35
1.1.4.1. Le tonus myogénique	36
1.1.4.2. Les dilatations induites par le débit.....	38
1.1.4.3. Les contractions induites par le débit.....	42
1.1.5. La régulation du débit sanguin cérébral	44
1.1.5.1. Adaptation du DSC pendant l'exercice physique	49
1.2. Impact des facteurs de risque cardiovasculaire sur la circulation cérébrale.....	51
1.2.1. Remodelage des artères cérébrales.....	51
1.2.1.1. Changement dans la structure de la paroi	52
1.2.1.2. Changement dans la mécanique de la paroi	53
1.2.1.3. Mécanismes associés au remodelage cérébral	62
1.2.1.4. Implication des métalloprotéinases dans le remodelage cérébrovasculaire.....	65
1.2.2. La dysfonction endothéliale cérébrale	68

1.2.3.	La dérégulation du DSC	72
1.2.3.1.	Mécanismes impliqués dans la dérégulation chronique du DSC.....	72
1.2.3.2.	Association entre la dérégulation du DSC et les pathologies cérébrales ..	75
1.2.4.	Relation entre la structure, la fonction endothéliale et la régulation du DSC	78
1.3.	Les traitements susceptibles de protéger l'endothélium vasculaire cérébral	81
1.3.1.	Les chronotropes négatifs	81
1.3.1.1.	La preuve de concept	81
1.3.1.2.	L'ivabradine	83
1.3.1.3.	Les antagonistes des récepteurs β -adrénergiques ou β -bloquants	84
1.3.2.	Les antioxydants polyphénols.....	88
1.3.2.1.	La preuve de concept	88
1.3.2.2.	Les mécanismes d'action	90
1.3.2.3.	L'impact sur la fonction endothéliale	90
1.3.3.	Les statines.....	93
1.3.3.1.	La preuve de concept	93
1.3.3.2.	Les mécanismes d'action	93
1.3.3.3.	L'impact sur la fonction endothéliale	94
1.3.4.	L'exercice physique	95
1.3.4.1.	La preuve de concept	95
1.3.4.2.	Les mécanismes d'action	96
1.3.4.3.	L'impact sur la fonction endothéliale	98
2.	La démarche et les objectifs des études.....	102
2.1.	Mise en contexte	102
2.2.	Étude 1	103
2.2.1.	L'hypothèse	104
2.2.2.	Les objectifs spécifiques	104
2.3.	Étude 2	104
2.3.1.	L'hypothèse	105
2.3.2.	Les objectifs spécifiques	105

2.4.	Étude préliminaire non-publiée	105
2.4.1.	Les objectifs spécifiques	106
3.	Matériels et méthodes	108
3.1.	Le modèle animal	108
3.2.	Les traitements	110
3.2.1.	L'ivabradine	110
3.2.2.	Le métoprolol	111
3.2.3.	L'exercice physique volontaire	111
3.2.4.	La catéchine	113
3.3.	Mesure de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle	117
3.3.1.	La télémétrie.....	117
3.3.2.	Le manchon caudal (<i>tail-cuff</i>).....	117
3.4.	Prélèvement sanguin et dosage plasmatique	118
3.5.	Quantification de la plaque aortique	118
3.6.	Histologie : marquage Verhoeff-Van Gieson	119
3.7.	Le myographe pressurisé : étude de la réactivité, de la biomécanique et de la structure des artères cérébrales	120
3.7.1.	Description du système de myographe pressurisé	121
3.7.2.	Isolation des artères cérébrales.....	122
3.7.3.	Installation d'une artère dans un myographe pressurisé	123
3.7.4.	Procédure pour évaluer la réactivité vasculaire	124
3.7.5.	Procédure pour évaluer la biomécanique et la structure	126
3.8.	Évaluation de l'expression protéique par immunobuvardage de type Western	130
3.8.1.	Isolation des vaisseaux cérébraux	130
3.8.2.	Extraction des protéines	131
3.8.3.	Séparation des protéines sur gel et transfert.....	131
3.8.4.	Détection	132
3.9.	Évaluation de l'activité des métalloprotéinases par zymographie	133
3.9.1.	Extraction des protéines	134
3.9.2.	Séparation des protéines.....	134

3.9.3.	Détection	134
3.9.4.	Contrôle positif et négatif	135
3.10.	Composition lipidique des vaisseaux cérébraux	135
3.10.1.	Quantification du cholestérol	136
3.10.1.1.	Extraction des lipides	136
3.10.1.2.	Quantification du cholestérol et des esters de cholestérol	136
3.10.2.	Quantification des acides gras	137
3.10.2.1.	Extraction des lipides	137
3.10.2.2.	Extraction des acides gras	137
3.10.2.3.	Synthèse des esters méthyliques d'acides gras	138
3.10.2.4.	Analyse des échantillons par GC-FID	138
3.11.	La tomographie par cohérence optique couplée au Doppler	139
3.12.	Analyses statistiques	140
4.	Articles.....	142
4.1.	Article 1.....	142
4.1.1.	Apport original et contribution des coauteurs.....	142
4.1.2.	Manuscrit	144
4.2.	Article 2.....	184
4.2.1.	Apport original et contribution des coauteurs.....	184
4.2.2.	Manuscrit	185
5.	Étude préliminaire non-publiée: Impact de la pulsatilité sur les fonctions vasculaires cérébrales.....	222
5.1.	Introduction.....	222
5.2.	Hypothèses et objectifs	225
5.3.	Matériels et méthodes	225
5.3.1.	TM	226
5.3.2.	WB	226
5.4.	Résultats préliminaires.....	228
5.5.	Discussion	230
5.6.	Conclusions et perspectives.....	230

6. Discussion	232
6.1. Les artères cérébrales sont-elles vraiment plus résistantes à l'athérogenèse ?	233
6.2. Pourquoi les artères cérébrales et les carotides des souris ATX se remodelent-elles différemment?	235
6.3. Que connaît-on de l'implication de la MMP-9 dans le remodelage cérébral associé à l'athérosclérose ?	237
6.4. Quelle est la relation entre la fonction endothéliale et l'activité de la MMP-9 au niveau cérébrovasculaire ?	238
6.5. Y-a-t-il une relation entre l'activité cérébrale de MMP-9 et les déficits cognitifs ?	240
6.6. La compliance des artères cérébrales influence-t-elle positivement ou négativement le contrôle du DSC?	241
6.7. Pourquoi l'exercice physique ne réduit pas la plaque dans l'aorte des souris ATX ?	243
6.8. Les limitations	245
7. Conclusions et perspectives	249
8. Références	255

Liste des tableaux

Tableau I Modèles expérimentaux, chez le rat ou la souris, caractérisés par un remodelage cérébrovasculaire ; facteurs pouvant potentiellement induire ce remodelage.....	58
Tableau II Évolution du poids (g), des lipides plasmatiques (mM) et de la glycémie (mM) chez les souris WT et ATX.	115
Tableau III Évolution de la fréquence cardiaque (FC, bpm), mesurée par télémétrie et des pressions systolique et diastolique (Psys et Pdia, mm Hg), mesurés par plethysmographie (manchon caudal), chez les souris ATX et WT utilisées dans l'étude 1.	116
Tableau IV Évolution de la fréquence cardiaque (FC, bpm), des pressions systolique et diastolique (Psys et Pdia, mm Hg) mesurées par plethysmographie (manchon caudal) chez les souris ATX et WT utilisées dans l'étude 2.	117

Liste des figures

Figure 1 Représentation des artères du polygone de Willis qui acheminent le sang au cerveau chez (A) la souris et (B) l'humain.	30
Figure 2 Schématisation des contraintes hémodynamiques appliquées tangentiellement (les contraintes de cisaillement (SS), propulsées par le débit sanguin) et circonférentiellement (la paroi la tension pariétale (TP), exercée par la pression sanguine) sur la paroi.	36
Figure 3 Schématisation des mécanismes généraux impliqués dans la FMD.	41
Figure 4 Schématisation des mécanismes potentiellement impliqués dans la FMC cérébrovasculaire.	43
Figure 5 Schématisation de l'autorégulation du DSC en absence et présence d'hypertension.	45
Figure 6 Schématisation de la réponse vasodilatatrice locale et de sa propagation rétrograde vers les artères piales, en réponse à l'activation neuronale du cortex somatosensoriel.	48
Figure 7 Schématisation de l'impact de l'hypertrophie interne et de l'augmentation de la compliance associées à l'hypertension chronique sur les artérioles cérébrales de rat lors d'une contraction ou d'une dilatation maximale.	55
Figure 8 Schématisation du cercle vicieux entre la structure et la fonction endothéliale.	80
Figure 9 Schématisation des effets directs des polyphénols sur les cellules endothéliales conduisant à la vasodilatation des CMVL.	92
Figure 10 Schématisation des principaux mécanismes impliqués dans la protection de la fonction endothéliale associée à l'exercice physique.	97
Figure 11 Apparition spontanée des lésions athérosclérotiques chez la souris ATX.	110
Figure 12 Représentations graphiques des paramètres évalués afin de quantifier l'EPV effectué par chacune des souris.	113
Figure 13 Schématisation du système de myographe pressurisé.	122
Figure 14 Vue basale d'un cerveau de souris illustrant les principales composantes vasculaires.	123

Figure 15 Représentation graphique de la relation <i>stress-strain</i>	127
Figure 16 Illustration d'une artère cérébrale isolée pressurisée à 60 mm Hg (A) schématisation des protocoles utilisés pour étudier la réactivité au débit (B) et la biomécanique (compliance et distensibilité incrémentielle) (C).	129
Figure 17 Schématisation des mécanismes impliqués dans la régulation du TM.....	224
Figure 18 Schématisation de la méthode de détection de WB à trois anticorps.	227
Figure 19 Effet d'une pulsation d'amplitude de 30 mm Hg à une fréquence de 9.2 Hz sur la régulation du TM des artères cérébrales de souris WT âgées de 3 mois, avec et sans inhibition de la eNOS.....	228
Figure 20 Impact des pulsations avec ou sans inhibition de eNOS sur la phosphorylation de la MLCP dans les artères cérébrales de souris WT âgées de 3 mois, isolées et pressurisées à 60 mm Hg.....	229
Figure 21 Corrélation négative significative entre la FMD et le <i>strain</i> circonférentiel dans les artères cérébrales de souris.....	246
Figure 22 Schématisation de la voie de signalisation responsable de la dilatation des artères pulmonaires de souris par la stimulation des β_2 -AR endothéliaux.	252

Abréviations

ΔP	variation de la pression (P)
0Ca ²⁺ PSS	solution saline physiologique dépourvue de calcium
20-HETE	20-hydroxyeicosatétraénoïque
2-VO	modèle d'occlusion bilatérale des carotides communes ; 2 <i>vessels occlusion</i>
5-HT	sérotonine (5-hydroxytryptamine)
AC	adénylate cyclase
ACA	artère cérébrale antérieure
ACCA	artère cérébrale communicante antérieure
ACE	enzyme de conversion de l'angiotensine
ACEI	inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine
ACh	acétylcholine
AGEs	produits de glycation avancée
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
AngII	angiotensine II
ApoB	apolipoprotéine de type B
ApoE	apolipoprotéine de type E
ApoE ^{-/-}	souris n'exprimant plus l'apolipoprotéine E
ATP	adénosine triphosphate
ATX	LDLr ^{-/-} ; hApoB ^{+/+} , modèle de souris athérosclérotiques
AT ₁	récepteur-1 à l'angiotensine II
AVC	accident vasculaire cérébral
BBB	barrière hémato-encéphalique ; <i>blood-brain barrier</i>
BH4	tétrahydrobioptérine
BK _{Ca}	canal potassique dépendant du Ca ²⁺ de grande conductance
BPH-2	modèle d'hypertension indépendant de la rénine
bpm	battements par minute
C	compliance
C19:0	acide nonadécylique

xvi

Ca ²⁺	calcium
CaM	calmoduline
CAT	catéchine
CBS	cystathionine β -synthétase
CMLV	cellule musculaire lisse vasculaire
COX	cyclo-oxygénase
CuZnSOD	cuivre et zinc superoxyde dismutase
CV	cardiovasculaire
CYP450	enzymes du cytochrome P450
D	diamètre interne de l'artère
d	diem
DE	dysfonction endothéliale
DOCA	acétate de désoxycorticostérone
DSC	débit sanguin cérébral
ECGC	(-)-épigallocatechine gallate
EDCF	facteur contracteur dérivé de l'endothélium (TXA ₂ , ROS, ET-1)
EDHF	facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium
EDRF	facteur relaxant dérivé de l'endothélium (NO, H ₂ O ₂ , EDHF, PGI ₂)
EET	acide époxyécicosatriénoïque
eNaC	canaux sodiques de la membrane apicale des cellules épithéliales
eNOS	monoxyde d'azote synthétase endothéliale
eNOS ^{-/-}	souris n'exprimant plus la monoxyde d'azote synthétase endothéliale
EP	épaisseur de la paroi
EPV	exercice physique volontaire
ET-1	endothéline-1
ET _A et ET _B	récepteurs à l'endothéline-1
FC	fréquence cardiaque
FMD	dilatation induite par le débit ; <i>flow-mediated dilation</i>
GCS	guanylate cyclase soluble
G _i	protéine G inhibitrice
GMPc	guanosine monophosphate cyclique

GPx	gluthathion peroxydase
G _{q/11}	protéine G qui stimule la phospholipase C
GTP	guanosine triphosphate
GTPase(s)	enzyme qui hydrolyse la guanosine triphosphate en guanosine diphosphate
H ⁺	ion hydrogène
H ₂ O ₂	peroxyde d'hydrogène
hApoB ^{+/+}	souris surexprimant l'apolipoprotéine B-100 humaine
HDL	lipoprotéine à haute densité
HMG-CoA	3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A
hR ⁺ /hA ⁺	souris surexprimant la rénine et l'angiotensinogène humains
I/R	ischémie/reperfusion
ICAM	molécule d'adhésion intercellulaire; <i>inter-cellular adhesion molecule</i>
ID	distensibilité incrémentale
iNOS	monoxyde d'azote synthétase inductible
iNOS ^{-/-}	souris n'exprimant plus la monoxyde d'azote synthétase inductible
IP	récepteur des prostaglandines I ₂
IRM	imagerie par résonance magnétique
IVA	ivabradine
K ⁺	ion potassique
K _{ATP}	canal potassique sensible à l'adénosine triphosphate
K _V	canal potassique dépendant du voltage
L	longueur
LDL	lipoprotéine de basse densité
LDLr	récepteur des lipoprotéines de basse densité
LDLr ^{-/-} ; hApoB-100 ^{+/+}	souris n'exprimant pas le récepteur aux lipoprotéines de basse densité mais exprimant l'apolipoprotéine B-100 humaine
L-NAME	L-nitro-arginine méthyl ester
L-NNA	N ^ω -nitro-L-arginine
Lox	lipoxygénases
MCA	artère cérébrale moyenne

MCP-1	protéine-1 chimioattractante des monocytes ; <i>monocyte chemotactic protein 1</i>
MEC	matrice extracellulaire
METO	métoprolol
MLC ₂₀	chaîne légère de la myosine de 20 K Da ; <i>myosin light chain of 20 kDa</i>
MLCK	kinase de la chaîne légère de la myosine ; <i>myosine light chain kinase</i>
MLCP	phosphatase de la chaîne légère de la myosine ; <i>myosin light chain phosphatase</i>
MMP-2,-9	métalloprotéinase de type 2 ou 9
MnSOD	manganèse superoxyde dismutase
Na ⁺	ion sodium
NADPH	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NGF	facteur de croissance neuronal ; <i>neuronal growth factor</i>
nNOS	monoxyde d'azote synthétase neuronale
NO	monoxyde d'azote ; <i>nitric oxide</i>
NOS	NO synthétase
Nox	NADPH oxydase
O ₂ ⁻	anion superoxyde
O ₂	oxygène
OCT	tomographie par cohérence optique
OH [•]	radical hydroxyle
ONOO ⁻	peroxynitrite
ox-LDL	lipoprotéines oxydées à basse densité
P	pression intraluminale
PA	pression artérielle
PaCO ₂	pression partielle en CO ₂
PAM	pression artérielle moyenne
PaO ₂	pression partielle en O ₂
PCA	artère cérébrale postérieure
PCCA	artère cérébrale postérieure communicante
Pdia	pression artérielle diastolique

PE	phényléphrine
PGI ₂	prostacycline
PI3K	phosphatidylinositol 3-kinase
PKA	protéine kinase A activée par l'AMPc
PKC	protéine kinase C activée par le diacylglycérol
PKG	protéine kinase G activée par le GMPc
PP	pression pulsée
PPAR γ	récepteur γ du facteur activé de prolifération des peroxysomes ; <i>peroxisome proliferator-activated receptor γ</i>
PSS	solution saline physiologique
Psys	pression artérielle systolique
PWV	vélocité de l'onde pulsée ; <i>pulse wave velocity</i> (m/s)
Q	débit (ml/sec)
r	rayon (cm)
RAS	système rénine-angiotensine II
ROS	substances oxygénées réactives ; <i>reactive oxygen species</i>
SAC	canaux activés par l'étirement ; <i>stretch-activated channels</i>
SEM	erreur standard à la moyenne
SeP	sclérose en plaques
SHR	rats spontanément hypertendus
SHRSP	rats spontanément hypertendus prédisposés aux accidents vasculaires cérébraux ; <i>stroke-prone spontaneously hypertensive rat</i>
TBST	tampon salin TRIS 0.05 % Tween 20
TIMP	inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases ; <i>tissue inhibitor of metalloproteinases</i>
TM	tonus myogénique
TP	récepteur au thromboxane-prostanoïde
TRP	canal à potentiel de récepteur transitoire; <i>transient receptor potential channel</i>
TXA ₂	thromboxane A ₂
V	volume

xx

VCAM	molécule d'adhésion vasculaire ; <i>vascular cellular adhesion molecule</i>
VEGF	facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VIP	polypeptide vasoactif intestinal
VLDL	lipoprotéines de très faible densité
VO ₂ max	consommation maximale d'oxygène
WKY	Wistar-Kyoto (rats utilisés comme contrôles des rats spontanément hypertendus SHR)
WT	souris de type sauvage
β _{1/2} -AR	récepteurs β ₁ et/ou β ₂ adrénergiques
βA	peptide de la β-amyloïde
η	viscosité (Poise)
τ	contraintes de cisaillement ; <i>shear stress</i> (dynes/cm ²)

Remerciements

Aux membres du Jury, la Dre Hélène Girouard, la Dre Stéphanie Lehoux et le Dr Jonathan Ledoux,

Merci d’avoir accepté de donner de votre précieux temps afin d’évaluer et critiquer ma thèse. Je prends    cœur votre appréciation de mon travail, vos remarques constructives me permettront d’améliorer grandement la qualité de cette thèse.

   mon directeur de recherche et mentor,   ric Thorin,

Aux dires d’un bon nombre d’étudiants, ils appréhendent de se faire «cuisiner» par toi après leur présentation orale mais, ils aimeraient tous t’avoir comme patron. Par tes questions toujours extrêmement pertinentes, tu nous pousses à nous remettre sans cesse en question et tu nous emp  ches de tomber dans les dogmes. Ta passion et ton enthousiasme pour la recherche sont contagieux. Outre tes nombreuses qualités professionnelles, tes qualités humaines ne peuvent être passées sous le silence. Il est clair que le bien-être de tes étudiants fait partie de tes préoccupations, tu t’es toujours montré disponible pour moi et tu as fait preuve d’une grande confiance à mon égard. Tu es probablement la personne la plus cultivée que je connaisse, le temps passé avec toi    «l’international» m’a permis de découvrir de fabuleux endroits et m’a incité à m’ouvrir à l’art, à l’histoire et au monde. Mon temps passé dans ton laboratoire m’a grandement aid  e à surmonter mon manque de confiance en moi et à faire valoir mon esprit critique. Un merci tout particulier pour ta grande aide du côté carrière.

   ma co-directrice de recherche, Christine Des Rosiers,

C’est dans ton laboratoire que mon histoire d’amour avec la recherche scientifique a pris forme. Moi qui étais persuadée d’entrer sur le marché du travail après mon stage de maîtrise, tu as révélé en moi un potentiel dont j’ignorais l’existence. Je peux dire que mon passage dans ton laboratoire a été une étape déterminante dans ma vie. Heureusement pour moi, notre relation s’est poursuivie tout au long de mon doctorat où tu as su m’encourager et me conseiller.

À Nathalie Trescases-Thorin,

Ton enseignement de la communication scientifique a été un élément capital dans l'aboutissement de mes travaux. Tu es toujours disposée à me donner ton opinion, en toute franchise, sur mes présentations orales et mes écrits, ce qui m'a permis de m'améliorer continuellement et de développer une confiance en mes capacités communicatives. Malgré ton travail complexe et exigeant, tu t'es toujours montrée à l'écoute, pleine de délicatesse, attentionnée (chaque anniversaire est souligné) et disponible pour mettre un baume sur mes petites angoisses du quotidien. Ta façon de concilier carrière et famille force mon admiration.

À mes collègues et amis du laboratoire, par ordre d'ancienneté bien sûr,

À Nada Farhat,

Tu es, incontestablement, la «fille la plus gentille de l'Institut» et ce n'est pas juste moi qui le dit. Ta générosité dépasse tes moyens et ton sourire est inconditionnel, ce n'est pas pour rien que tu as autant d'admirateurs. Grâce à toi, venir travailler la fin de semaine me remplissait de joie et je n'exagère presque pas. Je suis sûre que ton futur sera rempli de bonheur, tu le mérites tellement !

À Annick Drouin,

Sans avoir la preuve vivante qu'il était possible de monter une artère cérébrale de souris en deux minutes, je n'y aurais peut-être pas cru. Merci de m'avoir enseigné tous les rudiments du myographe. J'ai toujours éprouvé beaucoup de plaisirs à défendre avec toi le point de vue «féminin» contre le clan masculin du laboratoire lors des débats d'opinion amicaux pendant l'heure du dîner.

À Albert Nguyen,

Les taquinerie dont tu es sans cesse victime ne sont qu'une preuve de la grande appréciation que l'on te voue. Tu as toujours fait l'unanimité malgré ton penchant pour la controverse. Tu aimes créer une ambiance zizanique amicale, provoquer et nous «infecter» le cerveau avec tes énigmes pas possibles. Ton imagination sans limite nous

permet de décrocher au laboratoire et de voir les choses sous une autre perspective, soit à ta manière.

À François Leblond,

Je le sais qu'on te le dit souvent mais, ton éthique de travail est irréprochable. Ta grande maturité, ton respect et ta gentillesse sont aussi tes qualités fortes chez toi. Tu t'es toujours montré intéressé de façon égalitaire à chacun d'entre nous, ce qui contribue grandement à mettre tout le monde à l'aise au laboratoire. Tu es aussi digne de confiance. Il ne s'en fait plus beaucoup, des comme toi !

À Nour El-Amine,

Ta présence dans le labo a été très marquante. Tu as apporté une toute nouvelle dynamique sociale autant au sein du laboratoire qu'au niveau des étudiants de l'Institut. Ta dévotion au comité étudiant en est sûrement pour quelque chose. Je garde de bons souvenirs de ton passage.

À Carol Yu,

Your laid-back personality is surely not affected by the amount of sugar you can absorb in a day. Your chill mood and your ability to laugh your way out is a breath of fresh air considering PhD students are often stressed out about nothing and everything. You are a very curious girl with who a little chit-chat is always big fun.

À Xiao Yan Luo,

You are a very surprising young woman. I would have loved to get more time to discover you. Your great kindness assures you a positive life's journey as once said the chinese philosopher Lao Tzu : «Kindness in words creates confidence. Kindness in thinking creates profoundness. Kindness in giving creates love » (604-531 BC). I really hope you will find your true passion.

Aux employés de l'Institut de Cardiologie de Montréal,

À Louis Villeneuve,

Que j'en ai passé du temps dans ta garçonnière obscure. On a échangé des potins, tu m'as enseigné la déconvolution ainsi que d'autres concepts de microscopie confocale qui sont encore un peu occultes pour moi. Échanger avec toi a toujours été une source de plaisirs.

À Marc-Antoine Gillis, Natacha Duquette, Karine Bouthillier ainsi qu'à tout le personnel de l'animalerie,

Vous êtes de vrais professionnels. Je ne vous ai pas dit assez souvent comment votre travail est important et apprécié.

Aux collaborateurs, Isabelle Frayne-Robillard, Edward Baraghis et Dr Frédéric Lesage,

Grâce à vous, j'ai pu avoir accès à des techniques innovatrices, ce qui m'a permis d'améliorer grandement la qualité de mes travaux. Notre collaboration a été extrêmement fructueuse et agréable.

À ma famille et mes amis,

À Jean, Sylvie, Mathieu et Stéphanie,

Malgré vos nombreuses blagues au sujet de mon doctorat, je sais que je suis bien plus qu'une tueuse en «souris» à vos yeux. Merci de vous intéresser à mes études, à votre façon, en me demandant : «quand est-ce que tu finis là ?» ou «c'est où le prochain congrès ? ». Sans que vous vous en rendiez compte, vous m'avez permis d'aiguiser mes aptitudes en vulgarisation scientifique et de resituer mes travaux dans un contexte plus large et plus global. Merci de m'avoir supportée tout au long de mes études.

À Caroline, Jessyca, Sophie et Véronique,

Votre support moral et votre capacité à me changer les idées sont des éléments importants qui m'ont permis de garder la motivation et la bonne humeur, surtout quand

un petit 5 à 7 en votre compagnie m'attend après le travail. Merci pour tout et j'espère que notre belle relation perdure.

À Hugo,

Tu ne partages mon quotidien le soir et la fin de semaine que six mois par année mais, tu connais tout ce qui passe au labo dans les moindres détails. Merci pour ton écoute et ton support. Je sais que ce n'est pas toujours facile de vivre avec une pauvre étudiante de 28 ans toujours débordée de travail, mais tu peux te consoler en te disant que je ne suis pas encore à l'école parce que je n'y ai rien compris, mais plutôt parce que j'ai voulu en apprendre d'avantage...

J'ai très hâte d'amorcer la prochaine étape de ma vie à tes côtés.

«Choisissez un travail que vous aimez et vous
n'aurez pas à travailler un seul jour de votre vie.»
Confucius, Philosophe chinois, 551-479 av J.-C.

Introduction

1. Introduction

Dans cette section est présentée une revue de la littérature décrivant les notions pertinentes à l'élaboration de mon projet de recherche. Une première partie est consacrée aux notions physiologiques de la circulation cérébrale propres aux hypothèses et objectifs de travail. Ces notions sont ensuite redécrites dans un contexte pathologique tel que l'hypertension artérielle puisque très peu de données sont rapportées dans la dyslipidémie sévère ou l'athérosclérose. Finalement, les traitements cardioprotecteurs susceptibles de protéger les atteintes cérébrovasculaires associées aux facteurs de risque cardiovasculaire sont présentés.

1.1. La circulation cérébrale

1.1.1. L'anatomie cérébrovasculaire

Le cerveau humain ne compte que pour 2 % du poids mais il reçoit 15 % du débit cardiaque afin de supporter le métabolisme neuronal (Hall, 2006). Pour atteindre le cerveau comme pour tous les autres organes et tissus excepté le poumon, le sang doit circuler par l'aorte. Celle-ci est connectée au ventricule gauche par une arche, la crosse aortique, d'où naissent la carotide primitive gauche et le tronc artériel brachiocéphalique d'où va naître la carotide primitive droite. Les artères vertébrales droite et gauche naissent des artères sous-clavières respectives.

Les carotides communes sont des artères paires disposées de part et d'autre du cou, donc directement en amont de la circulation cérébrale. Chacune se divise en carotide externe qui transporte le sang au visage et en carotide interne qui assure une partie de l'apport sanguin au cerveau. Les carotides internes pénètrent dans la boîte crânienne par le lobe temporal et donnent naissance à quatre branches au niveau de la scissure de Sylvius : l'artère cérébrale antérieure (ACA), l'artère cérébrale moyenne (MCA), l'artère communicante postérieure (PCCA) ainsi que l'artère postérieure (PCA) (Fitzgerald, 1996). Le réseau formé par ces artères de résistance est le polygone de Willis.

La vascularisation du tronc cérébral et du cervelet dépend du système vertébro-basilaire constitué par les deux artères vertébrales et le tronc basilaire (Fitzgerald, 1996). Chacune des artères vertébrales naît à la face supérieure de l'artère sous-clavière, monte obliquement le long de la colonne vertébrale, pénètre dans le cerveau par le *foramen magnum* et elles se rencontrent pour former l'artère basilaire (Fitzgerald, 1996). L'artère basilaire longe la protubérance formée par le tronc cérébral.

Chez la souris, il n'existe pas de communication entre les artères du polygone de Willis qui sont alimentées par les carotides internes, et le territoire alimenté par l'artère basilaire (Okuyama *et al.*, 2004) (Figure 1A). L'artère carotide interne se jette dans les artères postérieures du polygone de Willis et le sang quitte le domaine antérieur par l'ACA qui devient l'artère olfactive. Chez la souris, le polygone de Willis n'est donc pas vraiment un polygone (Figure 1A).

Chez l'humain, la PCA est une branche de la basilaire, qui connectée au polygone de Willis par la PCCA, forme un circuit fermé (Okuyama *et al.*, 2004) (Figure 1B). Le sang de la carotide interne est directement drainé dans la MCA sans circuler dans le domaine postérieur du polygone de Willis (Okuyama *et al.*, 2004). Chez l'humain, la MCA est la branche la plus importante de la carotide interne car elle perfuse la majeure partie des lobes temporaux, frontaux et pariétaux (Fitzgerald, 1996). La MCA est souvent impliquée dans les hémorragies et les occlusions cérébrales et est surnommée *l'artery of stroke*. En effet, la minceur de sa paroi par rapport à la pression sanguine qu'elle subit la rend extrêmement vulnérable (Fitzgerald, 1996). Chez l'humain, l'occlusion de la MCA entraîne des déficits sensoriels et moteurs ainsi qu'une diminution des capacités cognitives (aphasie et trouble de la mémoire) (Bakker *et al.*, 2000; Xie *et al.*, 2010).

Les embranchements des artères du polygone de Willis se nomment artères piales ; comme leur nom le suggère, elles longent la surface du cerveau et cheminent sous la pie-mère (Cipolla, 2009). Les artères du polygone de Willis et les artères piales sont dotées d'une innervation périvasculaire qui est progressivement remplacée par une association aux neurones et aux astrocytes intracérébraux, lorsqu'elles deviennent

successivement des artérioles pénétrantes, des artérioles parenchymateuses et des capillaires (Cipolla, 2009).

Le drainage du cerveau est assuré par les veines cérébrales superficielles et profondes. Les veines superficielles parcourent le cortex et la matière blanche et se déversent dans les sinus veineux intracrâniens (sagittal, carverneux et transversal) (Fitzgerald, 1996). Comme leur nom le suggère, les veines cérébrales profondes drainent les structures internes, telles que le thalamus, le striatum et les plexus choroïdes, et se jettent dans la grande veine de Galen (Fitzgerald, 1996). Cette veine fusionne avec le sinus sagittal inférieur pour former le sinus droit qui se vide à son tour dans le sinus transverse droit. Les sinus amènent le sang aux veines jugulaires internes localisées latéralement aux carotides internes puis communes.

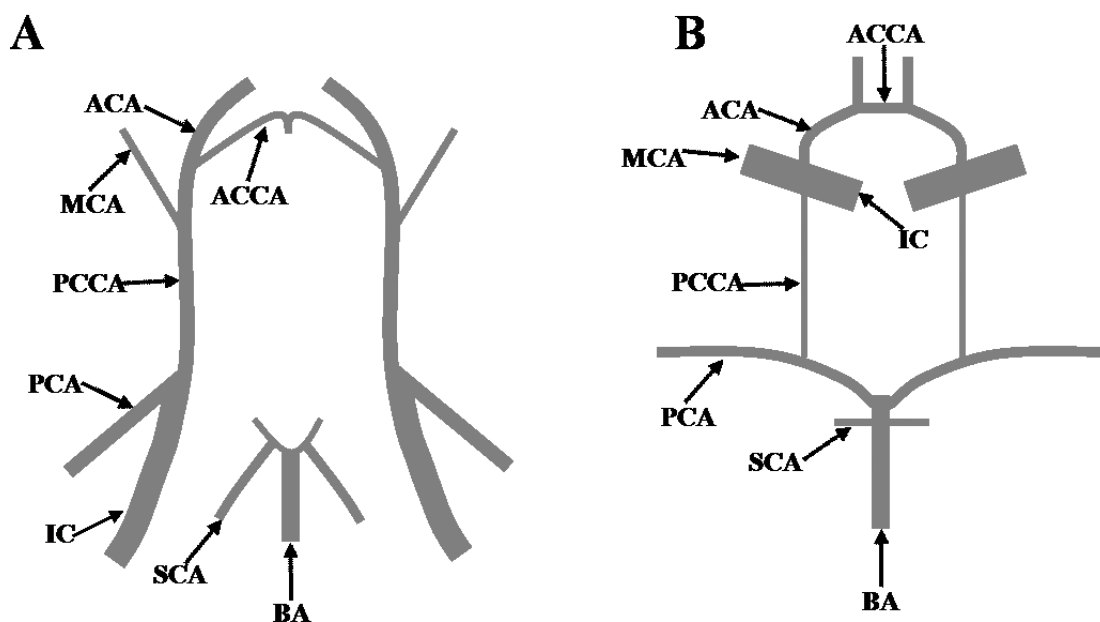


Figure 1 Représentation des artères du polygone de Willis qui acheminent le sang au cerveau chez (A) la souris et (B) l'humain.

ACA : artère cérébrale antérieure, ACCA : artère cérébrale communicante antérieure, MCA : artère cérébrale moyenne, PCCA : artère cérébrale communicante postérieure, PCA : artère cérébrale postérieure, IC : carotide interne, SCA : artère cérébelleuse supérieure, BA : artère basilaire. Inspirée (Okuyama *et al.*, 2004).

1.1.2. La structure des artères cérébrales

La paroi artérielle se décrit généralement comme une succession de trois couches : l'intima, la media et l'adventice. L'intima est une monocouche de cellules endothéliales communément connue sous le nom d'endothélium. Les cellules endothéliales sont localisées à l'interface entre le sang circulant et les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) et donc, assurent un dialogue entre ces deux entités. Les cellules endothéliales régulent, entre autre, la perméabilité vasculaire, l'agrégation plaquettaire, la vasoconstriction et la vasodilatation (Cottart *et al.*, 2009). L'endothélium synthétise la lame basale qui renforce sa capacité de filtration moléculaire en plus de lui offrir un certain support physique. L'endothélium qui tapisse l'intérieur des capillaires cérébraux se distingue fondamentalement de celui retrouvé au niveau périphérique. Il possède des ultrastructures lui permettant de gérer étroitement le contenu des liquides extracellulaire et cérébrospinal. Cette barrière physique hautement spécialisée porte le nom de barrière hémato-encéphalique (BBB ; *blood-brain barrier*). La BBB empêche le passage des molécules hydrosolubles et de gros calibres, mais permet aux petites molécules lipophiliques et aux nutriments essentiels tels le glucose de traverser par transport actif et par des transporteurs spécifiques (Rubin & Staddon, 1999). Au niveau des capillaires cérébraux, les cellules endothéliales adjacentes sont si étroitement disposées qu'elles forment une cloison étanche ; cet arrangement porte le nom de jonctions serrées (Rubin & Staddon, 1999). La rareté des vésicules pinocytotiques endothéliales au niveau des capillaires cérébraux est aussi une caractéristique de la BBB (Fitzgerald, 1996). Sur la membrane apicale des cellules endothéliales se trouve une forte concentration en transporteur P-glycoprotéine qui renvoie à la circulation les molécules lipophiliques indésirables, ce qui diminue la perméabilité de la barrière (Rubin & Staddon, 1999).

La media est principalement composée de CMLV arrangées concentriquement, qui contrôlent la résistance vasculaire en maintenant un tonus myogénique (TM) (Cottart *et al.*, 2009). La matrice extracellulaire (MEC) de la media est composée de fibres structurales (élastine et collagène). La media est délimitée par deux lames élastiques interne et externe. L'interne est composée d'élastine perforée ce qui permet aux

nutriments sanguins de diffuser vers les cellules les plus éloignées de la lumière. Ces perforations rondes ou ovales sont connues sous le nom de fenestrations. Leur densité et leur taille varient considérablement selon l'espèce, la localisation dans le lit vasculaire et l'âge (Lee, 1995). La lame élastique externe contient du collagène, des fibroblastes et des cellules nerveuses. Les artères cérébrales se distinguent des artères systémiques par l'absence de lame élastique externe et par une media pauvre en fibres élastiques (Lee, 1995).

L'adventice est composée de fibroblastes, de péricytes et de fibres de collagène et d'élastine. Son épaisseur varie énormément en fonction de la localisation et de la fonction du vaisseau. Par exemple, dans les artères cérébrales du polygone de Willis, l'adventice est presque inexistante (Lee, 1995), alors que dans les artères de fort calibre, comme la carotide, l'adventice est tellement importante qu'elle contient un *vasa vasorum*, c'est-à-dire son propre réseau vasculaire qui alimente les cellules de la paroi. Ceci étant dit, les artères cérébrales sont extrêmement délicates, elles ne comptent en moyenne que quatre couches de CMLV en plus de l'intima, ce qui se reflète par la faiblesse du ratio entre l'épaisseur de la paroi et le diamètre de la lumière.

1.1.3. La mécanique des artères cérébrales

La majeure partie des différences morphologiques entre les carotides et les artères du polygone de Willis s'explique conceptuellement par leur rôle physiologique respectif. Les carotides sont des artères dites de conductance (Greenwald, 2007). Ainsi, la richesse de leur MEC en élastine et en collagène leur permet d'amortir la pulsativité du flux sanguin afin d'assurer une perfusion sanguine stable et continue vers le cerveau tout au long du cycle cardiaque (Greenwald, 2007). Lors de l'éjection systolique, l'aorte doit s'étirer afin de transformer le débit pulsé en débit continu lors de la diastole ; c'est ce qu'on appelle l'effet Windkessel (décrit par Frank Otto en 1899) (Westerhof *et al.*, 2009). En revanche, les artères cérébrales du polygone de Willis sont des artères dites de résistance. Comme leur média est principalement composée de CMLV, elles exercent un contrôle étroit sur le débit sanguin cérébral qui sera directement acheminé en aval, c'est-à-dire vers les artères piales, les artères intracrâniennes, les artérioles et

les capillaires. Le contenu majoritairement musculaire des artères de résistance leur permet de s'adapter aux diverses conditions physiologiques en modulant leur diamètre.

1.1.3.1. Comment mesurer les propriétés mécaniques des artères

Dans le domaine clinique ou de l'expérimentation animale, les termes compliance ou *stiffness* sont utilisés afin de caractériser les propriétés élastiques de la paroi artérielle. La compliance vasculaire correspond à la capacité d'un vaisseau à s'élargir afin d'accommoder son volume en réponse à une augmentation de la pression intraluminale (Hall, 2006). La compliance (C) est d'autant plus élevée que la pression (P) nécessaire pour amener l'artère à un volume (V) donné est faible, selon la formule $C = \Delta V / \Delta P$ (Hall, 2006). Par exemple, pour de faibles valeurs de pression, la compliance des veines est supérieure à celle des artères. La façon la plus simple de mesurer indirectement la compliance est de déterminer la pression pulsée (PP ; différence entre la pression systolique et la pression diastolique) dans l'artère brachiale avec un sphygmomanomètre ; une PP élevée est un marqueur clinique de rigidité artérielle.

De nos jours, des outils modernes non-invasifs permettent de mesurer la vitesse de l'onde de pouls (PWV ; *pulse wave velocity*), une estimation plus précise et hautement reproductible de la compliance aortique et périphérique. La PWV correspond au temps mis par l'onde de pouls pour se propager le long d'une artère : plus l'artère est rigide, plus la PWV est rapide (Wang, 2007). Ainsi, des sondes Doppler placées à chaque extrémité du segment artériel permettent l'enregistrement simultané de l'onde pulsée. Le délai entre la propagation de l'onde le long de l'artère est calculé à l'aide de l'électrocardiogramme puisque l'onde QRS indique le moment où l'onde pulsée émane du cœur (DeLoach & Townsend, 2008). On obtient la PWV en divisant la longueur du segment imagé par le temps de propagation de l'onde pulsée (Correia & Haynes, 2007). L'augmentation de la PWV indique une diminution de la compliance artérielle, un phénomène associé au vieillissement et/ou à un bon nombre de conditions pathologiques comme l'hypertension, le diabète et l'athérosclérose (Correia & Haynes, 2007). Par exemple, chez des hommes en santé séparés par groupes d'âge, la PWV évaluée à

7.7±1.2 m/s chez les 26 et 41 ans augmente à 10.7±1.7 m/s pour les sujets âgés de 60 à 75 ans (Koivistoinen *et al.*, 2007).

Pour étudier de la relation potentielle entre l'hémodynamie cérébrale et les formes de démence vasculaire, le Doppler transcranial n'est cependant pas assez puissant (Bateman *et al.*, 2006). La quantification du débit sanguin cérébral à l'aide de l'imagerie par résonance magnétique (IRM) permettrait en revanche d'obtenir une mesure absolue de la compliance, facilitant les comparaisons intergroupes. Cette technique permet de déceler des différences surprenantes entre les patients cognitivement intacts et touchés : la compliance cérébrovasculaire, estimée à 20 $\mu\text{l}/\text{mm Hg}$ chez des patients âgés sains, s'élève à 27 $\mu\text{l}/\text{mm Hg}$ les patients atteints de démence vasculaire et baisse à 16 $\mu\text{l}/\text{mmHg}$ chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Bateman *et al.*, 2006). Souvent dépeintes comme un seul syndrome puisqu'elles partagent des facteurs de risque (Bateman *et al.*, 2006), la maladie d'Alzheimer et la démence vasculaire sont des pathologies qui présentent des profils cliniques et des traitements différents (Hanyu *et al.*, 2009b). La compliance cérébrale pourrait s'avérer un marqueur clinique potentiel afin d'orienter le diagnostic et le traitement de ces pathologies. L'IRM s'avère également une technique non-invasive fort intéressante pour mesurer la pression intracrâniale qui s'obtenait auparavant en installant chirurgicalement des sondes dans le système nerveux central (Raksin *et al.*, 2003). Il a été proposé qu'une haute pression intracrâniale est un facteur prédisposant à la maladie d'Alzheimer (Wostyn, 2004).

Une technologie d'imagerie à haute résolution nommée tomographie par cohérence optique (OCT)-Doppler permet également de mesurer la compliance cérébrale (voir 3.11). Toutefois, son application est restreinte au domaine de l'expérimentation animale puisque c'est une procédure invasive.

Ex-vivo, la compliance se mesure directement sur la plupart des vaisseaux isolés en réalisant une courbe pression-diamètre en condition passive à l'aide du myographe pressurisé (voir 3.7).

1.1.4. La vasoréactivité des artères cérébrales

La résistance ou tonus de base vasculaire est le produit de l'équilibre qui règne entre les molécules vasoactives relâchées par l'endothélium et les propriétés myogéniques des CMLV. Un des vieux concepts en physiologie cérébrovasculaire stipule que l'influence des stimuli humoraux sur la circulation périphérique perd toute sa pertinence au niveau cérébral puisque la BBB empêche la plupart de ces molécules d'atteindre les CMLV (Faraci *et al.*, 1990). Certaines régions spécialisées du cerveau font exception à ce concept, par exemple, les plexus choroïdes qui sont alimentés par des capillaires fenestrés (Faraci *et al.*, 1990). Toutefois, l'élévation supraphysiologique d'angiotensine II (Ang II) et de vasopressine pourrait affecter la résistance des grosses artères cérébrales en raison des petites quantités d'hormones diffusent à travers la BBB (Faraci & Heistad, 1990). Il est aussi probable que l'AngII et la vasopressine circulantes agissent directement sur l'endothélium. En effet, il existe des récepteurs-1 à l'AngII (AT₁) au niveau de l'endothélium des artérioles cérébrales de résistance chez la souris (Kazama *et al.*, 2004). Peu d'études ont rapporté la présence de récepteurs à la vasopressine au niveau de l'endothélium cérébrovasculaire. Toutefois, chez le rat, nous savons que l'ARNm du récepteur V_{1a} est présent dans l'endothélium des vaisseaux cérébraux aux niveaux des bulbes olfactifs et des tissus superficiels recouvrant la surface du cerveau (Ostrowski *et al.*, 1994) et que l'expression des récepteurs V_{1a} s'élève considérablement dans les cellules endothéliales des microvaisseaux et des gros vaisseaux localisés dans les régions du cerveau lésées par un choc traumatique (Szmydynger-Chodobska *et al.*, 2004). Soulignons que les contrôles neuronaux sympathique et cholinergique ont aussi une importance non-négligeable sur la résistance des grosses artères cérébrales. Cependant, en condition physiologique, la modulation du diamètre artériel est surtout contrôlée par les forces exercées sur la paroi suite au passage du sang : les contraintes de cisaillement tangentes à la paroi et la tension pariétale exercée par la pression perpendiculairement à la paroi et dictée par la loi de Laplace (tension pariétale : pression sanguine x rayon du vaisseau) (Figure 2)

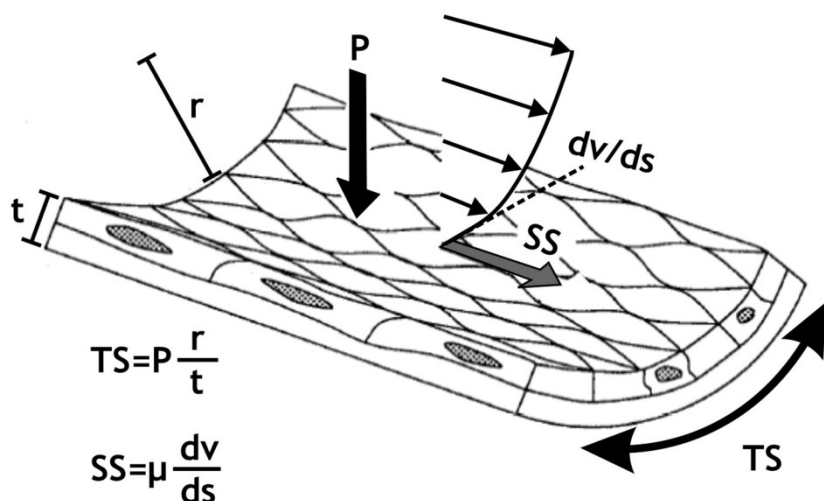


Figure 2 Schématisation des contraintes hémodynamiques appliquées tangentiellement (les contraintes de cisaillement (SS), propulsées par le débit sanguin) et circonférentiellement (la paroi la tension pariétale (TP), exercée par la pression sanguine) sur la paroi.

SS : *shear stress* ; contraintes de cisaillement, TS : tension pariétale ; *tensile stress*, P : pression sanguine, r : rayon de la lumière, t : épaisseur de la paroi, dv/ds : contraintes de cisaillement appliquées sur la paroi, μ : viscosité du sang.

Réimprimé de [International Journal of Cardiology](#), 126/3, George D. Giannoglou, Yiannis S. Chatzizisis, Chrysanthos Zamboulis, George E. Parcharidis, Dimitri P. Mikhailidis, George E. Louridas, Elevated heart rate and atherosclerosis : An overview of the pathogenetic mechanisms, 302-313, Copyright (2008), avec la permission de Elsevier.

1.1.4.1. Le tonus myogénique

La réponse dite myogénique a été décrite pour la première fois en 1902 par le Dr Bayliss (Bayliss, 1902). Le TM découle de la capacité des artères de résistance à ajuster localement leur diamètre en réponse à des variations de la pression artérielle (PA). Le TM est donc le niveau de contraction induit par la pression intraluminale. L'étirement membranaire causé par une augmentation de la pression occasionne des changements de tension au niveau du cytosquelette des CMLV : des canaux ioniques mécanosenseurs (canaux activés par l'étirement (SAC), canaux à potentiel de récepteur transitoire (TRP), canaux sodiques de la membrane apicale des cellules épithéliales (eNaC)) localisés sur la membrane plasmique des CMLV détectent ces changements de tension.

En réponse à une élévation de la pression intraluminale, l'activation des canaux calciques non-sélectifs dépolarise les CMLV, ce qui active subséquemment l'ouverture des canaux calciques dépendants du voltage nécessaire à la contraction (Ledoux *et al.*, 2006; Hill *et al.*, 2009). L'augmentation de la concentration calcique dans le cytosol induit l'ouverture des récepteurs canaux à la ryanodine localisés à la membrane du réticulum sarcoplasmique (réserve de calcium intracellulaire) (Ledoux *et al.*, 2006). L'afflux massif de Ca^{2+} mobilisé vers l'espace intracellulaire génère des vagues calciques qui seraient aussi impliquées dans l'activation de l'appareil contractile (Ledoux *et al.*, 2006). Toutefois, il est important de préciser que les vagues calciques peuvent aussi activer les canaux potassiques dépendants du Ca^{2+} de grande conductance (BK_{Ca}), ce qui entraîne une hyperpolarisation membranaire s'opposant à l'augmentation du TM (Ledoux *et al.*, 2006). Brièvement, le Ca^{2+} intracellulaire se fixe sur la calmoduline (CaM) pour former le complexe activé Ca^{2+} -CaM. La liaison de ce complexe sur la *myosine light chain kinase* (MLCK) active la phosphorylation de la *myosin light chain* (MLC_{20}) sur la sérine 19. Cette étape déclenche l'activité myosine ATPase, ce qui permet le glissement des pontages formés entre les filaments d'actine et de myosine. Plus récemment, des données ont démontré la contribution des *myosin light chain phosphatase* (MLCP) dans la réponse myogénique (Cole & Welsh, 2011). À l'inverse des MLCK, les MLCP défavorisent la contraction en déphosphorylant les MLC_{20} . Des stimuli mécaniques seraient aussi en mesure d'activer une cascade dépendante des Rho-kinases menant à l'activation de CP1-17 (*PKC-mediated phosphatase inhibitor*) par la protéine kinase C (PCK) (Hill *et al.*, 2009). La CP1-17 augmente la sensibilité au Ca^{2+} de la réponse myogénique en inhibant les MLCP. Conséquemment, le ratio entre l'activité des MLCK et des MLCP serait un indicateur plus juste de la contraction myogénique que l'activité MLCK ou la concentration de Ca^{2+} intracellulaire, par exemple (Somlyo & Somlyo, 2003).

Cette capacité des artères cérébrales de résistance à se dilater ou à se contracter rapidement en réponse aux changements de pression est considérablement supérieure à celle observée dans tout autre lit vasculaire et est corrélée au rôle essentiel que les artères cérébrales jouent dans l'autorégulation du débit sanguin cérébral (DSC) (Faraci & Heistad, 1990).

1.1.4.2. Les dilatations induites par le débit

Depuis les années 70, le rôle prépondérant de l'endothélium vasculaire dans la fonction des CMLV est reconnu. Lee fut le premier à observer une relaxation endothélium-dépendante des artères cérébrales *in vitro* après stimulation des récepteurs muscariniques par l'acétylcholine (ACh) (Lee, 1980). Actuellement, une panoplie de stimuli plus ou moins physiologiques, tels que l'ACh, l'ADP, la sérotonine, la bradykinine, le carbachol et les contraintes de cisaillement, ont été identifiés comme capables de relaxer *ex vivo* les CMLV *via* l'endothélium. La dilatation induite par le débit (FMD ; *flow-mediated vasodilatation*) (Figure 3) a une importance fonctionnelle capitale sur la perfusion du cerveau.

Au niveau cérébral comme au niveau périphérique, les artères se dilatent *in vivo* en réponse à une élévation du débit sanguin ; cette réponse physiologique requiert l'intégrité de l'endothélium. En premier lieu, des structures sur la membrane des cellules endothéliales détectent les contraintes tangentielles de cisaillement ainsi que les déformations mécaniques du cytosquelette exercées par le sang qui circule et les traduisent en signal biochimique (Ando & Yamamoto, 2009). Les canaux ioniques, les récepteurs couplés aux protéines G, les récepteurs tyrosine kinase, les intégrines, les caveolae et le glycocalyx ont tous été identifiés comme étant importants dans la signalisation de la FMD (Ando & Yamamoto, 2009). Brièvement, les contraintes de cisaillement entraînent l'ouverture des canaux perméables au Ca^{2+} sur les cellules endothéliales, comme les récepteurs canaux purinergiques P2X et les TRP, ce qui élève la concentration intracellulaire du Ca^{2+} de manière dose-dépendante avec l'intensité du stimulus mécanique (Ando & Yamamoto, 2009). Les voies de signalisation dépendante du Ca^{2+} intracellulaire permettent d'activer des protéines kinases et des facteurs de transcription. Le complexe activé Ca^{2+} -CaM dissocie la monoxyde d'azote synthétase endothéliale (eNOS) séquestrée dans les caveolae en compétitionnant avec la cavéoline-1 (Ando & Yamamoto, 2009). L'activation de la eNOS libère un gaz vasodilatateur très puissant agissant sur les CMLV, le monoxyde d'azote (NO) (Ignarro *et al.*, 1987). Une voie de signalisation indépendante du Ca^{2+} est aussi responsable de la FMD. Elle requiert la phosphorylation de la eNOS par l'intermédiaire de la cascade

phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt (Jin *et al.*, 2005). Au niveau périphérique, le NO est sans l'ombre d'un doute le principal facteur vasodilatateur relâché suite à l'activation de la eNOS (Figure 3). Le NO diffuse jusqu'aux CMLV, où il se lie à la guanylate cyclase soluble (GCs), ce qui active la formation de la guanosine monophosphate cyclique (GMPc) à partir de la guanosine triphosphate (GTP) qui active à son tour la protéine kinase G (PKG). La PKG commande soit directement l'hyperpolarisation par l'ouverture des BK_{Ca}, soit indirectement en phosphorylant les récepteurs à la ryanodine, ce qui entraîne ensuite une sortie locale de Ca²⁺ du réticulum sarcoplasmique capable d'activer les BK_{Ca} (Lincoln *et al.*, 2001). L'élévation locale du Ca²⁺ n'empêche pas la chute de la concentration globale du Ca²⁺ intracellulaire causée par inactivation des canaux calciques de type L par la PKG (Lincoln *et al.*, 2001). De plus, la PKG contribue à réduire la sensibilité au Ca²⁺ de l'appareil contractile en activant la MLCP (Lincoln *et al.*, 2001). La PKG promeut la relaxation des CMLV (Vanhoutte, 2002) et conséquemment, le diamètre artérielle augmente jusqu'à la normalisation des contraintes de cisaillement.

Au niveau cérébral, le mécanisme est clairement plus complexe. Des études de notre laboratoire démontrent que chez la souris, le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) produit par la eNOS est essentiellement responsable de la FMD et qu'il partage la même voie de signalisation que le NO (Drouin & Thorin, 2009). Cette différence dans le médiateur (NO *versus* H₂O₂) pourrait s'expliquer conceptuellement par un découplage physiologique de la eNOS qui serait spécifique au domaine cérébrovasculaire (Drouin *et al.*, 2007). Une étude sur l'artère basilaire du rat suggère que les contraintes de cisaillement peuvent aussi activer la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase par l'intermédiaire de la PI3K et que l'anion superoxyde (O₂⁻) généré est ensuite converti en H₂O₂ vasodilatateur (Paravicini *et al.*, 2006). Cependant, dans le travail de Drouin *et al.* la FMD est indépendante de l'activité NADPH oxydase et partiellement abolie par le N^ω-nitro-L-arginine (L-NNA), un inhibiteur de la NOS, et par la catalase (dégrade le H₂O₂), ce qui suggère la participation d'autres facteurs relaxants dérivés de l'endothélium (EDRF) dans la FMD (Drouin & Thorin, 2009).

Classiquement, deux autres EDRF sont générés par l'endothélium en réponse aux contraintes de cisaillement : la prostacycline (PGI_2) et le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF) (Figure 3). La PGI_2 est un produit du métabolisme de l'acide arachidonique par la cyclo-oxygénase (COX). Par l'intermédiaire du récepteur des prostaglandines I₂ (IP) sur les CMLV, la PGI_2 active l'adénylate cyclase (AC) ce qui favorise la formation d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) à partir de l'adénosine triphosphate (ATP). L'AMPC agit comme second messenger puisqu'il active à son tour la protéine kinase A (PKA) qui réduit la sensibilité au Ca^{2+} de l'appareil contractile et active les canaux potassiques sensibles à l'adénosine triphosphate (K_{ATP}) (Yang *et al.*, 2008), dépendants du voltage (K_V) (Waldron & Cole, 1999) et BK_{Ca} (Schubert *et al.*, 1996)). L'EDHF englobe l'ensemble des médiateurs vasodilatateurs sécrétés par l'endothélium, hormis la PGI_2 et le NO (ou l' H_2O_2 dans le cerveau), capables d'hyperpolariser les CMLV. Au niveau cérébral, la FMD n'est pas bloquée par les inhibiteurs de COX ce qui confirme l'implication d'un EDHF (Gaw & Bevan, 1993; Drouin & Thorin, 2009) conjointement avec le H_2O_2 . Cependant, une ambiguïté existe autour de la réponse au débit des artères cérébrales ; une deuxième école de pensée préconise que les contraintes de cisaillement induisent une contraction (FMC) (Figure 4).

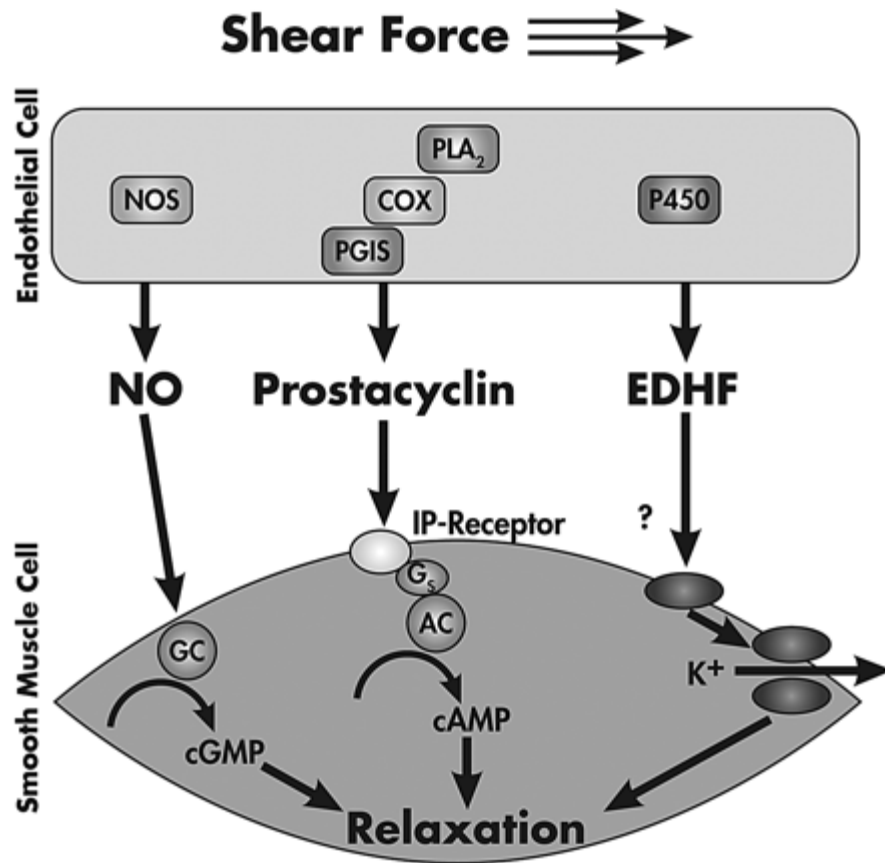


Figure 3 Schématisation des mécanismes généraux impliqués dans la FMD.

Les contraintes de cisaillement propulsées par le débit sanguin stimulent la relâche de NO, de prostacycline et d'EDHF par les cellules endothéliales. Les EDRF migrent jusqu'aux CMLV et induisent la relaxation.

NO : monoxyde d'azote, NOS : NO synthétase, PLA₂ : phospholipase A₂, COX : cyclo-oxygénase, PGIS, prostacycline synthétase, P450 : enzymes du cytochrome P450, EDHF : facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium, IP-Receptor : récepteur des prostaglandines I₂, GC : guanylate cyclase soluble, cGMP : guanosine monophosphate cyclique, G_s : protéine G stimulatrice, AC : adénylate cyclase, cAMP : adénosine monophosphate cyclique, K⁺ : ion potassique. Tirée de (Clifford, 2011). Permission non requise.

1.1.4.3. Les contractions induites par le débit

Ex-vivo, la MCA et les artérioles intracrâniennes du rat se contracteraient d'environ 5 à 15 % suite à une augmentation du débit de perfusion. Cette réponse est indépendante de la pression intraluminale et de l'endothélium et se manifeste sur une gamme de contraintes de cisaillement allant de 0 à 100 dynes/cm² par intervalles ≥ 10 dynes/cm² (Bryan *et al.*, 2001). Dans cette étude, la portée physiologique des contractions est discutable puisque les valeurs de contraintes de cisaillement semblent supraphysiologiques (valeurs approximative observées dans des artères de calibre similaire : entre 2 et 36 dynes/cm²) (Koller *et al.*, 1995; Kroll *et al.*, 1996; Muller *et al.*, 1996; Shojima *et al.*, 2004; Papaioannou *et al.*, 2006). Le groupe du Dr Bevan soulève que la pression intraluminale pourrait s'avérer un facteur déterminant dans la FMC : dans des artères cérébrales de lapin, un débit de 20 μ l/min induit une relaxation à pression intraluminale constante de 30 mm Hg, aucune réponse à 60 mm Hg et une contraction à 90 mm Hg (Garcia-Roldan & Bevan, 1990) (Figure 4 : effet de la composante PA sur la contraction des CMLV). Chez le rat, la relâche de substances oxygénées réactives (ROS) par les CMLV, causant une augmentation intracellulaire de Ca²⁺, serait à l'origine de la FMC (Bryan *et al.*, 2001) (Figure 4). Étonnamment, le même groupe valide le rôle atténuateur de l'endothélium sur la FMC mais infirme la participation du NO, de la PGI₂ ou de l'EDHF dans cette observation. L'existence d'un facteur endothélial inconnu ou la transmission indirecte des forces de l'endothélium vers les CMLV seraient les deux explications possibles (Bryan *et al.*, 2001) (Figure 4). Une étude réalisée parallèlement sur des artères intracérébrales humaines et la MCA du rat consolide l'implication des ROS et révèle la participation d'un facteur contracteur dérivé de l'endothélium (EDCF) (Figure 4). La formation de l'acide 20-hydroxyeicosatétraénoïque (20-HETE) *via* l'activation de COX a été proposée comme mécanisme sous-jacent à la FMC (Toth *et al.*, 2011) . En fait, le débit activerait le métabolisme de l'acide arachidonique par les enzymes du cytochrome P450 (CYP450) 4A. En plus de former le 20-HETE, cette réaction dégagerait une quantité importante de ROS pouvant participer à la contraction. Les produits du métabolisme du 20-HETE par les COX, les 20-endoperoxydes, engendreraient la contraction *via* le récepteur thromboxane-prostanoïde (TP) sur les CMLV.

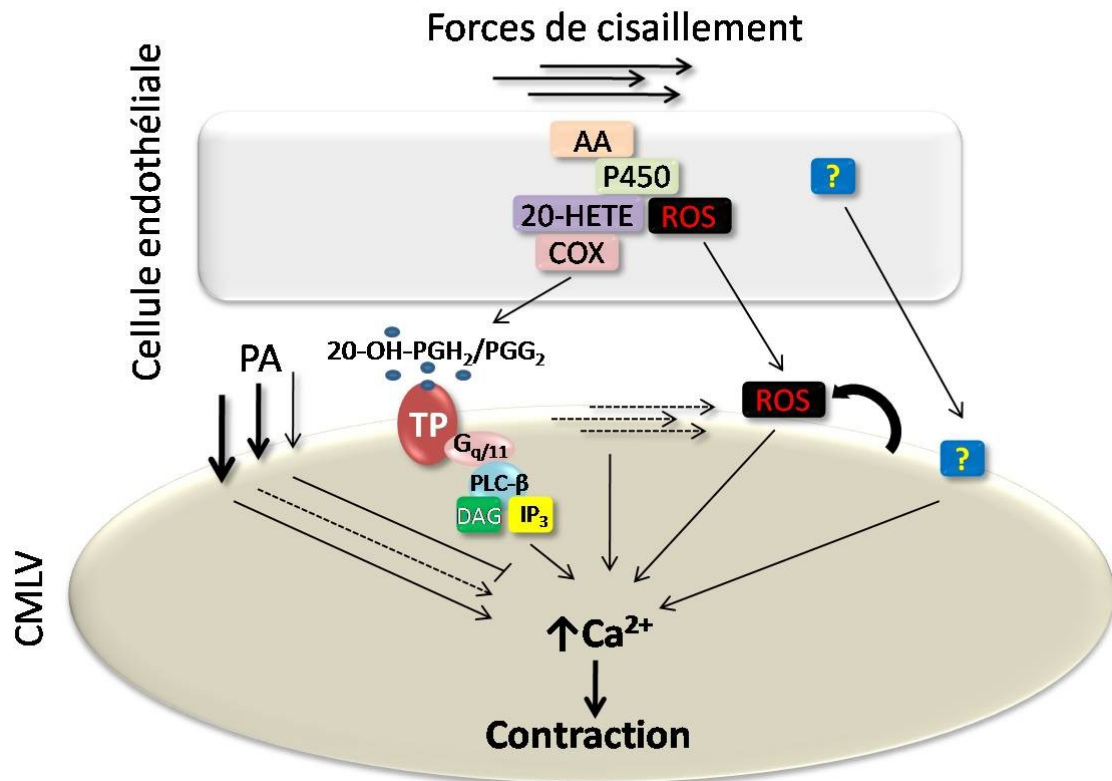


Figure 4 Schématisation des mécanismes potentiellement impliqués dans la FMC cérébrovasculaire.

AA : acide arachidonique, P450 : enzymes du cytochrome P450, 20-HETE : acide 20-hydroxyeicosatétraénoïque, COX : cyclo-oxygénase, ROS : substances oxygénées réactives, TP : récepteur au thromboxane–prostanoïde, $G_{q/11}$: protéine G qui stimule la phospholipase C, PLC- β : phospholipase C- β , IP₃ : inositol triphosphate, DAG : diacylglycérol, CMLV : cellule musculaire lisse vasculaire, 20-OH-PGH₂/PGG₂ : 20-endoperoxides, PA : pression artérielle intraluminale, ? : facteur constricteur inconnu dérivé de l'endothélium, $\uparrow Ca^{2+}$: augmentation du calcium intracellulaire. D'après les hypothèses suggérées dans (Garcia-Roldan & Bevan, 1990; Bryan *et al.*, 2001; Toth *et al.*, 2011).

Malgré cette grande confusion quant à la réponse induite par les contraintes de cisaillement, il ne faut pas oublier que ces réponses sont souvent bien spécifiques à l'espèce, au segment choisi (artère, artériole) et aux paramètres expérimentaux

(vaisseaux pré-contractionné ou non, valeur des contraintes de cisaillement, valeur de la pression intraluminale). Habituellement, les FMD s'observent à une pression physiologique sur une pré-contraction induite (tonus de 35-55 %) tandis que les FMC s'observent habituellement sur le tonus basal ($\approx 10\%$ chez la souris et $\approx 35\%$ chez le rat). En résumé, les FMD et les FMC sont deux réponses physiologiques, permettant à l'artère d'ajuster son diamètre pour maintenir un débit optimal. Il est probable que la réponse au débit soit en fait la résultante d'une dilatation et d'une contraction. Si pour une même valeur de contrainte de cisaillement sur la paroi deux réponses distinctes sont possibles *in vitro*, il est fort probable que d'autres facteurs intrinsèques interviennent dans la réponse au débit. On pourrait penser que la résistance de l'artère affecte l'arrangement physique des senseurs des contraintes de cisaillement ce qui favoriserait ou préviendrait l'activation des voies de signalisation impliquées dans la FMD ou dans la FMC.

1.1.5. La régulation du débit sanguin cérébral

Le cerveau est l'organe le plus à la merci des fluctuations de son débit de perfusion (Iadecola, 2004). C'est pourquoi il est doté d'une propriété unique d'autorégulation qui protège son intégrité fonctionnelle. L'intolérance du cerveau à l'ischémie s'explique par l'incapacité des neurones à emmagasiner le glucose sous forme de réserve (glycogène) et sa capacité anaérobique limitée (Hall, 2006). Le métabolisme du cerveau est extrêmement actif, soit 7.5 fois plus rapide que celui des autres organes qui peuvent survivre quelques minutes sans oxygène (O_2), grâce à la glycolyse anaérobique (Hall, 2006). Dans le cerveau, le glucose traverse directement et indépendamment de l'insuline (Hall 2006), les membranes neuronales par le transporteur GLUT3 (Fung *et al.*, 2010). La synthèse efficace d'ATP à partir du glucose (glycolyse, cycle de Krebs et phosphorylation oxydative) requiert de l' O_2 . Six minutes sans O_2 suffisent pour entraîner des dégâts neuronaux irréversibles (Richmond, 1997). À l'opposé, une perfusion surabondante élève la pression intracrâniale et microvasculaire, ce qui endommage les tissus et provoque l'éclatement des petits capillaires (Hall, 2006). Des stimuli physiologiques bien caractérisés déclenchent les mécanismes de régulation du DSC.

Premièrement, le cerveau exerce un contrôle neuronal et humoral sur la circulation systémique qui lui permet de détourner le flux sanguin acheminé aux autres organes pour prioriser l'irrigation cérébrale en cas de baisse brutale du débit cardiaque ou de la pression artérielle (PA) (Iadecola, 2004).

Deuxièmement, le diamètre des artères cérébrales s'ajuste conformément aux fluctuations de la pression artérielle systémique afin de maintenir la stabilité du DSC au cours des activités quotidiennes (McHedlishvili, 1980). Le TM est le mécanisme par lequel les artères se contractent en réponse à l'augmentation de la pression intravasculaire afin de rétablir le débit de base (Bayliss, 1902; Hill *et al.*, 2009). Quant à elle, l'autorégulation maintient constant le DSC malgré les perturbations de la PA sur un intervalle de 60 à 150 mm Hg (Figure 5) (Iadecola & Davisson, 2008).

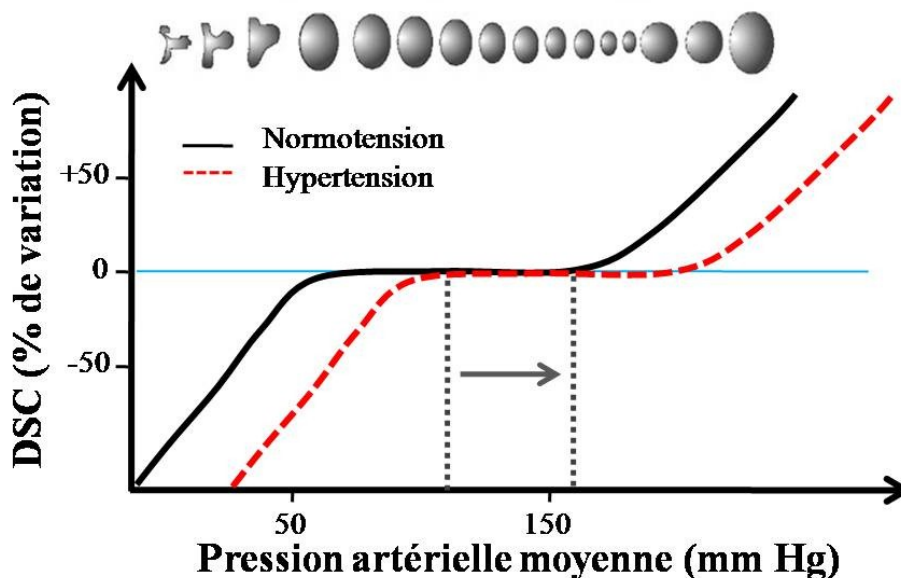


Figure 5 Schématisation de l'autorégulation du DSC en absence et présence d'hypertension.

L'autorégulation du calibre artériel assure la stabilité du DSC sur un intervalle de pression allant de 60 à 150 mm Hg. En présence d'hypertension, cet intervalle est déplacé vers de plus hautes valeurs de pression allant de 110-120 à ≈ 230 mm Hg. Inspirée de (Iadecola & Davisson, 2008).

Troisièmement, la demande métabolique associée à l'activité neuronale varie selon la zone du cerveau sollicitée. Le mécanisme complexe par lequel le DSC s'ajuste localement à l'activité neuronale se nomme l'hyperémie fonctionnelle (Iadecola, 2004). L'ensemble des structures impliquées dans le couplage entre la demande métabolique et le DSC se nomme unité neurovasculaire. Cette dernière regroupe les neurones, les myocytes, les péricytes, la glie, les astrocytes et les cellules endothéliales (Iadecola, 2010). Même si l'hypoxie et l'hypoglycémie sont les stimuli directement associés à l'augmentation de la demande métabolique, ils sont loin d'être suffisants pour initier une augmentation du DSC (Iadecola, 2004). Des facteurs qui relaxent les CMLV doivent être relâchés pour qu'une vasodilatation, quoique très modeste, se manifeste : les astrocytes, grâce à leur localisation à l'interface des neurones et des artérioles/capillaires, seraient centraux dans ce mécanisme de vasodilatation locale. En effet, le glutamate relâché par les terminaisons axonales lors d'une élévation de l'activité synaptique migrerait jusqu'aux récepteurs glutaminergiques astrocytaires. L'activation de ces récepteurs produit des oscillations calciques s'étendant jusqu'aux pieds astrocytaires qui recouvrent directement les capillaires et les artérioles intracérébraux (Zonta *et al.*, 2003). De là, l'augmentation du Ca^{2+} stimule la libération de prostaglandine E2. D'autres médiateurs vasodilatateurs (potassium (K^+), adénosine, hydrogène (H^+), acide époxyéicosatriénoïque (EET)) seraient aussi libérés par les astrocytes ou directement par les terminaisons synaptiques dans l'espace extracellulaire (Gillian Pocock, 2004; Iadecola, 2004; Blanco *et al.*, 2008). Les interneurones localisés périvasculairement pourraient aussi participer à la réponse vasodilatatrice rapide en relâchant du NO synthétisé par la monoxyde d'azote synthétase neuronale (nNOS), le polypeptide vasoactif intestinal (VIP) et la sérotonine (5HT) (Cholet *et al.*, 1997; Iadecola, 2004).

Ce sont les artères de résistance cérébrales situées à la surface du cerveau qui contrôlent la résistance vasculaire cérébrale ainsi, elles doivent se dilater pour adapter le DSC à la demande métabolique (Iadecola, 2004). Toutefois, ces artères ne sont pas directement sous contrôle métabolique. En effet, selon la loi de Poiseuille, le débit sanguin (Q) varie en fonction du changement de la pression (ΔP) entre deux points (L), de la viscosité (η) et du rayon (r) du vaisseau élevé à la quatrième puissance selon $Q = \Delta P \pi r^4 / 8 \eta L$. Or,

l'augmentation du diamètre artériolaire crée automatiquement une chute de la pression locale et donc une augmentation du débit vers la plus faible pression. C'est à cette étape que les cellules endothéliales entrent en jeu. L'augmentation du débit se propage rapidement en amont jusqu'aux artères piales en faisant intervenir un mécanisme dépendant de l'endothélium : la FMD (Figure 3) (Iadecola, 2004). La FMD implique la libération d'un médiateur vasodilatateur très puissant produit par la eNOS, le NO et/ou le H_2O_2 selon les modèles. L'infusion intra-carotidienne de L-nitro-arginine méthyl ester (L-NAME : un inhibiteur de eNOS) chez le rat provoque une baisse de 75 % du DSC par rapport au niveau de base (Prado *et al.*, 1992), illustrant le rôle prépondérant de la fonction endothéliale dans la régulation de la perfusion cérébrale. Une fonction endothéliale normale garantit l'adaptation du diamètre vasculaire imposée par les contraintes de cisaillement. Ainsi, le signal conduisant à une vasodilatation est la propagation rétrograde de la vasodilatation locale vers les artères en amont (Figure 6).

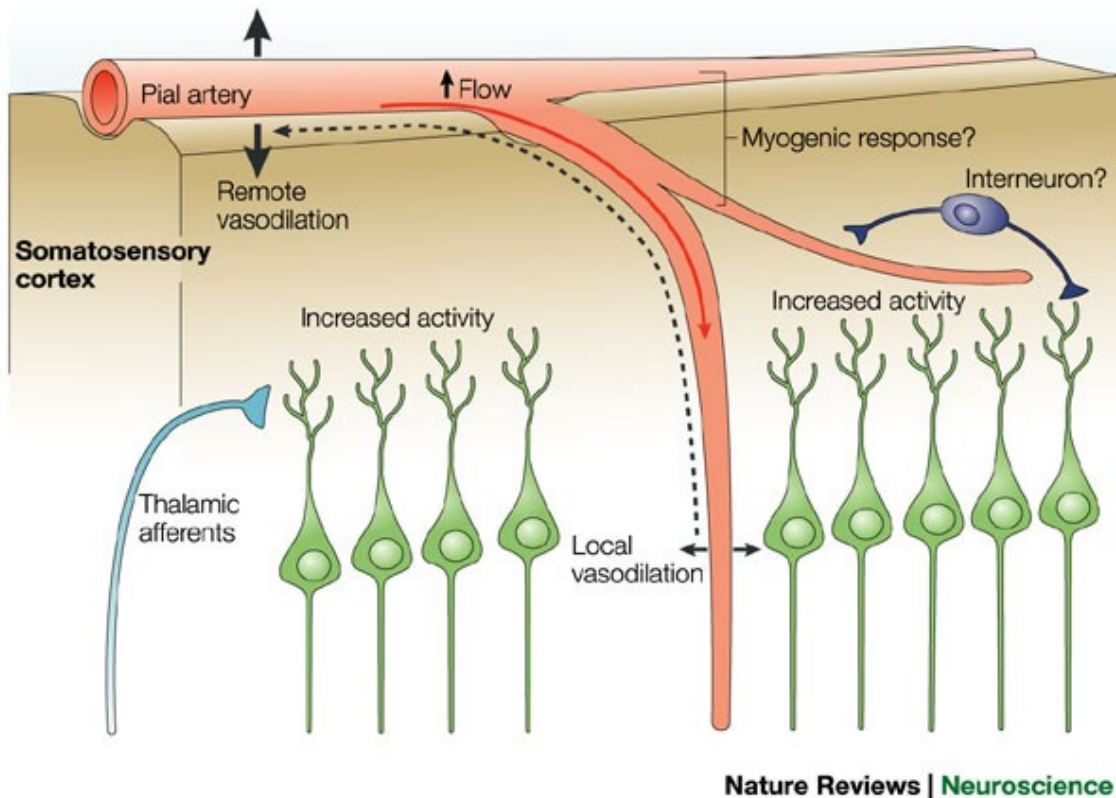


Figure 6 Schématisation de la réponse vasodilatatrice locale et de sa propagation rétrograde vers les artères piales, en réponse à l'activation neuronale du cortex somatosensoriel.

L'activité neuronale induit une vasodilatation locale qui se propage vers les artères piales en amont. La vasodilatation des artères piales permet d'augmenter substantiellement le débit en aval vers le territoire activé. Le TM des artères piales pourrait aussi participer à la régulation du DSC. *Remote vasodilatation* : vasodilatation rétrograde, *flow* : débit.

Réimprimé avec la permission de Macmillan Publishers Ltd : [Nature Reviews Neuroscience](#), Costantino Iadecola., Neurovascular regulation in the normal brain in Alzheimer's disease, 5, 347-360, Copyright (2004).

Ces mécanismes régulateurs protègent le cerveau en régulant rigoureusement le DSC lorsque nos activités quotidiennes font varier les paramètres hémodynamiques et l'activité neuronale. Cependant, qu'en est-il lors des variations brutales au niveau de l'activité sympathique, de la pression sanguine, de la fréquence cardiaque (FC) et de la pression partielle en CO_2 (PaCO_2) qui accompagnent une séance d'exercice physique ?

1.1.5.1. Adaptation du DSC pendant l'exercice physique

Parmi la variété d'études réalisées sur le sujet, on retrouve à la fois des résultats en faveur d'une diminution, d'une augmentation ou d'une absence de changement du DSC associée à l'exercice physique (Querido & Sheel, 2007). Malgré ces discordances, une nette prédominance des travaux est en faveur d'une augmentation du DSC pendant l'exercice (Querido & Sheel, 2007; Ogoh & Ainslie, 2009a). L'élévation du DSC associée à une augmentation de la consommation maximale d'O₂ (VO₂ max) (jusqu'à 60 %) est fort complexe et implique collectivement plusieurs paramètres physiologiques de nature chimique, hémodynamique, métabolique et neuronale.

L'augmentation de la PaCO₂ (l'hypercapnie) pourrait jouer un rôle central dans l'augmentation du DSC. La BBB est en effet perméable au CO₂, qui se dissocie en H⁺ et en HCO₃⁻ lorsqu'il réagit avec l'H₂O lors de son passage (Querido & Sheel, 2007). L'acidose induite a un effet relaxant rapide sur les CMLV. La PaO₂ aurait, quant à elle, peu d'impact sur le DSC puisqu'elle reste stable pendant l'exercice chez la majorité des personnes (Querido & Sheel, 2007).

Afin d'assurer l'approvisionnement sanguin vers les muscles sollicités lors de l'exercice, la PA s'élève. Toutefois, le DSC est indépendant de la PA sur un intervalle allant de 60 à 150 mm Hg (Figure 5) (Iadecola & Davisson, 2008). Dans cette zone d'autorégulation les artères de résistance protègent le cerveau des dommages associés à 1) une hyperperfusion en se contractant ou 2) à l'hypoperfusion en se relaxant. Cependant, la PA prend une certaine importance lorsqu'on isole les activités physiques rythmiques des activités physiques soutenues. En effet, Pott *et al.*, ont évalué la PA et la vitesse sanguine dans la MCA (un indice du DSC de la région antérieure) chez un groupe de rameurs (aviron) où chaque coup de rame (propulsion) cause une fluctuation de la PA moyenne. Cette fluctuation, trop rapide pour être contrecarrée par l'autorégulation, induit une élévation cyclique de la perfusion cérébrale (Pott *et al.*, 1997).

Pendant l'exercice physique, le débit cardiaque (volume d'éjection x FC) peut augmenter jusqu'à ≈3.8 fois (Hall, 2006) donc, vraisemblablement, il pourrait

influencer directement le DSC. En effet, chez un groupe de volontaires sains, la prise d'un antagoniste β_1 -adrénergique atténue la vélocité sanguine dans la MCA durant une séance de vélo (Ide *et al.*, 1998).

Les mouvements effectués lors de l'exercice physique sollicitent les aires motrices et sensorimotrices du cerveau, ce qui augmente le métabolisme cérébral local et réclame l'élévation concomitante de l'apport en O_2 et en glucose, sans toutefois élever le DSC global (Ogoh & Ainslie, 2009a). De ce fait, les concentrations plasmatiques en glucose ou en lactate (produit final de la glycolyse anaérobique) ne seraient pas de bons outils pour comprendre comment l'exercice augmente le DSC (Querido & Sheel, 2007).

Les catécholamines circulantes ne s'élèvent pas suffisamment lors des entraînements d'intensité modérée pour traverser la BBB et induire une action vasoactive sur les artères cérébrales (Pott *et al.*, 1996). Cependant, à haute intensité ($> 80\%$ VO_2 max), Pott *et al.* ont rapporté une élévation de 50 % de la vélocité du sang dans la MCA qui pourrait être corrélée avec une élévation de 1400 % des catécholamines circulantes (Pott *et al.*, 1996). Bien que le lit vasculaire cérébral soit doté d'une innervation sympathique vasoconstrictive bien développée, l'activité sympathique au repos n'a qu'une modeste influence sur la résistance (6 % de réduction du diamètre des artères piales), et quasiment pas sur le DSC (Busija *et al.*, 1982). Ainsi, il n'est pas tout à fait clair si l'augmentation de l'activité sympathique lors de l'exercice peut être associée à une variation nette du DSC (Ogoh & Ainslie, 2009a). L'innervation sympathique neuronale permettrait d'élever la résistance vasculaire (vasoconstriction) tout en réduisant la pression microvasculaire (Faraci & Heistad, 1990) ce qui protégerait les petits vaisseaux d'une dilatation forcée pouvant causer la détérioration de la BBB (Ogoh & Ainslie, 2009b).

Si on récapitule, l'hypercapnie et les changements cardiovasculaires associés à l'exercice physique seraient les principaux déterminants dans les variations que peut connaître le DSC. Lors des activités isométriques ou dynamiques l'augmentation de la FC et du débit cardiaque se répercute sur le DSC. La PA, quant à elle, n'aurait une importance que dans le cas d'activités physiques rythmées.

1.2. Impact des facteurs de risque cardiovasculaire sur la circulation cérébrale

1.2.1. Remodelage des artères cérébrales

La paroi artérielle n'est pas une structure statique mais plutôt remarquablement plastique (Martinez-Lemus *et al.*, 2009). Sa plasticité lui permet de se modifier rapidement afin de s'adapter continuellement à des changements hémodynamiques, mécaniques, neurohumoraux et métaboliques (Martinez-Lemus *et al.*, 2009) associés aux facteurs de risque cardiovasculaire (CV) tels le vieillissement, l'hypertension, l'athérosclérose, le diabète, l'hyperhomocystéinémie et une FC au repos supérieure à 70 bpm. Même si un changement dans la structure d'un vaisseau est inhérent à un procédé pathologique, c'est avant tout une réponse de nature compensatoire : la structure s'altère dynamiquement pour corriger un débit sanguin instable ou un changement dans les contraintes tangentielles ou circonférentielles exercées par le sang sur la paroi (Humphrey, 2008; van den Akker *et al.*, 2010). Le remodelage vasculaire est le fruit de l'activation de plusieurs voies de signalisation contrôlant la migration cellulaire, la prolifération cellulaire, l'apoptose et la réorganisation de la MEC (Intengan & Schiffrin, 2001). Le remodelage cérébrovasculaire demeure encore énigmatique ; chez l'humain c'est la difficulté d'accès aux tissus qui limite les recherches, et chez l'animal, le petit calibre des artères limite notre habilité à en étudier la structure. C'est l'ensemble des travaux réalisés par Baumbach, Heistad et Faraci dans le cadre de l'hypertension qui a le plus contribué à l'avancement des connaissances sur le remodelage cérébrovasculaire. Le remodelage associé à l'athérosclérose est bien décrit au niveau périphérique, surtout depuis 1987 grâce à l'introduction du phénomène de Glagov (remodelage compensatoire vers l'extérieur de l'artère décrit plus loin) (Glagov *et al.*, 1987), mais on en connaît peu sur l'évolution de la structure des artères cérébrales dans ce contexte pathologique en particulier. Les notions portant sur le remodelage cérébrovasculaire seront majoritairement décrites dans le contexte de l'hypertension puisque c'est l'exemple le mieux documenté.

1.2.1.1. Changement dans la structure de la paroi

Le remodelage vasculaire induit par l'hypertension englobe les changements survenant au niveau du cytosquelette, de la MEC, des connections intercellulaires et de la morphométrie et quantité des CMLV. Étant donné la difficulté à définir la nature du remodelage au niveau cellulaire et moléculaire, Mulvany *et al.* ont proposé un système de classification basé sur des macroparamètres et qui permet de distinguer les différents types de remodelage (Mulvany *et al.*, 1996). Le diamètre de la lumière, l'épaisseur de la paroi et le ratio entre l'épaisseur de la paroi et le diamètre en condition passive sont couramment utilisés afin de définir la nature du remodelage : le remodelage est soit hypertrophique, eutrophique ou hypotrophique selon que l'épaisseur de la paroi augmente, reste stable ou diminue (Martinez-Lemus *et al.*, 2009). Le qualificatif interne ou externe est ajouté au type de remodelage selon si le diamètre diminue ou augmente. Les artères et artéριοles cérébrales subissent généralement un remodelage hypertrophique interne : la paroi s'épaissit en empiétant dans la lumière vasculaire (Iadecola & Davisson, 2008). L'hypertrophie et l'hyperplasie des CMLV seraient à l'origine de l'augmentation du matériel au sein de la paroi (Iadecola & Davisson, 2008). L'hypertrophie permet d'atténuer le stress sur la paroi et d'autoréguler le DSC dans un intervalle de PA plus élevées (110-120 à \approx 230 mm Hg) (Strandgaard *et al.*, 1973) (Figure 5) (Baumbach & Heistad, 1988). Cependant, la réduction de la lumière limite la capacité des artères à répondre aux stimuli vasodilatateurs.

Un des concepts les plus importants en remodelage est le phénomène de Glagov associé à l'athérosclérose. À l'époque, il était convenu que les lésions athérosclérotiques empiétaient dans la lumière de l'artère. En 1987, Glagov rectifie cette théorie en démontrant que la lumière des artères coronaires reste constante tandis que leur diamètre externe s'agrandit pour déplacer la plaque en périphérie du vaisseau (Glagov *et al.*, 1987). Chez des singes soumis à diète pro-athérogénique, la lumière des artères carotides commune et interne varie peu malgré une augmentation substantielle de l'aire de l'intima en raison de la plaque (Tamaki *et al.*, 1986). En d'autres termes, l'artère ajuste sa lumière dans l'objectif de maintenir un débit sanguin physiologique. Cependant, si la sténose excède 40 %, la paroi perd sa capacité de remodelage et la

plaque progresse vers la lumière (Korshunov *et al.*, 2007). On ne sait pas si le phénomène de Glagov s'applique aussi aux artères cérébrales.

1.2.1.2. Changement dans la mécanique de la paroi

L'hypertension chronique influence non seulement la structure de la paroi mais aussi la distensibilité ou la compliance cérébrovasculaire. Au début des années 80, les travaux de Brayden (Brayden *et al.*, 1983) et de Toda (Toda *et al.*, 1982) chez le rat spontanément hypertendu (SHR) ont démontré une augmentation de la rigidité des artères cérébrales basilaire et postérieure ($\geq 200 \mu\text{m}$) (Tableau I). Quelques années plus tard, l'étude des artères cérébrales de plus petit calibre ($< 200 \mu\text{m}$: artérioles chez le rat) par Baumbach et son équipe révèle au contraire une augmentation paradoxale de la compliance associée à l'hypertension (Tableau I) (Baumbach *et al.*, 1988a). Cette opposition quant à la réponse observée dans les artères de gros (artères de résistance chez le rat) et de petit calibre (artères de résistance chez la souris et artérioles chez le rat) face à l'hypertension a été confirmée dans d'autres modèles de la pathologie, tels que la souris hypertendue indépendamment de la rénine (souris BPH-2), la souris surexprimant la rénine et l'angiotensinogène humains (souris hR^+/hA^+) (Baumbach *et al.*, 2003) et le rat traités à l'acétate de deoxycorticostérone (rat DOCA) (Dorrance *et al.*, 2006) (Tableau I).

Ces résultats ne sont pas contradictoires, ils reconnaissent plutôt que de la composition et le calibre de la paroi dictent dans quelle mesure le remodelage affectera la mécanique. La mécanique de l'artère dépend, entre autre, de la proportion des composantes rigides (collagène, membrane basale) *versus* élastiques (élastine, CMVL, endothélium) (Baumbach *et al.*, 1988b). Le collagène et l'élastine, qui sont les principaux constituants de la MEC, sont de loin les composantes les plus étudiées. Le collagène est la protéine qui confère aux tissus leur résistance mécanique face à la distension (van den Akker *et al.*, 2010). L'élastine, en revanche, donne de la souplesse et de l'élasticité aux vaisseaux (van den Akker *et al.*, 2010). C'est une fibre extrêmement résiliente, sa demi-vie est de 40 ans (Briones *et al.*, 2010). Toutefois, sa synthèse s'arrête après la puberté, après quoi elle s'use et le collagène prend progressivement le dessus. La membrane basale est considérée comme une composante

rigide puisqu'elle est riche en collagène de type IV (Baumbach *et al.*, 1988b). Les CMLV, quant à elles, auraient un module élastique de Young (coefficient de rigidité) semblable à celui de l'élastine (Baumbach *et al.*, 1988b) et participent donc à la composante élastique.

Chez le rat, la proportion en collagène est quatre fois plus importante dans les grosses artères cérébrales que dans les artérioles (Baumbach & Heistad, 1988). Ainsi, on peut imaginer qu'une altération dans la composition en collagène aura plus d'impact sur les propriétés mécaniques de la paroi des grosses artères que sur les propriétés mécaniques de la paroi des artérioles. En effet, la quantité de collagène est 30 % plus élevée dans les artères de résistance (diamètre interne : $\approx 167\mu\text{m}$, épaisseur de la paroi : $\approx 17\mu\text{m}$) des rats SHR en comparaison aux rats contrôles normotendus de type Wistar-Kyoto (WKY) (Brayden *et al.*, 1983), mais identique au niveau des artérioles (diamètre interne : $\approx 96\mu\text{m}$, épaisseur de la paroi : $\approx 5\mu\text{m}$) (Baumbach *et al.*, 1988b). Ces résultats suggèrent que dans les vaisseaux cérébraux de gros calibre où la composition en collagène contribue significativement dans l'amalgame des composantes de la paroi, l'hypertension induit une augmentation du collagène qui se traduit par une diminution de la compliance. À l'inverse, dans les petits vaisseaux cérébraux, l'hypertension n'affecte pas le collagène puisqu'il est presque inexistant. Mais alors comment expliquer l'augmentation de compliance dans ces petits vaisseaux cérébraux ?

La faible proportion de fibres élastiques par rapport aux CMLV dans les petits vaisseaux cérébraux (les artérioles d'un rat WKY sont composées de 6 % d'élastine, <1 % de collagène, 11 % de membrane basale, 12 % d'endothélium et 69 % de CMLV) (Baumbach *et al.*, 1988b) suggère que l'hypertrophie de la paroi, c'est-à-dire l'hypertrophie et l'hyperplasie des CMLV (Iadecola & Davisson, 2008), pourrait jouer un rôle majeur dans les changements de compliance. La proportion des CMLV grimpe à 75 % chez les rats spontanément hypertendus prédisposés aux accidents vasculaires cérébraux (SHRSP) sans changement dans la composition en collagène et en élastine (Baumbach *et al.*, 1988b). Cette augmentation des CMLV fait pencher l'équilibre mécanique en faveur des propriétés élastiques et se traduit par une compliance cérébrovasculaire accrue. Ainsi, le ratio composantes rigides (collagène+membrane

basale) sur composantes élastiques (CMLV+élastine) diminue dans la paroi des artérioles cérébrales chez les rats hypertendus en comparaison aux rats normotendus (Baumbach *et al.*, 1988b), ce qui explique l'augmentation de la compliance. Baumbach spécule que l'augmentation de la compliance cérébrale permettrait, lors d'une vasodilatation maximale, de contrecarrer la réduction de la lumière causée par l'hypertrophie interne (Baumbach & Heistad, 1988) (Figure 7). D'un autre côté, une augmentation de la compliance pourrait aussi se traduire par une fragilisation de la paroi. Celle-ci deviendrait plus vulnérable face aux augmentations de la pression intraluminaire, ce qui pourrait occasionner des microruptures dans la paroi (Baumbach & Heistad, 1988) (Figure 7).

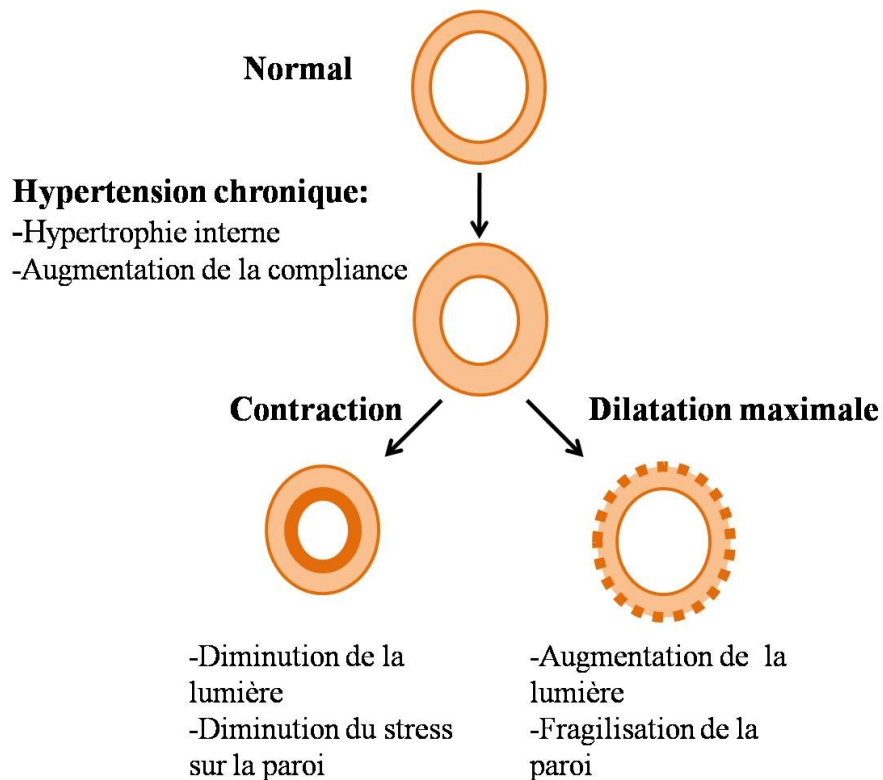


Figure 7 Schématisation de l'impact de l'hypertrophie interne et de l'augmentation de la compliance associées à l'hypertension chronique sur les artérioles cérébrales de rat lors d'une contraction ou d'une dilatation maximale.

Inspirée de (Baumbach & Heistad, 1988).

Avant les travaux de Baumbach *et al.*, une étude réalisée en 1981 *in vitro* chez l'humain, où les propriétés mécaniques de l'ACA et de la carotide interne ont été étudiées en parallèle, me paraît particulièrement avant-gardiste (Hudetz *et al.*, 1981). Les artères ont été classées en deux groupes, fibrotiques ou normales, selon que le collagène de la media avait augmenté de plus ou moins 15 %. Cette étude révèle deux aspects importants : premièrement, les carotides et les artères cérébrales se remodelent de façon opposée ; les carotides fibrotiques sont plus rigides tandis que les artères cérébrales fibrotiques sont plus compliantes par rapport à leurs contrôles respectifs. Deuxièmement, la proportion en collagène n'est pas déterminante sur le module élastique de l'artère (Hudetz *et al.*, 1981). Cette étude propose que l'impact d'une pathologie sur la paroi artérielle est dicté par la composition de la paroi et le rôle physiologique qu'occupe l'artère en question. Baumbach utilise cette théorie afin d'expliquer les différences entre le remodelage des artères et des artérioles du rat hypertendu : la paroi des artères contient plus de collagène et est exposée à de plus fortes pressions que les artérioles (Baumbach & Heistad, 1988). À l'inverse de l'étude de Hudetz *et al.*, les travaux de Baumbach, Brayden et Toda soutiennent que les changements en collagène, dont l'abondance est d'autant plus importante que l'artère est grosse, influenceront la biomécanique des grosses artères cérébrales (Baumbach & Heistad, 1988).

Une augmentation paradoxale de la compliance cérébrale accompagnée d'une hypertrophie de la paroi a aussi été observée *in vitro* chez les rats contrôles (WKY) suite à une ischémie/reperfusion de l'artère cérébrale moyenne (Jimenez-Altayo *et al.*, 2007), chez les rats WKY (Chillon & Baumbach, 2004), mais pas les souris traités au L-NAME (Baumbach *et al.*, 2004), chez des souris exprimant un dominant négatif pour le récepteur γ du facteur activé de prolifération des peroxyosomes (PPAR γ) (Halabi *et al.*, 2008), chez des souris déficientes en cystathionine β -synthase soumises à une diète riche en méthionine (modèle d'hyperhomocystéinémie) (Baumbach *et al.*, 2002) et chez des souris déficientes en superoxyde dismutase (Baumbach *et al.*, 2006) (Tableau I). À l'inverse, les artérioles des rats âgés deviennent plus rigides (Tableau I) (Hajdu *et al.*, 1990). Normalement, les modèles pathologiques énumérés ci-haut précipitent les effets du vieillissement, c'est pourquoi cette étude est en désaccord avec les autres. Dans la

limite de mes connaissances, la littérature portant sur les changements biomécaniques cérébrovasculaires associés à l'athérosclérose ou aux dyslipidémies est inexistante.

Tableau I Modèles expérimentaux, chez le rat ou la souris, caractérisés par un remodelage cérébrovasculaire ; facteurs pouvant potentiellement induire ce remodelage.

Modèle animal mâle	Symptômes/Phénotype	Artères à l'étude	Structure	Biomécanique	Références
Rat SHR et SHRSP	↑PAM ↓ contractilité intrinsèque	PCA	Hypertrophie interne	↓ compliance	(Toda <i>et al.</i> , 1982; Brayden <i>et al.</i> , 1983)
Rat SHR	↑PAM	basilaire	Hypertrophie externe	↓ compliance	(Toda <i>et al.</i> , 1982)
Traitement au DOCA chez rat Wistar	↑Psys systémique	MCA	Hypertrophie interne	↓ compliance	(Dorrance <i>et al.</i> , 2006)
Rat SHR et SHRSP	↑PAM ↑Psys artériolaire ↑PP artériolaire	artérioles	Hypertrophie interne	↑ compliance	(Baumbach & Heistad, 1989; Chillon & Baumbach, 2004; Dupuis <i>et al.</i> , 2005)
Souris BPH-2	↑PAM ↑Psys artériolaire ↑PP artériolaire	artérioles	Hypertrophie externe	↑ compliance	(Baumbach <i>et al.</i> , 2003)

Souris hR+/hA+	↑PAM ↑Psys artériolaire ↑PP artériolaire ↑AngII	artérioles	Hypertrophie interne	↑ compliance	(Baumbach <i>et al.</i> , 2003)
Occlusion de la MCA chez rat WKY	I/R	MCA	Hypertrophie interne	↑ compliance	(Jimenez-Altayo <i>et al.</i> , 2007)
Occlusion de la MCA chez rat Sprague-Dawley	I/R ↓TM ↑ROS	MCA	pas de changement	= compliance ↓ wall stress	(Jimenez-Altayo <i>et al.</i> , 2009)
Traitement au L-NAME chez rat WKY	↑PAM ↑Psys artériolaire ↑PP artériolaire	artérioles	Hypertrophie interne	↑ compliance	(Chillon & Baumbach, 2004)
Traitement au L-NAME chez souris C57BL/6J et souris eNOS^{-/-}	↑PAM ↑Psys artériolaire ↑PP artériolaire	artérioles	Hypertrophie externe	= compliance	(Baumbach <i>et al.</i> , 2004)

Inhibition du PPARγ chez rat et souris	<p>↑PAM</p> <p>↑TM cérébral</p> <p>DE aortique</p> <p>DE cérébrale</p> <p>↑ROS</p>	<p>PCA</p> <p>artérioles</p> <p>basilaire</p>	<p>Hypertrophie interne</p>	<p>↑ compliance</p>	<p>(Beyer <i>et al.</i>, 2008; Halabi <i>et al.</i>, 2008; Chan <i>et al.</i>, 2010)</p>
Souris CBS+/- avec ou sans diète riche en méthionine	<p>↑ homocystéine plasmatique</p>	<p>artérioles</p>	<p>Hypertrophie interne</p>	<p>↑ compliance</p>	<p>(Baumbach <i>et al.</i>, 2002)</p>
Souris CuZnSOD+/-	<p>↑ROS</p>	<p>artérioles</p>	<p>Hypertrophie interne</p>	<p>=compliance</p>	<p>(Baumbach <i>et al.</i>, 2006)</p>
Souris CuZnSOD-/-	<p>↓PAM</p> <p>↑ROS</p> <p>DE cérébrale</p>	<p>artérioles</p>	<p>Hypertrophie interne</p>	<p>↑ compliance</p>	<p>(Baumbach <i>et al.</i>, 2006)</p>
Rat Fisher âgé (24-27 mois)	<p>↓PAM</p>	<p>artérioles</p>	<p>Hypotrophie interne</p>	<p>↓ compliance</p>	<p>(Hajdu <i>et al.</i>, 1990)</p>

SHR : rats spontanément hypertendus, SHRSP : rats spontanément hypertendus prédisposés aux accidents vasculaires cérébraux, PAM : pression artérielle moyenne, Psys : pression systolique, PP : pression pulsée, PCA : artère cérébrale postérieure, DOCA : acétate de deoxycorticostérone, MCA : artère cérébrale moyenne, BPH-2 : modèle d'hypertension indépendant de la rénine, hR⁺/hA⁺ : souris surexprimant la rénine et l'angiotensinogène humains, AngII : angiotensine II, WKY : Wistar-Kyoto, I/R : ischémie/reperfusion, TM : tonus myogénique, ROS : substances oxygénées réactives, L-NAME : L-nitro-arginine méthyl ester, eNOS^{-/-} : souris n'exprimant plus la monoxyde d'azote synthétase endothéliale, PPAR γ : récepteur γ du facteur activé de prolifération des peroxysomes, DE : dysfonction endothéliale, CBS : cystathionine β -synthétase, CuZnSOD : cuivre et zinc superoxyde dismutase.

Jusqu'à maintenant j'ai décrit comment la composition de la paroi pouvait affecter les propriétés mécaniques. Cependant, il ne faut pas oublier que l'arrangement et l'intégrité des composantes, plus particulièrement des fibres de collagène et d'élastine, est sans aucun doute un paramètre crucial. Au niveau cérébral, trop peu d'études décrivent ce type de paramètres pour soutenir une relation directe entre la réorganisation ou la détérioration des fibres et un changement biomécanique de la paroi. Toutefois, quelques études fort intéressantes ont révélé l'existence de changements dans la lame élastique interne possiblement associés à des changements dans la distensibilité. Ainsi, suite à l'ischémie/reperfusion de la MCA droite chez le rat WKY, l'augmentation de la compliance des MCA droite et gauche est accompagnée d'une augmentation de 100 % de l'aire des fenestrations sur la lame élastique interne (Jimenez-Altayo *et al.*, 2007). En se basant sur les travaux d'Arribas réalisés au niveau du mésentère (Briones *et al.*, 2003), les auteurs proposent que cette augmentation dans l'aire des fenestrations contribuerait à une plus grande distensibilité cérébrovasculaire. Les artères de résistance mésentérique des rats SHR sont caractérisées quant à elles par une diminution de l'aire des fenestrations et une baisse de la compliance, par rapport aux rats WKY (Briones *et al.*, 2003). Suivant cette logique, une lame élastique plus dense serait plus rigide et une lame plus perforée serait plus souple. En effet, un traitement à l'élastase, l'enzyme qui dégrade l'élastine, suffit pour abolir le changement de compliance (Briones *et al.*, 2003), ce qui prouve que l'organisation de l'élastine est bien un paramètre clé dans les propriétés mécaniques intrinsèques d'une artère. En 1923, Reuterwall décrivit pour la première fois des cassures dans la lame élastique interne des artères cérébrales chez l'humain qu'il surnomma *Reutewall's tears*. Plus tard en 1961, Hassler remarqua l'incidence élevée de ces cassures chez les sujets âgés ou présentant un anévrisme cérébral (Hegedus & Fekete, 1983). Ces cassures, localisées au niveau de la basilaire, de la MCA et de la carotide interne (Hassler, 1961), pourraient être associées à des hémorragies intracérébrales suite à la rupture d'un vaisseau artériosclérosé lors d'une augmentation extrême de la pression (Hegedus & Fekete, 1983). Chez le rat, l'hypertension (Zhang *et al.*, 2003) ou un violent changement hémodynamique (la ligation de la carotide gauche et de la branche postérieure des deux artères rénales) (Kim *et al.*, 1988) induit la fragmentation de la lame élastique interne à

des sites spécifiques (jonction entre l'ACA et l'artère olfactive, bifurcation de la basilaire) décrits comme étant des anévrismes. Dans ces deux études, la couche de CMLV sous la lame élastique interne fragmentée demeure inchangée. Il n'est pas clair si une fragmentation plus diffuse de l'élastine le long d'une artère pourrait donner lieu à des changements de compliance. Tandis qu'une fragmentation locale induit une structure lâche au sein de l'artère (l'anévrisme), une lame élastine interne fragmentée et désorganisée a déjà été associée à une rigidification paradoxale de la paroi de la PCA dans un groupe de 6 patients âgés (Fonck *et al.*, 2009). Selon moi, cette différence s'explique simplement par le fait que la cause de l'anévrisme est bien plus complexe qu'une simple dégradation de l'élastine. Même si certains chercheurs considèrent que la lame élastique interne est à l'origine de la pathogénèse de l'anévrisme (Kim *et al.*, 1988), la détérioration de l'endothélium, une dérégulation dans la synthèse du collagène et une atrophie de la couche de CMLV sont aussi incriminés (Inci & Spetzler, 2000).

Bien que l'étude du remodelage vasculaire soit souvent limitée à des altérations touchant une ou plusieurs composantes de la paroi, il faut toujours le considérer comme un processus multifactoriel. Au final, c'est la combinaison des différents changements qui vont façonner la mécanique de l'artère. Par exemple, une fragmentation de l'élastine n'a pas le même impact si elle s'accompagne d'une augmentation en collagène ou d'une augmentation en CMLV. De même, une augmentation en collagène n'a pas la même portée si les fibres sont intègres ou cassées.

1.2.1.3. Mécanismes associés au remodelage cérébral

Plusieurs facteurs contribuent à déclencher les changements structuraux et mécaniques de la paroi qui définissent le remodelage cérébrovasculaire. D'après les études répertoriées dans le Tableau I, les principaux facteurs seraient la pression, le tonus, l'AngII, les ROS, la biodisponibilité du NO, le niveau plasmatique d'homocystéine et l'âge. La majorité de ces études ne permettent pas de dissocier la contribution spécifique de ces facteurs dans les changements structuraux *versus* mécaniques. Par exemple, il est difficile de distinguer si les ROS sont impliqués dans l'hypertrophie ou dans l'augmentation de la compliance (Tableau I).

L'utilisation privilégiée des modèles d'hypertension dans l'étude du remodelage cérébral suggère que la pression et le système rénine-angiotensine II-aldostérone (RAAS) sont des facteurs déterminants (Tableau I). La pression détermine les contraintes circonférentielles et de cisaillement et régule directement le TM, tandis que l'AngII stimule la migration des CMLV et la formation de ROS qui désactivent le NO (Baumbach *et al.*, 2003). Cependant, le remodelage cérébral associé à l'hypertension est beaucoup plus complexe que le supposent les effets connus de la pression et de l'AngII. D'après certains, la PP et la stimulation du système nerveux sympathique seraient les déterminants principaux dans l'hypertrophie des artères cérébrales associée à l'hypertension (Baumbach & Chillon, 2000). En effet, chez les rats SHRSP, la dénervation sympathique atténue l'hypertrophie des artérioles sans diminuer la PAM (Baumbach *et al.*, 1989). De plus, l'augmentation de la PP dans la carotide sans augmentation de la PAM, grâce à une fistule artério-veineuse aorto-cave, serait suffisante pour induire l'hypertrophie des artérioles cérébrales chez des rats contrôles (Baumbach, 1996). Cependant, chez les souris eNOS^{-/-}, la ligature de la carotide commune gauche contribue à réduire la pression artériolaire moyenne et à normaliser la PP artériolaire cérébrale sans prévenir l'hypertrophie interne des artérioles cérébrales, suggérant que l'absence de NO pourrait favoriser l'hypertrophie (Tableau I) (Baumbach *et al.*, 2004). L'activation du système RAAS joue un rôle clé dans l'hypertension et serait impliquée dans l'hypertrophie des artères mésentériques (Griffin *et al.*, 1991). Cependant, l'implication du système RAAS dans l'hypertrophie des artères cérébrales n'a pas encore été confirmée. Chez des rats SHRSP, un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) ne prévient pas l'hypertrophie cérébrovasculaire si la dose n'est pas assez forte pour induire une baisse de la PA (Baumbach & Chillon, 2000). Dans une autre étude, le même niveau d'hypertrophie cérébrovasculaire est observé dans un modèle murin d'hypertension chronique indépendant de la rénine et chez des souris surexprimant la rénine et l'AngII (Tableau I) (Baumbach *et al.*, 2003). À ce jour, il y a cependant trop d'inconsistances entre les diverses études pour justifier l'importance de l'AngII, de la PP artériolaire cérébrale, de la PP et de la PAM dans l'hypertrophie cérébrovasculaire associée à l'hypertension.

En ce qui concerne la biomécanique, l'interprétation des changements de distensibilité semble beaucoup plus simple : la distensibilité passive des artères cérébrales semble varier conformément avec l'hypertrophie de la paroi. Dans les petites artères cérébrales, l'hypertrophie est caractérisée par l'augmentation disproportionnée des éléments distensibles (CMLV et élastine) de la paroi, ce qui pourrait expliquer l'augmentation de la compliance. Dans les grosses artères cérébrales, la paroi se rigidifie puisque l'hypertrophie est accompagnée d'une augmentation du contenu en collagène. En prévenant l'hypertrophie, on préviendrait conjointement les changements de compliance. Plusieurs études sont en faveur de cette association entre l'hypertrophie et la compliance cérébrovasculaire. Tout d'abord, chez les SHRSP, une diminution de la Psys artériolaire piale et de la PP artériolaire piale (pression mesurée dans les artérioles piales de premier ordre 1A qui sont les embranchements majeurs de la MCA) sans changement de la PAM, grâce à l'occlusion partielle d'une carotide, prévient complètement l'hypertrophie et normalise la compliance cérébrale (Baumbach *et al.*, 1991). De plus, chez les SHR, les effets pléiotropiques d'un traitement à la lovastatine, un inhibiteur de l'3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) réductase, préviennent à la fois l'hypertrophie interne et l'augmentation de la compliance des artérioles cérébrales (Regrigny *et al.*, 2000). Cependant quelques études réalisées par l'équipe de Baumbach remettent en question la véracité de ce principe. Chez les SHRSP, un traitement au cilzapril, un inhibiteur de l'ACE (ACEI) et à l'hydralazine, un vasodilatateur, inhibe de façon similaire l'hypertrophie cérébrale. Toutefois, la compliance n'est normalisée que par le cilzapril (Hajdu *et al.*, 1991). De plus, chez les SHRSP, une forte et faible dose de perindopril, un autre ACEI, atténuent l'augmentation de la compliance cérébrale sans que la faible dose n'ait d'effet sur l'hypertrophie (Chillon & Baumbach, 1999). Cependant, l'interprétation de ces résultats est discutable puisque le cilzapril et la forte dose de perindopril entraînent une plus forte baisse de PAM, PP artériolaire et Psys artériolaire que l'hydralazine ou la faible dose de perindopril, ce qui pourrait expliquer les différentes efficacités de ces traitements dans la prévention du remodelage. Quelques années plus tard, une étude dément sans équivoque le principe selon lequel l'augmentation de la compliance soit nécessairement consécutive à l'hypertrophie. Le captopril rétablit la PAM, la PP

systémique, la P artériolaire moyenne, la PP artériolaire et empêche l'hypertrophie avec la même efficacité chez des rats SHR jeunes (6 mois) et âgés (15 mois). Cependant, le captopril n'empêche aucunement l'augmentation de la compliance chez les rats âgés tandis qu'il normalise complètement la réponse chez les jeunes rats (Dupuis *et al.*, 2005).

En somme, l'augmentation de la PP artériolaire cérébrale et l'absence de NO semblent accessoires dans l'hypertrophie des artères cérébrales. La théorie stipulant que l'hypertrophie contribue elle-même à la compliance est plus ou moins valable depuis la parution de l'article de Dupuis *et al.* chez des rats âgés. Malgré cela, il reste évident que des changements dans la composition et l'architecture des composantes de la paroi vasculaire vont se traduire par un changement du comportement mécanique. Le ratio entre les éléments distensibles et rigides de la paroi et l'intégrité des fibres structurales pourraient être tout aussi déterminantes sur la biomécanique des artères cérébrales. L'abondance des études quant au rôle critique qu'occupent les métalloprotéinases (MMP) dans le remodelage vasculaire en général témoigne de la pertinence de cette hypothèse.

1.2.1.4. Implication des métalloprotéinases dans le remodelage cérébrovasculaire

Les MMP forment une famille de 26 enzymes divisées en 6 groupes : les collagénases, les gélatinases, les stromélysines, les MMP membranaires et les «autres» MMP (Raffetto & Khalil, 2008). Ce sont des enzymes à domaine catalytique zinc (Zn^{2+}), produites sous forme zymogène latente (proMMP). Après leur synthèse, les MMP sont sécrétées dans le milieu extracellulaire ou vont s'ancrer dans la membrane plasmique. Une fois activées suite à l'exposition du Zn^{2+} , ces enzymes dégradent les composantes de la MEC comme le collagène, l'élastine, la fibronectine et la membrane basale (Newby, 2007; Lemarie *et al.*, 2010). Les MMP sont impliquées autant dans les processus physiologiques (développement, cicatrisation) que pathologiques (la migration métastase, l'athérosclérose, l'arthrite, dégradation de la BBB) (Rosenberg, 2002). Au niveau vasculaire, la production de ces enzymes par les macrophages, les CMLV et les cellules endothéliales est surtout régulée par le NO, l'AngII,

l'inflammation, les ROS, la PA (étirement de la paroi vasculaire) et les changements de débit sanguin (stress hémodynamique) (Signorelli *et al.*, 2005; Lehoux *et al.*, 2006; Flamant *et al.*, 2007; Ota *et al.*, 2009; Ruddy *et al.*, 2009). Une relation cause-effet existe entre l'activation des MMP et la progression de plusieurs pathologies vasculaires telles que le remodelage associé à l'hypertension, la déstabilisation et la rupture des lésions athérosclérotiques, les anévrismes aortiques et cérébraux, la prééclampsie et les varices (Raffetto & Khalil, 2008). Le remodelage vasculaire est souvent attribué à un déséquilibre entre les MMP et les inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases (TIMP) endogènes. En fait, l'activité nette des MMP va dépendre de la présence des TIMP. Les quatre types d'inhibiteurs TIMP-1,-2,-3 et -4, possèdent une affinité spécifique pour différentes MMP. Les TIMP vont s'insérer dans le site actif de la MMP où s'insérerait normalement le substrat à cliver afin d'en empêcher sa dégradation (Raffetto & Khalil, 2008).

Plusieurs études ont démontré l'implication des gélatinases MMP-2 et -9 dans le remodelage cérébrovasculaire associé à l'hypertension (Pires *et al.*, 2011), à l'anévrisme cérébral (Aoki *et al.*, 2007a) et au diabète (Elgebaly *et al.*, 2010). Toutefois, les conséquences spécifiques d'une restructuration de la MEC par les MMP restent à définir. Intuitivement on pourrait penser que les MMP contribuent davantage à la biomécanique puisqu'elles clivent les brins de collagène et d'élastine. C'est ce que le travail de Lehoux *et al.* démontre *in vitro* en validant le rôle fondamental de MMP-9 dans l'augmentation de la compliance des carotides induit par un stress sur la paroi. En effet, l'incubation de la carotide à une pression de 150 mm Hg pendant trois jours augmente la distensibilité de la paroi, une réponse abolie par un inhibiteur de MMP et dans les carotides provenant de souris MMP-9^{-/-} (Lehoux *et al.*, 2004). Quelques années plus tard, le même groupe confirme ces résultats *in vivo* : chez des souris WT traitées à l'AngII, la compliance carotidienne est augmentée alors que chez des souris MMP-9^{-/-}, l'AngII induit une baisse de la compliance carotidienne (Flamant *et al.*, 2007). La phase précoce de l'hypertension induite par l'AngII est accompagnée d'une augmentation de l'activité MMP-9 qui permettrait hypothétiquement d'atténuer l'augmentation de la PA en augmentant la compliance artérielle. Dans ce contexte, l'activité MMP-9 clive le collagène IV et freine son accumulation dans la paroi, ce qui se traduit par la

rigidification de la carotide chez les MMP-9^{-/-} (Flamant *et al.*, 2007). Les carotides ne sont ni des artères cérébrales ni des artères de résistance mais, dans la limite de mes connaissances, aucune démonstration aussi élégante n'existe au niveau cérébrovasculaire. En revanche, nous savons que l'équilibre entre MMP-9 et MMP-2 et leur inhibiteur, TIMP-1 et TIMP-2, respectivement, détermine la gravité des anévrismes cérébraux induits expérimentalement (Aoki *et al.*, 2007a; Aoki *et al.*, 2007b). Les souris TIMP-1^{-/-} et TIMP-2^{-/-} sont en effet plus vulnérables à la détérioration, voire à la disparition, de la lame élastique interne au niveau de l'embranchement de l'artère olfactive avec l'ACA découlant de l'induction des anévrismes cérébraux (Aoki *et al.*, 2007b). La MMP-9 serait aussi impliquée dans les hémorragies intracérébrales causées par la rupture des microvaisseaux : l'activité MMP-9 est liée à la déposition d'hémoglobine au cerveau (indicateur d'hémorragie) (Lee *et al.*, 2007). En se basant sur une étude chez l'homme, l'activité MMP-9 pourrait expliquer la nature instable des malformations artério-veineuses cérébrales (Hashimoto *et al.*, 2003). Vraisemblablement, la dégradation excessive de la MEC par MMP-9 fragilise la paroi la rendant plus distensible jusqu'à ce qu'elle atteigne son point de rupture. Soulignons que certains travaux récents diminuent le rôle potentiel des MMP dans la biomécanique. En effet, un traitement à la doxycycline, un inhibiteur non spécifique des MMP, prévient la diminution des diamètres externe et interne sans affecter l'hypertrophie et l'augmentation de la rigidité de la MCA chez des SHRSP (Pires *et al.*, 2011). De plus, chez des rats diabétiques Goto-Kakizaki, la MCA ne présente aucun signe de remodelage par rapport aux contrôles malgré une augmentation de 300 % de l'activité MMP-2,-9 dans les artères du polygone de Willis (Elgebaly *et al.*, 2010). Dans ce modèle, l'inhibition de l'activité MMP par la minocycline révèle que la MMP-9 est plutôt responsable de l'augmentation du nombre de collatérales, du diamètre des collatérales, de l'index de tortuosité et du nombre d'anastomoses (Elgebaly *et al.*, 2010).

En résumé, bien que le remodelage vasculaire soit un processus multifactoriel, il est reconnu qu'une part des changements survenant au niveau de la MEC soit contrôlée par l'activation des MMP. Dans les modèles animaux de maladies CV caractérisés par une

augmentation de la compliance des artères cérébrales (Tableau I) l'implication des MMP dans ce changement mécanique reste cependant à être démontrée.

En présence de facteur de risque CV, les artères cérébrales subissent une transformation physique de nature présumément adaptative qui va évoluer vers une désorganisation des composantes de la paroi (Martinez-Lemus *et al.*, 2009). Dans un premier temps, le remodelage cérébrovasculaire permettrait de pallier aux changements dans la pression ou le débit sanguin, mais l'exacerbation de l'état pathologique (inflammation, activation des MMP, stimuli pathologique) transforme la paroi en état dit maladaptatif (Martinez-Lemus *et al.*, 2009).

1.2.2. La dysfonction endothéliale cérébrale

La dysfonction endothéliale cérébrovasculaire est associée à l'hypertension, à l'athérosclérose, au vieillissement, au diabète, à l'accident vasculaire cérébral (AVC ou *stroke*) et à la maladie d'Alzheimer. C'est aussi un facteur prédisposant à l'AVC et au déclin cognitif (Miller *et al.*, 2010a). Au niveau périphérique, la dysfonction endothéliale est incriminée dans l'athérosclérose, la formation de thrombus, l'angine de Prinzmetal, la dysfonction érectile et l'infarctus du myocarde (Britten *et al.*, 1999; Billups, 2005; Hadi *et al.*, 2005). Autrement dit : «*one is only as old as one's endothelium*» (R. Altschul, 1954) ; une reformulation plus «actuelle» de la citation originale : «*a man is only as old as his arteries*» (Olser, 1898). La dysfonction endothéliale est caractérisée par l'incapacité de l'endothélium à maintenir un tonus de base optimal et à répondre adéquatement aux stimuli vasodilatateurs (Vanhoutte *et al.*, 2009). Quand la biodisponibilité des EDRF (NO, EDHF, PGI₂) diminue et/ou celle des EDCF (l'endothéline-1 (ET-1), le thromboxane A₂ (TXA₂), les ROS, l'AngII, *etc.*) augmente, le tonus de base penche vers en état vasoconstricteur (Vanhoutte, 2002). Le terme dysfonction endothéliale peut aussi s'utiliser pour parler d'un endothélium procoagulant, proinflammatoire et qui dérégule la croissance et la structure vasculaires (Miller *et al.*, 2010a).

À la base, la dysfonction endothéliale est une diminution de la dilatation dépendante de l'endothélium, le plus souvent occasionnée par une baisse de la libération et de la

biodisponibilité de NO/H₂O₂ (van der Loo *et al.*, 2000; Hamilton *et al.*, 2001; Blackwell *et al.*, 2004; William E. Sonntag, 2007; Drouin *et al.*, 2008). Le mécanisme sous-jacent majeur impliqué dans la dysfonction endothéliale est le stress oxydant (van der Loo *et al.*, 2000; Hamilton *et al.*, 2001). On parle de stress oxydant lorsque l'équilibre *redox* physiologique est déplacé vers un état pro-oxydant où une production accrue de ROS (l'O₂⁻, radical hydroxyle (OH[•]) et le peroxy-nitrite (ONOO⁻)) ne peut plus être contrecarrée par les enzymes antioxydantes (la catalase, la glutathion peroxydase et la superoxyde dismutase) et les chélateurs non-enzymatiques (glutathion, vitamine C et E).

Au niveau cérébrovasculaire, la NADPH oxydase est une source de ROS très importante (Miller *et al.*, 2006; Bedard & Krause, 2007) mais la xanthine oxydase, les enzymes mitochondriales, les NO synthases et les enzymes qui métabolisent l'acide arachidonique (les COX, les lipoxigénases (Lox), les réductases du CYP450) sont aussi impliquées (Faraci, 2006; Park *et al.*, 2007). L'O₂⁻ produit par la NADPH oxydase, par exemple, réagit rapidement avec le NO local pour former du ONOO⁻ (Beckman & Koppenol, 1996). Cette réaction inactive le NO et favorise l'équilibre myogénique vers la vasocontraction. Le rôle fondamental de la NADPH oxydase dans la dysfonction endothéliale a été décrit dans plusieurs études. Par exemple, à l'âge de 12 mois, la dysfonction endothéliale cérébrale normalement associée au vieillissement n'est pas observée chez les souris qui n'expriment pas la sous-unité catalytique Nox2 de la NADPH oxydase et est abolie par un chélateur de ROS ou un inhibiteur de la NADPH oxydase (Park *et al.*, 2007). De plus, *via* son récepteur AT-1, l'Ang II associée à l'hypertension induit une robuste production de ROS dépendante de l'activation de la NADPH oxydase (Kazama *et al.*, 2004). En effet, les récepteurs AT-1 coexistent avec la sous-unité Nox2 (gp91^{phox}) de la NADPH oxydase dans le cytoplasme des cellules endothéliales des artérioles cérébrales (Kazama *et al.*, 2004). L'AngII interfère avec la dilation dépendante de l'endothélium des artères cérébrales (Girouard *et al.*, 2006) et atténue l'hyperémie fonctionnelle chez la souris (Kazama *et al.*, 2004).

La production d'O₂⁻ dépendante de la sous-unité Nox2 de la NADPH oxydase serait aussi responsable de la dysfonction endothéliale cérébrale chez des souris

athérosclérotiques n'exprimant plus l'apolipoprotéine E (ApoE^{-/-}) (Miller *et al.*, 2010b). Même si les souris athérosclérotiques présentent rarement des lésions cérébrales avec l'âge, l'extrême sensibilité des artères cérébrales face aux ROS abroge significativement la vasodilatation dépendante de l'endothélium dès l'âge de trois mois (Miller *et al.*, 2010b; Bolduc *et al.*, 2011; Drouin *et al.*, 2011a).

Les effets directs des ROS sur le tonus cérébral de base sont complexes. Dépendamment des circonstances, des contractions ou des relaxations des artères cérébrales ont été observées suite à la génération d'O₂⁻. L'explication la plus plausible serait l'effet biphasique du O₂⁻, qui induit une relaxation à faible concentration, voire physiologique, qui évolue vers une contraction à haute dose (Faraci, 2006). L'inactivation du NO par l'O₂⁻ forme l'ONOO⁻. Hypothétiquement, le ONOO⁻ pourrait partiellement compenser pour la baisse de NO en activant les canaux K⁺ sensibles à l'ATP, sauf que l'ONOO⁻ a aussi été impliqué dans l'inhibition des canaux K⁺ activés par le Ca²⁺ (Faraci, 2006). L'effet indirect du ONOO⁻ sur la réponse myogénique est moins nébuleux ; il induit la nitrosylation et dépolymérise l'actine F ce qui affecte les propriétés contractiles des CMLV de la PCA chez le rat et diminue le TM (Maneen & Cipolla, 2007). Ajoutons que l'O₂⁻ se dismute spontanément à une vitesse $4 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, ce qui signifie que sa demi-vie est inversement corrélée avec sa concentration. Par exemple, à une concentration intracellulaire physiologique faible d'environ 0.1 nM, la demi-vie de l'O₂⁻ est de 3.5 h (Auchere & Rusnak, 2002).

Mis à part l'effet inactivateur de l'O₂⁻ sur le NO, il existe d'autres déficiences endothéliales susceptibles de compromettre la biodisponibilité du NO. Avec l'âge et les facteurs de risque CV, les cellules endothéliales régénérées subissent des changements qui les rendent fonctionnellement anormales (Vanhoutte *et al.*, 2009). L'expression de eNOS diminue et l'endothélium devient insensible aux agonistes (sérotonine, thrombine) qui déclenchent la relaxation dépendante de la protéine G inhibitrice (G_i) (Vanhoutte *et al.*, 2009). Le vieillissement vasculaire est aussi associé à une réduction de tétrahydrobioptérine (BH4 ; un cofacteur essentiel de la eNOS) ce qui contribue au découplage de la eNOS (Yang *et al.*, 2009). Chez les souris athérosclérotiques ApoE^{+/+}, la baisse de production de NO est causée par une suppression de la phosphorylation de la

eNOS (Yamashiro *et al.*, 2010). De plus, la suractivation pathologique de la voie kinase RhoA/Rho endothéliale interfère avec la production de NO en déstabilisant l'ARNm de eNOS (Miller *et al.*, 2010a).

L'ET-1 est produite par l'endothélium en condition pathologique (ischémie, diabète, athérosclérose, obésité, *etc.*) et entraîne une vasoconstriction soutenue *via* les récepteurs ET_A couplés aux protéines G localisés sur les CMLV des artères cérébrales (Andresen *et al.*, 2006). La localisation ainsi que la réponse régulée par le sous-type ET_B est plutôt hétérogène ; les récepteurs ET_B localisés sur les cellules endothéliales induisent des relaxations tandis que les récepteurs ET_B des CMLV provoquent des contractions (Harris *et al.*, 2008). Dans un modèle de diabète de type II chez le rat, la relaxation dépendante de l'endothélium induite par l'ACh est compromise par l'activation accrue des récepteurs ET_B et ET_A au niveau de l'artère basilaire (Harris *et al.*, 2008). De plus, la MCA des souris athérosclérotiques ApoE^{-/-} serait sélectivement plus sensible à l'ET-1 : bien que la contraction maximale induite par une dépolarisation soit identique entre les souris sauvages et les ApoE^{-/-}, la réponse contractile à ET-1 est 3.5 fois plus intense chez ces dernières (Yamashiro *et al.*, 2010). Finalement, dans la PCA du lapin, une exposition de 5 min aux LDL oxydées (oxLDL) induit une libération d'ET-1 qui potentialise le TM et atténue indirectement les relaxations dépendantes de l'endothélium (Xie & Bevan, 1999). L'ensemble de ces résultats, nous porte à croire qu'au niveau cérébral, la vasoconstriction induite par l'ET-1 domine sur la vasodilatation.

D'après une étude récente menée au laboratoire, les souris athérosclérotiques LDLr^{-/-} ; ApoB^{+/+} (ATX) âgées de trois mois présentent une dysfonction endothéliale cérébrale prématurée qui peut être renversée par un traitement aigu au furégrelate, un inhibiteur de la synthèse de TXA₂. Ces résultats suggèrent que l'augmentation de la synthèse du TXA₂ vasoconstricteur associée à l'athérosclérose, en plus de l'augmentation des ROS, inhibe la dilatation dépendante de eNOS (Drouin *et al.*, 2011b). Le TXA₂ est un produit dérivé de la dégradation de l'acide arachidonique par les COX, produit par l'endothélium mais principalement par les plaquettes d'où son rôle primaire dans l'agrégation plaquettaire. La liaison du TXA₂ à son récepteur TP couplé à G_{q/11} localisé

sur les CMLV favorise la phosphorylation des MLC₂₀, ce qui induit une vasocontraction (Sellers & Stallone, 2008).

Les ROS reçoivent beaucoup d'attention pour le rôle qu'ils jouent dans la dysfonction endothéliale, mais ils n'agissent pas seuls; d'autres mécanismes (découplage de la eNOS) ou agents (l'ET-1, la TXA₂) contribuent aussi à compromettre la vasodilatation induite par le NO. Lorsque la relâche d'EDCF domine celle d'EDRF, l'homéostasie vasculaire est perturbée et, ultimement, le tonus basal augmente ce qui conduit à une régulation anormale du DSC.

1.2.3. La dérégulation du DSC

En s'attaquant à l'arbre vasculaire cérébral et périphérique, le vieillissement et les facteurs de risque CV (l'hypertension, les dyslipidémies, l'obésité, le tabac, le diabète, l'hyperhomocystéinémie, la FC, *etc.*) compromettent la perfusion cérébrale. Les dysfonctions vasculaires se manifestent sous plusieurs formes et vont collectivement contribuer à une baisse chronique du DSC. Une vaste majorité d'études corrobore l'implication d'une perfusion cérébrale inadéquate dans l'étiologie des formes de démence vasculaire comme la maladie d'Alzheimer (Farkas & Luiten, 2001; Hanyu *et al.*, 2009a) et la leucoaraïose (ou lésions de la substance blanche) (Pantoni & Garcia, 1997; Shibata *et al.*, 2004). De ces pathologies, des déficits cognitifs s'ensuivent inévitablement. Les conséquences d'une dérégulation du DSC sont donc très graves et les mécanismes impliqués potentiellement très nombreux.

1.2.3.1. Mécanismes impliqués dans la dérégulation chronique du DSC

Tous les facteurs de risque CV énumérés ci-haut sont associés à la dysfonction endothéliale cérébrale (Faraci, 2011). De toute évidence, si la voie de signalisation du NO est compromise on pourrait penser que la hausse du débit sanguin synchrone à l'activation neuronale n'est plus assurée (Adachi *et al.*, 1992; Raszkievicz *et al.*, 1992). Premièrement, l'activation des fibres cholinergiques sous-corticales induit la libération périvasculaire d'acétylcholine responsable une vasodilatation dépendante de la eNOS en stimulant les récepteurs muscariniques endothéliaux des artérioles intra-corticales

(Zhang *et al.*, 1995; Elhusseiny & Hamel, 2000). Deuxièmement, il a été suggéré que la propagation rétrograde de la vasodilatation locale vers les artères piales en amont fait intervenir la libération de facteurs vasodilatateurs *via* l'activation de la eNOS par les contraintes de cisaillement (Dietrich *et al.*, 1996; Iadecola, 2004). Généralement, c'est l'abondance de ROS qui diminue la biodisponibilité du NO. Dans l'hypertension, la PA élevée est typiquement accompagnée d'une augmentation de l'activité du système RAS qui serait garante d'une dysfonction endothéliale contrôlée par les ROS : chez des souris recevant une infusion d'AngII, la diminution du DSC est associée à une dysfonction endothéliale dépendante de la production d'O₂⁻ par la NADPH oxydase (Girouard *et al.*, 2007). Des résultats provenant de notre laboratoire suggèrent l'existence d'un lien potentiel entre la dysfonction endothéliale cérébrale et la baisse du DSC basal ou en réponse à une stimulation neuronale chez les souris LDLr^{-/-} ; hApoB-100^{+/+} (Drouin *et al.*, 2011a). Dans ce travail, on constate que les ROS jouent un rôle de premier plan dans la détérioration de la dysfonction cérébrovasculaire associée à l'athérosclérose puisque les souris traitées avec un antioxydant ont une fonction endothéliale normale et sont moins sujettes aux dommages cérébraux (Drouin *et al.*, 2011a).

Des altérations dans la structure des vaisseaux cérébraux peuvent aussi compromettre l'autoregulation cérébrale. En effet, l'âge, l'hypertension, le diabète et un historique d'AVC sont les facteurs prédisposant à la leucoaraïose, une affection des petites artères et des artérioles intracrâniennes caractérisée par la substitution de la couche de CMLV par une substance fibreuse, la fibrohyaline (Pantoni & Garcia, 1997). Dans la leucoaraïose, l'épaississement de la paroi vers la lumière (artériosclérose) entraîne l'occlusion partielle du vaisseau (Pantoni & Garcia, 1997). Cette pathologie se manifeste par la présence de petites zones infarctées dans la matière blanche détectées par *CT-scan* (zones de faible signal) (Markus, 2008). Dans l'hypertension, plusieurs facteurs, dont la pression intravasculaire exercée sur la paroi et le niveau d'AngII, contribuent au remodelage des artères cérébrales de résistance (Chillon & Baumbach, 1999; Iadecola & Davisson, 2008). Ce processus implique l'hypertrophie de la paroi avec son empiètement dans la lumière (Baumbach & Heistad, 1989) ainsi qu'une réorganisation des fibres élastiques allant vers une rigidification ou une fragilisation de

la paroi artérielle dépendamment du type d'artère étudiée (Toda *et al.*, 1982; Brayden *et al.*, 1983; Baumbach *et al.*, 1988a). Dans l'hypertension chronique, cette restructuration de la paroi décale vers la droite la courbe d'autorégulation (110-120 à \approx 230 mm Hg) (Strandgaard *et al.*, 1973) (Figure 5), de façon à ce que de plus hautes valeurs de pression soient requises dans les artères de résistance pour maintenir constant le DSC (Iadecola & Davisson, 2008). Cette adaptation prévient les AVC en évitant une perfusion trop vélocité des capillaires à haute pression, mais limite la capacité des vaisseaux à compenser pour une chute drastique de la PA (Iadecola & Davisson, 2008) suscitée par une médication hypotensive, par exemple. À ce jour, trop peu d'études se sont penchées sur la caractérisation du remodelage des artères cérébrales associé à l'athérosclérose pour faire une prédiction avisée quant à son rôle dans l'hypoperfusion cérébrale.

Même si la régulation globale du DSC en réponse à la demande métabolique est orchestrée conjointement par la structure et la fonction endothéliale des artères cérébrales, la rigidification des carotides a des conséquences non-négligeables. Les artères cérébrales ne sont en effet pas à l'abri d'une augmentation de la pression pulsatile. Les carotides «protègent» les artères cérébrales en convertissant la pression pulsatile en pression continue, mais ces propriétés amortissantes disparaissent avec l'âge et les facteurs de risque CV rendant les artères cérébrales vulnérables. La proportion en collagène augmente au détriment de celle de l'élastine et de la proportion des CMLV (Greenwald, 2007). À cela s'additionne la calcification, la formation de produits de glycation avancés (AGEs) et la «fatigue» de l'élastine (Greenwald, 2007). En somme, lorsque la carotide se rigidifie, les artères cérébrales en aval sont exposées à de plus grandes amplitudes de contraintes pulsatiles circonférentielles et de cisaillement (O'Rourke & Safar, 2005) ce qui induit une vasoconstriction et endommage l'endothélium, respectivement. En 1954, le Dr Byrom démontra pour la première fois, chez le rat, que des dommages cérébrovasculaires peuvent être induits par l'augmentation du stress pulsatile, un état qu'il baptisa *chronic hypertensive encephalopathy* (Byrom, 1954). Une cinquantaine d'années plus tard, la rigidité artérielle des artères de conductance est associée à des troubles cognitifs, à la démence vasculaire, à la maladie d'Alzheimer et aux pertes de mémoires (Kearney-Schwartz *et*

al., 2009). Cependant, la rigidité des artères de conductance n'est pas encore unanimement reconnue comme un facteur de risque indépendant des troubles cognitifs, puisque la PP brachiale et PWV carotido-fémorale sont toujours dépendantes de l'âge lorsque les études sont longitudinales et réalisées sur des cohortes âgées. Par exemple, en 2008, une étude sur 14 ans effectuée sur 1749 participants exempts de démence au départ, révèle qu'à mesure que les sujets vieillissent, ceux chez qui la PP brachiale et la PWV carotido-fémorale s'élèvent rapidement, deux index de rigidification artérielle, voient décliner leur capacité d'apprentissage et de mémorisation (Waldstein *et al.*, 2008). D'après l'étude d'Elias *et al.*, c'est l'interaction entre la PWV et l'âge qui contribue à diminuer les performances cognitives (Elias *et al.*, 2009). Plus récemment, Pase *et al.* ont identifié la PP comme un facteur de risque indépendant dans la chute de la capacité et de la rapidité d'extraction de la mémoire à long terme, au sein d'une petite cohorte de sujets sains âgés entre 40 et 65 ans (Pase *et al.*, 2010). Nonobstant, l'interprétation de ces études qui associent l'augmentation de la PWV carotido-fémorale aux troubles cognitifs est limitée puisque le DSC n'a pas été évalué en parallèle. En revanche, nous savons que la diminution du débit sanguin dans la MCA est en relation étroite avec la diminution de la compliance aortique (Kwater *et al.*, 2009) et que la rigidité de la carotide est un excellent prédicteur de maladies cérébrovasculaires (Ochi *et al.*, 2010; Tsuchikura *et al.*, 2010).

Pour conclure, la dysfonction endothéliale, la structure des artères cérébrales et la rigidification des artères de conductance influencent fortement le DSC. Indubitablement, une mauvaise perfusion cérébrale aura des répercussions sur les fonctions cérébrales et les déficits cognitifs associés.

1.2.3.2. Association entre la dérégulation du DSC et les pathologies cérébrales

Comment l'hypoperfusion chronique du cerveau évolue-t-elle vers des déficits cognitifs? Premièrement, lors de l'hypoperfusion, l'approvisionnement en O₂ et glucose, indispensable au fonctionnement des neurones, est réduit. Deuxièmement, la tortuosité des capillaires augmente (distorsion de la lumière et compression des cellules endothéliales) en réponse aux changements hémodynamiques microvasculaires

(écoulement sanguin turbulent plutôt que laminaire) (de la Torre, 2000), ce qui ajoute un obstacle supplémentaire à la livraison des nutriments. La crise énergétique neuro-gliale conséquente (baisse d'ATP et production de ROS) chamboule les processus impliqués dans la synthèse des neurotransmetteurs, le transport calcique, l'activité synaptique, la transmission du potentiel d'action neuronal et l'expression génique (synthèse et phosphorylation anormale des protéines) (de la Torre, 2000). De plus, la déformation des capillaires rend difficile l'évacuation des déchets à travers la BBB et leur accumulation devient cytotoxique pour les neurones environnants (de la Torre, 2000). Les neurones de l'hippocampe, une région principalement responsable de la mémoire et de l'apprentissage, ont une forte demande énergétique et sont donc plus vulnérables (de la Torre, 2006). Par exemple, le défaut typique de la maladie d'Alzheimer, la forme de démence la plus répandue, serait l'accumulation du peptide de la β -amyloïde (β A) à structure anormale aboutissant à la formation des plaques séniles. Cette malformation protéique pourrait vraisemblablement être d'origine vasculaire (Iadecola, 2010). L'accumulation du β A au cerveau est toxique pour les neurones et induit la contraction des artères cérébrales, ce qui entretient la progression de la maladie d'Alzheimer (Iadecola, 2004). L'accumulation de la β A dans la maladie d'Alzheimer anime plusieurs débats, il n'y a pas de consensus sur la chronologie des événements : la β A est-elle la cause ou la conséquence de la maladie d'Alzheimer ? (de la Torre, 2004).

Dans la maladie de Binswanger, des lésions dans la matière blanche (démyélination, la perte d'axone et l'activation gliale) s'accompagnent de déficits cognitifs. L'hypoperfusion chronique de l'encéphale serait en cause. En effet, dans un modèle d'occlusion bilatérale des carotides communes (2-VO ; *two vessels occlusion*) chez la souris, une réduction modérée du DSC (% du DSC initial : 51 % après 2h et 81 % après un mois) pendant un mois est suffisante pour induire l'activation gliale et la raréfaction de la myéline dans la matière blanche, sans affecter la matière grise et l'aire visuelle (Shibata *et al.*, 2004). Dans ce modèle, la mémoire à long terme est intacte conformément à l'absence de lésions dans l'hippocampe, mais la mémoire à court terme est affectée car les circuits sous-corticaux-frontaux sont touchés (Shibata *et al.*, 2007). Une étude à long terme avec le même modèle (DSC : 63 % après 2h et 85 % après trois mois) révèle des défauts dans la mémoire à l'âge de huit mois en accord avec

un hippocampe atrophié et marqué positivement pour des neurones pyknotiques et apoptotiques (Nishio *et al.*, 2010).

La perfusion cérébrale pourrait aussi être pertinente dans l'étiologie de la sclérose en plaques (SeP). Cette maladie du système nerveux central est principalement caractérisée par une démyélination axonale. Sans gaine, le transit électrique des informations dans l'axone est compromis, voire interrompu. Bien que la SeP soit décrite classiquement comme une maladie auto-immune dominée par les lymphocytes T, certains aspects ne s'expliquent pas par des mécanismes auto-immunitaires (De Keyser *et al.*, 2008). Une étude révèle une baisse d'environ 50 % du DSC dans la matière blanche des patients atteints de SeP par rapport aux contrôles sains (Law *et al.*, 2004). Dans sa revue concernant les liens possibles entre l'hypoperfusion cérébrale et la progression de la maladie, le Dr De Keyser suggère que le déficit astrocytaire en récepteur β_2 -adrénergiques chez les patients atteints de SeP, dont l'origine demeure encore inconnue, serait responsable de l'hypoperfusion. Normalement, l'activation des récepteurs β_2 -adrénergiques favorise la vasorelaxation des artérioles en stimulant la synthèse intracellulaire d'AMPc et la relâche de K^+ dans l'espace périvasculaire (De Keyser *et al.*, 2008).

Il est difficile d'étudier les pathologies cérébrales sans mentionner l'AVC. Une distinction avec les pathologies précédemment discutées s'impose néanmoins : la majorité (85 %) sont des AVC ischémiques causés par l'occlusion subite d'une artère cérébrale, et 15 % découlent d'une hémorragie cérébrale (de la Torre, 2006). Ainsi, les ravages sont immédiats et dramatiques, à l'inverse d'une hypoperfusion chronique et asymptomatique où l'accumulation des dommages est progressive. Le pronostic de l'AVC est effrayant, 25 % de mortalité après un mois et près de 50 % pour les AVC hémorragiques (Donnan *et al.*, 2008) ; parmi les survivants, 30 % souffriront de démence (Leys *et al.*, 2005). Chez ces derniers, les déclin cognitifs corrént avec une atrophie du cerveau, des lésions dans la matière blanche et des infarctus cérébraux silencieux (Leys *et al.*, 2005). La démence vasculaire ou la maladie d'Alzheimer explique les déficits cognitifs *post-AVC* (Leys *et al.*, 2005).

Terminons cette section en rapportant que les souris athérosclérotiques LDLr^{-/-}; hApoB-100^{+/+} sont aussi caractérisées par une perte des fonctions cognitives à l'âge de six mois. Comme mentionné précédemment, ces souris présentent une dysfonction endothéliale sévère allant de pair avec une hypoperfusion cérébrale, ce qui suggère que les dommages neuronaux accumulés pourraient vraisemblablement justifier les troubles d'apprentissage observés chez ces souris (Drouin *et al.*, 2011a). Ces résultats s'alignent avec la théorie soutenue par le Dr de la Torre : l'hypothèse vasculaire de la maladie d'Alzheimer surclasse l'hypothèse neurodégénérative de la β -amyloïde. De la Torre soutient que les maladies CV impliquant une dérégulation du DSC sont le fondement même de la maladie d'Alzheimer. Le fait que les facteurs de risque pour la maladie d'Alzheimer, tels que hypertension, l'hypotension, l'athérosclérose et les arythmies pour n'en nommer que quelques-uns, soient tous liés à la dérégulation du DSC constitue un argument éloquent (de la Torre, 2004). En limitant la capacité de dilatation maximale des artères de résistance cérébrales, la structure et le comportement biomécanique pourraient s'avérer aussi pertinents que la fonction endothéliale dans la régulation du DSC. Ainsi, nous devons évaluer dans quelle mesure le remodelage des artères cérébrales s'intègre dans ce concept dans notre modèle de souris athérosclérotiques.

Il y a donc clairement une association directe entre le DSC et des déficits cognitifs : l'insuffisance nutritionnelle du cerveau conduit à la mort des neurones, à l'atrophie de certaines aires du cerveau, à la production de protéines délétères et à l'échec de la transmission neuronale.

1.2.4. Relation entre la structure, la fonction endothéliale et la régulation du DSC

En juxtaposant les études portant sur le remodelage cérébrovasculaire (présentées au paragraphe 1.2.1) avec celles sur la fonction endothéliale cérébrale (présentées au paragraphe 1.2.2), il apparaît évident que ces deux paramètres sont indissociables. La dysfonction endothéliale cérébrale associée aux facteurs de risque CV est-elle la cause ou une conséquence du remodelage de la paroi? Sans avoir de

réponse précise nous savons qu'au niveau périphérique et central cette interdépendance entre la structure et la fonction endothéliale existe, bien qu'elle n'ait jamais été directement démontrée. D'après des mesures obtenues par échocardiographie ou par Doppler, la rigidité de l'aorte ou de la carotide est associée à la dysfonction endothéliale de l'artère brachiale (Tounian *et al.*, 2001; Nigam *et al.*, 2003; McEniery *et al.*, 2006). De plus, l'athérosclérose coronaire est caractérisée par une dysfonction endothéliale coronaire qui est associée à une diminution de la compliance et une augmentation des contraintes de cisaillement également au sein de l'artère coronaire (Takumi *et al.*, 2010). Au niveau cérébral, dans les modèles animaux d'hypertension (Mayhan *et al.*, 1987; Baumbach & Heistad, 1989; Dunn *et al.*, 2008), d'ischémie/reperfusion (Petrault *et al.*, 2005; Jimenez-Altayo *et al.*, 2007) et d'inhibition de PPAR γ (Halabi *et al.*, 2008; Chan *et al.*, 2010), l'augmentation paradoxale de la compliance des artères cérébrales est constamment associée à une dysfonction endothéliale cérébrale.

En réduisant la production de NO, la dysfonction endothéliale induit une augmentation des contraintes circonférentielles d'étirement et tangentielles de cisaillement, liées à une élévation de la pression et du débit, respectivement (Lehoux *et al.*, 2006). L'endothélium est le principal senseur de ces contraintes et un changement chronique stimule la transformation physique de la paroi (remodelage) afin de ramener les contraintes à des valeurs physiologiques (Figure 8) (Lehoux *et al.*, 2006). À l'inverse, si la paroi se rigidifie en premier, l'élévation des forces de tension sur la paroi va promouvoir la production de ROS, la synthèse endothéliale de molécules pro-inflammatoires (molécule d'adhésion vasculaire et intercellulaire (VCAM et ICAM), protéine-1 chimioattractante des monocytes (MCP-1)) et de molécules vasoconstrictives (ET-1) (Figure 8) (Chatzizisis & Giannoglou, 2007) qui vont entraîner la dysfonction endothéliale. En plus, des contraintes trop fortes pourraient abîmer la surface de l'endothélium et ainsi compromettre sa fonctionnalité (Chatzizisis & Giannoglou, 2007).

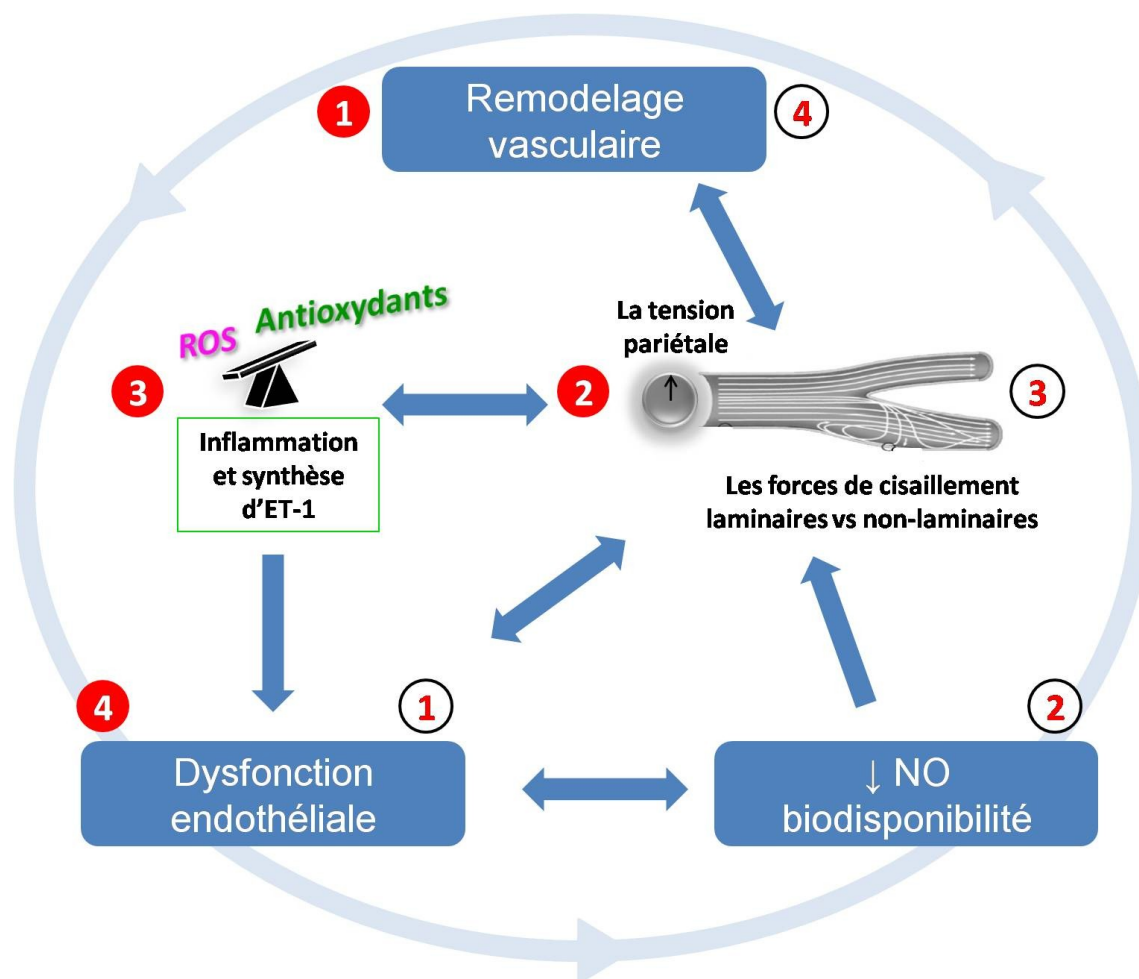


Figure 8 Schématisation du cercle vicieux entre la structure et la fonction endothéliale.

Les cercles pleins et clairs indiquent la séquence des évènements si le remodelage vasculaire ou la dysfonction endothéliale est l'évènement avant-coureur, respectivement.

En résumé, il est concevable que le remodelage et la dysfonction endothéliale évoluent ensemble, dans un cercle vicieux (Figure 8), sans nécessairement qu'un paramètre soit avant-coureur de l'autre. Un autre argument renforce le fondement de ce concept : l'association entre la fonction vasculaire et le remodelage des artères cérébrales est potentiellement très importante. En déterminant la capacité de dilatation maximale des artères cérébrales de résistance, la structure et la fonction endothéliale et le TM vont, par conséquent, influencer la capacité du cerveau à adapter son débit à la demande

métabolique neuronale et contrôler directement le DSC. Par exemple, chez l'humain la vasodilatation dépendante des NOS semble compter pour 20 % du DSC de base (White *et al.*, 1999). Toutefois, il n'est pas du tout clair dans quelle mesure le remodelage des artères cérébrales de résistance observé dans l'hypertension, par exemple, peut influencer la dérégulation du DSC indépendamment de la fonction vasculaire.

1.3. Les traitements susceptibles de protéger l'endothélium vasculaire cérébral

En se basant sur l'hypothèse selon laquelle l'endothélium vasculaire et la structure sont intimement liés, nous proposons qu'en protégeant l'intégrité de l'endothélium cérébral nous empêcherons le remodelage de la paroi et la dérégulation du DSC. Les principaux traitements cardioprotecteurs susceptibles de préserver la fonction endothéliale cérébrale, décrits dans la littérature, sont les chronotropes négatifs, les antioxydants, les statines et l'exercice physique.

1.3.1. Les chronotropes négatifs

1.3.1.1. La preuve de concept

Si l'on part du principe qu'à chaque battement cardiaque, le sang projeté dans les vaisseaux induit un stress mécanique sur la paroi (Thorin & Thorin-Trescases, 2009), c'est la couche directement en contact avec le sang, soit l'endothélium, qui subira le plus les conséquences de cette force. Comme avec l'âge, l'endothélium accumule les dommages et se fatigue, il est logique de penser qu'une baisse de la FC va freiner la dégénération endothéliale. Un simple calcul montre qu'une modeste réduction de la FC au repos de trois bpm sur 20 ans éviterait à l'endothélium de subir 31.5 millions d'impacts inutiles, soit l'équivalent approximatif du nombre d'impacts accumulés pendant un an à une FC au repos de 70 bpm. Dans le même ordre d'idée, une étude clinique rapporte qu'une réduction de la FC de 70 à 60 bpm au repos prolonge l'espérance de vie de 80 à 93.3 ans (Chatzizisis & Giannoglou, 2006). En plus du stress mécanique ressenti par l'endothélium, un deuxième mécanisme intervient : réduire la FC augmente le temps de perfusion diastolique, ce qui diminue la pulsatilité

et augmente la constance des valeurs de contraintes de cisaillement (Thorin & Thorin-Trescases, 2009). Sur un cycle cardiaque, un segment relativement rectiligne sera exposé à des contraintes «athéroprotectrices» variant entre 15 et 70 dynes/cm², alors que dans un segment à géométrie irrégulière, la pulsation sanguine génère des contraintes de cisaillement faibles (0-12 dynes/cm²) (Papaioannou *et al.*, 2006; Chatzizisis *et al.*, 2007). Or, les contraintes faibles induisent des événements biologiques aboutissant à une diminution de la production de NO, une augmentation de la perméabilité endothéliale aux lipoprotéines de basse densité (LDL), une augmentation de la production de ROS, une augmentation de l'inflammation, la migration et la prolifération des CMLV, l'induction des MMP *etc.* (Chatzizisis & Giannoglou, 2006; Thorin & Thorin-Trescases, 2009). D'après une modélisation numérique de la dynamique des fluides dans les artères coronaires, la perfusion systolique est associée à des contraintes de cisaillement faibles et oscillatoires puisque la compression myocardique entraîne un débit rétrograde (Giannoglou *et al.*, 2008). Pendant la diastole, les contraintes de cisaillement s'élèvent rapidement et atteignent des valeurs athéroprotectrices (Giannoglou *et al.*, 2008). Quand la FC au repos est basse, la diastole dure plus longtemps que la systole, ce qui permet de compenser l'environnement pro-athérogénique favorisé par la systole (Giannoglou *et al.*, 2008).

Une FC élevée est un facteur indépendant de risque CV, en prévention primaire ainsi que chez les individus hypertendus, coronariens et angineux (Custodis *et al.*, 2010), mais n'est pas encore reconnue comme un facteur prédictif pour l'AVC (Billeci *et al.*, 2009) ou les déficits cognitifs (Cacciatore *et al.*, 2007). Comme l'élévation de la FC cardiaque se traduit au niveau vasculaire par une fatigue endothéliale et une propension des contraintes de cisaillement faibles dans certaines régions vasculaires, elle contribue directement à la progression des maladies vasculaires dont l'athérosclérose (Custodis *et al.*, 2010). Une réduction de la FC par l'ablation du nœud sinusal chez des singes suivant une diète athérogénique ralentit le développement de la plaque dans la carotide (Beere *et al.*, 1992). Il est donc théoriquement fondé qu'un ralentissement de la FC puisse protéger l'intégrité endothéliale, mais en pratique, quel est l'impact des molécules chronotropes négatives chez des patients ou dans des modèles animaux de maladies CV ?

1.3.1.2. L'ivabradine

1.3.1.2.1. Les mécanismes d'action

L'ivabradine inhibe sélectivement les canaux responsables du courant *pacemaker* I_f localisés dans le nœud sinusal, siège du contrôle de la FC (Riccioni, 2009). Ce courant est surnommé *funny current*, d'où le f dans I_f , puisqu'il s'active lors de l'hyperpolarisation diastolique à partir d'un seuil de -50 mV (Mach, 2009). Le courant I_f déclenche la dépolarisation diastolique nécessaire à la génération spontanée d'un nouveau potentiel d'action induisant la contraction myocardique systolique. En bloquant l'entrée du Na^+ , l'ivabradine réduit la pente de la dépolarisation diastolique entre deux battements cardiaques sans effet sur la contractilité myocardique et la PA (Riccioni, 2009). Contrairement aux β -bloquants, l'ivabradine n'a pas d'effets inotropes négatifs et permet une adaptation à l'effort (Ferrari & Ceconi, 2011). L'ivabradine a été conçue et approuvée pour le traitement de l'angine stable en Europe (Procolaran®).

1.3.1.2.2. L'impact sur la fonction endothéliale

Une étude du laboratoire a démontré l'efficacité d'un traitement chronique pendant trois mois à l'ivabradine dans la prévention de la dysfonction endothéliale cérébrale et rénale chez des souris dyslipidémiques hApoB^{+/+} (Drouin *et al.*, 2008). Une réduction «pure» de la FC de 10 %, accompagnée d'une réduction de la pression ventriculaire diastolique et du temps de relaxation isovolumique, est suffisante pour améliorer l'efficacité des relaxations dépendantes de l'endothélium à ACh des artères rénales et cérébrales (Drouin *et al.*, 2008). De façon similaire, Custodis *et al.* ont démontré une meilleure relaxation dépendante de l'endothélium au carbachol de l'aorte et du corps caverneux chez des souris athérosclérotiques ApoE^{-/-} traitées à l'ivabradine (Custodis *et al.*, 2008; Baumhakel *et al.*, 2010). L'ivabradine prévient également la progression des lésions athérosclérotiques aortiques, diminue l'activité NADPH oxydase dans l'aorte et diminue l'accumulation de ROS dans l'aorte et dans le corps caverneux (Custodis *et al.*, 2008). L'ivabradine exerce ses bénéfices en réduisant spécifiquement la FC : en aigu ou à une dose qui ne réduit pas la FC, l'ivabradine n'a pas d'effet sur la fonction endothéliale, sur la phosphorylation de eNOS, sur l'activité

NADPH oxydase et sur la libération de ROS (Custodis *et al.*, 2008). Ceci suggère que l'ivabradine est dépourvue d'effets pléiotropiques, une affirmation pourtant remise en question par Heusch (Heusch, 2008). Chez le cochon, la protection des dommages relatifs à une ischémie/reperfusion (zone infracie) par un traitement préventif à l'ivabradine est complètement renversée par le *pacing* (Heusch *et al.*, 2008). Toutefois, si l'ivabradine est donnée pendant ou après l'ischémie, le *pacing* n'annule pas complètement la réduction de la taille de l'infarctus (Heusch *et al.*, 2008). Pour le moment, c'est la seule étude qui suggère que l'effet de l'ivabradine ne soit pas exclusif à son action sur la FC. Cependant, une lacune de cette étude est l'omission d'un groupe contrôle avec *pacing* seul. Pour cette raison, d'autres études s'avèrent nécessaires avant de proposer que l'ivabradine possède des effets pleiotropiques.

L'ensemble de ces données nous donne néanmoins de bonnes raisons de croire qu'un traitement chronique à l'ivabradine va préserver la fonction endothéliale cérébrale en maintenant des contraintes de cisaillement favorables à l'activité de la eNOS et en diminuant le stress mécanique sur les parois (Drouin *et al.*, 2008). À ce jour, les effets de l'ivabradine sur la régulation du DSC et l'apparition des déficits cognitifs n'ont jamais été testés.

1.3.1.3. Les antagonistes des récepteurs β -adrénergiques ou β -bloquants

1.3.1.3.1 Les mécanismes d'action

Cette classe de molécules antagonise l'action des catécholamines (noradrénaline et adrénaline) relâchées par le système sympathique sur les récepteurs β_1 et/ou β_2 -adrénergiques ($\beta_{1/2}$ -AR). Le premier β -bloquant ayant démontré une efficacité clinique, le propranolol, a été développé au début des années 1960, par Sir James Black, qui a reçu un prix Nobel pour sa découverte (Black *et al.*, 1964). Initialement développé pour apaiser les douleurs angineuses par leurs actions sur l'activité myocardique, les β -bloquants sont aussi indiqués pour traiter l'hypertension, les arythmies et la défaillance cardiaque (Baker *et al.*, 2011).

Via la relâche de noradrénaline par les nerfs sympathiques, une prédominance de β_1 -AR (80 %) localisés dans le nœud sinusal et sur les cardiomyocytes contrôle la chronotropie et l'inotropie, respectivement (Rockman *et al.*, 2002; Katzung, 2004). Les β -bloquants empêchent l'ouverture des canaux sodiques (Na^+) responsables du courant *pacemaker* sur le nœud sinusal et l'ouverture des canaux Ca^{2+} de type L sur les cardiomyocytes responsables de l'augmentation intracellulaire de Ca^{2+} (Rockman *et al.*, 2002). Outre leurs effets prédominants sur le cœur, les β -bloquants peuvent baisser la PA en empêchant la libération de rénine activée par les β_1 -AR sur le rein et peuvent augmenter la résistance vasculaire en s'opposant à la vasodilatation induite par les catécholamines via les β_2 -AR sur les CMLV (hyperpolarisation) (Katzung, 2004). Soulignons l'existence sur les cellules adipeuses de récepteurs β_3 -AR responsables de la lipolyse, mais pour lesquels les β -bloquants ont peu d'affinité (Baker *et al.*, 2011). La première génération de β -bloquants, dont fait partie le propranolol, est non-sélective, donc possède une affinité pour les β_1 et β_2 -AR. La seconde génération est plus ou moins sélective pour β_1 -AR (métoprolol, aténolol) et la troisième génération possède des propriétés vasodilatatrices additionnelles (l'action antioxydante du nébivolol prévient la déactivation du NO par le O_2^- et le carvedilol antagonise la vasocontraction induite par les récepteurs α_1 -adrénergiques) (Wojciechowski & Papademetriou, 2008). D'autres β -bloquants (pindolol, acébutol) ont une activité sympatholytique : ce sont des agonistes partiels qui activent modérément les récepteurs tout en prévenant la liaison de l'agoniste endogène (Baker *et al.*, 2011).

1.3.1.3.2 L'impact sur la fonction endothéliale

Malgré leur capacité à réduire la FC et la PA, l'efficacité de certains β -bloquants dans le traitement de l'hypertension est limitée, voire défavorable. En effet, d'après une méta-analyse regroupant 17 671 patients traités pour l'hypertension et répartis dans cinq études, l'aténolol augmenterait significativement la mortalité cardiovasculaire de 16 % et la fréquence des AVC de 30 % comparativement à un autre traitement antihypertenseur (Aronow, 2010). De plus, l'aténolol augmenterait de 22 % le risque de développer un diabète de type II chez des patients hypertendus âgés (Aronow, 2010). Une augmentation de la résistance systémique, une diminution du débit cardiaque et des

effets métaboliques adverses, tels qu'une augmentation des triglycérides, une baisse de la sensibilité à l'insuline et une prise de poids, pourraient justifier l'efficacité sous-optimale de certains β -bloquants (aténolol, métoprolol, propranolol) dans le traitement de l'hypertension (Warmack *et al.*, 2009). Les effets délétères des β -bloquants pourraient aussi s'expliquer par une dysfonction endothéliale découlant directement de l'inhibition des récepteurs β localisés sur l'endothélium (Thorin & Thorin-Trescases, 2009). Les cellules endothéliales possèdent en effet des récepteurs adrénergiques (β_1 , β_2 et β_3) couplés à l'activation de la cascade vasodilatatrice NO/GMPc par les catécholamines circulantes (Ciccarelli *et al.*, 2007; Kou & Michel, 2007; Figueroa *et al.*, 2009). Le rôle protecteur des β -AR endothéliaux sur l'endothélium cérébral reste à démontrer, mais serait en accord avec l'hypothèse d'une association entre l'intégrité endothéliale et la fonction cérébrale et expliquerait les effets délétères des β -bloquants.

D'après des résultats du laboratoire, un traitement chronique au métoprolol qui diminue la FC de 10 %, ne prévient pas la dysfonction endothéliale cérébrale des souris exprimant l'ApoB humaine (hApoB^{+/+} : modèle de dyslipidémie modérée avec une augmentation de 150 % des lipides circulants) comparativement à un agent chronotrope négatif non- β -bloquant (ivabradine), et ce pour une même réduction de la FC (Drouin *et al.*, 2008). Une autre étude relate l'association possible entre les thérapies β -bloquantes et la dégradation de la fonction érectile qui est dépendante de la synthèse de NO (Baumhake *et al.*, 2008). Chez des souris athérosclérotiques ApoE^{-/-} soumises à une diète riche en gras, le métoprolol n'améliore pas la relaxation dépendante de l'endothélium du corps caverneux contrairement au nébivolol, un β -bloquant vasodilatateur (Baumhake *et al.*, 2008).

Les catécholamines circulantes agissent comme des facteurs de survie pour les cellules endothéliales en stimulant la synthèse de NO (Figueroa *et al.*, 2009), ce qui concorde avec l'inefficacité des antagonistes des $\beta_{1/2}$ -AR dans les modèles animaux de dysfonction endothéliale. Ceci pourrait aussi expliquer, en partie, l'utilisation préjudiciable de certains β_1 -bloquants (aténolol, métoprolol, propranolol) pour le traitement de l'hypertension.

Comme rien n'est jamais tout blanc ou tout noir, certaines études, dont une du laboratoire, rapportent au contraire des effets bénéfiques du métoprolol sur la fonction endothéliale de l'artère rénale (Drouin *et al.*, 2008) et de l'aorte (Funovic *et al.*, 2008). Afin d'expliquer ces discordances, on pourrait imaginer que la localisation et l'abondance des récepteurs β endothéliaux à travers le lit vasculaire dicteraient leur impact sur la fonction endothéliale. Ainsi, l'artère rénale, par exemple, exprime peut-être moins de récepteurs β endothéliaux. Cette hypothèse est plausible puisque la surexpression du β_2 -AR sur l'endothélium après l'injection d'un adénovirus dans la lumière de la carotide est suffisante pour corriger la dysfonction endothéliale carotidienne chez des rats SHR et améliorer la relaxation dépendante de l'endothélium chez les WKY (Iaccarino *et al.*, 2002).

En résumé, une baisse «pure» de la FC est bénéfique pour la fonction endothéliale cérébrale, périphérique et centrale puisqu'elle stabilise les contraintes de cisaillement et diminue le stress mécanique sur les parois artérielles. Malgré cela, il n'a pas encore été démontré que les bénéfices d'une baisse de la FC s'étendent jusqu'à la prévention des désordres cognitifs. De plus, si la baisse de la FC s'accompagne d'une perte de la sensibilité aux vasodilatations induites par les catécholamines circulantes, les bénéfices sont abolis. Les résultats négatifs obtenus en clinique avec les β -bloquants sélectifs pour les β_1 -AR justifient la création de nouveaux β -bloquants vasodilatateurs (nébivolol et carvedilol) qui modulent la fonction endothéliale. Au niveau cérébral, cela se traduit par une protection de la fonction cognitive (Kumar *et al.*, 2011) et une prévention des dommages cérébraux engendrés par une attaque oxydante (Savitz *et al.*, 2000; Uzar *et al.*, 2011).

Afin de bien mettre en valeur l'importance de la FC comme facteur de risque CV, une brève incursion en biologie animale et en anthropologie s'impose. Chez les mammifères, l'espérance de vie est corrélée négativement avec la FC et positivement avec le poids corporel : les petits animaux ont une FC plus élevée et une espérance de vie est courte (Cook *et al.*, 2006). Par exemple, la tortue géante des îles Galápagos peut vivre jusqu'à 180 ans avec une FC de 6 bpm, tandis que le daphnie, un petit crustacé, vit 30 jours à une FC moyenne de 300 bpm (Levine, 1997). L'humain moderne fait

exception à cette règle : d'après sa FC (≈ 70 bpm), il aurait la même espérance de vie que la girafe ou le tigre, soit un peu plus de 20 ans, alors qu'en réalité, elle est de 80 ans (Levine, 1997). L'humain se distingue du reste du règne Animal puisqu'il a développé des moyens lui permettant de modifier son environnement et de combattre les pathologies afin de repousser les frontières quant à son espérance de vie. Une citation de Ludwig Boltzmann (1966) explique la relation inverse entre la FC et l'espérance de vie chez les animaux : «*the fundamental object of contention in the life struggle, in evolution of the organic world, is available energy*» (Levine, 1997). C'est-à-dire que la faiblesse du ratio entre la surface corporelle et le poids corporel prédit une meilleure conservation de la chaleur, un métabolisme moins actif et une demande cardiaque moins exigeante (Levine, 1997). Autrement dit, la FC est un marqueur de la demande métabolique cellulaire (Cook *et al.*, 2006). Cette éloquente démonstration additionnée de l'usage étendu des thérapies bradycardisantes dans le traitement des maladies CV appuient l'importance de la FC.

1.3.2. Les antioxydants polyphénols

1.3.2.1. La preuve de concept

Par définition, un antioxydant est une substance qui, lorsque présente en concentration suffisante par rapport aux substrats oxydables, retarde significativement ou prévient l'oxydation des dits substrats (Halliwell & Gutteridge, 2007). Il est bien connu que le stress oxydant joue un rôle initiateur dans la progression de plusieurs pathologies associées au vieillissement, tel le cancer (Baur & Sinclair, 2006), les maladies CV (Pashkow, 2011), les maladies cérébrovasculaires (Chrissobolis & Faraci, 2008) et les maladies neurodégénératives (Halliwell, 2001). Avec le temps, l'équilibre environnemental *redox* se déplace progressivement vers un état pro-oxydatif et les cellules perdent leur habileté à combattre les attaques radicalaires (Halliwell & Gutteridge, 2007). Par conséquent, l'accumulation des ROS conduit inexorablement à des dommages à l'ADN et aux macromolécules (lipides et protéines) (Halliwell & Gutteridge, 2007), à l'hyperplasie des CMLV (Niu *et al.*, 2010), à l'atténuation de la vasodilatation dépendante du NO (Jiang *et al.*, 2003), à l'oxydation des lipoprotéines

circulantes (Steinberg & Witztum, 2002), à l'activation des MMP (Zalba *et al.*, 2007), *etc.* J'ajoute que ce processus est accéléré par la présence de facteurs de risque CV.

Logiquement, un antioxydant, quoique ce soit loin d'être si simple, devrait renverser le processus ou, du moins, freiner les détériorations fonctionnelles moléculaires, cellulaires et tissulaires causées par le stress oxydant. Conformément, l'efficacité d'un traitement antioxydant contre la dysfonction vasculaire cérébrale et périphérique a été corroborée à maintes reprises dans différents modèles expérimentaux (Chyu *et al.*, 2004; Gendron *et al.*, 2010; Loke *et al.*, 2010; Xie *et al.*, 2011). En général, les bénéfices des antioxydants testés chez l'humain ne sont pas si évidents mais le dosage, le choix du composé et l'initiation du traitement à un stade pathologique trop avancé pourraient justifier l'échec clinique des antioxydants (β -carotène, vitamine C et E) en clinique (Steinberg & Witztum, 2002; Pashkow, 2011). En revanche, vers la fin des années 1990, quelques études cliniques ont rapporté des résultats fortement encourageants dans l'athérosclérose, dans l'infarctus du myocarde et dans la resténose (Pashkow, 2011). Mais en quoi ces études différent-elles? La combinaison d'antioxydants (vitamine A, C, E, β -carotène ou probucol) permet de profiter des interactions moléculaires entre les antioxydants, combler les carences vitaminiques des patients et empêche l'effet d'entraînement : la disponibilité insuffisante d'un antioxydant diminue la bioactivité des autres antioxydants (Singh *et al.*, 1996). Il y a aussi les antioxydants de type polyphénol, auxquels est associé le *green tea effect*, qui fait référence à leurs propriétés miraculeuses. Ceci a une importance extrême sur la santé publique puisque le thé (noir et vert) est le deuxième breuvage le plus populaire au monde, le premier étant l'eau (Peters *et al.*, 2001). Trois tasses de thé par jour réduisent l'incidence de l'infarctus du myocarde de 11 % (Peters *et al.*, 2001) et celle de l'AVC de 21 % (Arab *et al.*, 2009) en comparaison avec les individus qui consomment moins d'une tasse de thé par jour. De plus, la prévalence des déficits cognitifs diminuent inversement avec la consommation de thé vert (Kuriyama *et al.*, 2006). En quoi les polyphénols sont-ils si spéciaux ?

1.3.2.2. Les mécanismes d'action

Les polyphénols, tels que les catéchines, le resvératrol et la quercétine, sont des antioxydants naturels retrouvés dans le vin rouge, le thé vert (*Camellia sinensis*), les fruits (la pomme grenade et les bleuets), les légumes (le piment fort et le brocoli), le chocolat noir *etc.* (Stoclet *et al.*, 2004; Baur & Sinclair, 2006). Initialement considérés comme de simples *quencher*s ou *scavenger*s de ROS (Stoclet *et al.*, 2004), l'effet des polyphénols outrepassa largement leur action antioxydante à proprement dit. Ils sont antiangiogéniques, antiprolifératifs, antihyperplasiques, inhibiteurs des MMP, anti-inflammatoires, antiplaquettaires, vasodilatateurs, antihypertenseurs et ils améliorent le profil lipidique (Garbisa *et al.*, 2001; Stoclet *et al.*, 2004; Baur & Sinclair, 2006; Babu & Liu, 2008). Par ces propriétés bénéfiques, l'utilisation des polyphénols en clinique réduit l'incidence de l'athérosclérose coronaire, du cancer du poumon, de l'AVC et de l'asthme (Arts & Hollman, 2005). Les polyphénols traversent la BBB, ce qui contribue à leur pouvoir neuroprotecteur (Xu *et al.*, 2010). Par exemple, en état d'hypoperfusion chronique, l'extrait de thé vert permet d'accroître les capacités antioxydantes et de diminuer la peroxydation lipidique ainsi que les dommages à l'ADN au niveau du cortex et de l'hippocampe (Xu *et al.*, 2010).

1.3.2.3. L'impact sur la fonction endothéliale

De façon générale, deux mécanismes distincts peuvent expliquer l'effet vasodilatateur direct des polyphénols (Figure 9) : l'activation dose-dépendante rapide et soutenue de la voie PI3K/AKT qui phosphoryle la eNOS sur la sérine 1197 indépendamment du Ca^{2+} intracellulaire (Lorenz *et al.*, 2004) et l'activation de la eNOS en réponse à l'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire par l'intermédiaire du complexe Ca^{2+} -CaM (Stoclet *et al.*, 2004). L'effet vasodilatateur et vasculoprotecteur des polyphénols est potentialisé par l'amplification de l'efficacité des antioxydants endogènes, comme la catalase (Negishi *et al.*, 2004), l'inhibition des enzymes pro-oxydantes (NADPH oxydase) (Gendron *et al.*, 2010) et par la dismutation des ROS environnants (Loke *et al.*, 2010).

Au niveau cérébrovasculaire, le resvératrol restaure la dilatation dépendante de la eNOS et de la nNOS des artérioles piales des rats diabétiques (Arrick *et al.*, 2011). Dans notre modèle de souris athérosclérotiques, un traitement chronique à la (+)-catéchine protège la fonction endothéliale cérébrale, augmente le DSC en réponse à une stimulation des moustaches et améliore la fonction cognitive (Drouin *et al.*, 2011a). De plus, l'expression protéique de la eNOS dans un homogénat de cerveau de rat est augmentée par un traitement chronique au polyphénol (-)-épigallocatechine gallate (ECGC) (Sutherland *et al.*, 2005). Dans un modèle d'hypoperfusion cérébrale chronique (le 2-VO chez le rat), l'extrait de thé vert atténue la perte des habiletés spatiales d'apprentissage et de mémorisation (Xu *et al.*, 2010).

Bien plus que de simples antioxydants, les polyphénols ont donc des vertus vasculoprotectrices remarquables. Ils revitalisent la fonction endothéliale et favorisent l'équilibre vasoactif vers l'état pro-vasodilatateur en modulant l'activité de la eNOS, en activant la synthèse de PGI₂ et en inhibant la synthèse de l'ET-1 (Figure 9) (Stoclet *et al.*, 2004). De plus, ils représentent un intérêt réel pour l'homme puisqu'ils s'incorporent facilement dans l'alimentation. Ainsi, il n'est pas surprenant que de plus en plus d'études portent sur ce sujet «à la mode». Nonobstant, les propriétés des polyphénols ne datent pas d'hier, bien avant la révélation du *french paradox* correspondant à une incidence faible des maladies CV chez les français, malgré une diète riche en lipides (beurre et fromage), liée à l'habitude de boire du vin rouge lors des repas (Renaud & de Lorgeril, 1992), la Chine ancienne considérait le thé comme un remède pour tous les maux (Harima *et al.*, 2008). Selon la légende, en 2737 avant J-C, un empereur chinois découvrit un élixir qui lui aurait rendu la santé, lorsque des feuilles se détachèrent d'un théier pour tomber dans son eau bouillante... (Edea, 2005).

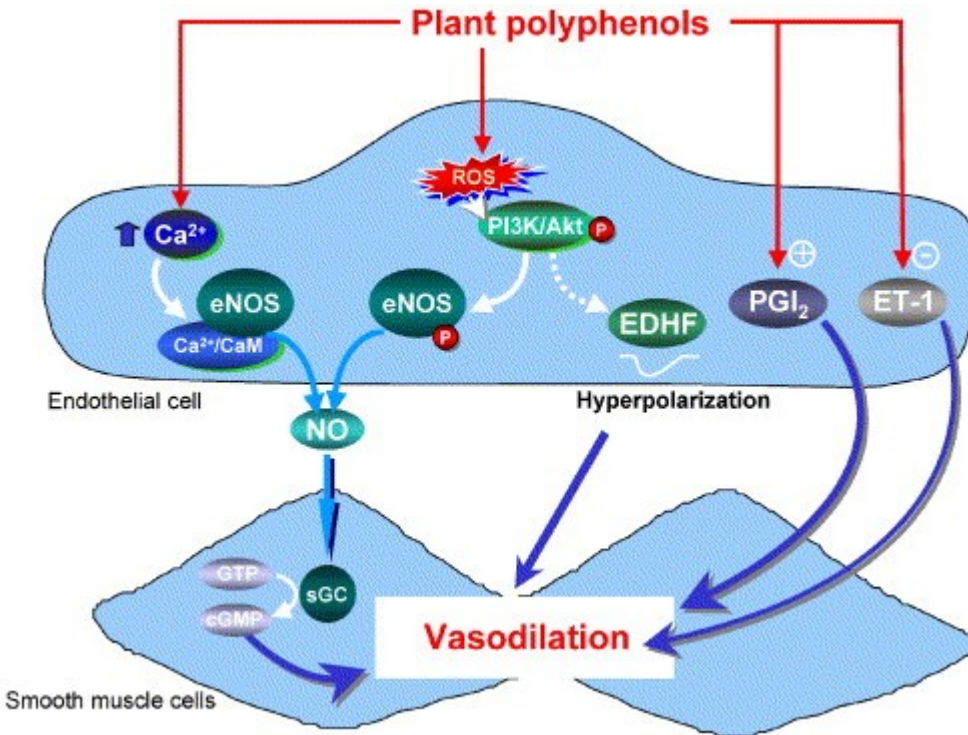


Figure 9 Schématisation des effets directs des polyphénols sur les cellules endothéliales conduisant à la vasodilatation des CMVL.

NO : monoxyde d'azote, eNOS : NO synthétase endothéliale, ROS : substances oxygénées réactives, CaM : calmoduline, GTP : guanosine triphosphate, cGMP : guanosine monophosphate cyclique, sGC : guanylate cyclase soluble, P : phosphorylation, PI3K : phosphatidylinositol 3-kinase, EDHF : facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium, PGI_2 : prostacycline, ET-1 : endothéline-1.

Réimprimé de [European Journal of Pharmacology](#), 500, Jean-Claude Stoclet, Thierry Chataigneau, Mamadou Ndiaye, Min-Ho Oak, Jasser El Bedoui, Marta Chataigneau, Valérie B. Schini-Kerth, Vascular protection by dietary polyphenols, 299-313, Copyright (2004), avec la permission de Elsevier.

1.3.3. Les statines

1.3.3.1. La preuve de concept

Les patients ayant de hauts taux de cholestérol LDL sont traités avec des inhibiteurs de l'HMG-CoA réductase (statines) afin de réduire et prévenir la formation de lésions athérosclérotiques surtout au niveau des artères coronaires (Laufs, 2003; Katzung, 2004). L'HMG-CoA est le précurseur immédiat du mévalonate, une molécule cruciale pour la synthèse endogène du cholestérol (Katzung, 2004). La dysfonction endothéliale fait partie des processus impliqués dans la pathogénèse de l'athérosclérose (Laufs, 2003). Or, les statines sont aussi reconnues pour augmenter la production de NO par l'entremise, ou non, de la réduction du taux de cholestérol (Endres *et al.*, 2004). En plus de retarder l'athérosclérose, les statines sont antithrombotiques et améliorent la viscosité sanguine (Sotiriou & Cheng, 2000), ce qui réduit l'incidence des thromboembolies cérébrales (l'AVC ischémique) causées par des détachements de la plaque en amont (Vaughan & Delanty, 1999). De plus, les statines réduisent la taille de la zone infarctée dans les modèles expérimentaux d'ischémie/reperfusion cérébrale en préservant le DSC et en limitant la mort neuronale (Endres *et al.*, 1998; Vaughan & Delanty, 1999). Cette neuroprotection face aux dommages ischémiques est surtout attribuée aux effets pléiotropiques des statines, tels qu'une modulation directe de la eNOS (Endres *et al.*, 1998), une action antioxydante et une diminution de la production d'isoprénoïdes qui modulent des mécanismes inflammatoires (protéines G des leucocytes, adhésion cellulaire et prolifération cellulaire) (Vaughan & Delanty, 1999). Les statines pourraient peut-être prévenir l'apparition de l'Alzheimer et de la démence chez des sujets âgés, mais les études cliniques du moment sont inconsistantes : certaines rapportent des bénéfices modestes (Bettermann *et al.*, 2011) tandis d'autres ne démontrent pas d'effet sur la cognition (McGuinness *et al.*, 2009; Bettermann *et al.*, 2011).

1.3.3.2. Les mécanismes d'action

De façon très concise, les statines inhibent la régulation négative de l'expression génique de la eNOS en diminuant l'oxydation des LDL et l'expression de la cavéoline-1 (Laufs, 2003). En inhibant la synthèse du mévalonate, les statines inhibent la

formation des isoprénoïdes, un produit intermédiaire de la synthèse du cholestérol qui module l'activité GTPases des petites protéines G en ajoutant des modifications *post*-traductionnelles (Laufs, 2003). Par exemple, l'isoprénylation de la RhoA GTPase déstabilise l'ARNm de la eNOS (Laufs, 2003). De plus, les statines activent la phosphorylation de eNOS par AKT et diminuent la production de O_2^- par la NADPH oxydase (Laufs, 2003). *In vitro*, la lovastatine inhibe l'oxydation des LDL par des leucocytes activés en augmentant l'activité superoxyde dismutase des leucocytes (Chen *et al.*, 1997).

1.3.3.3. L'impact sur la fonction endothéliale

Chez des singes nourris avec une diète hyperlipidique jusqu'à l'âge de deux ans, suivie d'une diète hypolipidique combinée ou non à la pravastatine jusqu'à l'âge de quatre ans, seules les artères coronaires des singes traités avec la statine dilatent à l'Ach (10 % de dilatation *versus* -5 % de contraction chez les singes non-traités) (Williams *et al.*, 1998). Cet effet est indépendant des concentrations plasmatiques de lipoprotéines et de cholestérol total ou d'un effet sur la taille de la plaque (Williams *et al.*, 1998). Chez des sujets n'ayant jamais été traités pour leur taux de cholestérol élevé (6.2 à 7.5 mmol/L), quatre semaines de traitement à la simvastatine augmentent la dilatation basale et stimulée dépendante de la eNOS dans l'artère brachiale (O'Driscoll *et al.*, 1997).

Au niveau cérébral, la réactivité de la MCA à la L-arginine mesurée par Doppler transcranial (un indicateur de la fonction endothéliale cérébrale) est améliorée après trois mois de traitement à l'atorvastatine chez des patients avec une hypertension contrôlée et des taux de lipides plasmatiques normaux (Pretnar-Oblak *et al.*, 2008). Similairement, chez des souris normocholestérolémiques, la simvastatine augmente l'expression génique de la eNOS cérébral, augmente le DSC 30 min *post*-ischémie et prévient les dommages associés à l'ischémie. Ces bénéfices de la simvastatine dans l'ischémie/reperfusion sont absents chez des souris eNOS^{-/-} (Endres *et al.*, 1998). Ces études suggèrent fortement que les statines sont neuroprotectrices, principalement *via* leur action indépendante du cholestérol sur l'activité de la eNOS.

1.3.4. L'exercice physique

1.3.4.1. La preuve de concept

L'essor technologique des années 1990 a contribué à instaurer un style de vie sédentaire et a restreint nos opportunités de solliciter notre «mental» et notre «physique» (Vaynman & Gomez-Pinilla, 2006). Ce qui était censé nous simplifier la vie au départ, menace au final considérablement notre qualité de vie une fois âgé. Dans les sociétés industrialisées, la sédentarité augmente la prévalence de l'obésité, du diabète de type II, de l'hypertension et des maladies cardiovasculaires (Vaynman & Gomez-Pinilla, 2006; Widlansky, 2010). Comme le fonctionnement du cerveau est relatif à la capacité cardiovasculaire du corps à le perfuser, le style de vie à l'américaine (sédentarité et la mauvaise alimentation) a aussi des répercussions défavorables sur les fonctions cognitives. À l'appui, l'indice de masse corporelle est négativement corrélé avec les performances cognitives chez les adultes (Mirowsky, 2011). Conceptuellement, le phénomène inverse, c'est-à-dire une bonne santé cardiovasculaire devrait préserver la santé mentale, tel que proposé par la fameuse citation ancienne : «un esprit sain dans un corps sain» (traduit du latin *mens sana in corpore sano*, Juvénal, Satires, livre V).

Inévitablement, l'exercice physique est une mesure préventive très populaire dans la lutte contre les maladies cardiovasculaires, la maladie d'Alzheimer et le déclin cognitif associé au vieillissement (Colcombe & Kramer, 2003; Heyn *et al.*, 2004; Lange-Asschenfeldt & Kojda, 2008). Selon la vaste majorité d'études sur le sujet, l'exercice physique serait le *gold standard* pour le «traitement» des maladies coronaires, du diabète, du vieillissement, du tabagisme, de l'hypertension, de la ménopause, du syndrome métabolique, de l'obésité et de l'AVC (Bronner *et al.*, 1995; Asikainen *et al.*, 2004; Anton *et al.*, 2006; Yung *et al.*, 2009). Néanmoins, même si les patients ne sortent jamais du bureau du médecin avec une «prescription» pour l'exercice physique en main, de plus en plus de centres hospitaliers mettent en place des programmes d'exercice physique pour la réhabilitation *post*-infarctus (Taylor *et al.*, 2004; Yung *et al.*, 2009) et préventif dont le centre ÉPIC de l'Institut de Cardiologie de Montréal qui prend en charges des individus obèses sans antécédent cardiovasculaire.

1.3.4.2. Les mécanismes d'action

Bien que l'exercice physique soit associé à une baisse de la FC au repos chez l'humain, il se distingue des traitements pharmacologiques : le tonus vagal augmente de pair avec une baisse de l'activité parasymphatique (Asikainen *et al.*, 2004; De Angelis *et al.*, 2004; Fujimoto *et al.*, 2010). L'augmentation de la sensibilité du baroréflexe (De Angelis *et al.*, 2004) et une facilitation de la relâche d'ACh par les ganglions cholinergiques (Danson & Paterson, 2003) pourraient expliquer les changements au niveau de la modulation du système nerveux autonome *post-exercice*. Exclusivement chez les athlètes, l'hypertrophie ventriculaire gauche diminue la FC en augmentant le volume d'éjection (Hall, 2006).

Les vertus de l'exercice s'étendent bien au-delà d'une diminution de la FC : il est associé à une augmentation de la biodisponibilité du NO (Figure 10) (Hambrecht *et al.*, 2003), à une augmentation des défenses antioxydantes (Figure 10) (Napoli *et al.*, 2004) et à une diminution de l'inflammation (Ribeiro *et al.*, 2009).

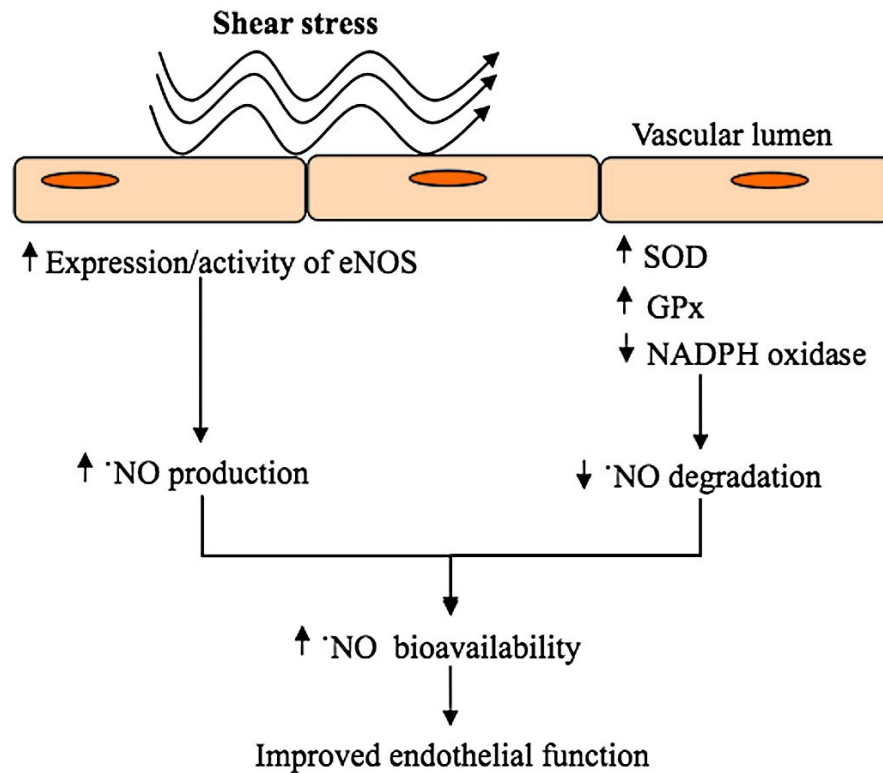


Figure 10 Schématisation des principaux mécanismes impliqués dans la protection de la fonction endothéliale associée à l'exercice physique.

Les contraintes de cisaillement stimulent l'augmentation de l'activité et de l'expression de la eNOS, l'augmentation de l'expression des enzymes antioxydantes (la superoxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase (GPx)) et la diminution de l'activité de la NADPH oxydase. Ainsi, l'exercice physique augmente la biodisponibilité du NO en augmentant sa production et en empêchant sa dégradation par le O_2^- .

Réimprimé de [International Journal of Cardiology](#), 141/3, Fernando Ribeiro, Alberto Jorge, José Alberto Duarte, José Oliveira, Is exercise training an effective therapy targeting endothelial dysfunction and vascular wall inflammation?, 215-21, Copyright (2009), avec la permission de Elsevier.

Lors des périodes d'activité physique, l'augmentation du débit cardiaque, concomitante avec la demande métabolique musculaire (Koller *et al.*, 1995), se traduit par l'exposition soutenue des cellules endothéliales à des contraintes de cisaillement physiologiques, ce qui stimule la libération du NO (Figure 10) et de la PGI_2 , tout en inhibant celle de l'ET-1 (Niebauer & Cooke, 1996). À long terme, une exposition

régulière à des contraintes de cisaillement laminaires et plus élevées module à la hausse l'expression génique de la eNOS (Noris *et al.*, 1995). De plus, l'exercice physique augmente le taux circulant de cellules progénitrices endothéliales, ce qui permettrait de réparer l'endothélium endommagé (Laufs *et al.*, 2004). L'effet hormétique fait aussi partie des bénéfices associés à l'exercice physique (Goto *et al.*, 2007). Afin de résumer grossièrement l'hormesis, on peut faire un parallèle avec la célèbre citation du philosophe et poète allemand Friedrich Wilhelm Nietzsche : *What does not destroy me, makes me stronger* (Twilight of the idols, 1888). Ainsi, selon la théorie de l'hormesis, l'exposition à un stress stimule des mécanismes d'adaptation pour mieux résister à des stress ultérieurs. L'excès de ROS mitochondriaux découlant de la consommation accrue d'O₂ pendant l'exercice physique renforcerait les mécanismes antioxydatifs, tels que la recrudescence de l'expression des enzymes antioxydantes (Goto *et al.*, 2007). Il est intéressant de noter que l'effet hormétique s'étend au-delà des tissus musculaires : dans certaines régions du cerveau, l'activité enzymatique de la superoxyde dismutase augmente en réponse aux ROS après 7.5 semaines d'exercice physique (Somani *et al.*, 1995).

1.3.4.3. L'impact sur la fonction endothéliale

Le rôle salubre de l'exercice physique sur la fonction endothéliale a été rapporté de nombreuses fois, dans plusieurs lits vasculaires, chez l'humain et dans des modèles expérimentaux de maladies CV.

L'exercice physique volontaire modéré restaure une dilatation normale induite par l'ACh dans l'artère brachiale chez des sujets sains âgés et chez des jeunes sédentaires (DeSouza *et al.*, 2000). Chez des patients coronariens ayant subi un pontage aorto-coronarien, quatre semaines d'entraînement avant la chirurgie suffisent pour doubler l'expression protéique de la eNOS dans l'artère mammaire et quadrupler sa phosphorylation, ce qui résulte en une augmentation de la dilatation dépendante de l'endothélium (Hambrecht *et al.*, 2003).

Dans des modèles animaux de vieillissement, de diabète et d'hypercholestérolémie, l'exercice physique renverse la dysfonction endothéliale des artères centrales et

périphériques (les coronaires, l'aorte et les carotides) grâce à une combinaison des effets suivants : augmentation de l'activité des enzymes antioxydantes (la superoxyde dismutase, la catalase, la glutathione peroxydase), inhibition de l'activité de la NADPH oxydase, augmentation de l'activation et/ou de l'expression de la eNOS au niveau du vaisseau même (Figure 10) et/ou du tissu environnant (Napoli et al., 2004; Moien-Afshari et al., 2008; Durrant et al., 2009).

Au niveau cérébral, l'exercice physique enrayer les effets néfastes associés à la nicotine chez la souris, soit la détérioration de la dilatation dépendante de la eNOS des PCA, l'accumulation des ROS dans le cortex et la baisse de l'expression protéique de la superoxyde dismutase dans les microvaisseaux cérébraux (Mayhan et al., 2010). Les mêmes effets cérébroprotecteurs de l'exercice physique ont aussi été rapportés chez les rats diabétiques de type I (Mayhan et al., 2011). De plus, l'aire de la zone infarctée et les déficits neurologiques sensori-moteurs associée à l'ischémie/reperfusion cérébrale sont minimisés si les souris ont préalablement accompli trois semaines d'exercice physique volontaire, puisque le DSC absolu augmente au cortex (Endres et al., 2003). Toutefois, l'effet neuroprotecteur de l'exercice physique est absent chez les souris eNOS^{-/-} (Endres et al., 2003), suggérant que l'activité de la eNOS joue un rôle capital dans la protection cérébrovasculaire associée à l'exercice physique.

Il y a pléthore d'études qui prouvent que l'effet vasculoprotecteur de l'exercice physique s'étend bien au-delà des artères qui nourrissent les muscles sollicités. Le succès prolifique de l'exercice physique dans la réduction de la mortalité et de la morbidité cardiovasculaire et dans la prévention des maladies CV et cérébrovasculaires (Niebauer & Cooke, 1996), repose principalement sur une bonification des défenses antioxydantes et de la relâche de NO. On peut aussi ajouter la diminution de la FC, du pourcentage de gras corporel, de la résistance à l'insuline, de la PA, des taux de lipides circulants et des molécules inflammatoires à la liste exhaustive des bénéfices associés à l'exercice physique (Giannoglou et al., 2008; Leung et al., 2008; Ribeiro et al., 2009).

Pour terminer, dans des modèles animaux de maladies CV présentant une dysfonction endothéliale cérébrale prématurée et possiblement un remodelage cérébral, tel que notre souris athérosclérotique LDLr^{-/-}; hApoB-100^{+/+}, l'utilisation de chronotropes négatifs,

de statines, d'antioxydants polyphénols ou de l'exercice physique permettrait de mieux comprendre si la structure et la mécanique cérébrovasculaire sont interdépendantes de l'intégrité de l'endothélium.

Pour conclure cette section, revoyons les principaux messages à retenir : les anomalies cérébrovasculaires associées à des pathologies ou des facteurs de risque CV, telles qu'une dysfonction endothéliale et un remodelage de la paroi, impactent sur la régulation du DSC et conduisent à l'apparition de déficits cognitifs. Bien que la perte de fonction endothéliale corrèle souvent avec un remodelage de la paroi, nous voulons confirmer l'existence, ou non, d'un lien de causalité entre ces deux événements au niveau cérébrovasculaire. Afin de répondre à ce paradigme, l'approche qui nous paraît la plus logique est de caractériser l'impact d'un traitement qui protège l'endothélium cérébral, tel que l'ivabradine, l'antioxydant polyphénol ou l'exercice physique, chez la souris athérosclérotique utilisée au laboratoire. En se basant sur la littérature et les études publiées du laboratoire, nous posons l'hypothèse que la dysfonction endothéliale cérébrale et le remodelage de la paroi des artères cérébrales se manifestent de concert dans le contexte de l'athérosclérose.

La démarche et les objectifs

2. La démarche et les objectifs des études

2.1. Mise en contexte

Avec l'âge et les facteurs de risque CV, la structure, la mécanique et la fonction des artères évoluent vers un état délétère caractérisé par un remodelage de la paroi et une dysfonction endothéliale. Dans les artères cérébrales, ceci se traduit généralement par un changement de compliance, une hypertrophie de la paroi et une perte des fonctions vasodilatatrices dépendantes de l'endothélium. La compliance des artères cérébrales se comporte à l'opposé de celle des artères périphériques et centrales : le consensus général suggère une augmentation paradoxale de l'élasticité de la paroi des artères et artérioles cérébrales de petit calibre tandis que les artères périphériques et centrales deviennent moins compliantes. L'association entre la rigidité artérielle et la dysfonction endothéliale semble bien établie pour les artères périphériques (Tounian *et al.*, 2001; Nigam *et al.*, 2003; McEniery *et al.*, 2006; Takumi *et al.*, 2010), mais pas pour les artères cérébrales. Nous proposons qu'au niveau cérébral, l'interdépendance entre le remodelage et la fonction endothéliale existe aussi. Afin de tester cette hypothèse nous devons en premier lieu sélectionner un modèle de maladie CV avec une dysfonction endothéliale cérébrale sévère et confirmer l'existence d'un remodelage au niveau des artères cérébrales. Ensuite, nous devons évaluer dans quelle mesure des interventions thérapeutiques qui protègent ou pas l'endothélium cérébrovasculaire vont parallèlement façonner le remodelage de la paroi des artères cérébrales. L'impact de ces interventions sur le DSC doit finalement aussi être évalué.

Nous avons sélectionné un modèle murin d'athérosclérose humaine : la souris LDLr^{-/-} ; hApoB-100^{+/+}, surnommée souris ATX (Gendron *et al.*, 2010). La plaque se développe initialement près du cœur et progresse vers les artères périphériques avant d'atteindre les artères du cerveau (Napoli *et al.*, 1999). Chez les souris ATX, les carotides sont gravement obstruées à l'âge de six mois, mais les artères cérébrales de résistance directement en aval sont dépourvues de plaque. En raison de leur responsabilité dans le maintien de la perfusion du cerveau, les artères cérébrales sont continuellement perfusées à haut débit durant la systole et la diastole (O'Rourke and Safar 2005). Le

débit laminaire ainsi engendré offrirait une meilleure protection contre la progression des lésions athérosclérotiques (Papaioannou *et al.*, 2006). Malgré tout, les artères cérébrales sont très vulnérables face aux stress oxydant et mécanique incriminés dans l'apparition de la dysfonction endothéliale (Thacher *et al.*, 2009). Au cours de l'introduction, nous avons rapporté dans le modèle ATX 1) une dysfonction endothéliale cérébrale sévère, 2) une chute du DSC et 3) des déficits cognitifs (Drouin *et al.*, 2011a). De plus, nous savons que les souris ATX présentent aussi une hypertension systolique et diastolique par rapport aux contrôles (à 3 mois sous anesthésie : PAM : 84 ± 2 versus 71 ± 3 mm Hg, ATX versus WT, $P < 0.05$) (Drouin *et al.*, 2011a) sans changement de la PP (Bolduc *et al.*, 2011) et indépendamment de l'activation du RAAS (niveau d'aldostérone plasmatique à 3 mois : 865 ± 179 versus 785 ± 149 pM, ATX versus WT, $P > 0.05$) (données non-publiées). L'athérosclérose contribue à la rigidification de la carotide (Tonstad *et al.*, 1998), conséquemment, les artères cérébrales en aval sont exposées à une variation des contraintes mécaniques ce qui accélère l'apparition de dommages vasculaires (Byrom, 1954; O'Rourke & Safar, 2005; Henskens *et al.*, 2008; Ochi *et al.*, 2010). Nous avons entrepris deux études visant à comprendre l'impact de l'athérosclérose périphérique sur la mécanique et la structure des artères cérébrales et à élucider comment ce remodelage peut être lié à la dysfonction endothéliale et à l'hypoperfusion cérébrale.

2.2. Étude 1

Les études épidémiologiques démontrent qu'une FC au repos supérieure à 70 bpm est un prédicateur d'athérosclérose et de mortalité cardiovasculaire (Giannoglou *et al.*, 2008). Au niveau périphérique et central, le stress mécanique imposé par la FC serait incriminé dans la dysfonction endothéliale (Thorin & Thorin-Trescases, 2009; Custodis *et al.*, 2010) et induirait la rigidification artérielle (Palatini & Parati, 2010). À l'inverse une basse FC augmente l'espérance de vie et réduit la mortalité cardiovasculaire en atténuant l'instauration d'un environnement vasculaire pro-athérogénique. Les effets de la FC sur les artères cérébrales sont peu connus mais en théorie, une réduction de la FC permettrait de moduler la dysfonction endothéliale cérébrale associée à l'athérosclérose. Nous avons utilisé trois approches afin de

moduler la FC chez les souris ATX : 1) l'ivabradine, un chronotrope négatif sélectif qui préserve la fonction endothéliale cérébrale des souris modérément dyslipidémiques exclusivement par la réduction de la FC (Drouin *et al.*, 2008), 2) le métoprolol, un chronotrope négatif qui ne préserve pas la fonction endothéliale cérébrale des souris modérément dyslipidémiques, malgré une réduction de la FC (Drouin *et al.*, 2008) et 3) l'exercice physique volontaire, une intervention non-pharmacologique d'efficacité possiblement supérieure à l'ivabradine qui réduit la FC (Fujimoto *et al.*, 2010) en plus d'augmenter directement l'activité de la eNOS (Hambrecht *et al.*, 2003).

2.2.1. L'hypothèse

La compliance des artères cérébrales de résistance est essentiellement contrôlée par l'endothélium: l'efficacité des traitements (ivabradine, métoprolol et exercice physique volontaire) dans la prévention de l'augmentation de la compliance associée à l'athérosclérose sera proportionnelle aux bénéfices sur la fonction endothéliale.

2.2.2. Les objectifs spécifiques

Les objectifs étaient de caractériser le remodelage cérébrovasculaire associé à l'athérosclérose et de déterminer comment la compliance des artères cérébrales et de la carotide est influencée par une réduction des contraintes mécaniques *via* le contrôle de la FC accompagnée (ivabradine et exercice physique), ou non (métoprolol), d'une protection endothéliale.

2.3. Étude 2

Le stress oxydant occupe un rôle central dans la progression de l'inflammation et de l'athérosclérose (Judkins *et al.*, 2009). L'administration de substances antioxydantes exogènes, telles que le polyphénol catéchine, est une intervention efficace permettant de freiner la progression de la plaque dans l'aorte et la dysfonction endothéliale rénale et cérébrale (Gendron *et al.*, 2010; Drouin *et al.*, 2011b). De plus, la catéchine prévient la perte des fonctions neuronales associée à l'athérosclérose, telles que les changements du DSC après une stimulation neuronale et la capacité d'apprentissage dans un test de comportement (Drouin *et al.*, 2011a). Conformément à

notre hypothèse générale, stipulant que la compliance des artères cérébrales est dépendante de la fonction endothéliale, un traitement à la catéchine devrait prévenir le remodelage cérébrovasculaire chez la souris ATX.

La pertinence physiologique d'un changement de compliance cérébrovasculaire n'a jamais été validée *in vivo*. La portée physiologique du remodelage des artères cérébrales sur le DSC est encore inconnue : le remodelage est-il estompé par les fonctions vasculaires, c'est-à-dire le TM dicté par les CMLV et la relâche de facteurs vasoactifs endothéliaux, ou va-t-il amplifier la dérégulation du DSC ? Sans pouvoir répondre concrètement à cette question nous espérons apporter certains éléments de réponse en étudiant parallèlement la compliance *in vivo* et le DSC de base.

2.3.1. L'hypothèse

La catechine va prévenir le remodelage des artères cérébrales associé à l'athérosclérose en protégeant l'endothélium cérébral. En conséquence, la catéchine va prévenir la chute du DSC de base chez les souris ATX.

2.3.2. Les objectifs spécifiques

Les objectifs étaient de démontrer que la catéchine prévient le remodelage des artères cérébrales chez les souris ATX en protégeant l'intégrité de l'endothélium. Nous voulons aussi évaluer la compliance *in vivo* pour déterminer si elle influence, conjointement avec la fonction endothéliale, la régulation du DSC de base. Nous proposons que ces effets de la catéchine contribuent à maintenir le DSC de base.

2.4. Étude préliminaire non-publiée

La pulsatilité cardiaque du débit est potentiellement un paramètre de haute importance dans le contrôle du DSC surtout dans un contexte pathologique caractérisé par une rigidification de la carotide, comme dans notre modèle de souris ATX. L'influence de la pulsatilité cardiaque n'a cependant jamais été considérée lors des études *ex vivo* de la FMD et du TM des artères cérébrales.

2.4.1. Les objectifs spécifiques

Nous devons tout d'abord tester un appareil fabriqué par des étudiants du Dr Frédéric Lesage de l'École Polytechnique de Montréal permettant de propager des ondes pulsées dans une artère isolée et pressurisée. Ensuite, nous voulons vérifier si les mécanosenseurs des CMLV distinguent une pression intraluminale statique d'une pression intraluminale pulsée en évaluant le TM dans les deux conditions. Nous allons aussi évaluer si la fonction de l'endothélium influence le TM en condition pulsée et statique en inhibant l'activité de la eNOS. Finalement, la phosphorylation de la MLCP par immunobuvardage de type *Western* sera évaluée afin de déterminer si la pulsatilité modifie l'activité de cette enzyme qui contrebalance à l'activation de la MLCK.

Matériels et méthodes

3. Matériels et méthodes

Tous les protocoles et procédures présentés dans cette section ont été faits en accord avec le guide institutionnel de l'Institut de Cardiologie de Montréal ainsi qu'avec le guide *Care and Use of Laboratory Animals of Canada*.

3.1. Le modèle animal

Afin d'étudier l'impact de l'athérosclérose sur la circulation cérébrale avons utilisé un modèle murin chez lequel l'athérosclérose se développe spontanément. Ces souris, que nous appelons ATX, n'expriment pas le récepteur aux lipoprotéines de basse densité (LDLr) mais expriment l'apolipoprotéine B-100 (ApoB-100) humaine (LDLr^{-/-} ; hApoB-100^{+/+}). Le LDLr permet l'endocytose des LDL dans toutes les cellules métabolisant le cholestérol, tout spécialement les hépatocytes. Les LDL sont formées de lipides, principalement d'esters de cholestérol et de triglycérides, et d'apolipoprotéines B-100. Cette dernière permet la reconnaissance des LDL par le LDLr. L'hypercholestérolémie familiale est une maladie génétique causée par une mutation au niveau du LDLr. Les individus hétérozygotes pour cette mutation ont un taux circulant de LDL 200 à 300 % supérieur. Pour un homozygote ce taux peut grimper de 600 % à 1000 % et s'accompagne de lésions athérosclérotiques dès l'enfance (Sanan *et al.*, 1998). Pour une souris LDLr^{-/-} homozygote, les taux de LDL plasmatiques ne s'élèvent que de 200 % à 300 % et les lésions n'apparaissent qu'avec une diète riche en gras. Cette résistance supérieure des souris face à l'apparition de l'athérosclérose associée à une déficience en LDLr s'explique par la production de deux isoformes de l'ApoB : l'isoforme 100 et l'isoforme 48 (Sanan *et al.*, 1998). Les LDL qui contiennent l'ApoB-48 peuvent être éliminés du plasma par d'autres récepteurs que les LDLr (Sanan *et al.*, 1998), ce qui permet de freiner l'élévation des LDL plasmatiques. Chez l'humain, seul l'isoforme ApoB-100 est produit par le foie (Sanan *et al.*, 1998). Chez les souris ATX, la surexpression de l'ApoB-100 humaine élève la synthèse hépatique de LDL (Sanan *et al.*, 1998) et permet d'atteindre des niveaux de LDL circulant 700 % supérieurs par rapport aux souris contrôles (Tableau II). De plus, les souris ATX se distinguent par l'apparition spontanée de lésions, sous une diète

standard. Les lésions athérosclérotiques apparaissent progressivement dans l'aorte et les carotides dès l'âge de 3 ou 4 mois et sont facilement visibles à l'œil nu à 6 mois (Figure 11). Ceci représente un avantage considérable et justifie l'utilisation de ce modèle comparativement au modèle ApoE^{-/-}, par exemple. Bien que la souris ApoE^{-/-} soit largement utilisée, elle nécessite l'exposition à une diète riche en gras afin que la plaque se développe ; son plus grand défaut est qu'elle présente des niveaux élevés de VLDL (lipoprotéines de très faible densité) plutôt que de LDL, ce qui n'est pas tout à fait conforme au phénotype des patients atteints d'hypercholestérolémie (Sanan *et al.*, 1998).

La colonie de souris ATX provient originalement du laboratoire du Dr Helen H. Hobbs (University of Texas SouthWestern, Dallas, TX, USA). Depuis 2003, cette colonie est maintenue au Centre de recherche de l'Institut de Cardiologie de Montréal (Montréal, QC, CA).

Les souris mâles ATX ont été en tout temps comparées avec des souris mâles témoins C57Bl/6 (WT) (Charles River Laboratories, St-Constant, QC, CA) du même âge. Ces deux types de souris ont un poids comparable à l'âge de 3 mois qui augmente de façon normale entre 3 et 6 mois bien que les souris ATX soient significativement plus légères à l'âge de 6 mois (Tableau II). Nos souris ont été hébergées dans l'animalerie du centre de recherche de l'Institut de Cardiologie de Montréal dans des conditions conventionnelles (cycle de lumière de 12 heures/d et diète régulière). Les souris mâles C57Bl/6 ont une espérance de vie moyenne de 22.5 mois (Storer, 1966) et les mâles ATX de 14 mois. Les souris ont été sacrifiées à l'âge de 3 mois, afin d'obtenir les valeurs de base, ou à l'âge de 6 mois, après avoir reçu, ou non, un traitement d'une durée de 3 mois.



Figure 11 Apparition spontanée des lésions athérosclérotiques chez la souris ATX.

Les lésions dans l'aorte thoracique sont visualisées en rouge grâce au lysochrome Oil Red O chez la souris $LDLr^{-/-}$; $hApoB-100^{+/+}$ (ATX) et son contrôle (WT) à l'âge de 6 mois.

3.2. Les traitements

3.2.1. L'ivabradine

L'ivabradine (IVA) (Institut de Recherches Internationales Servier, Courbevoie, France) est le premier traitement visant à réduire la fréquence cardiaque (FC) en inhibant sélectivement les canaux responsables du courant *pacemaker* I_f . En bloquant l'entrée du Na^{2+} dans les cellules du noeud sinusal, l'IVA réduit la pente de la dépolarisation diastolique sans affecter la contractilité myocardique (Riccioni, 2009). Dans l'étude 1, nous avons traité ces souris ATX à l'IVA (15 mg/kg/d), dans l'eau de boisson pendant 3 mois, de l'âge de 3 mois à 6 mois. La solution à boire était renouvelée hebdomadairement.

Chez les souris ATX traitées, l'IVA n'a affecté ni le poids des souris, ni les taux de lipides plasmatiques, ni la glycémie (Tableau II). L'IVA a réduit la FC d'environ 18 %

mais n'a pas occasionné de changements dans les pressions systolique et diastolique (Tableau III).

3.2.2. Le métoprolol

Le métoprolol (METO) (Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, ON, Canada) est un antagoniste β_1 -adrénergique. Il diminue la FC en bloquant la liaison de la norépinéphrine aux récepteurs β_1 -adrénergiques localisés sur les cellules du noeud sinusal. Outre son effet chronotrope négatif, le METO est aussi un composé inotrope négatif. Il bloque la liaison de la norépinéphrine sur les récepteurs β_1 -adrénergiques localisés sur les cardiomyocytes qui sont les cellules responsables de la contractibilité myocardique. Dans l'étude 1, nous avons traité des souris ATX au METO (80 mg/kg/d) dans l'eau de boisson pendant 3 mois, de l'âge de 3 mois à 6 mois. La solution à boire était renouvelée hebdomadairement. Le traitement chronique au METO a permis de comparer les effets de deux composés chronotropes négatifs (IVA et METO) possédant un mode d'action différent.

Chez les souris ATX traitées, le METO n'a affecté ni le poids des souris, ni les taux de lipides plasmatiques ou la glycémie (Tableau II). L'IVA a réduit la FC d'environ 15 % mais n'a pas occasionné de changements dans les pressions systolique et diastolique (Tableau III).

3.2.3. L'exercice physique volontaire

Dans l'étude 1, nous avons placé des souris ATX âgées de 3 mois dans des cages munies de roue (Lafayette Instrument, Lafayette, IN, USA) permettant un exercice physique volontaire, et ce pour 3 mois (jusqu'à l'âge de 6 mois) (EPV). Chaque souris occupait seule une cage à roue, 5 jours par semaine, avec un accès illimité à la roue. L'exercice était exécuté sur une base volontaire sans récompense. Pour analyser les données de la course, nous avons utilisé le logiciel *Activity Wheel Monitoring System* qui détecte les mouvements de la roue et les transforme en valeur de vitesse (m/min) et de distance parcourue (m). Les souris ATX parcourent en moyenne 6160 ± 619 m/d, en courant pendant 9.0 ± 0.7 h/d à une vitesse de 11 ± 1 m/min (Figure 12). Nous avons préféré l'EPV à l'exercice physique forcé puisque ce dernier pourrait

déclencher un état de stress psychologique et ainsi accroître le niveau de cortisol circulant. Dans un protocole d'EPV forcé typique, les animaux sont installés sur un tapis roulant de type corridor où une grille localisée à l'arrière émet une décharge électrique de faible intensité (0.3 à 2 mA) dès que l'animal entre en contact avec celle-ci (Benito *et al.*, 2011).

Chez les souris ATX, l'EPV n'a affecté ni le poids des souris, ni les taux de lipides plasmatiques ou la glycémie (Tableau II). Pendant qu'elles courent, la FC des souris s'élève de 32 % (623 ± 15 bpm) alors qu'au repos, la FC tend à baisser de 10 % *versus* la valeur obtenue chez des souris ATX sédentaires (452 ± 20 *versus* 504 ± 15 bpm, $p=0.086$). Ainsi, sur un cycle de 24 h, la hausse de la FC à l'exercice maintenue 9 h/d est contrebalancée par une baisse de la FC au repos (Tableau III) : sur 24h, la FC n'est pas modifiée, en moyenne, par l'EPV. L'EPV n'a pas occasionné de changements de la pression systolique et diastolique (Tableau III).

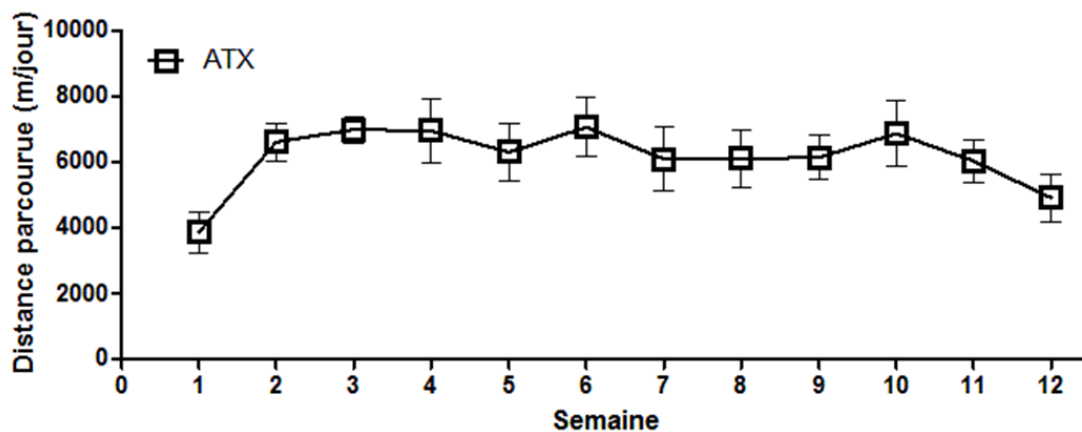
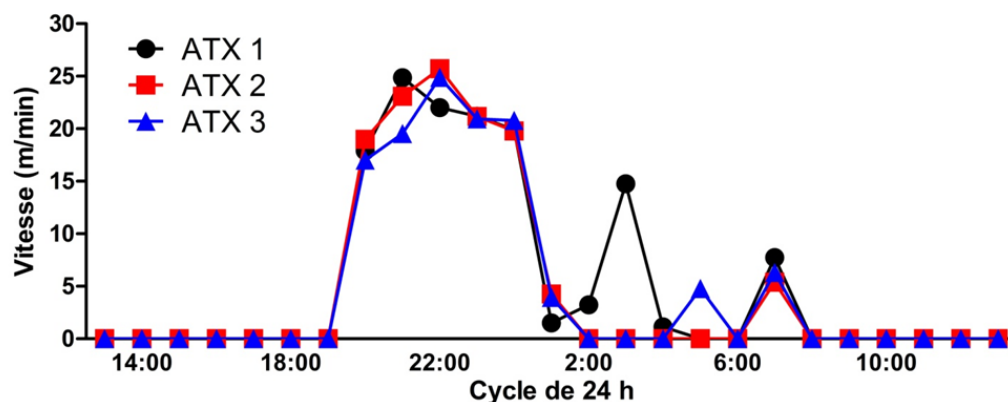
A**B**

Figure 12 Représentations graphiques des paramètres évalués afin de quantifier l'EPV effectué par chacune des souris.

A) Moyenne de la distance parcourue en m à chaque semaine pour toutes les souris qui ont suivi le protocole d'EPV. En moyenne, les souris courent 6160 ± 619 m/d. B) Exemple de la vitesse de course en fonction de l'heure de la journée pour un cycle de 24h choisi au hasard parmi les 3 mois du protocole et ce pour 3 souris ATX choisies au hasard. En moyenne, les souris courent pendant la nuit à une vitesse de 11 ± 1 m/min pour une période cumulative de 9.0 ± 0.7 h/d.

3.2.4. La catéchine

La catéchine (CAT) (Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, ON, Canada) est une molécule polyphénol cardioprotectrice appartenant à la famille des flavanoïdes qui

possède des propriétés antioxydantes. Dans l'étude 2, nous avons traité des souris ATX à la CAT (30 mg/kg/d) dans l'eau de boisson pendant 3 mois, de l'âge de 3 mois à 6 mois. La catéchine étant photosensible, les biberons des souris étaient couverts de papier métallique et la solution à boire renouvelée hebdomadairement.

Chez les souris ATX traitées à la CAT, ni le poids ni la glycémie des souris n'ont été affectés (Tableau II). La CAT a engendré une légère augmentation des LDL plasmatiques ce qui se reflète sur le taux de cholestérol plasmatique total (Tableau II). La CAT n'a eu d'impact ni sur la FC ni sur les pressions systolique et diastolique (Tableau VI).

Tableau II Évolution du poids (g), des lipides plasmatiques (mM) et de la glycémie (mM) chez les souris WT et ATX.

	Poids	Cholestérol total	Cholestérol- LDL	Cholestérol- HDL	Triglycérides	Glucose
WT 3 mois	27±1 (12)	2.1±0.2 (4)	0.1±0.1 (4)	1.6±0.1 (4)	1.2±0.2 (4)	18.1±2.7 (4)
ATX 3 mois	27±1 (15)	16.2±1.1* (4)	9.8±0.5* (4)	1.9±0.1 (4)	7.8±0.6* (4)	16.2±1.7 (4)
WT 6 mois	37±1* (24)	2.3±0.2 (9)	0.7±0.2 (9)	1.2±0.1 (9)	0.8±0.1 (4)	24.0±2.4 (9)
ATX 6 mois	32±1†‡ (26)	16.1±1.0† (9)	10.1±0.8† (9)	1.6±0.1† (9)	7.4±0.8† (9)	13.8±2.2† (9)
ATX + IVA 6 mois	33±1 (11)	16.1±1.9 (4)	10.3±1.3 (4)	1.9±0.1 (4)	7.1±0.6 (4)	9.6±1.3 (4)
ATX + METO 6 mois	32±1 (11)	20.2±1.0§ (4)	13.5±0.5§ (9)	1.7±0.1 (4)	9.0±0.6 (4)	11.0±1.6 (4)
ATX + EPV 6 mois	31±1 (6)	17.8±2.1 (5)	11.4±2.0 (5)	1.6±0.1 (5)	7.5±0.8 (5)	15.4±3.0 (5)
ATX+CAT 6 mois	31±1 (10)	22.3±1.3§ (5)	15.0±1.1§ (5)	1.6±0.1 (5)	6.5±0.6 (5)	19.8±1.5 (5)

WT : souris de type sauvage, ATX : souris LDLr^{-/-} ; hApoB^{+/+}, ATX+IVA : souris LDLr^{-/-} ; hApoB^{+/+} traitées à l'ivabradine (15 mg/kg/d), ATX+METO : souris LDLr^{-/-} ; hApoB^{+/+} traitées au métoprolol (80 mg/kg/d), ATX+EPV : souris LDLr^{-/-} ; hApoB^{+/+} ayant pratiqué 3 mois d'exercice physique volontaire, ATX+CAT : souris LDLr^{-/-} ; hApoB^{+/+} traitées à la catéchine (30 mg/kg/d), LDL : lipoprotéine à basse densité, HDL : lipoprotéine à haute densité. Les résultats sont présentés sous la forme moyenne±SEM de (n) souris. * : P<0.05 versus WT 3 mois ; † : P<0.05 versus WT 6 mois ; ‡ : P<0.05 versus ATX 3 mois ; § : P<0.05 versus ATX 6 mois.

Tableau III Évolution de la fréquence cardiaque (FC, bpm), mesurée par télémétrie et des pressions systolique et diastolique (Psys et Pdia, mm Hg), mesurés par plethysmographie (manchon caudal), chez les souris ATX et WT utilisées dans l'étude 1.

	FC moyenne sur 24h	Psys	Pdia
WT 3 mois	543±15 (6)	137±6 (6)	106±5 (6)
ATX 3 mois	522±10 (10)	147±2 (23)	115±2 (23)
WT 6 mois	532±12 (7)	127±3 (7)	96±2 (6)
ATX 6 mois	504±15 (7)	149±4 * (11)	116±4 * (11)
ATX + IVA 6 mois	434±10 § (6)	149±6 (6)	115±6 (6)
ATX + METO 6 mois	439±7 § (6)	150±5 (6)	113±4 (6)
ATX + EPV 6 mois	516±30 (3)	159±4 (6)	125±3 (6)

WT : souris de type sauvage, ATX : souris LDLr^{-/-} ; hApoB^{+/+}, ATX+IVA : souris LDLr^{-/-} ; hApoB^{+/+} traitées à l'ivabradine (15 mg/kg/d), ATX+METO : souris LDLr^{-/-} ; hApoB^{+/+} traitées au métoprolol (80 mg/kg/d), ATX+EPV : souris LDLr^{-/-} ; hApoB^{+/+} ayant pratiqué 3 mois d'exercice physique volontaire. Les résultats sont présentés sous la forme moyenne±SEM de (n) souris. * : P<0.05 versus 6 WT mois ; § : P<0.05 versus 6 mois ATX.

Tableau IV Évolution de la fréquence cardiaque (FC, bpm), des pressions systolique et diastolique (Psys et Pdia, mm Hg) mesurées par plethysmographie (manchon caudal) chez les souris ATX et WT utilisées dans l'étude 2.

	FC	Psys	Pdia
WT 3 mois (6)	691±9	137±6	106±5
ATX 3 mois (11)	644±26	146±3	114±3
WT 6 mois (6)	693±9	127±3	97±2
ATX 6 mois (5)	662±18	146±7*	112±6*
ATX + CAT 6 mois (6)	602±23	141±8	108±7

WT : souris de type sauvage, ATX : souris LDLr^{-/-} ; hApoB^{+/+}, ATX+CAT : souris LDLr^{-/-} ; hApoB^{+/+} traitées à la catéchine (30 mg/kg/d). Les résultats sont présentés sous la forme moyenne±SEM de (n) souris. * : P<0.05 versus 6-mo WT.

3.3. Mesure de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle

3.3.1. La télémétrie

Afin d'assurer le suivi constant de la FC dans l'étude 1, les souris ont été implantées avec des capteurs intra-péritonéaux *Open-Heart radio-frequency* de modèle *F-10* (Data Sciences International, Arden Hills, MN, USA). Les souris ont été anesthésiées à l'isoflurane 2.5 % dans l'O₂ (0.5 L/minute) l'implantation des capteurs. Une électrode est placée à droite près de la patte avant et l'autre, à gauche, au niveau de l'abdomen. Les enregistrements n'ont débuté qu'après une période de récupération de 5 à 7 jours. Les données ont été analysées avec le logiciel *Auto ECG version 2.4.6* (EMKA Technologies, Paris, France).

3.3.2. Le manchon caudal (*tail-cuff*)

Dans les études 1 et 2, les pressions artérielles systolique et diastolique et la FC ont été mesurées hebdomadairement à l'aide d'un manchon caudal (Kent Scientific, Torrington, CT, USA). La souris a été placée dans un tube de contention et déposée sur une plateforme chauffante. La souris doit s'adapter à l'immobilisation sur la plateforme

pour 15 min. Ensuite, les brassards d'occlusion et de pression-volume ont été installés sur la queue de la souris. La prise des données commence lorsque la queue de la souris atteint une température de 30 °C. À l'aide du logiciel *CODA*, nous avons enregistré 30 mesures répétées par souris, à chaque session. La souris doit être entraînée pour 4 sessions en 2 semaines (ligne de base), avant de débiter les lectures hebdomadaires à l'âge de 3 mois. Malgré les sessions d'entraînement, les mesures de *tail-cuff* stressent les souris. Ceci se reflète par des valeurs de FC plus élevées que celles obtenues en télémétrie (Tableau III et VI).

3.4. Prélèvement sanguin et dosage plasmatique

Les souris des études 1 et 2 ont été anesthésiées (44 mg/kg kétamine, 2.2 mg/kg xylazine) et placées sous ventilation mécanique à l'aide d'un *MiniVent* (HSE, March-Hugstetten, Germany). Une ponction cardiaque, en insérant une seringue dans le ventricule gauche, permet de prélever environ 1ml de sang. Les prélèvements ont été effectués entre 9h et 9h30 AM chez des souris non à jeun. Le sang doit coaguler 30 min à température ambiante après quoi il est centrifugé à 14 000 rotations par minute (rpm) pour 10 min à 4 °C. Le sérum est conservé à -80 °C pour des dosages ultérieurs.

Dans les études 1 et 2, le dosage plasmatique du niveau de cholestérol total, de HDL, de LDL, de triglycérides et de glucose a été réalisé par le laboratoire de biochimie clinique de l'Institut de Cardiologie de Montréal. Dans l'étude 2, le niveau circulant du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) a été quantifié à l'aide du kit *Fluorokine MAP Mouse VEGF* (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), par le laboratoire de biochimie clinique de l'Institut de Cardiologie de Montréal.

3.5. Quantification de la plaque aortique

L'aorte et le cœur des souris de l'étude 1 ont été prélevés ensemble, placés dans un tampon 0.01 M phosphate, pH 7.4 (PBS) et disséqués du tissu conjonctif. La crosse aortique et l'aorte ont été ouvertes longitudinalement en partant de la valve aortique jusqu'à l'extrémité de l'aorte thoracique et fixées dans une boîte Pétri dont le fond est recouvert de *Sylgard* (un silicone) à l'aide de petites aiguilles (0.01 mm de diamètre).

Les aortes ont été fixées 30 min avec une solution de 4 % paraformaldéhyde dans du PBS et rincées avec de l'eau distillée. Après 2 lavages de 5 min au 1,2-propanediol, les aortes ont été incubées 30 min avec une solution 0.5 % *Oil Red O* dans du 1,2-propanediol. Les aortes ont été lavées 4 fois pendant 10 sec au 1,2-propanediol ou jusqu'à ce que le 1,2-propanediol décolore. Après le lavage, seules les lésions lipidiques devraient apparaître en rouge. Les aortes ont été photographiées par un professionnel du service audio-visuel de l'Institut de Cardiologie de Montréal (Figure 11). La quantification de la plaque a été effectuée avec le logiciel *GIMP 2* (www.gimp.org). L'aire de la plaque a été exprimée en pourcentage d'aire totale de l'aorte.

3.6. Histologie : marquage Verhoeff-Van Gieson

Pour les souris de l'étude 1, la section du cervelet contenant l'artère basilaire orientée longitudinalement a été placée dans des cassettes d'histologie et immergée dans une solution 10 % formaline dans du PBS, pendant 5 jours. Les étapes suivantes ont été réalisées par le laboratoire d'histologie du centre de recherche l'Institut de Cardiologie de Montréal. Les tissus fixés ont été embaumés dans la paraffine et coupés au microtome en sections de 6 µm. Les sections ont été déposées sur des lames. Avant le marquage, les sections ont été déparaffinées dans du xylène (4 bains de 5 min) et hydratées dans un gradient d'éthanol 100, 95 et 70 % (3 bains de 3 min). Les lames ont été marquées avec le colorant *Verhoeff* qui permet de visualiser l'élastine en noir et contremarquées avec le colorant *Van Gieson* qui permet de visualiser le collagène en rose-rouge, les noyaux en brun-noir et les muscles, la fibrine, les cytoplasmes et les globules rouges en jaune.

Les lames ont été observées avec un microscope *Olympus* de modèle *BX60* équipé d'une caméra *QImaging* de modèle *Retiga 2000K* sous un objectif 100x à immersion. Le logiciel *Image-Pro Plus 7.0* nous a permis de numériser des images.

3.7. Le myographe pressurisé : étude de la réactivité, de la biomécanique et de la structure des artères cérébrales

Le myographe pressurisé qui dérive directement d'un autre type de myographe : le myographe à fils. Le myographe à fils pour petits vaisseaux a été introduit en 1976 par les professeurs Michael J. Mulvany et William Halpern (Mulvany & Halpern, 1976). À l'époque, aucun outil ne permettait d'étudier concrètement les forces générées par les CMVL au sein de la paroi. Grâce à 2 fils métalliques traversant transversalement la lumière d'un segment d'artère et couplés respectivement à un capteur de force et à une vis micrométrique, il est possible de mesurer les changements de tension par rapport à l'étirement initial du segment. L'artère peut être maintenue en vie plusieurs heures puisqu'elle baigne dans une solution saline physiologique (PSS) (130 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.6 mM CaCl₂, 1.17 mM MgSO₄, 14.9 mM NaHCO₃, 14.9 mM KH₂PO₄, 0.026 mM EDTA, 10 mM glucose, pH 7.4) maintenue à 37 °C et alimentée en O₂ (5%). Les composés s'ajoutent directement dans la cuve où baigne l'artère ce qui provoque des changements de tension sans changement du diamètre de l'artère (condition isométrique). Le myographe à fils est plus approprié pour l'étude des artères de 400 µm à 3 mm de diamètre. Toutefois, si les parois sont suffisamment épaisses on peut aller jusqu'à 100 µm de diamètre.

En 1984, le premier myographe pressurisé fut confectionné par le professeur William Halpern (Halpern *et al.*, 1984). Dans ce système, le segment d'artère est installé horizontalement entre deux micropipettes de verre (Figure 13). Une des pipettes est perfusée par une solution saline tandis que l'autre est occluse, ce qui permet d'élever la pression intraluminale. Si la deuxième pipette est débloquée, l'artère peut aussi être perfusée à un débit donné. L'intégration du contrôle de la pression intraluminale et du débit fait de cette technique un outil beaucoup plus physiologique que le myographe à fils. Cependant, le myographe pressurisé n'est pas conçu pour les artères d'un calibre supérieur à 500 µm de diamètre. Il est en revanche idéal pour les artères qui possèdent une paroi très fine, telles les artères cérébrales de souris. Polyvalent, le myographe

pressurisé permet d'étudier, d'une part, les propriétés intrinsèques biomécaniques active (le tonus myogénique) et passive (la compliance) des artères, à pression variable et, d'autre part, la réponse des CMLV et des cellules endothéliales face aux substances vasoactives et aux contraintes engendrées par le débit à pression constante.

3.7.1. Description du système de myographe pressurisé

Tous les constituants du système de myographe pressurisé (Figure 13), sauf si mentionné, proviennent de *Living Systems Instrumentation* (Burlington, VT, USA). Une cuve de 2 ou 10 ml est traversée par une paire de pipettes de verre (extrémité d'environ 100 µm de diamètre). Une des pipettes est reliée à un capteur de pression P1 par de la tubulure. La pression ressentie par P1 se contrôle à l'aide d'un module automatique muni d'une pompe péristaltique, le *pressure servo control*. Celui-ci contrôle la pression en injectant le PSS circulant dans le système. L'autre pipette est reliée à un capteur de pression P2 qui n'est pas sous contrôle automatique. Un robinet placé en amont de P2 permet de fermer cette extrémité afin de travailler sans perfusion (étude du tonus myogénique) ou de l'ouvrir afin de laisser passer un débit propulsé par une pompe péristaltique installée en amont du robinet (étude de la réactivité vasculaire au débit). Le *pressure servo control* possède 2 modes de contrôle : en mode *normal*, le *pressure servo control* s'ajuste aux changements de pression ressentis en P1 et en mode *pressure*, le *pressure servo control* s'ajuste selon la pression moyenne ($P_{av}=(P1+P2)/2$). Généralement, nous travaillons en mode *pressure*. Le montage abritant la cuve s'installe sur un microscope inversé *Nikon* de modèle *TMS* équipé d'une caméra *Sony* de modèle *Hyper HAD* sous un objectif 4x. La caméra est couplée à un moniteur vidéo qui permet d'analyser le diamètre interne et externe du vaisseau, en superposant une bande horizontale digitale traversant le moniteur sur les frontières du vaisseau. Le montage possède un élément de chauffage et une sonde thermique qui doivent être connectés au régulateur de température. L'approvisionnement en O₂ vers la cuve est assuré par l'ajout d'un diffuseur d'air relié à un cylindre de gaz comprimé (12 % CO₂, 5 % O₂, 83 % N₃). Dans ces conditions la pO₂ est de 150±10 mm Hg (Drouin *et al.*, 2007) et conforme aux conditions physiologiques.

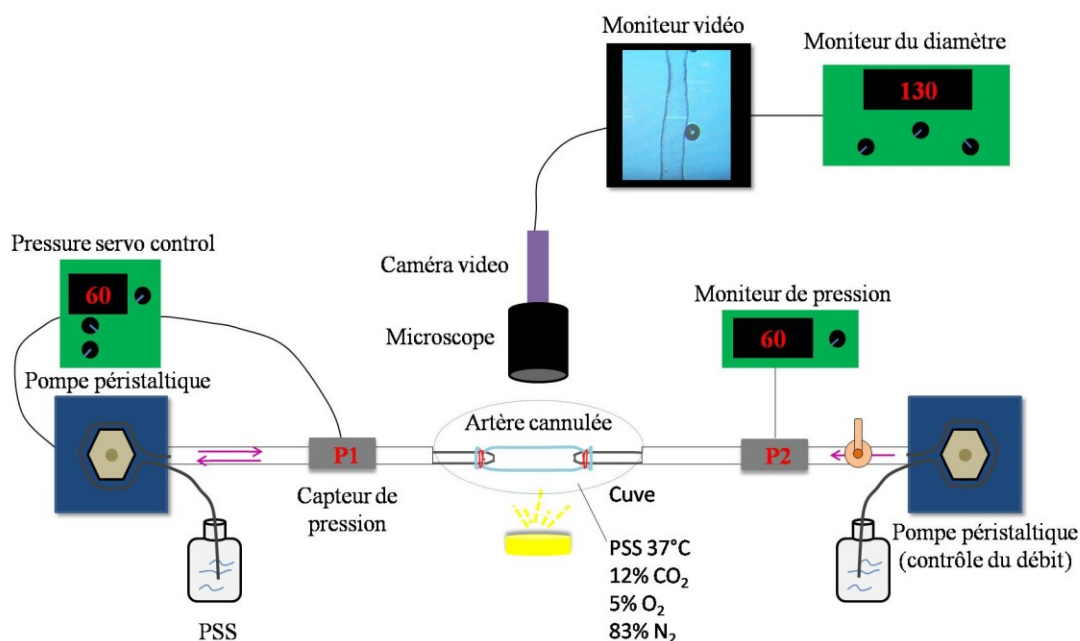


Figure 13 Schématisation du système de myographe pressurisé.

3.7.2. Isolation des artères cérébrales

Les carotides droite et gauche des souris des études 1 et 2 ont été prélevées, nettoyées du tissu conjonctif et placées dans du PSS à 4 °C. Chez les souris âgées de 6 mois, le diamètre interne moyen d'une carotide légèrement pressurisée (60 mm Hg) est de $385 \pm 14 \mu\text{m}$ pour les WT et de $443 \pm 6 \mu\text{m}$ pour les ATX ($P < 0.05$). Ensuite, la tête de la souris a été sectionnée, le cerveau a été retiré de la cavité crânienne et déposé dans du PSS à 4 °C. Les artères de résistance cérébrales postérieures du polygone de Willis (Figure 14) sont délicatement prélevées. Chez les souris âgées de 6 mois, le diamètre interne moyen d'une artère cérébrale postérieure légèrement pressurisée (10 mm Hg) est de $124 \pm 2 \mu\text{m}$ pour les WT et de $113 \pm 2 \mu\text{m}$ pour les ATX ($P < 0.05$). Les artères de résistance cérébrales moyennes, communicantes postérieures du polygone de Willis et les artères de résistance cérébelleuses supérieures du cervelet ont aussi été parfois utilisées (Figure 14). La section du cervelet contenant l'artère basilaire (Figure 14) a été découpée et soit fixée dans la 10 % formaline pour faire de l'histologie, soit enrobée dans le composé *Optimal Cutting Temperature* (O.C.T.) et conservée à -80 °C pour

faire de l'immunofluorescence. Finalement, le cerveau doit être immédiatement congelé pour les expériences de biologie moléculaire (*Western blot* et zymographie).

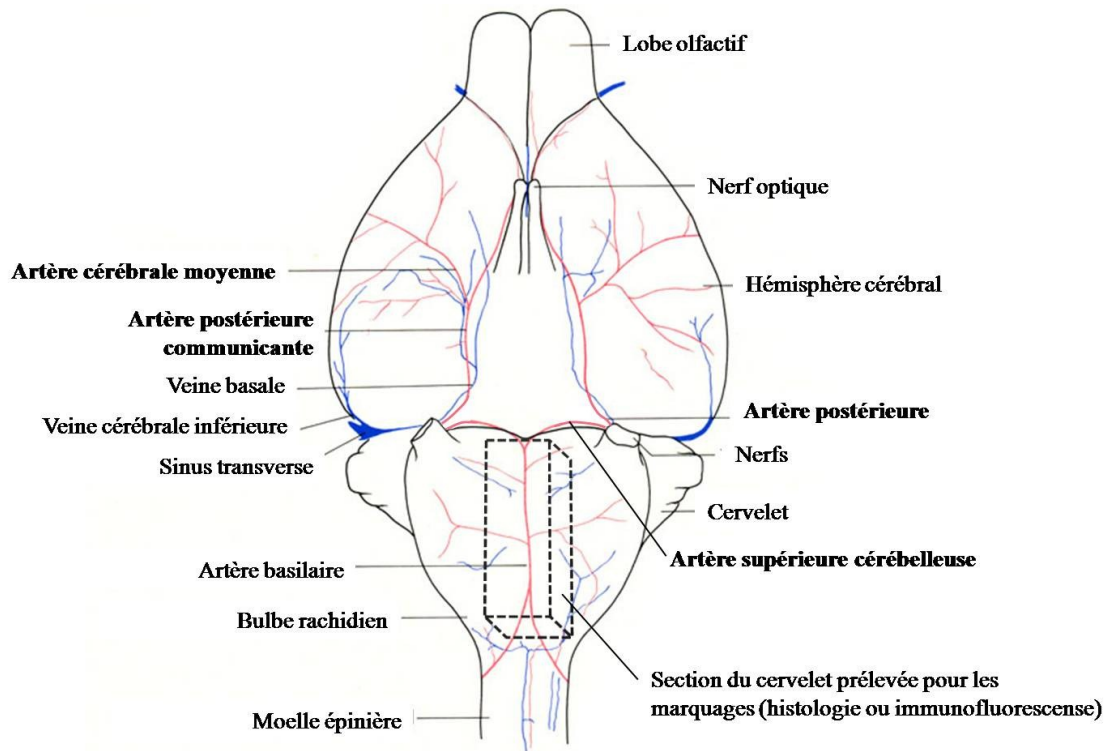


Figure 14 Vue basale d'un cerveau de souris illustrant les principales composantes vasculaires.

(Image modifiée de *The Anatomy of the Laboratory Mouse* par Margaret J. Cook tiré du site web *MGI-Mouse Genome Informatics*, [http : //www.informatics.jax.org](http://www.informatics.jax.org))

3.7.3. Installation d'une artère dans un myographe pressurisé

L'artère isolée a été canulée sur la pipette perfusée en P1 et ligaturée. L'artère a été vidée de son sang en la perfusant à faible débit. L'artère a été ligaturée sur la pipette placée en P2 et l'étanchéité du système vérifiée : lorsque le système fuit, le *pressure servo control* s'active pour maintenir la pression et les ligatures doivent être resserrées ou déplacées afin d'éliminer la fuite. Une fois le système étanche, la pression intraluminaire a été élevée à 60 mm Hg à l'aide du *pressure servo control*. L'artère

pressurisée a été incubée 40 min dans du PSS maintenu à 37 °C et alimenté en O₂ (Figure 16A). Cette étape dite d'équilibration a été réalisée à la pression intraluminale physiologique approximative des artères cérébrales chez la souris (60 mm Hg) (Baumbach & Heistad, 1989; Faraci & Heistad, 1990) et permet le développement du tonus myogénique.

3.7.4. Procédure pour évaluer la réactivité vasculaire

L'étude de la réactivité vasculaire consiste à évaluer la réponse des vaisseaux face à des stimuli de nature chimique (neurotransmetteur, agent pharmacologique, *etc.*) ou physique (distension par la pression, contrainte de cisaillement, *etc.*). Dans les études 1 et 2, nous nous sommes intéressés à la réponse des artères de résistance cérébrales suite à l'augmentation des contraintes de cisaillement aussi appelée *shear stress* (τ ; dynes/cm²). Les contraintes de cisaillement sont le résultat de la friction du sang parallèlement à la surface interne de la paroi d'un vaisseau (Lehoux *et al.*, 2006). Ainsi, elles sont dépendantes de la viscosité du sang (η ; Poise), du rayon interne du vaisseau (r ; cm) et du débit (Q ; ml/sec) sanguin :

$$\tau = \frac{4\eta Q}{\pi r^3}$$

Le Q dépend du gradient de pression intraluminale (ΔP) et de la résistance vasculaire (R) :

$$Q = \frac{\Delta P}{R}$$

Selon la loi de Poiseuille, qui décrit l'écoulement laminaire d'un fluide dans un cylindre, la R est directement proportionnelle à η et à la longueur du vaisseau (L) mais inversement proportionnelle au r du vaisseau élevé à la puissance 4 :

$$R = \frac{8\eta L}{\pi r^4}$$

Cependant, dans nos conditions expérimentales *ex-vivo*, la pression intraluminale et le débit sont des paramètres contrôlés. La viscosité quant à elle, correspond à celle du PSS (0.009 Poise) et demeure donc constante. Ainsi, pour obtenir la valeur de Q à laquelle il

faut perfuser l'artère à un *shear stress* donné, il suffit d'insérer dans la formule la valeur de τ désirée et le rayon de l'artère :

$$Q = \frac{\tau \pi r^3}{4\eta}$$

Le Q se contrôle manuellement à l'aide d'une petite pompe péristaltique portable installée en P2 (Figure 13). En sélectionnant le mode *pressure* sur le *pressure servo control*, la pompe en P1 tourne automatiquement dans le sens contraire des aiguilles d'une montre afin de créer une pression négative, c'est-à-dire qu'elle tire le PSS hors du système. Le système doit expulser le liquide introduit lors de la perfusion de l'artère au débit Q, tout en gardant la P_{av} constante à 60 mm Hg.

Après la période d'équilibration, l'artère a été pré-contractée avec un agoniste α_1 -adrénergique, la phényléphrine (PE ; 10 à 30 μM) et le diamètre interne a été noté (D_{PE}). Ensuite, une courbe de dilation a été réalisée en fonction d'un τ croissant (0, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20 dynes/cm²) correspondant aux valeurs physiologiques observées dans des vaisseaux de diamètre comparable ($\approx 0\text{-}25$ dynes/cm²) (Muller *et al.*, 1996; Papaioannou *et al.*, 2006) (Figure 16B). Chaque valeur de τ a été maintenue quelques minutes jusqu'à l'obtention d'un diamètre stable, après quoi le diamètre atteint (D) a été noté. Ce D est évidemment indispensable pour calculer le % de dilation résultante, mais aussi pour trouver la prochaine valeur de Q en fonction du τ désiré. Une fois la courbe complétée, le PSS contenu dans la cuve a été échangé pour un PSS dépourvu en Ca^{2+} contenant 1 μM d'EGTA (0 Ca^{2+} PSS) et un donneur de NO, le sodium nitroprusside (SNP ; 30 μM), afin d'obtenir le diamètre interne maximal en condition passive (D_{max}). La dilation induite par le débit (FMD) pour chaque valeur de τ est calculée selon :

$$\text{FMD (\%)} = \frac{D - D_{PE}}{D_{max}} * 100$$

Les artères qui n'atteignent pas une pré-contraction minimale de 30 % par rapport au D_{max} sont rejetées :

$$\text{Pré - contraction (\%)} = \frac{D_{max} - D_{PE}}{D_{max}} * 100$$

3.7.5. Procédure pour évaluer la biomécanique et la structure

Dans les études 1 et 2, la biomécanique des artères cérébrales a été caractérisée à l'aide de 2 paramètres : la relation *stress-strain* et la distensibilité. La relation *stress-strain* et l'ID se calculent à l'aide des résultats obtenus suite à une seule expérience : une courbe pression-diamètre en conditions passives (Figure 16C). Cette courbe peut se réaliser à la fin d'une expérience de réactivité quand l'artère baigne dans la solution $0Ca^{2+}$ PSS + SNP. Il est nécessaire de réaliser ce protocole en absence de Ca^{2+} afin d'abolir la réponse myogénique. Les diamètres interne et externe ont été mesurés suite à chaque variation de la pression intraluminale par intervalles croissants (de 10 à 120 mm Hg avec un premier intervalle de 10 mm Hg, suivi d'intervalles de 20 mm Hg).

La relation *stress-strain* est une représentation graphique illustrant la force tangentielle appliquée par la pression sur la paroi de l'artère en fonction de la capacité de l'artère à se déformer face à cette pression (Figure 15). Réaliser une courbe *stress-strain* permet ainsi de caractériser la compliance de l'artère. La compliance se définit comme la capacité de l'artère à accommoder son volume à une augmentation de la pression transmurale (Hall, 2006). La compliance est d'autant plus élevée que la pression requise pour amener l'artère à contenir un volume donné est faible (Hall, 2006). Le *stress* est la force (dynes/cm^2) appliquée par la pression (P) en dynes/cm^2 ($1 \text{ mm Hg} = 1334 \text{ dynes/cm}^2$) ajustée au diamètre interne (D) à la pression appliquée et à l'épaisseur de la paroi (EP) (Briones *et al.*, 2009) :

$$EP = \frac{D_{\text{externe}} - D}{2}$$

$$\text{Stress} \left(\frac{\text{dynes}}{\text{cm}^2} \right) = \frac{P * 1334 * D}{2EP}$$

Le *strain* est le % d'augmentation du D à une pression donnée par rapport au diamètre original de l'artère, c'est-à-dire le diamètre à un étirement physiologique et sans pression intraluminale. Cependant, à 0 mm Hg l'artère s'affaisse, il est donc difficile d'obtenir une valeur fiable. Ainsi, nous avons fixé le diamètre original comme étant celui mesuré à 10 mm Hg ($D_{10 \text{ mm Hg}}$). Le *strain* se calcule selon (Briones *et al.*, 2009) :

$$\text{Strain (\%)} = \frac{D - D_{10 \text{ mm Hg}}}{D_{10 \text{ mm Hg}}} * 100$$

La tangente à la courbe *stress-strain*, nommée le *Young's elastic modulus* (β), représente le coefficient de la rigidité de l'artère (Briones *et al.*, 2009) (Figure 15) :

$$\text{Stress} = \text{stress}_0^{\beta \text{ strain}}$$

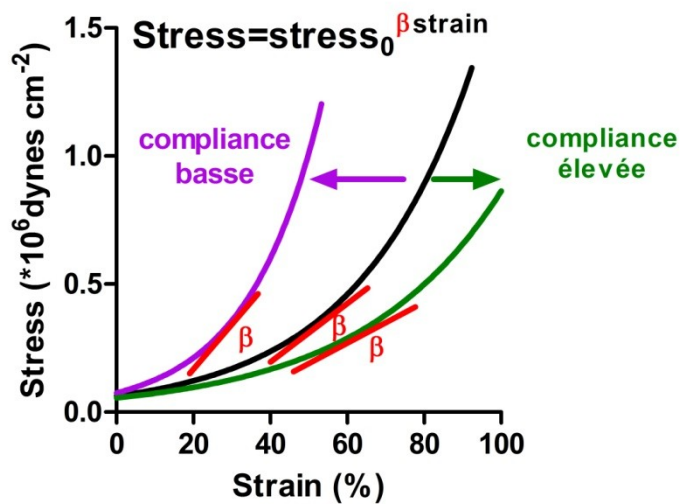


Figure 15 Représentation graphique de la relation *stress-strain*.

Une diminution de la pente de la courbe *stress-strain* signifie une augmentation de la compliance, alors qu'une augmentation de la pente illustre une diminution de la compliance de l'artère (Figure 15). Plus le coefficient *Young's elastic modulus* est élevé, plus l'artère est rigide.

Le second paramètre biomécanique étudié est la distensibilité incrémentielle (ID ; *incremental distensibility*). L'ID permet de déterminer dans quel intervalle de pression le changement de compliance se manifeste. L'ID indique le pourcentage

d'augmentation du diamètre interne ($\Delta D = D_1 - D_0$) de l'artère à chaque augmentation de la pression intraluminale ($\Delta P = P_1 - P_0$) et est normalisée au diamètre obtenu suite à l'augmentation de la pression, soit D_1 (Baumbach *et al.*, 1989). La ID se calcule selon :

$$ID (\%) = \frac{\Delta D}{D_1 * \Delta P} * 100$$

Dans l'étude 2, nous avons présenté 2 paramètres supplémentaires, soit l'EP et le ratio EP/D. Ces paramètres nous ont permis d'obtenir des informations quant à la structure et le remodelage de l'artère. L'EP et le ratio EP/D ont été calculés en conditions passives, au D original (à P=10 mm Hg). Ces paramètres ne peuvent pas caractériser des modifications survenant aux niveaux cellulaire et moléculaire, ils ne donnent pas d'information sur la composition et l'organisation de la MEC ou sur la morphométrie et l'abondance des CMLV et cellules endothéliales. Ce sont plutôt des outils utilisés pour définir la nature d'un remodelage de la paroi (hypertrophique, eutrophique, hypotrophique, interne et externe).

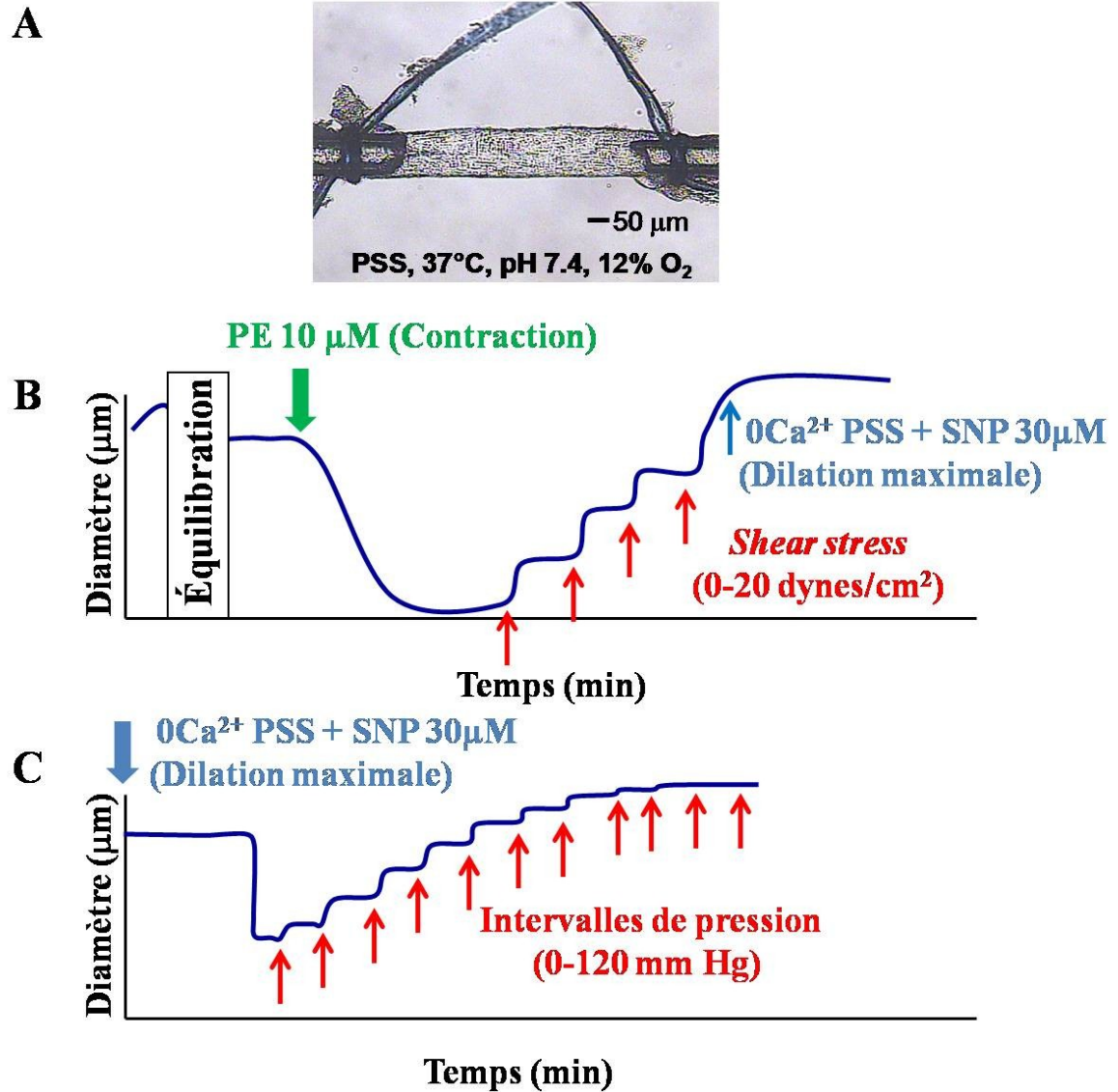


Figure 16 Illustration d'une artère cérébrale isolée pressurisée à 60 mm Hg (A) schématisation des protocoles utilisés pour étudier la réactivité au débit (B) et la biomécanique (compliance et distensibilité incrémentielle) (C).

3.8. Évaluation de l'expression protéique par immunobuvardage de type Western

Dans les études 1 et 2 nous avons évalué l'expression protéique de deux protéines structurales essentielles au maintien de l'intégrité et de la fonctionnalité de la paroi vasculaire : l'élastine (71 kDa) et le collagène (134 kDa). Les collagènes de type I et III (Col I/III) représentent 60 % et 30 %, respectivement, des collagènes vasculaires totaux (Borel & Bellon, 1985), c'est pourquoi nous avons choisi un anticorps qui reconnaît conjointement ces 2 types. Dans l'étude 2, nous avons évalué l'expression protéique du VEGF (38 kDa) afin de vérifier l'existence d'un lien causal possible entre l'abondance de VEGF dans les vaisseaux cérébraux et l'activité de la métalloprotéinase de type 9 (MMP-9). L'expression des protéines à l'étude a été normalisée à celle de l' α -actine (42 kDa). Les immunobuvardages de type *Western* (WB) ont été réalisés sur les protéines extraites d'un isolat de vaisseaux cérébraux totaux provenant d'un cerveau par souris.

3.8.1. Isolation des vaisseaux cérébraux

Les vaisseaux ont été extraits du cerveau d'après une technique décrite par Li *et al.* en 2004 (Li *et al.*, 2004). Le cerveau est décongelé sur la glace et homogénéisé avec un outil de type *loosely fitting Dounce tissue grinder* dans 3 ml de PBS froid. Le cerveau a été réduit en une solution homogène qui a été centrifugée à 3 500 rpm pour 5 min à 4 °C. Le surnageant a été jeté et le culot resuspendu dans du PBS froid. Cette étape de lavage a été répétée jusqu'à l'obtention d'un surnageant clair (4 à 5 fois). Afin de concentrer les vaisseaux contenus dans le culot avant la filtration, il est possible d'ajouter une étape de centrifugation. Il suffit de resuspendre le culot lavé, le déposer sur du dextran 15 % (p/v) et de centrifuger à 5 000 rpm pour 30 min à 4 °C. Le dextran permet de séparer l'homogénat par gradient de densité donc de séparer les différentes composantes par sédimentation. Si le cerveau a été adéquatement homogénéisé, les vaisseaux devraient occuper la couche la plus profonde du tube. Toutefois, il n'est pas essentiel de réaliser cette étape puisque la filtration va automatiquement éliminer tous les débris cellulaires de volume inférieur à environ 50 μm^2 . Suite aux étapes de

centrifugation, le culot a été resuspendu dans du PBS froid et cette solution a été filtrée sur une mèche de nylon (Cell micro sieves, Bio Design of New York, Carmel, NY, USA) ayant des pores de $50 \mu\text{m}^2$. Les vaisseaux retenus sur la mèche ont été lavés avec beaucoup de PBS froid pour éviter qu'elle ne s'obstrue. Afin de déloger les vaisseaux retenus sur et dans la mèche, la mèche a été retournée sur un béccher propre et pulvérisée par un jet de PBS froid (en utilisant une pipette automatique par exemple). La solution contenant les vaisseaux a été centrifugée à 4 500 rpm pour 10 min à 4 °C. Les protéines ont ensuite été extraites du culot de vaisseaux. Il est important de spécifier que les vaisseaux isolés sur la mèche sont un mélange d'artères, d'artérioles, de capillaires, de veines et de veinules, ce qui représente une limite technique à prendre en considération lors de l'interprétation des résultats.

3.8.2. Extraction des protéines

Le culot de vaisseaux a été homogénéisé dans 60 μl de tampon de lyse (50 mM Tris-HCl, 20 mM β -glycérophosphate, 20 mM sodium fluoride, 5 mM EDTA, 10 mM EGTA, 1 mM Na_3VO_4 , 10 mM benzamidine, 5 mM dithiothréitol, 0.5 mM phénylméthylsulfonyl fluoride, 10 $\mu\text{g/ml}$ leupetine, 1.5 mg/ml aprotinine, 1 μM microcystine et 1 % (v/v) Triton X-100) dans lequel un cocktail d'inhibiteurs de protéases a été également fraîchement ajouté. Le mélange a été incubé 30 min sur la glace et centrifugé à 14 000 rpm pour 10 min à 4 °C. Le surnageant contenant les protéines a été récupéré et conservé à -80 °C pour utilisation ultérieure. La concentration protéique a été déterminée par un dosage colorimétrique conventionnel à l'aide de la méthode de Bradford.

3.8.3. Séparation des protéines sur gel et transfert

Trente μg (WB du collagène et du VEGF) ou 50 μg (WB de l'élastine) de protéines par échantillon ont été mélangées à un tampon de Laemmli conventionnel 4x et chauffées 5 min à 95 °C. Les protéines dénaturées ont été séparées à température ambiante sur un gel SDS-PAGE 10 % (p/v) acrylamide à 200 V dans un tampon de migration conventionnel. Ensuite, les protéines ont été transférées à 100 V sur une

membrane de nitrocellulose pendant 90 min à 4 °C dans un tampon de transfert conventionnel.

3.8.4. Détection

Pour toutes les protéines étudiées, la membrane a été bloquée dans un tampon salin Tris 0.05 % Tween 20 (TBST) contenant 5 % (p/v) de lait en poudre (TBST-lait) pendant 2 h à température ambiante. Après un lavage (3 x 10 min au TBST), la membrane a été incubée en présence de l'anticorps primaire [anti-collagène type I/III, 1:1000, (Calbiochem, Darmstadt, Germany) ; anti-VEGF, 1:1000 (Abcam, Cambridge, MA, USA) ; anti-élastine, 1:6 000, (Abcam, Cambridge, MA, USA); anti- α -actine, 1:100 000, (Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, Ontario, Canada)] dilué dans du TBST-lait pendant 16 h à 4 °C. Pour les WB dirigés contre le collagène, le VEGF et l' α -actine, la membrane a été lavée (3 x 10 min au TBST) et incubée en présence d'un anticorps secondaire conjugué à la peroxydase de raifort (HRP) (anti-souris-HRP, anti-lapin-HRP, 1:10 000, Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA) dilué dans du TBST-lait pendant 2 h à température ambiante. Afin d'accroître la sensibilité de détection pour le WB dirigé contre l'élastine, la membrane a été lavée (3 x 10 min au TBST) et incubée en présence d'un anticorps secondaire conjugué à la biotine (anti-souris-biotine, 1:10 000, Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA) dilué dans du TBST pendant 1 h à température ambiante. Ensuite, la membrane a été lavée (3 x 10 min au TBST) et incubée en présence de streptavidine (forte affinité pour la biotine) conjuguée à la HRP (streptavidine-HRP, 1:10 000, Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA) diluée dans du TBST pendant 2 h à température ambiante.

La membrane a été lavée (3 x 10 min au TBST et 1 x 1 min au TBS) et incubée 3 min avec un substrat pour la détection améliorée de la chimiluminescence (Western Lightning Plus-ECL, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). En conjonction avec son substrat, l'enzyme HRP va émettre une chimiluminescence proportionnelle à la concentration protéique. Cette réaction a été capturée sur un film autoradiographique (HyBlot CL, Denville Scientific, St-Laurent, QC, CA). Le film a été numérisé et la quantification des bandes a été réalisée par analyse densitométrique à l'aide du logiciel *Quantity One* (BioRad Laboratories, Hercules, MA, USA).

3.9. Évaluation de l'activité des métalloprotéinases par zymographie

Dans les études 1 et 2, nous avons évalué l'activité enzymatique des métalloprotéinases de type 2 et 9 (MMP-2, -9) par la technique de zymographie en gel de gélatine (Kleiner & Stetler-Stevenson, 1994). En plus d'être simple, rapide et économique, cette technique est extrêmement sensible puisqu'elle détecte jusqu'à des pg d'enzymes. Les MMP-2, -9 sont des enzymes sécrétées sous forme inactive (proMMP) par les macrophages, les CMLV et les cellules endothéliales et qui, une fois actives, dégradent les composantes de la MEC comme le collagène, la gélatine (forme dénaturée du collagène) et la laminine (Lemarie *et al.*, 2010). Le domaine catalytique des MMP est un Zn^{2+} actif. Sur les proMMP un résidu cystéine forme une liaison stabilisatrice avec le Zn^{2+} (Snoek-van Beurden & Von den Hoff, 2005). Tant que cette liaison est intacte, l'enzyme reste inactive. La détérioration de ce lien expose le Zn^{2+} actif et permet le clivage autolytique du pro-domaine (8-10 kDa) (Snoek-van Beurden & Von den Hoff, 2005). *In vivo*, les proMMP sont activées par des protéases et *in vitro*, il est possible de les activer avec des agents chimiques (acétate de p-aminophényl mercurique), l'acidité et la chaleur (Snoek-van Beurden & Von den Hoff, 2005). Lors de la zymographie, le processus de dénaturation-renaturation, que subissent les proMMP, serait suffisant pour les activer (Kleiner & Stetler-Stevenson, 1994). Nous nous intéressons à ces enzymes puisqu'elles sont impliquées dans le remodelage vasculaire.

Le protocole de zymographie débute par une séparation protéique par électrophorèse sur gel SDS-PAGE à la gélatine en condition non-dénaturante. Le substrat contenu dans le gel, la gélatine, est digéré par les gélatinases (MMP-2 et -9) actives prises dans le gel. Une coloration du gel au bleu de Coomassie permet de révéler une bande bleue claire à transparente sur un fond bleu foncé au poids moléculaire correspondant à la MMP. La clarté de la bande est proportionnelle à la concentration de MMP présente dans l'échantillon protéique. L'ajout dans le gel d'un autre substrat permet d'étudier d'autres types de MMP. Par exemple, la caséine pour la détection des MMP-11, -1, -7, -12 et -13 (Snoek-van Beurden & Von den Hoff, 2005).

3.9.1. Extraction des protéines

Le même protocole que pour le WB a été suivi mis à part pour la composition du tampon de lyse. La technique de zymographie repose sur la présence d'une activité enzymatique c'est pourquoi il est primordial d'omettre les agents dénaturants et les chélateurs du Ca^{2+} (l'activité MMP est dépendante du Ca^{2+}) dans la confection du tampon de lyse. Seul un cocktail d'inhibiteurs de protéases a été fraîchement ajouté au tampon de lyse pour zymographie (50 mM Tris, 1 % (v/v) Triton X-100, 150 mM NaCl).

3.9.2. Séparation des protéines

Cinquante μg de protéines de vaisseaux cérébraux par échantillon ont été mélangés dans un tampon non-dénaturant 4x (0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 10 % (p/v) SDS, 40 % (p/v) sucrose, 0.6 % (p/v) bleu de bromophénol) sans chauffer. Les protéines ont été séparées à 4 °C sur un gel SDS-PAGE de 6 % (p/v) acrylamide et 0.09 % (v/v) gélatine dans un tampon de migration conventionnel. La migration commence à 20 mA jusqu'à ce que le front de migration quitte le gel d'entassement et se poursuit à 90 V.

3.9.3. Détection

Afin d'éliminer le SDS, le gel a été lavé (5 x 10 min) dans un tampon de lavage 2.5 % (v/v) Triton X-100. Cette étape permet de renaturer les protéines contenues dans le gel. Le gel a été incubé 72 h à 37 °C dans le tampon de zymographie [38 mM Tris-HCl, 13 mM CaCl_2 , 0.02 % (p/v) NaN_3 , 10 μM ZnCl_2 , 0.0334 % (v/v) Brj 35]. L'activité enzymatique des MMP est dépendante du Ca^{2+} , l'omission du CaCl_2 abolit l'activité gélatinolytique. Puis, les gels ont été colorés avec une solution de bleu de Coomassie [0.2 % (p/v) bleu de Coomassie, 10 % (v/v) acide acétique, 40 % (v/v) méthanol] pendant 1 h et décolorés avec une solution décolorante [10 % (v/v) acide acétique, 40 % (v/v) méthanol] jusqu'à l'intensité désirée. Le gel a été numérisé et les bandes ont été quantifiées en mesurant l'intensité de la clarté par surface à l'aide du logiciel *Gimp 2*.

3.9.4. Contrôle positif et négatif

Comme contrôle positif, les proenzymes recombinantes humaines purifiées proMMP-2 (72 kDa, Enzo Life Sciences, Plymouth Meeting PA, USA) et proMMP-9 (88 kDa pour la forme non-réduite et 92 kDa pour la forme réduite, Chemicon International, MA, USA) ont été séparées en parallèle avec nos échantillons, dans chaque gel effectué. Chez la souris, la proMMP-2 est aussi de 72 kDa mais, la proMMP-9 est légèrement plus large, soit 105 kDa. Ainsi, il est attendu que la proMMP-9 présente dans nos échantillons migre plus haut que notre contrôle positif humain.

Comme contrôle négatif, nous avons fait migrer un échantillon en duplicata et nous avons coupé le gel en 2. Une partie a été incubée dans le tampon de zymographie et l'autre dans le tampon de zymographie + 20 mM d'EDTA. Dans la partie incubée en présence d'EDTA, les MMP n'ont pas été révélées.

3.10. Composition lipidique des vaisseaux cérébraux

Dans l'étude 1, nous avons proposé une relation entre la dyslipidémie de la souris ATX et la composition en phospholipides et en cholestérol de la paroi des vaisseaux cérébraux. En effet, l'abondance et les différents types de lipides plasmatiques pourraient influencer la composition en phospholipides des membranes cellulaires (Ruiz-Gutierrez *et al.*, 1996). Par exemple, si le ratio en acides gras insaturés augmente ou si le contenu en cholestérol change, les membranes pourraient devenir plus ou moins fluides (Song & Waugh, 1993; Hamilton *et al.*, 1994; Thorin *et al.*, 1995; Dorrance *et al.*, 2001; Byfield *et al.*, 2004). C'est pourquoi nous avons proposé qu'en altérant la fluidité membranaire des CMLV ou des cellules endothéliales, les propriétés biomécaniques des artères cérébrales pourraient être modifiées.

Afin de valider cette hypothèse, nous avons quantifié dans les vaisseaux cérébraux des souris ATX et WT, le cholestérol total ainsi que la composition en acides gras des phospholipides membranaires.

3.10.1. Quantification du cholestérol

3.10.1.1. Extraction des lipides

Le culot de vaisseaux récupéré à la fin du protocole d'isolation des vaisseaux cérébraux (section 3.8.1) a été réduit en poudre en le broyant à -196 °C dans l'azote liquide. Ensuite, les lipides ont été extraits en ajoutant 200 µl de chloroforme contenant 1 % (v/v) Triton X-100 à 20 mg de poudre de vaisseaux cérébraux. Les échantillons ont été soniqués 20 min et mélangés par inversion durant 16 h à 4 °C. Les échantillons ont été filtrés sur une gaze pour se débarrasser des particules en suspension et récupérés dans des tubes de verre. Les tubes ont été placés sous l'évaporateur à l'azote pour environ 30 min à 50 °C, afin de sécher les lipides.

3.10.1.2. Quantification du cholestérol et des esters de cholestérol

Les lipides ont été re-solubilisés dans 200 µl de tampon *Cholesterol Reaction* provenant du kit *Cholesterol/Cholesteryl Ester Quantitation* (Calbiochem, San Diego, CA). Le principe de ce kit repose sur deux réactions chimiques : l'enzyme cholestérol estérase hydrolyse les esters de cholestérol contenus dans l'échantillon en cholestérol et l'enzyme cholestérol oxydase oxyde le cholestérol. Le peroxyde d'hydrogène produit par cette dernière réaction va réagir avec une sonde afin de former un composé de couleur rose, la résorufine. L'intensité de la coloration rose est déterminée par spectrophotométrie en mesurant la densité optique de chaque échantillon à une longueur d'onde de 570 nm. Le kit permet de détecter le cholestérol seul en omettant l'enzyme cholestérol estérase et le cholestérol total (cholestérol + ester de cholestérol) par l'ajout de l'enzyme cholestérol estérase. Si l'on désire quantifier les esters de cholestérol seuls, il suffit de soustraire la valeur de cholestérol seul à la valeur de cholestérol total. Le dosage a été effectué conformément aux instructions fournies avec le kit.

3.10.2. Quantification des acides gras

3.10.2.1. Extraction des lipides

Le culot de vaisseaux récupéré à la fin du protocole d'isolation des vaisseaux cérébraux (section 3.8.1) a été réduit en poudre en le broyant à $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ dans l'azote liquide. Ensuite, les lipides ont été extraits d'après une technique décrite par Ruiz *et al* (Ruiz *et al.*, 2004). Un ml de chloroforme:méthanol (2:1) a été ajouté à 20 mg de poudre de vaisseaux cérébraux. Les échantillons ont été soniqués 20 min et mélangés par inversion pendant 16 h à $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Les échantillons ont été filtrés sur une gaze pour se débarrasser des particules en suspension et récupérés dans des tubes de verre. Les tubes ont été placés sous l'évaporateur à l'azote pour environ 30 min à $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ afin de sécher les lipides.

3.10.2.2. Extraction des acides gras

Les lipides ont été re-solubilisés dans 200 μl de hexane:chloroforme:méthanol (95:3:2) et séparés sur une colonne de silice ($\text{Si-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2^+$) échangeuse d'anions (résine +) (BondElut NH_2 0,5g, Varian, Lake Forest, CA, USA). Très polaire, la silice va retenir les groupements négatifs COO^- terminant la chaîne de carbones des acides gras. Les triglycérides ont été élués avec 4 ml de chloroforme. Ensuite, les acides gras libres et les phospholipides ont été élués dans la même fraction avec 2.5 ml de méthanol:chloroforme (6:1), suivi de 2.5 ml of méthanol:chloroforme (6:1) 0.05 M sodium acétate ($\text{CH}_3\text{COO}^- \text{Na}^+$). Bien que les acides gras libres soient élués avec phospholipides, ils ne sont pas détectés par chromatographie gazeuse couplée à la détection par ionisation de flamme (GC-FID) puisqu'ils sont présents en concentration négligeable dans nos échantillons. Les triglycérides sont solubles dans le chloroforme tandis que les acides gras libres et les phospholipides sont solubles dans le méthanol. Le sodium acétate neutralise les charges négatives des groupements phosphate des phospholipides. Après l'éluion, le standard interne acide nonadécylique (C19:0), a été ajouté dans chaque fraction pour la quantification relative et le solvant d'éluion a été évaporé à l'azote.

3.10.2.3. Synthèse des esters méthyliques d'acides gras

Pour la réaction d'estérification, les acides ont été re-solubilisés dans 2 ml d'hexane:méthanol (1:4) 10 % (v/v) chlorure d'acétyle et chauffés 1 h à 80 °C sous agitation. Après la réaction, les échantillons ont été refroidis et neutralisés par l'ajout de 5 ml 6 % (p/v) K₂CO₃. Les échantillons ont été mélangés par inversion et centrifugés 10 min pour accélérer la séparation entre la phase hexane et la phase aqueuse. La phase hexane (environ 200 µl) a été prélevée et transférée dans des vials pour l'analyse en GC-FID (Agilent Technologies, Santa Clara, CA).

3.10.2.4. Analyse des échantillons par GC-FID

Le système est équipé d'une colonne capillaire Agilent DB-WAX (60 m de longueur par 0.25 mm de diamètre interne et 0.25 µm d'épaisseur de film). La phase mobile est de l'hydrogène qui migre dans la colonne à un débit de 1.9 ml/min. 2 µl de chaque échantillon ont été prélevés directement des vials et injectés dans la colonne à une température de 40 °C. Une fois l'échantillon dans la colonne, le four se maintient à 40 °C pour 7 min. Ensuite, la température s'élève jusqu'à 120 °C à un rythme de 10 °C/min, jusqu'à 180 °C à un rythme de 1 °C/min et jusqu'à 218 °C à un rythme de 0.5 °C/min. Dans la colonne, les acides gras se séparent selon leur temps de rétention. Quand les acides gras sous forme gazeuse sortent de la colonne, ils entrent en combustion. Les ions générés ont ensuite été captés par une électrode qui a transmis un signal. Ce signal a été capturé sur un chromatographe qui représente le spectre de masse (pics en fonction du temps de rétention). La concentration des acides gras (intensité des pics) a été calculée relativement au signal obtenu pour le standard externe. Les fractions triglycérides et phospholipides + acides gras libres ont été analysées en GC-FID, mais en réalité, seule la fraction contenant les phospholipides membranaires a été considérée lors de l'analyse des résultats puisque c'est sous cette forme que les acides gras vont interférer avec les propriétés biomécaniques de la paroi.

3.11. La tomographie par cohérence optique couplée au Doppler

Grâce à une collaboration avec le laboratoire du Dr Frédéric Lesage de l'École Polytechnique de Montréal, nous avons eu la chance d'utiliser une technologie d'imagerie de fine pointe, la tomographie par cohérence optique couplée au Doppler (OCT-Doppler). Chez la souris, l'OCT-Doppler permet de mesurer *in vivo* le DSC absolue et la compliance des artères cérébrales (Baraghis *et al.*, 2011). En utilisant une longueur d'onde (870 nm) du domaine de l'infrarouge, ce qui permet une bonne pénétration tissulaire, il est possible d'imager les artères pénétrantes du cortex somatosensoriel à travers la boîte crânienne. Les acquisitions ont permis de reconstruire, par la technique du *moving-scatterer-sensitive*, (Ren *et al.*, 2006) le débit sanguin basal absolu (nl/sec) (Srinivasan *et al.*, 2010) sur cycle cardiaque ainsi que l'aire de la section transversale du vaisseau imagé (mm²). À l'âge de 6 mois, les souris ont été anesthésiées à l'uréthane (2 g/kg) et trachéotomisées. Ensuite, les souris ont été placées sur un support stéréotaxique muni d'un coussin chauffant afin de maintenir la température corporelle à 37 °C. La peau recouvrant le crane a été enlevée et le cortex a été imagé sous un objectif à l'eau de 10x. Un volume de 800 x 800 x 600 µm a été balayé autour de l'artère d'intérêt et numérisé (2 à 5 volumes d'acquisition par souris). La FC a été enregistrée tout au long de l'expérience à l'aide d'un électrocardiographe.

Le débit absolu a été normalisé à l'aire et à la FC (bpm) afin d'obtenir une valeur standardisée (nl/sec/mm²/bpm). Le débit a été mesuré sur l'artère d'intérêt ainsi que tous ses collatérales visibles dans le volume d'acquisition. Étant donné le grand nombre de données générées (n=356), les études statistiques ont été réalisées par Jean Lambert de l'Université de Montréal.

La compliance locale a été calculée à partir du débit absolu pendant la diastole (Q_{Av} en m³/sec). de l'aire de la section transversale pendant la diastole (A_{Av} en m²) et du % de variation de ces 2 paramètres entre la diastole et la systole, δ_v (a.u.) et δ_A (a.u.), respectivement. La compliance a été normalisée par la viscosité du sang (η ; cP)

calculée à partir du diamètre artérielle et de l'hématocrite (Pries *et al.*, 1992). La compliance locale (nL/Pa) se calcule selon :

$$C = [((A_{AV})^3/Q_{AV}) * ((\delta_A+1)\delta_A/\delta_v) * 10^{15}]/\eta$$

Le compliance locale a été évaluée uniquement sur l'artère d'intérêt au centre de chaque volume d'acquisition.

3.12. Analyses statistiques

Les études statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel *GraphPad Prism 5* (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Les valeurs moyennes ont été calculées et exprimées avec l'erreur standard à la moyenne (moyenne \pm SEM). Le «n» représente le nombre de souris utilisé pour chaque protocole. Les tests *t* de Student non-pairés et le test ANOVA *one-way* suivi d'un test *post-hoc* de Bonferroni ont été utilisés afin de déterminer si les moyennes étaient statistiquement différentes. Si la valeur du P est inférieure à 0.05, la différence a été considérée statistiquement significative.

Les statistiques effectuées pour les mesures *in vivo* de DSC obtenues avec l'OCT-Doppler ont été réalisées par le Dr Jean Lambert à l'aide du logiciel SPSS 19.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Brièvement, les 191 valeurs de DSC de base provenant de 10 souris ayant des FC similaires au moment de l'acquisition des données ont été analysées à l'aide d'une équation d'estimation généralisée qui permet de prendre en considération les valeurs corrélées. Pour chaque groupe de souris, les moyennes marginales du DSC ont été estimées et comparées avec l'approche de Sidak après ajustement du niveau de signification (pour les détails se référer au deuxième manuscrit).

Articles

4. Articles

4.1. Article 1

Bolduc V, Drouin A, Gillis MA, Duquette N, Thorin-Trescases N, Frayne-Robillard I, Des Rosiers C, Tardif JC & Thorin E. (2011). Heart rate-associated mechanical stress impairs carotid but not cerebral artery compliance in dyslipidemic atherosclerotic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 301, H2081-2092.

4.1.1. Apport original et contribution des coauteurs

Titre: Heart rate-associated mechanical stress impairs carotid but not cerebral artery compliance in dyslipidemic atherosclerotic mice.

Ce manuscrit a été accepté pour publication dans la revue scientifique *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology* le 9 septembre 2011.

Par **Virginie Bolduc** : Conception et design expérimental, cuillette des données, analyse des données, interprétation des résultats, préparation des figures, rédaction du manuscrit, révision et correction du manuscrit, approbation de la version finale du manuscrit.

Annick Drouin : Conception et design expérimental, cuillette des données, analyses des données, approbation de la version finale du manuscrit.

Marc-Antoine Gillis : Cuillette des données, analyses des données, approbation de la version finale du manuscrit.

Natacha Duquette : Cuillette des données, approbation de la version finale du manuscrit.

Nathalie Thorin-Trescases : Analyses des données, interprétation des résultats, préparation des figures, révision et correction du manuscrit, approbation de la version finale du manuscrit.

Isabelle Frayne-Robillard : Cuillette des données, approbation de la version finale du manuscrit.

Christine Des Rosiers : Conception et design expérimental, analyses des données, interprétation des résultats, révision et correction du manuscrit, approbation de la version finale du manuscrit.

Jean-Claude Tardif : Conception et design expérimental, révision et correction du manuscrit, approbation de la version finale du manuscrit.

Eric Thorin : Conception et design expérimental, analyses des données, interprétation des résultats, révision et correction du manuscrit, approbation de la version finale du manuscrit.

4.1.2. Manuscrit

Heart rate-associated mechanical stress impairs carotid but not cerebral artery compliance in dyslipidemic atherosclerotic mice

Virginie Bolduc^{1,6}, Annick Drouin^{2,6}, Marc-Antoine Gillis⁶, Natacha Duquette⁶, Nathalie Thorin-Trescases⁶, Isabelle Frayne-Robillard⁶, Christine Des Rosiers^{3,6}, Jean-Claude Tardif^{4,6}, Eric Thorin^{5,6}.

Université de Montréal, Faculty of Medicine, Departments of Pharmacology¹, Physiology², Nutrition³, Medicine⁴ and Surgery⁵, Montreal, Qc, Canada, Montreal Heart Institute Research Center⁶, Montreal, Quebec, Canada.

Corresponding author: Dr Eric Thorin

Abstract

The cardiac cycle imposes a mechanical stress that dilates elastic carotid arteries, while shear stress largely contributes to the endothelium-dependent dilation of downstream cerebral arteries. In the presence of dyslipidemia, carotid arteries stiffen while the endothelial function declines. We reasoned that stiffening of carotid arteries would be prevented by reducing resting heart rate (HR), while improving the endothelial function would regulate cerebral artery compliance and function. Thus, we treated or not, 3-month old (-mo) male atherosclerotic mice (ATX; LDLr^{-/-}:hApoB^{+/+}) for 3 months with the sino-atrial pacemaker current inhibitor ivabradine (IVA), the β -blocker metoprolol (METO), or subjected mice to voluntary physical training (PT). Arterial (carotid and cerebral artery) compliance and endothelium-dependent flow-mediated cerebral dilation were measured in isolated pressurized arteries. IVA and METO similarly reduced ($p < 0.05$) 24-hr HR by $\approx 15\%$, while PT had no impact. As expected, carotid artery stiffness increased ($P < 0.05$) in ATX mice compared to wild-type mice, while cerebral artery stiffness decreased ($P < 0.05$); this paradoxical increase in cerebrovascular compliance was associated with endothelial dysfunction and an augmented metalloproteinase-9 (MMP-9) activity ($p < 0.05$), without changing the lipid composition of the wall. Reducing HR (IVA and METO) limited carotid artery stiffening, but plaque progression was prevented by IVA only. In contrast, IVA maintained and PT improved cerebral eNOS-dependent flow-mediated dilation and wall compliance, and both interventions reduced MMP-9 activity ($p < 0.05$); METO worsened endothelial dysfunction, compliance, and did not reduce MMP-9 activity. In conclusion, HR-dependent mechanical stress contributes to carotid artery wall stiffening in severely dyslipidemic mice while cerebrovascular compliance is mostly regulated by the endothelium.

Key words: cerebrovascular compliance, endothelial function, resting heart rate

Introduction

Large elastic artery stiffness and endothelial dysfunction are co-markers of aging and premature atherosclerosis (51, 58). It is postulated that these changes are, at least partly, the consequence of the accumulation of damage associated with the repeated mechanical stress imposed by the heart rate (HR), a process magnified by risk factors for cardiovascular diseases (19, 51, 58). Although never directly tested, endothelial dysfunction and arterial stiffening have been suggested to be closely associated in peripheral elastic arteries (46, 50, 57, 60), and to feed each other's deterioration in a vicious cycle (14, 56). Because of the cyclic mechanical stress imposed by each heartbeat on the vasculature (19, 58), elevated resting HR above 80 beats per minute (bpm) in humans is a known risk factor for cardiovascular events and premature death (8, 19, 21, 28). Accordingly, the stiffening of the carotid artery is an excellent predictor of cardiovascular (1, 36), peripheral and also cerebral vascular diseases (42, 52, 61). On the other hand, regular exercise is beneficial to the cardiovascular system and is associated with an augmented life expectancy by reducing all cause mortality (8, 33, 39). Both a reduction in resting HR and an improved endothelium-dependent eNOS function are associated with these beneficial effects (26, 29, 33, 38).

The effects of a reduction in resting HR and exercise on the cerebral circulation are, however, unknown. Severe dyslipidemia induces endothelial dysfunction in cerebral arteries (22) but its effects on cerebral artery wall compliance is unknown. Few studies have shown that in rat and mouse models of hypertension (4, 5), of inhibition of PPAR γ signalling (13, 32) and of ischemia/reperfusion (35), cerebral endothelial dysfunction is consistently associated with a paradoxical increase in cerebral arterial and arteriolar compliance, suggestive of cerebral wall weakening rather than wall stiffening. Thus, the mechanisms by which chronic mechanical stress alters arterial wall compliance may be different in carotid and cerebral arteries. We reasoned that, if the compliance of elastic carotid arteries is directly affected by the pulsatile mechanical forces, the compliance of muscular cerebral arteries is essentially controlled by the endothelium. In order to validate this hypothesis, we modulated HR for three months in atherosclerotic mice displaying endothelial dysfunction (31), using 3 different indirect approaches, all relevant to the clinical setting and in prevention. First, mice were treated

with the sino-atrial pacemaker current inhibitor ivabradine (IVA); it selectively reduces HR without affecting cardiac function (43) and consequently decreases the chronic mechanical stress, and has been shown to maintain the endothelial function (17, 18, 23). Second, mice were treated with metoprolol (METO) that reduces HR but does not preserve the cerebral endothelial function, likely by interfering with endothelial β -adrenergic receptor (AR)-NO production (12, 18, 23). The third approach was non-pharmacological, using voluntary physical training (PT), proven to improve endothelial function in both humans and animals (33, 48). While exercise training reduces resting HR in humans, its effects in mice is not known, although forced exercise has been shown to decrease HR at rest (9). Our data demonstrate that, in contrast to the carotid arteries, cerebral artery compliance increases with severe dyslipidemia and that, in agreement with our hypothesis, the repeated mechanical stress imposed by the cardiac cycle directly regulates carotid artery stiffening while the endothelium is central to maintain compliance of cerebral arteries. In the cerebral circulation, the mechanical stress only amplifies endothelial dysfunction, favouring functional remodelling.

Methods

The procedures and protocols were approved by our institutional animal ethical committee and performed in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of Canada and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996).

Experiments were conducted on cerebral arteries from the circle of Willis and carotid arteries isolated from 3 and 6-month-old (mo) male C57Bl/6 control wild type and atherosclerotic (ATX) mice (22, 31). These ATX mice are severely dyslipidemic (Table 1) and develop, under a normal diet, atherosclerotic plaque in large conductance arteries such as the aorta, the renal arteries and the carotids, but not in the cerebral arteries. ATX mice are knockout for the LDL receptor but express the human apolipoprotein B-100 (LDLr^{-/-}:hApoB^{+/+}) (31). ATX mice were randomly assigned to receive a 3-month treatment (from 3 to 6-mo) with ivabradine (18, 23) (15 mg/kg/d; ATX+IVA) (n=11) or metoprolol (23) (80 mg/kg/d; ATX+METO) (n=11) in the drinking water. In another set of experiments, ATX mice (n=9) were subjected to 3 months of voluntary training and compared with sedentary ATX and WT mice. Each mouse was kept in a cage with free access to a running wheel (Lafayette Instrument, Lafayette, IN, USA), without reward. The mice ran for 9.0±0.7 h/24 h, mostly during the night (6160±619 m/day at an average speed of 13±1 m/min) (Fig. 1).

Heart rate was monitored from 3 to 6-mo after implantation of open-heart radio-frequency transmitters under isoflurane (2.5 % in O₂, 0.5L/min for induction and 1.5 % for maintenance) anesthesia (Data Sciences International, Arden Hills, MN, USA) (11, 23). Analgesia was maintained by buprenorphine (0.05 mg/kg before surgery and every 8 hrs for 48hrs). Electrocardiogram leads were placed in lead II position. Data were analyzed with ECG Auto (version 2.4.6; EMKA Technologies, Paris, France). In voluntary trained mice, HR was monitored by telemetry for a week before sacrifice (n=3) to avoid physical interferences between the implantable telemetry probe and the exercise capacities of the mice. Telemetry data were confirmed by a weekly monitoring of HR using a tail-cuff device during the 3-month training protocol. At 3 and 6-mo, mice were anesthetized (44 mg/kg ketamine, 2.2 mg/kg xylazine) and blood was

collected; the plasma was frozen at -80°C . The thoracic aorta was dissected and frozen at -80°C . The brain was removed from the cranial cavity and frozen at -80°C , or placed in ice-cold physiological salt solution (PSS, pH 7.4, mmol/L: 130 NaCl, 4.7 KCl, 1.18 KH_2PO_4 , 1.17 MgSO_4 , 14.9 NaHCO_3 , 1.6 CaCl_2 , 0.023 EDTA and 10 glucose) to isolate cerebral arteries for reactivity (24) and compliance studies. The left carotid arteries were removed and placed in ice-cold PSS for compliance studies.

Isolated arteries were cannulated at both ends, and pressurized as previously described (24). Flow-mediated dilations (FMD) were induced on phenylephrine (PE) precontracted cerebral arteries (24). A single cumulative curve (from 0 to 25 $\mu\text{l}/\text{min}$, with 2 $\mu\text{l}/\text{min}$ steps between 0 and 10 $\mu\text{l}/\text{min}$, followed by three 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ steps, at constant pressure of 60 mm Hg) was performed on each segment. Shear stress (t ; dyn/cm^2) was calculated according to $[t = 4\eta Q/\pi r^3]$, where η represents the viscosity (0.009 P), Q the flow rate through the lumen (ml/s) and r the inside radius (cm). The applied calculated shear stress was in the physiological range ($\approx 0\text{-}25$ dynes/ cm^2) (47, 53). Data are presented as the % of dilatation for a given average value of shear stress. The average shear stress represents the average of each shear stress obtained for each data set presented on the same graph that were in a ± 1.0 dynes/ cm^2 interval.

Reactivity and compliance studies were performed on different arterial segments. Passive pressure-diameter curves were conducted in a Ca^{2+} -free PSS containing 1mM of EGTA, in order to abolish myogenic tone and to assess the mechanical properties of the arteries. Internal and external diameter changes were measured after each increment of intra-luminal pressure (from 10-120 mm Hg with a first 10 mm Hg step followed by 20 mm Hg steps for cerebral arteries and from 60 to 180 mm Hg with 20 mm Hg steps for carotid arteries), in order to calculate mechanical parameters. The circumferential wall strain (Strain, %) was calculated according to $[(D - D_{\text{initial mm Hg}}) / D_{\text{initial mm Hg}}]$, where D is the internal diameter at a given pressure and $D_{\text{initial mm Hg}}$ is the initial diameter at the initial pressure (10 mm Hg for cerebral arteries and 60 mm Hg for carotid arteries). The incremental distensibility (ID, %/mm Hg), which represents the percentage of change of the arterial internal diameter for each mm Hg change in intra-luminal pressure, was calculated according to $[(D_1 - D_0) / (D_1 * \Delta P) * 100]$, where D_0 is the

internal diameter before the pressure increment, D_1 is the internal diameter after the pressure increment and ΔP is the change in pressure (10 or 20 mm Hg).

Plasma Parameters Total cholesterol, low-density lipoprotein (LDL), high-density lipoprotein (HDL), triglycerides and glucose levels were measured at the Montreal Heart Institute biochemistry laboratory (Montreal, Qc, Canada).

Staining of Atherosclerotic Lesions and Quantification of Plaque Areas Thoracic aortas still attached to the heart were removed and dissected from surrounding tissues. The aortic arch and the aorta were opened longitudinally from the aortic valve through the end of the thoracic aorta, pinned on a Petri dish, fixed in 0.01M phosphate buffer solution (PBS, pH 7.4) and 10 % paraformaldehyde and stained for 1 hour with 1-2-propandiol 0.5 % Oil Red O. Stained aortas were photographed and digitalized. Plaque areas were quantified using Gimp 2.6 software (www.gimp.org) and expressed in percentage of total aorta area.

Histological Verhoeff-Van Gieson staining Cerebral arteries were fixed in 10 % formalin PBS-buffered solution and processed for standard histological procedures and embedded in paraffin. Sections of 6 μm were obtained by microtome, deparaffinized in xylene and hydrated in ethanol. All of the slides obtained were stained with Verhoeff's elastic stain to visualize the elastic fibers and counterstained with Van Gieson's solution to visualize collagen.

Isolation of Cerebral vessels and Western Blot Whole brain vessels were isolated as previously described (45). For Western blot analysis, 30 μg (for collagen type I/III) or 50 μg (for elastin) of cerebral vessels proteins were mixed with a discontinuous Laemmli buffer and loaded on a 10 % acrylamide SDS-PAGE gels. After 45 min of migration at 200 V, gels were transferred on nitrocellulose. Membranes were incubated with an anti-collagen I/III (1:10 000, Calbiochem, Darmstadt, Germany) or with an anti-elastin (1: 6 000, Abcam, Cambridge, MA, USA). To enhance elastin detection sensitivity, after primary antibody incubation, membranes were incubated with a biotin-

conjugated anti-mouse IgG (1: 10 000) followed by incubation with a horseradish peroxidase (HRP)-conjugated with streptavidin (1: 10 000). α -actin was used as a loading control (anti- α -actin 1:100 000, Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, Ontario, Canada). Quantification was made by densitometric analysis using Quantity One software.

Gelatin Zymography Zymography using gelatin-containing gels was performed as described previously (37). Briefly, a modified Laemmli buffer without mercaptoethanol was added to the vessel proteins samples, without heating, on a 6 % SDS-polyacrylamide gel containing 1 % gelatin. Migration was conducted at 4 °C and 10 mA for 1h, followed by a 90V migration for 2h. After migration, SDS was removed from the gel by washing 5x10 min with 2.5 % (v/v) Triton X-100 at room temperature. Gels were incubated in a zymography buffer (38 mM Tris-HCl pH 7.4, 13 mM CaCl₂, 10 μ M ZnCl₂, 0.02 % NaN₃ and 0.03 % Brij 35) at 37 °C for 72h and then stained with Coomassie brilliant blue. Gelatinolytic activity was visualized as clear bands against the dark background. Samples of purified human pro-MMP-9 (Chemicon International, MA, USA) and pro-MMP-2 (Enzo Life Sciences, Plymouth Meeting PA, USA) were used as a positive control. Quantification was made by densitometric analysis using Gimp 2.6 software. When sample quantity allowed it, experiments were made in duplicate.

Cholesterol Composition of Cerebral vessels Lipids extraction was performed by adding 200 μ l of chloroform and 1 % Triton X-100 to 20 mg of isolated cerebral vessels. Samples were sonicated for 20 min and mixed by inversion at 4 °C overnight. Samples were filtrated through a gaze to remove suspended particles and collected in clean tubes in order be air-dried and vacuum-dried at 50 °C for 30 min. Dry lipids were re-dissolved in 200 μ l Cholesterol Reaction buffer from a Cholesterol/Cholesteryl Ester Quantitation kit (Calbiochem, San Diego, CA, USA) and the total cholesterol concentration was calculated according to the manufacturer's instructions.

Fatty Acids Composition of Cerebral vessels Lipids extraction method was adapted from Ruiz et al (55). 1 ml of chloroform:methanol (2:1) was added to 20 mg of isolated cerebral vessels. Samples were sonicated 20 min and mixed by inversion at 4 °C overnight. Samples were then filtrated through a gaze to remove suspended particles and collected in glass tubes. A N₂ evaporation was used to concentrate fatty acids which were re-dissolved in 200 µl of hexane:chloroform:methanol (95:3:2) for the column separation step. Dissolved fatty acids were loaded on the 0.5 g NH₂ Bond columns (Varian, Lake Forest, CA, USA). Triglycerides were eluted by 4 ml of chloroform and free fatty acids and phospholipids were eluted in the same fraction by 2.5 ml of methanol:chloroform (6:1) followed by 2.5 ml of methanol:chloroform (6:1) 0.05 M sodium acetate. Free fatty acids concentration was negligible and thus not detectable by GC-FID. An external standard of nonadecanoic acid (C19:0) was added in each fraction for relative quantification and solvent was evaporated by N₂. Fatty acids were re-dissolved in 2 ml of hexane:methanol (1:4) 10 % acetyl chloride and heated for 1 h at 80 °C under agitation for esterification. Then, tubes were cooled down and 5 ml of K₂CO₃ 6 % were added to neutralize the excess of acetyl chloride. The tubes were agitated by inversion and centrifuged 10 min at high speed to accelerate the phase of separation between hexane and the aqueous solution. The hexane phase was transferred in vials for analysis by gas chromatography coupled with flame ionisation detection (GC-FID) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The system is coupled with an Agilent DB-WAX capillary column (60 m x 0.25 mm I.D; 0.25 µm film thickness). The carrier gas was hydrogen at a flow rate of 1.9 ml/min. Two microliters of each sample was injected at 40 °C in the column. Initially, the oven is held at 40 °C for 7 min. Then, the temperature is increased to 120 °C with a 10 °C/min rate, to 180 °C with a 1 °C/min rate and finally, 218 °C is reached with a rate of 0.5 °C/min. Fatty acid concentrations in the phospholipids fraction were calculated based on the concentration of the external standard (C19:0).

Statistics. “n” refers to the number of animals used in each protocol. Results are presented as mean±SEM. Unpaired Student’s *t* test and one-way ANOVA were used, when adequate. A value of P<0.05 was considered statistically significant.

Materials

METO and PE were purchased from Sigma-Aldrich Canada Ltd. (Oakville, Ontario, Canada). Ivabradine was provided by Institut de Recherches Internationales Servier (Courbevoie, France).

Results

Phenotype of WT and ATX mice. Plasma total cholesterol, LDL-cholesterol and triglycerides levels were higher in ATX mice compared to WT mice (Table 1). ATX mice (at 6 mo of age) were hypertensive and blood pressure was not normalized by IVA, METO or PT. IVA and METO similarly reduced HR (Table 1). In contrast, PT had no impact on 24-hr HR compared to sedentary ATX mice (Table 1). Trained mice were indeed active for a cumulative time of 9 ± 1 h daily (during night time, Fig. 1), running 6.2 ± 0.6 km/day at a speed of 11 ± 1 m/min with an average running HR of 623 ± 47 bpm, which is significantly higher than sedentary 6-mo ATX mice (504 ± 15 bpm, $P<0.05$); when mice were not running, HR was 452 ± 20 bpm which tended to be lower than sedentary 6-mo ATX mice ($P=0.086$) and which is not significantly different from IVA and METO-treated mice. In the group of trained mice, the daily (9 h of running and 15 h of rest) HR, *i.e.* the mean cumulative HR at rest and during running was therefore not significantly different from sedentary 6-mo ATX mice (Table 1, Fig. 1). Weekly HR acquisition by tail-cuff used in parallel during the protocol of PT, reinforces data obtained by telemetry revealing a 10 % reduction in HR at rest in 6-mo trained (612 ± 18 bpm; $n=6$, $P<0.05$) compared with sedentary ATX mice (678 ± 16 bpm; $n=6$).

Carotid artery compliance. Compared to 6-mo WT mice, carotid arteries from 6-mo ATX mice were less compliant, as illustrated by a decrease of the circumferential strain from 120 to 180 mm Hg (Fig. 2A). IVA and METO, but not PT, equally reduced carotid stiffness (Fig. 2B).

Cerebral artery compliance and endothelial function. Cerebral artery compliance increased with age in WT mice, a change magnified by atherosclerosis in ATX mice (Fig. 3A). The circumferential strain of cerebral arteries from 3-mo ATX mice was similar to that measured in 6-mo WT mice (Fig. 3A). The increase in strain of cerebral arteries of ATX mice was associated with an increase in incremental distensibility (ID) between 20 and 60 mm Hg (Fig. 3B). In parallel, endothelium-dependent flow-

mediated dilation (FMD) was significantly reduced in cerebral arteries from 3- and 6-mo ATX mice at 6.7 ± 0.4 and 12.1 ± 0.5 dynes/cm², when compared to age-matched WT mice (Fig. 3C). The effect of N^w-nitro-L-arginine (L-NNA, 10 μM), an inhibitor of eNOS, was tested on the responses to flow: as previously reported (22), in 3- and 6-mo WT mice, FMD is clearly eNOS-dependent and almost abolished by L-NNA (Fig. 3D-E). In 3-mo ATX mice, FMD are reduced when compared to WT mice, but the response is still sensitive to L-NNA (Fig. 3D). In 6-mo ATX mice, FMD are very low, in the presence or absence of L-NNA, suggesting major eNOS dysfunction (Fig. 3E).

IVA normalized the strain of cerebral arteries at physiological pressures from 60 to 80 mm Hg (Fig. 4A), attributable to the maintenance of the distensibility between 20 and 60 mm Hg. IVA also prevented further decline in endothelial dysfunction in ATX mice, illustrated by a greater FMD at 16.3 ± 0.6 dynes/cm² compared to cerebral arteries isolated from 6-mo untreated ATX mice (Fig. 4A) but a similar endothelial dysfunction compared to 3-mo ATX sedentary mice (Fig. 3C). In contrast, METO tended to further impair strain and ID and significantly worsened FMD (Fig. 4B).

After 3 months of voluntary exercise (PT), the strain and ID were completely normalized to WT values (Fig. 4C) and thus improved compared to 3-mo ATX sedentary mice (Fig. 3C). In cerebral arteries from trained ATX mice, FMD induced by shear stresses from 3.2 ± 0.2 to 17.0 ± 0.1 dynes/cm² were increased compared to arteries from 6-mo sedentary ATX (Fig. 4C), and endothelial function was even normalized to WT values from 7.1 ± 0.4 to 11.6 ± 0.4 dynes/cm² (Fig. 4C), demonstrating that PT not only stopped but also reversed the endothelial dysfunction in ATX mice.

When all groups are considered, there is a negative correlation ($p < 0.05$, $r = 0.824$) between cerebral FMD obtained at 12.0 ± 0.5 dyn/cm² (the only physiological shear stress shared between the different groups of mice) and the cerebral circumferential strain measured at the physiological intra-luminal pressure of 60 mm Hg (Fig. 5).

Factors modulating cerebrovascular compliance. We tested whether the lipid composition of cerebral vessels could underly the increase in compliance by altering the membrane fluidity of the cells. The content of fatty acids and cholesterol in cerebral

vessels was, however, similar between WT and severely dyslipidemic ATX mice (Table 2).

We also tested whether differences in pulse pressure could contribute to the changes in compliance: the pulse pressure, calculated from the systolic and diastolic blood pressure measured by tail-cuff, were similar between the groups of mice (Table 1).

Changes in the hemodynamic environment associated with atherosclerosis, such as oxidative stress and nitric oxide (NO) bioavailability, are known to trigger MMP-dependent remodeling (30). Such remodeling could affect cerebrovascular compliance. Accordingly, MMP-9 activity increased in cerebral vessels from 3 to 6-mo in WT and ATX mice (Fig. 6); MMP-9 activity was, however, higher in 6-mo ATX compared to age-matched WT mice, and this was prevented by IVA and PT, but not by METO (Fig. 6). MMP-2 activity was very low and similar between all groups (data not shown).

We finally tested whether the collagen type I or III (Col I/III) content of cerebral blood vessels could be modified by severe dyslipidemia and modulated by IVA, METO and PT. Cerebrovascular Col I/III protein expression was similar between WT and ATX mice and was not altered by treatments or by PT (Fig. 7A, B). Collagen type IV and V were not detected. Histological analysis of collagen expression (Verhoeff-Van Gieson staining, Fig. 7E) did not enable to revealed differences between cerebral arteries isolated from 6-mo WT and ATX mice (Fig. 6). Elastin expression was similar between 6-mo WT and ATX mice (Fig. 7C, D).

Atherosclerotic Plaque Progression. ATX mice spontaneously develop atherosclerotic plaque in the aorta and the carotid arteries. The lesions, hardly noticeable at 3-mo, covered 7.1 ± 1.6 % of the total surface of the thoracic aorta at 6-mo, including the aortic arch (Fig. 8). IVA significantly slowed plaque progression; METO tended to decrease it as well, while PT did not limit plaque progression. No atherosclerotic plaques were observed in cerebral arteries.

Discussion

The results of this study demonstrate for the first time that, in mice, severe dyslipidemia is associated with a paradoxical increase in cerebrovascular compliance and that while chronic HR-associated mechanical stress directly contributes to carotid artery stiffening, cerebrovascular compliance is essentially regulated by the endothelium. These conclusions are indirectly validated through the use of three experimental approaches, (1) IVA that reduced HR and thus mechanical stress, maintained endothelial function and cerebrovascular compliance, (2) METO that also reduced HR, but worsened endothelial function and did not maintain the compliance, and (3) PT that normalized the endothelial function and cerebrovascular compliance without reducing mechanical stress.

Previous studies demonstrated that dyslipidemia has a significant impact on conduit artery stiffness (3, 7, 15, 59). Accordingly, we found that carotid arteries stiffened from the age of 3 to 6 months in ATX, but not in WT mice. In contrast to the carotids, cerebral arteries isolated from ATX mice were more compliant, suggestive of a weakening of the wall. Although similar increased cerebrovascular compliance had been previously reported in animal models of hypertension (4, 5), PPAR γ inhibition (12, 32) and ischemia/reperfusion (35), this is the first study to report such a paradoxical cerebrovascular wall weakening in a mouse model of severe dyslipidemia and atherosclerosis in the large peripheral conductance arteries.

The beneficial effect of voluntary PT on cerebrovascular compliance indirectly demonstrates that the endothelium, but not the mechanical stress, tightly controls wall biomechanics. Voluntary running, which did not reduce HR over a 24hr-period (Table 1), not only maintained but also improved endothelial function (eNOS-dependent flow-mediated dilation, Fig. 4C) and normalized both cerebrovascular compliance (Fig. 4C) and MMP-9 activity (Fig. 6). Exercise induces acute increases in blood flow and thus shear-stress, a stimulus known to improve the endothelial function by up-regulating eNOS activity (25, 63). There is, however, an apparent disconnect between the beneficial effect of PT on the cerebral arteries (Fig. 4C) and its lack of effect on both carotid stiffness (Fig. 2) and aortic plaque size (Fig. 8). In contrast to PT, HR reduction by IVA and METO (Table 1) equally reduced carotid stiffness (Fig. 2), demonstrating

that the cyclic mechanical stress is critical for determining carotid elasticity, in accordance with previous reports in animal models of atherosclerosis (3, 7). Although exercise reduced resting HR 15 hrs per day, it has been at the expense of a significant increase in HR during exercise for a cumulative time of 9 h (Fig. 1): therefore, over a 24 h-period, HR averaged 516 bpm in trained ATX mice (Table 1), which is not different from sedentary mice. In contrast, HR averaged 435 bpm in ATX mice treated with IVA or METO. This represents a reduction of 80 bpm in treated mice compared to PT mice, *i.e.* a reduction of 115,200 heartbeats per 24 h (Fig. 1). Therefore, because of the supreme importance of HR and accumulated cyclic stress on large elastic stiffness, the lack of effect of PT observed on large elastic artery stiffness and plaque formation could be explained. In monkeys (62) and humans (34), moderate exercise (<3 hrs per week) was associated with a small reduction in resting HR without preventing plaque progression despite improving the endothelial function (62). Only intensive training (>5 hrs per week) led to a reduction in plaque size in humans (34). Furthermore, it has been reported that 1-hr daily forced exercise in high-fat fed LDL $r^{-/-}$ mice slowed plaque progression (48): although in the latter study no hemodynamic data were reported, this experimental approach decreases resting HR in rats (9). Hence, voluntary exercise in mice may represent a low to moderate exercise activity in humans. Another discrepancy is that METO did not prevent plaque progression as well as IVA (Fig. 8) despite equal HR reduction; this may be dependent on the deleterious effect of METO on the endothelial function (Fig. 4B). This would therefore suggest that if HR is essential for plaque progression, the endothelium could modulate its growth. We previously observed that plaque progresses, although not as rapidly, under an endothelium with a perfectly normal function in ATX mice treated with the polyphenol catechin, which does not reduce HR (31).

We previously reported that IVA has no direct vascular effects (23). Therefore, the beneficial effects of pure HR reduction by IVA on the cerebral endothelial function in ATX mice (Fig. 4A) also demonstrate that the cardiac cycle magnifies the endothelial damage induced by severe dyslipidemia. While IVA has been previously shown to improve carotid distensibility in WKY rats and wall stress in SHR (2), IVA also prevented the decline in aorta endothelial relaxant function in dyslipidemic mice and

increased brain capillary density (17, 18). Because IVA is highly specific for its molecular target, these data suggest that in addition of inducing elastic artery fatigue and stiffness, cyclic mechanical stress is responsible for magnifying the endothelial damage induced by severe dyslipidemia, which favours cerebral artery wall weakening (19, 58).

The molecular mechanism by which a reduction in HR is beneficial to the cardiovascular system remains, however, unclear. In large elastic arteries, it is accepted that age-dependent stiffness is dependent of wall fatigue (51) and that this process is magnified by risk factors for cardiovascular diseases (41). Our data suggest that in muscular cerebral arteries, a reduction in the mechanical stress will likely tip the balance towards maintenance mechanisms allowing for slowing the damages that target the endothelium. The deleterious effects of METO on the endothelial function and cerebral compliance (Fig. 4B) suggest that β_1 -AR, expressed on the endothelium (20), could contribute to the maintenance of vessel integrity (23). It has been postulated that catecholamines act as endothelial cell survival factors (16, 27, 40). Recently, β -AR stimulation during voluntary exercise has been shown to be instrumental to the cardiac protection following ischemia in mice (12). By extension, circulating catecholamines could protect the cerebral arteries during exercise as well as at rest. Our data support this concept, since antagonism of cerebrovascular β -AR with METO fully counteracted the beneficial effects of HR lowering that were evidenced by IVA in our study (Fig. 4A, B) and in others (18).

In addition to the *catecholamine hypothesis* proposed above, MMP-2 and -9 have been widely studied for their implication in vascular remodelling since they cleave the basal membrane, collagens (type III, IV and V), elastin and laminin (49). We observed that MMP-9 activity was augmented in cerebral vessels from 6-mo ATX mice (Fig. 6). Such increase in MMP-9 activity could reduce arterial stiffness by disturbing the cell-to-cell connections and their matrix; this would likely be sufficient to weaken the wall since, like in humans, mouse cerebral arteries lack external elastic lamina and adventitia (44). In addition, this increase in MMP-9 activity is in accordance with the magnified endothelial dysfunction observed in ATX mice (Fig. 3C), since oxidative stress and nitric oxide (NO) bioavailability are known to trigger MMP-dependent remodeling (30);

likewise, in eNOS^{-/-} mice, cerebral artery walls are weakened and this is independent of pulse pressure (6). Exercise and IVA, but not METO, strongly reduced MMP-9 activity compared with sedentary and untreated ATX mice (Fig. 6), which is associated with better eNOS-dependent flow-mediated dilation and the normalization of cerebrovascular compliance (Fig. 4). On the other hand, the direct impact of MMPs activity on the endothelial function remains to be studied. Of interest, MMP-9 has been reported to inactivate endothelial β_2 -AR by cleavage of their extracellular domain, reducing endothelium-dependent relaxation (54) providing a mechanism by which MMPs could also reduce endothelial function independently of a reduced eNOS function.

Baumbach *et al.* proposed that the increase in cerebral arteriolar compliance associated with hypertension is linked to a reduction in the stiff collagen *versus* the compliant elastin contained in the arteriolar wall extracellular matrix (5). Collagen I and III are the most prominent types in the vasculature, 60 % and 30 %, respectively, of total collagen content (10). We did not find a significant difference in collagen I and III expression among the different groups of mice (Fig. 7A, B). At 6-mo, elastin content was not altered by severe dyslipidemia (Fig. 7C, D, E). We also tested whether the lipid composition of cerebral vessels could underly the increase in compliance by altering the membrane fluidity of the cells as well as cell mass, but we found that the lipid composition was identical in WT and ATX mice (Table 2). This is, however, the first report of vascular wall lipid composition of total mouse cerebral vessels. Therefore, neither collagen and elastin expression *per se*, nor lipid composition of the arterial wall seems to account for the changes in cerebral compliance associated with severe dyslipidemia.

Changes in cerebrovascular wall thickness, such as an increase in vascular smooth muscle, one of the most compliant components of the vascular wall, could account for the increase in cerebrovascular compliance observed in ATX mice (Fig. 3A). Vessel hypertrophy was not evaluated in the present study, but when compared to WT mice, lumen diameter decreased in cerebral arteries from 6-mo ATX mice, wall thickness increased and as a result, the wall-to-lumen ratio increased significantly (data not shown). However, while IVA, METO and exercise significantly increased the inner

diameter in cerebral arteries from ATX mice (data not shown), only IVA and exercise prevented the rise in compliance (Fig. 4). Therefore, changes in passive structure (wall thickness, inner diameter, wall-to-lumen ratio) may contribute to the observed alterations in the vascular compliance, while other pathways, such the rise in MMP-9, may be more important.

Limits of the study:

While cerebrovascular compliance and endothelial function were assessed in arteries from the circle of Willis, all the molecular biology studies (MMPs activity, collagen and elastin protein expression) were conducted in blood vessels extracted from the whole brain (including the circle of Willis). Since the cerebral arteries and the whole brain blood vessels are of different origin and exposed to different hemodynamic factors, conclusions should be made with caution. Another limit of the study is that active MMP-2 activity is also revealed while evaluating MMP-9 activity. However, the signal concerning MMP-2 was low when compared to that of MMP-9. Finally, the conclusion that changes in compliance in cerebral arteries in ATX mice were regulated by endothelial function is based on indirect evidences. In the literature, although never directly tested, endothelial function and arterial stiffness of large peripheral elastic arteries have been suggested to be closely associated. To the best of our knowledge, direct endothelium-dependent regulation of cerebrovascular compliance has never been reported, and we are the first to suggest a link between the two parameters.

In summary, the stiffening of the carotid arteries observed in atherosclerotic mice is predominantly related to HR-associated cyclic stress and independent of the endothelial function. In contrast, cerebral arteries from ATX mice are characterized by an increased compliance suggestive of a weakening of the wall, a change that can be prevented by maintaining or improving cerebral endothelial function by a chronic treatment with IVA or by voluntary exercise, respectively. By reducing HR and thus by decreasing the mechanical strain stress directly applied onto the cerebral endothelium, IVA maintained cerebral endothelial function without improving it, reduced MMP-9 activity, and in turn was able to prevent cerebral arterial wall functional remodelling. Voluntary exercise training maximized these benefits likely through mechanisms involving physiological

transient increases in shear stress and sympathetic tone. This study has marked clinical relevance since cerebral endothelial function and compliance are critical for the ability of cerebral arterioles to maintain their auto-regulatory functions, which are known to decline with age and prematurely in the presence of risk factors for cardiovascular diseases, leading to impaired cognitive functions and dementia.

Sources of funding: This work has been supported in part by the Montreal Heart Institute Foundation, the Heart and Stroke Foundation of Quebec, the Canadian Institutes of Health Research (MOP89733) and by an unrestricted educational grant from Servier (France). A. Drouin holds the *Frederick Banting and Charles Best Canada Graduate Scholarships - Doctoral Award* in association with the Canadian Institutes for Health Research.

Conflicts of interest/Disclosures: Supported in part by an unrestricted educational grant from Servier (CdR, JCT and ET).

References

1. **Aatola H, Koivisto T, Hutri-Kahonen N, Juonala M, Mikkilä V, Lehtimäki T, Viikari JS, Raitakari OT, and Kahonen M.** Lifetime fruit and vegetable consumption and arterial pulse wave velocity in adulthood: the Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *Circulation* 122: 2521-2528, 2010.
2. **Albaladejo P, Carusi A, Apartian A, Lacolley P, Safar ME, and Benetos A.** Effect of chronic heart rate reduction with ivabradine on carotid and aortic structure and function in normotensive and hypertensive rats. *J Vasc Res* 40: 320-328, 2003.
3. **Bassiouny HS, Zarins CK, Kadowaki MH, and Glagov S.** Hemodynamic stress and experimental aortoiliac atherosclerosis. *J Vasc Surg* 19: 426-434, 1994.
4. **Baumbach GL and Heistad DD.** Remodeling of cerebral arterioles in chronic hypertension. *Hypertension* 13: 968-972, 1989.
5. **Baumbach GL, Sigmund CD, and Faraci FM.** Cerebral arteriolar structure in mice overexpressing human renin and angiotensinogen. *Hypertension* 41: 50-55, 2003.
6. **Baumbach GL, Sigmund CD, and Faraci FM.** Structure of cerebral arterioles in mice deficient in expression of the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Circ Res* 95: 822-829, 2004.
7. **Beere PA, Glagov S, and Zarins CK.** Retarding effect of lowered heart rate on coronary atherosclerosis. *Science* 226: 180-182, 1984.
8. **Benetos A, Thomas F, Bean KE, Pannier B, and Guize L.** Role of modifiable risk factors in life expectancy in the elderly. *J Hypertens* 23: 1803-1808, 2005.
9. **Benito B, Gay-Jordi G, Serrano-Mollar A, Guasch E, Shi Y, Tardif JC, Brugada J, Nattel S, and Mont L.** Cardiac arrhythmogenic remodeling in a rat model of long-term intensive exercise training. *Circulation* 123: 13-22, 2011.
10. **Borel JP and Bellon G.** [Vascular collagens. General review]. *Pathol Biol (Paris)* 33: 254-260, 1985.
11. **Brouillette J, Grandy SA, Jolicœur P, and Fiset C.** Cardiac repolarization is prolonged in CD4C/HIV transgenic mice. *J Mol Cell Cardiol* 43: 159-167, 2007.
12. **Calvert JW, Elston M, Pablo Aragon J, Nicholson CK, Moody BF, Hood RL, Sindler A, Gundewar S, Seals DR, Barouch LA, and Lefer DJ.** Exercise Protects Against Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury via Stimulation of b3-

Adrenergic Receptors and Increased Nitric Oxide Signaling: Role of Nitrite and Nitrosothiols. *Circ Res*, 2011.

13. **Chan SL, Chapman AC, Sweet JG, Gokina NI, and Cipolla MJ.** Effect of PPARgamma inhibition during pregnancy on posterior cerebral artery function and structure. *Front Physiol* 1: 130, 2010.

14. **Chatzizisis YS and Giannoglou GD.** Coronary hemodynamics and atherosclerotic wall stiffness: a vicious cycle. *Med Hypotheses* 69: 349-355, 2007.

15. **Cheng HM, Ye ZX, Chiou KR, Lin SJ, and Charng MJ.** Vascular stiffness in familial hypercholesterolaemia is associated with C-reactive protein and cholesterol burden. *Eur J Clin Invest* 37: 197-206, 2007.

16. **Ciccarelli M, Cipolletta E, Santulli G, Campanile A, Pumiglia K, Cervero P, Pastore L, Astone D, Trimarco B, and Iaccarino G.** Endothelial beta2 adrenergic signaling to AKT: role of Gi and SRC. *Cell Signal* 19: 1949-1955, 2007.

17. **Custodis F, Baumhake M, Schlimmer N, List F, Gensch C, Bohm M, and Laufs U.** Heart rate reduction by ivabradine reduces oxidative stress, improves endothelial function, and prevents atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 117: 2377-2387, 2008.

18. **Custodis F, Gertz K, Balkaya M, Prinz V, Mathar I, Stamm C, Kronenberg G, Kazakov A, Freichel M, Bohm M, Endres M, and Laufs U.** Heart Rate Contributes to the Vascular Effects of Chronic Mental Stress: Effects on Endothelial Function and Ischemic Brain Injury in Mice. *Stroke*, 2011.

19. **Custodis F, Schirmer SH, Baumhake M, Heusch G, Bohm M, and Laufs U.** Vascular pathophysiology in response to increased heart rate. *J Am Coll Cardiol* 56: 1973-1983, 2010.

20. **Daly CJ, Ross RA, Whyte J, Henstridge CM, Irving AJ, and McGrath JC.** Fluorescent ligand binding reveals heterogeneous distribution of adrenoceptors and 'cannabinoid-like' receptors in small arteries. *Br J Pharmacol* 159: 787-796, 2010.

21. **Diaz A, Bourassa MG, Guertin MC, and Tardif JC.** Long-term prognostic value of resting heart rate in patients with suspected or proven coronary artery disease. *Eur Heart J* 26: 967-974, 2005.

22. **Drouin A, Bolduc V, Thorin-Trescases N, Belanger E, Fernandes P, Baraghis E, Lesage F, Gillis MA, Villeneuve L, Hamel E, Ferland G, and Thorin E.** Catechin treatment improves cerebrovascular flow-mediated dilation and learning abilities in atherosclerotic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 300: H1032-1043, 2011.
23. **Drouin A, Gendron ME, Thorin E, Gillis MA, Mahlberg-Gaudin F, and Tardif JC.** Chronic heart rate reduction by ivabradine prevents endothelial dysfunction in dyslipidaemic mice. *Br J Pharmacol* 154: 749-757, 2008.
24. **Drouin A and Thorin E.** 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, 2009.
25. **Duncker DJ and Bache RJ.** Regulation of coronary blood flow during exercise. *Physiol Rev* 88: 1009-1086, 2008.
26. **Durrant JR, Seals DR, Connell ML, Russell MJ, Lawson BR, Folian BJ, Donato AJ, and Lesniewski LA.** Voluntary wheel running restores endothelial function in conduit arteries of old mice: direct evidence for reduced oxidative stress, increased superoxide dismutase activity and down-regulation of NADPH oxidase. *J Physiol* 587: 3271-3285, 2009.
27. **Figuroa XF, Poblete I, Fernandez R, Pedemonte C, Cortes V, and Huidobro-Toro JP.** NO production and eNOS phosphorylation induced by epinephrine through the activation of beta-adrenoceptors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297: H134-143, 2009.
28. **Fox K, Ford I, Steg PG, Tendera M, Robertson M, and Ferrari R.** Heart rate as a prognostic risk factor in patients with coronary artery disease and left-ventricular systolic dysfunction (BEAUTIFUL): a subgroup analysis of a randomised controlled trial. *Lancet* 372: 817-821, 2008.
29. **Fujimoto N, Prasad A, Hastings JL, Arbab-Zadeh A, Bhella PS, Shibata S, Palmer D, and Levine BD.** Cardiovascular effects of 1 year of progressive and vigorous exercise training in previously sedentary individuals older than 65 years of age. *Circulation* 122: 1797-1805, 2010.

30. **Galis ZS and Khatri JJ.** Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res* 90: 251-262, 2002.
31. **Gendron ME, Theoret JF, Mamarbachi AM, Drouin A, Nguyen A, Bolduc V, Thorin-Trescases N, Merhi Y, and Thorin E.** Late chronic catechin antioxidant treatment is deleterious to the endothelial function in aging mice with established atherosclerosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 298: H2062-2070, 2010.
32. **Halabi CM, Beyer AM, de Lange WJ, Keen HL, Baumbach GL, Faraci FM, and Sigmund CD.** Interference with PPAR gamma function in smooth muscle causes vascular dysfunction and hypertension. *Cell Metab* 7: 215-226, 2008.
33. **Hambrecht R, Adams V, Erbs S, Linke A, Krankel N, Shu Y, Baither Y, Gielen S, Thiele H, Gummert JF, Mohr FW, and Schuler G.** Regular physical activity improves endothelial function in patients with coronary artery disease by increasing phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 107: 3152-3158, 2003.
34. **Hambrecht R, Niebauer J, Marburger C, Grunze M, Kalberer B, Hauer K, Schlierf G, Kubler W, and Schuler G.** Various intensities of leisure time physical activity in patients with coronary artery disease: effects on cardiorespiratory fitness and progression of coronary atherosclerotic lesions. *J Am Coll Cardiol* 22: 468-477, 1993.
35. **Jimenez-Altayo F, Martin A, Rojas S, Justicia C, Briones AM, Giraldo J, Planas AM, and Vila E.** Transient middle cerebral artery occlusion causes different structural, mechanical, and myogenic alterations in normotensive and hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293: H628-635, 2007.
36. **Juonala M, Magnussen CG, Venn A, Dwyer T, Burns TL, Davis PH, Chen W, Srinivasan SR, Daniels SR, Kahonen M, Laitinen T, Taittonen L, Berenson GS, Viikari JS, and Raitakari OT.** Influence of age on associations between childhood risk factors and carotid intima-media thickness in adulthood: the Cardiovascular Risk in Young Finns Study, the Childhood Determinants of Adult Health Study, the Bogalusa Heart Study, and the Muscatine Study for the International Childhood Cardiovascular Cohort (i3C) Consortium. *Circulation* 122: 2514-2520, 2010.

37. **Kleiner DE and Stetler-Stevenson WG.** Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases. *Anal Biochem* 218: 325-329, 1994.
38. **Kojda G, Cheng YC, Burchfield J, and Harrison DG.** Dysfunctional regulation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression in response to exercise in mice lacking one eNOS gene. *Circulation* 103: 2839-2844, 2001.
39. **Kokkinos P, Myers J, Faselis C, Panagiotakos DB, Doumas M, Pittaras A, Manolis A, Kokkinos JP, Karasik P, Greenberg M, Papademetriou V, and Fletcher R.** Exercise capacity and mortality in older men: a 20-year follow-up study. *Circulation* 122: 790-797, 2010.
40. **Kou R and Michel T.** Epinephrine regulation of the endothelial nitric-oxide synthase: roles of RAC1 and beta3-adrenergic receptors in endothelial NO signaling. *J Biol Chem* 282: 32719-32729, 2007.
41. **Kovacic JC, Moreno P, Hachinski V, Nabel EG, and Fuster V.** Cellular senescence, vascular disease, and aging: part 1 of a 2-part review. *Circulation* 123: 1650-1660, 2011.
42. **Laurent S and Boutouyrie P.** Arterial stiffness and stroke in hypertension: therapeutic implications for stroke prevention. *CNS Drugs* 19: 1-11, 2005.
43. **Lauzier B, Vaillant F, Gelinas R, Bouchard B, Brownsey R, Thorin E, Tardif JC, and Des Rosiers C.** Ivabradine reduces heart rate while preserving metabolic fluxes and energy status of healthy normoxic working hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 300: H845-852, 2011.
44. **Lee HY and Oh BH.** Aging and arterial stiffness. *Circ J* 74: 2257-2262, 2010.
45. **Li X, Geary GG, Gonzales RJ, Krause DN, and Duckles SP.** Effect of estrogen on cerebrovascular prostaglandins is amplified in mice with dysfunctional NOS. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287: H588-594, 2004.
46. **McEniery CM, Wallace S, Mackenzie IS, McDonnell B, Yasmin, Newby DE, Cockcroft JR, and Wilkinson IB.** Endothelial function is associated with pulse pressure, pulse wave velocity, and augmentation index in healthy humans. *Hypertension* 48: 602-608, 2006.
47. **Muller JM, Davis MJ, and Chilian WM.** Integrated regulation of pressure and flow in the coronary microcirculation. *Cardiovasc Res* 32: 668-678, 1996.

48. **Napoli C, Williams-Ignarro S, De Nigris F, Lerman LO, Rossi L, Guarino C, Mansueto G, Di Tuoro F, Pignalosa O, De Rosa G, Sica V, and Ignarro LJ.** Long-term combined beneficial effects of physical training and metabolic treatment on atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 8797-8802, 2004.
49. **Newby AC.** Metalloproteinases and vulnerable atherosclerotic plaques. *Trends Cardiovasc Med* 17: 253-258, 2007.
50. **Nigam A, Mitchell GF, Lambert J, and Tardif JC.** Relation between conduit vessel stiffness (assessed by tonometry) and endothelial function (assessed by flow-mediated dilatation) in patients with and without coronary heart disease. *Am J Cardiol* 92: 395-399, 2003.
51. **O'Rourke MF and Hashimoto J.** Mechanical factors in arterial aging: a clinical perspective. *J Am Coll Cardiol* 50: 1-13, 2007.
52. **Ochi N, Kohara K, Tabara Y, Nagai T, Kido T, Uetani E, Ochi M, Igase M, and Miki T.** Association of central systolic blood pressure with intracerebral small vessel disease in Japanese. *Am J Hypertens* 23: 889-894, 2010.
53. **Papaioannou TG, Karatzis EN, Vavuranakis M, Lekakis JP, and Stefanadis C.** Assessment of vascular wall shear stress and implications for atherosclerotic disease. *Int J Cardiol* 113: 12-18, 2006.
54. **Rodrigues SF, Tran ED, Fortes ZB, and Schmid-Schonbein GW.** Matrix metalloproteinases cleave the beta2-adrenergic receptor in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299: H25-35, 2010.
55. **Ruiz J, Antequera T, Andres AI, Petron MJ, and Muriel E.** Improvement of a solid phase extraction method for analysis of lipid fractions in muscle foods. *Analytica Chimica Acta* 520: 201-205, 2004.
56. **Sugawara J, Komine H, Hayashi K, Yoshizawa M, Yokoi T, Otsuki T, Shimojo N, Miyauchi T, Maeda S, and Tanaka H.** Effect of systemic nitric oxide synthase inhibition on arterial stiffness in humans. *Hypertens Res* 30: 411-415, 2007.
57. **Takumi T, Yang EH, Mathew V, Rihal CS, Gulati R, Lerman LO, and Lerman A.** Coronary endothelial dysfunction is associated with a reduction in coronary artery compliance and an increase in wall shear stress. *Heart* 96: 773-778, 2010.

58. **Thorin E and Thorin-Trescases N.** Vascular endothelial ageing, heartbeat after heartbeat. *Cardiovasc Res* 84: 24-32, 2009.
59. **Tonstad S, Joakimsen O, Stensland-Bugge E, Ose L, Bonnaa KH, and Leren TP.** Carotid intima-media thickness and plaque in patients with familial hypercholesterolaemia mutations and control subjects. *Eur J Clin Invest* 28: 971-979, 1998.
60. **Tounian P, Aggoun Y, Dubern B, Varille V, Guy-Grand B, Sidi D, Girardet JP, and Bonnet D.** Presence of increased stiffness of the common carotid artery and endothelial dysfunction in severely obese children: a prospective study. *Lancet* 358: 1400-1404, 2001.
61. **Tsuchikura S, Shoji T, Kimoto E, Shinohara K, Hatsuda S, Koyama H, Emoto M, and Nishizawa Y.** Central versus peripheral arterial stiffness in association with coronary, cerebral and peripheral arterial disease. *Atherosclerosis* 211: 480-485, 2010.
62. **Williams JK, Kaplan JR, Suparto IH, Fox JL, and Manuck SB.** Effects of exercise on cardiovascular outcomes in monkeys with risk factors for coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 864-871, 2003.
63. **Zhang QJ, McMillin SL, Tanner JM, Palionyte M, Abel ED, and Symons JD.** Endothelial nitric oxide synthase phosphorylation in treadmill-running mice: role of vascular signalling kinases. *J Physiol* 587: 3911-3920, 2009.

Table 1: Evolution of body weight (g), plasma lipids and glucose levels (mmol/L), heart rate (HR, bpm; telemetry), systolic blood pressure (SBP, mm Hg; tail-cuff) and pulse pressure (Pulse, mm Hg; tail-cuff) in mice.

	<i>Weight</i>	<i>Total cholesterol</i>	<i>LDL-cholesterol</i>	<i>HDL-cholesterol</i>	<i>Triglycerides</i>	<i>Glucose</i>	<i>Average 24-hr HR</i>	<i>SBP</i>	<i>Pulse</i>
<i>3-mo WT</i>	27±1 (12)	2.1±0.2 (4)	0.1±0.1 (4)	1.6±0.1 (4)	1.2±0.2 (4)	18.1±2.7 (4)	543±15 (6)	137±6 (6)	31.0±1.7 (6)
<i>3-mo ATX</i>	27±1 (15)	16.2±1.1 ** (4)	9.8±0.5 ** (4)	1.9±0.1 (4)	7.8±0.6 ** (4)	16.2±1.7 (4)	522±10 (10)	147±2 ** (23)	31.6±0.8 (23)
<i>6-mo WT</i>	38±1 ** (20)	2.3±0.2 (9)	0.7±0.2 (9)	1.2±0.1 (9)	0.8±0.1 (4)	24.0±2.4 (9)	532±12 (7)	127±3 (7)	30.3±1.9 (6)
<i>6-mo ATX</i>	31±1 * ω (20)	16.1±1.0 * (9)	10.1±0.8 * (9)	1.6±0.1 * (9)	7.4±0.8 * (9)	13.8±2.2 * (9)	504±15 (7)	149±4 * (11)	32.9±1.0 (6)
<i>6-mo ATX + IVA</i>	33±1 (11)	16.1±1.9 (4)	10.3±1.3 (4)	1.9±0.1 (4)	7.1±0.6 (4)	9.6±1.3 (4)	434±10 ϕ (6)	149±6 (6)	33.7±1.0 (11)
<i>6-mo ATX + METO</i>	32±1 (11)	20.2±1.0 ϕ (4)	13.5±0.5 ϕ (9)	1.7±0.1 (4)	9.0±0.6 (4)	11.0±1.6 (4)	439±7 ϕ (6)	150±5 (6)	37.1±2.1 (6)
<i>6-mo ATX + PT</i>	31±1 (6)	17.8±2.1 (5)	11.4±2.0 (5)	1.6±0.1 (5)	7.5±0.8 (5)	15.4±3.0 (5)	516±30 (3)	159±4 (6)	33.0±1.2 (6)

WT: wild-type mice, ATX: LDLr^{-/-}:hApoB^{+/+} mice, ATX+IVA: LDLr^{-/-}:hApoB^{+/+} mice treated with ivabradine (15 mg/kg/d), ATX+METO: LDLr^{-/-}:hApoB^{+/+} mice treated with metoprolol (80 mg/kg/d), ATX+PT: LDLr^{-/-}:hApoB^{+/+} mice subjected to 3 months of voluntary physical training, LDL: low-density lipoprotein, HDL: high-density lipoprotein. Results are mean±SEM of (n) mice.

***: P*<0.05 *versus* 3-mo WT; **: P*<0.05 *versus* 6-mo WT; ω *: P*<0.05 *versus* 3-mo ATX; ϕ *: P*<0.05 *versus* 6-mo ATX.

Table 2: Vessel wall lipid composition of total cerebral vessel from wild type (WT) and LDLr^{-/-}:hApoB^{+/+} (ATX) mice.

Fatty acids (%)	3-mo WT	3-mo ATX	6-mo WT	6-mo ATX
Palmitic acid (C:16:0)	18.9±0.8	18.8±0.7	18.5±0.4	18.0±1.0
Palmitoleic acid (C:16:1)	0	0	0	0
Stearic acid (C:18:0)	19.3±0.7	19.2±0.2	19.7±0.3	19.3±0.4
Oleic acid Ω 9 (C18:1n9)	31.2±0.9	32.2±0.8	31.7±0.9	32.3±1.4
Oleic acid Ω 7 (C18:1n7)	5.2±0.3	5.2±0.1	4.9±0.2	5.1±0.2
Linoleic acid (C18:2)	1.7±0.5	2.2±0.3	1.8±0.5	2.2±0.3
Linolenic acid Ω 6 (C18:3n6)	0	0	0	0
Linolenic acid Ω 3 (C18:3n3)	0	0	0	0
Homo-γ-linoleic acid (C20:3n6)	0	0	0	0
Arachidonic acid (C20:4)	9.9±0.3	9.7±0.3	9.9±0.2	9.9±0.2
Eicosapentanoic acid (C20:5)	0	0	0	0
Docosahexanoic acid (C22:6)	13.7±0.5	12.8±0.7	13.5±0.4	13.2±0.2
Total cholesterol (μg/mg)	7.0±0.3	7.3±0.6	NA	NA

Fatty acid composition in phospholipids is expressed as the percentage of total fatty acids detected by GC-FID. Total free cholesterol was quantified by colorimetric detection (μg/mg). Results are mean±SEM for n=4.

Figure 1: Time during which exercise occurred and changes in heart rate induced by training. **(A)** Recording of the running activity of 3 different LDLr^{-/-}:hApoB^{+/+} (ATX) mice housed in a cage with free access to a running wheel. The cumulative duration of the training, which occurred mostly during the night, was 9±1 h. **(B)** Example of the simultaneous recording of the speed of running and of the changes in heart rate (HR) monitored by telemetry in an ATX mouse. **(C)** Schematization of the heart rate in sedentary, IVA- or METO-treated ATX mice and in mice exposed to exercise. Heart rate is expressed in beats per minute (bpm) or in beats per 24 h. The difference in heart rate (Δ HR) between IVA- or METO-treated ATX mice and trained ATX mice is indicated.

Figure 2: Effect of aging and atherosclerosis on the compliance of peripheral carotid arteries expressed as strain (%) from 3- and 6-mo wild type (WT) mice and LDLr^{-/-}:hApoB^{+/+} mice (ATX) **(A)**, and **(B)** following 3 months of exposure to voluntary physical training (PT), or treatment with either ivabradine (IVA) or metoprolol (METO). Results are means±SEM of 7-16 mice. *: P<0.05 *versus* 6-mo WT; ϕ : P<0.05 IVA *versus* ATX; α : P<0.05 METO *versus* ATX.

Figure 3: Age and atherosclerosis increase cerebral compliance and alter endothelial function. Cerebrovascular compliance expressed as circumferential strain (%) **(A)**, distensibility expressed as incremental distensibility (ID, %/mm Hg) **(B)**, and flow-mediated endothelium-dependent dilation **(C)** of pressurized cerebral arteries from 3- and 6-mo wild type (WT) mice and LDLr^{-/-}:hApoB^{+/+} mice (ATX). Effects of eNOS inhibition by L-NNA on flow-mediated dilation of cerebral arteries isolated from 3-mo WT and ATX mice **(D)** and 6-mo WT and ATX mice **(E)**. Results are means±SEM of 7 mice.

** ϕ : P<0.05 *versus* 3-mo WT mice; * ϕ : P<0.05 *versus* 6-mo WT mice; ω : P<0.05 *versus* 3-mo ATX mice.

Figure 4: Effect of a chronic treatment of 6-mo LDLr^{-/-}:hApoB^{+/+} mice (ATX) with **(A)** ivabradine (IVA), **(B)** metoprolol (METO) and **(C)** exposure to voluntary physical

training (PT) on the cerebral compliance expressed as circumferential strain (%), the distensibility expressed as incremental distensibility (ID, %/mm Hg) and flow-mediated endothelium-dependent dilation of pressurized cerebral arteries. Results are means \pm SEM of 6 to 10 mice.

*: $P < 0.05$ versus 6-mo WT mice; ϕ : $P < 0.05$ versus 6-mo ATX mice.

Figure 5: Correlation between endothelial flow-mediated dilation (%) observed at 12.0 ± 0.5 dyn/cm² and the circumferential strain (%) observed at an intra-luminal pressure of 60 mm Hg, in cerebral arteries isolated from 3- and 6-mo WT mice and LDLr^{-/-}:hApoB^{+/+} (ATX) mice, and in 6-mo ATX mice treated for 3 months with either ivabradine (IVA) or metoprolol (METO), or ATX mice exposed for 3 months to voluntary physical training (PT). There is a negative and significant correlation between both parameters ($P = 0.0227$, $r = 0.824$, $n = 7$).

Results are means \pm SEM.

Figure 6: (A) Representative example of zymography illustrating MMP-9 activities of cerebral vessels from WT and LDLr^{-/-}:hApoB^{+/+} (ATX) mice. (B) Effect of a chronic treatment of 6-mo ATX mice with ivabradine (IVA) or metoprolol (METO) and after 3-month exposure to voluntary physical training (PT) on the gelatinase activity of cerebral vessels. Each graph represents the % of changes to respective controls. Results are means \pm SEM of 6 mice. **: $P < 0.05$ versus 3-mo WT mice; *: $P < 0.05$ versus 6-mo WT mice; ω : $P < 0.05$ versus 3-mo ATX mice; ϕ : $P < 0.05$ versus 6-mo ATX mice.

Figure 7: (A) Representative example of Western Blot illustrating collagen I and III (Col I/III) protein expression of total cerebral vessels from wild type (WT) and LDLr^{-/-}:hApoB^{+/+} (ATX) mice. (B) Effect of a chronic treatment of 6-mo ATX mice with ivabradine (IVA) or metoprolol (METO) and after 3-month of exposure to voluntary exercise (PT) on Col I/III protein expression of total cerebral vessels. Each graph represents the protein abundance normalized to its respective internal standard after adjusting for loading with Ponceau red. Results are means \pm SEM of 4 mice. (C) Representative example of Western Blot illustrating elastin protein expression of total

cerebral vessels from wild type (WT) and LDLr^{-/-}:hApoB^{+/+} (ATX) mice. **(D)** Elastin protein abundancy after adjusting for loading with α -actin. Results are means \pm SEM of 4 mice. **(E)** Representative example of cerebral arteries stained with Verhoeff-Van Gieson to reveal elastic fibers in black and collagen in red (x100). No differences were detected between cerebral arteries isolated from 6-mo WT and ATX mice.

Figure 8: Effect of 3 months chronic treatment of LDLr^{-/-}:hApoB^{+/+} (ATX) mice with ivabradine (IVA) or metoprolol (METO) and effect of 3 months exposure to voluntary physical training (PT) on the the progression of atherosclerotic lesions in the aortic arch and thoracic aorta. Aortic lesions quantification in **(A)** and representative picture of Oil Red O-stained aorta in **(B)**. Results are means \pm SEM of 9-20 mice. *: P<0.05 *versus* 6-mo WT mice; ω : P<0.05 *versus* 3-mo ATX mice; ϕ : P<0.05 *versus* 6-mo ATX mice.

Figure 1

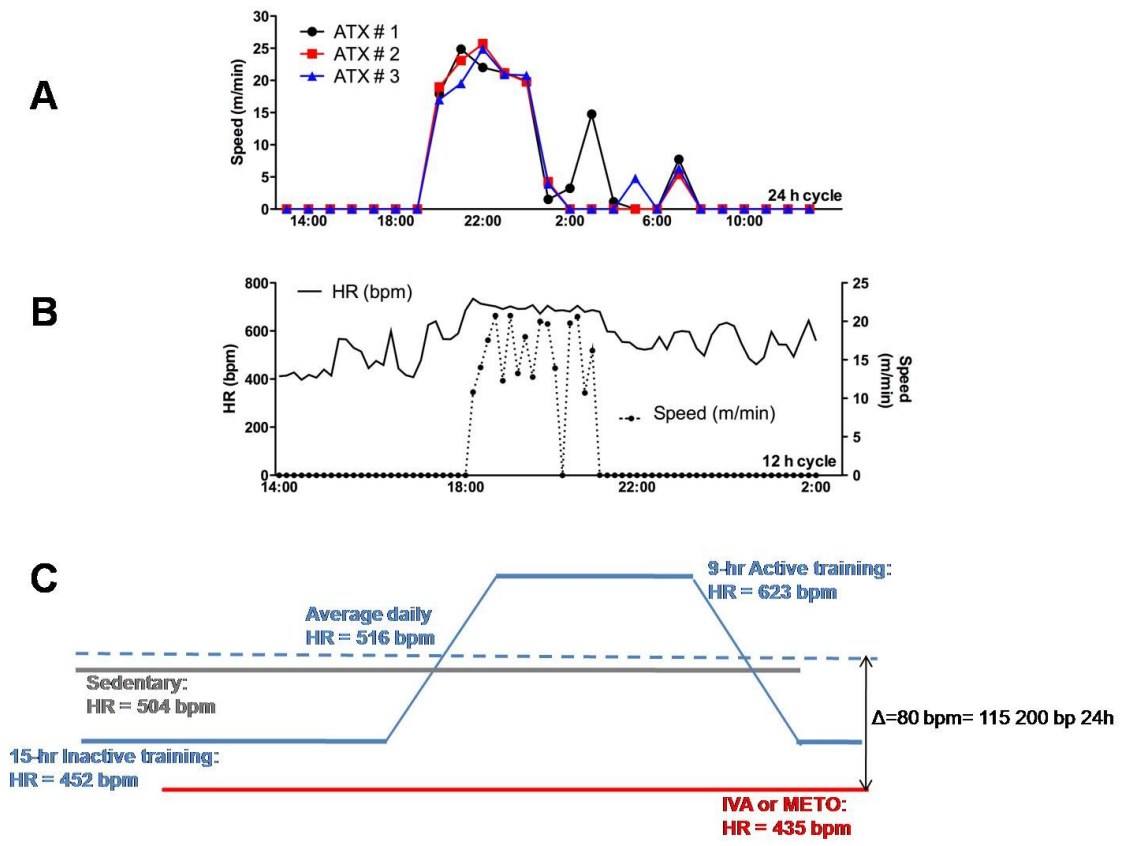


Figure 2

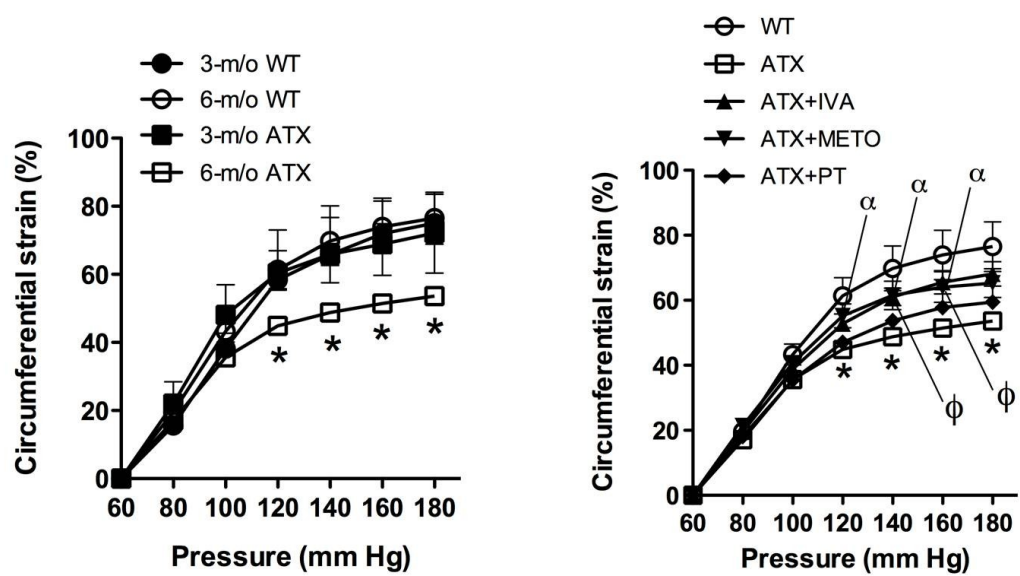


Figure 3

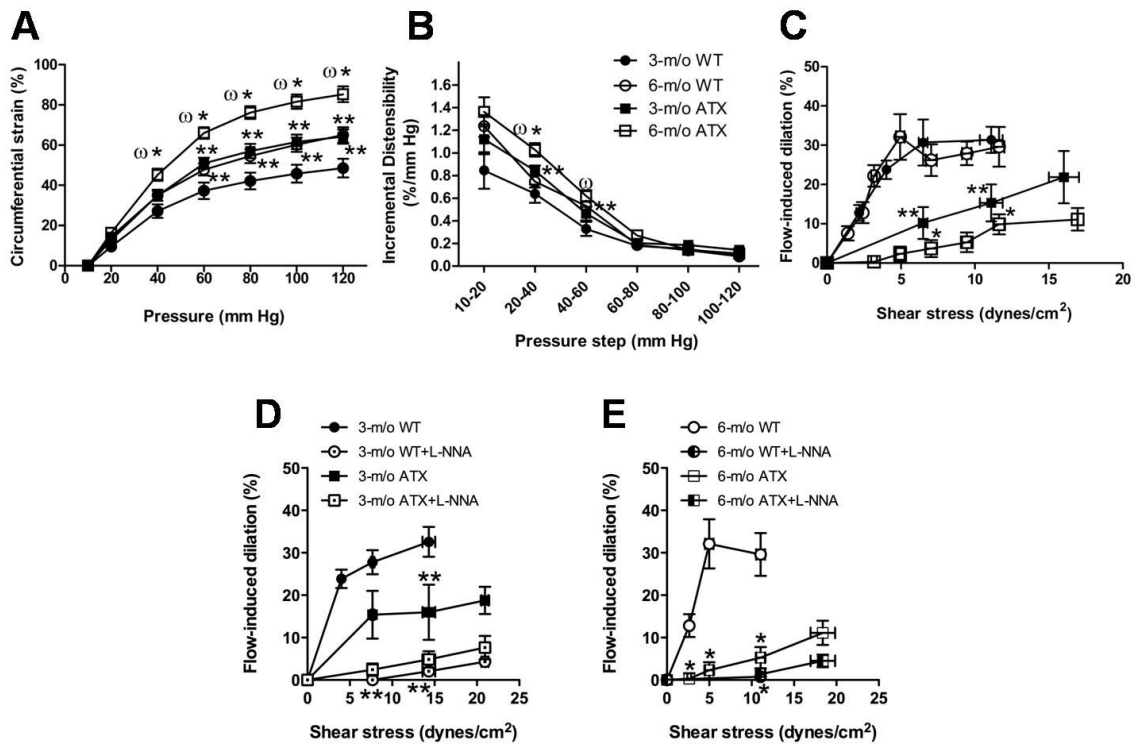


Figure 4

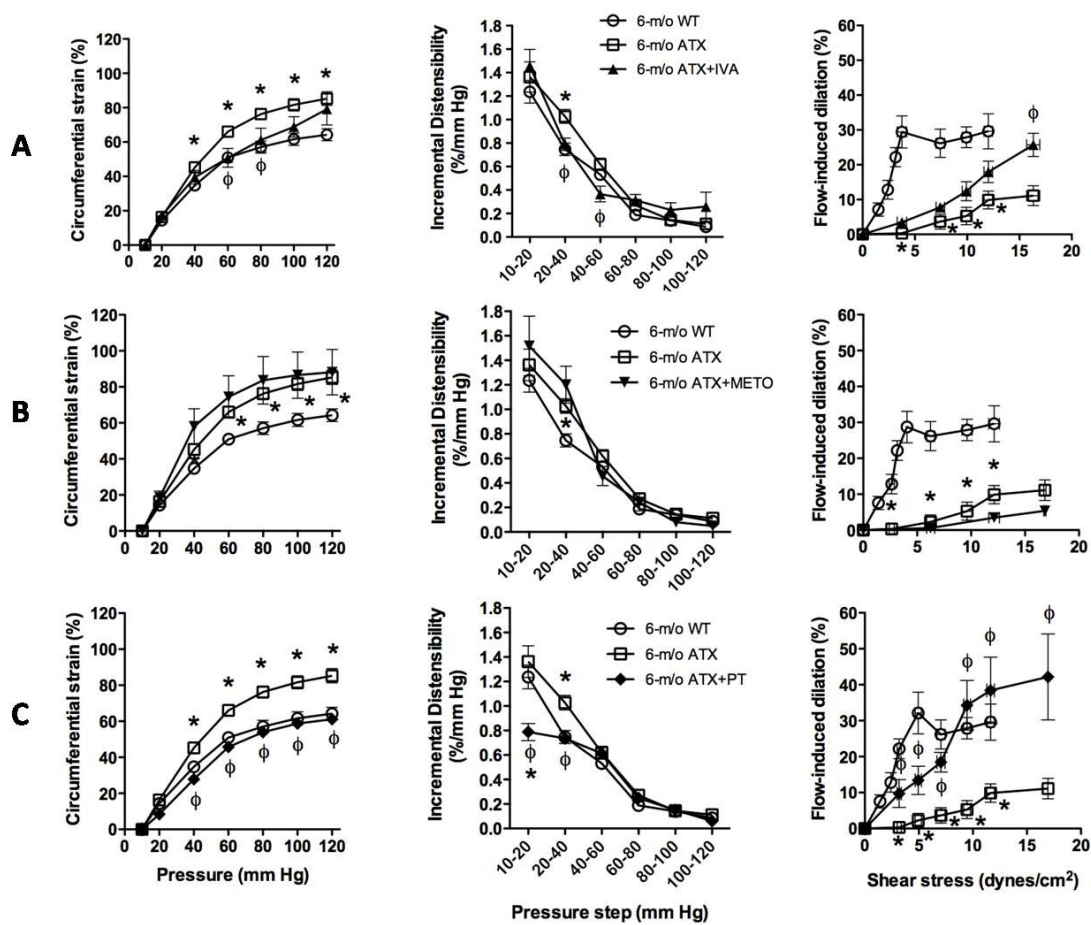


Figure 5

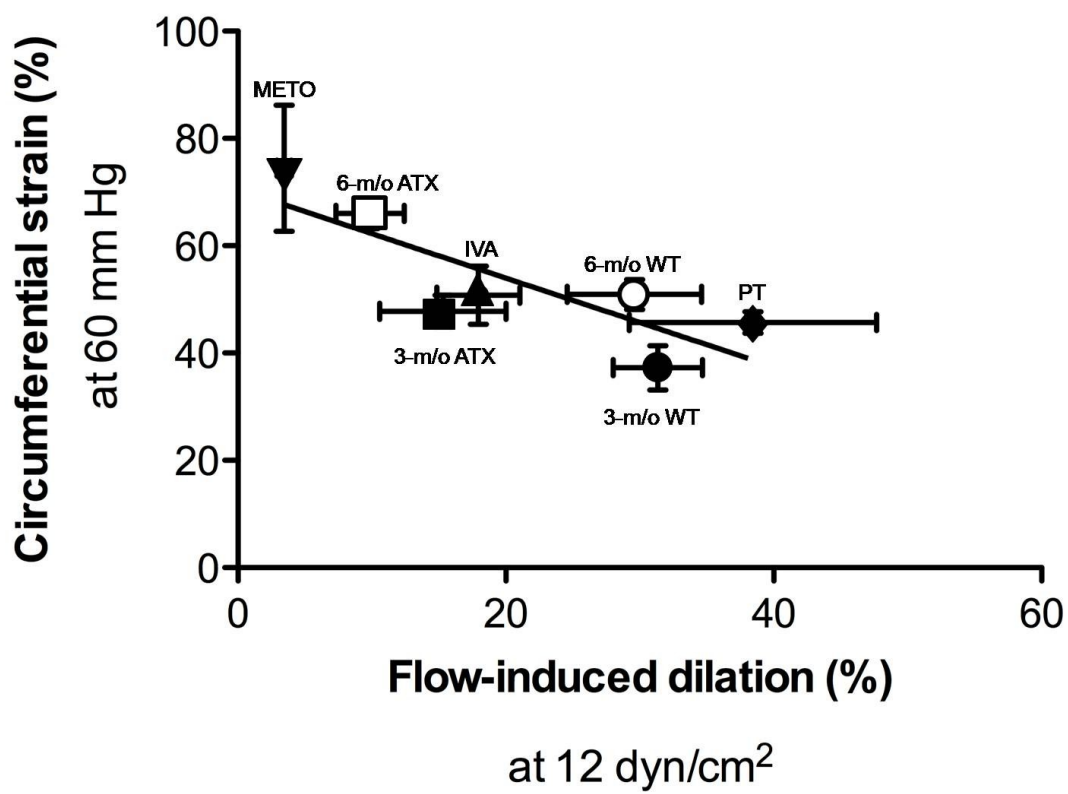


Figure 6

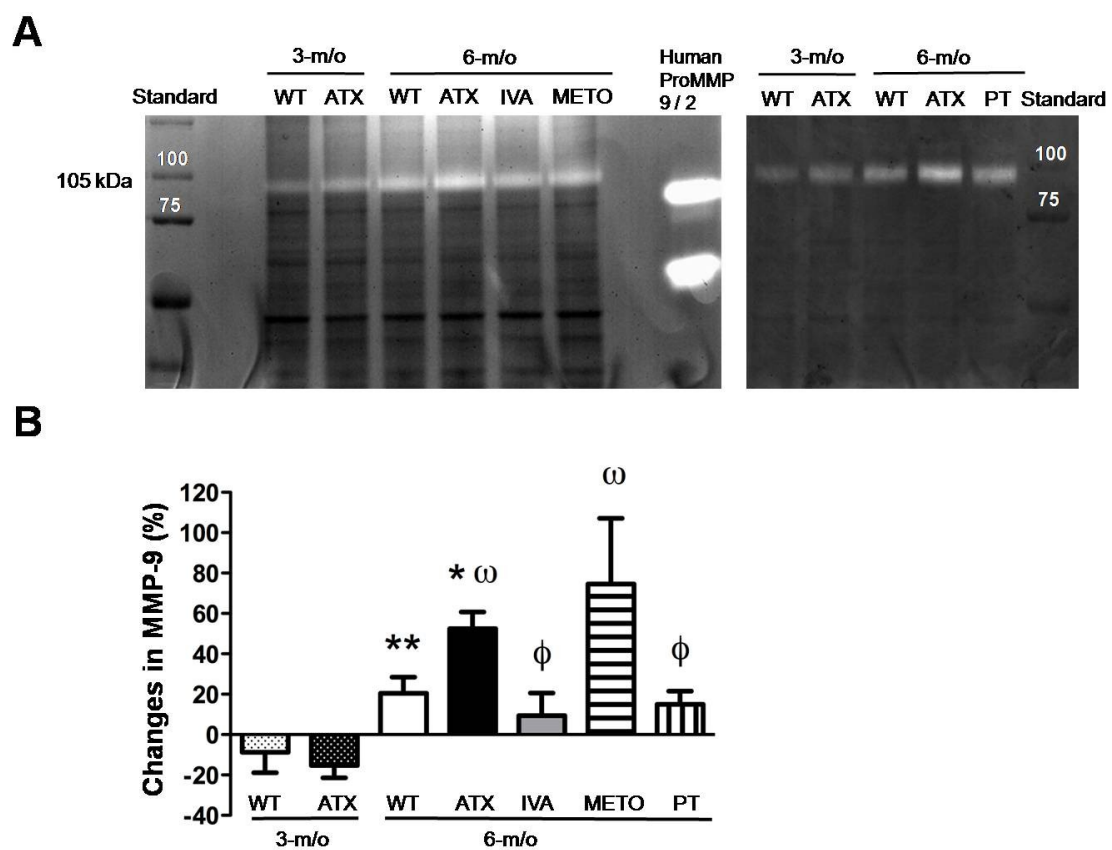


Figure 7

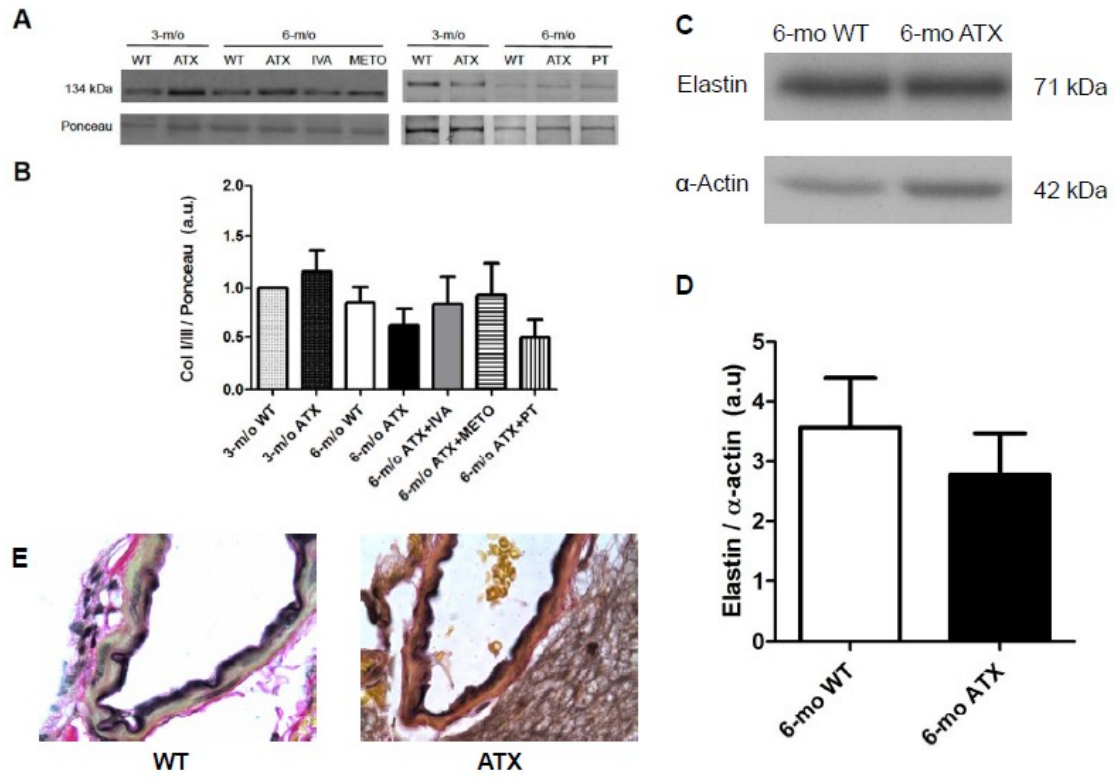
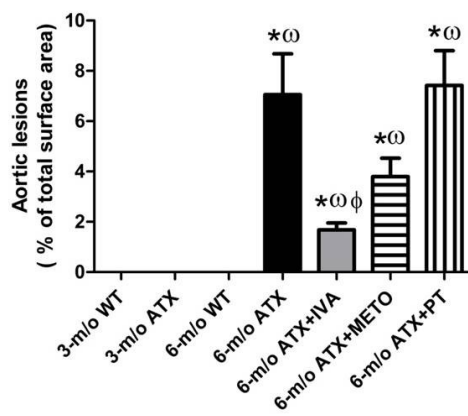
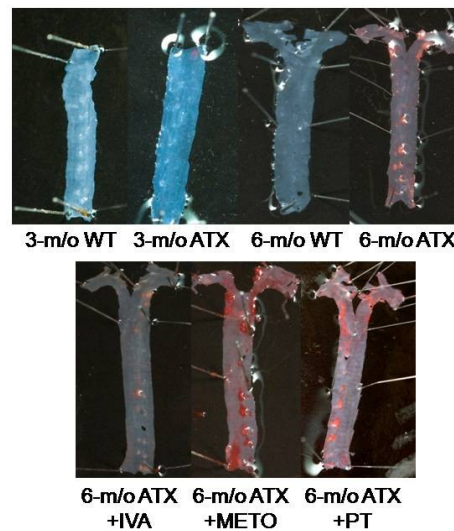


Figure 8

A**B**

4.2. Article 2

Bolduc V, Baraghis E, Duquette N, Thorin-Trescases N, Lambert J, Lesage F & Thorin E. (2012). Catechin prevents severe dyslipidemia-associated changes in wall biomechanics of cerebral arteries in LDLr^{-/-}:hApoB^{+/+} mice and improves cerebral blood flow. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 302, H1330-1339.

4.2.1. Apport original et contribution des coauteurs

Titre: Catechin prevents severe dyslipidemia-associated changes in wall biomechanics of cerebral arteries in LDLr^{-/-}:hApoB^{+/+} mice and improves cerebral blood flow

Ce manuscrit a été accepté pour publication dans la revue scientifique *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology* le 20 janvier 2012.

Par **Virginie Bolduc** : Conception et design expérimental, cuillette des données, analyse des données, interprétation des résultats, préparation des figures, rédaction du manuscrit, révision et correction du manuscrit, approbation de la version finale du manuscrit.

Edward Baraghis : Cuillette des données, analyses des données, approbation de la version finale du manuscrit.

Natacha Duquette : Cuillette des données, approbation de la version finale du manuscrit.

Nathalie Thorin-Trescases : Analyses des données, interprétation des résultats, préparation des figures, rédaction du manuscrit, révision et correction du manuscrit, approbation de la version finale du manuscrit.

Jean Lambert : Analyses des données, approbation de la version finale du manuscrit.

Frédéric Lesage : Analyses des données, interprétation des résultats, révision et correction du manuscrit, approbation de la version finale du manuscrit.

Eric Thorin : Conception et design expérimental, analyses des données, interprétation des résultats, révision et correction du manuscrit, approbation de la version finale du manuscrit.

4.2.2. Manuscrit

Catechin prevents severe dyslipidemia-associated changes in wall biomechanics of cerebral arteries in LDLr^{-/-}:hApoB^{+/+} mice and improves cerebral blood flow

Virginie Bolduc^{1,4}, Edward Baraghis^{4,5}, Natacha Duquette⁴, Nathalie Thorin-Trescases⁴, Jean Lambert², Frédéric Lesage^{4,5} and Eric Thorin^{3,4}.

Université de Montréal, Faculty of Medicine, Departments of Pharmacology¹, Social and Preventive Medicine² and Surgery³, Montreal Heart Institute Research Center⁴, École Polytechnique de Montréal⁵, Montreal, Quebec, Canada.

Running head: Effect of catechin on cerebrovascular compliance and CBF

Corresponding author: Dr Eric Thorin

Abstract

Endothelial dysfunction and oxidative stress contribute to the atherosclerotic process that includes stiffening of large peripheral arteries. In contrast, we previously reported a paradoxical increase in cerebrovascular compliance in LDLr^{-/-}: hApoB^{+/+} atherosclerotic (ATX) mice. We hypothesized that prevention of cerebral artery endothelial dysfunction with a chronic dietary antioxidant intake would normalize the changes in cerebral artery wall structure and biomechanics and prevent the decline in basal cerebral blood flow (CBF) associated with atherosclerosis. Three-month old ATX mice were treated, or not, for 3 months with the polyphenol (+)-catechin (CAT, 30 mg/kg/day) and compared to wild-type (WT) controls. In isolated pressurized cerebral arteries from ATX mice, CAT prevented endothelial dysfunction (deterioration of endothelium-dependent flow-mediated dilations; P<0.05), the inward hypertrophic structural remodeling (increase in the wall-to-lumen ratio; P<0.05) and the rise in cerebrovascular compliance (rightward shift of the stress-strain curve measured in passive conditions, reflecting mechanical properties of the arterial wall; P<0.05). Doppler optical coherence tomography imaging *in vivo* confirmed these findings, showing that cerebral compliance was higher in ATX mice and normalized by CAT (P<0.05). CAT also prevented basal cerebral hypoperfusion in ATX mice (P<0.05). Active remodeling of the cerebrovascular wall in ATX mice was further suggested by the increase (P<0.05) in pro-metalloproteinase-9 activity, which was normalized by CAT. We conclude that by preserving the endothelial function, a chronic treatment with CAT prevents the deleterious effect of severe dyslipidemia on cerebral artery wall structure and biomechanical properties, contributing to preserving resting cerebral blood flow.

Key words: polyphenol; optical coherence tomography; pressurized arteries; cerebrovascular compliance; wall remodeling.

Introduction

Atherosclerosis is associated with endothelial dysfunction (11, 16), an increased production of reactive oxygen species (ROS) (21), changes in the compliance and structure of large elastic peripheral and small cerebral arteries (7, 46), and it is a major risk factor for stroke (47). The term compliance refers to the changes in volume contained within an artery for a given change in transmural pressure and reflects the degree of arterial elasticity. The term capacitance, also used in this context, specifically refers to the volume of blood in the vessel wall, for a given pressure. Thus, highly distensible vessels display a higher compliance/capacitance than stiff vessels. We previously reported that in severely dyslipidemic, spontaneously atherosclerotic (ATX) LDLr^{-/-}:hApoB^{+/+} mice, which develop lesions in large peripheral arteries (aorta, renal and carotid arteries), are hypertensive and exhibit cerebral hypoperfusion and cognitive decline (7, 11, 16), cerebral and carotid arteries display opposite changes in vascular compliance *in vitro* (7) and *in vivo* (4): while, as expected, carotid arteries stiffen, cerebrovascular compliance increases with atherosclerosis. We recently proposed that the compliance of cerebral arteries is dependent on the endothelial function(7), while that of the carotids is more influenced by the mechanical stress imposed to the wall by the cardiac cycle, as it has been suggested by others (1, 7, 17, 30). These conclusions were indirectly validated through the use of three experimental approaches, (a) ivabradine that reduces heart rate (HR) and thus mechanical stress, maintained endothelial function and cerebrovascular compliance, (b) metoprolol worsened cerebral endothelial function and the compliance, and (c) exposure to physical training normalized the endothelial function and cerebrovascular compliance, without reducing mechanical stress (7). Endothelial function and cerebral compliance seem therefore tightly associated.

Another way to protect the endothelium is the use of antioxidants. The efficiency of antioxidant therapy to reduce the progression of an evolving lesion in the aorta, to lower pro-inflammatory mediators, to reverse endothelial dysfunction and to reduce ROS accumulation in the vasculature has been demonstrated in animal models (9, 16, 27, 52). These mouse models of atherosclerosis (*i.e* ApoE^{-/-} and LDLr^{-/-}:hApoB^{+/+})

rarely develop lesions in the cerebral vasculature before the age of 6 months, however, the benefits of antioxidants clearly extended to the brain and cerebral arteries function (11):we reported that catechin, a polyphenol with antioxidant properties and member of the flavonoid family (48), significantly preserved flow-mediated dilations (FMD) of cerebral resistance arteries, improved cerebral blood flow responses to neuronal stimulations and cognitive functions in ATX mice (11). It is not known, however, if catechin restores the structural changes leading to an increased compliance of cerebral arteries. These biomechanical alterations could contribute, in addition to the endothelial dysfunction and the higher myogenic responses, to the decreased capacity of the brain to autoregulate its perfusion. To the best of our knowledge, the effects of catechin on the structure of the cerebral arteries in mice with severe dyslipidemia and developing atherosclerotic lesions in conductance arteries have not been reported. The objective of this study was to demonstrate that by improving cerebrovascular endothelial function, catechin prevents adverse wall remodeling; we hypothesized that this would contribute to maintain basal cerebral blood flow (CBF). Accordingly, we found that catechin not only prevents the remodeling of cerebral resistance arteries occurring in $LDLR^{-/-}$:hApoB^{+/+} mice, but it also normalizes the cerebrovascular compliance, measured *ex vivo* in passive conditions, as well as *in vivo*, and improves basal CBF. These combined beneficial effects could therefore contribute to the protective effects of catechin on basal CBF regulation previously reported with polyphenols (11, 44, 45).

Materials and Methods

The procedures and protocols were approved by our institutional animal ethical committee and performed with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of Canada and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996).

Experiments were conducted on posterior cerebral arteries (PCA) isolated from 6-month-old (mo) male C57BL/6 wild type (WT) (n=15) (Charles River Laboratories, St-Constant, Qc, Canada) used as controls, and from 6-mo male atherosclerotic (ATX) mice (LDLr^{-/-}: hApoB-100^{+/+}) (n=27) (11, 16, 41). ATX mice were randomly assigned to receive, or not (n=17), a 3-month (from 3- to 6-mo) (+)-catechin hydrate (Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, Ontario, Canada) treatment (ATX+CAT; 30 mg/kg/day; n=10) (11) in the drinking water. At 6-mo, mice were anesthetized (44 mg/kg ketamine, 2.2 mg/kg xylazine) and blood was collected; the plasma was frozen at -80°C. The brain was removed from the cranial cavity and frozen at -80°C, or placed in ice-cold physiological salt solution (PSS) for reactivity and compliance studies. The carotid arteries were removed and placed in ice-cold PSS for compliance studies.

Plasma Parameters Total cholesterol, low-density lipoproteins (LDL), high-density lipoproteins (HDL), triglycerides and glucose levels were measured at the Montreal Heart Institute clinical biochemistry laboratory (Montreal, Qc, Canada). VEGF level was quantified with the Fluorokine® MAP Mouse VEGF Kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

Tail cuff For n=6-9 mice in each group (WT, ATX and ATX+CAT mice), heart rate and blood pressure were monitored weekly from 3- to 6-mo by tail-cuff plethysmography (Kent Scientific Corporation, Torrington, CT, USA). Mice were inserted in a holder on a heated platform 15 minutes prior to pressure measurements. When the tail reached 30°C, 30 recordings were collected. Mice were trained for five sessions three weeks before (baseline) starting the weekly recording at 3-mo.

Reactivity Studies Posterior cerebral arteries were isolated, cannulated at both ends, and pressurized as previously described (13). The media used for the isolated vessels was PSS (pH 7.4, mmol/L: 130 NaCl, 4.7 KCl, 1.18 KH₂PO₄, 1.17 MgSO₄, 14.9 NaHCO₃, 1.6 CaCl₂, 0.023 EDTA and 10 glucose) aerated with 12% O₂/5% CO₂/83% N₂. Flow-mediated dilations (FMD) were induced on phenylephrine (10 μM) (Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, Ontario, Canada) precontracted arteries (13). Arteries were perfused with PSS. A single cumulative curve (from 0 to 20 dynes/cm², with 2 dynes/cm² steps between 0 and 10 dynes/cm² followed by two 5 dynes/cm² steps, at constant pressure of 60 mm Hg) was performed on each segment(7). The flow rate through the lumen (Q) (ml/s) required to match a given shear stress value (τ , dyn/cm²) was calculated for each point on the curve according to $[Q=(\tau\pi r^3)/4\eta]$, where η represents the viscosity (0.009 Poise) and r the inside radius (cm). The applied calculated shear stress was in the physiological range (\approx 0-25 dynes/cm²) (31, 36). The data are presented as the % of dilation for every shear stress value.

Measurements of *ex-vivo* cerebral arteries biomechanics and structure Posterior cerebral arteries and carotid arteries were used for the *in vitro* assessment of the compliance, measured in passive conditions to reflect mechanical properties of the vascular wall. Passive pressure-diameter curves were conducted in a Ca²⁺-free PSS containing 1 mM of EGTA and 1 μM of sodium nitroprusside in order to abolish myogenic tone and to solely assess the mechanical properties of the arteries. Lumen diameter and outer diameter changes were measured after each increment in the intraluminal pressure (from 10-120 mm Hg, with a first 10 mm Hg step followed by 20 mm Hg steps for PCA and from 60-180 mm Hg with 20 mm Hg steps for carotid arteries) in order to calculate the structural and mechanical parameters of the arterial wall. The wall thickness (μm) was calculated according to $[(\text{external diameter} - \text{lumen diameter}) / 2]$ for the values obtained at 10 mm Hg. The wall-to-lumen ratio was calculated according to wall thickness / lumen diameter for the values obtained at 10 mm Hg. For the structural parameters (lumen diameter, wall thickness and wall-to-lumen ratio) the values are only presented at 10 mm Hg in order to eliminate the effect of distensibility, but in non-collapsed vessels. The circumferential wall strain (strain, %) was calculated

according to $[(D - D_{10 \text{ mm Hg}}) / D_{10 \text{ mm Hg}}]$, where D is the internal diameter at a given pressure and $D_{10 \text{ mm Hg}}$ is the initial diameter at the initial pressure. The circumferential wall stress (stress, dynes/cm²) was calculated according to $[(P * 1334 * D) / 2 * \text{wall thickness}]$, where P is the given intra-luminal pressure (1 mm Hg = 1334 dynes/cm²). The stress-strain relationship was calculated by fitting the data to a non-linear exponential curve (stress = stress₀^{βstrain}) where stress₀ is the value when strain equals 0 and β is a constant representing Young's elastic modulus.

The incremental distensibility (ID, %/mm Hg), which represents the percentage of change of the arterial internal diameter for each mm Hg change in intra-luminal pressure, was calculated according to $[(D_1 - D_0) / (D_1 * \Delta P) * 100]$, where D_0 is the internal diameter before the pressure increment, D_1 is the internal diameter after the pressure increment and ΔP is the change in intra-luminal pressure (10 or 20 mm Hg).

***In vivo* estimation of cerebrovascular compliance and basal cerebral blood** Compliance and basal CBF of small brain arteries located in the somatory-sensory cortex, a region supplied by the middle cerebral artery (MCA) and its branches, were measured *in vivo* using a Doppler optical coherence tomography (OCT) system previously described (4, 11). Our gold standard consisted in controlled measures of viscous flow in phantoms (4). Acquisitions were made to quantitatively assess basal CBF over the cardiac cycle. The system used is based on a superluminescent diode emitting near infrared light at 870 nm with a bandwidth of 65nm. Light on the sample was 2.5 mW, yielding a sensitivity of 106 dB with a dynamic range of 76 dB. Acquisition was done at a frequency of ~15 kHz, which gives a maximum detectable Doppler speed of 3 mm/s. Lateral and axial resolutions were 10 and 7 μm, respectively. At 6-mo, mice were anesthetized (2g/kg, urethane) and a tracheotomy was performed. The mice were placed in a stereotaxic stage and the skin on the top of the scalp was removed to image the somato-sensory cortex with a 10X water microscope objective. Body temperature was kept at 37°C with a heating pad until the experiment was completed. Heart rate was monitored during the experiment, but neither blood pressure nor blood gases were recorded. Acquisitions were done on a 800 μm by 800 μm field of

view, the depth of penetration allowed imaging of structures up to 600 μm beneath the surface. We calculated the absolute CBF (nl/s) as previously described (11) in the imaged arteries and all its visible collateral branches, normalized by the cross-sectional area (mm^2). CBF values were compared between WT, ATX and catechin-treated ATX mice, in animal with similar heart rate (409 ± 10 , 423 ± 10 and 438 ± 7 bpm, respectively), since resting HR was very variable during image acquisition. CBF was measured in a region supplied by the MCA while arterial function/structure was assessed in the PCA, but both arteries derive from the internal carotid and form an independent domain in the circle of Willis of the mouse brain (35).

For compliance, imaged arteries with similar diameter were found at the interface between the skull and the brain at a depth of ~ 400 μm . Image reconstruction yielded a quantitative average value of blood flow (Q_{Av} , m^3/sec) and a vascular cross-sectional area (A_{Av} , m^2). The cardiac profile of the vessel flow was determined using an ECG gated reconstruction technique. Change in blood speed (δ_v ; a.u.) and in vessel area (δ_A ; a.u.) between diastole and systole was obtained from this profile. The blood viscosity (η ; cPoise) was calculated for each vessel using the vessel diameter and hematocrit calculated according to a previously described formula (40). A local compliance evaluator (nl/Pa) can be obtained with:

$$\text{Compliance} = [((A_{Av})^3 / Q_{Av}) * ((\delta_A + 1) * \delta_A / \delta_v) * 10^{15}] / \eta.$$

Isolation of Cerebral vessels and Western Blot Whole brain vessels were isolated as previously described (26). For Western blot analysis, 30 μg of cerebral vessels proteins were mixed with a discontinuous Laemmli buffer and loaded on a 10% acrylamide SDS-PAGE gels. After 45 min of migration at 200 V, gels were transferred on nitrocellulose. Membranes were incubated with an anti-VEGF (1:1000, Abcam, Cambridge, MA, USA). α -actin was used as a loading control (anti- α -actin 1:100 000, Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, Ontario, Canada). Quantification was made by densitometric analysis using Quantity One software.

Gelatin Zymography Zymography using gelatin-containing gels was performed as described previously (23). Briefly, a modified Laemmli buffer without mercaptoethanol

was added to the vessel proteins samples, without heating, on a 6% SDS-polyacrylamide gel containing 1% gelatin. Migration was conducted at 4°C and 20 mA for 1h, followed by a migration (90V) for 2h. After migration, SDS was removed from the gel by washing 5x10 min with 2.5% (v/v) Triton X-100 at room temperature. Gels were incubated in a zymography buffer (38 mM Tris-HCl pH 7.4, 13 mM CaCl₂, 10 μM ZnCl₂, 0.02% NaN₃ and 0.03% Brij 35) at 37°C for 72h and then stained with Coomassie brilliant blue. Gelatinolytic activity was visualized as clear bands against the dark background. Samples of purified human pro-MMP-9 (Chemicon International, MA, USA) and pro-MMP-2 (Enzo Life Sciences, Plymouth Meeting PA, USA) were used as a positive control. Quantification was made by densitometric analysis using Gimp 2.6 software. To test if CAT could directly inhibits MMP-9, we incubated gels in a zymographic buffer containing CAT 3.1μM. This concentration represents the approximate CAT absorption per day and per mouse if the absorption rate was equal to 100%.

Statistics “n” refers to the number of animals used in each protocol. Results are presented as mean±SEM. Unpaired Student’s *t* test and one-way ANOVA were used, when adequate. A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant. Statistical analyses were mostly performed with GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Statistical analyses of basal CBF were performed with SPSS 19.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA): 191 measurements of basal CBF were obtained from 10 mice in which similar HR was simultaneously recorded, therefore, the parameter CBF was analyzed using generalized estimating equations to take into account correlated data. The cerebral blood flow was positively skewed so inverse Gaussian and gamma distributions were tested with different link functions (identity, log, power (-2)). Two working correlations structures were also tested: exchangeable and unstructured. The goodness of fit quasi-likelihood under independence criterion (QIC) was used to compare the choices of distributions, link functions and working correlation structures. The best results were obtained with the inverse Gaussian distribution, the log link function and the exchangeable correlation structure. For each group of mice, cerebral blood flow marginal means were estimated and compared with pairwise contrasts using

the Sidak approach for adjusting the significance level. This method provides tighter bounds than the Bonferroni approach.

Results

Phenotype of WT and ATX mice The body weight was similar in WT and ATX mice and was not affected by catechin treatment (Table 1). Non-fasting plasma lipids were higher in ATX compared to WT mice, while glucose was lower (Table 1). Catechin further increased plasma levels of total cholesterol and LDL-cholesterol, but did not affect those of glucose (Table 1). Blood pressures assessed by tail-cuff were higher in 6-mo ATX compared to age-matched WT mice, while pulse pressure and HR were similar between both groups (Table 2). Catechin affected significantly neither blood pressure, pulse pressure nor HR in conscious mice (Table 2).

Carotid artery compliance Compared to 6-mo WT mice, carotid arteries from 6-mo ATX mice were less compliant, as illustrated by a leftward shift of the passive stress-strain curve and a trend for a lower ID between 100 and 120 mm Hg (Fig. 1A, C). The calculated values of Young's elastic modulus in ATX mice, however, were not significantly different compared to those calculated in WT mice ($\beta=39\pm9*10^{-3}$ versus $44\pm6*10^{-3}$, ATX versus WT mice). Catechin did not prevent carotid stiffness associated with severe dyslipidemia (Fig. 1A, C).

Cerebral artery structure, compliance and endothelial function In contrast to carotid arteries, cerebrovascular compliance increased in ATX mice as shown by a rightward shift of the passive stress-strain curve (Fig. 1B) and by a lower value of Young's elastic modulus compared to WT mice ($\beta=40\pm2*10^{-3}$ versus $51\pm3*10^{-3}$, ATX versus WT mice, $p<0.05$). Incremental distensibility was also higher in ATX mice between 20-40 and 60-80 mm Hg compared to WT mice (Fig. 1D). Catechin fully normalized the increase in cerebrovascular compliance associated with severe dyslipidemia: it prevented the shift of the passive stress-strain curve (Fig. 1B) and the decrease of Young's elastic modulus ($\beta=50\pm2*10^{-3}$ versus $40\pm2*10^{-3}$, ATX+CAT versus ATX mice, $p<0.05$). This was attributable to a significant decrease of incremental distensibility between 10-20 and 40-60 mm Hg (Fig. 1D). Interestingly, at low pressures (10-20 mm Hg), cerebral arteries isolated from ATX+CAT mice were even less distensible than those from WT mice (Fig. 1D).

We studied the structural properties of the posterior cerebral artery by *ex vivo* measurement of the internal and external diameter in passive conditions at 10 mm Hg. Posterior cerebral arteries from ATX mice exhibited a hypertrophic inward remodeling suggested by a decreased lumen diameter and a thickening of the vessel wall, leading to an increased wall-to-lumen ratio compared to arteries from WT mice (Fig. 2A, C, D). External diameters did not change among groups (Fig. 2B). Catechin prevented this adverse wall remodeling (Fig. 2A, D). Accordingly, the calculated cross sectional areas were higher in cerebral arteries from ATX mice ($7007 \pm 373 \mu\text{m}^2$, $n=17$) than from WT mice ($5910 \pm 337 \mu\text{m}^2$, $n=15$, $p < 0.05$) and this tended to be prevented by CAT ($6640 \pm 441 \mu\text{m}^2$, $n=10$) (data not shown).

Endothelium-dependent flow-mediated dilations (FMD) were significantly reduced in cerebral arteries from ATX mice from 4 to 20 dynes/cm², when compared to FMD observed in WT mice (Fig. 3). Catechin improved endothelial function at low and moderate physiological values of shear stress (31) (between 6-10 dynes/cm²) compared to untreated-ATX mice (Fig. 3). In CAT-treated mice, however, the FMD curve is biphasic, suggesting that the protective effect of catechin could be lost for shear stresses greater than 10 dynes/cm² (Fig. 3).

Neither contractile nor dilatory properties of the smooth muscle were affected by atherosclerosis and/or catechin treatment: phenylephrine or potassium-induced contractions were very similar in WT, ATX and ATX+CAT mice (data not shown). In addition, sodium nitroprusside induced identical endothelium-independent dilations in WT and ATX mice, with similar sensitivity (pD_2 in WT: 6.91 ± 0.19 , in ATX: 6.82 ± 0.08) and efficacy (E_{max} in WT: $81 \pm 3\%$, in ATX: $74 \pm 6\%$). These data indicate that in contrast to the endothelial function, vascular smooth muscle contractile properties are unlikely affected by atherosclerosis and/or catechin.

***In vivo* estimation of cerebrovascular compliance and basal cerebral blood per heartbeat** Using the Doppler OCT imaging system, the local compliance evaluator was estimated for intracranial arteries of similar diameter (WT: $94 \pm 5 \mu\text{m}$, $n=10$ mice; ATX: 107 ± 12 , $n=10$ mice; ATX+CAT: 80 ± 5 , $n=4$ mice; the measurement was performed in 2

to 5 vessels per mouse). In agreement with the data collected *ex vivo*, the local *in vivo* cerebral compliance evaluator was higher in ATX than in WT mice ($p<0.05$) and was normalized by catechin ($p<0.05$) (Fig. 4A). We measured simultaneously basal CBF (nl/sec) in the selected arteries and all visible collateral branches (diameters were ranging from 21 to 279 μm , WT: 67 ± 3 , $n=161$; ATX: 68 ± 3 , $n=105$; ATX+CAT: 63 ± 3 μm , $n=90$) and they were normalized by vessels cross-sectional areas (mm^2) area. Each n represents 5.4 ± 0.4 (up to 8) volume acquisitions of an artery of interest and surrounding collateral branches (up to 7) in WT, ATX and ATX+CAT mice. CBF was reduced in ATX mice, as previously reported (11), and was corrected by CAT ($P<0.05$) (Fig. 4B).

Metalloproteinase-9 activity in cerebral blood vessels Pro-MMP-9 activity, the non-activated form of MMP-9, increased in cerebral vessels from ATX mice (Fig. 5) and was prevented by catechin (Fig. 5). Pro-MMP-2 activity was not detectable (Fig. 5).

VEGF levels Plasma levels of VEGF were similar in WT and ATX mice; catechin, however, reduced circulating VEGF levels when compared to untreated-ATX mice (Fig. 6A). In contrast, protein expression of VEGF in mouse cerebral blood vessels was similar between groups (Fig.6 B-C).

Discussion

We recently proposed the hypothesis that the endothelium regulates structural and biomechanical properties of cerebral arteries (7). Accordingly, we now report for the first time that in severely dyslipidemic and moderately hypertensive mice, the preservation of the endothelial function by a chronic treatment with the polyphenol catechin prevented the paradoxical increase in cerebral artery wall compliance, measured both *in vitro* and *in vivo*, and impeded the hypertrophic inward remodeling. Importantly, these protective effects of catechin were associated with an improved basal CBF in ATX mice. The combined beneficial effects of catechin on endothelial function, cerebral artery structure and compliance could therefore contribute to the observed maintenance of an adequate cerebral perfusion.

The preventive use of catechin and polyphenols has been shown to improve endothelial function and limit plaque progression by us (11, 16) and others (3, 22, 27). In addition, polyphenols have been shown to slow the decline in the learning ability associated with brain hypoperfusion (11, 53) and to display neuroprotective effects, partly by preserving endothelial function possibly through a reduction in lipid peroxidation (19, 20). Whether the prevention of changes in cerebral structural and biomechanical properties, *via* endothelial preservation, could play a role in the neuroprotective effects of catechin was never tested. Our data suggest that catechin could impede cerebral remodeling and hypoperfusion induced by dyslipidemia indirectly by protecting the endothelial integrity through its antioxidant activity: we previously reported that 3-month treatment of ATX mice with CAT significantly reduced the abnormal superoxide production in the aorta and cerebral arteries (11). We also reported that catechin increased Mn-superoxide dismutase (SOD) expression in the cerebral circulation of the ATX mouse, which could further contribute to the beneficial effect of CAT (11). The antioxidant effect of CAT was associated with the preservation of the endothelial function: indeed, CAT preserved cerebrovascular eNOS activity induced by either acetylcholine or flow, which was decreased in 6-mo ATX mice (11) and nearly abolished at 12-month of age (12). The endothelial dysfunction in cerebral arteries from ATX mice was characterized by the fact that the lower endothelium-dependent dilations

were insensitive to eNOS inhibition; one of the mechanisms by which CAT prevented endothelial dysfunction was by maintaining the sensitivity to eNOS inhibitors (11). In the present study, we demonstrate that CAT also prevents structural and biomechanical alterations in the cerebrovasculature of ATX mice; the combined beneficial effects of catechin on superoxide accumulation in cerebral arteries, eNOS-dependent dilation and increase in antioxidant enzyme such as MnSOD, likely protected the cerebral arteries and prevented their remodeling. Altogether, these data suggest that endothelial dysfunction in the cerebrovasculature, related to the pro-oxidative environment associated with severe dyslipidemia and atherosclerosis, contributes to remodeling leading ultimately to hypoperfusion.

Oxidative stress-associated inflammation is a known stimulus for arterial wall remodeling (8, 43). A reduction in vascular oxidative stress and global inflammation (evidenced by a reduction in plasma VEGF levels, Fig. 6A) could therefore prevent the abnormal remodeling of cerebral arteries from ATX mice. ROS production by vascular cells, mainly under the control of NADPH oxidases, is known to trigger VSMC hyperplasia and/or hypertrophy (33, 50). Very little is known about the involvement of ROS in cerebral artery remodeling associated with atherosclerosis. It was previously reported that treatment of spontaneously hypertensive rats with the O_2^- scavenger Tempol improved the structure of the MCA independently of blood pressure reduction, suggesting as well that ROS contribute to the remodeling of the cerebral vasculature (39). Likewise, in the present study, catechin prevented the reduction of lumen diameter and the thickening of the cerebral arterial wall without reducing blood pressure, suggestive of a free radical-dependent inward hypertrophic remodeling (29) of PCA isolated from ATX mice. These macro-scale parameters (lumen diameter, wall thickness and wall-to-lumen ratio) cannot characterize the cellular and molecular modifications; nonetheless, the inward hypertrophic remodeling implies that there is an increase of material into the arterial wall.

Catechin could also prevent cerebral remodeling by inhibiting MMPs activity and VSMC proliferation (28, 51) since degradation of the extracellular matrix by MMPs stimulates the migration and proliferation of VSMC and intimal thickening (18, 32). In

the context of cerebral ischemia, gelatinases MMP-2, and especially MMP-9, contribute to the pathological process by disturbing the cerebral vasculature integrity leading to neuro-inflammation, brain edema and hemorrhages (2, 37). In this context, (-)-epigallocatechin gallate has been reported to limit brain infarct size and neuronal damage by inhibiting MMP-9 activity (37, 38). In the present study, we demonstrate that MMP-9 activity was significantly higher in cerebral vessels from ATX mice than from WT mice and that a chronic treatment for 3 months with catechin significantly prevented this rise in MMP-9 activity (Fig. 5). Thus, MMP-9 activity was impacted by the long-term treatment with the antioxidant, confirming that ROS trigger MMP-9 activity (54). On the other hand, since it has been reported that catechin could have a direct inhibitory effect on MMP activity (10, 14, 15, 38), we tested the effect of acute addition of catechin directly in the zymography: adding 3.1 μ M catechin to cerebrovascular proteins from ATX mice did not acutely reverse the activation of MMP-9 and did not inhibit the activity of recombinant pro-MMP-9 (data not shown). Thus, the effects of catechin on MMP-9 activity are not direct, but modulated on the long-term and possibly linked to endothelial preservation. There are known inter-relationships between cerebrovascular compliance and eNOS (6), and NO inactivates MMP-9 in peripheral arteries through the MMP-9/NO/tissue inhibitor of MMP (TIMP) complex (42, 49). The relationship between eNOS and MMP-9 is unknown in cerebral arteries. It is possible, however, that since catechin preserves cerebral eNOS activity by scavenging ROS, this will result in MMP-9 inactivation and thus, changes in wall structure/compliance. This hypothesis remains to be proven, by the use of MMP-9 inhibitor, for example, since doxycycline prevented the remodeling of the MCA of stroke-prone hypertensive rats (39). Nonetheless, our data reveal that in a pro-oxidant and pro-inflammatory environment, cerebral endothelial dysfunction is associated with MMP-9 activation. Taking into account that mouse cerebral arteries lack external elastica lamina and adventitia (25), such increase in pro-MMP-9 activity would most likely perturb vessel wall extracellular matrix composition and structure, leading to the weakening of the walls. The beneficial antioxidant effects of catechin on eNOS activity revealed by the improved flow-mediated dilation could therefore contribute to the

reduction of MMP-9 activity observed in this study, and therefore prevent changes in compliance and in wall remodeling.

In accordance to its protective effect on endothelial function (Fig. 3), structure and biomechanics (Fig. 1B,1D, 2 and 4A), catechin improved basal CBF (Fig. 4B). This contrasts with our recent work showing that catechin did not improve the basal cerebral perfusion in 6-mo ATX mice (11). This dissimilarity can be explained by at least 2 reasons. First, the anesthetic used during basal CBF measurement is different; we changed pentobarbital sodium used in (11) to urethane in order to maintain a normal physiological metabolic activity. Indeed, pentobarbital strongly reduces HR (172 ± 4 bpm compared to 492 ± 5 bpm with urethane); urethane therefore permits to maintain a resting HR similar to that measured in conscious unrestrained animals [504 ± 15 bpm (7)]. Secondly, the present work includes arteries in a larger range of vessel size, by considering an artery and all its collateral branches within 600 μm depth. For these reasons, we would like to propose that we have now optimized the method for the precise measurement of basal CBF in a single artery. Nonetheless, the improvement in basal CBF observed in this study by catechin could be challenged in conditions needing higher shear stresses, such as during mental and physical exercises. Indeed, in CAT-treated mice, the FMD curve is biphasic, suggesting that the protective effect of catechin is limited and does not allow for an optimal chronic endothelial cell repair and maintenance; this prevents a physiological endothelial response for shear-stresses greater than 10 dynes/cm^2 (Fig. 3) and could lead to inadequate cerebral perfusion. This limited effect of catechin contrasts with the preservation of FMD over the whole range of shear stresses obtained after 3 months of voluntary exercise in ATX mice [fig. 4C in (7)], suggesting that the long-term outcome of catechin and voluntary exercise on CBF may be different, despite similar beneficial effect of CAT and physical training on cerebral compliance and their absence of effect on carotid stiffness [Fig. 1, and (7)].

There is, however, a limitation to the interpretation of our results of CBF: the large variability in resting HR in WT and ATX mice revealed that resting HR is positively correlated with basal CBF (data not shown). Since blood pressure was not recorded during imaging of the cerebral vessels, the impact of resting HR on blood pressure and

CBF will need to be assessed in further studies. However, in mice where resting HR was similar among groups, a reduction in basal CBF was observed in ATX mice and this hypoperfusion was prevented by catechin treatment.

Why, however, do cerebral and carotid arteries from atherosclerotic mice display opposite changes in vascular compliance? ATX mice are slightly hypertensive (7) and atherosclerotic plaques develop in the aorta, the renal arteries, the carotids, but not in the cerebral arteries (11, 16). Carotid plaque is associated with carotid stiffening, and this likely lowers the "buffering" capacity of the carotids, promoting the propagation of the pulse pressure to small vessels in the brain (34). Since cerebral arteries lack external elastic lamina and adventitia (24) these hemodynamic changes would likely be sufficient to weaken the wall of the cerebral arteries. In addition, the changes associated with atherosclerosis in the composition or in the organization of structural elastin and collagen fibers are likely to have more impact in the mechanical properties of conductance arteries, such as carotids, than in cerebral arteries (5). We believe, however, that the fundamental difference between carotid and cerebral changes in compliance resides in the relative role of the endothelium and their sensitivity to biomechanical stress: the carotid artery wall is directly exposed to the mechanical stress. Thus, carotid stiffness can be prevented by reducing HR for example, with the pacemaker current inhibitor ivabradine or the β -blocker metoprolol (7). In contrast, in cerebral arteries that develop myogenic responses and are less exposed to mechanical stress, compliance is mostly regulated by the endothelium: the better the endothelial function, the lower the cerebrovascular compliance (7). The mechanical stress only amplifies cerebral endothelial dysfunction, favoring remodeling. Accordingly, we demonstrate in the present study that catechin preserves both cerebral endothelial function and compliance, while carotid stiffness is not improved. The endothelium is therefore a key player regulating the cerebrovascular, but not carotid, biomechanical properties. To the best of our knowledge, a direct endothelium-dependent regulation of cerebrovascular compliance has never been reported. Because the increase in compliance and endothelial dysfunction we observed were triggered by a chronic exposition of cerebral vessels to the pathological environment created by atherosclerosis, only indirect evidence can be provided.

In conclusion, our results extend from our previous studies (7, 11) by demonstrating that preservation of the endothelial function by catechin improves cerebrovascular wall biomechanics. The mechanism of action of catechin likely involves a reduction in cerebral ROS availability, preserving eNOS, which subsequently could reduce MMP-9 activity and prevent the changes in structure and compliance. These combined effects lead to an improved basal CBF. Therefore, the observed preservation of cognitive function by catechin in ATX mice (11) goes beyond the sole improvement of the endothelial function. It demonstrates that the cerebral artery wall is an integrated system and that strategies aiming at preventing cerebrovascular dysfunction and the associated cognitive decline will likely need to integrate biomechanics as a determinant functional parameter.

Sources of funding. This work has been supported in part by the Montreal Heart Institute Foundation, the Heart and Stroke Foundation of Quebec and the Canadian Institutes of Health Research (MOP89733).

Conflicts of interest/Disclosures. None.

References

1. **Albaladejo P, Carusi A, Apartian A, Lacolley P, Safar ME, and Benetos A.** Effect of chronic heart rate reduction with ivabradine on carotid and aortic structure and function in normotensive and hypertensive rats. *J Vasc Res* 40: 320-328, 2003.
2. **Asahi M, Wang X, Mori T, Sumii T, Jung JC, Moskowitz MA, Fini ME, and Lo EH.** Effects of matrix metalloproteinase-9 gene knock-out on the proteolysis of blood-brain barrier and white matter components after cerebral ischemia. *J Neurosci* 21: 7724-7732, 2001.
3. **Auclair S, Milenkovic D, Besson C, Chauvet S, Gueux E, Morand C, Mazur A, and Scalbert A.** Catechin reduces atherosclerotic lesion development in apo E-deficient mice: a transcriptomic study. *Atherosclerosis* 204: e21-27, 2009.
4. **Baraghis E, Bolduc V, Lefebvre J, Srinivasan VJ, Boudoux C, Thorin E, and Lesage F.** Measurement of cerebral microvascular compliance in a model of atherosclerosis with optical coherence tomography. *Biomedical Optics Express* 2: 3079-3093, 2011.
5. **Baumbach GL, Sigmund CD, and Faraci FM.** Cerebral arteriolar structure in mice overexpressing human renin and angiotensinogen. *Hypertension* 41: 50-55, 2003.
6. **Baumbach GL, Sigmund CD, and Faraci FM.** Structure of cerebral arterioles in mice deficient in expression of the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Circ Res* 95: 822-829, 2004.
7. **Bolduc V, Drouin A, Gillis MA, Duquette N, Thorin-Trescases N, Frayne-Robillard I, Des Rosiers C, Tardif JC, and Thorin E.** Heart rate-associated mechanical stress impairs carotid but not cerebral artery compliance in dyslipidemic atherosclerotic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 301: H2081-2092, 2011.
8. **Chatzizisis YS, and Giannoglou GD.** Coronary hemodynamics and atherosclerotic wall stiffness: a vicious cycle. *Med Hypotheses* 69: 349-355, 2007.
9. **Chyu KY, Babbidge SM, Zhao X, Dandillaya R, Rietveld AG, Yano J, Dimayuga P, Cercek B, and Shah PK.** Differential effects of green tea-derived catechin on developing versus established atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice. *Circulation* 109: 2448-2453, 2004.

10. **Demeule M, Brossard M, Page M, Gingras D, and Beliveau R.** Matrix metalloproteinase inhibition by green tea catechins. *Biochim Biophys Acta* 1478: 51-60, 2000.
11. **Drouin A, Bolduc V, Thorin-Trescases N, Belanger E, Fernandes P, Baraghis E, Lesage F, Gillis MA, Villeneuve L, Hamel E, Ferland G, and Thorin E.** Catechin treatment improves cerebrovascular flow-mediated dilation and learning abilities in atherosclerotic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 300: H1032-1043, 2011.
12. **Drouin A, Farhat N, Bolduc V, Thorin-Trescases N, Gillis MA, Villeneuve L, Nguyen A, and Thorin E.** Up-regulation of thromboxane A impairs cerebrovascular eNOS function in aging atherosclerotic mice. *Pflugers Arch* 462: 371-383, 2011.
13. **Drouin A, and Thorin E.** 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, 2009.
14. **Garbisa S, Biggin S, Cavallarin N, Sartor L, Benelli R, and Albin A.** Tumor invasion: molecular shears blunted by green tea. *Nat Med* 5: 1216, 1999.
15. **Garbisa S, Sartor L, Biggin S, Salvato B, Benelli R, and Albin A.** Tumor gelatinases and invasion inhibited by the green tea flavanol epigallocatechin-3-gallate. *Cancer* 91: 822-832, 2001.
16. **Gendron ME, Theoret JF, Mamarbachi AM, Drouin A, Nguyen A, Bolduc V, Thorin-Trescases N, Merhi Y, and Thorin E.** Late chronic catechin antioxidant treatment is deleterious to the endothelial function in aging mice with established atherosclerosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 298: H2062-2070, 2010.
17. **Giannattasio C, Vincenti A, Failla M, Capra A, Ciro A, De Ceglia S, Gentile G, Brambilla R, and Mancina G.** Effects of heart rate changes on arterial distensibility in humans. *Hypertension* 42: 253-256, 2003.
18. **Gurjar MV, Sharma RV, and Bhalla RC.** eNOS gene transfer inhibits smooth muscle cell migration and MMP-2 and MMP-9 activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19: 2871-2877, 1999.

19. **Haque AM, Hashimoto M, Katakura M, Tanabe Y, Hara Y, and Shido O.** Long-term administration of green tea catechins improves spatial cognition learning ability in rats. *J Nutr* 136: 1043-1047, 2006.
20. **Hong JT, Ryu SR, Kim HJ, Lee JK, Lee SH, Kim DB, Yun YP, Ryu JH, Lee BM, and Kim PY.** Neuroprotective effect of green tea extract in experimental ischemia-reperfusion brain injury. *Brain Res Bull* 53: 743-749, 2000.
21. **Judkins CP, Diep H, Broughton BR, Mast AE, Hooker EU, Miller AA, Selemidis S, Dusting GJ, Sobey CG, and Drummond GR.** Direct evidence of a role for Nox2 in superoxide production, reduced nitric oxide bioavailability, and early atherosclerotic plaque formation in ApoE^{-/-} mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 298: H24-32, 2010.
22. **Kaliora AC, Dedoussis GV, and Schmidt H.** Dietary antioxidants in preventing atherogenesis. *Atherosclerosis* 187: 1-17, 2006.
23. **Kleiner DE, and Stetler-Stevenson WG.** Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases. *Anal Biochem* 218: 325-329, 1994.
24. **Lee HY, and Oh BH.** Aging and arterial stiffness. *Circ J* 74: 2257-2262, 2010.
25. **Lee RM.** Morphology of cerebral arteries. *Pharmacol Ther* 66: 149-173, 1995.
26. **Li X, Geary GG, Gonzales RJ, Krause DN, and Duckles SP.** Effect of estrogen on cerebrovascular prostaglandins is amplified in mice with dysfunctional NOS. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287: H588-594, 2004.
27. **Loke WM, Proudfoot JM, Hodgson JM, McKinley AJ, Hime N, Magat M, Stocker R, and Croft KD.** Specific dietary polyphenols attenuate atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice by alleviating inflammation and endothelial dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30: 749-757, 2010.
28. **Lu LH, Lee SS, and Huang HC.** Epigallocatechin suppression of proliferation of vascular smooth muscle cells: correlation with c-jun and JNK. *Br J Pharmacol* 124: 1227-1237, 1998.
29. **Martinez-Lemus LA, Hill MA, and Meininger GA.** The plastic nature of the vascular wall: a continuum of remodeling events contributing to control of arteriolar diameter and structure. *Physiology (Bethesda)* 24: 45-57, 2009.

30. **Mircoli L, Mangoni AA, Giannattasio C, Mancina G, and Ferrari AU.** Heart rate-dependent stiffening of large arteries in intact and sympathectomized rats. *Hypertension* 34: 598-602, 1999.
31. **Muller JM, Davis MJ, and Chilian WM.** Integrated regulation of pressure and flow in the coronary microcirculation. *Cardiovasc Res* 32: 668-678, 1996.
32. **Newby AC.** Matrix metalloproteinases regulate migration, proliferation, and death of vascular smooth muscle cells by degrading matrix and non-matrix substrates. *Cardiovasc Res* 69: 614-624, 2006.
33. **Niu XL, Madamanchi NR, Vendrov AE, Tchivilev I, Rojas M, Madamanchi C, Brandes RP, Krause KH, Humphries J, Smith A, Burnand KG, and Runge MS.** Nox activator 1: a potential target for modulation of vascular reactive oxygen species in atherosclerotic arteries. *Circulation* 121: 549-559, 2010.
34. **O'Rourke MF, and Hashimoto J.** Mechanical factors in arterial aging: a clinical perspective. *J Am Coll Cardiol* 50: 1-13, 2007.
35. **Okuyama S, Okuyama J, Tamatsu Y, Shimada K, Hoshi H, and Iwai J.** The arterial circle of Willis of the mouse helps to decipher secrets of cerebral vascular accidents in the human. *Med Hypotheses* 63: 997-1009, 2004.
36. **Papaioannou TG, Karatzis EN, Vavuranakis M, Lekakis JP, and Stefanadis C.** Assessment of vascular wall shear stress and implications for atherosclerotic disease. *Int J Cardiol* 113: 12-18, 2006.
37. **Park JW, Hong JS, Lee KS, Kim HY, Lee JJ, and Lee SR.** Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate reduces matrix metalloproteinase-9 activity following transient focal cerebral ischemia. *J Nutr Biochem* 21: 1038-1044, 2010.
38. **Park JW, Jang YH, Kim JM, Lee H, Park WK, Lim MB, Chu YK, Lo EH, and Lee SR.** Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate reduces neuronal cell damage and up-regulation of MMP-9 activity in hippocampal CA1 and CA2 areas following transient global cerebral ischemia. *J Neurosci Res* 87: 567-575, 2009.
39. **Pires PW, Deutsch C, McClain JL, Rogers CT, and Dorrance AM.** Tempol, a superoxide dismutase mimetic, prevents cerebral vessel remodeling in hypertensive rats. *Microvasc Res* 80: 445-452, 2010.

40. **Pries AR, Neuhaus D, and Gaehtgens P.** Blood viscosity in tube flow: dependence on diameter and hematocrit. *Am J Physiol* 263: H1770-1778, 1992.
41. **Sanan DA, Newland DL, Tao R, Marcovina S, Wang J, Mooser V, Hammer RE, and 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* 95: 4544-4549, 1998.
42. **Steed MM, Tyagi N, Sen U, Schuschke DA, Joshua IG, and Tyagi SC.** Functional consequences of the collagen/elastin switch in vascular remodeling in hyperhomocysteinemic wild-type, eNOS^{-/-}, and iNOS^{-/-} mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 299: L301-311, 2010.
43. **Sugawara J, Komine H, Hayashi K, Yoshizawa M, Yokoi T, Otsuki T, Shimojo N, Miyauchi T, Maeda S, and Tanaka H.** Effect of systemic nitric oxide synthase inhibition on arterial stiffness in humans. *Hypertens Res* 30: 411-415, 2007.
44. **Sutherland BA, Shaw OM, Clarkson AN, Jackson DN, Sammut IA, and Appleton I.** Neuroprotective effects of (-)-epigallocatechin gallate following hypoxia-ischemia-induced brain damage: novel mechanisms of action. *FASEB J* 19: 258-260, 2005.
45. **Tanabe N, Suzuki H, Aizawa Y, and Seki N.** Consumption of green and roasted teas and the risk of stroke incidence: results from the Tokamachi-Nakasato cohort study in Japan. *Int J Epidemiol* 37: 1030-1040, 2008.
46. **Tonstad S, Joakimsen O, Stensland-Bugge E, Ose L, Bonna KH, and Leren TP.** Carotid intima-media thickness and plaque in patients with familial hypercholesterolaemia mutations and control subjects. *Eur J Clin Invest* 28: 971-979, 1998.
47. **Touboul PJ, Labreuche J, Vicaut E, and Amarenco P.** Carotid intima-media thickness, plaques, and Framingham risk score as independent determinants of stroke risk. *Stroke* 36: 1741-1745, 2005.
48. **Tournaire C, Croux S, Maurette MT, Beck I, Hocquaux M, Braun AM, and Oliveros E.** Antioxidant activity of flavonoids: efficiency of singlet oxygen ($^1\Delta_g$) quenching. *J Photochem Photobiol B* 19: 205-215, 1993.

49. **Tronc F, Mallat Z, Lehoux S, Wassef M, Esposito B, and Tedgui A.** Role of matrix metalloproteinases in blood flow-induced arterial enlargement: interaction with NO. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: E120-126, 2000.
50. **Ushio-Fukai M, Zafari AM, Fukui T, Ishizaka N, and Griending KK.** p22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 271: 23317-23321, 1996.
51. **Won SM, Park YH, Kim HJ, Park KM, and Lee WJ.** Catechins inhibit angiotensin II-induced vascular smooth muscle cell proliferation via mitogen-activated protein kinase pathway. *Exp Mol Med* 38: 525-534, 2006.
52. **Xie C, Kang J, Burris R, Ferguson ME, Schauss AG, Nagarajan S, and Wu X.** Acai juice attenuates atherosclerosis in ApoE deficient mice through antioxidant and anti-inflammatory activities. *Atherosclerosis* 2011.
53. **Xu Y, Zhang JJ, Xiong L, Zhang L, Sun D, and Liu H.** Green tea polyphenols inhibit cognitive impairment induced by chronic cerebral hypoperfusion via modulating oxidative stress. *J Nutr Biochem* 21: 741-748, 2010.
54. **Zalba G, Fortuno A, Orbe J, San Jose G, Moreno MU, Belzunce M, Rodriguez JA, Beloqui O, Paramo JA, and Diez J.** Phagocytic NADPH oxidase-dependent superoxide production stimulates matrix metalloproteinase-9: implications for human atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27: 587-593, 2007.

Table 1: Body weight (g), plasma lipids and glucose levels (mM) in mice

	<i>Weight</i>	<i>Total cholesterol</i>	<i>LDL- cholesterol</i>	<i>HDL- cholesterol</i>	<i>TG</i>	<i>Glucose</i>
6-mo WT	36±1 (13)	2.1±0.2 (5)	0.7±0.1 (5)	1.2±0.1 (5)	0.7±0.1 (5)	26.8±3.0 (5)
6-mo ATX	32±2 (12)	15.7±1.3* (5)	10.3±1.2* (5)	1.6±0.1* (5)	7.2±1.3* (5)	15.9±3.6* (5)
6-mo ATX + CAT	31±1 (10)	22.3±1.3† (5)	15.0±1.1† (5)	1.6±0.1 (5)	6.5±0.6 (5)	19.8±1.5 (5)

WT: wild-type mice, ATX: LDLr^{-/-}: hApoB^{+/+} mice, ATX+CAT: LDLr^{-/-}: hApoB^{+/+} mice treated with (+)-catechin (CAT; 30 mg/kg/d), LDL: low-density lipoprotein, HDL: high-density lipoprotein, TG: triglycerides. Results are mean±SEM of (n) mice.

*: P<0.05 versus 6-mo WT; †: P<0.05 versus 6-mo ATX.

Table 2: Evolution of heart rate (HR, bpm), systolic blood pressure (SBP), diastolic blood pressure (DBP, mm Hg) and pulse pressure (PP, mm Hg) measured by tail cuff in mice during 3 months of catechin treatment.

	<i>HR (bpm)</i>	<i>SBP (mm Hg)</i>	<i>DBP (mm Hg)</i>	<i>PP (mm Hg)</i>
3-mo WT (6)	691±9	137±6	106±5	31±2
6-mo WT (6)	684±9	127±3	97±2	30±2
3-mo ATX (11)	644±26	146±3	114±3	32±1
6-mo ATX (5)	662±18	146±7*	112±6*	34±2
6-mo ATX + CAT (6)	602±23	141±8	108±7	33±1

WT: wild-type mice, ATX: LDLr^{-/-}: hApoB^{+/+} mice, ATX+CAT: LDLr^{-/-}: hApoB^{+/+} mice treated with (+)-catechin (CAT; 30 mg/kg/d), LDL: low-density lipoprotein, HDL: high-density lipoprotein. Results are mean±SEM of (n) mice. *: P<0.05 *versus* 6-mo WT.

Figure 1: Effect of a chronic treatment with (+)-catechin (CAT) of 6-mo LDLr^{-/-}: hApoB^{+/+} (ATX) mice, on the arterial compliance expressed as the stress-strain relationship and on the distensibility expressed as incremental distensibility (ID, %/mm Hg) in (A, C) carotids arteries and (B, D) cerebral arteries.

Results are means±SEM of 5-9 mice for carotid arteries and of 10 to 17 mice for cerebral arteries. *: P<0.05 *versus* WT mice; α: P<0.05 *versus* ATX mice.

Figure 2: Effect of a chronic treatment with (+)-catechin (CAT) of 6-mo LDLr^{-/-}: hApoB^{+/+} (ATX) mice, on the structural changes occurring in cerebral arteries. (A) Vessel lumen diameter, (B) vessel external diameter, (C) vessel wall thickness and (D) wall-to-lumen ratio. Results are means±SEM of 10-17 mice. *: P<0.05 *versus* WT mice; α: P<0.05 *versus* ATX.

Figure 3: Effect of chronic treatment with (+)-catechin (CAT) of 6-mo LDLr^{-/-}: hApoB^{+/+} (ATX) mice, on flow-mediated endothelium-dependent dilations induced by increasing shear stresses (dyn/cm²) of pressurized cerebral arteries.

Results are means±SEM of 10 to 17 mice. *: P<0.05 *versus* WT mice; α: P<0.05 *versus* ATX mice.

Figure 4: Effect of a chronic treatment with (+)-catechin (CAT) of 6-mo LDLr^{-/-}: hApoB^{+/+} (ATX) mice on *in vivo* (A) cerebral compliance expressed as the local compliance evaluator, (B) basal cerebral blood flow (nl/sec) normalized to arterial area (mm²) and evaluated in the microvasculature.

In (A) results are means±SEM of 10 mice for WT and ATX mice and of 4 mice for ATX+CAT mice. In (B) results are means±SEM of 77 vessels for WT mice, 25 for ATX mice and 88 for ATX+CAT mice.

*: P<0.05 *versus* WT mice; α: P<0.05 *versus* ATX mice.

Figure 5: (A) Representative example of zymography illustrating pro-MMP-9 activities of cerebral vessels from WT, LDLr^{-/-}: hApoB^{+/+} (ATX) mice and ATX treated, or not,

with (+)-catechin (CAT). **(B)** Each set of experiment was normalized to a reference sample (loaded in every experiments).

Results are means \pm SEM of 6 mice. *: P<0.05 *versus* WT mice; α : P<0.05 *versus* ATX mice.

Figure 6: **(A)** Effect of a chronic treatment of 6-mo LDLr^{-/-}: hApoB^{+/+} (ATX) mice with (+)-catechin (CAT) on plasma VEGF level. **(B)** Representative example of Western Blot illustrating VEGF protein expression of total cerebral vessels from WT, ATX mice treated, or not, with (+)-catechin (CAT). **(C)** Graph represents the protein expression normalized to a reference sample (loaded in every experiment) and after normalization with smooth muscle α -actin.

Results are means \pm SEM of 4-5 mice. α : P<0.05 *versus* ATX mice.

Figure 1

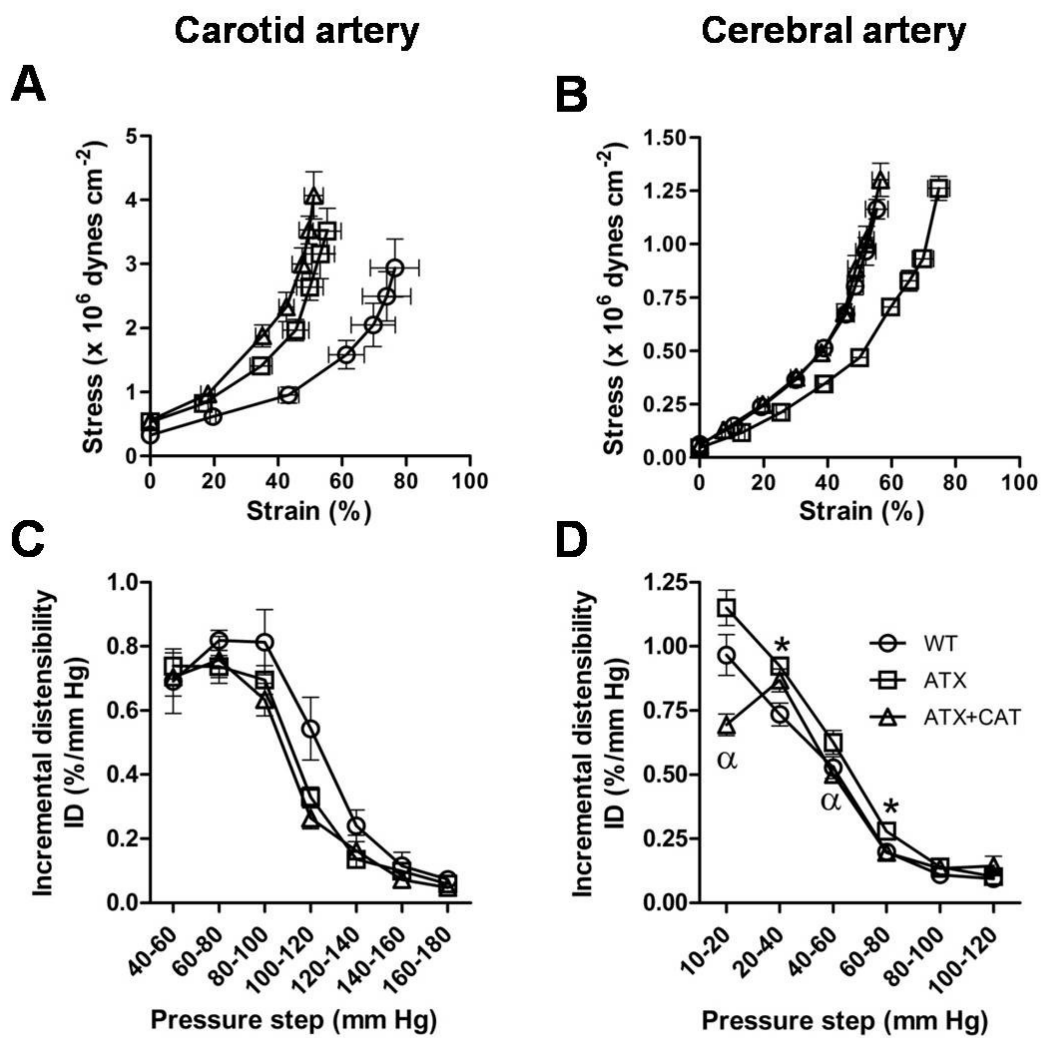


Figure 2

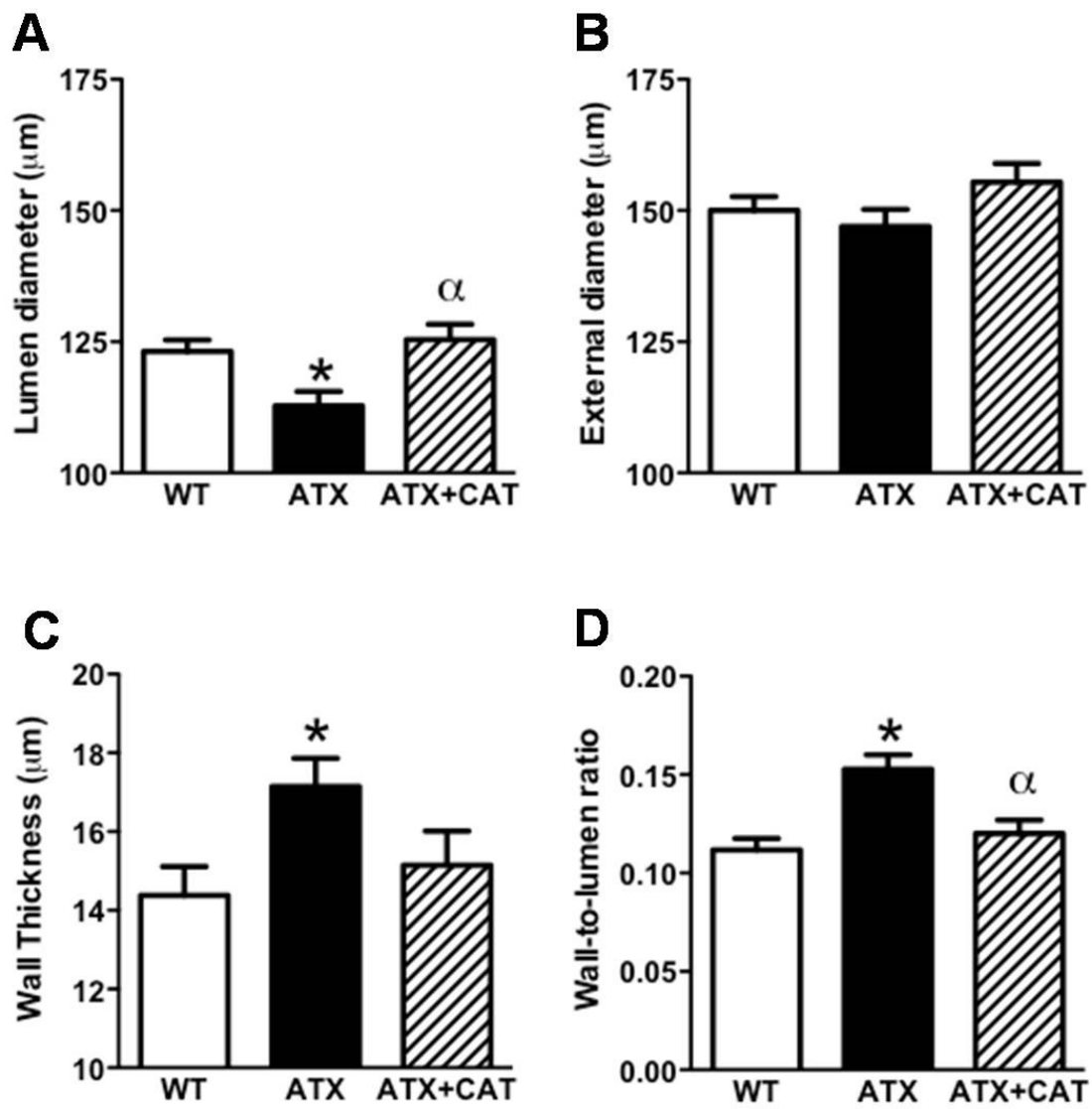


Figure 3

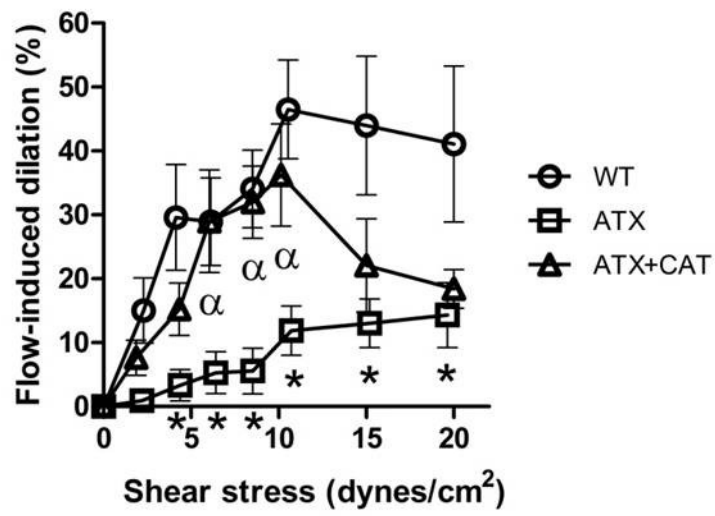


Figure 4

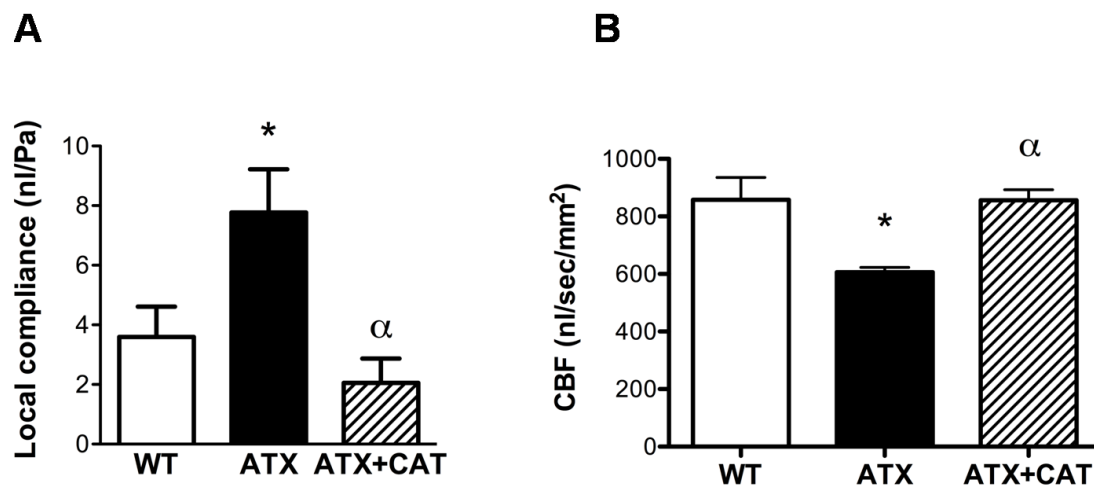


Figure 5

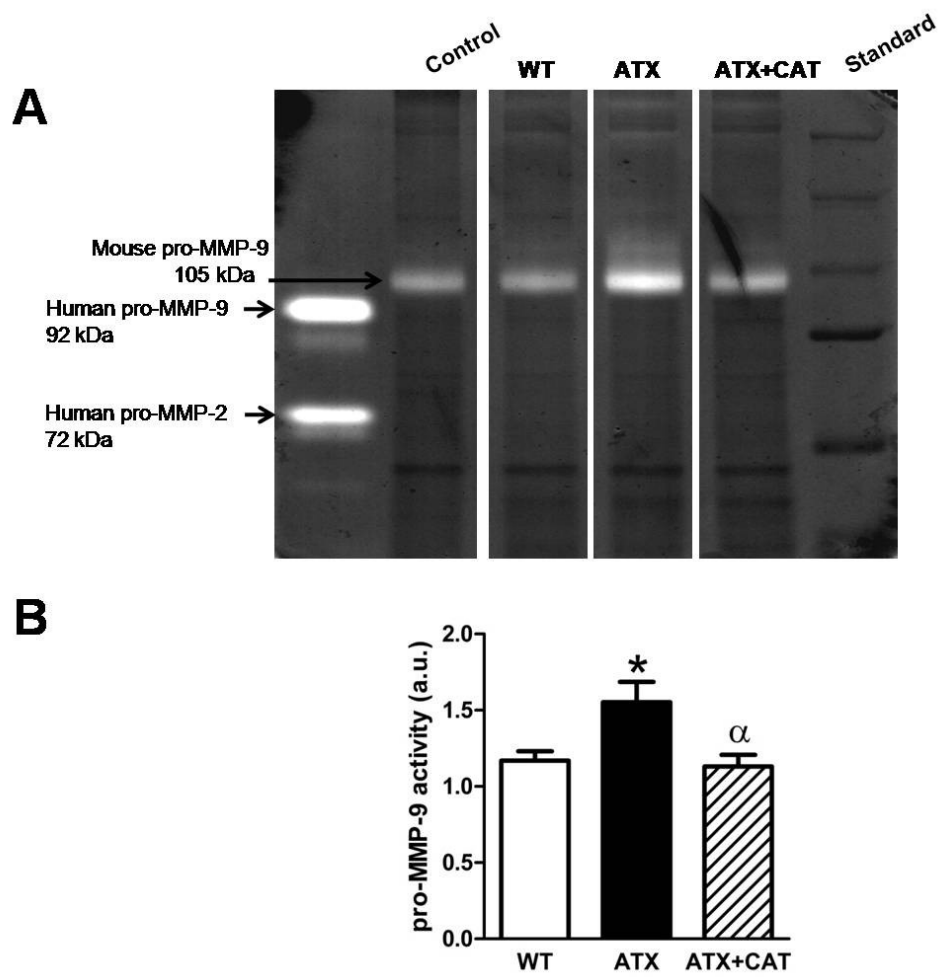
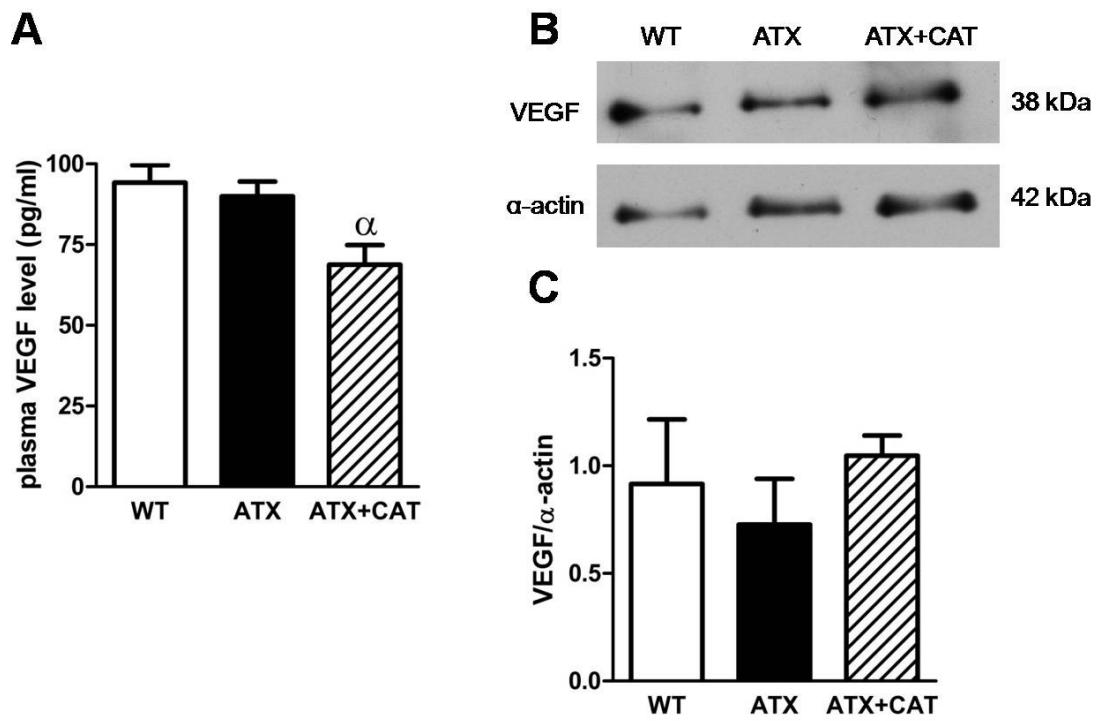


Figure 6



**Étude préliminaire non-
publiée : Impact de la
pulsatilité sur les fonctions
vasculaires cérébrales**

5. Étude préliminaire non-publiée: Impact de la pulsatilité sur les fonctions vasculaires cérébrales

5.1. Introduction

In vivo, le débit sanguin dans les artères cérébrales est pulsatile pourtant l'étude de la fonction endothéliale et du TM réalisée *ex vivo* à l'aide du myographe pressurisé se déroule toujours dans des conditions statiques. La pulsatilité ressentie par les artères cérébrales de résistance est caractérisée par la FC et l'amplitude de l'onde de pouls qui dépend de la capacité des carotides à amortir la pulsatilité du flux sanguin (effet Windkessel). La pulsatilité altère les contraintes de cisaillement ainsi que la fréquence et la puissance des forces exercées perpendiculairement à la paroi, ce qui va influencer les réponses vasculaires qui sont dictées par des *stimuli* mécaniques, tels que la FMD, la FMC et le TM.

Quelques études ont déjà examiné la réponse des artères isolées au débit pulsatile, par exemple, la FMD est sensible à la fréquence des pulsations et est inhibée par l'augmentation de la PP dans l'aorte du lapin (Hutcheson & Griffith, 1991). Dans des artères cérébrales de porc, la déformation des cellules endothéliales causée par un débit pulsatile physiologique transforme la FMC, observée en condition statique, en une FMD (Shimoda *et al.*, 1998).

Très peu d'études ont rapporté l'effet de la pulsatilité sur le tonus vasculaire. Dans les artères coronaires de porc, à pression constante et sans débit, l'amplitude de la pulsatilité dilate les artères *via* un mécanisme indépendant de l'endothélium (Goto *et al.*, 1996). Toutefois, la réponse myogénique face à une augmentation de la pression intraluminale n'a pas été comparée en condition statique *versus* pulsée.

Une étude récente se distingue en évaluant, à l'inverse, les conséquences d'une absence de pulsatilité : la FMD est diminuée et le TM augmenté dans les artères mésentériques de rat maintenues 180 min avant le début de l'expérience dans des conditions non-pulsées *versus* pulsées (Pinaud *et al.*, 2011). L'absence de pulsatilité favorise la production de ROS après 30 min, l'instauration d'un état pro-inflammatoire après 180

min et altère les réponses vasculaire au débit et à la pression après 180 min (Pinaud *et al.*, 2011). De façon intéressante, ces effets délétères liés à l'absence de pouls sont renversés par un traitement antioxydant au tempol, ce qui suggère que la pulsatilité joue un rôle protecteur en inhibant l'élévation des ROS (Pinaud *et al.*, 2011). Cette étude suscite un certain questionnement puisqu'elle implique que les études *ex vivo* réalisées en condition statique sous-estiment les réponses vasodilatatrices et amplifient les réponses vasoconstrictrices.

Notre étude a pour but de mieux comprendre la contribution de la pression pulsatile dans la réponse myogénique des artères de résistance cérébrales. Au niveau cérébral, le TM des artères de résistance est responsable de l'autorégulation c'est pourquoi il occupe un rôle important dans le contrôle du DSC. Dans les études 1 et 2, nous avons rapporté, conformément à la littérature, une rigidification de la carotide associée à l'athérosclérose. Ceci devrait vraisemblablement modifier l'onde de pouls qui devrait se propager jusqu'aux artères cérébrales de résistance localisées en aval et pourrait affecter le contrôle du TM.

Le TM est dicté par la capacité intrinsèque des CMLV à se contracter dépendante de l'équilibre entre l'activation des MLCK et des MLCP (Figure 17). Rappelons que la phosphorylation de la MLC₂₀, qui est le fondement de la réponse contractile, est régulée par deux voies de signalisation : l'activation dépendante du Ca²⁺ de la MLCK et l'inhibition de la MLCP par la kinase associée à Rho (ROK) qui augmente la sensibilité au Ca²⁺ (Cole & Welsh, 2011) (Figure 17). Dans les artères cérébrales du rat, l'inhibition des MLCP est nécessaire à la réponse myogénique et à l'autorégulation du DSC en réponse aux changements de pression (Cole & Welsh, 2011). En effet, dans les artères cérébrales de rats montées dans un myographe pressurisé, l'inhibition de la ROK supprime complètement l'augmentation de la phosphorylation de la MLC₂₀ ainsi que la réponse myogénique concomitantes à l'augmentation de la pression (entre 40 et 120 mm Hg) (Johnson *et al.*, 2009).

En résumé, les effets de la pulsatilité sur le TM des artères cérébrales, encore inconnus à ce jour, pourraient cibler la phosphorylation de la MLCP, un mécanisme central dans la régulation du TM des artères de résistance cérébrales.

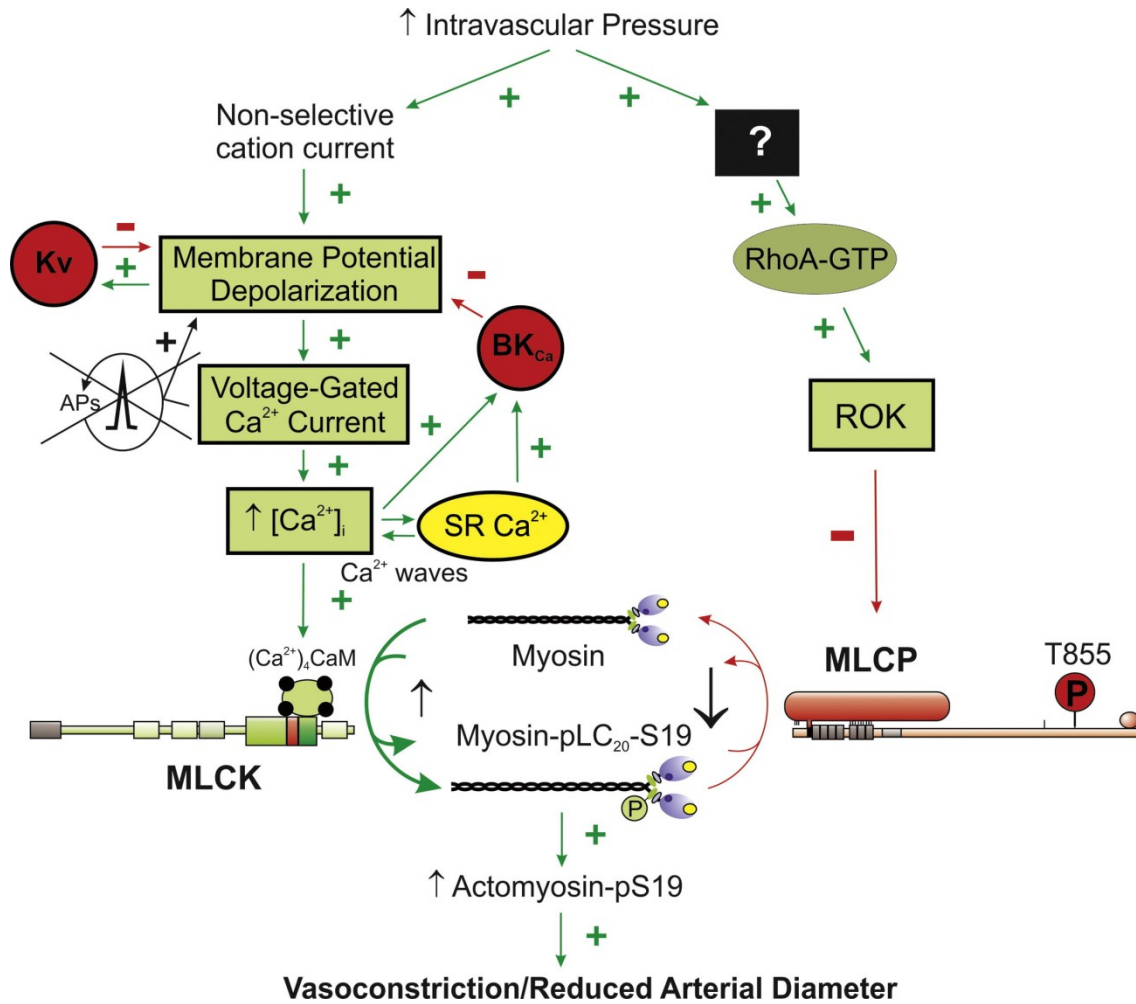


Figure 17 Schématisation des mécanismes impliqués dans la régulation du TM.

K_v : canal potassique activé par le voltage, BK_{Ca} : canal potassique dépendant du Ca²⁺ de grande conductance, APs : potentiels d'action, SR : réticulum sarcoplasmique, MLCK : kinase de la chaîne légère de la myosine, MLCP : phosphatase de la chaîne légère de la myosine, P : phosphorylation, LC₂₀ : chaîne légère de la myosine, RhoA-GTP : activation du membre A de la famille Rho, ROK : kinase associée à Rho, S19, sérine 19, ? : intermédiaire inconnu de la voie de signalisation.

Réimprimé de [Archives of Biochemistry and Biophysics](#), 510/2, William C. Cole, Donald G. Welsh, Role of myosin light chain kinase and myosin light chain phosphatase in the resistance arterial myogenic response to intravascular pressure, 160-173, Copyright (2011), avec la permission de Elsevier.

5.2. Hypothèses et objectifs

Notre hypothèse est que le TM des artères cérébrales de résistance est sensible à la pulsatilité. En premier lieu, nous devons vérifier si les mécanosenseurs des CMLV distinguent une pression intraluminale statique d'une pression intraluminale pulsée en déterminant si la réponse myogénique résultante diffère. Ensuite, nous voulons vérifier les conséquences d'une inhibition de l'activité de la eNOS sur la régulation du TM en condition pulsée et statique afin de prédire si la pulsatilité influence différemment le TM en présence d'une dysfonction endothéliale. Pour terminer, nous voulons déterminer si la phosphorylation des MLCP joue un rôle dans la régulation du TM en condition pulsée *versus* statique, avec ou sans l'inhibition de la eNOS.

5.3. Matériels et méthodes

Pour répondre à mes besoins techniques, des étudiants du Dr Frédéric Lesage de l'École Polytechnique de Montréal ont conceptualisé et fabriqué un système de pompe à piston contrôlé par un programme informatique permettant de propager des ondes pulsées dans une artère installée sur le myographe pressurisé. Grâce à l'interface du programme informatique, il est possible de contrôler l'amplitude (mm Hg) et la fréquence (Hz) des pulsations. Les expériences ont été réalisées sous une amplitude de 30 mm Hg, ce qui correspond à la PP artériolaire chez le rat (Baumbach *et al.*, 1991) pour des artères de même taille que celles étudiées chez la souris, et à une fréquence de 9.2 Hz, ce qui équivaut à 550 bpm, la FC approximative chez une souris non-anesthésiée (Bolduc *et al.*, 2011).

Dans un myographe pressurisé, les artères isolées de souris WT âgées de 3 mois ont été pressurisées à 60 mm Hg et incubées 40 min en conditions statique ou pulsée, en présence ou non du L-NNA, un inhibiteur de la NOS. Puis, une courbe pression-diamètre a été réalisée afin d'évaluer le TM. En parallèle, d'autres artères soumises aux mêmes conditions expérimentales ont été fixées afin d'évaluer la phosphorylation des MLCP par WB.

5.3.1. TM

Le diamètre interne (D) a été mesuré suite à chaque variation de la pression intraluminale entre 20 à 120 mm Hg par intervalle croissant de 20 mm Hg en attendant 4 min entre chaque variation de la pression. La réponse myogénique a été évaluée en absence de débit afin d'éliminer la réponse des cellules endothéliales aux contraintes de cisaillement. Une fois la courbe de TM complétée, le PSS contenu dans la cuve a été échangé pour du $0Ca^{2+}$ PSS contenant 30 μ M de SNP et le courbe a été répétée afin d'obtenir le diamètre interne maximal en condition passive (D_{max}). Le TM pour chaque valeur de pression intraluminale est calculée selon :

$$TM(\%) = \frac{D - D_{max}}{D_{max}} * 100$$

5.3.2. WB

Après une incubation de 40 min à 60 mm Hg, les artères toujours canulées et pressurisées, ont été rapidement transférées dans autre cuve (Quick Transfer chamber, Living Systems Instrumentation, Burlington, VT, USA) contenant une solution de fixation (acétone, 10 % d'acide thrichloroacétique et 10 mM dithiothreitol (DTT)) conservée à -20°C pour 5 min. Après la fixation, les artères ont été lavées (3 x 1 min) de l'acide avec une solution de lavage (acétone 10 mM DTT) conservée à -20°C. Ensuite, les artères ont été lyophilisées pendant 16 h dans un *Speed-Vac*. Puis, un tampon de chargement (60 mM Tris-HCl pH 6.8, 2 % (p/v) SDS, 10 % (p/v) glycérol, 0.01 % (p/v) bleu de bromophénol, 0.1 M DTT fraîchement ajouté) a été ajouté aux artères séchées. Il faut prévoir 1 ml de tampon de chargement pour 1 x 8 mm de segments d'artères et 4 à 5 artères par échantillon. Les échantillons ont été chauffés à 95 °C pour 10 min et incubés 16h à 4°C sous agitation.

Les protéines provenant de 25 μ l d'échantillon ont été séparées sur un gel SDS-PAGE de 10 % (p/v) acrylamide dans un tampon de migration conventionnel à 30 mA. La migration commence à 20 mA jusqu'à ce que le front de migration quitte le gel d'entassement et se poursuit à 90 V. Ensuite, les protéines ont été transférées à 100 V

sur une membrane de nitrocellulose pendant 120 min à 4 °C dans un tampon de transfert conventionnel.

La membrane a été incubée en présence de l'anticorps primaire contre un site de phosphorylation sur la sous-unité régulatrice 1 de la MLCP (MYPT1) [anti-phospho MYPT1 Thr 850, 1 :1000 (Milipore, Billerica, MA, USA), anti-phospho MYPT1 Thr 696, 1 :1000 (Milipore, Billerica, MA, USA)]. Le système de détection à trois anticorps a été utilisé afin d'accroître la sensibilité (Figure 18). L'expression de la α -actine a été utilisée comme contrôle de chargement.

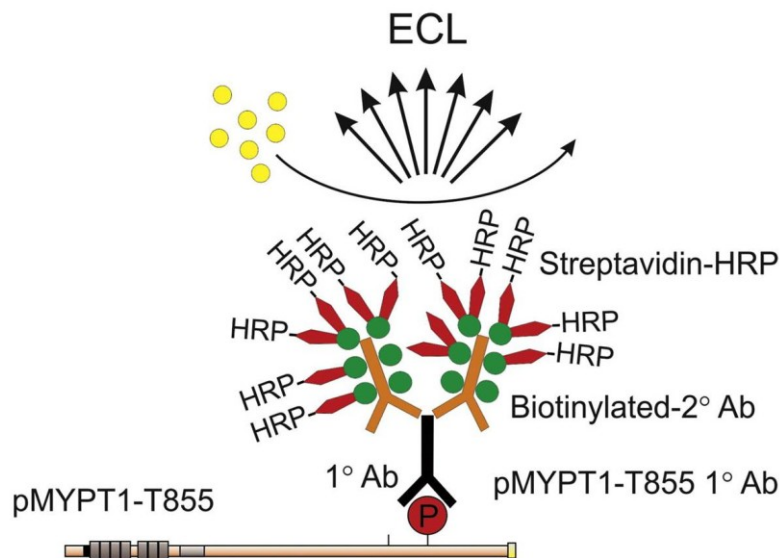


Figure 18 Schématisation de la méthode de détection de WB à trois anticorps.

ECL : substrat pour la détection améliorée de la chimiluminescence, HRP : peroxydase de raifort, Ab : anticorps, pMYPT1-T855 : phosphorylation sur la thréonine 855 de la sous-unité régulatrice 1 de la myosine phosphatase, P : phosphorylation. Tirée de (Cole & Welsh, 2011).

5.4. Résultats préliminaires

En condition statique, les artères cérébrales des souris WT âgées de 3 mois présentent une faible réponse myogénique qui est potentialisée par l'absence de NO (Figure 19C). En condition pulsée, le TM est potentialisé mais quasi insensible à l'inhibition de la eNOS (Figure 19A et D). En présence d'une inhibition de la eNOS, les pulsations freinent la réponse myogénique à haute pression.

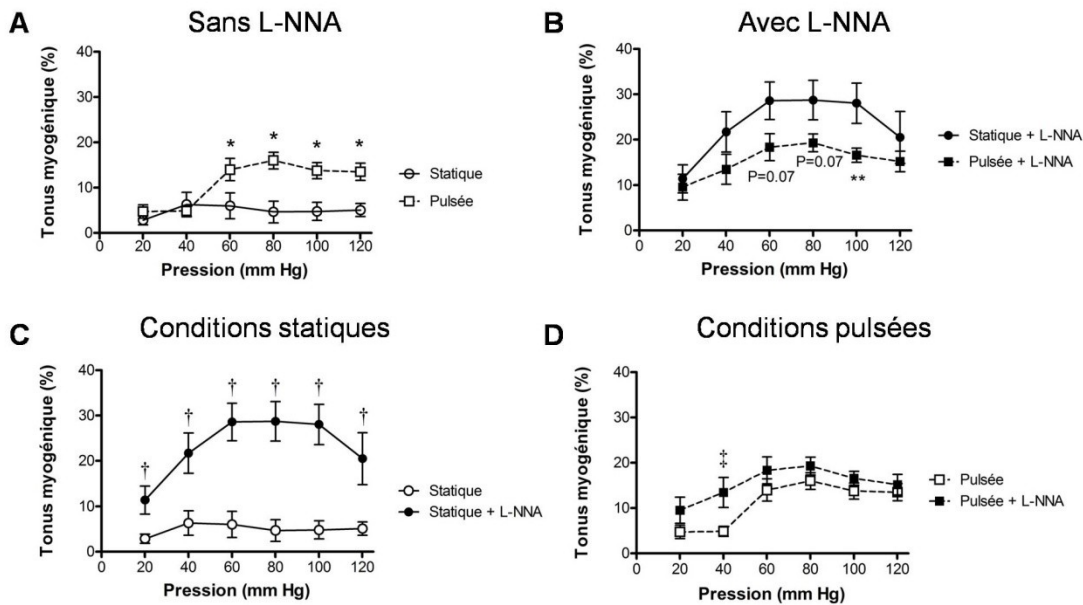


Figure 19 Effet d'une pulsation d'amplitude de 30 mm Hg à une fréquence de 9.2 Hz sur la régulation du TM des artères cérébrales de souris WT âgées de 3 mois, avec et sans inhibition de la eNOS.

Conditions statique (n=5) et pulsée (n=6) sans L-NNA, (B) conditions statique (n=7) et pulsée (n=7) avec 10 μ M de L-NNA, (C) conditions statiques avec et sans L-NNA, (D) conditions pulsées avec et sans L-NNA. * : $P < 0.05$ versus statique sans L-NNA; ** : $P < 0.05$ versus statique avec L-NNA. † : $P < 0.05$ versus statique sans L-NNA; ‡ : $P < 0.05$ versus pulsée sans L-NNA.

En condition pulsée *versus* statique, l'inhibition de la eNOS diminue significativement la phosphorylation de la sous-unité MYPT1 de la MLCP sur les sites T-850 et 698 à une pression de 60 mm Hg (Figure 20).

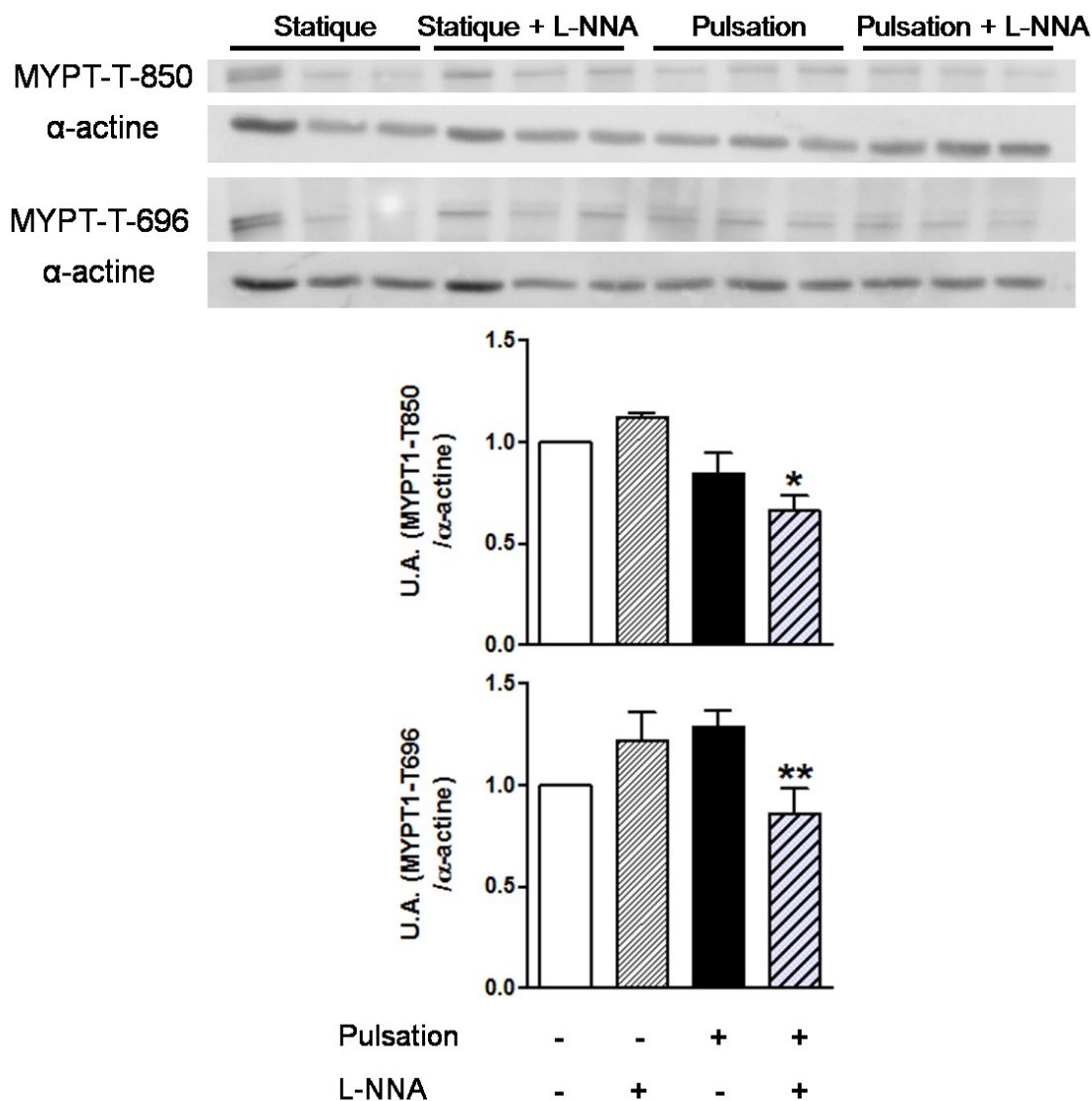


Figure 20 Impact des pulsations avec ou sans inhibition de eNOS sur la phosphorylation de la MLCP dans les artères cérébrales de souris WT âgées de 3 mois, isolées et pressurisées à 60 mm Hg.

Phosphorylation de la sous-unité 1 MYPT sur la thréonine 850 et 696 (130 kDa) normalisée à l'expression de l' α -actine (42 kDa). n=3, * : P<0.05 *versus* sans pulsation et avec L-NNA. ** : P<0.05 *versus* avec pulsation et sans L-NNA.

5.5. Discussion

Ces résultats préliminaires suggèrent que dans des artères cérébrales provenant de souris saines, la pulsatilité potentialise la réponse myogénique *via* un mécanisme inconnu mais indépendant de la phosphorylation des MLCP. À l'inverse, lorsque l'activité de la eNOS est inhibée, la pulsatilité prévient l'augmentation du TM ($P < 0.05$ à 100 mm Hg et $P = 0.07$ à 60 et à 80 mm Hg) *via* un mécanisme qui pourrait être associé à une inhibition de la phosphorylation des MLCP, donc une plus grande activité MLCP (diminution de la sensibilité Ca^{2+} des mécanismes contractiles). Toutefois, nous devons confirmer que la diminution de la phosphorylation de la MLCP est concomitante avec une diminution de la phosphorylation de la MLC_{20} afin de suggérer l'implication de ce mécanisme dans la diminution de la réponse myogénique en condition pulsée avec inhibition de la eNOS.

5.6. Conclusions et perspectives

L'étude approfondie du TM dans des conditions pulsées apportera sans doute de nouveaux éléments physiologiquement pertinents, tels que le changement dans la sensibilité au Ca^{2+} des CMVL, qui pourrait être impliqué dans l'autorégulation du DSC associée à la dysfonction endothéliale. Pour la suite du projet, nous voulons déterminer l'impact de la pulsatilité dans la réponse myogénique et dans la FMD des artères cérébrales des souris ATX. Nous voulons aussi évaluer la phosphorylation de la MLC_{20} et confirmer à une pression plus élevée (100 mm Hg) les niveaux de phosphorylation de la sous-unité MYPT1 de la MLCP obtenus à 60 mm Hg.

Discussion

6. Discussion

Dans cette section, je vais tenter de répondre aux principales interrogations qui ont été soulevées par mes travaux mais, qui n'ont pas pu être expliquées par mes résultats ou qui outrepassent les notions couvertes dans les discussions des articles 1 et 2. En faisant des liens entre mes travaux et ce qui est déjà connu, je vais vous livrer mon interprétation et ma position sur certains sujets intrigants qui sont à mon avis encore un peu obscurs. Je vais aussi poser un regard critique sur l'ensemble de mes travaux en vous présentant ce que je considère comme les principales limitations.

Dans nos études, nous avons caractérisé les changements mécaniques, structuraux, et fonctionnels survenant au niveau des artères cérébrales de souris athérosclérotiques qui ne développent apparemment pas de plaques au niveau de leurs vaisseaux cérébraux. La carotide a été choisie comme contrôle périphérique puisque la littérature prédit une rigidification associée à l'athérosclérose qui s'oppose à l'augmentation de la compliance des artères cérébrales directement en aval. Les effets de deux traitements pharmacologiques qui réduisent la FC (l'ivabradine et le métoprolol), de l'exercice physique volontaire et d'un supplément diététique antioxydant, évalués en mode préventif chez les souris athérosclérotiques, nous ont permis de conclure que le stress mécanique dépendant de la FC contribue aux changements mécaniques affectant la carotide, tandis que la mécanique et la structure des artères cérébrales semblent régulées par les cellules endothéliales. De plus, nous avons proposé, mais non confirmé, l'implication de la MMP-9 dans l'augmentation de la compliance cérébrovasculaire ainsi que l'existence d'une relation entre la fonction endothéliale et l'activation de la MMP-9. Dans l'athérosclérose, la MMP-9 est bien connue pour son rôle dans la progression et dans la rupture de la plaque mais, dans un contexte où la plaque est absente, comment une augmentation de MMP-9 dans les vaisseaux cérébraux devient-elle un phénomène pertinent? Nous avons aussi identifié la dysfonction endothéliale, l'obstruction de la lumière et l'augmentation de la compliance comme potentiellement impliquées dans la réduction du DSC chez la souris athérosclérotique. Le traitement préventif à l'antioxydant catéchine prévient, parallèlement et avec une efficacité similaire, ces trois événements associés à l'athérosclérose, ce qui rend difficile de

discriminer l'implication précise de la compliance dans la régulation du DSC. Il est important de noter que nos conclusions, concernant les rôles respectifs de l'endothélium et de la MMP-9 dans l'augmentation de la compliance cérébrale, sont basées sur des évidences indirectes, ce qui peut limiter notre interprétation des résultats. Pour terminer, un résultat étonnant mérite une clarification, l'exercice physique, souvent décrit dans la littérature comme une intervention très efficace dans la prévention de la maladie coronaire, ne ralentit pourtant pas la progression de la plaque aortique chez les souris athéroclérotiques.

6.1. Les artères cérébrales sont-elles vraiment plus résistantes à l'athérogenèse ?

Malgré une dysfonction endothéliale sévère, les souris ATX âgées (≈ 12 mois) ne développent pas de lésions dans leurs artères cérébrales alors que les carotides sont sérieusement obstruées par la plaque. Le même constat a été fait chez les souris athérosclérotiques ApoE^{-/-}:LDLr^{-/-} âgées de ≈ 20 mois (Langheinrich *et al.*, 2007). Que se soit chez l'humain ou dans les modèles animaux, l'athérogenèse cérébrale se manifeste plus tardivement et les lésions sont moins prononcées qu'au niveau périphérique (Hoekstra & Velleman, 2008). Ces observations suscitent un questionnement : les artères cérébrales pourraient-elles bénéficier d'une protection supérieure face aux lipides circulants ou aux ROS bien qu'elles soient abritées dans un organe riche en lipides et qui est extrêmement susceptible au stress oxydant (Halliwell, 2001) ?

Premièrement, l'occurrence des lésions est étroitement liée aux forces appliquées sur la paroi lors des perfusions systolique et diastolique. La plaque se développe préférentiellement dans les sites où les contraintes de cisaillement sont basses (< 12 dynes/cm² chez l'humain), oscillatoires (< 1.5 dynes/cm² chez l'humain) et turbulentes (bifurcations, courbures) (Cheng *et al.*, 2006; Chatzizisis *et al.*, 2007). Un écoulement dit de Poiseuille, qui implique des contraintes de cisaillement laminaires, régule à la hausse les facteurs anti-athérogéniques (Papaioannou *et al.*, 2006). Grâce à l'autorégulation du DSC, les artères cérébrales sont continuellement perfusées à haut

débit durant la systole et la diastole (O'Rourke & Safar, 2005), ce qui suggère un débit laminaire et par le fait même, une meilleure protection contre la progression des lésions.

Deuxièmement, est-il possible que l'endothélium cérébral soit moins sensible aux lipides oxydés circulants qui jouent un rôle instrumental dans la formation de la plaque ? (Ross, 1993). Les cellules endothéliales cérébrales en culture exposées aux oxLDL répondent par une augmentation des ROS intracellulaires (Hamdheydari *et al.*, 2003) et une induction des mécanismes apoptotiques (Chen *et al.*, 2007). *Ex vivo*, la PCA du lapin se contracte suite à une exposition aux oxLDL par un mécanisme dépendant de l'endothélium qui fait intervenir la libération d'ET-1 (Xie & Bevan, 1999). Ces résultats ne suggèrent pas l'implication d'une protection particulière de l'endothélium cérébral qui pourrait expliquer l'absence d'athérosclérose. À l'opposé, le groupe du Dr Claudio Napoli montre que, contrairement à la carotide, la relaxation dépendante de l'endothélium et la contraction de la basilaire chez le lapin ne sont pas affectées par une exposition aux oxLDL (Napoli *et al.*, 1997). De plus, il a été proposé que l'endothélium cérébral, par son étanchéité supérieure inhérent à son rôle de BBB, soit moins perméable aux LDL circulants (Napoli *et al.*, 1999). À cette égard, nous avons démontré que la composition en cholestérol total des vaisseaux cérébraux n'est pas affectée par le taux élevé de LDL circulants retrouvés chez les souris ATX âgées de 3 mois (Bolduc *et al.*, 2011).

Troisièmement, est-il possible que les artères cérébrales possèdent de meilleures capacités antioxydantes ? Effectivement, le Dr Napoli et son équipe ont démontré que chez des fœtus humains provenant de mères hypercholestérolémiques ainsi que chez les enfants (7.0 ± 3.8 ans) et des adultes (42.5 ± 5.1 ans) sans facteur de risque pour l'athérosclérose, la PCA et la MCA présentent moins de lésions par rapport à la carotide et à l'aorte, et qu'elles possèdent une activité antioxydante manganèse superoxyde dismutase (MnSOD) plus élevée (Napoli *et al.*, 1999; D'Armiento *et al.*, 2001). Chez les personnes âgées (71.8 ± 3.4 ans), la progression rapide des lésions coïncide avec une subite diminution des enzymes antioxydante (catalase, GPx, MnSOD et CuZnSOD), ce qui suggère que l'athérosclérose cérébrale est dépendante des

défenses antioxydantes (D'Armiento *et al.*, 2001). De plus, les résultats d'une étude réalisée chez la caille d'élevage révèlent que les artères cérébrales sont plus résistantes que l'aorte face aux oxLDL parce qu'elles induisent une expression supérieure de l'hème-oxygénase (HO-1), une enzyme ayant des propriétés antioxydantes (Hoekstra & Velleman, 2008). Des résultats du laboratoire cadrent avec l'hypothèse de Napoli stipulant que les enzymes antioxydantes confèrent une résilience des artères cérébrales face à la formation de lésions : contrairement à l'aorte, la production de O_2^- dans l'artère basilaire est insensible à l'hyperlipidémie chez les souris âgées de 3 et 12 mois (Drouin *et al.*, 2011a; Drouin *et al.*, 2011b).

Cependant, les autres types de ROS, comme le $ONOO^-$, et l'activité des enzymes antioxydantes n'ont pas été comparées dans l'aorte et la basilaire de nos souris ATX et WT. De plus, la dysfonction endothéliale, qui est déjà bien installée à six mois dans les artères cérébrales des souris ATX, doit être comparée avec la fonction endothéliale dans l'aorte avant de prendre position quant à l'hypothèse de Napoli.

Une chose est sûre, les artères cérébrales répondent différemment des artères périphériques au processus d'athérogenèse. Pour le moment, la relation entre la formation des lésions et les défenses antioxydantes aortiques et cérébrales chez les souris ATX n'est que corrélative ; il manque beaucoup d'informations quant à l'activité des enzymes antioxydantes et aux autres sources de ROS pour avancer que les artères cérébrales des souris ATX sont moins vulnérables à l'athérogenèse et au stress oxydant.

6.2. Pourquoi les artères cérébrales et les carotides des souris ATX se remodelent-elles différemment?

Les articles 1 et 2 suggèrent que l'endothélium régule les propriétés mécaniques et structurales des artères cérébrales tandis que le stress mécanique, contrôlé par la FC, influence la rigidité de la carotide. En effet, la paroi vasculaire cérébrale maintient son intégrité seulement si l'endothélium reste fonctionnel suite à des traitements à l'ivabradine, à l'exercice physique et à la catéchine. D'un autre côté, seule une réduction de la FC avec l'ivabradine et le métoprolol parvient à atténuer la rigidification de la carotide. Il est à noter que les segments utilisés pour tester la

compliance carotidienne étaient toujours dépourvus de plaques. Nos résultats soulignent que les effets d'un traitement sur un type de vaisseaux ne peuvent pas être généralisés à l'ensemble du lit vasculaire.

Effectivement, il semble que la nature du remodelage artériel soit déterminée par le rôle et la localisation de l'artère. En guise d'explication, les carotides, qui sont considérées analogiquement comme de simples tuyaux qui absorbent la pulsativité du débit sanguin, sont hypersensibles aux variations dans les forces exercées sur la paroi, la pression et les contraintes de cisaillement. Les artères cérébrales, étant plus loin du cœur, sont moins prédisposées à ressentir une pulsativité aussi intense que les carotides et la FMD, qui permettrait de répondre hypothétiquement à l'hyperémie fonctionnelle par la propagation rétrograde de la vasodilatation locale des artérioles intra-parenchymateuses, est une fonction principale des artères cérébrales de résistance entièrement dépendante de l'endothélium.

La fonction et la localisation déterminent forcément la composition de la paroi, un autre aspect qui influence le remodelage. L'épaisse paroi élastique des carotides leur permet d'absorber la pulsativité à haute pression et la musculature des artères cérébrales de résistance, qui sont dépourvues de lame élastique externe et d'adventice, prédit une forte réactivité vasculaire et une hémodynamie plus stable. Par exemple, la paroi des artérioles cérébrales du rat est composée de moins de 1 % de collagène et de 6 % d'élastine (Baumbach *et al.*, 1988b) ; ces pourcentages s'élèvent à 24 % et 29 %, respectivement, dans la carotide de la souris (Humphrey *et al.*, 2009). Autrement dit, si les fibres structurales occupent 55 % du volume de la paroi dans les carotides alors qu'elles occupent moins de 10 % dans les artères cérébrales, il est logique de penser qu'un changement dans ces fibres structurales sera plus discret et moins influant sur la mécanique des artères cérébrales que celle des carotides. À ce sujet, dans l'article 1, l'estimation de la composition protéique du collagène et de l'élastine dans les vaisseaux cérébraux par WB suggère que le remodelage associé à l'athérosclérose est indépendant d'un changement dans l'abondance des fibres structurales. Chez les souris âgées, la rigidification de la carotide est en accord avec une augmentation du collagène I et III et une diminution de l'élastine dans l'adventice (Fleenor *et al.*, 2010). Nous n'avons pas

évalué le collagène et l'élastine dans la carotide des souris ATX mais, les conséquences de l'athérosclérose étant en quelque sorte une amplification des effets du vieillissement, une élévation similaire du collagène dans la carotide de nos souris ATX ne serait surprenante.

6.3. Que connaît-on de l'implication de la MMP-9 dans le remodelage cérébral associé à l'athérosclérose ?

Puisque les oxLDL, les molécules inflammatoires, les ROS et l'hypercholestérolémie sont tous des stimuli qui activent la MMP-9, il semble évident que la MMP-9 soit impliquée dans le remodelage vasculaire associé à l'athérosclérose (Galis & Khatri, 2002). En effet, la MMP-9 a été beaucoup étudiée pour son rôle dans la progression et la rupture de la plaque athérosclérotique (Galis & Khatri, 2002). Étant donné la faible incidence de la plaque au niveau cérébral, les résultats proviennent en majeure partie des artères périphériques et ainsi, l'implication de la MMP-9 cérébrale dans l'athérosclérose est très peu connue. En réalité, nous savons uniquement que chez l'humain, l'expression et l'activité de la MMP-9 augmentent en fonction de l'âge et de la gravité des lésions athérosclérotiques dans les artères du polygone de Willis (D'Armiento *et al.*, 2001; Caird *et al.*, 2006). Nous sommes les premiers à valider que l'activité de la MMP-9 augmente avec l'âge et l'athérosclérose dans des vaisseaux cérébraux dépourvus de lésions (Bolduc *et al.*, 2011). Notre hypothèse selon laquelle l'activité MMP-9 est impliquée dans le remodelage des artères cérébrales associé à l'athérosclérose n'est que corrélative et n'a jamais été démontrée directement. Au niveau cérébral, plusieurs études suggèrent que l'élévation de la MMP-9 en réponse à un état pathologique, tel que l'ischémie cérébrale (Park *et al.*; Asahi *et al.*, 2001), l'anévrisme cérébral induit par l'élastase (Nuki *et al.*, 2009) et les malformations artério-véneuses cérébrales (Lee *et al.*, 2004) est imputée dans le remodelage artères cérébrales. Traiter nos souris ATX avec un inhibiteur spécifique de la MMP-9, tel que le SB-3CT (Gu *et al.*, 2005), ou induire l'athérosclérose chez des souris MMP-9^{-/-}, nous permettrait de démontrer le rôle de la MMP-9 dans le remodelage cérébral associé à l'athérosclérose.

6.4. Quelle est la relation entre la fonction endothéliale et l'activité de la MMP-9 au niveau cérébrovasculaire ?

Dans l'article 1, les résultats de FMD obtenus en présence de L-NNA suggèrent que la réponse vasodilatatrice des artères cérébrales dépendante de la eNOS chez les WT est perdue chez les souris ATX. L'ivabradine, mais pas le métoprolol, (résultats non-publiés) ainsi que la catéchine protègent la vasodilatation dépendante de la eNOS (Drouin *et al.*, 2011a) chez les ATX. Nous n'avons pas de données confirmant que l'exercice physique préserve aussi l'activité de la eNOS chez les souris ATX, mais les études publiées sur le sujet (voir la section 1.3.4.3 de l'Introduction) abondent dans ce sens. L'effet inhibiteur de l'ivabradine, l'exercice physique et la catéchine, mais pas du métoprolol, sur l'activité de la MMP-9 dans les vaisseaux cérébraux est-il en lien avec l'amélioration de la fonction endothéliale dépendante de la eNOS? Au niveau des artères périphériques, cette relation entre la biodisponibilité du NO et l'activité de la MMP-9 existe, mais est-elle transposable au niveau cérébral sachant que le facteur principal de vasodilatation produit par la eNOS est le H₂O₂ (Drouin *et al.*, 2007)?

Au niveau périphérique, le NO inhibe l'activité de la MMP-9 en participant à la formation du complexe tertiaire inhibiteur MMP-9/NO/TIMP (Steed *et al.*, 2010). La production de NO atténuée par les ROS chez les souris hyperhomocystéinémiques, chez les souris eNOS^{-/-} et chez les souris n'exprimant plus la NOS inducible (iNOS^{-/-}) est en accord avec une augmentation de l'activité MMP-9 dans l'aorte (Steed *et al.*, 2010). Les artères cérébrales des souris produisent du NO et du H₂O₂ à l'état basal, mais la stimulation de la eNOS par l'ACh ou par le débit induit la relâche exclusivement du H₂O₂ (Drouin *et al.*, 2007; Drouin & Thorin, 2009). Une étude récente montre que la génération d'H₂O₂ mitochondrial régule négativement l'expression génique de la MMP-9 dans les macrophages des alvéoles pulmonaires et que conformément, la catalase (qui catabolise le H₂O₂) stimule la surexpression de la MMP-9 (Murthy *et al.*, 2010). En revanche, sur des cellules endothéliales en culture, l'ajout de H₂O₂ exogène génère une réponse biphasique : une faible concentration de H₂O₂ (1 µM : quantité générée par les cellules endothéliales stimulées par VCAM-1), active la MMP-9, tandis qu'une forte concentration (50 µM : quantité produite par des macrophages activés)

l'inhibe (Deem & Cook-Mills, 2004). À l'inverse, l'ajout de 50 μM de NO, de H_2O_2 ou de ONOO^- sur des cellules endothéliales microvasculaires cultivées sur une monocouche de collagène stimule l'activité de la MMP-9 d'environ 500 %, ce qui dégrade le collagène (Haorah *et al.*, 2007). Autrement dit, l'effet du H_2O_2 sur la MMP-9 est mixte, il est donc difficile de prédire les conséquences de sa libération par la eNOS. En ce qui concerne les ROS, la production du O_2^- par la NADPH oxydase des microvaisseaux cérébraux augmente l'expression protéique sensible à l'apocynine de la MMP-9 (Liu *et al.*, 2008). De cette façon, les ROS régulent indirectement, en inactivant le NO, et directement l'activité de la MMP-9.

Bien qu'il existe des inconsistances entre les résultats publiés, il semble tout de même qu'il y ait une relation entre la MMP-9 et le NO, le H_2O_2 et les ROS. Toutefois, il n'est pas connu si le NO et le H_2O_2 sont relâchés en quantité suffisante par la eNOS cérébrale afin d'avoir un effet inhibiteur sur la MMP-9. Comme l'antioxydant catéchine réduit l'activité MMP-9, il faut aussi considérer l'effet médiateur des ROS sur la MMP-9 chez les souris ATX. Il est probable que la perte de NO et de H_2O_2 et l'environnement pro-oxydant associé à l'athérosclérose contribuent ensemble à l'augmentation de l'activité de la MMP-9 dans les vaisseaux cérébraux.

Dans l'article 1, les effets délétères obtenus avec le métoprolol chez les souris ATX suggèrent que les récepteurs β_1 -AR endothéliaux (Graves & Poston, 1993; Figueroa *et al.*, 2009) sont importants pour la fonction endothéliale cérébrale. Dans les artères mésentériques (Figueroa *et al.*, 2009), les artères pulmonaires (Banquet *et al.*, 2011), l'artère brachiale (Majmudar *et al.*, 1999), l'artère fémorale (Xu *et al.*, 2000) et l'aorte (Ferro *et al.*, 2004), les β -AR endothéliaux stimulés protègent l'intégrité endothéliale et stimulent la production de NO dépendante de l'endothélium. De façon intéressante, les MMP-7 et 9 contractent les microvaisseaux mésentériques en clivant le domaine extracellulaire des β_2 -AR endothéliaux (Rodrigues *et al.*, 2010). L'augmentation de l'activité plasmatique MMP-2,-7 et -9 liée à l'hypertension pourrait expliquer la dilatation réduite aux agonistes β_2 -AR chez le rat SHR et chez les patients hypertendus (Rodrigues *et al.*, 2010). Les MMP-7 et 9 clivent aussi le domaine extracellulaire des récepteurs du VEGF localisés sur l'endothélium des artères, artérioles et capillaires

cardiaques des rats SHR, ce qui entraîne une forte augmentation de l'apoptose endothéliale (Tran *et al.*, 2010).

En résumé, il semble que l'activité de la MMP-9 et la dysfonction endothéliale s'autostimulent dans un cercle vicieux où le manque de NO/H₂O₂ ainsi que l'augmentation des ROS activent la MMP-9, et où la MMP-9 activée bloque une voie importante de la vasodilatation et favorise un endothélium apoptotique.

6.5. Y-a-t-il une relation entre l'activité cérébrale de MMP-9 et les déficits cognitifs ?

Les patients atteints de la maladie d'Alzheimer et de démence vasculaire présentent un taux anormalement élevé de MMP-9 au niveau du plasma (Lorenzl *et al.*, 2002), dans la paroi des vaisseaux intracrâniens (Asahina *et al.*, 2001), des neurones de l'hippocampe (Backstrom *et al.*, 1996), du liquide cérébrospinal (Adair *et al.*, 2004) et des cortex pariétaux et frontaux (Bruno *et al.*, 2009). En fait, la MMP-9 pourrait jouer un rôle dans la maladie d'Alzheimer en favorisant le remodelage vasculaire, la détérioration de la BBB, la mort neuronale (Lorenzl *et al.*, 2002) et la dégradation du β A (Backstrom *et al.*, 1996). Chez les souris ATX âgées de six mois, nous avons rapporté des déficits cognitifs et une augmentation de l'activité MMP-9 dans les vaisseaux cérébraux. Est-il possible que ces deux événements soient reliés?

D'après les travaux de Bruno *et al.*, l'association corrélative entre l'augmentation de l'activité MMP-9 et la gravité des déficits cognitifs s'explique par la dégradation du facteur de croissance neuronal (NGF) dans le système nerveux central (Bruno *et al.*, 2009). Les neurones cholinergiques antéro-basaux impliquées dans les mécanismes de la mémoire nécessitent un apport ininterrompu en NGF, sans quoi ils disparaissent (Cuello & Bruno, 2007). Le NGF est synthétisé sur demande sous la forme du précurseur (proNGF) et doit être converti extracellulairement en NGF mature par la plasmine afin d'exercer son rôle dans la différenciation, la survie et la croissance neuronale (Cuello & Bruno, 2007). En activant la MMP-9, la plasmine régule aussi la dégradation rapide du NGF mature en excès (Bruno & Cuello, 2006). Or, chez les patients souffrant de la maladie d'Alzheimer cette cascade métabolique est dérégulée :

le proNGF non-fonctionnel et la MMP-9 augmentent tandis que la plasmine diminue (Cuello & Bruno, 2007). Ainsi, la dégradation du NGF est favorisée au détriment de sa maturation, ce qui entraîne l'atrophie du système cholinergique, la diminution de la relâche du neurotransmetteur ACh et le déclin des facultés d'apprentissage et de la mémoire (Cuello *et al.*, 2010). Il est intéressant de noter que l'exercice physique augmente la relâche endothéliale de l'activateur tissulaire du plasminogène (Smith *et al.*, 2003), ce qui, théoriquement, augmenterait le niveau de plasmine (Eggermont *et al.*, 2006). Par juxtaposition, on peut spéculer que l'exercice physique favoriserait la maturation du NGF et donc l'intégrité neuronale.

De plus, chez le rat et la souris, la neuroinflammation induite à l'aide d'agents neurotoxiques est définie par une augmentation de l'activité MMP-9 qui est responsable de la mort neuronale (Jourquin *et al.*, 2003; Mizoguchi *et al.*, 2009) et de l'apparition de troubles cognitifs (Mizoguchi *et al.*, 2009). Grâce à des inhibiteurs spécifiques pour la MMP-9 (Jourquin *et al.*, 2003; Mizoguchi *et al.*, 2009) ou chez la souris MMP-9^{-/-} (Mizoguchi *et al.*, 2009), les effets délétères de la MMP-9 sur la survie neuronale et la mémoire sont atténués. Il est intéressant de souligner que chez les souris ATX âgées de six mois, l'augmentation de l'activité MMP-9 coïncide (Bolduc *et al.*, 2012) avec une perte de la capacité d'apprentissage (Drouin *et al.*, 2011a) et que le traitement à la catéchine prévient ces deux événements associés à l'athérosclérose. Évidemment, cette observation est purement corrélative puisque nous n'avons jamais évalué la mort neuronale ou l'expression du NGF chez les souris ATX. Toutefois, il est important de reconnaître, qu'outre la diminution du DSC, d'autres événements pourraient aussi contribuer au déclin cognitif. Le rôle de la MMP-9 dans l'induction des dommages cérébraux associés à l'athérosclérose dépasse sans doute son implication potentielle dans les changements mécaniques de la paroi des artères cérébrales.

6.6. La compliance des artères cérébrales influence-t-elle positivement ou négativement le contrôle du DSC?

Dans l'étude 2, nous avons démontré que la catéchine préserve la fonction endothéliale et les changements structuraux et biomécaniques des artères cérébrales, ce

qui contribue potentiellement à maintenir le DSC de base. Cependant, cette étude ne permet pas de dissocier l'impact spécifique de la compliance, de la structure et de la fonction endothéliale sur le contrôle du DSC. Le changement de compliance est observé *in vivo*, ce qui suggère qu'il n'est pas masqué par l'autorégulation (TM) et donc qu'il joue possiblement un rôle dans le contrôle du DSC.

D'après Baumbach, la distensibilité permet de compenser pour un rétrécissement de la lumière en augmentant la capacité de dilation maximale lorsque le niveau d'activité métabolique requiert une hausse de l'apport sanguin (Baumbach & Heistad, 1992).

D'autre part, le TM de l'artère permet de maintenir un tonus de base en fonction de la pression intraluminale. On peut spéculer que l'énergie requise par la paroi pour maintenir le diamètre de base est d'autant plus élevée que le diamètre de l'artère est grand et conséquemment, l'artère plus distensible est peut-être moins efficace myogéniquement parlant. Évidemment, le nombre et la fonctionnalité des CMLV sont aussi des paramètres déterminants pour les propriétés myogéniques. Chez les souris ATX, l'augmentation de la compliance s'accompagne d'un épaississement de la paroi mais, la morphométrie, la quantité des CMLV et l'organisation de la MEC n'ont pas été évaluées. Ainsi, nous ne pouvons pas prédire comment les modifications à l'origine de l'hypertrophie et du changement de compliance vont influencer le comportement *in vivo* des CMLV. Toutefois, nous savons qu'*ex vivo* le TM cérébral est amplifié chez les souris ATX (Drouin *et al.*, 2011a) indépendamment des propriétés contractiles et vasodilatatrices des CMLV des artères cérébrales. Effectivement, la contraction maximale (K^+ 127 mM) et la vasodilatation induite par un donneur de NO (SNP) ne sont pas altérées par l'athérosclérose (Bolduc *et al.*, 2012).

De plus, la distensibilité des artères cérébrales pourrait protéger les artérioles en atténuant la pulsativité du débit sanguin. Normalement, les carotides assurent l'amortissement de la pulsativité sanguine mais, chez les souris ATX les carotides plus rigides pourraient vraisemblablement reléguer leur rôle au domaine de résistance cérébrovasculaire.

Bien que l'influence directe de l'augmentation de la compliance sur le DSC reste encore inconnue, il semble que ce changement mécanique, en augmentant possiblement

la capacité dilatatoire et l'absorption de la pulsatilité, s'inscrit dans le cadre d'un remodelage adaptatif positif. Je propose que sans l'augmentation de la compliance des artères cérébrales, la hausse du TM et la baisse du DSC seraient davantage exacerbées chez les souris ATX âgées de six mois.

6.7. Pourquoi l'exercice physique ne réduit pas la plaque dans l'aorte des souris ATX ?

Dans l'étude 1, nous avons montré que chez les souris ATX âgées de 6 mois, l'ivabradine freine la progression de la plaque dans l'aorte thoracique tandis que l'exercice physique volontaire n'a aucun effet.

De nombreuses études suggèrent que l'exercice physique prévient non seulement la progression de la plaque (Okabe *et al.*, 2007) mais, contribue aussi à la régression de la plaque déjà installée (Ramachandran *et al.*, 2005). Alors que certaines études soutiennent que l'exercice physique réduit la sévérité des lésions, sans améliorer le profil lipidique plasmatique, en augmentant la biodisponibilité du NO (Niebauer *et al.*, 2003; Okabe *et al.*, 2007; Shimada *et al.*, 2007), d'autres révèlent que l'exercice physique peut réduire la plaque dans l'aorte, indépendamment de la fonction endothéliale et des paramètres hémodynamiques, en diminuant l'expression des récepteurs AT₁ (Pellegrin *et al.*, 2009). Il est aussi reconnu que l'exercice physique retarde la progression des lésions en induisant les défenses antioxydantes par l'effet d'hormesis (Meilhac *et al.*, 2001). En effet, quelques études montrent que les antioxydants (vitamine E et vitamine C) abrogent les bénéfices associés à l'exercice physique sur la réduction de la plaque, l'induction des défenses antioxydantes endogènes et la sensibilité à l'insuline (Meilhac *et al.*, 2001; Ristow *et al.*, 2009). À l'opposé, le groupe du Dr Ignarro montre une potentialisation de l'effet sur la réduction de la plaque si l'exercice est combiné avec un traitement métabolique (vitamine C, vitamine E et L-arginine) (Napoli *et al.*, 2004; Napoli *et al.*, 2006). La théorie stipulant que l'exercice physique réduit les lésions en accélérant le métabolisme du cholestérol est aussi défendue dans la littérature (Meissner *et al.*, 2011). Il n'y a donc pas consensus

général qui suggère que la réduction de la plaque par l'exercice découle exclusivement d'un mécanisme particulier.

Une discordance beaucoup plus frappante capte mon attention : l'inefficacité de l'exercice physique à réduire la plaque aortique chez les souris ATX n'est pas si inattendue et surprenante que je le croyais. En effet, il existe plusieurs évidences qui vont à l'encontre de la prévention de l'athérosclérose par l'exercice physique. Pour commencer, chez les singes nourris avec une diète athérogénique, 40 min de course trois fois par semaine pour une durée de 34 mois n'empêche pas la progression de la plaque (Williams *et al.*, 2003). D'ailleurs, cette étude rapporte que les bénéfices associés à l'exercice chez le primate sont très modestes : mis à part une diminution de la FC, une augmentation de la fraction d'éjection et une diminution de la réponse au stress, la fonction endothéliale coronaire, les lipides plasmatiques et le poids corporel demeurent inchangés (Williams *et al.*, 2003). Chez des porcs nourris avec une diète athérogénique et suivant un programme de course d'une durée de 85 min par jour, à raison de cinq fois par semaine pendant cinq mois, l'exercice n'a pas influencé le phénotype pro-athérogénique des cellules endothéliales, le nombre de cellules spumeuses et n'a pas augmenté l'expression de la eNOS et des enzymes antioxydantes au niveau des artères coronaires (Arce-Esquivel *et al.*, 2011). Étonnés, les auteurs se rabattent, entre autres, sur l'hypothèse selon laquelle l'initiation de la thérapie était à un stage pathologique trop précoce, afin d'expliquer l'échec de l'exercice physique dans leur étude. Cette explication m'apparaît un peu déplacée considérant que le dicton «mieux vaut prévenir que guérir» est le principe de base de la médecine préventive. Dans la même lignée, une étude chez de jeunes adultes (28 ± 4 ans) rapporte que l'exercice physique (3h par semaine de sport d'endurance ou récréationnel) n'affecte pas les manifestations précoces de l'athérosclérose dans la carotide (Popovic *et al.*, 2010). Chez des sujets plus âgés (53 ± 6 ans), une régression des lésions coronaires est observée seulement si les patients s'adonnent à cinq ou six heures d'exercice physique intense par semaine, en plus de suivre une diète faible en gras pendant un an (Hambrecht *et al.*, 1993).

Enfin, il ne faut pas s'alarmer et conclure que l'exercice physique à un jeune âge est inutile mais, il est possible que l'exercice physique soit plus un style de vie qu'une intervention thérapeutique en soi. En effet, chez l'humain l'exercice physique fait souvent partie d'un mode de vie sain où l'alimentation et le poids corporel sont des paramètres dépendants. Une étude chez des souris apoE^{-/-} nourries avec une diète riche en gras démontre que sans intervention diététique (substitution de la diète riche en gras pour une diète riche en protéine), l'exercice n'a aucun effet sur l'accumulation de la plaque dans l'aorte (Cesar *et al.*, 2010).

Dans notre étude, la différence entre l'effet de l'ivabradine et de l'exercice physique volontaire sur la progression de la plaque pourrait être expliquée par l'importance de la FC et de l'accumulation du *stress* sur la paroi des artères de conductance. Contrairement à l'ivabradine, sur une période de 24h, l'exercice physique ne réduit pas la FC. Les effets anti-athérogéniques d'une diminution de la FC sont reconnus (Giannoglou *et al.*, 2008) et dans contexte de la souris ATX, il semble que c'est la seule explication valable. Bien que l'extrapolation chez l'humain soit risquée, dans l'étude de Hambrecht, une charge d'exercice moyenne de 3.3h par semaine occasionne une diminution de la FC au repos de 74 à 68 bpm et empêche la progression des lésions coronaires (Hambrecht *et al.*, 1993).

Il y a apparemment une déconnection entre les effets de l'exercice physique sur les artères cérébrales et sur la progression de la plaque dans l'aorte mais, il n'a aucun doute que l'exercice physique pratiqué régulièrement est gage d'une meilleure qualité de vie : il diminue la mortalité et la morbidité CV (Yung *et al.*, 2009), il prévient la maladie d'Alzheimer (Lange-Asschenfeldt & Kojda, 2008), il rehausse les défenses immunitaires (Gleeson, 2007), il atténue les symptômes de la dépression et l'anxiété (Paluska & Schwenk, 2000) et il diminue les risques de cancer (Wen *et al.*, 2011).

6.8. Les limitations

Le paradigme que nous proposons entre la fonction endothéliale et la compliance cérébrovasculaire, c'est-à-dire que la compliance est d'autant plus élevée

que la FMD est basse, s'appuie exclusivement sur une démonstration corrélative indirecte (Figure 21).

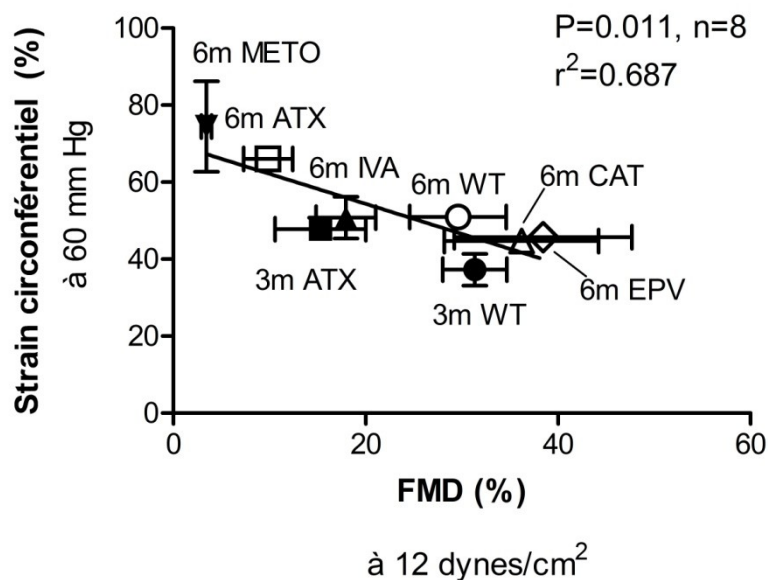


Figure 21 Corrélation négative significative entre la FMD et le *strain* circonférentiel dans les artères cérébrales de souris.

La FMD a été obtenue à une contrainte de cisaillement d'environ 12 dynes/cm² et le *strain* circonférentiel à une pression intraluminaire de 60 mm Hg dans les artères cérébrales isolées des souris WT et ATX âgées de 3 et 6 mois et les souris ATX traitées avec l'ivabradine (IVA), le métoprolol (METO), l'exercice physique volontaire (EPV) et la catéchine (CAT).

Bien que la fonction endothéliale semble étroitement associée à la compliance cérébrovasculaire, cela n'a pas été démontré directement. Nous avons tenté de cibler spécifiquement les cellules endothéliales en utilisant le modèle de souris eNOS^{-/-}, mais l'augmentation de la compliance cérébrale était très modeste. En effet, la FMD (résultats non-publiés), et la dilatation à ACh (Drouin *et al.*, 2007) tendent à être supérieures dans les artères cérébrales de la souris eNOS^{-/-}, ce qui signifie que ces souris développent des mécanismes de dilatation compensatoires, comme l'EDHF (Huang *et al.*, 2001) ou la PGI₂ (Sun *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2004). L'inhibition chronique de la eNOS à l'aide du L-NNA n'est pas non plus une approche convenable pour vérifier notre paradigme puisque l'augmentation de PA induite entraîne

indépendamment un remodelage cérébrovasculaire (Baumbach & Heistad, 1989). En fait, l'augmentation de la compliance des artères cérébrales est le résultat d'une exposition chronique à un environnement pathologique créé par l'athérosclérose, ce qui limite considérablement la faisabilité d'une démonstration directe. À mon avis, l'unique alternative qui s'offre à nous serait de cultiver *ex vivo* dans le myographe pressurisé pour environ trois jours (Lehoux *et al.*, 2004), les artères cérébrales d'une souris WT en présence d'un inhibiteur de la eNOS. Après la période d'incubation, les changements mécaniques et structuraux pourraient directement être évalués. Afin de confirmer l'implication de la MMP-9 dans le remodelage, l'activité de la MMP-9 pourrait être mesurée sur ces mêmes artères. Toutefois, la fragilité des artères cérébrales fait en sorte qu'il est difficile de les garder en vie *ex-vivo* plus de 12h, ce qui complique ce type d'expérience.

Sur une toute autre note, nous sommes conscients que l'activité nette de la MMP-9 est dépendante de la présence de son inhibiteur endogène, le TIMP-1. Or, dans les études 1 et 2, l'activité de TIMP-1 n'a pas été évaluée. Il faut rester prudent dans l'interprétation de nos résultats puisqu'une augmentation de TIMP-1 concomitante à celle de MMP-9 pourrait invalider l'implication de MMP-9 dans le remodelage cérébrovasculaire. Sans grand succès, l'utilisation de la zymographie inverse n'a pas permis de détecter la TIMP-1 dans les vaisseaux cérébraux des souris WT et ATX (données non-publiées). Le WB ou la PCR quantitative nous permettraient de démystifier s'il y a effectivement un déséquilibre entre la MMP-9 et son inhibiteur dans les vaisseaux cérébraux des souris ATX.

Les relations liant la compliance à la fonction endothéliale et la compliance à l'activité de la MMP-9 sont de nature corrélative plutôt que causale, ce qui a forcément été l'objet de critiques lors du processus d'évaluation de mes travaux par les pairs.

Conclusions et perspectives

7. Conclusions et perspectives

Les principaux objectifs de mes travaux étaient de clarifier les circonstances du remodelage cérébral et d'explorer la possibilité d'une connexion entre la compliance, la fonction endothéliale et le contrôle du DSC dans le contexte de l'athérosclérose. Les données complémentaires présentées dans les articles 1 et 2 démontrent que la compliance des carotides est dépendante de la FC et du stress appliqué sur la paroi tandis que la compliance des artères cérébrales est contrôlée par l'endothélium. Nos résultats constituent la première démonstration d'une augmentation de la compliance cérébrale dans le cadre de l'athérosclérose. Chez l'humain, les cliniciens assument généralement que les artères cérébrales se comportent comme les carotides. La difficulté d'accès à des échantillons de cerveau humain explique le peu d'études réalisées sur des vaisseaux cérébraux. Bien sûr, nos résultats chez la souris ne sont pas directement transposables à l'humain, mais il est concevable que les petites artères cérébrales (<200µm), les artérioles ou les capillaires humains se remodelent comme les grosses artères de résistance chez la souris de calibre similaire (150-200 µm), c'est-à-dire qu'ils deviennent plus compliants en condition pro-athérosclérotique. De plus, nous avons identifié la MMP-9 comme une cible potentiellement pertinente pour l'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans la fragilisation de la paroi des artères cérébrales avec l'athérosclérose. L'imagerie des artères cérébrales par l'OCT, un outil novateur précieux, nous a permis de nous démarquer en évaluant *in vivo* la compliance et le DSC de base sur une même artère. Ces informations supplémentaires sont extrêmement importantes car elles nous ont permis de mettre en évidence que la fonction endothéliale, la structure et la biomécanique des artères cérébrales sont les bases d'un système intégré qui contrôle le DSC. Lorsque ces bases sont déstabilisées par les facteurs de risque ou des pathologies CV, comme l'athérosclérose, le DSC est dérégulé au détriment des fonctions cognitives.

Le rôle de la détérioration vasculaire dans l'apparition de maladies cognitives et neurodégénératives, telles que la maladie d'Alzheimer, est un domaine de recherche de grand intérêt et dans la tourmente des problèmes de santé publique actuels. Deux véritables raz-de-marée : la maladie d'Alzheimer et l'athérosclérose, ont plusieurs

facteurs de risque en commun, tels que la dyslipidémie et l'inflammation. D'ici 2030, il est prévu que l'incidence de la maladie d'Alzheimer augmente de 50 % aux États-Unis et que cette maladie devienne un véritable fardeau économique (Alzheimer's *et al.*, 2011). Le régime à l'américaine (40 % de lipides) et la sédentarité y contribuent forcément. Selon un article alarmant paru récemment dans le prestigieux journal *The Lancet*, 50 % des américains seront obèses d'ici 20 ans, ce qui se traduit par 8.5 et 7.3 millions de cas supplémentaires de diabète et de maladies CV ou d'AVC, respectivement (Wang *et al.*, 2011). Certains décrivent ce phénomène comme la vengeance du corps et du cerveau contre la fainéantise humaine en cette époque de révolutions technologiques (Vaynman & Gomez-Pinilla, 2006). Malheureusement, il n'existe actuellement aucun traitement capable de renverser les différentes formes de démence. Toutefois, nos études suggèrent que des traitements d'ordre préventif, tels que l'ivabradine, l'exercice physique et les antioxydants polyphénols, pourraient retarder l'apparition des déficits cognitifs associés à l'athérosclérose en préservant la perfusion du cerveau qui est en partie contrôlée par la fonction endothéliale, qui elle-même régule les propriétés biomécaniques des parois vasculaires.

En perspective, il est évident que nous allons poursuivre l'étude de l'effet de la pulsatilité sur la fonction myogénique cérébrale et sur la phosphorylation des MLCP présentée en section 5. Il reste énormément de travail à faire mais, caractériser la réponse myogénique dépendante de la pulsatilité sur un éventail d'amplitude et de fréquence fait partie de nos priorités. Autrement dit, nous voulons savoir si la réponse myogénique est influencée par la FC et par la magnitude de la pression pulsée. De plus, les résultats obtenus avec le L-NNA sont très intrigants : quand la eNOS est inhibée, la pulsatilité prévient l'augmentation du TM en diminuant possiblement la sensibilité calcique des MLC₂₀. Afin de mieux comprendre ces résultats, il serait pertinent de les valider dans le modèle de souris ATX où l'activité de la eNOS est réduite, ainsi que dans des artères cérébrales où l'endothélium aura été préalablement dénudé. À plus long terme, nous voulons configurer notre système afin d'induire des pulsations en simultané avec un débit intraluminal. Seule une poignée d'études montre que la pulsatilité modifie le comportement des artères face aux contraintes de cisaillement

mais, il semble qu'un débit pulsatile physiologique soit favorable aux fonctions artérielles.

Dans l'article 1, l'antagonisme chronique des β_1 -AR avec le métoprolol aggrave la fonction endothéliale ce qui suggère que les β_1 -AR jouent un rôle dans la circulation cérébrale. Il serait intéressant d'explorer l'implication possible des β -AR endothéliaux dans la fonction endothéliale cérébrale. Tout d'abord, il faudrait confirmer la présence d'une relaxation β_1 -AR dépendante de l'endothélium dans les artères cérébrales à l'aide de l'agoniste β_1 -AR, dobutamine. Si tel est le cas, la voie de signalisation pourrait être déterminée par l'usage d'inhibiteurs pour des cibles potentiellement impliquées dans la cascade, comme la triciribine, l'inhibiteur d'AKT. D'après une publication récente, l'activation des β_2 -AR endothéliaux dilate les artères pulmonaires de souris *via* la voie $G_{i/o}$ - kinase SRC-PI3K/AKT qui promeut la phosphorylation de la eNOS (Figure 22) (Banquet *et al.*, 2011).

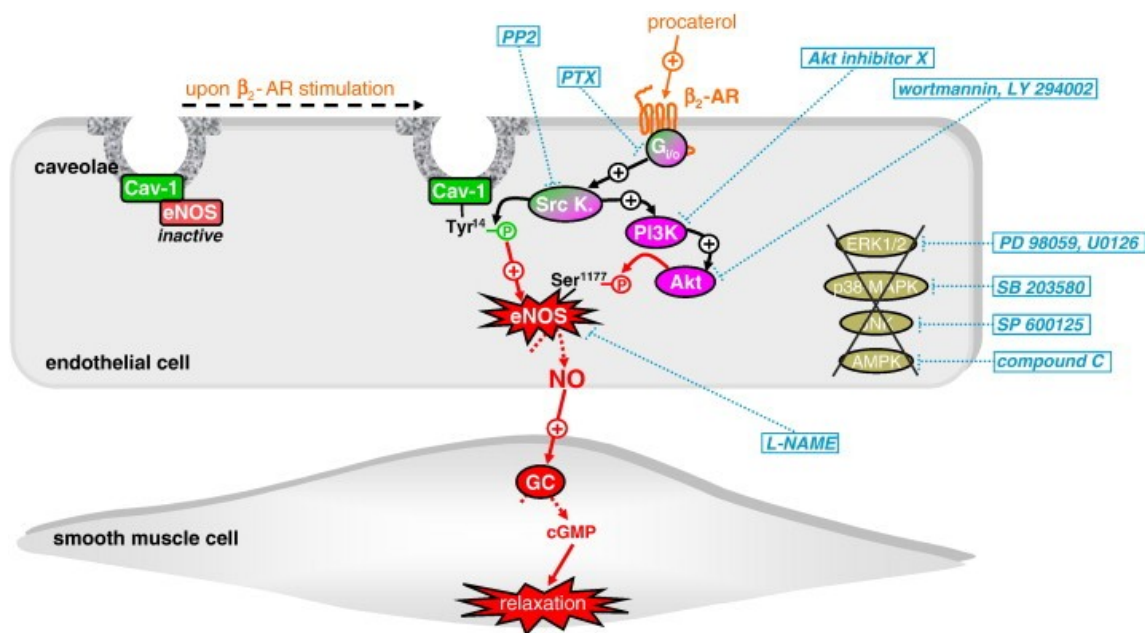


Figure 22 Schématisation de la voie de signalisation responsable de la dilatation des artères pulmonaires de souris par la stimulation des β_2 -AR endothéliaux.

CAV-1 : cavéoline-1, Src K : kinase SRC, $G_{i/o}$: protéine G inhibitrice, PTX : toxine pertussique, PI3K : phosphatidylinositol 3-kinase, eNOS : NO synthétase endothéliale, NO : monoxyde d'azote, GC : guanylate cyclase soluble, cGMP : guanosine monophosphate cyclique, P : phosphorylation.

Réimprimé de [Cellular Signalling](#), 23/7, Sébastien Banquet, Estelle Delannoy, Abdelali Agouni, Chantal Dessy, Sabrina Lacomme, Fabien Hubert, Vincent Richard, Bernard Muller, Véronique Leblais, Role of $G_{i/o}$ -Src kinase-PI3K/Akt pathway and caveolin-1 in β_2 -adrenoceptor coupling to endothelial NO synthase in mouse pulmonary artery, 1136-1143, Copyright (2011), avec la permission de Elsevier.

La découverte de β -AR endothéliaux cérébraux ouvrirait la voie à de nouvelles avenues de recherche, comme par exemple, l'étude de l'effet combinatoire de l'exercice physique et du métoprolol. Il semble que l'élévation des catécholamines circulantes contribue à l'augmentation de NO associée à l'exercice physique. En effet, l'exercice physique augmente la densité des récepteurs β_3 -AR cardiaques et les niveaux d'adrénaline et de noradrénaline circulantes, ce qui se traduit par une augmentation de

l'activité de la eNOS via la stimulation des β_3 -AR (Calvert *et al.*, 2011). De plus, dans la carotide des rats âgés, l'exercice physique renverse la baisse de la dilatation dépendante de l'endothélium à l'agoniste β -AR isoprotérénol en prévenant la désensibilisation et la perte des β -AR avec l'âge (Leosco *et al.*, 2003). Ainsi, il ne serait pas surprenant que le métoprolol enrayer les bénéfices associés à l'exercice physique rapportés chez la souris ATX.

Pour terminer, nous voudrions aller plus loin dans la caractérisation du remodelage cérébrovasculaire associé à l'athérosclérose : l'imagerie par microscopie électronique ou à deux photons s'avèrerait un outil de choix pour examiner l'architecture des brins de collagène et d'élastine et pour caractériser les CMLV. À l'avenir, il serait également intéressant de profiter des informations que pourrait nous apporter l'étude de l'intégrité neuronale. Enfin, définir précisément les circonstances entourant les répercussions cognitives de l'athérosclérose et évaluer concrètement l'effet des traitements sur la viabilité neuronale et les capacités cognitives nous permettraient de renforcer notre paradigme qui propose que la détérioration de la structure et des fonctions vasculaires, la diminution du DSC et les déficits cognitifs sont une succession d'évènements interdépendants causés par l'athérosclérose.

Références

8. Références

- Adachi T, Inanami O & Sato A. (1992). Nitric oxide (NO) is involved in increased cerebral cortical blood flow following stimulation of the nucleus basalis of Meynert in anesthetized rats. *Neurosci Lett* **139**, 201-204.
- Adair JC, Charlie J, Dencoff JE, Kaye JA, Quinn JF, Camicioli RM, Stetler-Stevenson WG & Rosenberg GA. (2004). Measurement of gelatinase B (MMP-9) in the cerebrospinal fluid of patients with vascular dementia and Alzheimer disease. *Stroke* **35**, e159-162.
- Alzheimer's A, Thies W & Bleiler L. (2011). 2011 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement* **7**, 208-244.
- Ando J & Yamamoto K. (2009). Vascular mechanobiology: endothelial cell responses to fluid shear stress. *Circ J* **73**, 1983-1992.
- Andresen J, Shafi NI & Bryan RM, Jr. (2006). Endothelial influences on cerebrovascular tone. *J Appl Physiol* **100**, 318-327.
- Anton MM, Cortez-Cooper MY, DeVan AE, Neidre DB, Cook JN & Tanaka H. (2006). Cigarette smoking, regular exercise, and peripheral blood flow. *Atherosclerosis* **185**, 201-205.
- Aoki T, Kataoka H, Morimoto M, Nozaki K & Hashimoto N. (2007a). Macrophage-derived matrix metalloproteinase-2 and -9 promote the progression of cerebral aneurysms in rats. *Stroke* **38**, 162-169.
- Aoki T, Kataoka H, Moriwaki T, Nozaki K & Hashimoto N. (2007b). Role of TIMP-1 and TIMP-2 in the progression of cerebral aneurysms. *Stroke* **38**, 2337-2345.
- Arab L, Liu W & Elashoff D. (2009). Green and black tea consumption and risk of stroke: a meta-analysis. *Stroke* **40**, 1786-1792.
- Arce-Esquivel AA, Kreutzer KV, Rush JW, Turk JR & Laughlin MH. (2011). Exercise Does Not Attenuate Early Coronary Artery Disease Progression in a Pig Model. *Med Sci Sports Exerc.*
- Aronow WS. (2010). Current role of beta-blockers in the treatment of hypertension. *Expert Opin Pharmacother* **11**, 2599-2607.
- Arrick DM, Sun H, Patel KP & Mayhan WG. (2011). Chronic resveratrol treatment restores vascular responsiveness of cerebral arterioles in type 1 diabetic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **301**, H696-703.

- Arts IC & Hollman PC. (2005). Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr* **81**, 317S-325S.
- Asahi M, Wang X, Mori T, Sumii T, Jung JC, Moskowitz MA, Fini ME & Lo EH. (2001). Effects of matrix metalloproteinase-9 gene knock-out on the proteolysis of blood-brain barrier and white matter components after cerebral ischemia. *J Neurosci* **21**, 7724-7732.
- Asahina M, Yoshiyama Y & Hattori T. (2001). Expression of matrix metalloproteinase-9 and urinary-type plasminogen activator in Alzheimer's disease brain. *Clin Neuropathol* **20**, 60-63.
- Asikainen TM, Kukkonen-Harjula K & Miilunpalo S. (2004). Exercise for health for early postmenopausal women: a systematic review of randomised controlled trials. *Sports Med* **34**, 753-778.
- Auchere F & Rusnak F. (2002). What is the ultimate fate of superoxide anion in vivo? *J Biol Inorg Chem* **7**, 664-667.
- Babu PV & Liu D. (2008). Green tea catechins and cardiovascular health: an update. *Curr Med Chem* **15**, 1840-1850.
- Backstrom JR, Lim GP, Cullen MJ & Tokes ZA. (1996). Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) is synthesized in neurons of the human hippocampus and is capable of degrading the amyloid-beta peptide (1-40). *J Neurosci* **16**, 7910-7919.
- Baker JG, Hill SJ & Summers RJ. (2011). Evolution of beta-blockers: from anti-anginal drugs to ligand-directed signalling. *Trends Pharmacol Sci* **32**, 227-234.
- Bakker FC, Klijn CJ, Jennekens-Schinkel A & Kappelle LJ. (2000). Cognitive disorders in patients with occlusive disease of the carotid artery: a systematic review of the literature. *J Neurol* **247**, 669-676.
- Banquet S, Delannoy E, Agouni A, Dessy C, Lacomme S, Hubert F, Richard V, Muller B & Leblais V. (2011). Role of G(i/o)-Src kinase-PI3K/Akt pathway and caveolin-1 in beta-adrenoceptor coupling to endothelial NO synthase in mouse pulmonary artery. *Cell Signal* **23**, 1136-1143.
- Baraghis E, Bolduc V, Lefebvre J, Srinivasan VJ, Boudoux C, Thorin E & Lesage F. (2011). Measurement of cerebral microvascular compliance in a model of atherosclerosis with optical coherence tomography. *Biomedical Optics Express* **2**, 14.
- Bateman GA, Levi CR, Schofield P, Wang Y & Lovett EC. (2006). Quantitative measurement of cerebral haemodynamics in early vascular dementia and Alzheimer's disease. *J Clin Neurosci* **13**, 563-568.

- Baumbach GL. (1996). Effects of increased pulse pressure on cerebral arterioles. *Hypertension* **27**, 159-167.
- Baumbach GL & Chillon JM. (2000). Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors on cerebral vascular structure in chronic hypertension. *J Hypertens Suppl* **18**, S7-11.
- Baumbach GL, Didion SP & Faraci FM. (2006). Hypertrophy of cerebral arterioles in mice deficient in expression of the gene for CuZn superoxide dismutase. *Stroke* **37**, 1850-1855.
- Baumbach GL, Dobrin PB, Hart MN & Heistad DD. (1988a). Mechanics of cerebral arterioles in hypertensive rats. *Circ Res* **62**, 56-64.
- Baumbach GL & Heistad DD. (1988). Cerebral circulation in chronic arterial hypertension. *Hypertension* **12**, 89-95.
- Baumbach GL & Heistad DD. (1989). Remodeling of cerebral arterioles in chronic hypertension. *Hypertension* **13**, 968-972.
- Baumbach GL & Heistad DD. (1992). Drug-induced changes in mechanics and structure of cerebral arterioles. *J Hypertens Suppl* **10**, S137-140.
- Baumbach GL, Heistad DD & Siems JE. (1989). Effect of sympathetic nerves on composition and distensibility of cerebral arterioles in rats. *J Physiol* **416**, 123-140.
- Baumbach GL, Siems JE & Heistad DD. (1991). Effects of local reduction in pressure on distensibility and composition of cerebral arterioles. *Circ Res* **68**, 338-351.
- Baumbach GL, Sigmund CD, Bottiglieri T & Lentz SR. (2002). Structure of cerebral arterioles in cystathionine beta-synthase-deficient mice. *Circ Res* **91**, 931-937.
- Baumbach GL, Sigmund CD & Faraci FM. (2003). Cerebral arteriolar structure in mice overexpressing human renin and angiotensinogen. *Hypertension* **41**, 50-55.
- Baumbach GL, Sigmund CD & Faraci FM. (2004). Structure of cerebral arterioles in mice deficient in expression of the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Circ Res* **95**, 822-829.
- Baumbach GL, Walmsley JG & Hart MN. (1988b). Composition and mechanics of cerebral arterioles in hypertensive rats. *Am J Pathol* **133**, 464-471.
- Baumhakel M, Custodis F, Schlimmer N, Laufs U & Bohm M. (2010). Heart rate reduction with ivabradine improves erectile dysfunction in parallel to decrease

- in atherosclerotic plaque load in ApoE-knockout mice. *Atherosclerosis* **212**, 55-62.
- Baumhakel M, Schlimmer N, Buyukafsar K, Arikan O & Bohm M. (2008). Nebivolol, but not metoprolol, improves endothelial function of the corpus cavernosum in apolipoprotein e-knockout mice. *J Pharmacol Exp Ther* **325**, 818-823.
- Baur JA & Sinclair DA. (2006). Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov* **5**, 493-506.
- Bayliss WM. (1902). On the local reactions of the arterial wall to changes of internal pressure. *J Physiol* **28**, 220-231.
- Beckman JS & Koppenol WH. (1996). Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* **271**, C1424-1437.
- Bedard K & Krause KH. (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* **87**, 245-313.
- Beere PA, Glagov S & Zarins CK. (1992). Experimental atherosclerosis at the carotid bifurcation of the cynomolgus monkey. Localization, compensatory enlargement, and the sparing effect of lowered heart rate. *Arterioscler Thromb* **12**, 1245-1253.
- Benito B, Gay-Jordi G, Serrano-Mollar A, Guasch E, Shi Y, Tardif JC, Brugada J, Nattel S & Mont L. (2011). Cardiac arrhythmogenic remodeling in a rat model of long-term intensive exercise training. *Circulation* **123**, 13-22.
- Bettermann K, Arnold AM, Williamson J, Rapp S, Sink K, Toole JF, Carlson MC, Yasar S, Dekosky S & Burke GL. (2011). Statins, Risk of Dementia, and Cognitive Function: Secondary Analysis of the Ginkgo Evaluation of Memory Study. *J Stroke Cerebrovasc Dis*.
- Beyer AM, Baumbach GL, Halabi CM, Modrick ML, Lynch CM, Gerhold TD, Ghoneim SM, de Lange WJ, Keen HL, Tsai YS, Maeda N, Sigmund CD & Faraci FM. (2008). Interference with PPAR γ signaling causes cerebral vascular dysfunction, hypertrophy, and remodeling. *Hypertension* **51**, 867-871.
- Billeci AM, Agnelli G & Caso V. (2009). Stroke pharmacogenomics. *Expert Opin Pharmacother* **10**, 2947-2957.
- Billups KL. (2005). Erectile dysfunction as an early sign of cardiovascular disease. *Int J Impot Res* **17 Suppl 1**, S19-24.
- Black JW, Crowther AF, Shanks RG, Smith LH & Dornhorst AC. (1964). A NEW ADRENERGIC BETA RECEPTOR ANTAGONIST. *Lancet* **1**, 1080-1081.

- Blackwell KA, Sorenson JP, Richardson DM, Smith LA, Suda O, Nath K & Katusic ZS. (2004). Mechanisms of aging-induced impairment of endothelium-dependent relaxation: role of tetrahydrobiopterin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **287**, H2448-2453.
- Blanco VM, Stern JE & Filosa JA. (2008). Tone-dependent vascular responses to astrocyte-derived signals. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **294**, H2855-2863.
- Bolduc V, Baraghis E, Duquette N, Thorin-Trescases N, Lambert J, Lesage F & Thorin E. (2012). Catechin prevents severe dyslipidemia-associated changes in wall biomechanics of cerebral arteries in LDLr^{-/-}:hApoB^{+/+} mice and improves cerebral blood flow. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **302**, H1330-1339.
- Bolduc V, Drouin A, Gillis MA, Duquette N, Thorin-Trescases N, Frayne-Robillard I, Des Rosiers C, Tardif JC & Thorin E. (2011). Heart rate-associated mechanical stress impairs carotid but not cerebral artery compliance in dyslipidemic atherosclerotic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **301**, H2081-2092.
- Borel JP & Bellon G. (1985). [Vascular collagens. General review]. *Pathol Biol (Paris)* **33**, 254-260.
- Brayden JE, Halpern W & Brann LR. (1983). Biochemical and mechanical properties of resistance arteries from normotensive and hypertensive rats. *Hypertension* **5**, 17-25.
- Briones AM, Arribas SM & Salaices M. (2010). Role of extracellular matrix in vascular remodeling of hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **19**, 187-194.
- Briones AM, Gonzalez JM, Somoza B, Giraldo J, Daly CJ, Vila E, Gonzalez MC, McGrath JC & Arribas SM. (2003). Role of elastin in spontaneously hypertensive rat small mesenteric artery remodelling. *J Physiol* **552**, 185-195.
- Briones AM, Rodriguez-Criado N, Hernanz R, Garcia-Redondo AB, Rodrigues-Diez RR, Alonso MJ, Egido J, Ruiz-Ortega M & Salaices M. (2009). Atorvastatin prevents angiotensin II-induced vascular remodeling and oxidative stress. *Hypertension* **54**, 142-149.
- Britten MB, Zeiher AM & Schachinger V. (1999). Clinical importance of coronary endothelial vasodilator dysfunction and therapeutic options. *J Intern Med* **245**, 315-327.
- Bronner LL, Kanter DS & Manson JE. (1995). Primary prevention of stroke. *N Engl J Med* **333**, 1392-1400.

- Bruno MA & Cuello AC. (2006). Activity-dependent release of precursor nerve growth factor, conversion to mature nerve growth factor, and its degradation by a protease cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 6735-6740.
- Bruno MA, Mufson EJ, Wu J & Cuello AC. (2009). Increased matrix metalloproteinase 9 activity in mild cognitive impairment. *J Neuropathol Exp Neurol* **68**, 1309-1318.
- 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.
- Busija DW, Marcus ML & Heistad DD. (1982). Pial artery diameter and blood flow velocity during sympathetic stimulation in cats. *J Cereb Blood Flow Metab* **2**, 363-367.
- Byfield FJ, Aranda-Espinoza H, Romanenko VG, Rothblat GH & Levitan I. (2004). Cholesterol depletion increases membrane stiffness of aortic endothelial cells. *Biophys J* **87**, 3336-3343.
- Byrom FB. (1954). The pathogenesis of hypertensive encephalopathy and its relation to the malignant phase of hypertension; experimental evidence from the hypertensive rat. *Lancet* **267**, 201-211.
- Cacciatore F, Mazzella F, Abete P, Viati L, Galizia G, D'Ambrosio D, Gargiulo G, Russo S, Visconti C, Della Morte D, Ferrara N & Rengo F. (2007). Mortality and heart rate in the elderly: role of cognitive impairment. *Exp Aging Res* **33**, 127-144.
- Caird J, Napoli C, Taggart C, Farrell M & Bouchier-Hayes D. (2006). Matrix metalloproteinases 2 and 9 in human atherosclerotic and non-atherosclerotic cerebral aneurysms. *Eur J Neurol* **13**, 1098-1105.
- Calvert JW, Condit ME, Aragon JP, Nicholson CK, Moody BF, Hood RL, Sindler AL, Gundewar S, Seals DR, Barouch LA & Lefer DJ. (2011). Exercise protects against myocardial ischemia-reperfusion injury via stimulation of beta(3)-adrenergic receptors and increased nitric oxide signaling: role of nitrite and nitrosothiols. *Circ Res* **108**, 1448-1458.
- Cesar L, Suarez SV, Adi J, Adi N, Vazquez-Padron R, Yu H, Ma Q, Goldschmidt-Clermont PJ, Agatston A, Kurlansky P & Webster KA. (2010). An essential role for diet in exercise-mediated protection against dyslipidemia, inflammation and atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice. *PLoS One* **6**, e17263.

- Chan SL, Chapman AC, Sweet JG, Gokina NI & Cipolla MJ. (2010). Effect of PPARgamma inhibition during pregnancy on posterior cerebral artery function and structure. *Front Physiol* **1**, 130.
- Chatzizisis YS, Coskun AU, Jonas M, Edelman ER, Feldman CL & Stone PH. (2007). Role of endothelial shear stress in the natural history of coronary atherosclerosis and vascular remodeling: molecular, cellular, and vascular behavior. *J Am Coll Cardiol* **49**, 2379-2393.
- Chatzizisis YS & Giannoglou GD. (2006). Pulsatile flow: a critical modulator of the natural history of atherosclerosis. *Med Hypotheses* **67**, 338-340.
- Chatzizisis YS & Giannoglou GD. (2007). Coronary hemodynamics and atherosclerotic wall stiffness: a vicious cycle. *Med Hypotheses* **69**, 349-355.
- Chen L, Hought WH, Yang B, Saldeen TG, Parathasarathy S & Mehta JL. (1997). Preservation of endogenous antioxidant activity and inhibition of lipid peroxidation as common mechanisms of antiatherosclerotic effects of vitamin E, lovastatin and amlodipine. *J Am Coll Cardiol* **30**, 569-575.
- Chen TG, Chen TL, Chang HC, Tai YT, Cherng YG, Chang YT & Chen RM. (2007). Oxidized low-density lipoprotein induces apoptotic insults to mouse cerebral endothelial cells via a Bax-mitochondria-caspase protease pathway. *Toxicol Appl Pharmacol* **219**, 42-53.
- Cheng C, Tempel D, van Haperen R, van der Baan A, Grosveld F, Daemen MJ, Krams R & de Crom R. (2006). Atherosclerotic lesion size and vulnerability are determined by patterns of fluid shear stress. *Circulation* **113**, 2744-2753.
- Chillon JM & Baumbach GL. (1999). Effects of an angiotensin-converting enzyme inhibitor and a beta-blocker on cerebral arterioles in rats. *Hypertension* **33**, 856-861.
- Chillon JM & Baumbach GL. (2004). Effects of chronic nitric oxide synthase inhibition on cerebral arterioles in Wistar-Kyoto rats. *J Hypertens* **22**, 529-534.
- Cholet N, Seylaz J, Lacombe P & Bonvento G. (1997). Local uncoupling of the cerebrovascular and metabolic responses to somatosensory stimulation after neuronal nitric oxide synthase inhibition. *J Cereb Blood Flow Metab* **17**, 1191-1201.
- Chrissobolis S & Faraci FM. (2008). The role of oxidative stress and NADPH oxidase in cerebrovascular disease. *Trends Mol Med* **14**, 495-502.
- Chyu KY, Babbidge SM, Zhao X, Dandillaya R, Rietveld AG, Yano J, Dimayuga P, Cercek B & Shah PK. (2004). Differential effects of green tea-derived catechin

- on developing versus established atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice. *Circulation* **109**, 2448-2453.
- Ciccarelli M, Cipolletta E, Santulli G, Campanile A, Pumiglia K, Cervero P, Pastore L, Astone D, Trimarco B & Iaccarino G. (2007). Endothelial beta2 adrenergic signaling to AKT: role of Gi and SRC. *Cell Signal* **19**, 1949-1955.
- Cipolla M, ed. (2009). *The Cerebral Circulation*. Morgan & Claypool Life Sciences, San Rafael (CA).
- Clifford PS. (2011). Local control of blood flow. *Adv Physiol Educ* **35**, 5-15.
- Colcombe S & Kramer AF. (2003). Fitness effects on the cognitive function of older adults: a meta-analytic study. *Psychol Sci* **14**, 125-130.
- Cole WC & Welsh DG. (2011). Role of myosin light chain kinase and myosin light chain phosphatase in the resistance arterial myogenic response to intravascular pressure. *Arch Biochem Biophys* **510**, 160-173.
- Cook S, Togni M, Schaub MC, Wenaweser P & Hess OM. (2006). High heart rate: a cardiovascular risk factor? *Eur Heart J* **27**, 2387-2393.
- Correia ML & Haynes WG. (2007). Arterial compliance and endothelial function. *Curr Diab Rep* **7**, 269-275.
- Cottart CH, Laguillier C, Nivet-Antoine V, Klimczak C, Sebban C & Beaudoux JL. (2009). [Biology of arterial ageing and arteriosclerosis.]. *C R Biol* **332**, 433-447.
- Cuello AC & Bruno MA. (2007). The failure in NGF maturation and its increased degradation as the probable cause for the vulnerability of cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Neurochem Res* **32**, 1041-1045.
- Cuello AC, Bruno MA, Allard S, Leon W & Iulita MF. (2010). Cholinergic involvement in Alzheimer's disease. A link with NGF maturation and degradation. *J Mol Neurosci* **40**, 230-235.
- Custodis F, Baumhakel M, Schlimmer N, List F, Gensch C, Bohm M & Laufs U. (2008). Heart rate reduction by ivabradine reduces oxidative stress, improves endothelial function, and prevents atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* **117**, 2377-2387.
- Custodis F, Schirmer SH, Baumhakel M, Heusch G, Bohm M & Laufs U. (2010). Vascular pathophysiology in response to increased heart rate. *J Am Coll Cardiol* **56**, 1973-1983.

- D'Armiento FP, Bianchi A, de Nigris F, Capuzzi DM, D'Armiento MR, Crimi G, Abete P, Palinski W, Condorelli M & Napoli C. (2001). Age-related effects on atherogenesis and scavenger enzymes of intracranial and extracranial arteries in men without classic risk factors for atherosclerosis. *Stroke* **32**, 2472-2479.
- Danson EJ & Paterson DJ. (2003). Enhanced neuronal nitric oxide synthase expression is central to cardiac vagal phenotype in exercise-trained mice. *J Physiol* **546**, 225-232.
- De Angelis K, Wichi RB, Jesus WR, Moreira ED, Morris M, Krieger EM & Irigoyen MC. (2004). Exercise training changes autonomic cardiovascular balance in mice. *J Appl Physiol* **96**, 2174-2178.
- De Keyser J, Steen C, Mostert JP & Koch MW. (2008). Hypoperfusion of the cerebral white matter in multiple sclerosis: possible mechanisms and pathophysiological significance. *J Cereb Blood Flow Metab* **28**, 1645-1651.
- de la Torre JC. (2000). Cerebral hypoperfusion, capillary degeneration, and development of Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* **14 Suppl 1**, S72-81.
- de la Torre JC. (2004). Is Alzheimer's disease a neurodegenerative or a vascular disorder? Data, dogma, and dialectics. *Lancet Neurol* **3**, 184-190.
- de la Torre JC. (2006). How do heart disease and stroke become risk factors for Alzheimer's disease? *Neurol Res* **28**, 637-644.
- Deem TL & Cook-Mills JM. (2004). Vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) activation of endothelial cell matrix metalloproteinases: role of reactive oxygen species. *Blood* **104**, 2385-2393.
- DeLoach SS & Townsend RR. (2008). Vascular stiffness: its measurement and significance for epidemiologic and outcome studies. *Clin J Am Soc Nephrol* **3**, 184-192.
- DeSouza CA, Shapiro LF, Clevenger CM, Dinunno FA, Monahan KD, Tanaka H & Seals DR. (2000). Regular aerobic exercise prevents and restores age-related declines in endothelium-dependent vasodilation in healthy men. *Circulation* **102**, 1351-1357.
- Dietrich HH, Kajita Y & Dacey RG, Jr. (1996). Local and conducted vasomotor responses in isolated rat cerebral arterioles. *Am J Physiol* **271**, H1109-1116.
- Donnan GA, Fisher M, Macleod M & Davis SM. (2008). Stroke. *Lancet* **371**, 1612-1623.

- Dorrance AM, Graham D, Webb RC, Fraser R & Dominiczak A. (2001). Increased membrane sphingomyelin and arachidonic acid in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* **14**, 1149-1153.
- Dorrance AM, Rupp NC & Nogueira EF. (2006). Mineralocorticoid receptor activation causes cerebral vessel remodeling and exacerbates the damage caused by cerebral ischemia. *Hypertension* **47**, 590-595.
- Drouin A, Bolduc V, Thorin-Trescases N, Belanger E, Fernandes P, Baraghis E, Lesage F, Gillis MA, Villeneuve L, Hamel E, Ferland G & Thorin E. (2011a). Catechin treatment improves cerebrovascular flow-mediated dilation and learning abilities in atherosclerotic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **300**, H1032-1043.
- Drouin A, Farhat N, Bolduc V, Thorin-Trescases N, Gillis MA, Villeneuve L, Nguyen A & Thorin E. (2011b). Up-regulation of thromboxane A impairs cerebrovascular eNOS function in aging atherosclerotic mice. *Pflugers Arch* **462**, 371-383.
- 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-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.
- 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.
- Dunn KM, Renic M, Flasch AK, Harder DR, Falck J & Roman RJ. (2008). Elevated production of 20-HETE in the cerebral vasculature contributes to severity of ischemic stroke and oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **295**, H2455-2465.
- Dupuis F, Atkinson J, Liminana P & Chillon JM. (2005). Captopril improves cerebrovascular structure and function in old hypertensive rats. *Br J Pharmacol* **144**, 349-356.
- Durrant JR, Seals DR, Connell ML, Russell MJ, Lawson BR, Folian BJ, Donato AJ & Lesniewski LA. (2009). Voluntary wheel running restores endothelial function in conduit arteries of old mice: direct evidence for reduced oxidative stress, increased superoxide dismutase activity and down-regulation of NADPH oxidase. *J Physiol* **587**, 3271-3285.

- Edea M, ed. (2005). *Les secrets de santé du thé*.
- Eggermont L, Swaab D, Luiten P & Scherder E. (2006). Exercise, cognition and Alzheimer's disease: more is not necessarily better. *Neurosci Biobehav Rev* **30**, 562-575.
- Elgebaly MM, Prakash R, Li W, Ogbi S, Johnson MH, Mezzetti EM, Fagan SC & Ergul A. (2010). Vascular protection in diabetic stroke: role of matrix metalloprotease-dependent vascular remodeling. *J Cereb Blood Flow Metab* **30**, 1928-1938.
- Elhousseiny A & Hamel E. (2000). Muscarinic--but not nicotinic--acetylcholine receptors mediate a nitric oxide-dependent dilation in brain cortical arterioles: a possible role for the M5 receptor subtype. *J Cereb Blood Flow Metab* **20**, 298-305.
- Elias MF, Robbins MA, Budge MM, Abhayaratna WP, Dore GA & Elias PK. (2009). Arterial pulse wave velocity and cognition with advancing age. *Hypertension* **53**, 668-673.
- Endres M, Gertz K, Lindauer U, Katchanov J, Schultze J, Schrock H, Nickenig G, Kuschinsky W, Dirnagl U & Laufs U. (2003). Mechanisms of stroke protection by physical activity. *Ann Neurol* **54**, 582-590.
- Endres M, Laufs U, Huang Z, Nakamura T, Huang P, Moskowitz MA & Liao JK. (1998). Stroke protection by 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase inhibitors mediated by endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 8880-8885.
- Endres M, Laufs U, Liao JK & Moskowitz MA. (2004). Targeting eNOS for stroke protection. *Trends Neurosci* **27**, 283-289.
- Faraci FM. (2006). Reactive oxygen species: influence on cerebral vascular tone. *J Appl Physiol* **100**, 739-743.
- Faraci FM. (2011). Protecting against vascular disease in brain. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **300**, H1566-1582.
- Faraci FM, Baumbach GL & Heistad DD. (1990). Cerebral circulation: humoral regulation and effects of chronic hypertension. *J Am Soc Nephrol* **1**, 53-57.
- Faraci FM & Heistad DD. (1990). Regulation of large cerebral arteries and cerebral microvascular pressure. *Circ Res* **66**, 8-17.
- Farkas E & Luiten PG. (2001). Cerebral microvascular pathology in aging and Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* **64**, 575-611.

- Ferrari R & Ceconi C. (2011). Selective and specific I_f inhibition with ivabradine: new perspectives for the treatment of cardiovascular disease. *Expert Rev Cardiovasc Ther* **9**, 959-973.
- Ferro A, Coash M, Yamamoto T, Rob J, Ji Y & Queen L. (2004). Nitric oxide-dependent beta₂-adrenergic dilatation of rat aorta is mediated through activation of both protein kinase A and Akt. *Br J Pharmacol* **143**, 397-403.
- Figuroa XF, Poblete I, Fernandez R, Pedemonte C, Cortes V & Huidobro-Toro JP. (2009). NO production and eNOS phosphorylation induced by epinephrine through the activation of beta-adrenoceptors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **297**, H134-143.
- Fitzgerald. (1996). *Neuroanatomy: Basic and Clinical*. Paperback.
- Flamant M, Placier S, Dubroca C, Esposito B, Lopes I, Chatziantoniou C, Tedgui A, Dussaule JC & Lehoux S. (2007). Role of matrix metalloproteinases in early hypertensive vascular remodeling. *Hypertension* **50**, 212-218.
- Fleenor BS, Marshall KD, Durrant JR, Lesniewski LA & Seals DR. (2010). Arterial stiffening with ageing is associated with transforming growth factor-beta1-related changes in adventitial collagen: reversal by aerobic exercise. *J Physiol* **588**, 3971-3982.
- Fonck E, Feigl GG, Fasel J, Sage D, Unser M, Rufenacht DA & Stergiopoulos N. (2009). Effect of aging on elastin functionality in human cerebral arteries. *Stroke* **40**, 2552-2556.
- Fujimoto N, Prasad A, Hastings JL, Arbab-Zadeh A, Bhella PS, Shibata S, Palmer D & Levine BD. (2010). Cardiovascular effects of 1 year of progressive and vigorous exercise training in previously sedentary individuals older than 65 years of age. *Circulation* **122**, 1797-1805.
- Fung C, Evans E, Shin D, Shin BC, Zhao Y, Sankar R, Chaudhuri G & Devaskar SU. (2010). Hypoxic-ischemic brain injury exacerbates neuronal apoptosis and precipitates spontaneous seizures in glucose transporter isoform 3 heterozygous null mice. *J Neurosci Res* **88**, 3386-3398.
- Funovic P, Korda M, Kubant R, Barlag RE, Jacob RF, Mason RP & Malinski T. (2008). Effect of beta-blockers on endothelial function during biological aging: a nanotechnological approach. *J Cardiovasc Pharmacol* **51**, 208-215.
- Galis ZS & Khatri JJ. (2002). Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res* **90**, 251-262.

- Garbisa S, Sartor L, Biggin S, Salvato B, Benelli R & Albini A. (2001). Tumor gelatinases and invasion inhibited by the green tea flavanol epigallocatechin-3-gallate. *Cancer* **91**, 822-832.
- Garcia-Roldan JL & Bevan JA. (1990). Flow-induced constriction and dilation of cerebral resistance arteries. *Circ Res* **66**, 1445-1448.
- Gaw AJ & Bevan JA. (1993). Flow-induced relaxation of the rabbit middle cerebral artery is composed of both endothelium-dependent and -independent components. *Stroke* **24**, 105-109; discussion 109-110.
- Gendron ME, Theoret JF, Mamarbachi AM, Drouin A, Nguyen A, Bolduc V, Thorin-Trescases N, Merhi Y & Thorin E. (2010). Late chronic catechin antioxidant treatment is deleterious to the endothelial function in aging mice with established atherosclerosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **298**, H2062-2070.
- Giannoglou GD, Chatzizisis YS, Zamboulis C, Parcharidis GE, Mikhailidis DP & Louridas GE. (2008). Elevated heart rate and atherosclerosis: an overview of the pathogenetic mechanisms. *Int J Cardiol* **126**, 302-312.
- Gillian Pocock CDR. (2004). *Physiologie humaine: les fondements de la médecine* Paris.
- 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.
- Girouard H, Park L, Anrather J, Zhou P & Iadecola C. (2007). Cerebrovascular nitrosative stress mediates neurovascular and endothelial dysfunction induced by angiotensin II. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**, 303-309.
- Glagov S, Weisenberg E, Zarins CK, Stankunavicius R & Kolettis GJ. (1987). Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* **316**, 1371-1375.
- Gleeson M. (2007). Immune function in sport and exercise. *J Appl Physiol* **103**, 693-699.
- Goto M, VanBavel E, Giezeman MJ & Spaan JA. (1996). Vasodilatory effect of pulsatile pressure on coronary resistance vessels. *Circ Res* **79**, 1039-1045.
- Goto S, Naito H, Kaneko T, Chung HY & Radak Z. (2007). Hormetic effects of regular exercise in aging: correlation with oxidative stress. *Appl Physiol Nutr Metab* **32**, 948-953.

- Graves J & Poston L. (1993). Beta-adrenoceptor agonist mediated relaxation of rat isolated resistance arteries: a role for the endothelium and nitric oxide. *Br J Pharmacol* **108**, 631-637.
- Greenwald SE. (2007). Ageing of the conduit arteries. *J Pathol* **211**, 157-172.
- Griffin SA, Brown WC, MacPherson F, McGrath JC, Wilson VG, Korsgaard N, Mulvany MJ & Lever AF. (1991). Angiotensin II causes vascular hypertrophy in part by a non-pressor mechanism. *Hypertension* **17**, 626-635.
- Gu Z, Cui J, Brown S, Fridman R, Mobashery S, Strongin AY & Lipton SA. (2005). A highly specific inhibitor of matrix metalloproteinase-9 rescues laminin from proteolysis and neurons from apoptosis in transient focal cerebral ischemia. *J Neurosci* **25**, 6401-6408.
- Hadi HA, Carr CS & Al Suwaidi J. (2005). Endothelial dysfunction: cardiovascular risk factors, therapy, and outcome. *Vasc Health Risk Manag* **1**, 183-198.
- Hajdu MA, Heistad DD & Baumbach GL. (1991). Effects of antihypertensive therapy on mechanics of cerebral arterioles in rats. *Hypertension* **17**, 308-316.
- Hajdu MA, Heistad DD, Siems JE & Baumbach GL. (1990). Effects of aging on mechanics and composition of cerebral arterioles in rats. *Circ Res* **66**, 1747-1754.
- Halabi CM, Beyer AM, de Lange WJ, Keen HL, Baumbach GL, Faraci FM & Sigmund CD. (2008). Interference with PPAR gamma function in smooth muscle causes vascular dysfunction and hypertension. *Cell Metab* **7**, 215-226.
- Hall JE. (2006). *Textbook of Medical Physiology*. Saunders.
- Halliwell B. (2001). Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging* **18**, 685-716.
- Halliwell B & Gutteridge JMC, ed. (2007). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, Oxford.
- Halpern W, Osol G & Coy GS. (1984). Mechanical behavior of pressurized in vitro prearteriolar vessels determined with a video system. *Ann Biomed Eng* **12**, 463-479.
- Hambrecht R, Adams V, Erbs S, Linke A, Krankel N, Shu Y, Baither Y, Gielen S, Thiele H, Gummert JF, Mohr FW & Schuler G. (2003). Regular physical activity improves endothelial function in patients with coronary artery disease by increasing phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* **107**, 3152-3158.

- Hambrecht R, Niebauer J, Marburger C, Grunze M, Kalberer B, Hauer K, Schlierf G, Kubler W & Schuler G. (1993). Various intensities of leisure time physical activity in patients with coronary artery disease: effects on cardiorespiratory fitness and progression of coronary atherosclerotic lesions. *J Am Coll Cardiol* **22**, 468-477.
- 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.
- Hamilton CA, Brosnan MJ, McIntyre M, Graham D & Dominiczak AF. (2001). Superoxide excess in hypertension and aging: a common cause of endothelial dysfunction. *Hypertension* **37**, 529-534.
- Hamilton CA, Thorin E, McCulloch J, Dominiczak MH & Reid JL. (1994). Chronic exposure of bovine aortic endothelial cells to native and oxidized LDL modifies phosphatidylinositol metabolism. *Atherosclerosis* **107**, 55-63.
- Hanyu H, Sato T, Hirao K, Kanetaka H, Iwamoto T & Koizumi K. (2009a). The progression of cognitive deterioration and regional cerebral blood flow patterns in Alzheimer's disease: A longitudinal SPECT study. *J Neurol Sci*.
- Hanyu H, Sato T, Hirao K, Kanetaka H, Sakurai H & Iwamoto T. (2009b). Differences in clinical course between dementia with Lewy bodies and Alzheimer's disease. *Eur J Neurol* **16**, 212-217.
- Haorah J, Ramirez SH, Schall K, Smith D, Pandya R & Persidsky Y. (2007). Oxidative stress activates protein tyrosine kinase and matrix metalloproteinases leading to blood-brain barrier dysfunction. *J Neurochem* **101**, 566-576.
- Harima S, Yoshikawa M & Tokuoka K. (2008). [Historical consideration of tea trees and tea flowers, especially regarding the use of tea flowers as food]. *Yakushigaku Zasshi* **43**, 16-32.
- Harris AK, Elgebaly MM, Li W, Sachidanandam K & Ergul A. (2008). Effect of chronic endothelin receptor antagonism on cerebrovascular function in type 2 diabetes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **294**, R1213-1219.
- Hashimoto T, Wen G, Lawton MT, Boudreau NJ, Bollen AW, Yang GY, Barbaro NM, Higashida RT, Dowd CF, Halbach VV, Young WL & University of California SFBSG. (2003). Abnormal expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in brain arteriovenous malformations. *Stroke* **34**, 925-931.

- Hassler O. (1961). Morphological studies on the large cerebral arteries, with reference to the aetiology of subarachnoid haemorrhage. *Acta Psychiatr Scand Suppl* **154**, 1-145.
- Hegedus K & Fekete I. (1983). Defects of elastic lamina in middle cerebral artery. A possible cause of a primary intracerebral hemorrhage in a young woman. *Arch Psychiatr Nervenkr* **232**, 515-519.
- Henskens LH, Kroon AA, van Oostenbrugge RJ, Gronenschild EH, Fuss-Lejeune MM, Hofman PA, Lodder J & de Leeuw PW. (2008). Increased aortic pulse wave velocity is associated with silent cerebral small-vessel disease in hypertensive patients. *Hypertension* **52**, 1120-1126.
- Heusch G. (2008). Pleiotropic action(s) of the bradycardic agent ivabradine: cardiovascular protection beyond heart rate reduction. *Br J Pharmacol* **155**, 970-971.
- Heusch G, Skyschally A, Gres P, van Caster P, Schilawa D & Schulz R. (2008). Improvement of regional myocardial blood flow and function and reduction of infarct size with ivabradine: protection beyond heart rate reduction. *Eur Heart J* **29**, 2265-2275.
- Heyn P, Abreu BC & Ottenbacher KJ. (2004). The effects of exercise training on elderly persons with cognitive impairment and dementia: a meta-analysis. *Arch Phys Med Rehabil* **85**, 1694-1704.
- Hill MA, Meininger GA, Davis MJ & Laher I. (2009). Therapeutic potential of pharmacologically targeting arteriolar myogenic tone. *Trends Pharmacol Sci* **30**, 363-374.
- Hoekstra KA & Velleman SG. (2008). Brain microvascular and intracranial artery resistance to atherosclerosis is associated with heme oxygenase and ferritin in Japanese quail. *Mol Cell Biochem* **307**, 1-12.
- Huang A, Sun D, Carroll MA, Jiang H, Smith CJ, Connetta JA, Falck JR, Shesely EG, Koller A & Kaley G. (2001). EDHF mediates flow-induced dilation in skeletal muscle arterioles of female eNOS-KO mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **280**, H2462-2469.
- Hudetz AG, Mark G, Kovach AG, Kerényi T, Fody L & Monos E. (1981). Biomechanical properties of normal and fibrosclerotic human cerebral arteries. *Atherosclerosis* **39**, 353-365.
- Humphrey JD. (2008). Vascular adaptation and mechanical homeostasis at tissue, cellular, and sub-cellular levels. *Cell Biochem Biophys* **50**, 53-78.

- Humphrey JD, Eberth JF, Dye WW & Gleason RL. (2009). Fundamental role of axial stress in compensatory adaptations by arteries. *J Biomech* **42**, 1-8.
- Hutcheson IR & Griffith TM. (1991). Release of endothelium-derived relaxing factor is modulated both by frequency and amplitude of pulsatile flow. *Am J Physiol* **261**, H257-262.
- Iaccarino G, Cipolletta E, Fiorillo A, Anecchiarico M, Ciccarelli M, Cimini V, Koch WJ & Trimarco B. (2002). Beta(2)-adrenergic receptor gene delivery to the endothelium corrects impaired adrenergic vasorelaxation in hypertension. *Circulation* **106**, 349-355.
- Iadecola C. (2004). Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* **5**, 347-360.
- Iadecola C. (2010). The overlap between neurodegenerative and vascular factors in the pathogenesis of dementia. *Acta Neuropathol* **120**, 287-296.
- Iadecola C & Davisson RL. (2008). Hypertension and cerebrovascular dysfunction. *Cell Metab* **7**, 476-484.
- Ide K, Pott F, Van Lieshout JJ & Secher NH. (1998). Middle cerebral artery blood velocity depends on cardiac output during exercise with a large muscle mass. *Acta Physiol Scand* **162**, 13-20.
- Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE & Chaudhuri G. (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 9265-9269.
- Inci S & Spetzler RF. (2000). Intracranial aneurysms and arterial hypertension: a review and hypothesis. *Surg Neurol* **53**, 530-540; discussion 540-532.
- Intengan HD & Schiffrin EL. (2001). Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis. *Hypertension* **38**, 581-587.
- Jiang F, Guo Y, Salvemini D & Dusting GJ. (2003). Superoxide dismutase mimetic M40403 improves endothelial function in apolipoprotein(E)-deficient mice. *Br J Pharmacol* **139**, 1127-1134.
- Jimenez-Altayo F, Caracuel L, Perez-Asensio FJ, Martinez-Revelles S, Messeguer A, Planas AM & Vila E. (2009). Participation of oxidative stress on rat middle cerebral artery changes induced by focal cerebral ischemia: beneficial effects of 3,4-dihydro-6-hydroxy-7-methoxy-2,2-dimethyl-1(2H)-benzopyran (CR-6). *J Pharmacol Exp Ther* **331**, 429-436.

- Jimenez-Altayo F, Martin A, Rojas S, Justicia C, Briones AM, Giraldo J, Planas AM & Vila E. (2007). Transient middle cerebral artery occlusion causes different structural, mechanical, and myogenic alterations in normotensive and hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **293**, H628-635.
- Jin ZG, Wong C, Wu J & Berk BC. (2005). Flow shear stress stimulates Gab1 tyrosine phosphorylation to mediate protein kinase B and endothelial nitric-oxide synthase activation in endothelial cells. *J Biol Chem* **280**, 12305-12309.
- Johnson RP, El-Yazbi AF, Takeya K, Walsh EJ, Walsh MP & Cole WC. (2009). Ca²⁺ sensitization via phosphorylation of myosin phosphatase targeting subunit at threonine-855 by Rho kinase contributes to the arterial myogenic response. *J Physiol* **587**, 2537-2553.
- Jourquin J, Tremblay E, Decanis N, Charton G, Hanessian S, Chollet AM, Le Diguardher T, Khrestchatisky M & Rivera S. (2003). Neuronal activity-dependent increase of net matrix metalloproteinase activity is associated with MMP-9 neurotoxicity after kainate. *Eur J Neurosci* **18**, 1507-1517.
- Judkins CP, Diep H, Broughton BR, Mast AE, Hooker EU, Miller AA, Selemidis S, Dusting GJ, Sobey CG & Drummond GR. (2009). Direct evidence of a role for Nox2 in superoxide production, reduced nitric oxide bioavailability, and early atherosclerotic plaque formation in ApoE^{-/-} mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **298**, H24-32.
- Katzung BG, ed. (2004). *Basic and clinical pharmacology*. McGraw-Hill/Lange Medical Books.
- Kazama K, Anrather J, Zhou P, Girouard H, Frys K, Milner TA & Iadecola C. (2004). Angiotensin II impairs neurovascular coupling in neocortex through NADPH oxidase-derived radicals. *Circ Res* **95**, 1019-1026.
- Kearney-Schwartz A, Rossignol P, Bracard S, Felblinger J, Fay R, Boivin JM, Lecompte T, Lacolley P, Benetos A & Zannad F. (2009). Vascular structure and function is correlated to cognitive performance and white matter hyperintensities in older hypertensive patients with subjective memory complaints. *Stroke* **40**, 1229-1236.
- Kim C, Kikuchi H, Hashimoto N, Kojima M, Kang Y & Hazama F. (1988). Involvement of internal elastic lamina in development of induced cerebral aneurysms in rats. *Stroke* **19**, 507-511.
- Kleiner DE & Stetler-Stevenson WG. (1994). Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases. *Anal Biochem* **218**, 325-329.

- Koivisto T, Koobi T, Jula A, Hutri-Kahonen N, Raitakari OT, Majahalme S, Kukkonen-Harjula K, Lehtimäki T, Reunanen A, Viikari J, Turjanmaa V, Nieminen T & Kahonen M. (2007). Pulse wave velocity reference values in healthy adults aged 26-75 years. *Clin Physiol Funct Imaging* **27**, 191-196.
- Koller A, Huang A, Sun D & Kaley G. (1995). Exercise training augments flow-dependent dilation in rat skeletal muscle arterioles. Role of endothelial nitric oxide and prostaglandins. *Circ Res* **76**, 544-550.
- Korshunov VA, Schwartz SM & Berk BC. (2007). Vascular remodeling: hemodynamic and biochemical mechanisms underlying Glagov's phenomenon. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**, 1722-1728.
- Kou R & Michel T. (2007). Epinephrine regulation of the endothelial nitric-oxide synthase: roles of RAC1 and beta3-adrenergic receptors in endothelial NO signaling. *J Biol Chem* **282**, 32719-32729.
- Kroll MH, Hellums JD, McIntire LV, Schafer AI & Moake JL. (1996). Platelets and shear stress. *Blood* **88**, 1525-1541.
- Kumar A, Prakash A & Dogra S. (2011). Neuroprotective effect of carvedilol against aluminium induced toxicity: possible behavioral and biochemical alterations in rats. *Pharmacol Rep* **63**, 915-923.
- Kuriyama S, Hozawa A, Ohmori K, Shimazu T, Matsui T, Ebihara S, Awata S, Nagatomi R, Arai H & Tsuji I. (2006). Green tea consumption and cognitive function: a cross-sectional study from the Tsurugaya Project 1. *Am J Clin Nutr* **83**, 355-361.
- Kwater A, Gasowski J, Gryglewska B, Wizner B & Grodzicki T. (2009). Is blood flow in the middle cerebral artery determined by systemic arterial stiffness? *Blood Press* **18**, 130-134.
- Lange-Asschenfeldt C & Kojda G. (2008). Alzheimer's disease, cerebrovascular dysfunction and the benefits of exercise: from vessels to neurons. *Exp Gerontol* **43**, 499-504.
- Langheinrich AC, Michniewicz A, Bohle RM & Ritman EL. (2007). Vasa vasorum neovascularization and lesion distribution among different vascular beds in ApoE^{-/-}/LDL^{-/-} double knockout mice. *Atherosclerosis* **191**, 73-81.
- Laufs U. (2003). Beyond lipid-lowering: effects of statins on endothelial nitric oxide. *Eur J Clin Pharmacol* **58**, 719-731.
- Laufs U, Werner N, Link A, Endres M, Wassmann S, Jurgens K, Miche E, Böhm M & Nickenig G. (2004). Physical training increases endothelial progenitor cells,

- inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation* **109**, 220-226.
- Law M, Saindane AM, Ge Y, Babb JS, Johnson G, Mannon LJ, Herbert J & Grossman RI. (2004). Microvascular abnormality in relapsing-remitting multiple sclerosis: perfusion MR imaging findings in normal-appearing white matter. *Radiology* **231**, 645-652.
- Ledoux J, Werner ME, Brayden JE & Nelson MT. (2006). Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone. *Physiology (Bethesda)* **21**, 69-78.
- Lee CZ, Xu B, Hashimoto T, McCulloch CE, Yang GY & Young WL. (2004). Doxycycline suppresses cerebral matrix metalloproteinase-9 and angiogenesis induced by focal hyperstimulation of vascular endothelial growth factor in a mouse model. *Stroke* **35**, 1715-1719.
- Lee CZ, Xue Z, Zhu Y, Yang GY & Young WL. (2007). Matrix metalloproteinase-9 inhibition attenuates vascular endothelial growth factor-induced intracerebral hemorrhage. *Stroke* **38**, 2563-2568.
- Lee RM. (1995). Morphology of cerebral arteries. *Pharmacol Ther* **66**, 149-173.
- Lee TJ. (1980). Direct evidence against acetylcholine as the dilator transmitter in the cat cerebral artery. *Eur J Pharmacol* **68**, 393-394.
- Lehoux S, Castier Y & Tedgui A. (2006). Molecular mechanisms of the vascular responses to haemodynamic forces. *J Intern Med* **259**, 381-392.
- Lehoux S, Lemarie CA, Esposito B, Lijnen HR & Tedgui A. (2004). Pressure-induced matrix metalloproteinase-9 contributes to early hypertensive remodeling. *Circulation* **109**, 1041-1047.
- Lemarie CA, Tharaux PL & Lehoux S. (2010). Extracellular matrix alterations in hypertensive vascular remodeling. *J Mol Cell Cardiol* **48**, 433-439.
- Leosco D, Iaccarino G, Cipolletta E, De Santis D, Pisani E, Trimarco V, Ferrara N, Abete P, Sorriento D, Rengo F & Trimarco B. (2003). Exercise restores beta-adrenergic vasorelaxation in aged rat carotid arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **285**, H369-374.
- Leung FP, Yung LM, Laher I, Yao X, Chen ZY & Huang Y. (2008). Exercise, vascular wall and cardiovascular diseases: an update (Part 1). *Sports Med* **38**, 1009-1024.
- Levine HJ. (1997). Rest heart rate and life expectancy. *J Am Coll Cardiol* **30**, 1104-1106.

- Leys D, Henon H, Mackowiak-Cordoliani MA & Pasquier F. (2005). Poststroke dementia. *Lancet Neurol* **4**, 752-759.
- 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.
- Lincoln TM, Dey N & Sellak H. (2001). Invited review: cGMP-dependent protein kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression. *J Appl Physiol* **91**, 1421-1430.
- Liu W, Sood R, Chen Q, Sakoglu U, Hendren J, Cetin O, Miyake M & Liu KJ. (2008). Normobaric hyperoxia inhibits NADPH oxidase-mediated matrix metalloproteinase-9 induction in cerebral microvessels in experimental stroke. *J Neurochem* **107**, 1196-1205.
- Loke WM, Proudfoot JM, Hodgson JM, McKinley AJ, Hime N, Magat M, Stocker R & Croft KD. (2010). Specific dietary polyphenols attenuate atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice by alleviating inflammation and endothelial dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **30**, 749-757.
- 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.
- Lorenzl S, Albers DS, Narr S, Chirichigno J & Beal MF. (2002). Expression of MMP-2, MMP-9, and MMP-1 and their endogenous counterregulators TIMP-1 and TIMP-2 in postmortem brain tissue of Parkinson's disease. *Exp Neurol* **178**, 13-20.
- Mach F. (2009). [Ivabradine, an I(f) current inhibitor--new treatment options in coronary heart disease]. *Rev Med Suisse* **5**, 1168-1170, 1172-1163.
- Majmudar NG, Anumba D, Robson SC & Ford GA. (1999). Contribution of nitric oxide to beta2-adrenoceptor mediated vasodilatation in human forearm arterial vasculature. *Br J Clin Pharmacol* **47**, 173-177.
- Maneen MJ & Cipolla MJ. (2007). Peroxynitrite diminishes myogenic tone in cerebral arteries: role of nitrotyrosine and F-actin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **292**, H1042-1050.
- Markus HS. (2008). Genes, endothelial function and cerebral small vessel disease in man. *Exp Physiol* **93**, 121-127.

- Martinez-Lemus LA, Hill MA & Meininger GA. (2009). The plastic nature of the vascular wall: a continuum of remodeling events contributing to control of arteriolar diameter and structure. *Physiology (Bethesda)* **24**, 45-57.
- Mayhan WG, Arrick DM, Patel KP & Sun H. (2011). Exercise training normalizes impaired NOS-dependent responses of cerebral arterioles in type 1 diabetic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **300**, H1013-1020.
- Mayhan WG, Arrick DM, Sun H & Patel KP. (2010). Exercise training restores impaired dilator responses of cerebral arterioles during chronic exposure to nicotine. *J Appl Physiol* **109**, 1109-1114.
- Mayhan WG, Faraci FM & Heistad DD. (1987). Impairment of endothelium-dependent responses of cerebral arterioles in chronic hypertension. *Am J Physiol* **253**, H1435-1440.
- McEniery CM, Wallace S, Mackenzie IS, McDonnell B, Yasmin, Newby DE, Cockcroft JR & Wilkinson IB. (2006). Endothelial function is associated with pulse pressure, pulse wave velocity, and augmentation index in healthy humans. *Hypertension* **48**, 602-608.
- McGuinness B, Craig D, Bullock R & Passmore P. (2009). Statins for the prevention of dementia. *Cochrane Database Syst Rev*, CD003160.
- McHedlishvili G. (1980). Physiological mechanisms controlling cerebral blood flow. *Stroke* **11**, 240-248.
- Meilhac O, Ramachandran S, Chiang K, Santanam N & Parthasarathy S. (2001). Role of arterial wall antioxidant defense in beneficial effects of exercise on atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **21**, 1681-1688.
- Meissner M, Lombardo E, Havinga R, Tietge UJ, Kuipers F & Groen AK. (2011). Voluntary wheel running increases bile acid as well as cholesterol excretion and decreases atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Atherosclerosis* **218**, 323-329.
- Miller AA, Budzyn K & Sobey CG. (2010a). Vascular dysfunction in cerebrovascular disease: mechanisms and therapeutic intervention. *Clin Sci (Lond)* **119**, 1-17.
- Miller AA, De Silva TM, Judkins CP, Diep H, Drummond GR & Sobey CG. (2010b). Augmented superoxide production by Nox2-containing NADPH oxidase causes cerebral artery dysfunction during hypercholesterolemia. *Stroke* **41**, 784-789.
- Miller AA, Drummond GR & Sobey CG. (2006). Novel isoforms of NADPH-oxidase in cerebral vascular control. *Pharmacol Ther* **111**, 928-948.

- Mirowsky J. (2011). Cognitive decline and the default American lifestyle. *J Gerontol B Psychol Sci Soc Sci* **66 Suppl 1**, i50-58.
- Mizoguchi H, Takuma K, Fukuzaki E, Ibi D, Someya E, Akazawa KH, Alkam T, Tsunekawa H, Mouri A, Noda Y, Nabeshima T & Yamada K. (2009). Matrix metalloprotease-9 inhibition improves amyloid beta-mediated cognitive impairment and neurotoxicity in mice. *J Pharmacol Exp Ther* **331**, 14-22.
- Moiens-Afshari F, Ghosh S, Elmi S, Khazaei M, Rahman MM, Sallam N & Laher I. (2008). Exercise restores coronary vascular function independent of myogenic tone or hyperglycemic status in db/db mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **295**, H1470-1480.
- Muller JM, Davis MJ & Chilian WM. (1996). Integrated regulation of pressure and flow in the coronary microcirculation. *Cardiovasc Res* **32**, 668-678.
- Mulvany MJ, Baumbach GL, Aalkjaer C, Heagerty AM, Korsgaard N, Schiffrin EL & Heistad DD. (1996). Vascular remodeling. *Hypertension* **28**, 505-506.
- Mulvany MJ & Halpern W. (1976). Mechanical properties of vascular smooth muscle cells in situ. *Nature* **260**, 617-619.
- Murthy S, Ryan A, He C, Mallampalli RK & Carter AB. (2010). Rac1-mediated mitochondrial H₂O₂ generation regulates MMP-9 gene expression in macrophages via inhibition of SP-1 and AP-1. *J Biol Chem* **285**, 25062-25073.
- 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.
- Napoli C, Williams-Ignarro S, de Nigris F, Lerman LO, D'Armiento FP, Crimi E, Byrns RE, Casamassimi A, Lanza A, Gombos F, Sica V & Ignarro LJ. (2006). Physical training and metabolic supplementation reduce spontaneous atherosclerotic plaque rupture and prolong survival in hypercholesterolemic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 10479-10484.
- Napoli C, Williams-Ignarro S, De Nigris F, Lerman LO, Rossi L, Guarino C, Mansueto G, Di Tuoro F, Pignalosa O, De Rosa G, Sica V & Ignarro LJ. (2004). Long-term combined beneficial effects of physical training and metabolic treatment on atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 8797-8802.
- Napoli C, Witztum JL, de Nigris F, Palumbo G, D'Armiento FP & Palinski W. (1999). Intracranial arteries of human fetuses are more resistant to hypercholesterolemia-induced fatty streak formation than extracranial arteries. *Circulation* **99**, 2003-2010.

- Negishi H, Xu JW, Ikeda K, Njelekela M, Nara Y & Yamori Y. (2004). Black and green tea polyphenols attenuate blood pressure increases in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Nutr* **134**, 38-42.
- Newby AC. (2007). Metalloproteinases and vulnerable atherosclerotic plaques. *Trends Cardiovasc Med* **17**, 253-258.
- Niebauer J & Cooke JP. (1996). Cardiovascular effects of exercise: role of endothelial shear stress. *J Am Coll Cardiol* **28**, 1652-1660.
- Niebauer J, Maxwell AJ, Lin PS, Wang D, Tsao PS & Cooke JP. (2003). NOS inhibition accelerates atherogenesis: reversal by exercise. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **285**, H535-540.
- Nigam A, Mitchell GF, Lambert J & Tardif JC. (2003). Relation between conduit vessel stiffness (assessed by tonometry) and endothelial function (assessed by flow-mediated dilatation) in patients with and without coronary heart disease. *Am J Cardiol* **92**, 395-399.
- Nishio K, Ihara M, Yamasaki N, Kalaria RN, Maki T, Fujita Y, Ito H, Oishi N, Fukuyama H, Miyakawa T, Takahashi R & Tomimoto H. (2010). A mouse model characterizing features of vascular dementia with hippocampal atrophy. *Stroke* **41**, 1278-1284.
- Niu XL, Madamanchi NR, Vendrov AE, Tchivilev I, Rojas M, Madamanchi C, Brandes RP, Krause KH, Humphries J, Smith A, Burnand KG & Runge MS. (2010). Nox activator 1: a potential target for modulation of vascular reactive oxygen species in atherosclerotic arteries. *Circulation* **121**, 549-559.
- Noris M, Morigi M, Donadelli R, Aiello S, Foppolo M, Todeschini M, Orisio S, Remuzzi G & Remuzzi A. (1995). Nitric oxide synthesis by cultured endothelial cells is modulated by flow conditions. *Circ Res* **76**, 536-543.
- Nuki Y, Tsou TL, Kurihara C, Kanematsu M, Kanematsu Y & Hashimoto T. (2009). Elastase-induced intracranial aneurysms in hypertensive mice. *Hypertension* **54**, 1337-1344.
- O'Driscoll G, Green D & Taylor RR. (1997). Simvastatin, an HMG-coenzyme A reductase inhibitor, improves endothelial function within 1 month. *Circulation* **95**, 1126-1131.
- O'Rourke MF & Safar ME. (2005). Relationship between aortic stiffening and microvascular disease in brain and kidney: cause and logic of therapy. *Hypertension* **46**, 200-204.

- Ochi N, Kohara K, Tabara Y, Nagai T, Kido T, Uetani E, Ochi M, Igase M & Miki T. (2010). Association of central systolic blood pressure with intracerebral small vessel disease in Japanese. *Am J Hypertens* **23**, 889-894.
- Ogoh S & Ainslie PN. (2009a). Cerebral blood flow during exercise: mechanisms of regulation. *J Appl Physiol* **107**, 1370-1380.
- Ogoh S & Ainslie PN. (2009b). Regulatory mechanisms of cerebral blood flow during exercise: new concepts. *Exerc Sport Sci Rev* **37**, 123-129.
- Okabe TA, Shimada K, Hattori M, Murayama T, Yokode M, Kita T & Kishimoto C. (2007). Swimming reduces the severity of atherosclerosis in apolipoprotein E deficient mice by antioxidant effects. *Cardiovasc Res* **74**, 537-545.
- Okuyama S, Okuyama J, Tamatsu Y, Shimada K, Hoshi H & Iwai J. (2004). The arterial circle of Willis of the mouse helps to decipher secrets of cerebral vascular accidents in the human. *Med Hypotheses* **63**, 997-1009.
- Olser W, ed. (1898). *The principle and practice of medicine*.
- Ostrowski NL, Lolait SJ & Young WS, 3rd. (1994). Cellular localization of vasopressin V1a receptor messenger ribonucleic acid in adult male rat brain, pineal, and brain vasculature. *Endocrinology* **135**, 1511-1528.
- Ota R, Kurihara C, Tsou TL, Young WL, Yeghiazarians Y, Chang M, Mobashery S, Sakamoto A & Hashimoto T. (2009). Roles of matrix metalloproteinases in flow-induced outward vascular remodeling. *J Cereb Blood Flow Metab* **29**, 1547-1558.
- Palatini P & Parati G. (2010). Persistently elevated heart rate accelerates the progression of arterial stiffness. *J Hypertens* **28**, 653-656.
- Paluska SA & Schwenk TL. (2000). Physical activity and mental health: current concepts. *Sports Med* **29**, 167-180.
- Pantoni L & Garcia JH. (1997). Pathogenesis of leukoaraiosis: a review. *Stroke* **28**, 652-659.
- 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, 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.

- Park JW, Hong JS, Lee KS, Kim HY, Lee JJ & Lee SR. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate reduces matrix metalloproteinase-9 activity following transient focal cerebral ischemia. *J Nutr Biochem* **21**, 1038-1044.
- Park L, Anrather J, Girouard H, Zhou P & Iadecola C. (2007). Nox2-derived reactive oxygen species mediate neurovascular dysregulation in the aging mouse brain. *J Cereb Blood Flow Metab* **27**, 1908-1918.
- Pase MP, Pipingas A, Kras M, Nolidin K, Gibbs AL, Wesnes KA, Scholey AB & Stough C. (2010). Healthy middle-aged individuals are vulnerable to cognitive deficits as a result of increased arterial stiffness. *J Hypertens* **28**, 1724-1729.
- Pashkow FJ. (2011). Oxidative Stress and Inflammation in Heart Disease: Do Antioxidants Have a Role in Treatment and/or Prevention? *Int J Inflam* **2011**, 514623.
- Pellegrin M, Alonso F, Aubert JF, Bouzourene K, Braunersreuther V, Mach F, Haefliger JA, Hayoz D, Berthelot A, Nussberger J, Laurant P & Mazzolai L. (2009). Swimming prevents vulnerable atherosclerotic plaque development in hypertensive 2-kidney, 1-clip mice by modulating angiotensin II type 1 receptor expression independently from hemodynamic changes. *Hypertension* **53**, 782-789.
- Peters U, Poole C & Arab L. (2001). Does tea affect cardiovascular disease? A meta-analysis. *Am J Epidemiol* **154**, 495-503.
- Petrault O, Ouk T, Gautier S, Laprais M, Gele P, Bastide M & Bordet R. (2005). Pharmacological neutropenia prevents endothelial dysfunction but not smooth muscle functions impairment induced by middle cerebral artery occlusion. *Br J Pharmacol* **144**, 1051-1058.
- Pinaud F, Loufrani L, Toutain B, Lambert D, Vandekerckhove L, Henrion D & Baufreton C. (2011). In vitro protection of vascular function from oxidative stress and inflammation by pulsatility in resistance arteries. *J Thorac Cardiovasc Surg* **142**, 1254-1262.
- Pires PW, Rogers CT, McClain JL, Garver HS, Fink GD & Dorrance AM. (2011). Doxycycline, a matrix metalloprotease inhibitor, reduces vascular remodeling and damage after cerebral ischemia in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **301**, H87-97.
- Popovic M, Puchner S, Endler G, Foraschik C, Minar E & Bucek RA. (2010). The effects of endurance and recreational exercise on subclinical evidence of atherosclerosis in young adults. *Am J Med Sci* **339**, 332-336.

- Pott F, Jensen K, Hansen H, Christensen NJ, Lassen NA & Secher NH. (1996). Middle cerebral artery blood velocity and plasma catecholamines during exercise. *Acta Physiol Scand* **158**, 349-356.
- Pott F, Knudsen L, Nowak M, Nielsen HB, Hanel B & Secher NH. (1997). Middle cerebral artery blood velocity during rowing. *Acta Physiol Scand* **160**, 251-255.
- Prado R, Watson BD, Kuluz J & Dietrich WD. (1992). Endothelium-derived nitric oxide synthase inhibition. Effects on cerebral blood flow, pial artery diameter, and vascular morphology in rats. *Stroke* **23**, 1118-1123; discussion 1124.
- Pretnar-Oblak J, Sebestjen M & Sabovic M. (2008). Statin treatment improves cerebral more than systemic endothelial dysfunction in patients with arterial hypertension. *Am J Hypertens* **21**, 674-678.
- Pries AR, Neuhaus D & Gaehtgens P. (1992). Blood viscosity in tube flow: dependence on diameter and hematocrit. *Am J Physiol* **263**, H1770-1778.
- Querido JS & Sheel AW. (2007). Regulation of cerebral blood flow during exercise. *Sports Med* **37**, 765-782.
- Raffetto JD & Khalil RA. (2008). Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. *Biochem Pharmacol* **75**, 346-359.
- Raksin PB, Alperin N, Sivaramakrishnan A, Surapaneni S & Lichtor T. (2003). Noninvasive intracranial compliance and pressure based on dynamic magnetic resonance imaging of blood flow and cerebrospinal fluid flow: review of principles, implementation, and other noninvasive approaches. *Neurosurg Focus* **14**, e4.
- Ramachandran S, Penumetcha M, Merchant NK, Santanam N, Rong R & Parthasarathy S. (2005). Exercise reduces preexisting atherosclerotic lesions in LDL receptor knock out mice. *Atherosclerosis* **178**, 33-38.
- Raszkievicz JL, Linville DG, Kerwin JF, Jr., Wagenaar F & Arneric SP. (1992). Nitric oxide synthase is critical in mediating basal forebrain regulation of cortical cerebral circulation. *J Neurosci Res* **33**, 129-135.
- Regrigny O, Atkinson J, Capdeville-Atkinson C, Liminana P & Chillon JM. (2000). Effect of lovastatin on cerebral circulation in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **35**, 1105-1110.
- Ren H, Sun T, MacDonald DJ, Cobb MJ & Li X. (2006). Real-time in vivo blood-flow imaging by moving-scatterer-sensitive spectral-domain optical Doppler tomography. *Opt Lett* **31**, 927-929.

- Renaud S & de Lorgeril M. (1992). Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* **339**, 1523-1526.
- Ribeiro F, Alves AJ, Duarte JA & Oliveira J. (2009). Is exercise training an effective therapy targeting endothelial dysfunction and vascular wall inflammation? *Int J Cardiol* **141**, 214-221.
- Riccioni G. (2009). Focus on ivabradine: a new heart rate-controlling drug. *Expert Rev Cardiovasc Ther* **7**, 107-113.
- Richmond TS. (1997). Cerebral resuscitation after global brain ischemia: linking research to practice. *AACN Clin Issues* **8**, 171-181.
- Ristow M, Zarse K, Oberbach A, Kloting N, Birringer M, Kiehnopf M, Stumvoll M, Kahn CR & Bluher M. (2009). Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 8665-8670.
- Rockman HA, Koch WJ & Lefkowitz RJ. (2002). Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function. *Nature* **415**, 206-212.
- Rodrigues SF, Tran ED, Fortes ZB & Schmid-Schonbein GW. (2010). Matrix metalloproteinases cleave the beta2-adrenergic receptor in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **299**, H25-35.
- Rosenberg GA. (2002). Matrix metalloproteinases in neuroinflammation. *Glia* **39**, 279-291.
- Ross R. (1993). The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* **362**, 801-809.
- Rubin LL & Staddon JM. (1999). The cell biology of the blood-brain barrier. *Annu Rev Neurosci* **22**, 11-28.
- Ruddy JM, Jones JA, Stroud RE, Mukherjee R, Spinale FG & Ikonomidis JS. (2009). Differential effects of mechanical and biological stimuli on matrix metalloproteinase promoter activation in the thoracic aorta. *Circulation* **120**, S262-268.
- Ruiz-Gutierrez V, Muriana FJ, Guerrero A, Cert AM & Villar J. (1996). Plasma lipids, erythrocyte membrane lipids and blood pressure of hypertensive women after ingestion of dietary oleic acid from two different sources. *J Hypertens* **14**, 1483-1490.
- Ruiz J, Antequera T, Andres AI, Petron MJ & Muriel E. (2004). Improvement of a solid phase extraction method for analysis of lipid fractions in muscle foods. *Analytica Chimica Acta* **520**, 201-205.

- 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.
- Savitz SI, Erhardt JA, Anthony JV, Gupta G, Li X, Barone FC & Rosenbaum DM. (2000). The novel beta-blocker, carvedilol, provides neuroprotection in transient focal stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* **20**, 1197-1204.
- Schubert R, Serebryakov VN, Engel H & Hopp HH. (1996). Iloprost activates KCa channels of vascular smooth muscle cells: role of cAMP-dependent protein kinase. *Am J Physiol* **271**, C1203-1211.
- 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.
- Shibata M, Ohtani R, Ihara M & Tomimoto H. (2004). White matter lesions and glial activation in a novel mouse model of chronic cerebral hypoperfusion. *Stroke* **35**, 2598-2603.
- Shibata M, Yamasaki N, Miyakawa T, Kalaria RN, Fujita Y, Ohtani R, Ihara M, Takahashi R & Tomimoto H. (2007). Selective impairment of working memory in a mouse model of chronic cerebral hypoperfusion. *Stroke* **38**, 2826-2832.
- Shimada K, Kishimoto C, Okabe TA, Hattori M, Murayama T, Yokode M & Kita T. (2007). Exercise training reduces severity of atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice via nitric oxide. *Circ J* **71**, 1147-1151.
- Shimoda LA, Norins NA & Madden JA. (1998). Responses to pulsatile flow in piglet isolated cerebral arteries. *Pediatr Res* **43**, 514-520.
- Shojima M, Oshima M, Takagi K, Torii R, Hayakawa M, Katada K, Morita A & Kirino T. (2004). Magnitude and role of wall shear stress on cerebral aneurysm: computational fluid dynamic study of 20 middle cerebral artery aneurysms. *Stroke* **35**, 2500-2505.
- Signorelli SS, Malaponte G, Libra M, Di Pino L, Celotta G, Bevelacqua V, Petrino M, Nicotra GS, Indelicato M, Navolanic PM, Pennisi G & Mazzarino MC. (2005). Plasma levels and zymographic activities of matrix metalloproteinases 2 and 9 in type II diabetics with peripheral arterial disease. *Vasc Med* **10**, 1-6.

- Singh RB, Niaz MA, Rastogi SS & Rastogi S. (1996). Usefulness of antioxidant vitamins in suspected acute myocardial infarction (the Indian experiment of infarct survival-3). *Am J Cardiol* **77**, 232-236.
- Smith DT, Hoetzer GL, Greiner JJ, Stauffer BL & DeSouza CA. (2003). Effects of ageing and regular aerobic exercise on endothelial fibrinolytic capacity in humans. *J Physiol* **546**, 289-298.
- Snoek-van Beurden PA & Von den Hoff JW. (2005). Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Biotechniques* **38**, 73-83.
- Somani SM, Ravi R & Rybak LP. (1995). Effect of exercise training on antioxidant system in brain regions of rat. *Pharmacol Biochem Behav* **50**, 635-639.
- Somlyo AP & Somlyo AV. (2003). Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev* **83**, 1325-1358.
- Song J & Waugh RE. (1993). Bending rigidity of SOPC membranes containing cholesterol. *Biophys J* **64**, 1967-1970.
- Sotiriou CG & Cheng JW. (2000). Beneficial effects of statins in coronary artery disease--beyond lowering cholesterol. *Ann Pharmacother* **34**, 1432-1439.
- Srinivasan VJ, Sakadzic S, Gorczynska I, Ruvinskaya S, Wu W, Fujimoto JG & Boas DA. (2010). Quantitative cerebral blood flow with optical coherence tomography. *Opt Express* **18**, 2477-2494.
- Steed MM, Tyagi N, Sen U, Schuschke DA, Joshua IG & Tyagi SC. (2010). Functional consequences of the collagen/elastin switch in vascular remodeling in hyperhomocysteinemic wild-type, eNOS^{-/-}, and iNOS^{-/-} mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **299**, L301-311.
- Steinberg D & Witztum JL. (2002). Is the oxidative modification hypothesis relevant to human atherosclerosis? Do the antioxidant trials conducted to date refute the hypothesis? *Circulation* **105**, 2107-2111.
- 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.
- Storer JB. (1966). Longevity and gross pathology at death in 22 inbred mouse strains. *J Gerontol* **21**, 404-409.

- Strandgaard S, Olesen J, Skinhoj E & Lassen NA. (1973). Autoregulation of brain circulation in severe arterial hypertension. *Br Med J* **1**, 507-510.
- Sun D, Huang A, Smith CJ, Stackpole CJ, Connetta JA, Shesely EG, Koller A & Kaley G. (1999). Enhanced release of prostaglandins contributes to flow-induced arteriolar dilation in eNOS knockout mice. *Circ Res* **85**, 288-293.
- 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.
- Szmydynger-Chodobska J, Chung I, Kozniwska E, Tran B, Harrington FJ, Duncan JA & Chodobski A. (2004). Increased expression of vasopressin v1a receptors after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* **21**, 1090-1102.
- Takumi T, Yang EH, Mathew V, Rihal CS, Gulati R, Lerman LO & Lerman A. (2010). Coronary endothelial dysfunction is associated with a reduction in coronary artery compliance and an increase in wall shear stress. *Heart* **96**, 773-778.
- Tamaki K, Armstrong M & Heistad D. (1986). Effects of atherosclerosis on cerebral vessels: hemodynamic and morphometric studies. *Stroke* **17**, 1209-1214.
- Taylor RS, Brown A, Ebrahim S, Jolliffe J, Noorani H, Rees K, Skidmore B, Stone JA, Thompson DR & Oldridge N. (2004). Exercise-based rehabilitation for patients with coronary heart disease: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Med* **116**, 682-692.
- Thacher TN, Silacci P, Stergiopoulos N & da Silva RF. (2009). Autonomous Effects of Shear Stress and Cyclic Circumferential Stretch regarding Endothelial Dysfunction and Oxidative Stress: An ex vivo Arterial Model. *J Vasc Res* **47**, 336-345.
- Thorin E, Hamilton C, Dominiczak AF, Dominiczak MH & Reid JL. (1995). Oxidized-LDL induced changes in membrane physico-chemical properties and [Ca²⁺]_i of bovine aortic endothelial cells. Influence of vitamin E. *Atherosclerosis* **114**, 185-195.
- Thorin E & Thorin-Trescases N. (2009). Vascular endothelial ageing, heartbeat after heartbeat. *Cardiovasc Res* **84**, 24-32.
- Toda N, Okunishi H & Miyazaki M. (1982). Length-passive tension relationships in cerebral and peripheral arteries isolated from spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Jpn Circ J* **46**, 1088-1094.

- Tonstad S, Joakimsen O, Stensland-Bugge E, Ose L, Bonna KH & Leren TP. (1998). Carotid intima-media thickness and plaque in patients with familial hypercholesterolaemia mutations and control subjects. *Eur J Clin Invest* **28**, 971-979.
- Toth P, Rozsa B, Springo Z, Doczi T & Koller A. (2011). Isolated human and rat cerebral arteries constrict to increases in flow: role of 20-HETE and TP receptors. *J Cereb Blood Flow Metab*.
- Tounian P, Aggoun Y, Dubern B, Varille V, Guy-Grand B, Sidi D, Girardet JP & Bonnet D. (2001). Presence of increased stiffness of the common carotid artery and endothelial dysfunction in severely obese children: a prospective study. *Lancet* **358**, 1400-1404.
- Tran ED, DeLano FA & Schmid-Schonbein GW. (2010). Enhanced matrix metalloproteinase activity in the spontaneously hypertensive rat: VEGFR-2 cleavage, endothelial apoptosis, and capillary rarefaction. *J Vasc Res* **47**, 423-431.
- Tsuchikura S, Shoji T, Kimoto E, Shinohara K, Hatsuda S, Koyama H, Emoto M & Nishizawa Y. (2010). Central versus peripheral arterial stiffness in association with coronary, cerebral and peripheral arterial disease. *Atherosclerosis* **211**, 480-485.
- Uzar E, Acar A, Evliyaoglu O, Firat U, Kamasak K, Gocmez C, Alp H, Tufek A, Tasdemir N & Ilhan A. (2011). The anti-oxidant and anti-apoptotic effects of nebivolol and zofenopril in a model of cerebral ischemia/reperfusion in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*.
- van den Akker J, Schoorl MJ, Bakker EN & Vanbavel E. (2010). Small artery remodeling: current concepts and questions. *J Vasc Res* **47**, 183-202.
- van der Loo B, Labugger R, Skepper JN, Bachschmid M, Kilo J, Powell JM, Palacios-Callender M, Erusalimsky JD, Quaschnig T, Malinski T, Gygi D, Ullrich V & Luscher TF. (2000). Enhanced peroxynitrite formation is associated with vascular aging. *J Exp Med* **192**, 1731-1744.
- Vanhoutte PM. (2002). Dysfonctionnement endothélial et pathologie vasculaire. *Flammarion Médecine-Science*.
- Vanhoutte PM, Shimokawa H, Tang EH & Feletou M. (2009). Endothelial dysfunction and vascular disease. *Acta Physiol (Oxf)* **196**, 193-222.
- Vaughan CJ & Delanty N. (1999). Neuroprotective properties of statins in cerebral ischemia and stroke. *Stroke* **30**, 1969-1973.

- Vaynman S & Gomez-Pinilla F. (2006). Revenge of the "sit": how lifestyle impacts neuronal and cognitive health through molecular systems that interface energy metabolism with neuronal plasticity. *J Neurosci Res* **84**, 699-715.
- Waldron GJ & Cole WC. (1999). Activation of vascular smooth muscle K⁺ channels by endothelium-derived relaxing factors. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **26**, 180-184.
- 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.
- Wang YC, McPherson K, Marsh T, Gortmaker SL & Brown M. (2011). Health and economic burden of the projected obesity trends in the USA and the UK. *Lancet* **378**, 815-825.
- Wang YX. (2007). Do measures of vascular compliance correlate with endothelial function? *Curr Diab Rep* **7**, 265-268.
- Warmack TS, Estes MA, Heldenbrand S & Franks AM. (2009). Beta-adrenergic antagonists in hypertension: a review of the evidence. *Ann Pharmacother* **43**, 2031-2043.
- Wen CP, Wai JP, Tsai MK, Yang YC, Cheng TY, Lee MC, Chan HT, Tsao CK, Tsai SP & Wu X. (2011). Minimum amount of physical activity for reduced mortality and extended life expectancy: a prospective cohort study. *Lancet* **378**, 1244-1253.
- Westerhof N, Lankhaar JW & Westerhof BE. (2009). The arterial Windkessel. *Med Biol Eng Comput* **47**, 131-141.
- White RP, Hindley C, Bloomfield PM, Cunningham VJ, Vallance P, Brooks DJ & Markus HS. (1999). The effect of the nitric oxide synthase inhibitor L-NMMA on basal CBF and vasoneuronal coupling in man: a PET study. *J Cereb Blood Flow Metab* **19**, 673-678.
- Widlansky ME. (2010). The danger of sedenterism: endothelium at risk. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **299**, H243-244.
- William E. Sonntag DME, Jeremy Ingraham, and David R. Riddle (2007). Regulation of Cerebrovascular Aging, ed. aging B. Taylor and Francis Group.
- Williams JK, Kaplan JR, Suparto IH, Fox JL & Manuck SB. (2003). Effects of exercise on cardiovascular outcomes in monkeys with risk factors for coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**, 864-871.

- Williams JK, Sukhova GK, Herrington DM & Libby P. (1998). Pravastatin has cholesterol-lowering independent effects on the artery wall of atherosclerotic monkeys. *J Am Coll Cardiol* **31**, 684-691.
- Wojciechowski D & Papademetriou V. (2008). Beta-blockers in the management of hypertension: focus on nebivolol. *Expert Rev Cardiovasc Ther* **6**, 471-479.
- Wostyn P. (2004). Can chronic increased intracranial pressure or exposure to repetitive intermittent intracranial pressure elevations raise your risk for Alzheimer's disease? *Med Hypotheses* **62**, 925-930.
- Xie C, Kang J, Burris R, Ferguson ME, Schauss AG, Nagarajan S & Wu X. (2011). Acai juice attenuates atherosclerosis in ApoE deficient mice through antioxidant and anti-inflammatory activities. *Atherosclerosis*.
- Xie H & Bevan JA. (1999). Oxidized low-density lipoprotein enhances myogenic tone in the rabbit posterior cerebral artery through the release of endothelin-1. *Stroke* **30**, 2423-2429; discussion 2429-2430.
- Xie M, Yi C, Luo X, Xu S, Yu Z, Tang Y, Zhu W, Du Y, Jia L, Zhang Q, Dong Q, Zhang X, Bu B & Wang W. (2010). Glial gap junctional communication involvement in hippocampal damage after middle cerebral artery occlusion. *Ann Neurol* **70**, 121-132.
- Xu B, Li J, Gao L & Ferro A. (2000). Nitric oxide-dependent vasodilatation of rabbit femoral artery by beta(2)-adrenergic stimulation or cyclic AMP elevation in vivo. *Br J Pharmacol* **129**, 969-974.
- Xu Y, Zhang JJ, Xiong L, Zhang L, Sun D & Liu H. (2010). Green tea polyphenols inhibit cognitive impairment induced by chronic cerebral hypoperfusion via modulating oxidative stress. *J Nutr Biochem* **21**, 741-748.
- Yamashiro K, Milsom AB, Duchene J, Panayiotou C, Urabe T, Hattori N & Ahluwalia A. (2010). Alterations in nitric oxide and endothelin-1 bioactivity underlie cerebrovascular dysfunction in ApoE-deficient mice. *J Cereb Blood Flow Metab* **30**, 1494-1503.
- Yang Y, Shi Y, Guo S, Zhang S, Cui N, Shi W, Zhu D & Jiang C. (2008). PKA-dependent activation of the vascular smooth muscle isoform of KATP channels by vasoactive intestinal polypeptide and its effect on relaxation of the mesenteric resistance artery. *Biochim Biophys Acta* **1778**, 88-96.
- Yang YM, Huang A, Kaley G & Sun D. (2009). eNOS uncoupling and endothelial dysfunction in aged vessels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **297**, H1829-1836.

- Yung LM, Laher I, Yao X, Chen ZY, Huang Y & Leung FP. (2009). Exercise, vascular wall and cardiovascular diseases: an update (part 2). *Sports Med* **39**, 45-63.
- Zalba G, Fortuno A, Orbe J, San Jose G, Moreno MU, Belzunce M, Rodriguez JA, Beloqui O, Paramo JA & Diez J. (2007). Phagocytic NADPH oxidase-dependent superoxide production stimulates matrix metalloproteinase-9: implications for human atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**, 587-593.
- Zhang D, Zhao J, Sun Y, Wang S, Tai WH, Cochrane DD & Li J. (2003). Pathological observation of brain arteries and spontaneous aneurysms in hypertensive rats. *Chin Med J (Engl)* **116**, 424-427.
- Zhang F, Xu S & Iadecola C. (1995). Role of nitric oxide and acetylcholine in neocortical hyperemia elicited by basal forebrain stimulation: evidence for an involvement of endothelial nitric oxide. *Neuroscience* **69**, 1195-1204.
- Zonta M, Angulo MC, Gobbo S, Rosengarten B, Hossmann KA, Pozzan T & Carmignoto G. (2003). Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nat Neurosci* **6**, 43-50.