

UNIVERSITE DE BOURGOGNE  
Ecole Doctorale « Environnements – Santé »  
PRES Bourgogne – Franche-Comté

**THESE**  
**Pour l'obtention du grade de**  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BOURGOGNE**

Discipline: Sciences de la Vie

Spécialités: Neurosciences

par **Hayat BANOUJAAFAR**

Présentée et soutenue publiquement le 18 Décembre 2015

---

**Contribution de l'hémodynamique cérébrale  
à l'élévation des taux de BDNF cérébraux  
induite par l'activité physique chez le rat.**

---

**Composition du jury :**

Pr. Marie-Hélène CANU

Rapporteur

Pr. Catherine MARCHAND-LEROUX

Rapporteur

Pr. Céline DEMOUGEOT

Examineur

Pr. Christine MARIE

Directeur



## Remerciements

Je tiens à remercier très sincèrement :

Mme Marie-Hélène CANU, Professeur à l'Université de Lille 1 et Mme Catherine MARCHAND-LEROUX, Professeur à l'Université de Paris-Descartes 5, pour avoir accepté de rapporter cette thèse. Qu'elles trouvent ici le témoignage de ma plus grande reconnaissance.

Mme Céline DEMOUGEOT, Professeur à l'Université de Franche-Comté, pour avoir accepté de juger cette thèse en tant qu'examinateur. Qu'elle trouve le témoignage de ma profonde gratitude.

Je remercie également Mme Christine MARIE, Professeur de Physiologie à l'Université de Bourgogne et Directrice de ce travail de thèse. En m'accueillant au sein de votre équipe, vous m'avez permis de vivre une expérience très enrichissante tant sur le plan scientifique que personnel. Merci pour votre rigueur scientifique, votre disponibilité et vos précieux conseils tout au long de la thèse et particulièrement pendant la rédaction. Recevez, Christine, l'assurance de mon estime et de mon plus profond respect.

A Mme Anne TESSIER, Professeur à la Faculté des Sciences de Santé de Dijon, et à Mme Isabelle MARGAILL, Professeur à la Faculté de Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Paris 5 qui ont accepté d'être membres de mon comité de suivi de thèse et qui ont suivi avec intérêt l'évolution de mon travail durant ces trois années.

A M. Claude MOSSIAT, Ingénieur à la Faculté des Sciences de Santé de Dijon, je vous remercie de m'avoir formée aux techniques expérimentales et pour vos précieux conseils.

A toutes les personnes du laboratoire INSERM U1093. Je les remercie pour tous les moments passés ensemble, pour leurs conseils et leurs aides : Pr.Philippe Garnier, Marion Rodier, Alice Monnier-Picard, Martin Pedard, Nicolas Pernet... et un merci tout particulier à Aurore Quirié, pour m'avoir soutenue durant les moments difficiles de cette thèse et quand le moral était au plus bas. Merci pour ton réconfort et ton amitié précieuse.

J'ai une pensée énorme pour ma famille qui, malgré la distance qui nous sépare, a une grande place dans mon cœur et dans mon esprit.

A ma sœur Ghizlane qui m'a toujours soutenue et était là pour m'insuffler de la bonne humeur et de la gaieté.

A mes enfants, Farah et Zakaria, que j'aime profondément et que je remercie pour leur patience et leur réconfort devant l'investissement que le travail de thèse nécessite. Vous êtes ma source d'énergie et les deux soleils qui illuminent ma vie. A Saïd, qui partage ma vie.

Je remercie enfin ma mère et mon père, Badia et Mohamed. Merci de m'avoir transmis le goût du travail bien fait, le sérieux et merci pour vos encouragements pour toujours aller de l'avant. C'est tout naturellement que je vous dédie ce travail de thèse.



## Résumé

La pratique régulière d'une activité physique (AP) est un important message de santé publique. L'AP améliore non seulement la santé cardiovasculaire via l'augmentation de la production de NO (nitric oxide) par l'endothélium vasculaire mais aussi la santé cérébrale via l'augmentation des taux de BDNF (brain-derived neurotrophic factor) dans le cerveau. Comme la synthèse et la sécrétion de BDNF sont proportionnelles à l'activité neuronale, il est généralement admis que l'élévation des taux cérébraux de BDNF induite par l'AP est à relier à l'hyperactivité neuronale. Nous avons testé l'hypothèse selon laquelle l'élévation du flux sanguin dans les vaisseaux de la circulation cérébrale pendant la réalisation de l'AP contribue à augmenter les taux cérébraux de BDNF.

Les expériences ont été menées chez des rats soumis ou non à l'AP (tapis roulant). Nos résultats montrent : 1) que l'augmentation des taux de BDNF induite par l'AP (tapis roulant, 18m/min, 30 min/j, 7j consécutifs) est moindre lorsque l'augmentation du flux sanguin pendant la réalisation de l'AP, est prévenue par un clampage mono- ou bi- carotidien, 2) que l'effet de l'AP sur les taux de BDNF dépend de l'intensité de l'AP ( tapis horizontal *versus* déclive descendant), 3) que la dysfonction endothéliale (modèle de rat spontanément hypertendu) et le traitement par un inhibiteur de NO synthase diminuent les effets de l'AP sur les taux cérébraux de BDNF et 4) qu'il existe une association positive entre les taux cérébraux de BDNF et la production de NO par l'endothélium vasculaire.

L'ensemble de nos résultats suggère que l'augmentation des taux cérébraux de BDNF induite par l'AP met en jeu l'augmentation du flux sanguin dans les vaisseaux de la circulation cérébrale et, plus précisément, l'augmentation de la production endothéliale de NO qui en résulte. Ils fournissent de nouvelles données pour comprendre le lien existant entre fonction endothéliale et performances cognitives, soulevant l'idée selon laquelle les modalités d'AP pour améliorer la santé cérébrale doivent être différentes en cas de pathologies associées à une dysfonction endothéliale.

**Mots clés :** BDNF, Activité physique, Hémodynamique cérébrale, Endothélium

## Abstract

The regular practice of physical activity (PA) is an important public health message. PA not only improves cardiovascular health through the increase in NO (nitric oxide) production by the vascular endothelium but also through the increase levels in brain BDNF (brain-derived neurotrophic factor) levels. As the synthesis and secretion of BDNF are proportional to neuronal activity, it is generally accepted that PA-induced brain BDNF levels elevation is linked to neuronal hyperactivity. We tested the hypothesis that the increase in blood flow in cerebrovasculature during PA contributes to increase brain BDNF levels.

The experiments were carried out in sedentary and trained rats (treadmill). Our results show that: 1) brain BDNF levels elevation induced by PA (treadmill, 18m /min, 30 min /day, 7 consecutive days) is lower when the normal rise of cerebral blood flow during the PA is prevented by occluding one or both common carotid arteries, 2) the effect of PA on brain BDNF levels is dependent on PA intensity (horizontal versus downhill), 3) the presence of endothelial dysfunction (spontaneously hypertensive rat model) as well as NO synthase inhibition decrease the effects of PA on brain BDNF levels and 4) there is a positive association between brain BDNF levels and vascular endothelium NO production .

Collectively, our results suggest that increase in brain BDNF levels, induced by PA, involves increase in cerebrovasculature blood flow and more precisely elevation in endothelium NO production. They provide new data for understanding the relationship between endothelial function and cognitive performance, raising the idea that PA modalities to improve brain health might be different in pathologies diseases with endothelial dysfunction.

**Keywords:** BDNF, Physical Activity, cerebral hemodynamics, endothelium

## Table des matières

<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>p 11</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>p 14</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>p 16</b>
<b><i>Première partie : État de l'art et Objectifs</i></b> .....	<b>p 19</b>
<b>I. La vascularisation du cerveau</b> .....	<b>p 20</b>
1. L'apport artériel.....	p 20
2. Le retour veineux.....	p 22
<b>II. L'innervation des vaisseaux cérébraux</b> .....	<b>p 23</b>
1. Le système nerveux extrinsèque.....	p 23
2. Le système nerveux intrinsèque.....	p 23
<b>III. Le débit sanguin cérébral</b> .....	<b>p 25</b>
1. Les déterminants du débit sanguin cérébral.....	p 25
2. Le contrôle des résistances vasculaires cérébrales.....	p 26
a. Le facteur métabolique.....	p 26
i. <i>Le couplage neurovasculaire</i> .....	p 26
ii. <i>La vasodilatation dépendante du flux</i> .....	p 29
iii. <i>La vasodilatation rétrograde propagée</i> .....	p 32
b. Le facteur humoral.....	p 33
i. $p_aCO_2$ .....	p 33
ii. $p_aO_2$ .....	p 34
iii. <i>adrénaline</i> .....	p 34
c. Le facteur myogène.....	p 35
d. Le facteur nerveux.....	p 35
i. <i>innervation extrinsèque</i> .....	p 35
ii. <i>innervation intrinsèque</i> .....	p 36
e. L'autorégulation cérébrale.....	p 36
<b>IV. Effets de l'activité physique sur le débit sanguin cérébral</b> .....	<b>p 38</b>
1. Élévation du DSC pendant l'activité physique.....	p 38
a. Études chez l'Homme.....	p 38



b.	Études chez l'animal.....	p 40
2.	Hyperactivité sympathique pendant l'activité physique.....	p 42
3.	Mécanismes impliqués dans l'élévation du débit sanguin cérébral.....	p 43
a.	Augmentation de l'activité neuronale.....	p 44
b.	Augmentation de la p <sub>a</sub> CO <sub>2</sub> .....	p 44
c.	Augmentation du débit cardiaque.....	p 44
<b>V.</b>	<b>Mécanismes impliqués dans les effets positifs de l'AP sur la santé cérébrale.....</b>	<b>p 45</b>
1.	Les mécanismes physiologiques.....	p 45
2.	Les mécanismes biochimiques.....	p 46
<b>VI.</b>	<b>Le BDNF.....</b>	<b>p 47</b>
1.	Historique.....	p 47
2.	Localisation cellulaire du BDNF cérébral.....	p 47
3.	Synthèse et sécrétion du BDNF.....	p 48
a.	Synthèse.....	p 48
b.	Sécrétion.....	p 49
4.	Les récepteurs au BDNF.....	p 50
5.	Comment l'activité physique augmente les taux cérébraux de BDNF ?.....	p 52
a.	Origine neuronale.....	p 52
b.	Origine périphérique.....	p 52
	<i>Objectifs</i> .....	p 54
	<b><u>Deuxième partie : Présentation des travaux</u>.....</b>	<b>p 56</b>
<b>I.</b>	<b>Première publication:</b>	
	<b>L'élévation des taux cérébraux de BDNF induite par l'activité physique est</b>	
	<b>réduite par une interruption unilatérale carotidienne chez le rat.....</b>	<b>p 57</b>
	Résumé des travaux.....	p 58
1.	Contexte et objectifs.....	p 58
2.	Protocole expérimental.....	p 58
3.	Principaux résultats.....	p 59
	Publication originale.....	p 60
<b>II.</b>	<b>Deuxième publication:</b>	

<b>Les taux cérébraux de BDNF sont dépendants du monoxyde d'azote dérivé de l'endothélium des vaisseaux cérébraux</b> .....	<b>p 68</b>
Résumé des travaux.....	p 69
1. Contexte et objectifs.....	p 69
2. Protocole expérimental.....	p 69
3. Principaux résultats.....	p 70
Publication originale.....	p 71
<b><i>Troisième partie : Discussion générale et Perspectives</i></b> .....	<b>p 72</b>
<b>I. Considérations méthodologiques</b> .....	<b>p 73</b>
1. Modèle d'entraînement physique.....	p 73
2. Dosage des protéines par la technique de Western blotting.....	p 75
3. Evaluation de la production de NO par l'endothélium des micro-vaisseaux cérébraux.....	p 75
<b>II. Contrôle des taux cérébraux de BDNF par le NO d'origine endothéliale</b> .....	<b>p 76</b>
<b>III. Type cellulaire répondant au NO d'origine endothéliale par une         augmentation de sa synthèse de BDNF</b> .....	<b>p 78</b>
<b>IV. Boucle hypothétique reliant hémodynamique et cognition</b> .....	<b>p 79</b>
<b>V. Les retombées de nos résultats</b> .....	<b>p 81</b>
<b>VI. Références bibliographiques</b> .....	<b>p 82</b>

## Liste des abréviations

aa : acides aminés  
ACA : artère cérébrale antérieure  
ACI : artère carotide interne  
ACP : artère cérébrale postérieure  
AMP : adénosine monophosphate  
AMPc : adénosine monophosphate cyclique  
AP : activité physique  
ARNm : acide ribonucléique messenger  
ATP : adénosine tri phosphate  
AV : artère vertébrale  
BDNF : brain-derived neurotrophic factor  
BHE: barrière hématoencéphalique  
Ca<sup>2+</sup> : calcium  
CaM : calmoduline  
CGRP : calcitonin-gene-related peptide  
CHAPS : 3- [(3-cholamidopropyl) dimethylammonio] -1-propanesulfonate  
CO<sub>2</sub> : dioxyde de carbone  
CREB : cAMP response element binding protein  
DSC : débit sanguin cérébral  
eNOS/NOS : endothéliale NO synthase/ NO synthase  
ERK : extracellular signal-regulated kinase  
GABA : acide  $\gamma$ -aminobutyrique  
GMPc : guanosine monophosphate cyclique  
Gs: protéine G stimulatrice  
GTP : guanosine triphosphate  
(20) HETE : acide 20- hydroxyeicosatetraonique  
IGF-1 : Insulin-like Growth Factor-1  
Kir (canaux): inward rectifying K<sup>+</sup> channel  
L-NAME : N-nitro-L-arginine methyl ester  
MAP Kinases : mitogen-activated protein kinases  
MMP : matrix metalloproteinases  
NF- $\kappa$ B : nuclear factor-kappa B

NGF : nerve growth factor  
NMDA : N-méthyl-D-aspartate  
NO : nitric oxide (= monoxyde d'azote)  
O<sub>2</sub> : dioxygène  
p75<sup>NTR</sup> : pan 75 neurotrophin receptor  
PaCO<sub>2</sub> : pression partielle en dioxyde de carbone  
PAM : pression artérielle moyenne  
PaO<sub>2</sub> : pression partielle en dioxygène  
PC : proprotéines convertases  
PGI<sub>2</sub> : prostacycline  
PI3K : phosphatidylinositol 3-kinase  
PLC : phospholipase C  
PPC : pression de perfusion cérébrale  
RVC : résistances vasculaires cérébrales  
RVP(t) : résistances vasculaires périphériques (totales)  
Ser1177 : serine en position 1177 sur la protéine NOS  
Shc : Src homology 2/ $\alpha$ -collagen-related protein  
SHR: spontaneously hypertensive rat  
SS : shear stress  
TNF /TNF $\alpha$  : tumor necrosis factor (alpha)  
t-PA : tissue type plasminogen activator  
TrkB : tropomyosin-related kinase receptor type B  
TrkB -FL : tropomyosin-related kinase receptor type B (-Full length)  
TRPV4 : transient receptor potential vanilloide 4  
Val66Met : polymorphisme valine en position 66 methionine  
VRP : vasodilatation rétrograde propagée  
WKY : wistar kyoto rats



## Liste des figures

<b><u>Figure 1</u> : Organisation des artères cérébrales avec le polygone de Willis chez l'Homme (A) et chez le rat (B)</b>	<b>p 21</b>
<b><u>Figure 2</u> : De l'artère piale aux capillaires sanguins cérébraux</b>	<b>p 22</b>
<b><u>Figure 3</u> : Représentation schématique de l'innervation des vaisseaux cérébraux</b>	<b>p 24</b>
<b><u>Figure 4</u> : Relation entre la consommation régionale en O<sub>2</sub> et le DSC régional chez le rat</b>	<b>p 26</b>
<b><u>Figure 5</u> : Communication des astrocytes avec les cellules qui les avoisinent dans le parenchyme cérébral</b>	<b>p 27</b>
<b><u>Figure 6</u> : Localisation de la membrane gliale limitante</b>	<b>p 28</b>
<b><u>Figure 7</u> : Valeurs des forces de cisaillement exercées par le sang sur l'endothélium vasculaire</b>	<b>p 30</b>
<b><u>Figure 8</u> : Influence de la pression de perfusion cérébrale sur le débit sanguin cérébral et les résistances vasculaires cérébrales</b>	<b>p 37</b>
<b><u>Figure 9</u> : Mécanismes conduisant à l'hyperactivité sympathique pendant la réalisation d'une activité physique</b>	<b>p 42</b>
<b><u>Figure 10</u> : Mécanismes impliqués dans l'augmentation du débit sanguin cérébral (DSC) lors de la réalisation d'une activité physique</b>	<b>p 43</b>
<b><u>Figure 11</u> : Structure du pré-proBDNF</b>	<b>p 48</b>
<b><u>Figure 12</u> : Synthèse et sécrétion neuronale du BDNF</b>	<b>p 49</b>
<b><u>Figure 13</u> : Représentation schématique des récepteurs TrkB et p75<sup>NTR</sup></b>	<b>p 50</b>
<b><u>Figure 14</u> : Les voies de signalisation induites lors de l'interaction de BDNF sur son récepteur dimérisé TrkB-FL</b>	<b>p 51</b>
<b><u>Figure 15</u> : Boucle reliant hémodynamique cérébrale et cognition</b>	<b>p 80</b>

## Liste des tables

<b>Tableau 1 : DSC pendant la réalisation d'une activité physique chez l'animal</b>	<b>p 41</b>
---	-------------



# **Introduction**

---



## Introduction

Il y a plus de 2400 ans, Hippocrate écrivait «en cas de déficience en nourriture et en exercice, le corps tombera malade ». Désormais, les effets salutaires, sur la santé, de la pratique régulière d'une activité physique (AP) sont unanimement reconnus. Cependant, la démonstration des bénéfices cardiovasculaires de l'AP ne date que depuis plus d'un siècle et celle des bénéfices sur la santé cérébrale que depuis deux décennies: réduction du déclin cognitif associée à l'âge, effets antidépresseur, antipsychotique, anxiolytique, prévention des maladies neurodégénératives, réduction du déficit fonctionnel associé à l'accident vasculaire cérébral etc... Les travaux chez l'animal ont fourni des arguments forts en faveur du rôle incontournable de l'augmentation des taux cérébraux de BDNF (brain-derived neurotrophic factor) dans l'impact positif de l'AP sur la fonction cérébrale. Le BDNF est une neurotrophine fortement impliquée dans la synaptogenèse, la neurogenèse, la vasculogenèse qui exerce un rôle essentiel dans l'apprentissage, la mémoire et les capacités cognitives. Cependant, un point qui n'est pas travaillé concerne les mécanismes par lesquels l'AP augmente les taux de BDNF dans le cerveau. Or, l'identification de ces mécanismes est un prérequis à l'élaboration de recommandations concernant la posologie de l'AP (durée, intensité, fréquence des exercices). En effet, les recommandations actuelles restent vagues et ne prennent pas en considération l'état initial de la personne alors même que notre gouvernement envisage l'AP comme un médicament à part entière. Un amendement de la loi de santé permettant le remboursement des prescriptions de l'activité physique adaptée dans les pathologies chroniques a été voté en mars 2015 par les députés. Cependant, il a été rejeté par les sénateurs mais doit repasser en lecture devant l'assemblée nationale. De plus, l'identification des mécanismes qui sous-tendent l'effet procognitif de l'AP est une étape obligatoire dans la démarche visant à trouver des mimétiques de l'AP chez les patients présentant des incapacités motrices ou une insuffisance cardiaque.

La réalisation d'une AP s'accompagne d'une réponse cardiovasculaire caractéristique dominée par une augmentation du débit cardiaque et un détournement du sang vers les organes en hyperactivité que sont les muscles actifs, le cœur et le cerveau. Il est bien connu que l'augmentation du flux sanguin s'accompagne d'une surproduction de monoxyde d'azote (NO) par l'endothélium et que cette réponse de l'endothélium au flux est moindre en cas de dysfonction endothéliale. Par ailleurs, il existe un nombre croissant de travaux montrant un

lien entre endothélium et cognition. Ainsi, les capacités cognitives sont moindres en cas de situations associées à une dysfonction endothéliale comme l'hypertension, le diabète, le vieillissement, la polyarthrite rhumatoïde etc... De plus, la pratique régulière d'une AP améliore à la fois la fonction endothéliale et les capacités cognitives. L'ensemble de ces données nous a conduits à tester l'hypothèse selon laquelle l'augmentation des taux de BDNF dans le cerveau induite par l'AP impliquait l'augmentation du flux sanguin dans les vaisseaux de la circulation cérébrale, augmentation observée pendant la réalisation de chaque séance d'exercice.

Le document comprend 4 grandes parties :

- État de l'art et Objectifs
- Présentation de la 1<sup>ière</sup> publication
- Présentation de la 2<sup>ième</sup> publication
- Discussion générale et perspectives

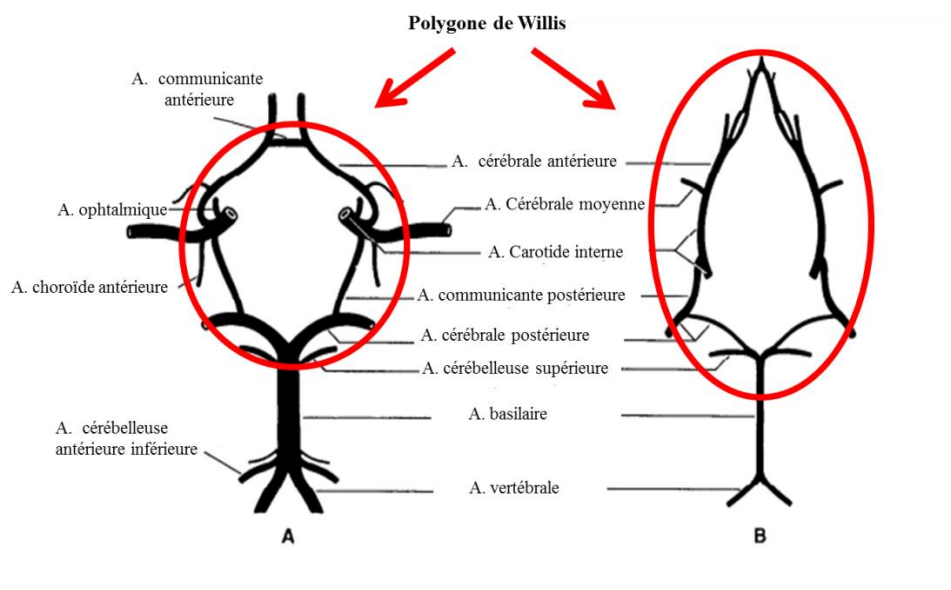
# **État de l'art et Objectifs**

## **I. Vascularisation du cerveau**

### **1. Apport artériel**

Le cerveau est le seul organe qui soit irrigué par 4 artères soulignant la dépendance majeure de la fonction du cerveau à son apport sanguin. Ces 4 artères, de localisation extra-crânienne, sont les 2 artères carotides internes (ACI) et les 2 artères vertébrales (AV). Il est à noter que chaque ACI et AV assure respectivement 40% et 10% de la perfusion totale du cerveau (Zauner & Muizelaar, 1997).

Chaque ACI naît de l'artère carotide commune au niveau de la 4<sup>ème</sup> vertèbre cervicale. A ce niveau, la commune donne en fait 2 branches : l'ACI qui irrigue le cerveau et l'artère carotide externe qui assure l'apport sanguin au tissu cutané de la tête. Les 2 ACI et les 2 AV vont se connecter au niveau du cercle ou polygone de Willis, un réseau vasculaire anastomosique qui permet la perfusion croisée des 2 hémicerveaux. De façon plus précise, les 2 AV fusionnent au niveau du tronc cérébral pour donner une artère unique de localisation intracrânienne, l'artère basilaire. Celle-ci donne naissance aux artères cérébrales postérieures (ACP) droite et gauche tandis que chaque ACI donne naissance à une artère cérébrale moyenne (ACM) et une artère cérébrale antérieure (ACA). Le polygone de Willis met en lien la perfusion sanguine des 2 hémicerveaux grâce à l'existence des petits vaisseaux appelés artères communicantes. Il s'agit des 2 artères communicantes postérieures reliant chacune ACP et ACI homolatérales et l'artère communicante antérieure reliant les 2 ACA. Il est important de noter qu'il existe une forte analogie de la circulation artérielle cérébrale entre l'Homme et le rat comme illustré dans la figure 1.



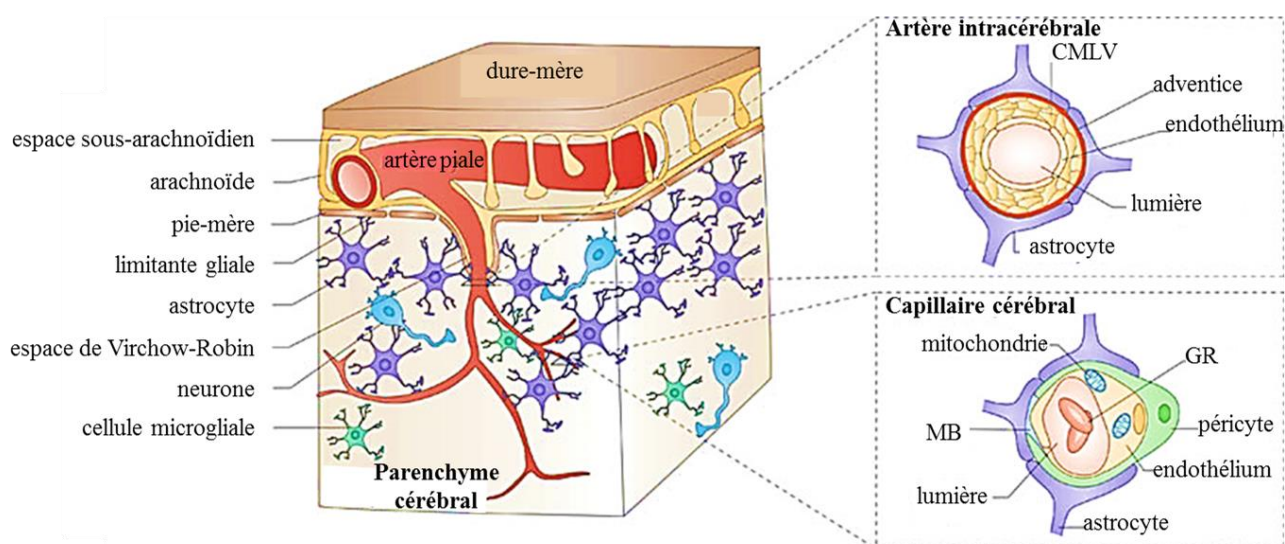
**Figure 1 : Organisation des artères cérébrales avec le polygone de Willis chez l'Homme (A) et chez le rat (B) (Lee, 1995).**

Le polygone de Willis permet évidemment de maintenir la perfusion du cerveau en cas d'occlusion des artères en amont du polygone de Willis. Cependant, il a été récemment proposé que le polygone pourrait également prévenir les dommages de la micro-vascularisation cérébrale et de la barrière hémato-encéphalique (BHE) induits par une élévation excessive de la pression artérielle (rôle tampon) (Vrselja *et al.*, 2014).

Les artères cérébrales se branchent aux artères piales (= artères leptoméningées). Ces dernières courent à la surface du cerveau et forment un important réseau vasculaire anastomosé qui permet de réduire la sévérité de l'ischémie de la portion corticale du cerveau en cas d'occlusion d'une artère située en aval du polygone de Willis. Les artères piales s'enfoncent dans le cerveau et prennent alors le nom d'artères perforantes. Ces perforantes sont situées dans l'espace de Virchow-Robin et s'engagent dans le parenchyme où elles donnent naissance aux artérioles intracérébrales (Iadecola, 2004). L'espace de Virchow-Robin est en fait l'espace virtuel rempli de liquide céphalorachidien situé entre la pie-mère (méninge qui épouse étroitement la surface du système nerveux cérébral) et la paroi de l'artère perforante (Drake & Iadecola, 2007) comme illustré dans la figure 2.

Chaque artériole intracérébrale donne naissance à un réseau capillaire. Les artérioles et les capillaires sont recouverts par les pieds astrocytaires. Au niveau des capillaires, les cellules endothéliales sont très proches des péricytes. Ces cellules sont capables de se contracter, et en

conséquence, de modifier le diamètre des capillaires, pourtant dépourvus de cellules musculaires lisses. Le couplage anatomique et fonctionnel existant entre les neurones, les cellules endothéliales et les astrocytes est à la base du concept d'unité neurogliovasculaire (del Zoppo & Mabuchi, 2003).



**Figure 2 : De l'artère piale aux capillaires sanguins cérébraux (Zlokovic, 2011) .**

*Les artères piales courent à la surface du crâne dans l'espace sous-arachnoïdien avant de s'enfoncer dans le parenchyme cérébral entourées de l'espace de Virchow-Robin. Les artères intracérébrales sont entourées de pieds astrocytaires, tout comme les capillaires. CMLV: cellule musculaire lisse vasculaire; GR: globules rouges; MB: membrane basale.*

## 2. Retour veineux

Le réseau veineux cérébral comporte un réseau veineux superficiel (veines corticales superficielles) et un réseau veineux profond (veines centrales). Les 2 réseaux collectent le sang dans les veines jugulaires internes après un relais dans les sinus veineux de la dure-mère. Le sang d'une jugulaire interne provient pour 70% de l'hémisphère ipsilatéral au vaisseau et pour 30% de l'hémisphère controlatéral (Zauner & Muizelaar, 1997). Le drainage veineux du cerveau est donc asymétrique. Le débit sanguin dans la veine jugulaire droite est estimé à 400 ml/min et celui dans la veine jugulaire gauche à 160 ml/min (Mehta *et al.*, 2000; Stoquart-Elsankari *et al.*, 2009).

## II. L'innervation des vaisseaux cérébraux

Les vaisseaux de la circulation cérébrale sont innervés par le système nerveux extrinsèque et le système nerveux intrinsèque comme illustrés dans la figure 3.

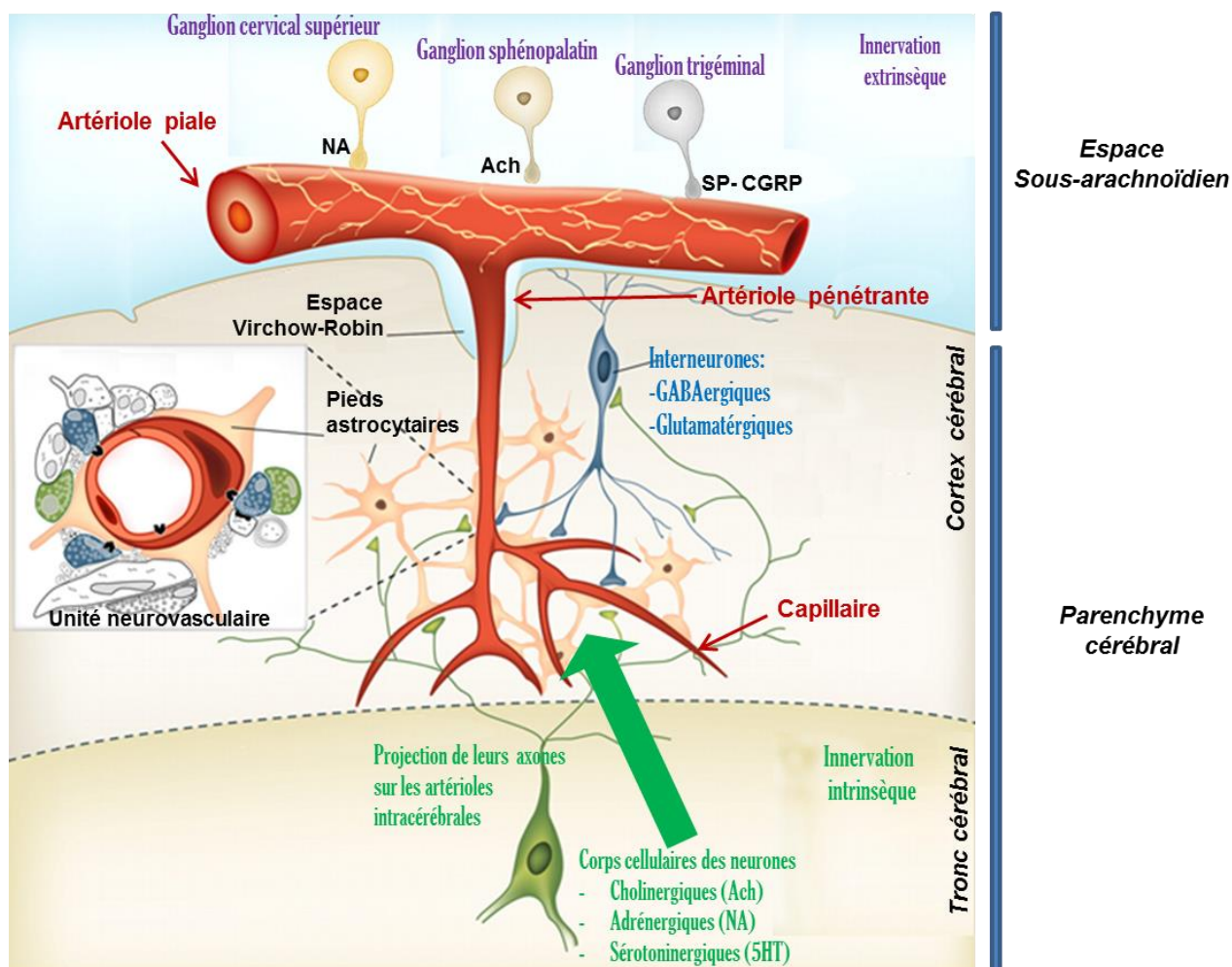
### 1. Le système nerveux extrinsèque

Le système nerveux extrinsèque comprend le système nerveux autonome (sympathique et parasympathique) et le contingent sensitif du nerf crânien V. Il assure l'innervation des artères cérébrales, des artères piales et des artères pénétrantes mais la densité de l'innervation décroît avec le calibre du vaisseau.

Les corps cellulaires des neurones postganglionnaires du sympathique, dont le neuromédiateur est la noradrénaline, sont localisés dans le ganglion cervical supérieur et ceux du parasympathique, dont le neuromédiateur est l'acétylcholine, dans le ganglion sphéno-palatin. Il a été montré que l'innervation sympathique était plus dense pour les vaisseaux de la circulation carotidienne que ceux de la circulation vertébrale (Kobayashi *et al.*, 1981). Concernant l'innervation par le nerf crânien V (nerf trijumeau) des vaisseaux extracérébraux, il s'agit d'une innervation par des nerfs sensitifs qui libèrent, par un réflexe d'axone, la substance P et le CGRP (Calcitonin-Gen-Related Peptide) dans la paroi vasculaire (voir figure 3).

### 2. Le système nerveux intrinsèque

Contrairement au système précédent, les corps cellulaires des neurones du système nerveux intrinsèque sont situés dans le tronc cérébral et leurs axones projettent sur les artérioles intracérébrales et plus exactement sur les pieds astrocytaires. Il s'agit de neurones cholinergiques dont les corps cellulaires sont situés dans le noyau basal de Meynert, de neurones noradrénergiques dont les corps cellulaires sont situés dans le locus coeruleus et de neurones sérotoninergiques dont les corps cellulaires sont situés dans le nucleus raphé. Ces neurones semblent projeter exclusivement sur les artérioles du cortex cérébral. A cette innervation originaire du tronc cérébral, il faut ajouter celle dévolue à des interneurones GABAergiques et glutamatergiques qui innervent les artérioles intracérébrales (Drake & Iadecola, 2007) comme illustré dans la figure 3.



**Figure 3: Représentation schématique de l'innervation des vaisseaux cérébraux. Adapté de (Hamel, 2006).**

*L'innervation extrinsèque des vaisseaux cérébraux qui courent à la surface de la pie-mère a pour origine le ganglion cervical supérieur (neurones libérant de la noradrénaline (NA)); le ganglion sphéno-palatin (neurones libérant de l'acétylcholine (Ach) et le ganglion trigéminal (neurones libérant la substance P (SP) et le calcitonin gene-related peptide (CGRP)). Les microvaisseaux corticaux sont innervés par le système nerveux intrinsèque qui a son origine dans le tronc cérébral (corps cellulaires des neurones cholinergiques, noradrénergiques et sérotoninergiques). On note également la présence d'interneurones GABAergiques et glutamatergiques à projection vasculaire. A gauche est représentée l'unité neurovasculaire, avec la cellule endothéliale (en orange) entourée des pieds astrocytaires (en beige) et d'un péricyte (en rouge), ainsi que des neurones.*



### III. Le débit sanguin cérébral

Alors que le cerveau humain ne représente que 2% de la masse du corps, il consomme au repos environ 20% de l'oxygène total utilisé par l'organisme soit 50 ml/min, ce qui fait de lui l'un des organes ayant le plus fort métabolisme. Comme les réserves énergétiques sont quasi inexistantes dans le cerveau, le débit sanguin cérébral (DSC) doit en permanence s'adapter à la demande métabolique, c'est-à-dire à l'activité neuronale. Au repos, le DSC est d'environ 700 ml/min soit 50 ml/min/100g de tissu cérébral, avec des valeurs plus élevées pour la substance grise que pour la substance blanche.

#### 1. Les déterminants du débit sanguin cérébral

Le débit sanguin cérébral se définit par la formule :

$$\text{DSC} = \text{pression de perfusion cérébrale} / \text{résistances vasculaires cérébrales}$$

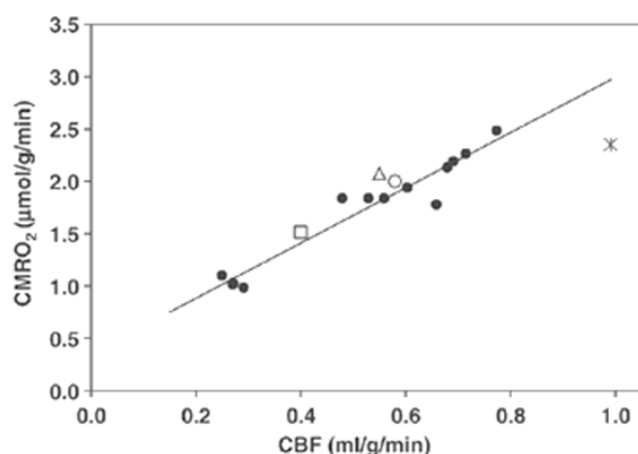
La pression de perfusion cérébrale est égale à la pression artérielle moyenne (PAM) auquel il faut retrancher la somme « pression veineuse + pression intracrânienne (pression exercée par les composants liquidiens sur la dure-mère) ». Sachant que la PAM est égale au produit du débit cardiaque par les résistances vasculaires périphériques totales (RVPT), il est évident que le DSC dépend du débit cardiaque. Au repos, le DSC est égale à 15% du débit cardiaque. Si l'on néglige les pressions veineuse et intracrânienne, le DSC devient égal au rapport PAM / RVC (résistances vasculaires cérébrales). Les RVC sont proportionnelles à la viscosité du sang et au diamètre interne des vaisseaux de résistance. A viscosité sanguine constante, les déterminants du DSC sont donc la PAM et le diamètre interne des vaisseaux de résistance. Il s'agit de l'ensemble des vaisseaux intracrâniens (capillaires sanguins cérébraux exclus). En effet, contrairement aux autres organes, où les vaisseaux en dehors de l'organe sont des vaisseaux de conductance, les vaisseaux situés à l'extérieur du cerveau mais intracrâniens (artères cérébrales, artères piales et pénétrantes, artérioles) sont des vaisseaux de résistance et donc impliqués dans le contrôle de l'apport sanguin au parenchyme cérébral.

## 2. Le contrôle des résistances vasculaires cérébrales

Les RVC sont influencées par les 4 mêmes facteurs que ceux qui contrôlent les résistances vasculaires périphériques totales. Il s'agit des facteurs : métabolique, nerveux, myogène et humoral. Cependant, pour les RVC, le facteur métabolique joue un rôle majeur.

### a. Le facteur métabolique

Le facteur métabolique correspond au contrôle du DSC par l'activité neuronale. Il explique la relation linéaire existant entre le DSC local et la consommation en glucose ou la consommation en dioxygène ( $O_2$ ) de la région considérée comme illustré dans la figure 4. Ce couplage débit/métabolisme inclut 3 processus: le couplage neurovasculaire, la vasodilatation dépendante du flux et la vasodilatation rétrograde propagée (Iadecola, 2004).



**Figure 4:** Relation entre la consommation régionale en  $O_2$  ( $CMRO_2$ ) et le DSC ( $CBF$ ) régional chez le rat. (Zhu et al., 2007).

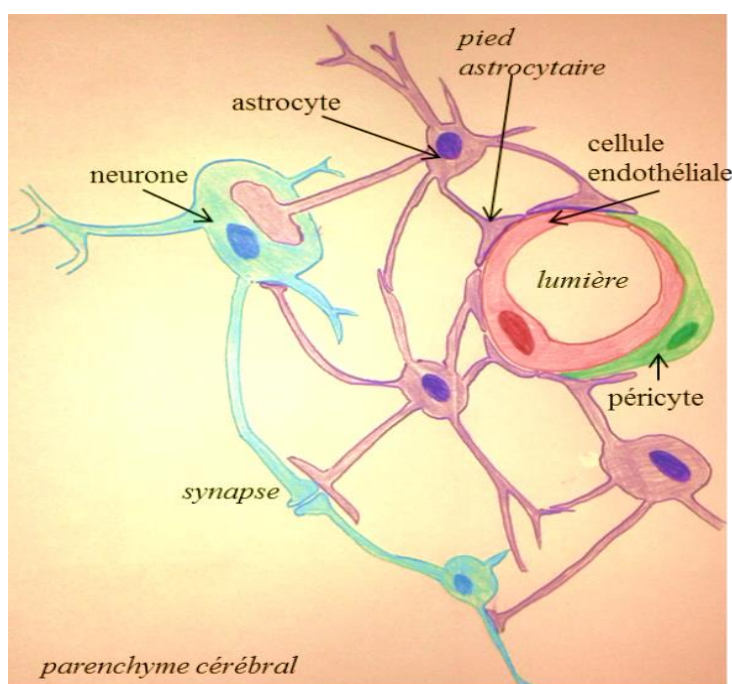
### i. le couplage neurovasculaire

Le couplage neurovasculaire, encore appelé hyperhémie fonctionnelle, met en lien l'activité des neurones et le DSC régional. En d'autres termes, c'est l'activité des neurones c'est-à-dire leurs besoins en nutriments (glucose, dioxygène...) qui contrôle instantanément le diamètre des artérioles cérébrales (Girouard & Iadecola, 2006). Les mécanismes qui sous-

tendent le couplage neurovasculaire sont mal connus. Cependant, il est généralement admis que l'activité neuronale produit des métabolites vasodilatateurs dont l'adénosine, le NO (origine neuronale) et le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>). Cependant, comme les pieds astrocytaires sont à l'interface entre les neurones et les artérioles, différents travaux se sont intéressés au rôle des astrocytes dans le couplage neurovasculaire et ont fait l'objet de 2 revues récentes (Dunn & Nelson, 2014; Howarth, 2014) que nous nous proposons de résumer.

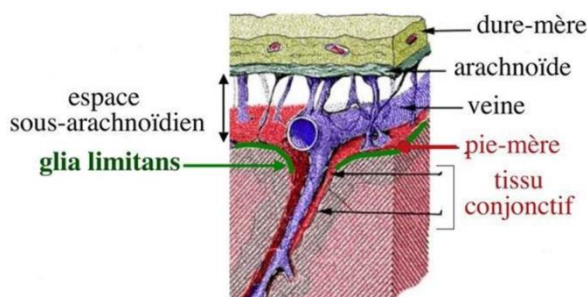
Pour comprendre l'implication potentielle des astrocytes dans le couplage neurovasculaire, il faut rappeler les 2 grandes localisations des astrocytes.

- Les astrocytes du parenchyme cérébral qui sont en contact non seulement avec l'endothélium des artérioles intra-parenchymateuses et des capillaires cérébraux mais aussi avec les neurones et les astrocytes environnants. La figure 5 montre qu'un seul astrocyte est capable de communiquer avec de nombreux types cellulaires, la communication étant assurée par des jonctions communicantes.



**Figure 5 : Communication des astrocytes avec les cellules qui les avoisinent dans le parenchyme cérébral.**

- Les astrocytes qui tapissent la surface piale du cerveau et forment la membrane gliale limitante. Ils sont situés à l'interface avec les artérioles piales et les neurones corticaux comme le montre la figure 6.



**Figure 6 : Localisation de la membrane gliale limitante (=glia limitans).**

Quelle que soit leur localisation, il est admis que les astrocytes répondent à l'hyperactivité neuronale par une augmentation de leur concentration cytosolique en calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) et que ce  $\text{Ca}^{2+}$  est à l'origine de la vasodilatation. Le  $\text{Ca}^{2+}$  active la phospholipase  $\text{A}_2$  d'où la production de différents médiateurs vasorelaxants à partir de l'acide arachidonique (prostaglandine  $\text{E}_2$ , les acides epoxyeicosatriénoïques). Ces médiateurs sont sécrétés par les pieds astrocytaires et diffusent en direction du muscle lisse artériolaire. Il en résulte une activation des canaux potassiques des cellules musculaires lisses, d'où leur hyperpolarisation et leur relaxation (via l'activation des canaux  $\text{Kir}$ ). Le  $\text{Ca}^{2+}$  peut également activer des canaux potassiques dépendants du  $\text{Ca}^{2+}$  de l'astrocyte et induire, via une augmentation de la concentration extracellulaire du potassium, une hyperpolarisation des cellules musculaires lisses et donc leur relaxation. L'acide arachidonique peut également être sécrété par l'astrocyte et transformé par les cellules musculaires lisses en acide 20-hydroxyeicosatetraénoïque (20-HETE), un composé qui inhibe leurs flux potassiques et exerce un effet vasoconstricteur. En conséquence, l'élévation de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  peut conduire à un effet vasodilatateur ou vasoconstricteur en fonction de la voie de signalisation dominante. Cependant la contribution des astrocytes à la régulation du DSC *in vivo* est largement controversée. En effet, il n'est pas certain que la réponse calcique des astrocytes soit suffisamment rapide pour être impliquée dans le couplage neurovasculaire. On peut mentionner ici que les 2 principaux médiateurs, d'origine neuronale, reconnus capables d'induire l'élévation de la concentration astrocytaire en calcium, sont l'ATP (adénosine triphosphate) et le glutamate.

Des travaux récents (Kim *et al.*, 2015), conduits sur un modèle où les artérioles intracérébrales sont perfusées et pressurisées directement sur des coupes de cerveau viennent de montrer que l'augmentation du flux intravasculaire induisait une vasoconstriction. Ainsi les astrocytes sont capables non seulement de contrôler la vasomotricité (communication dans le sens astrocytes vers artérioles) mais aussi de répondre aux changements hémodynamiques (communication dans le sens artérioles-astrocytes). Là encore, les mécanismes impliqués restent à confirmer : augmentation de la concentration calcique et ATP astrocytaire, activation des récepteurs TRPV4 (transient receptor potential vanilloïde 4).

Enfin, même si les médiateurs biochimiques et cellulaires du couplage neurovasculaire restent à définir de façon plus précise, il faut retenir que ce couplage ne fait pas intervenir les cellules endothéliales. En revanche, l'hyperhémie induite par l'activité neuronale va induire de « façon automatique » une vasodilatation supplémentaire via 2 processus qui sont la vasodilatation dépendante du flux et la vasodilatation rétrograde propagée. Ces 2 processus sont nécessaires pour satisfaire l'augmentation des besoins métaboliques. En d'autres termes, il existe une réponse coordonnée de la vasomotricité entre les microvaisseaux (artérioles intracérébrales) et les artères nourricières (Zonta *et al.*, 2003; Mulligan & MacVicar, 2004).

### *ii. la vasodilatation dépendante du flux*

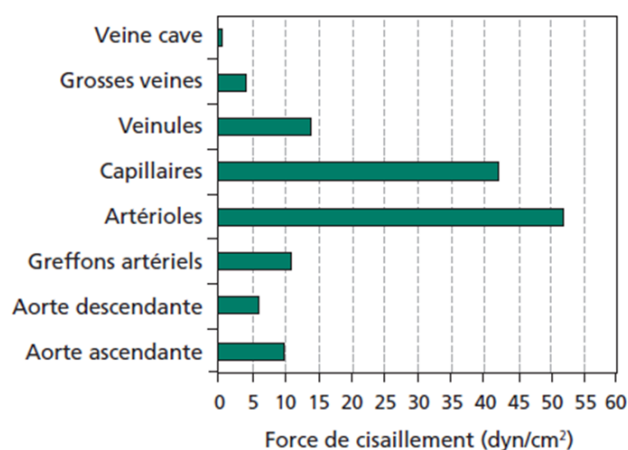
Il s'agit de la vasodilatation induite par une augmentation du débit sanguin dans le vaisseau lui-même et, plus précisément, de la vasodilatation induite par l'augmentation des forces de cisaillement exercées par le sang sur l'endothélium (shear stress en anglais, SS). Il s'agit de la force tangentielle provenant du frottement du sang qui se déplace sur la surface endothéliale et dont l'importance des effets a été identifiée pour la première fois par Caro et coll. (Caro *et al.*, 1969). Le SS (exprimé en dynes par unité de surface) est proportionnel à la viscosité du sang et au débit sanguin dans le vaisseau et inversement proportionnel au rayon vasculaire selon la formule suivante :

$$SS = 4 \eta Q / \pi r^3$$

$\eta$  = viscosité du sang,  $Q$  = débit sanguin dans le vaisseau,  $r$  = rayon du vaisseau

La vasodilatation dépendante du flux nécessite d'abord la détection par l'endothélium des modifications hémodynamiques puis la réponse de l'endothélium à ses modifications notamment la sécrétion de NO (Rees *et al.*, 1989) et, à moindre mesure, de la prostacycline (PGI<sub>2</sub>) (Grabowski *et al.*, 1985) et de l'activateur tissulaire du plasminogène (t-Pa) (Diamond *et al.*, 1990). Les mécanismes par lesquels les forces mécaniques sont converties en signaux biochimiques à l'intérieur des cellules endothéliales ne sont pas vraiment connus mais probablement multiples incluant des canaux ioniques, des récepteurs à activité tyrosine kinase, des récepteurs couplés à une protéine G, les cavéoles, des protéines d'adhérence, le glycocalyx (Lansman, 1988; Ando & Yamamoto, 2009). En tout cas, la vasodilatation dépendante du flux est un processus qui nécessite l'intégrité physique et fonctionnelle de l'endothélium. Ainsi, la vasodilatation dépendante du flux est altérée dans les pathologies associées à une dysfonction endothéliale comme l'hypertension artérielle, le diabète de type 2 et l'âge aussi bien chez l'Homme que chez l'animal et aussi bien à l'étage périphérique que cérébral. Dans ces situations, l'augmentation du DSC en réponse à l'hyperactivité neuronale sera moindre (Paniagua *et al.*, 2001; Henry *et al.*, 2004; de la Torre & Aliev, 2005; Guo *et al.*, 2010; Viboolvorakul & Patumraj, 2014).

*In vivo*, le débit sanguin dans un vaisseau diminue avec le calibre vasculaire mais le rayon chute plus vite que le débit. Aussi, c'est au niveau des artérioles et des capillaires sanguins que le SS est le plus élevé dans l'arbre vasculaire comme le montre la figure 7 (Rocca A *et al.*, 2007). Il est également plus élevé dans l'aorte que la veine cave. De façon importante, la vasodilatation dépendante du flux est une réponse quasi immédiate à l'élévation du SS (Lehoux *et al.*, 2006).



**Figure 7 : Valeurs des forces de cisaillement exercées par le sang sur l'endothélium vasculaire. (Rocca *et al.*, 2007).**

L'hypersécrétion de NO, en réponse au stimulus mécanique que représente le SS, est le résultat d'une activation de la NO synthase endothéliale (eNOS) d'une part et une induction de la synthèse de cette enzyme par l'endothélium d'autre part. L'activation de la eNOS est induite par la phosphorylation de l'enzyme Akt (serine/threonine kinase/protein kinase B) qui à son tour phosphoryle la eNOS sur la sérine en position 1177 (Dimmeler *et al.*, 1999). La eNOS phosphorylée sur la sérine en position 1177 produit 10 fois plus de NO que la forme non phosphorylée (Corson *et al.*, 1996). Sur le plan mécanistique, la phosphorylation augmente la sensibilité de l'enzyme au  $\text{Ca}^{2+}$  mais ne conduira à une augmentation de la production de NO que si l'enzyme est également déphosphorylée sur la thréonine en position 495. En effet, phosphorylée sur la thréonine 495, la calmoduline (protéine qui fixe le  $\text{Ca}^{2+}$ ) ne peut pas se fixer à l'enzyme (Davies *et al.*, 2013). Le NO d'origine endothéliale, diffuse dans les cellules musculaires lisses sous-jacentes où il active la guanylate cyclase soluble qui transforme la guanosine triphosphate (GTP) en guanosine monophosphate cyclique (GMP<sub>C</sub>), un second messenger qui induit un relâchement musculaire via l'activation de canaux potassiques (hyperpolarisation) suivi d'une inhibition des canaux calciques dépendants du potentiel.

Replacée dans le contexte du couplage DSC/métabolisme cérébral, la vasodilatation dépendante du flux a pour élément déclencheur l'augmentation du flux dans les artérioles cérébrales qui a été induite par l'hyperactivité neuronale. Cette vasodilatation supplémentaire qui fait suite au couplage neurovasculaire se manifeste en amont des artérioles cérébrales car, en aval, les vaisseaux sont des capillaires et ne peuvent pas se relâcher en réponse au NO.

Cependant, il faut souligner que les expériences sur vaisseaux cérébraux isolés (ACM, carotide) ont montré que la réponse vasculaire à une élévation du SS était très variable, une vasodilatation dépendante de l'endothélium (You *et al.*, 1997), une vasoconstriction indépendante de l'endothélium (Bryan *et al.*, 2001b) ou les 2 ayant été reportées (Shimoda *et al.*, 1996; Bryan *et al.*, 2001a). Toutefois, l'origine de la variabilité de la réponse n'est, à notre connaissance, pas comprise.

### *iii. la vasodilatation rétrograde propagée*

La vasodilatation rétrograde propagée (VRP) est l'un des éléments de la réponse vasculaire propagée. Par définition, la réponse vasculaire propagée est un phénomène initié par un stimulus local induisant une vasodilatation ou une vasoconstriction et qui se propage rapidement de façon bidirectionnelle de façon indépendante du flux et de l'innervation vasculaire. Ce phénomène, décrit par Segal et Duling en 1986, s'observe aussi bien au niveau des artérioles périphériques qu'au niveau de celles du cerveau et peut être étudié soit sur vaisseau isolé soit *in vivo* chez l'animal anesthésié (Segal & Duling, 1986).

La VRP est une vasodilatation qui se propage comme son nom l'indique dans le sens opposé au flux sanguin et qui en conséquence affecte les vaisseaux en amont du site d'initiation de la vasodilatation donc à distance du site de l'activation neuronale. Ce phénomène a été mis en évidence pour la première fois par Hilton qui a montré que la contraction du muscle soléaire s'accompagnait d'une augmentation de calibre de l'artère fémorale (Hilton, 1959). Plus tard, il a été montré que ce phénomène s'appliquait aux vaisseaux de la circulation cérébrale. Ainsi, la stimulation des vibrisses du rat conduit à une vasodilatation des artérioles piales situées bien en amont des artérioles présentes dans les aires corticales activées (Cox *et al.*, 1993; Erinjeri & Woolsey, 2002).

Les mécanismes qui sous-tendent la réponse vasculaire propagée sont de mieux en mieux compris pour les vaisseaux périphériques mais font encore l'objet de larges débats pour les vaisseaux cérébraux (Jensen & Holstein-Rathlou, 2013). La VRP est initiée par la vasodilatation induite par l'hyperactivité neuronale. L'augmentation du flux induit un courant hyperpolarisant longitudinal qui se propage des artérioles intracérébrales aux artères piales et même aux artères cérébrales. Il en résulte une chute des résistances vasculaires cérébrales d'où une augmentation du flux sanguin et une activation de la vasodilatation dépendante de l'endothélium. Il vient d'être élégamment démontré que l'endothélium était indispensable à la VRP (Chen *et al.*, 2015). En effet, les auteurs ont montré que la perturbation de l'endothélium cérébral (induite par une réaction photochimique localisée) annulait la VRP des artères piales pendant l'application d'un stimulus évoquant une hyperhémie fonctionnelle. Les mécanismes qui sous-tendent le courant hyperpolarisant associés à la VRP restent cependant flous. La communication intercellulaire médiée par les jonctions communicantes reliant les cellules endothéliales adjacentes d'une part et reliant les cellules endothéliales et les cellules



musculaires sous-jacentes (jonctions endothéliaux-musculaires) d'autre part semble être impliquée. Quelles que soient les voies de signalisation impliquées, la VRP pourrait expliquer pourquoi l'hyperactivité d'une région circonscrite du cerveau ne conduit pas à une hypoperfusion des régions non hyperactives, évitant ainsi leur souffrance neuronale.

En résumé, l'hyperactivité neuronale va conduire à une vasodilatation non seulement des artérioles (couplage neurovasculaire – endothélium indépendant) mais aussi des vaisseaux de résistances situées en amont (vasodilatation dépendante du flux et vasodilatation rétrograde propagée – dépendante de l'endothélium).

## **b. Le facteur humoral**

Le contrôle du DSC par le facteur humoral correspond à l'impact des substances circulantes sur le DSC. Parmi celles-ci, on peut citer les gaz du sang ( $\text{CO}_2$  et  $\text{O}_2$ ), l'adrénaline, l'angiotensine II et l'aldostérone. Cependant, ce sont aux variations de la pression partielle du sang artériel en  $\text{CO}_2$  ( $\text{paCO}_2$ ) que le DSC est le plus sensible.

### *i. paCO<sub>2</sub>*

La très forte sensibilité au  $\text{CO}_2$  de la vasomotricité est une caractéristique de l'ensemble des vaisseaux de la circulation cérébrale (des grosses artères extra-crâniennes jusqu'aux artérioles intra-parenchymateuses) et explique pourquoi la  $\text{paCO}_2$  est toujours contrôlée dans les études qui s'intéressent à la régulation du DSC.

La  $\text{paCO}_2$  est une constante physiologique dont la valeur normale est comprise entre 35 et 45 mmHg chez l'Homme. Il a été montré qu'une variation de 1 mmHg de la  $\text{PaCO}_2$  induisait une variation dans le même sens du DSC global de 1 à 2 ml/min/100g (Brian, 1998). Ainsi, une hypercapnie augmente le DSC et une hypocapnie le diminue. De façon importante, la réponse du DSC aux changements de  $\text{paCO}_2$  se manifeste en 30 secondes et est maximale en 2 minutes. Cependant, alors que la réponse à l'hypercapnie est indépendante du vaisseau, la réponse à l'hypocapnie est, quant à elle, plus marquée pour l'AV que pour l'ACI, l'ACM et l'ACA (Willie *et al.*, 2012).

L'effet vasodilatateur du  $\text{CO}_2$ , présent dans le sang est indépendant de son effet sur le pH sanguin (acidose) mais est à relier à la diffusion du  $\text{CO}_2$  dans la paroi des artères et à travers la

BHE. Le  $\text{CO}_2$  est ensuite hydraté en acide carbonique qui se décompose rapidement, grâce à la présence d'une anhydrase carbonique en ions  $\text{H}^+$  et  $\text{HCO}_3^-$ . L'acidose du secteur extracellulaire induit via une hyperpolarisation (activation de canaux potassiques) des cellules musculaires lisses d'où une réduction du flux calcique entrant à l'origine de la relaxation du vaisseau (Nelson & Quayle, 1995; Kitazono *et al.*, 1997; Battisti-Charbonney *et al.*, 2011). Ainsi, l'application de solutions hyper- et hypo-capniques non tamponnées sur le cerveau après réalisation d'une fenêtre crânienne induit respectivement une augmentation et une réduction du diamètre des artères piales (Kontos *et al.*, 1978). A l'inverse, si le pH est neutralisé, ces solutions sont dépourvues d'effet vasomoteur. Evidemment, l'effet vasodilatateur du  $\text{CO}_2$  va s'accompagner d'une vasodilatation dépendante du flux (dépendante de l'endothélium, dépendante du NO) expliquant pourquoi le NO a été impliqué dans l'augmentation du DSC global induit par l'hypercapnie.

### *ii. $p_a\text{O}_2$*

Les vaisseaux de la circulation cérébrale sont moins sensibles à la  $p_a\text{O}_2$  qu'à la  $p_a\text{CO}_2$  et les vaisseaux de la circulation carotidienne sont plus sensibles aux variations de  $p_a\text{O}_2$  que les vaisseaux de la circulation vertébrale (Willie *et al.*, 2012). Ainsi, une diminution de 1% de la saturation du sang en  $\text{O}_2$  (en isocapnie) entraîne une augmentation du DSC global de 0,5 à 2,5%. L'effet de l'hypoxémie sur le DSC se manifeste pour des valeurs de  $p_a\text{O}_2$  inférieures à 60 mmHg (c'est également le seuil qui déclenche l'hyperventilation). En revanche, le DSC est relativement insensible à l'hyperoxémie.

### *iii. adrénaline*

Un autre facteur humoral qui pourrait contrôler le DSC est l'adrénaline (Bolduc *et al.*, 2013). Cette hormone pourrait agir sur la face luminale des cellules endothéliales de l'arbre vasculaire cérébral et induire une vasodilatation via l'activation de récepteurs  $\beta$ -adrénergiques endothéliaux (récepteurs couplés à une protéine Gs) et la stimulation de la production de NO (phosphorylation de eNOS) qui en découle. Ainsi, l'hyperactivité sympathique qui accompagne la réalisation d'une AP pourrait exercer un effet vasodilatateur cérébral via la libération d'adrénaline par les médullosurrénales.

### c. Le facteur myogène

Le facteur myogène, connu aussi sous le nom d'effet Bayliss (Bayliss *et al.*, 1895) correspond à la réponse du muscle lisse vasculaire en réponse à un changement de pression intravasculaire. Selon cet effet, une augmentation de pression intravasculaire induit une vasoconstriction alors qu'une réduction exerce l'effet opposé. Ainsi, le débit sanguin d'un organe est relativement indépendant de la pression artérielle. Les mécanismes impliqués dans la réponse musculaire aux variations de pression intravasculaire sont relativement méconnus. L'augmentation de la pression intravasculaire serait détectée par des canaux TRP (transient receptor potential channel) des cellules musculaires lisses dont l'activation induirait une dépolarisation d'où l'ouverture des canaux calciques dépendant du potentiel et une augmentation de la concentration en  $Ca^{2+}$  à l'intérieur des cellules musculaires suffisante pour induire leur contraction (Earley *et al.*, 2004; Reading & Brayden, 2007).

### d. Le facteur nerveux

#### *i. innervation extrinsèque*

La régulation du DSC par le sympathique semble négligeable en conditions physiologiques (Harper *et al.*, 1972; Alm & Bill, 1973). En revanche, en cas d'hypertension artérielle, le sympathique (ganglion cervical supérieur) pourrait via l'activation des récepteurs  $\alpha_1$  vasculaires induire une vasoconstriction et protéger ainsi les vaisseaux intra-parenchymateux. En effet, la résection unilatérale du ganglion cervical supérieur pendant l'induction d'une hypertension conduit à une lésion des vaisseaux corticaux (ter Laan *et al.*; Heistad *et al.*, 1978; ter Laan *et al.*, 2013).

Les données concernant le contrôle du DSC par le parasympathique sont très limitées et les résultats dépendent de l'espèce considérée. Alors que le parasympathique induit une vasodilatation dépendante de l'acétylcholine chez le porc (activation de récepteurs muscariniques endothéliaux), la stimulation du parasympathique ou son inhibition est sans effet sur le DSC basal chez le rat (Pinard *et al.*, 1979). Chez l'Homme, le blocage systémique du parasympathique potentialise les effets de l'autorégulation cérébrale (Hamner *et al.*, 2012).

Enfin, concernant l'innervation vasculaire par le nerf crânien V, l'activation des fibres sensitives libère, par réflexe d'axone, au niveau de la paroi du vaisseau innervé la substance P et le CGRP. Il s'agit de neuropeptides vasodilatateurs impliqués dans la céphalée migraineuse. Leur effet sur DSC en l'absence de migraine n'est pas connu.

### *ii. innervation intrinsèque*

A notre connaissance, l'impact réel des interneurons glutamatergiques et GABAergiques sur le DSC reste à définir.

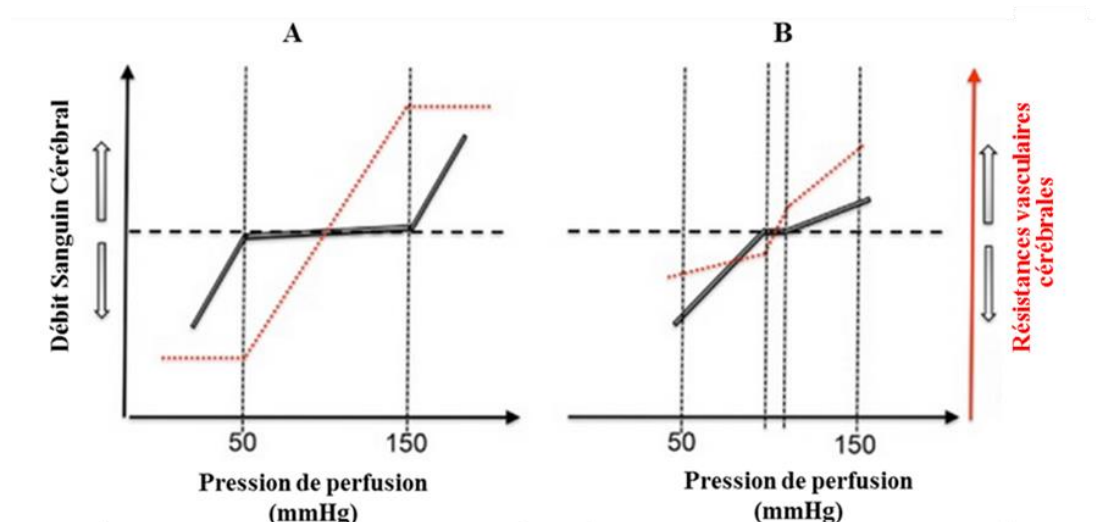
### **e. L'autorégulation cérébrale**

On entend par autorégulation cérébrale le fait que le DSC global est relativement indépendant de la PAM tant qu'elle reste comprise entre 50 et 160 mmHg. Cette notion a été proposée par Lassen en 1959 et est illustrée dans la figure 8A (Lassen, 1959). Cette figure a été construite à partir de 7 études incluant des patients dont la PAM était modifiée par un traitement pharmacologique ou une pathologie. Elle montre qu'en dessous de 50 mmHg et au-dessus de 160 mmHg, le DSC suit les valeurs de la PAM d'où, respectivement, un risque de souffrance neuronale et d'hémorragie cérébrale. En revanche, entre ces 2 bornes, le DSC global reste constant. Chez le rat, il a été montré qu'une augmentation de pression artérielle de 1 mmHg augmentait le DSC de 0,37% en tout cas pour des valeurs de PAM comprises entre 81 et 172 mmHg (Kontos *et al.*, 1978). Dans la même étude, les auteurs rapportent que les artères piales (diamètre de 37 à 59  $\mu\text{m}$ ) se dilatent quand la pression artérielle dépasse 170 mmHg et que les artères plus larges (diamètre de 117 à 174  $\mu\text{m}$ ) ne changent pas de calibre (même quand la pression artérielle atteint 190 mmHg).

Les mécanismes qui sous-tendent l'autorégulation cérébrale ont fait l'objet de nombreux travaux (Ogoh, 2008; Ainslie & Brassard, 2014) dont de belles revues (Ide & Secher, 2000; Querido & Sheel, 2007; Secher *et al.*, 2008; Ogoh & Ainslie, 2009; Seifert & Secher, 2011) et font encore débat. Il est cependant admis que le facteur myogène et le facteur nerveux extrinsèque (sympathique et parasympathique) contribuent à l'autorégulation avec une importance relative de ces facteurs qui diffère entre les espèces animales et le vaisseau considéré (Ainslie & Brassard, 2014). Chez l'Homme, il vient d'être montré que le

facteur myogène et le facteur nerveux extrinsèque (sympathique et parasympathique) expliquaient à eux deux 62% de la relation existant entre la pression artérielle et le flux sanguin dans l'ACM (Hamner & Tan, 2014).

Toutefois, la relative indépendance du DSC global aux changements de PAM a été récemment remise en cause par Willie *et al.* (2014). Les auteurs, qui ont analysé 41 études conduites chez des patients sains, montrent que la pente de la relation existant entre les variations de DSC et les variations de PAM (exprimées en pourcentage) était de 0,81 pour l'hypertension et seulement 0,2 pour l'hypotension. Ces données indiquent que le DSC est bien plus sensible aux variations de PAM que ce qui est généralement indiqué dans les livres de physiologie (Willie *et al.*, 2014). La Figure 8B montre que le DSC change dès que la PAM passe sous 90 mmHg et au-dessus de 110 mmHg.



**Figure 8:** Influence de la pression de perfusion cérébrale sur le débit sanguin cérébral et les résistances vasculaires cérébrales. A) données classiques, B) nouvelles données (Willie *et al.*, 2014).

En fait, l'autorégulation cérébrale serait sensible non pas uniquement aux valeurs de PAM mais surtout à la vitesse du changement de ces valeurs (Tan, 2012) d'où la notion d'autorégulation cérébrale statique (modification durable de la PA) et d'autorégulation cérébrale dynamique (modification transitoire de la PA).

## IV. Effets de l'activité physique sur le débit sanguin cérébral

Il faut différencier les modifications du DSC de repos, induites par un entraînement physique (répétitions régulières de sessions d'exercice) des modifications du DSC observées pendant la réalisation de chaque exercice.

Concernant l'effet de l'entraînement physique, les études précliniques (Swain *et al.*, 2003; Ding *et al.*, 2006; Rhyu *et al.*, 2010; Viboolvorakul & Patumraj, 2014) et cliniques (Murrell *et al.*, 2013) s'accordent à montrer que l'entraînement physique d'une durée suffisante (3 à 10 semaines) conduit à une élévation du DSC de repos. Cette amélioration de l'apport sanguin au cerveau à l'état basal s'explique pour l'essentiel par une stimulation de l'angiogenèse (formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants). Dans notre travail, la durée du protocole d'AP a été limitée à 7 jours. Aussi, nous ne développerons que les études s'intéressant aux modifications du DSC observées pendant la réalisation d'un exercice.

### 1. élévation du DSC pendant l'activité physique

#### a. Études chez l'Homme

Les premières études consacrées à la mesure du DSC global pendant la réalisation d'un exercice utilisaient des mesures s'appuyant sur le principe de Kety et Schmidt qui fait appel à des dosages dans le sang artériel et dans le sang de la jugulaire (Kety & Schmidt, 1948). Elles ont unanimement conclu que le DSC global n'augmentait pas pendant la réalisation de l'AP (Scheinberg *et al.*, 1954; Madsen *et al.*, 1993; Ide & Secher, 2000; Querido & Sheel, 2007; Sato & Sadamoto, 2010), idée actuellement largement répandue. Cependant, les résultats se basant sur le principe de Kety et Schmidt étaient entachés d'erreurs pour trois raisons :

- la veine jugulaire interne est collapsée pendant les exercices réalisés en position debout
- le retour veineux met également en jeu les veines spinales
- le drainage du cerveau par les veines jugulaires est asymétrique, or le sang est prélevé au niveau d'une seule jugulaire.

Actuellement, les spécialistes du sujet s'accordent à penser que le DSC global augmente pendant la réalisation d'une AP à la condition que celle-ci sollicite une masse musculaire suffisante ou qu'elle soit d'intensité suffisante (Ide *et al.*, 1998).

La mesure du DSC pendant la réalisation d'une AP fait souvent appel aujourd'hui, au couplage de la débitimétrie doppler et de l'échographie. La première mesure la vitesse du sang dans le vaisseau et la seconde le diamètre du vaisseau « sondé ». Ces 2 paramètres permettent la mesure du débit sanguin qui est égal au produit (vitesse du sang dans le vaisseau)  $\times$  (surface de section du vaisseau). Pendant la contraction volontaire maximale de la main (activité de serrage), le flux augmente dans l'ACM controlatérale à la main active, effet associé à une augmentation du DSC global de 12,5% et à une augmentation de la saturation du sang veineux jugulaire en O<sub>2</sub> (Fisher *et al.*, 2013) indiquant que l'apport sanguin dépasse les besoins métaboliques. Pendant une activité de pédalage, le débit sanguin augmente de façon bilatérale dans les vaisseaux de la circulation vertébrale (artères vertébrales, basilaire et cérébrale postérieure) et dans ceux de la circulation carotidienne (artères carotides communes et internes, cérébrales antérieures et moyennes), indiquant que le DSC augmente de façon globale pendant l'AP. Il est important de préciser que pour des AP dynamiques de 30, 50 et 70% de la consommation maximale en O<sub>2</sub>, l'augmentation du débit dans les vaisseaux de la circulation cérébrale est proportionnelle à l'intensité de l'AP. En revanche pour des AP plus intenses, il n'y a pas d'augmentation supplémentaire du DSC global voire une diminution. Les raisons sont présentées plus loin.

Enfin, la circulation vertébrale répond plus que la circulation carotidienne à l'AP. Ainsi, l'augmentation du flux sanguin induite par une activité de pédalage (sur cycloergomètre) à 70% de la consommation maximale en O<sub>2</sub> est plus élevée dans les artères vertébrales (AV) que les artères carotides internes (ACI) (+40% vs + 15%) (Sato *et al.*, 2011). Les mécanismes à l'origine de cette réponse différentielle entre les circulations carotidienne et vertébrale restent hypothétiques. Il est possible que les besoins métaboliques des régions irriguées par la circulation vertébrale (cervelet, tronc cérébral, moelle épinière) soient supérieurs aux besoins des régions irriguées par la circulation carotidienne. Une autre explication est une différence de réponse aux mécanismes d'autorégulation cérébrale et/ou aux agents vasomoteurs entre l'AV et l'ACI. En effet, l'AV est plus sensible à l'hypoxie et à l'hypocapnie que l'ACI, l'ACM et l'ACP (Willie *et al.*, 2012). Ainsi, aux exercices intenses,

l'augmentation de débit dans l'ACI impliquerait uniquement une élévation de la vitesse du sang alors que l'augmentation de débit dans l'AV mettrait également en jeu une augmentation de son diamètre.

L'utilisation de la technique de tomographie par émission de positons ( $H_2O^{15}$ ) pour mesurer les DSC global et régional a également conclu à une augmentation du DSC global pendant la réalisation d'une activité de pédalage (Hiura *et al.*, 2014). Les auteurs rapportent une augmentation du DSC global (+28%) à la 5<sup>ème</sup> min mais pas à la 15<sup>ème</sup> min alors que la réponse cardiovasculaire à l'AP (pression artérielle, débit cardiaque, consommation en  $O_2$ ) est la même aux 2 temps. Cette discordance suggère l'absence de lien entre DSC global et réponse cardiovasculaire à l'exercice. En revanche, aux 2 temps le débit est augmenté dans le cortex sensorimoteur représentatif des membres inférieurs et le cervelet alors que le débit n'est augmenté qu'au temps précoce dans l'aire motrice supplémentaire et le cortex insulaire droit. Il a également été montré que le DSC global évalué par la consommation du cerveau en  $O_2$  augmentait de 12% pendant un exercice de serrage d'une main et de 21% lors d'une activité de pédalage (Fisher *et al.*, 2013).

### **b. Études chez l'animal**

Les études consacrées à la mesure du DSC pendant la réalisation de l'AP chez l'animal sont peu nombreuses et résumées dans le tableau 1. Dans ces études, le DSC est mesuré par différentes techniques: la technique des microsphères qui consiste à injecter par voie systémique des microsphères radiomarquées et à faire le rapport entre radioactivité du sang artériel et radioactivité du parenchyme cérébral, la technique à l'iodoantipyrine radiomarquée de principe similaire à la précédente et la débitmétrie doppler laser, la sonde étant implantée dans la structure cérébrale d'intérêt. Seule la dernière technique permet évidemment une mesure en continue du DSC régional, les 2 premières permettant quant à elles à la fois de mesurer le DSC régional et le DSC global. Concernant les modalités d'AP, il s'agit le plus souvent d'une activité sur tapis roulant qui présente l'intérêt de pouvoir maîtriser l'intensité et la durée de l'AP. Cependant, les publications sur le sujet ne précisent que très rarement l'intensité de l'AP en terme de consommation en  $O_2$ .

Le premier point à souligner est que peu d'études se sont intéressées à l'effet de l'AP sur le DSC global (Foreman *et al.*, 1976; Gross *et al.*, 1980; Parks & Manohar, 1983; Manohar,



1986) mais que toutes concluent à l'absence de modifications du DSC global. La majorité des études se sont focalisées sur les variations du débit sanguin régional. Elles rapportent une augmentation du DSC régional soit dans le cortex uniquement (Gross *et al.*, 1980; Kimura *et al.*, 1994), soit dans le cervelet uniquement (Foreman *et al.*, 1976; Pannier & Leusen, 1977; Parks & Manohar, 1983; Manohar, 1986), soit dans une multitudes de régions cérébrales (Holschneider *et al.*, 2003). Ainsi, il est souvent considéré que l'AP augmente le DSC uniquement dans les régions impliquées dans la motricité. Cependant, trois études ont rapporté grâce à la technique de débitmétrie doppler laser, une augmentation du débit sanguin dans l'hippocampe, lors d'une course sur tapis roulant chez le rat (Nakajima *et al.*, 2003; Nishijima & Soya, 2006; Nishijima *et al.*, 2012).

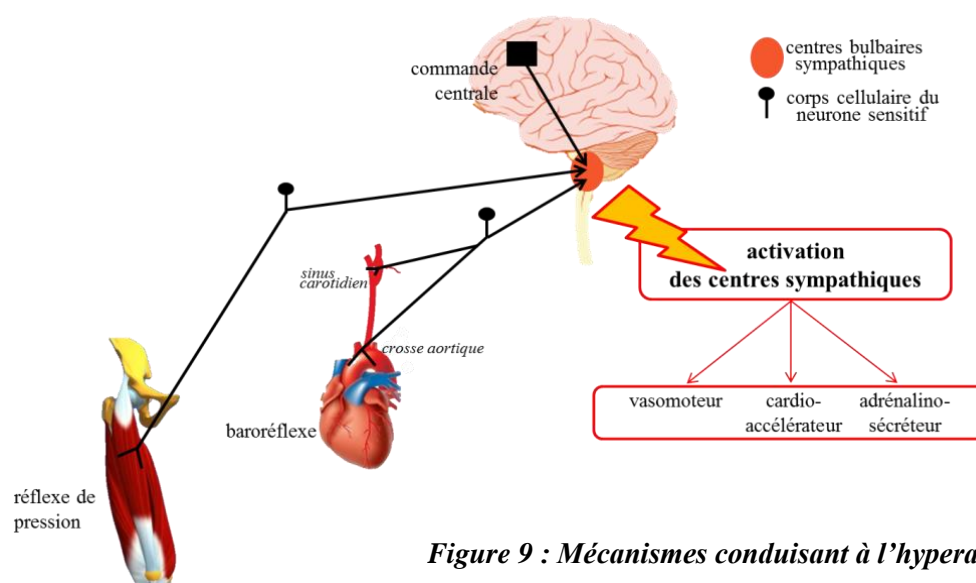
Auteurs	Animal	Type d'AP	Modalités d'exercice	Techniques d'analyses	DSC
Foreman DL <i>et al.</i> , 1976	Porc miniature	Tapis roulant	130 à 260 cm/s 30 min 0-10% inclinaison	Microsphères	↗ cortex cérébelleux
Pannier JL <i>et al.</i> , 1977	chien	Tapis roulant	Intensité modérée	Microsphères	↗ cortex cérébelleux
Gross PM <i>et al.</i> , 1980	chien	Tapis roulant	Intensité modérée	Microsphères	↗ cortex moteur
Parks CM <i>et al.</i> , 1983	poney	Tapis roulant	Intensité graduelle	Microsphères	↗ cortex cérébelleux de 30%
Manohar M, 1986	poney	Tapis roulant	Forte intensité	Microsphères	↗ substance grise cervelet
Sikkas BP <i>et al.</i> , 1992	poney	Tapis roulant	570 cm/s, 5,15,26 min inclinaison 7%	microsphères	↘ (toutes les régions) pour EX de 26 min
Kimura <i>et al.</i> , 1994	rat	Tapis roulant	4 cm/s, 30 sec	Débitmétrie Doppler-Laser	↗ cortex
Ollenberger <i>et al.</i> , 1998	rat	Nage volontaire	/	<sup>14</sup> C-isopropyl-p-iodoamphétamine	Aucun changement
Manohar M <i>et al.</i> , 1998	cheval	Tapis roulant	800 et 1300 cm/s	microsphères	↘ dans substance blanche
Delp MD <i>et al.</i> , 2001	Porc miniature	Tapis roulant	70 et 100% VO <sub>2</sub> max	microsphères	↗ 25% à 70% VO <sub>2</sub> max dans aires subcorticales
Holschneider <i>et al.</i> , 2003	rat	Tapis roulant	3.1 cm/s, 45 min	<sup>14</sup> C-iodoantipyrine	↗ cortex, striatum, thalamus
Nakajima <i>et al.</i> , 2003	rat	Tapis roulant	2,4,8 cm/s, 30s ou 3 min	Débitmétrie Doppler-laser	↗ hippocampe
Nishijima & Soya, 2006	rat	Tapis roulant	16 cm/s, 2h	Débitmétrie Doppler-laser	↗ hippocampe
Nishijima <i>et al.</i> , 2012	rat	Tapis roulant	16 cm/s, 80 min	Débitmétrie Doppler-laser	↗ hippocampe

**Tableau 1 : DSC pendant la réalisation d'une activité physique chez l'animal.**

## 2. Hyperactivité sympathique pendant l'activité physique

Pendant la réalisation de l'AP, l'impératif est que l'organisme assure un apport sanguin approprié aux muscles qui se contractent afin de satisfaire leurs besoins métaboliques. L'augmentation du débit sanguin aux muscles en activité s'explique par la vasodilatation des artérioles du tissu musculaire (vasodilatation induite par les métabolites vasodilatateurs), l'augmentation du débit cardiaque et la réduction de l'apport sanguin aux organes non impliqués dans la réalisation de l'AP notamment le tube digestif et ses annexes, le rein et la peau. Les 2 derniers processus sont le résultat d'une hyperactivité sympathique via l'activation par la noradrénaline respectivement des récepteurs  $\beta_1$  cardiaques (effet inotrope et chronotrope positif) et  $\alpha_1$  vasculaires (effet vasoconstricteur). L'augmentation du débit cardiaque explique également pourquoi la pression artérielle s'élève pendant l'AP en dépit de la réduction des résistances vasculaires périphériques totales (dont l'origine est la vasodilatation au niveau des muscles actifs).

L'hyperactivité sympathique est le résultat de l'activation des centres bulbaire sympathiques (cardioaccélérateur, vasomoteur et adrénalinosécréteur) par 3 mécanismes (voir figure 9) qui sont : la commande centrale (ce sont les voies nerveuses activées avant même la réalisation de l'exercice et qui prennent naissance dans le cortex préfrontal), le réflexe de pression (ce sont les voies nerveuses sensibles qui ont leur origine dans les muscles squelettiques et qui sont activées par les produits du métabolisme musculaire), le baroréflexe (ce sont les voies nerveuses sensibles qui ont leur origine dans le sinus carotidien et la crosse de l'aorte qui sont activées au début de l'exercice par l'hypotension artérielle).

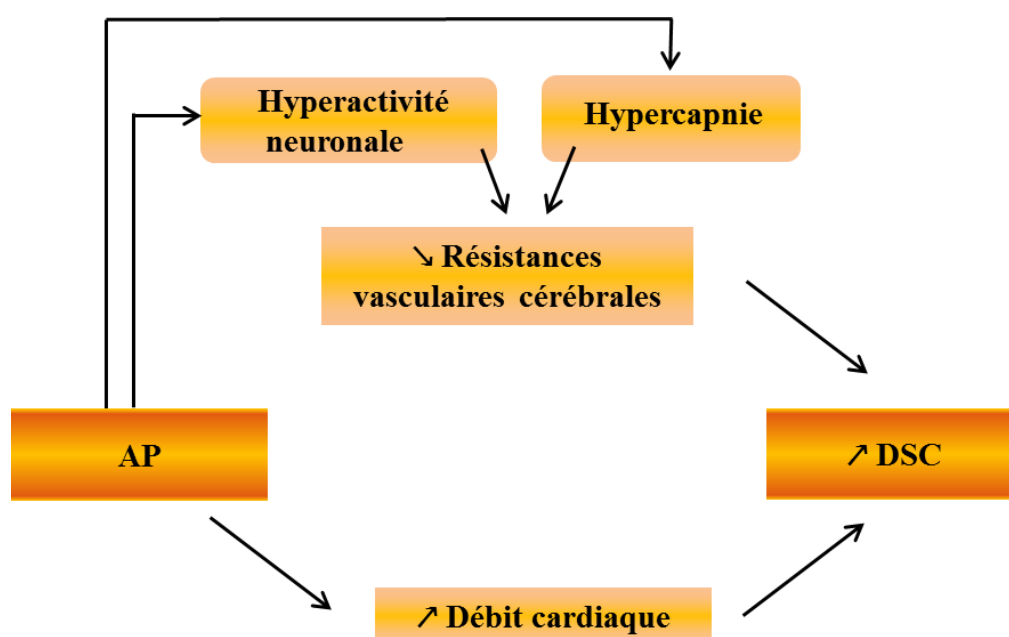


**Figure 9 : Mécanismes conduisant à l'hyperactivité sympathique pendant la réalisation d'une activité physique.** 42

### 3. Mécanismes impliqués dans l'élévation du débit sanguin cérébral

La figure 10 résume les mécanismes impliqués dans l'élévation du DSC observée pendant la réalisation de l'AP. L'augmentation du DSC met en jeu:

- la diminution des résistances vasculaires cérébrales en réponse à l'hyperactivité neuronale (couplage neurovasculaire et vasodilatations dépendante du flux et propagée rétrograde) et à l'hypercapnie (contrôle humoral) associées à l'AP
- une élévation du débit cardiaque



*Figure 10: Mécanismes impliqués dans l'augmentation du débit sanguin cérébral (DSC) lors de la réalisation d'une activité physique (AP).*

Les données les plus récentes suggèrent même que l'augmentation de la pression artérielle pourrait également contribuer à augmenter le DSC pendant la réalisation de l'AP (Willie *et al.*, 2014). On notera que le DSC augmente pendant l'AP en dépit de l'effet vasoconstricteur du sympathique sur les artères cérébrales et piales, qui pourrait alors être masqué par l'effet vasodilatateur de l'adrénaline.

### **a. Augmentation de l'activité neuronale**

Pendant la réalisation de l'AP, l'activité neuronale augmente de façon proportionnelle à l'intensité de l'AP (Czurko *et al.*, 1999; Querido & Sheel, 2007). L'hyperactivité neuronale, en tout cas celle observée dans le cortex cérébral, est à relier à l'activation des aires motrices (Orgogozo & Larsen, 1979) impliquées dans la contraction volontaire des muscles et à l'activation des aires somesthésiques par les voies nerveuses sensibles d'origine musculaire (voies métabotropes, voie de la proprioception consciente). En cas d'activité locomotrice sur tapis roulant, l'hyperactivité neuronale s'observe également dans les régions sous-corticales, notamment les ganglions de la base (Shi *et al.*, 2004) et l'hippocampe (Nishijima *et al.*, 2012).

### **b. Augmentation de la $paCO_2$**

Il est bien connu que l'AP s'accompagne d'une élévation de la  $paCO_2$  qui est proportionnelle à l'intensité de l'AP du moins tant que l'intensité reste inférieure à 60% de la  $VO_2max$  (Secher *et al.*, 2008). En effet, au-delà de cette intensité, la réduction de la  $paO_2$  déclenche une hyperventilation à l'origine d'une hypocapnie. Or, contrairement à l'hypercapnie qui induit une élévation du diamètre vasculaire, l'hypocapnie induit une vasoconstriction.

Il est intéressant de noter que la réactivité cérébrovasculaire au  $CO_2$  augmente pendant l'AP d'autant plus qu'elle s'accompagne d'une élévation de la température corporelle. Le maintien de la température de la peau du crâne, pendant les AP intenses, nécessite une augmentation de l'irrigation cutanée afin de favoriser les échanges thermiques avec l'extérieur. Aussi, aux activités intenses, le sang de la carotide commune est détourné vers la carotide externe (qui irrigue la peau de la tête) au détriment de l'ACI (Sato *et al.*, 2011). En d'autres termes, l'irrigation de la peau se ferait au détriment de celle du cerveau aux AP intenses.

### **c. Augmentation du débit cardiaque**

L'augmentation du débit cardiaque, observée pendant la réalisation de l'AP, contribue à l'élévation du DSC global observé pendant sa réalisation. Ainsi, l'augmentation du flux sanguin dans l'ACM, observée pendant l'AP, est réduite par l'administration de propranolol

(un antagoniste des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques) (Seifert *et al.*, 2009) et est moindre chez les patients insuffisants cardiaques (Hellstrom *et al.*, 1996b) ou souffrant de fibrillation ventriculaire (Ide *et al.*, 1998). De plus, pendant la réalisation de l'AP, il existe une relation linéaire entre le débit cardiaque et flux sanguin dans l'ACM (Hellstrom *et al.*, 1996a; Ogoh *et al.*, 2005). Cependant, à partir d'une intensité supérieure à 60% de la consommation en  $O_2$ , le débit cardiaque plafonne car la tachycardie diminue le remplissage du cœur et donc le volume d'éjection systolique expliquant en partie pourquoi l'augmentation du DSC n'est pas proportionnelle à l'intensité de l'AP.

En conclusion, pendant l'AP, le DSC augmente de façon proportionnelle à l'intensité de l'AP sauf aux exercices intenses. Dans ce cas, le DSC plafonne voire diminue car l'augmentation du débit cardiaque est restreinte, la  $paCO_2$  diminue et la thermorégulation est privilégiée. C'est alors l'augmentation de l'extraction du cerveau en  $O_2$  qui permet de satisfaire au mieux ses besoins en  $O_2$ .

## **V. Mécanismes impliqués dans les effets positifs de l'activité physique sur la santé cérébrale**

La pratique régulière d'une AP est l'une des stratégies les plus efficaces pour maintenir la santé cérébrale et *in fine* pour espérer bien vieillir (Cotman & Berchtold, 2002). Ainsi, l'AP diminue l'incidence de multiples maladies cérébrales qu'elles soient psychiatriques comme la dépression (Strohle, 2009; Teixeira *et al.*, 2015; Vancampfort *et al.*, 2015) et les psychoses (Vancampfort *et al.*, 2011; Ikai *et al.*, 2013; Scheewe *et al.*, 2013), les maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer (Teri *et al.*, 2003; Hernandez *et al.*, 2014; Frazzitta *et al.*, 2015) et neurologiques comme l'accident vasculaire cérébral (Macko *et al.*, 2005; Luft *et al.*, 2008). De plus, l'AP améliore les capacités cognitives chez les personnes âgées (Kirk-Sanchez & McGough, 2014).

### **1. Les mécanismes physiologiques**

Les effets salutaires de l'AP pourraient s'expliquer par son impact positif sur le système cardiovasculaire et notamment par son effet stimulant sur la fonction endothéliale (Hambrecht

*et al.*, 2003; Di Francescomarino *et al.*, 2009). En effet, la dysfonction endothéliale est reconnue comme le principal facteur de risque de la maladie d'Alzheimer (Kelleher & Soiza, 2013) et de l'accident vasculaires cérébral (McCarty, 2000) et est de plus en plus impliquée dans les maladies psychiatriques (Rybakowski *et al.*, 2006). Par ailleurs, comme décrit précédemment, le DSC au repos est plus élevé chez les personnes actives que sédentaires. Il n'est donc pas exclu que l'AP préserve la santé cérébrale via une amélioration de l'apport sanguin au cerveau. Un autre effet reconnu de l'AP sur le cerveau est une stimulation de la transmission synaptique via une induction de la synaptogenèse et de la neurogenèse (notamment hippocampique) (van Praag *et al.*, 1999; Uda *et al.*, 2006) et une augmentation de l'activité neuronale (glutamatergique, dopaminergique, sérotoninergique, noradrénergique) (Garcia *et al.*, 2003; Goekint *et al.*, 2012). Ces données suggèrent que l'AP peut impacter la fonction cérébrale soit en agissant sur la transmission neuronale soit en améliorant la fonction endothéliale.

## 2. Les mécanismes biochimiques

Il existe un consensus sur l'implication du BDNF dans les effets positifs de l'AP sur la santé cérébrale. En effet, chez l'animal, l'AP augmente les taux cérébraux de BDNF dans de multiples régions incluant l'hypothalamus, le cortex, le cervelet, l'hippocampe et les noyaux de la base (Soya *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2009; Rasmussen *et al.*, 2009; Hopkins & Bucci, 2010) et chez l'Homme une augmentation du BDNF est rapportée dans le sang (Rasmussen *et al.*, 2009). Or le BDNF est une neurotrophine capable d'induire la synaptogenèse, la neurogenèse, la vasculogenèse et d'augmenter l'activité neuronale via l'activation de récepteurs spécifiques, les récepteurs TrkB. Le constat que le BDNF et l'AP partagent les mêmes effets sur le cerveau est le premier argument en faveur de l'implication du BDNF dans les effets positifs de l'AP sur la fonction cérébrale. Le second argument est que les stratégies anti-BDNF c'est-à-dire les stratégies capables de bloquer les effets centraux du BDNF, annulent les effets positifs de l'AP sur le cerveau. Ainsi, l'AP devient incapable d'induire la synaptogenèse et d'améliorer les capacités cognitives en cas d'administration intra-hippocampique d'anticorps anti-TrkB (Gomez-Pinilla *et al.*, 2008) ou d'antagoniste des récepteurs TrkB (Liu *et al.*, 2008). Un autre argument est que les bénéfices cérébraux de l'AP sont plus faibles chez les souris hétérozygotes pour le gène *bdnf* que chez les souris sauvages (Gerecke *et al.*, 2012). Enfin, le dernier argument obtenu chez l'Homme réside dans le fait

que les effets positifs de l'AP sur la cognition sont moindres chez les porteurs du polymorphisme Val66Met du gène *bdnf* (expliqué ci-dessous).

## VI. Le BDNF

### 1. Historique

En 1982, Barde et coll. ont mis en évidence dans le cerveau de porc une molécule capable, comme le NGF (nerve growth factor), d'augmenter la survie de neurones en culture. Comme la molécule a été isolée dans le cerveau et qu'elle agit comme la neurotrophine NGF, ils lui donnent le nom de brain-derived neurotrophic factor (BDNF). Depuis sa découverte, le BDNF a fait l'objet d'une pléthore de travaux tant chez l'Homme (dosage sanguin), chez l'animal (dosage dans le système nerveux) que sur culture de neurones. En revanche, peu de travaux se sont intéressés à la présence et au rôle du BDNF en dehors du cerveau.

### 2. Localisation cellulaire du BDNF cérébral

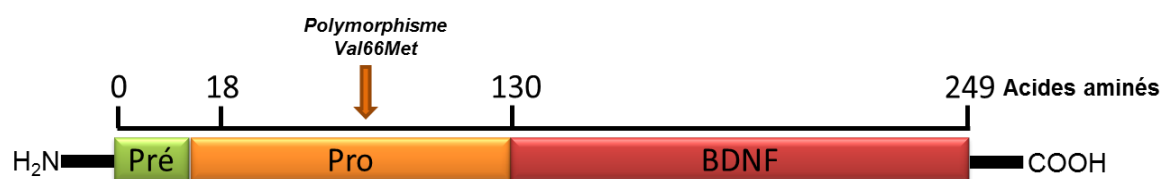
Les premiers travaux ont été réalisés sur cerveaux de porc, de rat et de souris. Les techniques utilisées alors ne permettaient que la détection des ARN messagers (ARNm) codant le BDNF (Conner *et al.*, 1996; Yamamoto *et al.*, 1996). Elles rapportent unanimement une forte expression des ARNm dans les neurones, avec des niveaux d'expression plus élevés au niveau du cortex et de l'hippocampe que dans les autres structures (Ernfors *et al.*, 1990; Hofer *et al.*, 1990; Wetmore *et al.*, 1990). Plus tard, la mise sur le marché des premiers anticorps a permis d'étudier la localisation cellulaire de la protéine BDNF. Là encore, les études ont rapportées une forte expression du BDNF dans les neurones. Ce n'est que plus récemment qu'il a été montré que la protéine était également exprimé par des cellules non neuronales notamment les astrocytes, les cellules microgliales et les cellules endothéliales même si cette expression extraneuronale a été surtout rapportée en conditions pathologiques notamment en cas d'ischémie cérébrale (Madinier *et al.*, 2009; Bejot *et al.*, 2011). Cependant, notre laboratoire a été le premier à montrer que l'AP s'accompagnait d'une surexpression de BDNF par les cellules endothéliales cérébrales (Quirie *et al.*, 2012).

### 3. Synthèse et sécrétion du BDNF

Toutes les données qui suivent concernent le métabolisme neuronal du BDNF, les données sur son métabolisme dans les autres types cellulaires restant fragmentaires.

#### a. Synthèse

Le BDNF est un peptide synthétisé à partir de l'ARNm codant le BDNF, sous forme d'un précurseur de haut poids moléculaire, le préproBDNF composé de 249 acides aminés (aa). Celui-ci est clivé en proBDNF (231 aa) puis en BDNF (119 aa) grâce à différentes enzymes protéolytiques intra- et extra-cellulaires. De façon plus détaillée, le pré-pro-BDNF est adressé au réticulum endoplasmique lisse pour donner le pro-BDNF après clivage du peptide signal. Le pro-BDNF passe dans l'appareil de Golgi où finalement il s'accumule dans les vésicules du réseau trans-golgien. Le clivage du pro-BDNF en BDNF met en jeu la furine (endoprotéase membranaire) dans les vésicules du *trans* golgien et des pro-protéines convertases 1 à 7 (PC1/7) dans les vésicules de sécrétion. Le polymorphisme Val66Met du gène *bdnf* est une anomalie génétique (nucléotide 196) fréquente (40% des caucasiens) qui se traduit par une substitution sur le codon 66 de la valine par une méthionine dans le domaine de la protéine BDNF. Ces données sont résumées dans la figure 11.



**Figure 11 : structure du pré-proBDNF**

La transcription du gène *bdnf* est principalement régulée par l'activité neuronale. En effet, la stimulation neuronale, via l'augmentation de la concentration cytosolique en  $\text{Ca}^{2+}$  et en AMPc, conduit à l'activation du promoteur du gène *bdnf* suite à la fixation sur ses séquences régulatrices respectivement du facteur CaRF (calcium-responsive transcription factor) et de la protéine CREB (cAMP-response element-binding protein) (Deogracias *et al.*, 2004; Aid *et al.*, 2007; Pruunsild *et al.*, 2007). Ainsi, le glutamate (Zafra *et al.*, 1991), l'acétylcholine



(Lindfors et al., 1992), la dopamine (Kuppers and Beyer, 2001) et la sérotonine (Vaidya et al., 1997) augmentent les taux des ARNm et de la protéine BDNF. En revanche, le GABA (Zafra et al., 1991) exerce des effets opposés.

A notre connaissance, la régulation de la synthèse du BDNF par les enzymes impliquées dans le clivage du proBDNF en BDNF est mal connue.

### b. Sécrétion

La sécrétion des vésicules contenant le BDNF est soit constitutive (permanente mais non régulée) soit régulée par la concentration cytosolique en calcium (Lessmann et al., 2003; Brigadski et al., 2005; Lessmann & Brigadski, 2009). Quelle que soit la voie, la sécrétion peut s'effectuer aussi bien au niveau des dendrites que des terminaisons axonales. Le polymorphisme Val66Met est associé à une réduction de la sécrétion de BDNF en réponse à l'hyperactivité neuronale (Egan et al., 2003; Chen et al., 2004; Chen et al., 2008), donc à une réduction de la sécrétion régulée.

Des données plus récentes obtenues sur culture de neurones, mais encore sujettes à débat, suggèrent que les neurones peuvent sécréter du proBDNF qui une fois dans l'espace extracellulaire serait transformé en BDNF par les métalloprotéases matricielles ou par la plasmine (Yang et al., 2009) comme indiqué dans la figure 12.

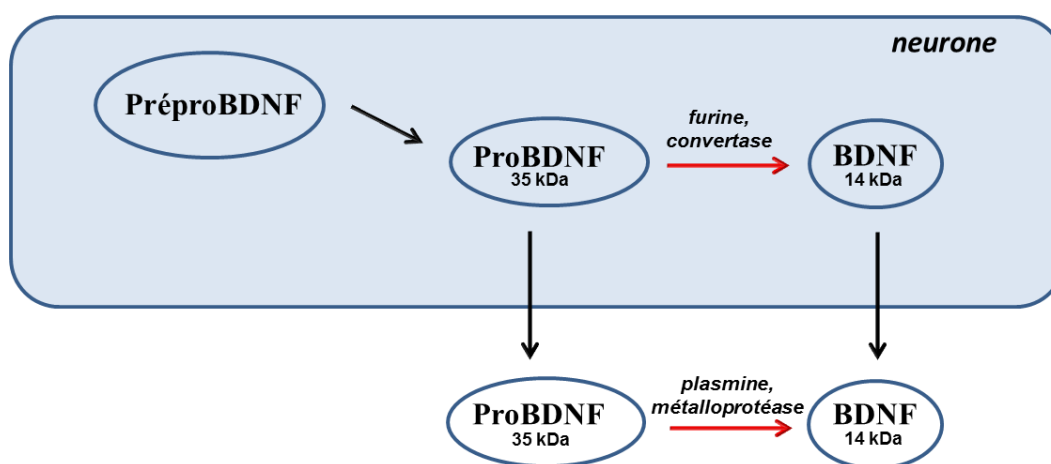


Figure 12 : Synthèse et sécrétion neuronales du BDNF.

#### 4. Les récepteurs au BDNF

Le BDNF présente une forte affinité pour le récepteur TrkB (tropomyosin-related kinase de type B) et une très faible affinité pour le récepteur P75<sup>NTR</sup> (pan 75 neurotrophin receptor) (figure 13). Il est bien démontré que tous les effets bénéfiques du BDNF sur le cerveau (synaptogenèse, neurogène, vasculogenèse, stimulation de l'activité neuronale) sont dus à l'activation des récepteurs TrkB. L'activation des récepteurs P75<sup>NTR</sup> conduit quant à elle à des effets négatifs notamment à l'apoptose. On peut noter que le proBDNF présente une forte affinité pour les récepteurs P75<sup>NTR</sup> (Teng *et al.*, 2005). Nous ne traiterons ici que des récepteurs TrkB.

Le récepteur TrkB est une protéine transmembranaire qui appartient à la famille des récepteurs à activité tyrosine kinases. Il est constitué de 3 domaines différents : un domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique qui possède une activité tyrosine kinase. La région extracellulaire est constituée d'un cluster riche en cystéine suivie par une série de répétitions riches en leucine et deux domaines de type immunoglobuline qui correspondent au site d'interaction avec le BDNF. Au niveau cérébral, le récepteur TrkB est présent dans les neurones, les cellules gliales et les cellules endothéliales (Nemoto *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2004; Fenner, 2012).

Le récepteur TrkB existe sous 4 isoformes : une forme entière TrkB-FL (TrkB-Full Length) qui possède le domaine tyrosine kinase et qui est responsable des effets du BDNF, deux formes tronquées à l'extrémité C-terminale, TrkB-T1 et TrkB-T2 délestées de l'activité catalytique, et une isoforme sans domaine tyrosine kinase.

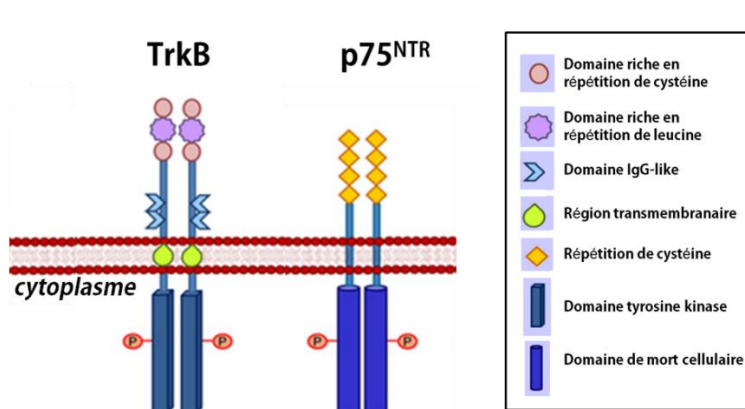


Figure 13 : Représentation schématique des récepteurs TrkB et p75<sup>NTR</sup>.

Le BDNF se fixe au récepteur TrkB sous forme d'homodimère. La fixation induit la dimérisation et l'autophosphorylation des résidus tyrosine du domaine cytoplasmique du récepteur. Les résidus tyrosine phosphorylés vont ensuite recruter des protéines adaptatrices Shc (Src homology 2/ $\alpha$ -collagen-related protein) pour conduire à l'activation de ERK (extracellular signal-regulated kinase), de PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase), et de PLCG1 (phospholipase C $\gamma$  1) (Blum & Konnerth, 2005; Reichardt, 2006) (figure 14). Ainsi, une augmentation de l'expression des récepteurs TrkB-FL phosphorylés (en tyrosine 816) est un reflet très utilisé non seulement de l'augmentation des taux de BDNF mais aussi de son activité. Le neurone est également capable d'internaliser le complexe BDNF-TrkB phosphorylé. Ce dernier peut être dégradé dans le neurone ou conduit jusqu'au noyau et jouer le rôle de facteur de transcription. Il n'existe pas d'information sur la présence d'éventuelles enzymes capables de dégrader le BDNF dans le secteur extracellulaire. En fait il semble que ce soit la fixation du BDNF sur ses récepteurs entiers et tronqués qui assurent l'élimination de BDNF du secteur extracellulaire (Heerssen & Segal, 2002).

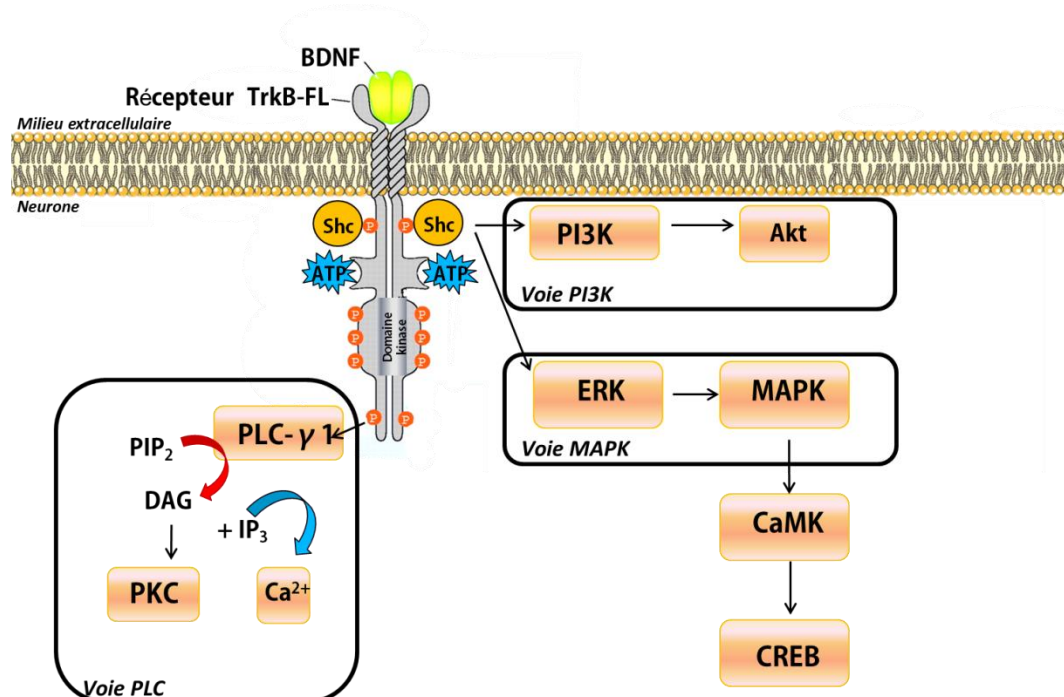


Figure 14: Les voies de signalisation induites lors de l'interaction de BDNF sur son récepteur dimérisé TrkB-FL (Blum & Konnerth, 2005).

## 5. Comment l'activité physique augmente les taux cérébraux de BDNF ?

Peu de travaux sont dédiés à la compréhension des mécanismes par lesquels l'AP augmente les taux de BDNF dans le cerveau. Le principal mécanisme évoqué est l'hyperactivité neuronale. Cependant, une augmentation de facteurs circulants comme IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1), l'irisine et le BDNF lui-même ne peut pas être exclue.

### a. Origine neuronale

Pendant la réalisation de l'AP, l'activité neuronale augmente dans le cortex cérébral de façon proportionnelle à l'intensité de l'AP (Ke *et al.*, 2011; Udina *et al.*, 2011). Cette hyperactivité neuronale est le résultat de l'activation volontaire de la voie corticospinale et de l'activation des voies somesthésiques par les afférences d'origine musculaire. En effet, l'électrostimulation du muscle suffit à augmenter la neuroplasticité cérébrale (Gondin *et al.*, 2006). Comme la synthèse et la sécrétion de BDNF par les neurones sont proportionnelles à l'activité neuronale et que les stratégies qui s'opposent à l'augmentation de l'activité neuronale induite par l'AP, annulent les effets de l'AP sur les taux de BDNF (Ivy *et al.*, 2003; Vaynman *et al.*, 2003), il est logique de relier l'augmentation des taux cérébraux de BDNF induite par l'AP à l'hyperactivité neuronale.

### b. Origine périphérique

Pour certains auteurs, l'augmentation des taux cérébraux de BDNF induite par l'AP est due à des facteurs circulants notamment l'IGF-1. En effet, les taux d'IGF-1 s'élèvent dans le cerveau en réponse à l'AP et cet effet est annulé par l'administration sous-cutanée d'anticorps anti-IGF-1 (Trejo *et al.*, 2001). Un point qui n'est pas clair concerne l'origine de l'élévation des taux cérébraux d'IGF-1: le neurone ou le sang. En effet, outre le fait qu'IGF-1 est synthétisé par les neurones (Bondy & Lee, 1993), il est secrété dans le sang par le foie et est capable de rejoindre le secteur interstitiel cérébral via un passage à travers la BHE (capillaires cérébraux) et à travers la barrière hémato-méningée (plexus choroïdes). Plus récemment, l'irisine circulante a été proposé comme un acteur dans les effets de l'AP sur le BDNF cérébral. L'irisine, la forme clivée circulante de la protéine FNDC5 (Fibronectin type III domain-containing protein 5) est une myokine dont les taux plasmatiques augmentent en

réponse à l'AP. Wrann et al (2013) ont montré que l'irisine était capable d'induire la transcription du gène *bdnf* dans l'hippocampe d'où l'idée que c'est la contraction musculaire via l'irisine qui contribue à l'augmentation des taux cérébraux de BDNF observés après l'AP (Wrann *et al.*, 2013).

Enfin, pendant l'AP les taux de BDNF augmentent dans le sang. Même si la preuve que le BDNF passe du sang dans le liquide interstitiel cérébral n'est pas faite, on ne peut pas à ce jour exclure l'implication du BDNF circulant dans l'augmentation des taux cérébraux de BDNF induite par l'AP.

*Objectifs*

L'objectif général du travail s'inscrit dans l'étude de la compréhension des mécanismes par lesquels l'activité physique (AP) régulière augmente les taux cérébraux de BDNF et par voie de conséquence la santé cérébrale. En effet, les mécanismes jusque-là impliqués ne sont pas satisfaisants. L'idée selon laquelle l'élévation des taux cérébraux est due à l'hyperactivité neuronale qui accompagne la réalisation de l'AP ne permet pas d'expliquer pourquoi l'élévation des taux de BDNF est très marquée dans l'hippocampe, une région cérébrale peu activée pendant l'AP. L'implication d'un facteur circulant qui serait secrété par le foie (IGF-1), par le muscle (irisine), ou par des cellules qui restent à identifier (BDNF) reste à notre avis très hypothétique. Dans ce contexte, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle, l'élévation cérébrale des taux de BDNF induite par l'AP était à relier à la réponse hémodynamique cérébrale et plus exactement à l'augmentation répétée (pendant chaque activité) du flux sanguin dans les vaisseaux de la circulation cérébrale.

Nos objectifs ont été :

- 1) d'évaluer dans quelle mesure des stratégies capables de réduire la réponse hémodynamique cérébrale à l'AP s'accompagnaient d'une moindre élévation des taux de BDNF dans le cerveau.
- 2) d'explorer dans quelle mesure, l'élévation des taux de BDNF est proportionnelle à l'intensité de l'AP comme l'est le flux sanguin dans la circulation cérébrale.
- 3) de rechercher l'existence d'un lien entre la production de NO par l'endothélium vasculaire (un indicateur du flux sanguin) et les taux cérébraux de BDNF.



# **Présentation des travaux**



**I) Première publication- L'élévation des taux cérébraux de BDNF induite par l'activité physique est réduite par une interruption unilatérale de la circulation carotidienne chez le rat.**

**Titre:**

Brain BDNF levels elevation induced by physical training is reduced after unilateral common carotid artery occlusion in rats

**Auteurs:**

Hayat Banoujaafar, Jacques Van Hoecke, Claude M Mossiat and Christine Marie

**Journal:**

*Cerebral blood flow and metabolism*

*J Cereb Blood Flow Metab. 2014 Oct;34(10):1681-7*

*doi:10.1038*

## **Résumé des travaux**

### **1. Contexte et Objectifs**

Alors que les bénéfices cardiovasculaires de l'entraînement physique sont largement attribués à une augmentation de la production de NO par l'endothélium vasculaire et que l'exercice s'accompagne d'une élévation du flux sanguin dans les vaisseaux de la circulation cérébrale mettant en jeu en partie le phénomène de dilatation dépendante du flux, le lien entre augmentation répétée du flux sanguin cérébral et élévation des taux cérébraux de BDNF après un entraînement physique n'a jamais été exploré. Aussi, nous avons conduit des expériences visant à tester l'hypothèse selon laquelle l'augmentation des taux de BDNF dans le cerveau induite par des exercices répétés s'explique en partie par l'élévation répétée du flux dans les vaisseaux de la circulation cérébrale.

### **2. Protocole expérimental**

Nous avons recherché si des stratégies qui réduisent l'augmentation du flux sanguin dans la circulation cérébrale pendant la réalisation des exercices (marche rapide sur tapis roulant, 18m/min, 30 min/j, 7 j consécutifs) sont capables de réduire les effets de l'entraînement physique (répétition d'exercices) sur les taux cérébraux de BDNF.

Les stratégies utilisées sont :

- a) clampage irréversible d'une carotide commune qui va s'opposer à l'augmentation du flux sanguin.
- b) modulation de l'intensité des exercices. En effet, le flux sanguin dans les vaisseaux de la circulation cérébrale est proportionnel à l'intensité de l'exercice tant que l'intensité n'est pas trop élevée. Pour moduler l'intensité de l'exercice, le tapis a été placé soit en position horizontale soit en position décline descendante (intensité plus faible comme en témoigne la moindre sollicitation cardiovasculaire).
- c) hypertension artérielle génétique qui s'accompagne d'une réduction de la capacité de l'endothélium à produire du NO en réponse à l'élévation du flux (utilisation du rat spontanément hypertendu (SHR) et de son contrôle normotendu Wistar Kyoto (WKY)).

d) traitement systémique par un inhibiteur de NO synthase qui va s'opposer à la vasodilatation dépendante du flux, une injection par jour avant chaque séance de tapis roulant.

Les taux de BDNF mature et de synaptophysine (un marqueur de l'activation des récepteurs TrkB par le BDNF mature) ont été déterminés par technique de Western Blot dans le cortex sensorimoteur 24h après la dernière séance d'exercice.

### **3. Principaux résultats**

L'augmentation des taux de BDNF induite par l'entraînement physique est moindre en cas d'occlusion carotidienne (effet observé sur le cortex ipsilatéral à l'occlusion), d'hypertension artérielle et d'inhibition de la NO synthase endothéliale. De plus, l'augmentation des taux de BDNF est plus marquée en cas de marche en descente qu'en montée. Enfin, il existe une bonne concordance entre les variations des taux cérébraux de BDNF et de synaptophysine. L'ensemble de ces résultats suggèrent l'existence d'une connexion entre l'élévation des taux de BDNF dans le cerveau induite par l'entraînement physique et l'augmentation du flux sanguin dans les vaisseaux de la circulation cérébrale pendant la réalisation de chaque séance du tapis roulant.

## ORIGINAL ARTICLE

## Brain BDNF levels elevation induced by physical training is reduced after unilateral common carotid artery occlusion in rats

Hayat Banoujaafar, Jacques Van Hoecke, Claude M Mossiat and Christine Marie

We investigated the contribution of blood flow elevation in the cerebrovasculature to physical training-induced brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels elevation in the brain. Brain-derived neurotrophic factor protein levels were measured in the motor cortex 24 h after the last session of a forced treadmill walking (30 minutes a day, 18 m/minute for 7 consecutive days). Unilateral common carotid artery occlusion and modulation of exercise intensity (0 versus a 10% inclination of the treadmill) were used as strategies to reduce the (normal) elevation of flow in the cerebrovasculature occurring during exercise. Administration of N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 60 mg/kg before each exercise sessions) and genetic hypertension (spontaneously hypertensive rats) were used as approaches to reduce stimulation of nitric oxide production in response to shear stress elevation. Vascular occlusion totally and partially abolished the effect of physical training on BDNF levels in the hemisphere ipsilateral and contralateral to occlusion, respectively. BDNF levels were higher after high than low exercise intensity. In addition, both genetic hypertension and L-NAME treatment blunted the effects of physical training on BDNF. From these results, we propose that elevation of brain BDNF levels elicited by physical training involves changes in cerebral hemodynamics.

Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism advance online publication, 23 July 2014; doi:10.1038/jcbfm.2014.133

Keywords: BDNF; cerebral hemodynamics; physical training; rats

## INTRODUCTION

In the last 20 years, the promotion of the regular practice of physical activity has become an important public health message. This can be attributed primarily to the cardiovascular benefits of physical training that are, at least in part, due to elevation of flow in the vasculature and subsequent modification of endothelial phenotype through activation of shear stress-dependent mechanisms.<sup>1</sup> Among the panoply of endothelium-derived factors that are secreted in response to shear stress elevation, nitric oxide (NO) is probably the most important and best characterized mediator. More recent evidence suggest that physical training has positive effects on brain function and relate brain benefits to an augmentation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in the brain.<sup>2</sup> Surprisingly, the physiologic mechanisms that drive the elevation of BDNF in the brain remain speculative whereas their elucidation represents a rational basis for the design of physical training modalities aimed at improving brain health.

As neuronal activity is well known to regulate bdnf transcription and maturation of BDNF messenger RNA into mature BDNF,<sup>3</sup> high BDNF levels observed in the brain after training have been implicitly related to neuronal hyperactivity that occurs during each exercise bout in motor-related and -unrelated brain areas.<sup>4,5</sup> An additional mechanism that has been proposed is the involvement of mediators originating from active skeleton muscles and able to induce bdnf gene in the brain such as insulin-like growth factor 1 or irisin.<sup>6,7</sup> Surprisingly, whereas blood flow (ml/minute) and blood flow velocity (cm/second) were reported to increase in the common and internal carotid arteries, vertebral arteries, and major cerebral arteries in proportion to exercise intensity<sup>8,9</sup> and

although a reciprocal interaction exist between NO and BDNF synthesis,<sup>10</sup> the contribution of cerebral hemodynamics to the effects of physical training on brain BDNF levels has never been explored.

The present study explores the hypothesis that flow elevation in the cerebrovasculature during exercise is involved in physical training-induced BDNF levels increase in the rat brain. For this purpose, we investigated to what extent strategies aimed at reducing the (normal) flow increases in the cerebrovasculature (occlusion of a common carotid artery, modulation of exercise intensity) or at decreasing endothelial production of NO in response to shear stress (genetic hypertension and NO synthase inhibition) did blunt the effect of physical training on brain BDNF. Physical training consisted in a daily walking activity on a motorized treadmill for 7 consecutive days. Changes in treadmill inclination (horizontal versus a 10% decline) were used to modulate exercise intensity. Levels of mature BDNF and synaptophysin (SYN) as a marker of synaptogenesis and synaptic activity<sup>11,12</sup> were measured in the cortex 24 h after the last session of exercise using western blot analysis.

## MATERIALS AND METHODS

## Ethical Approval

All experiments were carried out (license 21CAE102, French Department of Agriculture) in accordance with the European Committee's Council Directive and performed to comply with the ARRIVE (Animal Research: Reporting In Vivo Experiments) guidelines. A total of 80 rats were used in the completion of this study. Young adult male (13 weeks old) were used so that excluding age-associated endothelial dysfunction and interaction

Unité INSERM U1093 Cognition, Action et Plasticité Sensorimotrice, Université de Bourgogne, Dijon, France. Correspondence: Professor C Marie, INSERM U1093 Cognition, Action et Plasticité Sensorimotrice, Faculté de Médecine-Pharmacie, 7 Boulevard Jeanne d'Arc, Dijon Cedex 21079, France.

E-mail: christine.marie@u-bourgogne.fr

This work was supported by grants from INSERM, Université de Bourgogne, conseil régional de Bourgogne, and fonds européen de développement régional.

Received 18 April 2014; revised 17 June 2014; accepted 26 June 2014

between female hormones and BDNF as confounding factors. Among these rats, there were 56 Wistar rats, 12 Wistar-Kyoto (WKY) rats, 12 spontaneously hypertensive rats (SHR). Wistar-Kyoto and SHR were purchased from Charles River (L'Arbresle, France) and other rats from Janvier (Le Genest Saint Isle, France). Animals were maintained in a temperature-controlled room, on a 12/12 hours light/dark cycle with food and water ad libitum. They were housed five per cage to maintain social interaction. To reduce the animal's stress level, the same operator performed all steps of experiments. Efforts were made to reduce the number of rats.

### Physical Training

To familiarize the rats with the operator, they were gently handled twice a day for 1 week. During the following week, all the rats were familiarized with the treadmill apparatus (model Exer-3/6, Linton Instrumentation, Norfolk, UK). A 2-minute long walking session (horizontal position of the treadmill) was given twice a day, using mild intensity (0.4mA) of foot shocks as negative reinforcement. Then, rats were randomly separated in sedentary and trained rats. We have been concerned with using exercise 'dosage' in rats mimicking recommendations of physical activity to improve human health. Therefore, physical training consisted in a daily walking of 30-minute duration at a rapid speed (18m/minute). The physical training duration was however restricted to 7 days that is short enough to not increase capillary density in the brain. Treadmill activity (without electrified grid) was induced in the morning between 0900 hours and 1200 hours. Corresponding sedentary rats were kept in their housing cage that was placed at the proximity of the treadmill apparatus. We previously showed that such a modality of physical training (treadmill activity with a horizontal position, 30minutes/day, 18m/minute, for 7 consecutive days) induced a mild increase in citrate synthase activity in skeleton muscles, did not change blood pressure in WKY rats and SHR,<sup>13</sup> and resulted in a twofold increase in mature BDNF levels in the cortex when induced in control Wistar rats.<sup>14</sup>

### Strategies Used to Reduce the Increase in Blood Flow Within the Cerebrovasculature During Exercise

**Common Carotid Artery Occlusion.** After anesthesia (chloral hydrate, 400 mg/kg, intraperitoneal) and a midline ventral incision of the neck, the left common carotid artery was definitively occluded and the incision was sutured. Once awake, rats returned to their housing cage. Sham-operated controls received the same surgical procedure without vessel ligation. Training was started 3 days after the vascular occlusion (VO) or at equivalent time in sham rats. Importantly, even though occlusion of a common carotid artery leads to an immediate decrease in cerebral blood flow in the hemisphere ipsilateral to occlusion, cerebral blood flow recovers preoccluded values as soon as 24 hours after occlusion induction.<sup>15,16</sup> Consistently, long-term unilateral occlusion does not induce neuronal suffering.<sup>17</sup>

**Changes in Exercise Intensity.** Flow changes in the cerebrovasculature are dependent on exercise intensity,<sup>18</sup> the ability to increase cardiac output,<sup>19</sup> and the arterial partial pressure in carbon dioxide.<sup>20</sup> Thus, blood flow in the carotid and vertebral circulations increases in proportion to exercise intensity from rest to moderate-intensity exercise.<sup>9</sup> In the present study, modulation of exercise intensity was achieved by changing the slope of the treadmill (0 versus a 10% decline at a same speed). Indeed, whole body oxygen consumption as well as hindlimb muscle blood flow and cardiac output have been shown to be lower for downhill than level locomotion at the same speed.<sup>21</sup>

### Strategies Used to Explore Shear Stress-Dependent Mechanisms in the Effect of Physical Training on Brain-Derived Neurotrophic Factor

A well-documented response of endothelium to shear stress elevation is an overproduction of NO by the endothelium. Moreover, endothelial NO production is reduced in cerebral microvessels from SHR compared with WKY rats<sup>22</sup> and SHR exhibit a decrease in flow-mediated dilation,<sup>23,24</sup> a process that largely involves endothelium-derived NO. Thus, to assess the role of shear stress in the effects of physical training, we investigated whether genetic hypertension and treatment with a NO synthase inhibitor can reduce the effect of physical training on BDNF. N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, N5751, Sigma-Aldrich, Saint Quentin-Fallavier, France) was used as a NO synthase inhibitor. Sedentary and trained rats were daily treated with L-NAME (60 mg/kg) or vehicle (saline) by the intraperitoneal route. N-nitro-L-arginine methyl ester inhibits all isoforms of NO synthase

after it is hydrolyzed into L-N-nitroarginine. Regarding how low is the cerebrospinal fluid-to-plasma distribution coefficient of L-N-nitroarginine as well as the low labeling of the cortex after the exposure of brain slice to [<sup>3</sup>H]-NG-nitroarginine,<sup>25,26</sup> inhibition of neuronal NO synthase if present in the cortex is expected to be minimal after intraperitoneal administration of L-NAME. Treatments were administered 1 hour before each treadmill session or at corresponding times in sedentary rats. Notably, at this dosage, L-NAME induces a progressive elevation of blood pressure that remains however below the upper limit of cerebral blood flow autoregulation after a 7-day long period of administration.<sup>27,28</sup> Concerning the interaction between genetic hypertension and physical training, experiments were conducted in 13-week-old SHR and age-matched normotensive WKY rats. At this age, we previously reported reduced endothelial NO production by the peripheral vasculature in SHR as compared with WKY rats.<sup>29</sup>

### Western Blot Analysis

Brain BDNF and SYN levels were measured 24 hours after the last treadmill session or at equivalent time in sedentary rats. After chloral anesthesia (400 mg/kg, intraperitoneal) and transcardial perfusion with saline to eliminate blood from the cerebral vasculature, the right and left hemispheres were separated. After dissection of the motor areas, samples were processed as described previously in details.<sup>14</sup> Blots were probed with anti-BDNF (rabbit monoclonal, Epitomics 3160-1, Euromedex, Souffelweyersheim, France) or anti-SYN antibodies (rabbit polyclonal, Thermo Scientific RB-1461-P1, Interchim, Montluçon, France) and anti- $\beta$ -actin antibodies (mouse monoclonal, A5441, Sigma-Aldrich).  $\beta$ -actin was used as an internal control. BDNF and SYN levels were analyzed after normalization to  $\beta$ -actin levels. Multiple groups of rats were compared two by two to investigate (i) the proper effects of VO, hypertension, and L-NAME treatment, (ii) the impact of exercise intensity, (iii) the interaction between VO, hypertension, or L-NAME treatment and training effects. Accordingly, BDNF and SYN levels were measured in 14 groups of rats: sedentary rats with VO (sed VO, n/46), sed sham (n/46), trained VO (training was induced in rats with previous VO, n/46), trained sham (n/46), sed WKY (n/46), trained WKY (n/46), sed SHR (n/46), trained SHR (n/46), trained 0% (n/46), trained a 10% (n/46), sed L-NAME (sedentary rats received L-NAME 60 mg/kg, n/44), trained L-NAME (n/46), sed saline (n/44), trained saline (n/46). For all groups of trained rats, there was no inclination of the treadmill except in group trained a 10% for which the treadmill was a 10% decline. Two groups of rats were analyzed on the same gel and gels were run in triplicate. Brain-derived neurotrophic factor and SYN were calculated from a representative gel. The number of rats in each group is appropriate to deal with inter-individual variability and appropriate to a statistical analysis.

### Statistical Analysis

Results were expressed by means  $\pm$  s.d. Statistical analysis between two groups was performed using Wilcoxon test as a non-parametric tests for non-paired observations. Differences were considered significant when  $P < 0.05$ .

## RESULTS

### Carotid Occlusion Alleviates the Effect of Physical Training on Brain-Derived Neurotrophic Factor

When induced in rats with normal carotid circulation (sham rats), horizontal physical training induced an increase in BDNF levels that reached  $\approx 150\%$  (Figure 1A). These effects of training were abolished when training was induced in rats with previous unilateral common carotid artery occlusion. Thus, training became unable to increase BDNF levels in the hemisphere ipsilateral to the occlusion; (Figure 1B) while the increase in BDNF levels was restricted to  $\approx 36\%$  in the hemisphere contralateral to the occlusion (Figure 1C). Notably, unilateral common carotid artery occlusion had no impact on brain BDNF levels in sedentary rats regardless the considered hemisphere (Figures 1D and E).

### Brain Brain-Derived Neurotrophic Factor Levels in Trained Rats are Dependent on Physical Training Intensity

Physical training with low exercise intensity (a 10% inclination of the treadmill) significantly increased BDNF levels as compared



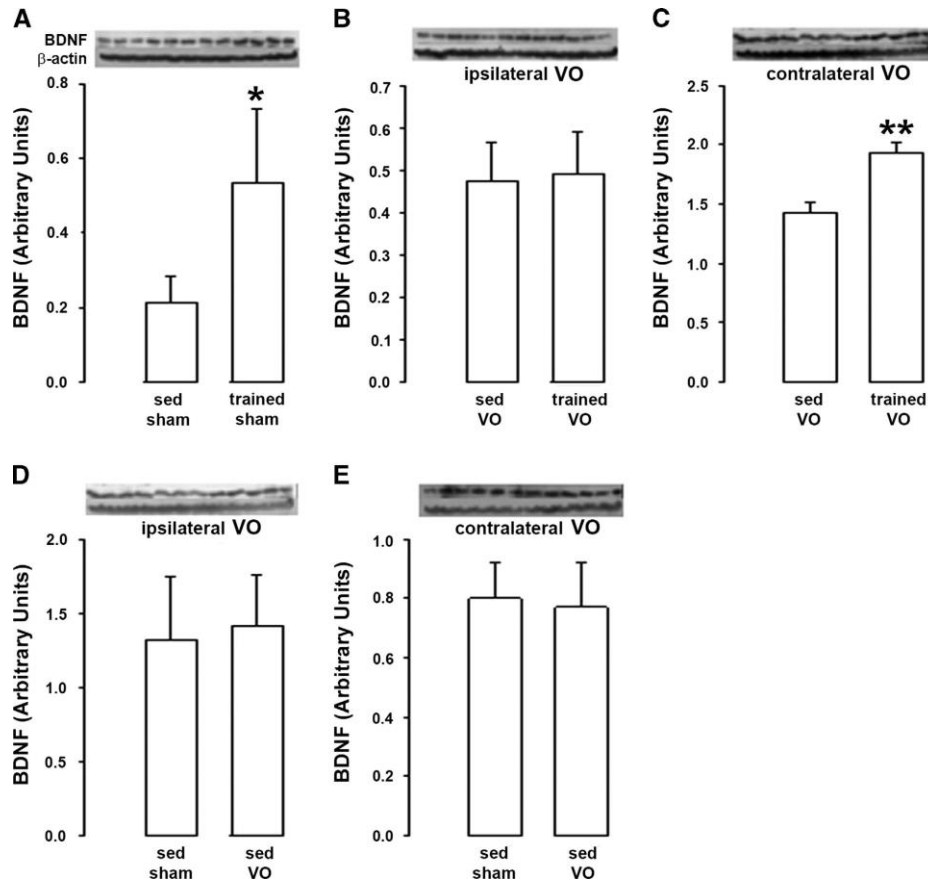


Figure 1. Effect of physical training on brain-derived neurotrophic factor (BDNF) after unilateral common carotid artery occlusion. (A) Effect of training in sham rats, (B) effect of training after ipsilateral VO, (C) effect of training after contralateral VO, (D) proper effect of ipsilateral VO, (E) proper effect of contralateral VO. Values are expressed as mean  $\pm$  s.d. (n 1/46 rats), \*Po 0.05, \*\*Po 0.01 significant difference between groups. Representative immunoblots of mature BDNF (15kDa) and b-actin (42kDa) are shown for corresponding groups. VO, vascular (common carotid artery) occlusion.

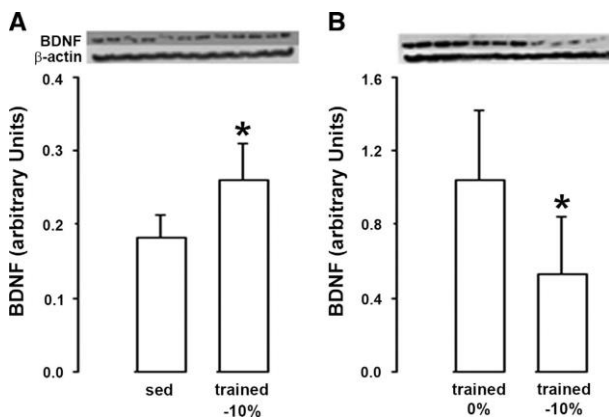


Figure 2. Impact of exercise intensity on brain-derived neurotrophic factor (BDNF). (A) Effect of training with a 10% inclination of the treadmill, (B) differential BDNF levels after physical training with high versus low exercise intensity (0 versus a 10% decline of the treadmill). Values are expressed as mean  $\pm$  s.d. (n 1/46 rats), \*Po 0.05 significant difference between groups. Representative immunoblots of mature BDNF (15kDa) and b-actin (42kDa) are shown for corresponding groups.

with sedentary rats ( $\downarrow$  30% Figure 2A), but in a lesser extent than physical training with high exercise intensity (no inclination of the treadmill,  $\downarrow$  150% see Figure 1A). Thus, BDNF levels in trained rats were significantly lower ( $\downarrow$  50%) for downhill than horizontal training (Figure 2B).

#### Genetic Hypertension Abolished the Effect of Physical Training on Brain-Derived Neurotrophic Factor

Although the increase in BDNF levels induced by training reached  $\uparrow$  114% in WKY rats (Figure 3A), training did not significantly change BDNF levels in SHR (Figure 3B). Moreover, in sedentary rats, BDNF levels were higher ( $\uparrow$  40%) in SHR than WKY (Figure 3C).

#### Physical Training did not Increase Brain-Derived Neurotrophic Factor Levels in N-Nitro-L-Arginine Methyl Ester-Treated Rats

When induced in saline-treated rats, training increased BDNF levels by a factor 2.4 ( $\uparrow$  140% Figure 4A). By contrast, training did not modify BDNF levels when it was induced in L-NAME-treated rats (Figure 4B). Thus, BDNF levels were lower in trained L-NAME-treated rats than in trained saline-treated rats ( $\downarrow$  44% Figure 4C). Of note, no difference in BDNF levels was observed in sedentary rats between L-NAME- and saline-treated rats (Figure 4D).

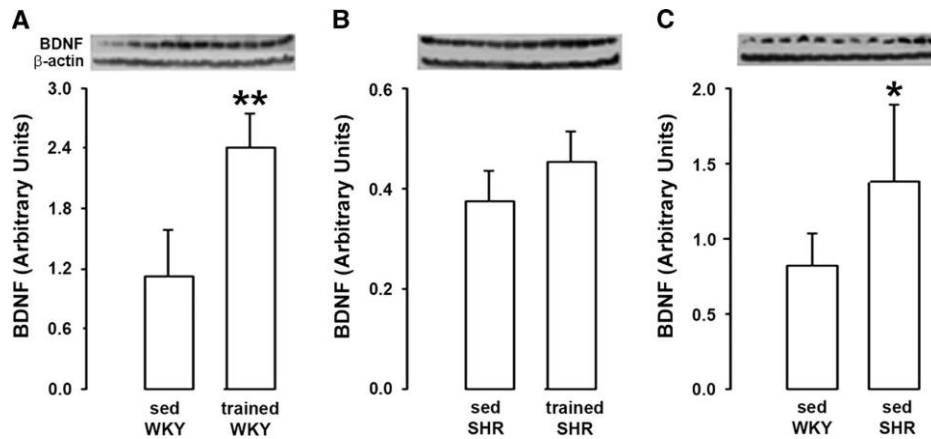


Figure 3. Effect of physical training on brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in genetic hypertension. (A) Effect of training in Wistar-Kyoto (WKY) rats, (B) effect of training in spontaneously hypertensive rats (SHR), (C) proper effect of hypertension. Values are expressed as mean  $\pm$  s.d. (n = 4-6 rats), \**P* < 0.05 significant difference between groups. Representative immunoblots of mature BDNF (15kDa) and b-actin (42kDa) are shown for corresponding groups.

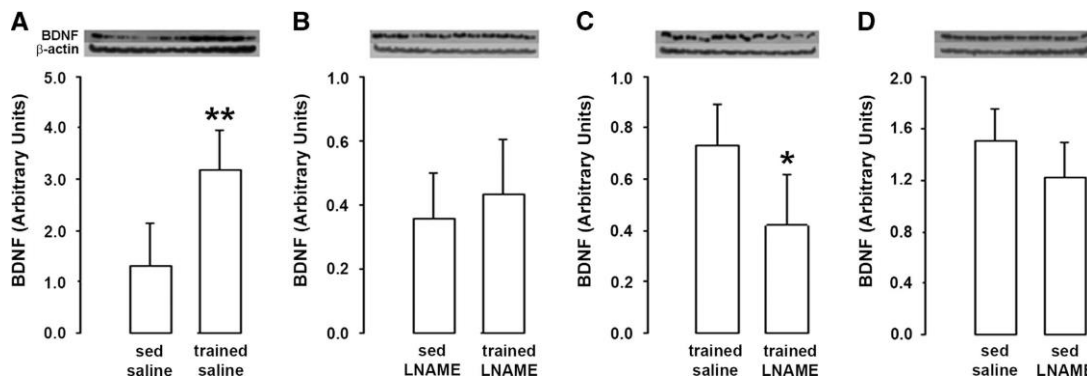


Figure 4. Effect of physical training on brain-derived neurotrophic factor (BDNF) after nitric oxide synthase inhibition. (A) Effect of training in saline-treated rats, (B) effect of training in N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME)-treated rats, (C) differential BDNF levels in L-NAME- versus saline-treated rats after physical training, (D) proper effect of L-NAME treatment. N-nitro-L-arginine methyl ester (60 mg/kg) or saline was administered before each treadmill session. Values are expressed as mean  $\pm$  s.d. (n = 4-6 rats), \**P* < 0.05 significant difference between groups. Representative immunoblots of mature BDNF (15kDa) and b-actin (42kDa) are shown for corresponding groups.

#### Brain-Derived Neurotrophic Factor Levels Match with Synaptophysin Levels

The results are summarized in Figure 5 and Table 1. When induced in rats with normal carotid circulation (sham rats), horizontal training increased SYN levels by  $\approx$  160% (Figure 5A). By contrast, when induced in rats with unilateral common carotid artery occlusion (VO rats), training did not change SYN levels in the hemisphere ipsilateral to occlusion (Figure 5B) and restricted the increase to  $\approx$  58% in the opposite hemisphere (Figure 5C). Moreover, physical training induced an elevation of SYN levels both in WKY rats ( $\approx$  116%, Figure 5D) and SHR ( $\approx$  60%, Figure 5E). By contrast, SYN levels were not changed by training when induced in L-NAME-treated rats (Figure 5F). Like horizontal training, downhill training increased SYN levels (Figure 5G) but to a lesser extent ( $\approx$  47 versus  $\approx$  160% as shown in Figure 5A). Finally, as shown in Figure 5H, SYN levels in sedentary rats were higher in SHR than in WKY rats ( $\approx$  131%).

As shown in Table 1, changes in SYN levels induced by training matched with changes in BDNF levels in all animal groups, except in SHR in which training increased SYN levels ( $\approx$  60%) but not BDNF levels (Figure 3B).

#### DISCUSSION

The major findings of the present study are that (i) elevation of brain BDNF levels evoked by physical training was dependent on exercise intensity and totally abolished by previous occlusion of a common carotid artery, at least in the cortex ipsilateral to the occlusion, (ii) concurrent pharmacological inhibition of NO synthase and genetic hypertension prevented the effect of training on BDNF. Taken together, these findings connect changes in cerebral circulation to training-induced BDNF levels elevation in the brain.

As evoked in the introduction, elevation of BDNF levels in the brain after physical training may involve neuronal hyperactivity occurring during exercise. Therefore, to investigate the contribution of hemodynamics to the effects of training on BDNF, we were concerned with using strategies that would reduce exercise-induced elevation of blood flow in the cerebrovasculature but not reduce exercise-induced neuronal hyperactivity. These conditions were satisfied for model of unilateral carotid occlusion that alters neither basal neuronal activity<sup>17</sup> nor basal BDNF levels (the present results). They were also satisfied with downhill training. Indeed, although neuronal activation is dependent on exercise

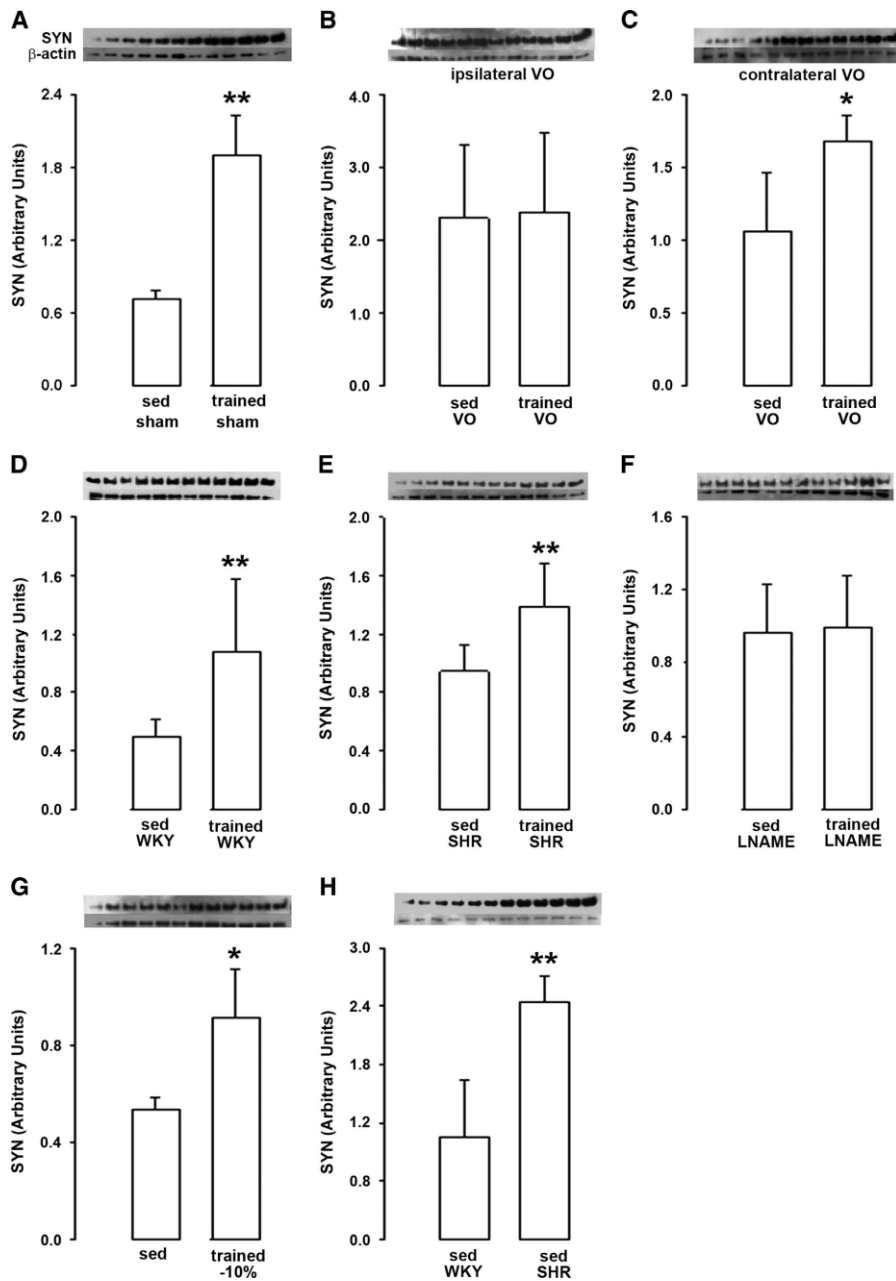


Figure 5 Synaptophysin (SYN) levels. (A) Effect of level training in sham rats, (B) effect of level training after ipsilateral VO, (C) effect of level training after contralateral VO, (D) effect of level training in Wistar-Kyoto rats, (E) effect of level training in spontaneously hypertensive rats (SHR), (F) effect of level training in N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME)-treated rats, (G) Effect of downhill training (A 10% inclination of the treadmill), (H) proper effect of genetic hypertension. Levels of SYN (38 kDa) and b-actin (42 kDa) were measured in tissue in which brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels were determined. Values are expressed as mean  $\pm$  s.d. (n=4 to 6 rats), \*Po 0,05, \*\*Po 0,01 significant difference between the two groups. VO, vascular (common carotid artery) occlusion.

intensity, neuronal hyperactivity is expected to be higher during downhill (that predominantly involves eccentric contraction) than horizontal walking (that involves eccentric-concentric cycles) as suggested from studies that have compared the pattern of neuronal activation between concentric and eccentric contraction.<sup>30,31</sup> Moreover, to further explore the contribution of cerebrovascular blood flow elevation to training effects, we investigated the impact of genetic hypertension and L-NAME treatment on training-induced BDNF levels elevation as pathologic and pharmacological approaches to induce alteration in shear stress

signaling, respectively. In basal conditions (sedentary conditions), cortical BDNF levels were found higher in SHR than in WKY rats, suggesting an interaction between genetic hypertension and brain BDNF production. Consistently, as compared with WKY rats, SHR were previously reported to exhibit higher BDNF levels in the nucleus tractus solitarii<sup>32</sup> and lower levels in the hippocampus.<sup>33</sup> Such a structure-dependent effect of genetic hypertension is a priori not compatible with a negative interaction between hypertension and brain BDNF levels. In accordance with this hypothesis are our results showing no difference in cortical BDNF



**Table 1.** Comparative changes in BDNF and SYN levels induced by physical training

	Effects of horizontal training	
	SYN, % (P value)	BDNF, % (P value)
Sham rats	p 160 (0.004)	p 150 (0.016)
VO rats		
Ipsilateral to VO	None	None
Contralateral to VO	p 58 (0.025)	p 36 (0.004)
WKY rats	p 116 (0.006)	p 114 (0.006)
SHR	p 60 (0.004)	p 21 (NS)
L-NAME-treated rats	None	p 21 (NS)
	Effects of downhill training	
	SYN	BDNF
Controls	p 47 (0.028)	p 40 (0.025)

BDNF, brain-derived neurotrophic factor; L-NAME, N-nitro-L-arginine methyl ester; NS, nonsignificant; SHR, spontaneously hypertensive rats; SYN, synaptophysin; VO, vascular (common carotid artery) occlusion; WKY, Wistar-Kyoto. Physical training consisted in a treadmill activity (30 minutes/day, 18 m/minute, 7 consecutive days) with a horizontal or A 10% decline position of the treadmill. L-NAME was administered (60 mg/kg, intraperitoneal) 1 hour before each exercise session. Results were expressed as the percentage of elevation of SYN and BDNF levels induced by training relative to levels in sedentary rats.

between saline- and L-NAME-treated rats while L-NAME was previously reported to induce hypertension when administered to rats at the dosage used in the present study.<sup>27,28</sup> Further studies are needed to explore the mechanisms underlying higher cortical BDNF levels in sedentary SHR. Regardless of the mechanisms involved, these higher levels cannot however question the validity of the SHR model to investigate whether increased BDNF levels in the brain of trained rats relate to shear stress elevation in the cerebrovasculature and subsequent overproduction of NO during exercise. As shear stress in the cerebrovasculature is relatively constant in sedentary rats, higher BDNF levels in sedentary SHR and the lack of difference in BDNF levels between sedentary L-NAME- and saline-treated rats may suggest that BDNF levels at rest are independent on the basal production of NO by the vascular endothelium. This does not however exclude a control of brain BDNF levels by NO when NO is produced in excess.

The present study is the first to investigate the effect of physical training on BDNF levels in the presence of unilateral carotid occlusion. The results that reported a complete abolition on the effect of training on BDNF levels in the hemisphere ipsilateral to the occlusion and a partial abolition in the opposite hemisphere emphasize the contribution of cerebrovascular flow increase in training-induced BDNF levels elevation in the brain. This is further supported by our results showing that elevation of brain BDNF levels evoked by training was dependent on exercise intensity. Indeed, BDNF levels were lower after downhill than level locomotion activity. Only two previous studies from the same laboratory investigated the effect of downhill training on brain BDNF levels.<sup>34,35</sup> The authors reported no difference in BDNF levels between horizontal and downhill modalities. However, discrepancies between these data and ours are may be because of difference in the modalities of training including the slope of the treadmill (A 29 versus A 10% in our study), training duration (8 weeks versus 7 days in the present study), the regions examined (the hippocampus and the striatum versus the cortex in the

present study), the procedure for BDNF levels measurements (ELISA tests that did not distinguish mature BDNF from its precursor proBDNF and only the mature form of BDNF using western blot analysis in the present study). Anyway, evidence that physical training-induced BDNF levels elevation in the brain is dependent on normal carotid circulation and exercise intensity emphasizes cerebral hemodynamics in the control of cerebral BDNF levels after physical training. This data question the traditional thinking that the unique role of elevation in cerebrovascular flow occurring during exercise serves to meet neuronal metabolic demand. It has to be approached to a previous study in which blood supply to hyperactive regions during exercise was reported to be larger than their metabolic oxygen demand.<sup>36</sup> We think that elevation of cerebrovascular flow during exercise beyond values required to satisfy metabolic needs may be a hitherto physiologic mechanism to induce brain plasticity through the control of brain BDNF levels. As an argument for this, changes in BDNF levels evoked by physical training parallel changes in SYN levels. Indeed, SYN is a biochemical marker of both synaptic density and activity, i.e., two processes underlying brain plasticity.

The emerging question is how changes in cerebral hemodynamics during exercise target brain BDNF levels. The present results support the involvement of endothelium-derived NO. First, we showed that physical training became unable to elevate brain BDNF levels in SHR, a model of endothelial dysfunction and altered production of NO by the endothelium in response to shear stress.<sup>22-24</sup> Second, these effects of genetic hypertension were reproduced by administration of the NO synthase inhibitor L-NAME during physical training. Notably, L-NAME treatment was previously reported to reduce the elevation of brain BDNF levels evoked by free access to a running wheel as a model of physical training.<sup>37</sup> However, as a confounding factor L-NAME treatment was associated with a drastic decrease in the mean running distance. Importantly, in the present study, difference in brain BDNF levels between L-NAME- and saline-treated rats after training cannot be explained by a reduction in exercise duration/intensity, as all the rats were subjected to a same amount and intensity of physical training. Finally, a striking result of the present study was the differential response of SYN to physical training between SHR (p 60%) versus L-NAME-treated rats (no change) while both genetic hypertension and L-NAME treatment annulled the effect of training on BDNF. A possible but speculative explanation may be a high TrkB receptor density in SHR cortex as compared with L-NAME-treated rats cortex.

In conclusion, our results provide converging evidence for a connection between elevation of BDNF levels after physical training and blood flow increases in the cerebrovasculature. This finding paves the way for further advancement in the mechanisms by which training improves brain health and provides a rational basis to optimize brain benefits of physical training. Our results also suggest that optimal modalities of training to improve brain function may differ between healthy beings and patients with endothelial dysfunction or asymptomatic carotid occlusion. Finally, the present study supports the emerging concept that cerebral endothelium is a key tissue linking cerebrovascular function and cognitive processes.<sup>38</sup>

#### DISCLOSURE/CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

#### REFERENCES

- Niebauer J, Cooke JP. Cardiovascular effects of exercise: role of endothelial shear stress. *J Am Coll Cardiol* 1996; 28: 1652-1660.
- Cotman CW, Berchtold NC. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends Neurosci* 2002; 25: 295-301.

- 3 Greenberg ME, Xu B, Lu B, Hempstead BL. New insights in the biology of BDNF synthesis and release: implications in CNS function. *J Neurosci* 2009; 29: 12764–12767.
- 4 Czurko A, Hirase H, Csicsvari J, Buzsáki G. Sustained activation of hippocampal pyramidal cells by 'space damping' in a running wheel. *Eur J Neurosci* 1999; 11: 344–352.
- 5 Querido JS, Sheel AW. Regulation of cerebral blood flow during exercise. *Sports Med* 2007; 37: 765–782.
- 6 Trejo JL, Carro E, Torres-Aleman I. Circulating insulin-like growth factor I mediates exercise-induced increases in the number of new neurons in the adult hippocampus. *J Neurosci* 2001; 21: 1628–1634.
- 7 Wrann CD, White JP, Salogiannis J, Laznik-Bogoslavski D, Wu J, Ma D et al. Exercise induces hippocampal BDNF through a PGC-1 $\alpha$ /FNDC5 pathway. *Cell Metab* 2013; 18: 649–659.
- 8 Ogoh S, Ainslie PN. Regulatory mechanisms of cerebral blood flow during exercise: new concepts. *Exerc Sport Sci Rev* 2009; 37: 123–129.
- 9 Sato K, Ogoh S, Hirasawa A, Oue A, Sadamoto T. The distribution of blood flow in the carotid and vertebral arteries during dynamic exercise in humans. *J Physiol* 2011; 589(Pt 11): 2847–2856.
- 10 Xiong H, Yamada K, Han D, Nabeshima T, Enikolopov G, Camahan J et al. Mutual regulation between the intercellular messengers nitric oxide and brain-derived neurotrophic factor in rodent neocortical neurons. *Eur J Neurosci* 1999; 11: 1567–1576.
- 11 Stroemer RP, Kent TA, Hulsebosch CE. Enhanced neocortical neural sprouting, synaptogenesis, and behavioral recovery with D-amphetamine therapy after neocortical infarction in rats. *Stroke* 1998; 29: 2381–2393, discussion 2393–5.
- 12 Valtorta F, Pennuto M, Bonanomi D, Benfenati F. Synaptophysin: leading actor or walk-on role in synaptic vesicle exocytosis? *Bioessays* 2004; 26: 445–453.
- 13 Prigent-Tessier A, Quirié A, Maguin-Gaté K, Szostak J, Mossiat C, Nappéy M et al. Physical training and hypertension have opposite effects on endothelial brain-derived neurotrophic factor expression. *Cardiovasc Res* 2013; 100: 374–382.
- 14 Quirié A, Hervieu M, Garnier P, Demougeot C, Mossiat C, Bertrand N et al. Comparative effect of treadmill exercise on mature BDNF production in control versus stroke rats. *PLoS One* 2012; 7: e44218.
- 15 De Ley G, Nshimyumuremyi JB, Leusen I. Hemispheric blood flow in the rat after unilateral common carotid occlusion: evolution with time. *Stroke* 1985; 16: 69–73.
- 16 Busch HJ, Buschmann JR, Mies G, Bode C, Hossmann KA. Arteriogenesis in hypoperfused rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003; 23: 621–628.
- 17 Ances BM, Greenberg JH, Detre JA, Dietrich WD. Acute carotid occlusion alters the activation flow coupling response to forepaw stimulation in a rat model. *Stroke* 2000; 31: 955–960.
- 18 Moraine JJ, Lamotte M, Berré J, Niset G, Leduc A, Naeije R. Relationship of middle cerebral artery blood flow velocity to intensity during dynamic exercise in normal subjects. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1993; 67: 35–38.
- 19 Ide K, Pott F, Van Lieshout JJ, Secher NH. Middle cerebral artery blood velocity depends on cardiac output during exercise with a large muscle mass. *Acta Physiol Scand* 1998; 162: 13–20.
- 20 Bhambhani Y, Malik R, Mookerjee S. Cerebral oxygenation declines at exercise intensities above the respiratory compensation threshold. *Respir Physiol Neurobiol* 2007; 156: 196–202.
- 21 Gault ML, Willems ME. Aging, functional capacity and eccentric exercise training. *Aging Dis* 2013; 4: 351–363.
- 22 Yamakawa H, Jezova M, Ando H, Saavedra JM. Normalization of endothelial and inducible nitric oxide synthase expression in brain microvessels of spontaneously hypertensive rats by angiotensin II AT1 receptor inhibition. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003; 23: 371–380.
- 23 Magyar MT, Valikovics A, Czuriga I, Csiba L. Changes of cerebral hemodynamics in hypertensives during physical exercise. *J Neuroimaging* 2005; 15: 64–69.
- 24 Oyama N, Yagita Y, Sasaki T, Omura-Matsuoka E, Terasaki Y, Sugiyama Y et al. An angiotensin II type 1 receptor blocker can preserve endothelial function and attenuate brain ischemic damage in spontaneously hypertensive rats. *J Neurosci Res* 2010; 88: 2889–2898.
- 25 Tabrizi-Fard MA, Fung HL. Pharmacokinetics and steady-state tissue distribution of L- and D-isomers of nitroarginine in rats. *Drug Metab Dispos* 1996; 24: 1241–1246.
- 26 Kidd EJ, Michel AD, Humphrey PP. Autoradiographic distribution of [<sup>3</sup>H]-NG-nitro-arginine binding in rat brain. *Neuropharmacology* 1995; 34: 63–73.
- 27 Wallerath T, Witte K, Schäfer SC, Schwarz PM, Prellwitz W, Wohlfart P et al. Down-regulation of the expression of endothelial NO synthase is likely to contribute to glucocorticoid-mediated hypertension. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 13357–13362.
- 28 Bartunek J, Weinberg EO, Tajima M, Rohrbach S, Katz SE, Douglas PS et al. Chronic N(G)-nitro-L-arginine methyl ester-induced hypertension: novel molecular adaptation to systolic load in absence of hypertrophy. *Circulation* 2000; 101: 423–429.
- 29 Demougeot C, Prigent-Tessier A, Marie C, Berthelot A. Arginase inhibition reduces endothelial dysfunction and blood pressure rising in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 2005; 23: 971–978.
- 30 Fang Y, Semonow V, Sahgal V, Xiong F, Yue GH. Distinct brain activation patterns for human maximal voluntary eccentric and concentric muscle actions. *Brain Res* 2004; 1023: 200–212.
- 31 Kwon YH, Park JW. Different cortical activation patterns during voluntary eccentric and concentric muscle contractions: an fMRI study. *NeuroRehabilitation* 2011; 29: 253–259.
- 32 Vermehren-Schmaedick A, Jenkins VK, Hsieh HY, Brown AL, Page MP, Brooks VL et al. Upregulation of brain-derived neurotrophic factor expression in nodose ganglia and the lower brainstem of hypertensive rats. *J Neurosci Res* 2013; 91: 220–229.
- 33 Pietranera L, Lima A, Roig P, De Nicola AF. Involvement of brain-derived neurotrophic factor and neurogenesis in oestradiol neuroprotection of the hippocampus of hypertensive rats. *J Neuroendocrinol* 2010; 22: 1082–1092.
- 34 Aguiar Jr AS, Tuon T, Pinho CA, Silva LA, Andrezza AC, Kapczinski F et al. Mitochondrial IV complex and brain neurotrophic derived factor responses of mice brain cortex after downhill training. *Neurosci Lett* 2007; 426: 171–174.
- 35 Aguiar Jr AS, Speck AE, Prediger RD, Kapczinski F, Pinho RA. Downhill training upregulates mice hippocampal and striatal brain-derived neurotrophic factor levels. *J Neural Transm* 2008; 115: 1251–1255.
- 36 Leithner C, Royl G, Offenhauser N, Fächtermeier M, Kohl-Bareis M, Villringer A. Pharmacological uncoupling of activation induced increases in CBF and CMRO<sub>2</sub>. *J Cereb Blood Flow Metab* 2010; 30: 311–322.
- 37 Chen MJ, Ivy AS, Russo-Neustadt AA. Nitric oxide synthesis is required for exercise-induced increases in hippocampal BDNF and phosphatidylinositol 3' kinase expression. *Brain Res Bull* 2006; 68: 257–268.
- 38 Bolduc V, Thorin-Trescases N, Thorin E. Endothelium-dependent control of cerebrovascular functions through age: exercise for healthy cerebrovascular aging. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2013; 305: H620–H633.



**II) Deuxième publication- Les taux cérébraux de BDNF sont dépendants du monoxyde d'azote dérivé de l'endothélium des vaisseaux cérébraux**

**Titre:**

Brain BDNF levels are dependent on cerebrovascular endothelium-derived nitric oxide

**Auteurs:**

Banoujaafar Hayat, Monnier Alice, Mossiat Claude, Quirié Aurore, Garnier Philippe, Prigent-Tessier Anne, Marie Christine

**Journal:**

*European Journal of Neurosciences*  
*soumission*

## Résumé des travaux

### 1. Contexte et Objectifs

Notre première étude a donné des arguments forts en faveur d'un lien entre changement de l'hémodynamique cérébrale (augmentation du flux dans les vaisseaux de la circulation cérébrale) et production de BDNF induite par l'entraînement physique. Cependant, les mécanismes sous-jacents ne sont pas connus. Sachant que les performances cognitives sont altérées en cas de pathologies associées à une dysfonction endothéliale (dont la caractéristique est une moindre production de NO en réponse à une augmentation du flux sanguin) et qu'il existe une interaction bidirectionnelle entre NO et BDNF, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle les taux de BDNF dans le cerveau étaient positivement régulés par le NO produit par les microvaisseaux cérébraux. Cette idée s'appuie sur le concept d'unité neurovasculaire qui met en avant la communication bidirectionnelle entre cellules endothéliales (productrice de NO) et neurones (productrices de BDNF).

### 2. Protocole expérimental

Nous avons modulé chez le rat la production de NO par les microvaisseaux cérébraux et étudié la conséquence sur les taux cérébraux de BDNF. Différentes stratégies ont été utilisées pour moduler la production de NO:

- a) clampage irréversible des 2 carotides qui réduit la production de NO.
- b) induction d'un entraînement physique (activité sur tapis roulant horizontal, 30 min/j, 18m/min, 7 j consécutifs) qui augmente la production de NO.
- c) induction d'un entraînement physique chez le rat dont les 2 artères carotides communes ont été au préalable définitivement occluses de façon à annuler les effets de l'entraînement sur la production de NO.

La production de NO par les microvaisseaux cérébraux a été estimée par la mesure dans le cortex et l'hippocampe de l'expression de la NO synthase endothéliale (eNOS) totale et de la eNOS phosphorylée sur la sérine en position 1177 (la phosphorylation sur ce site est induite par l'augmentation du flux sanguin et s'accompagne d'une augmentation de la production par un facteur 10). Le dosage du BDNF mature a été réalisé dans les mêmes régions cérébrales et couplé à la détermination de l'expression des récepteurs TrkB et des récepteurs TrkB

phosphorylés (marqueur de l'activation par le BDNF). Les protéines d'intérêt ont été mesurées par techniques de Western blot.

Dans une dernière expérience, nous avons étudié dans quelle mesure l'exposition de coupes de cortex cérébral pendant 24h à un donneur de NO, la trinitrine, était capable d'augmenter les taux de BDNF.

### **3. Principaux résultats**

L'expression du BDNF et de la forme phosphorylée de eNOS sont réduites par l'occlusion bicarotidienne et augmentées par l'entraînement physique avec une corrélation positive entre les variations de eNOS et de BDNF ( $r = 0,679$ ). L'association entraînement physique + clampage bicarotidien ne modifie ni les expressions de eNOS ni de BDNF. Chez les rats soumis au clampage vasculaire, les faibles taux de BDNF coexistent avec une forte élévation des taux des récepteurs TrkB qu'ils soient ou pas phosphorylés. Par ailleurs, l'exposition de coupes à la trinitrine augmente les taux de BDNF. L'ensemble de ces résultats suggèrent que les taux de BDNF dans le cerveau sont dépendants de la production de NO par l'endothélium des microvaisseaux cérébraux.

Title:

Brain BDNF levels are dependent on cerebrovascular endothelium-derived nitric oxide

Running head:

Brain BDNF and cerebrovascular NO

Authors:

Banoujaafar Hayat<sup>1</sup>, Monnier Alice<sup>1, 2</sup>, Mossiat Claude<sup>1</sup>, Quirié Aurore<sup>1</sup>, Garnier Philippe<sup>1, 3</sup>, Prigent-Tessier Anne<sup>1</sup>, Marie Christine<sup>1</sup>.

Affiliations :

1 Unité INSERM U1093 Cognition, Action et Plasticité Sensorimotrice, Univ. Bourgogne Franche Comté, F-21000, Dijon, France.

2 Department of rehabilitation, University Hospital, Dijon, France

3 IUT de Dijon, Département de Génie Biologique, Université de Bourgogne, Dijon, France.

Address for correspondence:

Prof. Christine MARIE

INSERM U1093 Cognition, Action et Plasticité Sensorimotrice

UFR Sciences de Santé

7 Boulevard Jeanne d'Arc

21079 Dijon cedex, France

Tél : (33) 3 80 39 32 25 Fax : (33) 3 80 39 32 27

E-mail : christine.marie@u-bourgogne.fr

**Abstract**

Scientific evidence continues to demonstrate a link between endothelial function and cognition. Beside, several studies support the idea of an interplay between nitric oxide (NO) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF), a neurotrophin largely involved in cognition. Therefore, the present study investigated the link between cerebral endothelium-derived NO and BDNF signaling. For this purpose, levels of BDNF and the phosphorylated form of endothelial NO synthase at serine 1177 (p-eNOS) were simultaneously measured in the cortex and hippocampus of rats subjected to either bilateral common carotid occlusion (n=6), physical exercise training (n=6) or combination of both (n=6) as experimental approaches to modulate flow-induced NO production by the cerebrovasculature. Tropomyosin-related kinase type B (TrkB) receptors and its phosphorylated form at tyrosine 816 (p-TrkB) were run in parallel. We also measured BDNF levels in brain slices exposed to the NO donor glyceryl trinitrate.

Our results reported increased p-eNOS and BDNF levels after training and decreased levels after vascular occlusion as compared to corresponding controls with a positive correlation between changes in p-eNOS and BDNF ( $r = 0.679$ ). When induced after vascular occlusion, training did not change levels of these proteins. Supporting a causal relationship between NO and BDNF, the NO donor increased BDNF levels in brain slices. Moreover, both vascular occlusion and training resulted in increased TrkB and p-TrkB levels, while no change was observed with the combination. We conclude that brain BDNF signaling is dependent on cerebral endothelium-derived NO production.

**Key words:** BDNF, TrkB, nitric oxide, physical training, carotid arteries occlusion



## Introduction

The endothelium that is a monolayer of epithelial cells in contact with the blood is an important source of nitric oxide (NO). Endothelium-derived NO is synthesized by the endothelial NO synthase (eNOS) isoform and secreted in proportion to eNOS activity since NO is released immediately after its synthesis. Increase in blood flow and consequently in shear stress (the frictional force induced by the movement of blood on the endothelial cells) is one of the most efficient mechanisms to stimulate eNOS-derived NO production (Noris et al., 1995) via phosphorylation of the enzyme at serine 1177 (Dimmeler et al., 1999; Figueroa et al., 2013). NO produced by the endothelium is an important mediator of endothelium-dependent vasodilatation and also helps to prevent thrombosis. Thus, patients with impaired flow-dependent dilatation as an index of impaired endothelial NO production including hypertensive and diabetic patients (Paniagua et al., 2001; Henry et al., 2004) are at risk for cardiovascular diseases (Nathan et al., 2005). It is noteworthy that these patients are also at risk for cognitive decline and Alzheimer disease (Ott et al., 1999; Musicco et al., 2009; Wang et al., 2010; Reitz et al., 2011; Yaffe et al., 2014). As NO produced by endothelium of the cerebral arterioles have been largely implicated in the regulation of cerebral blood flow (Paniagua et al., 2001), it is logic to suspect the involvement of deficiency in blood supply in the link between impaired cognition and impaired endothelial NO production.

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF), a neurotrophin present in large amount in the brain, plays a crucial role in cognition, neuroplasticity and long term potentiation (LTP) (Cunha et al., 2010). These positive effects relate to phosphorylation at tyrosine 816 of neuronal full-length TrkB (tropomyosin-related kinase type B) receptors by the mature form of BDNF. Beside, NO has been proposed to be

involved in neuroplasticity and LTP (Haul et al., 1999; Doreulee et al., 2003; Katusic & Austin, 2014) and NO signals originating from endothelium were recently shown to be required for LTP (Hopper & Garthwaite, 2006). From these data raises the possibility that impaired cognition in patients with impaired endothelial NO production might relate to a control of brain BDNF levels by NO derived from cerebral endothelial cells. Supporting a connection between brain BDNF levels and endothelium-derived NO, stroke-induced elevation in brain BDNF levels was reported to be lower in eNOS knock out animals than in wild type littermate (Chen et al., 2005; Cui et al., 2013). Likewise, pharmacological inhibition of NO synthases was shown to blunt physical exercise-induced elevation of brain BDNF levels (Chen et al., 2006; Banoujaafar et al., 2014). However, in these above studies, the presence of hypertension and appearance of compensatory mechanisms in eNOS knock out mouse (Ortiz & Garvin, 2003) as well as the use of a non-selective NOS inhibitor complicate the data interpretation.

The aim of the present study was to investigate the role of NO derived from the cerebrovasculature on brain BDNF level signaling. For this purpose, eNOS phosphorylated at serine 1177 (p-eNOS) as a marker of eNOS activity and BDNF levels were simultaneously measured in the cortex and hippocampus of rats before and after occlusion of the two common carotid arteries, physical exercise training or combination of both as experimental approaches to modulate cerebrovascular eNOS activity. TrkB and TrkB phosphorylated at tyrosine 816 (p-TrkB) receptors were run in parallel. We also measured BDNF levels in brain slices exposed to glyceryl trinitrate as a NO donor.

## Material and methods

### Animals

Experiments were conducted in 97 adult male Wistar rats (330-350 g, Depré, Saint-Doulchard, France). Animals were maintained in a temperature-controlled room, on a 12/12 hours light/dark cycle with food and water ad libitum. They were housed 5 per cage to maintain social interaction. All experiments (license 21CAE102, French department of Agriculture) were approved by the local ethic committee. They conformed to the European Convention for Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes. All the rats were familiarized with the experimenter and a treadmill apparatus for a 5 days-long period (2 times a day) in order to minimize novelty stress. Once familiarized, rats were assigned to bilateral carotid occlusion (2VO) or the sham procedure. Physical exercise training (EX) was initiated three days after the sham procedure or 2VO induction. Anesthesia was induced by chloral hydrate (400 mg/kg, i.p.).

### 2VO

After anesthesia and a midline ventral incision of the neck, the 2 common carotid arteries were exposed, separated carefully from the vagus-sympathic trunks and definitely occluded. The right vessel was occluded 30 seconds after the left vessel. Then, the incision was sutured. Sham-operated controls received the same surgical procedure with no vessel ligation. Rats were replaced in their home cage 24h after the surgical procedure.

### Physical exercise training

Physical exercise training (EX) consisted in a daily walking activity (18m/min) on a horizontal treadmill apparatus (model Exer-3/ 6, Linton Instrumentation, Norfolk, UK) for 7 consecutive days. We previously reported that this modality of EX resulted in a two-fold elevation in BDNF levels in the cortex (Quirie et al., 2012; Banoujaafar et al., 2014). Corresponding sedentary rats (SED) were kept in their home cage at the proximity of the treadmill. Rats were euthanized 24h after the last session of treadmill.

### Preparation of brain slices to study the effect of a NO donor

Brain slices were prepared from two additional rats (without familiarization on the treadmill and sham procedure). After animal anesthesia, brains were transcardially perfused with saline and gently removed from the skull. Slices (1x1 mm) were immediately prepared from the entire cortex using a Mc Ilwain tissue chopper and then quickly mixed and placed (50mg/ml) in wells containing a culture medium (M199 medium supplemented with 0.1 mg/L L-glutamine, 30% fetal bovine serum, 2% glucose, 2% amino acids and 1% antibiotic solution). Slices were incubated at 37°C in a 95% O<sub>2</sub>- 5% CO<sub>2</sub> atmosphere for 24h. The NO donor glyceryl trinitrate (Merck-Millipore) was added (0, 5, 10 µM, n=4 wells for each concentration) at the beginning of the incubation period.

### Histochemistry

Histochemical experiments were performed on day 10 after induction of 2VO or sham procedure. After anesthesia and a transcardial perfusion of the brain with saline and

then with a 4% paraformaldehyde (PFA) solution, the brains were removed and postfixed in 4% PFA during 24 h. Then, the brains were embedded in paraffin. Coronal slices (7 µm thick) were deparaffinized, rehydrated and stained with cresyl violet (0.4 %) and coverslipped in Eukitt mounting medium. Digital images of the sections were captured with a camera equipped microscope (Eclipse E600, NIKON, objectives x10 for sensorimotor cortex and x40 for hippocampus) coupled with a light source (Super High Pressure Mercury Lamp). Neuronal count (expressed as neurons/ mm<sup>2</sup>) was performed by two different blinded experimenters in the CA1 region (50 µm x 100 µm) of the hippocampus and in the sensorimotor cortex (within a vertical area of 1.4 mm x 0.2 mm). Neuronal count was performed in both hemispheres.

#### Western blot Analysis

Western blot analysis was performed on homogenates prepared from incubated brain slices and from two brain regions involved in cognition (the sensorimotor cortex and hippocampus). These regions were collected in anesthetized rats after transcardial perfusion of the brain with saline. They were homogenized in 7 volumes of lysis buffer [bi-distilled water containing 100 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1% triton X-100, 1% protease inhibitors, pH 7.4 (Sigma P8340)]. Then, the total protein extracts were sonicated and centrifuged at 14,000×g for 20 min. An aliquot of supernatant was kept for protein measurement (Lowry method or nanodrop spectrophotometer for brain slices) and the remaining protein extracts were aliquoted and stored at -80°C. Equal amounts of proteins were dissolved in Laemmli solution (62.5 mM Tris–HCl (pH 6.8), 2% SDS, 10% glycerol, 0.001% bromophenol blue) with 2-mercaptoethanol 5% and were heated at 85°C for 10 min. Proteins were separated

using a 8% (p-TrkB), 10% (p-eNOS, eNOS and TrkB) or 12% (BDNF) SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred electrophoretically onto a polyvinylidene fluoride membrane (0.45  $\mu\text{m}$  pore size for p-TrkB and 0.20  $\mu\text{m}$  for other proteins) in cold transfer buffer [10 mM NaHCO<sub>3</sub>, 3 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH 9.9) and 20% methanol]. The membranes were then incubated overnight at 4°C in 7.5% BSA (p-TrkB and p-eNOS) or in 5% non-fat dry milk (BDNF, TrkB and eNOS) in a Tris-buffered saline (TBS) solution (20 mM Tris, 137 mM NaCl, HCl, pH 7.6) containing 0.1% Tween 20 to block unspecific binding. Blots were probed with anti-BDNF (1/3,000 in 5% non-fat dry milk, rabbit monoclonal, 3160-1, Epitomics, Souffelweyersheim, France), anti-p-TrkB (1/4,000 in 2.5% BSA, Y816, rabbit polyclonal, ab175173, Abcam, Cambridge, UK), anti-full length-TrkB (1/1,000, mouse monoclonal, 610102, BD Biosciences, Franklin Lakes, US), anti-p-eNOS (1/1,000, pS1177, mouse monoclonal, 612393, BD Biosciences, Allschwil, Switzerland), anti-eNOS (1/2,500, mouse monoclonal, 610297, BD Biosciences, Allschwil, Switzerland) and anti- $\beta$ -actin (1/5,000, mouse monoclonal, A5441, Sigma-Aldrich, Saint Quentin-Fallavier, France). The membranes were washed with TBS-0.1% Tween 20 and then incubated for 2h (Room temperature) with either horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgGs or anti-rabbit IgGs (1/30,000 to 1/160,000 according to the protein, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Interchim, France). Protein-antibody complexes were visualized using the enhanced chemiluminescence Western blotting detection system (ECL+, GE Healthcare, Orsay, France). BDNF (15 kDa), full length TrkB receptor and its phosphorylated form (145 kDa), e-NOS and p-eNOS (130 kDa) and  $\beta$ -actin (42 kDa) band densities were determined by scanning densitometry (GS-800, Bio-rad, Ivry sur Seine, France). A computer-based imaging system (Quantity One, Bio-rad, Ivry sur Seine, France) was used to measure the relative optical

density of each specific band. eNOS and p-eNOS on the one hand and TrkB and p-TrkB receptors on the other hand were run on separate gels as a result of difference in experimental conditions between the phosphorylated and unphosphorylated proteins.

Protein levels in brain regions were analyzed in the following 4 groups of rats (n=6, each): SHAM EX (sham operated rats subjected to EX on day 3 after surgery), SHAM SED (sham operated rats not subjected to EX), 2VO EX (2VO rats subjected to EX on day 3 after vascular occlusion), 2VO SED (2VO rats not subjected to EX). The effect of EX, 2VO and EX in 2VO rats was assessed from differences between SHAM SED and SHAM EX groups, between SHAM SED and 2VO SED groups, and between 2VO SED and 2VO EX groups, respectively. The 2 groups of interest were analyzed on a same gel. Such a procedure as compared to a simultaneous analysis of the four groups of rats on a same gel avoids repeating normalizations to a control sample and subsequent multiplication of approximations. It also offers the opportunity to reveal even a small difference between groups as well as to assess inter-individual variability in a given group. Importantly, the appropriate amounts of total proteins to be analyzed were determined from a concentration (increasing amounts of proteins) / response (optical density of the band) curves from two rats belonging each to a group (on a same gel). The impact of the each concentration of the NO donor was also assessed on separate gels. All gels were run in triplicate.  $\beta$ -actin was used as internal standard. Data were expressed as arbitrary units and were calculated from a representative gel.

## Statistical analysis

Results were expressed by mean  $\pm$  standard deviation (SD). Statistical analysis between two groups was performed using parametric t-test or non-parametric Mann–Whitney's test, depending on normality and equal variance tests. The relationship between two variables was investigated using the Pearson's correlation coefficient because of the normal distributed data. Differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

## Results

No mortality was observed after the sham procedure. By contrast, 2VO resulted in high mortality rates especially in the first 24h following occlusion. Indeed, mortality rate was 22.5%, 72.5% and 75% at 6h, 24h and 48h post-occlusion. This high mortality likely related to the quasi-concomitant artery occlusion. Indeed, no mortality was previously reported when 2VO was induced with a delay (7 days) between occlusion of the two arteries (Cechetti et al., 2010). However, rats surviving from 2VO showed no sign of brain dysfunction as assessed from a gross visual inspection of neurological status and were as able as sham-operated rats to walk on the treadmill confirming a gradual recovery of cerebral blood flow after 2VO (Farkas et al., 2007).

### 1) Opposite effects of 2VO and EX on p-eNOS and BDNF levels

The results are summarized in Fig.1 (white bars for the cortex and grey bars for the hippocampus). As expected, p-eNOS levels were decreased by 2VO (Fig.1A) and



increased by EX (Fig.1B) regardless the region examined. Notably, 2VO did not change eNOS levels (Fig.1C) while EX increased it only in the hippocampus (Fig.1D). Like p-eNOS levels, BDNF levels are decreased by 2VO (Fig.1E) and increased by EX (Fig.1F) regardless the region examined. Importantly, 2VO was previously reported to reduce BDNF levels in the hippocampus (Lee et al., 2004; Zheng et al., 2008; Damodaran et al., 2014; Sakr et al., 2014) but at a late stage when neuronal death already occurred. In the present study, neuronal morphology was altered by 2VO neither in the cortex nor in the hippocampus as shown in Fig.2. Furthermore, the number of morphologically-apparent intact neurons did not differ between sham rats (n=5) and 2VO rats (n=3). In the cortex, the number per mm<sup>2</sup> of morphologically intact neurons was  $1401 \pm 106$  in sham operated rats and  $1256 \pm 96$  in rats exposed to 2VO. Corresponding values for the hippocampus were  $4427 \pm 207$  and  $4610 \pm 274$ . Thus, decreased BDNF levels elicited by 2VO did not relate to neuronal loss (data not shown).

## 2) Brain BDNF levels are controlled by NO-derived from the cerebrovasculature production

In order to investigate the potential control of brain BDNF levels by cerebrovascular NO, we first explored the association between changes in p-eNOS and BDNF expression elicited by 2VO and EX. For this purpose, individual p-eNOS and BDNF values in 2VO SED and SHAM EX rats (cortical and hippocampal data) were expressed as percentage of the mean of control values (SHAM SED). When changes in p-eNOS expression induced by 2VO and EX (either in sham or 2VO rats) were plotted against corresponding changes in BDNF expression, a strong linear correlation ( $r=0.679$ ,  $p<0.001$ ) was observed between the 2 parameters (Fig.3).

Then, we explored to what extent prevention of EX-induced elevation in eNOS activity by the cerebrovasculature did abolish the normal effect (elevation) of EX on brain BDNF levels. For this purpose, EX was started 3 days after the definitive ligation of the common carotid arteries. The results are shown in Fig.4. As expected, when induced in 2VO rats, EX changed neither p-eNOS (Fig.4A) nor eNOS (Fig.4B) levels whatever the brain region considered. Furthermore, prevention of EX-induced elevation in p-eNOS levels coincided with the abolition of EX-induced elevation in brain BDNF levels. Thus, BDNF levels in both regions did not differ between 2VO SED and 2VO EX (Fig.4C). Lastly, to explore whether the association that we observed between changes in p-eNOS and BDNF did sign a causal relationship, brain slices were exposed to an NO donor. As shown in Fig.5, incubation of brain slices with glyceryl trinitrate at both 5  $\mu$ M and 10  $\mu$ M enhanced BDNF levels.

### 3) Both 2VO and EX elevate TrkB and p-TrkB receptors levels

BDNF signaling involves phosphorylation of full-length TrkB receptors at tyrosine 816 (p-TrkB). Therefore, we explored the impact of 2VO, EX and combination of both on TrkB and p-TrkB receptors levels (Fig.6). Both TrkB (Fig.6A) and p-TrkB (Fig.6B) levels were increased by 2VO. EX had the same impact on TrkB (Fig.6C) and p-TrkB (Fig.6D). By contrast, the combination 2VO+ EX changed neither TrkB (Fig.6E) nor p-TrkB (Fig.6E) levels.

## Discussion

The mains results of the present study are that i) changes in cerebrovascular eNOS activity induced by common carotid artery occlusion (2VO) or physical exercise

training (EX) translated into parallel changes in brain BDNF levels, ii) the exposure of brain slices to the NO donor glyceryl trinitrate increased BDNF levels, iii) brain levels of TrkB and TrkB phosphorylated at tyrosine 816 (p-TrkB) were increased by both 2VO and EX but not by the combination 2VO+EX.

#### Methodological consideration

Endothelial cells respond to blood flow increase by elevation of NO production through phosphorylation of eNOS at serine 1177 (p-eNOS<sup>ser1177</sup>). It is noteworthy that NO production by p-eNOS<sup>ser1177</sup> was shown to be more than 10 times higher than NO production by the unphosphorylated form of eNOS (Corson et al., 1996). Thus, changes in p-eNOS<sup>ser1177</sup> expression appear to be a reliable indicator of important changes in NO production by endothelial cells. In the present study, eNOS activity by cerebral endothelial cells was assessed from the measurements of p-eNOS<sup>ser1177</sup> expression in brain (cortical and hippocampal) homogenates. This procedure was preferred to measurements in microvessels isolated from these regions because it allows the measurement of both p-eNOS and BDNF levels in the same samples and is consequently particularly suited to study associations between these 2 parameters. Importantly, p-eNOS<sup>ser1177</sup> levels in homogenates prepared from the cortex and the hippocampus must be considered as a reliable index of p-eNOS<sup>ser1177</sup> expression by the cerebral endothelium since in these regions eNOS mRNA and proteins are found in endothelial cells only (Stanarius et al., 1997; Lin et al., 2007).

Modulation of p-eNOS<sup>ser1177</sup> levels was achieved by EX that results in blood flow elevation in the cerebrovasculature during each bout of exercise (Whyte & Laughlin,

2010) and by 2VO model that results in an abrupt fall in cerebral blood flow followed by a progressive recovery of blood supply to the brain (Farkas et al., 2007). Traditionally, 2VO maintained for 4 to 8 weeks is used to mimic pathogenesis of Alzheimer Disease (Zhao & Gong, 2015). In the present study, vascular occlusion was shortened to 10 days, thus offering the opportunity to assess associations between eNOS-derived NO and brain BDNF without introducing neuronal degeneration as a confounding factor. Indeed, with these conditions of occlusion, neuronal count performed in the cortex and the hippocampus did not differ between 2VO and sham rats (our results and (Pappas et al., 1996)). Accordingly, the loss in brain BDNF levels induced by 2VO for 10 days cannot be due to neuronal degenerative processes.

#### Control of brain BDNF levels by NO

Experiments conducted on culture of neuronal cells and neural progenitor cells exposed to BDNF, NO donors or NO synthase inhibitors support the idea of a complex interplay between NO and BDNF as recently reviewed by Biojone et al (2015). For instance, while BDNF upregulates neuronal NOS (nNOS) expression or NO production (Samdani et al., 1997), NO produced by neurons negatively modulates BDNF production (Xiong et al., 1999; Canossa et al., 2002; Pinnock & Herbert, 2008; Hsieh et al., 2010). To the best of our knowledge, the potential connection between eNOS and BDNF has never been explored. Here, we provide arguments for NO-derived from cerebral endothelial cells as a regulator of brain BDNF levels. Indeed, our results have revealed that changes in p-eNOS<sup>ser1177</sup> levels evoked by EX and 2VO translate into parallel changes in brain BDNF levels and that prevention of EX-induced elevation in p-eNOS levels abolished EX-induced BDNF

upregulation in these regions. Consistent with a causal relationship between NO production by the cerebrovasculature and brain BDNF levels, we showed for the first time that the exposure of brain slices to a NO donor results in elevation of BDNF levels. A positive control of brain BDNF levels by cerebrovascular eNOS activity apparently contrasts with the negative control by nNOS-derived NO and suggest that eNOS- and nNOS-derived NO exert opposite effects on BDNF levels. Assuming that NO output is phasic for nNOS and tonic for eNOS, it is possible that the control of brain BDNF levels by NO may be dependent on the NO concentration in neurons and the time course of NO exposure. Consistent with this, transfection of neurons with eNOS was reported to result in BDNF upregulation (Li et al., 2014).

#### Control of TrkB receptors by NO

To the best of our knowledge, studies designed to explore the effect of NO on TrkB receptors are lacking. In the present study, evidence that both EX and 2VO upregulate brain TrkB receptors despite their opposing effect on cerebrovascular eNOS activity do not support a direct effect of cerebrovascular NO on cerebral TrkB synthesis. Increased brain TrkB levels in response to physical training is not new and likely relates to training-induced neuronal hyperactivity (Czurko et al., 1999) since TrkB protein and mRNA are regulated by depolarization of neurons (Kingsbury et al., 2003). By contrast, the impact of 2VO on TrkB has never been explored. Evidence marked elevation in brain TrkB levels after may be seen as a mean to cope with low BDNF levels in 2VO rats even though the underlying mechanisms remain to be explored.

Assuming that cognition is improved by short-term physical training (Vaynman et al., 2004) and deficient after 2VO for 10 days (Shu et al., 2013; Damodaran et al., 2014), the more surprising and unexpected result of the present study was that both EX and 2VO resulted in an increase in brain p-TrkB levels. This data questions the reliability of the measurement of brain p-TrkB levels to explore BDNF-dependent neuroplasticity in rats subjected to 2VO and raises the possibility that 2VO elicits posttranslational changes of p-TrkB receptors, resulting in aberrant activation of cellular pathways downstream to TrkB activation. Of interest, from a bioinformatics analysis based on the aminoacid sequences of TrkB and BDNF, NO trough nitration/S-nitrosylation of these proteins has been recently proposed as a potential candidate to modulate BDNF stability or affinity to the receptor and TrkB responsiveness (Biojone et al., 2015). Whatever the mechanisms involved in 2VO-associated p-TrkB levels upregulation, it has to be kept in mind that cognitive deficit induced by 2VO has been reported to be alleviated by the NO donor S-nitrosoglutathione (Won et al., 2013) and exacerbated by pharmacological eNOS inhibition (de la Torre & Aliev, 2005), thus giving to NO a central role in 2VO-induced impaired cognition.

In conclusion, the present results provide convincing arguments for a positive control of brain BDNF levels by cerebrovascular endothelium-derived NO, thus providing new insights in the link between impaired endothelial NO production and BDNF-dependent cognition. They also incite further studies on the cellular pathways downstream to TrkB activation in situations associated with abnormal cerebral blood flow.

Acknowledgements

We thank Nicolas Pernet for its technical assistance.

Conflict of interest : none

Abbreviations

NO: nitric oxide

BDNF : brain-derived neurotrophic factor

p-eNOS : phosphorylated endothelial NO synthase

p-eNOSser1177 : phosphorylated endothelial NO synthase at serine 1177

eNOS : endothelial NO synthase

nNOS : neuronal NO synthase

NOS : nitric oxide synthase

2VO : 2 vessels occlusion

EX : exercise

SED : sedentary

GTN : glyceryl trinitrate

TrkB : Tropomyosin-related kinase type B

p-TrkB : phosphorylated tropomyosin-related kinase type B

LTP : long term potentiation

PFA : paraformaldehyde



## references

Banoujaafar, H., Van Hoecke, J., Mossiat, C.M. & Marie, C. (2014) Brain BDNF levels elevation induced by physical training is reduced after unilateral common carotid artery occlusion in rats. *J Cereb Blood Flow Metab*, 34, 1681-1687.

Biojone, C., Casarotto, P.C., Joca, S.R. & Castren, E. (2015) Interplay Between Nitric Oxide and Brain-Derived Neurotrophic Factor in Neuronal Plasticity. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 14, 979-987.

Canossa, M., Giordano, E., Cappello, S., Guarnieri, C. & Ferri, S. (2002) Nitric oxide down-regulates brain-derived neurotrophic factor secretion in cultured hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 3282-3287.

Cechetti, F., Worm, P.V., Pereira, L.O., Siqueira, I.R. & C, A.N. (2010) The modified 2VO ischemia protocol causes cognitive impairment similar to that induced by the standard method, but with a better survival rate. *Braz J Med Biol Res*, 43, 1178-1183.

Chen, J., Zacharek, A., Zhang, C., Jiang, H., Li, Y., Roberts, C., Lu, M., Kapke, A. & Chopp, M. (2005) Endothelial nitric oxide synthase regulates brain-derived neurotrophic factor expression and neurogenesis after stroke in mice. *J Neurosci*, 25, 2366-2375.

Chen, M.J., Ivy, A.S. & Russo-Neustadt, A.A. (2006) Nitric oxide synthesis is required for exercise-induced increases in hippocampal BDNF and phosphatidylinositol 3' kinase expression. *Brain Res Bull*, 68, 257-268.

Corson, M.A., James, N.L., Latta, S.E., Nerem, R.M., Berk, B.C. & Harrison, D.G. (1996) Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress. *Circ Res*, 79, 984-991.

Cui, X., Chopp, M., Zacharek, A., Ning, R., Ding, X., Roberts, C. & Chen, J. (2013) Endothelial nitric oxide synthase regulates white matter changes via the BDNF/TrkB pathway after stroke in mice. *PLoS One*, 8, e80358.

Cunha, C., Brambilla, R. & Thomas, K.L. (2010) A simple role for BDNF in learning and memory? *Front Mol Neurosci*, 3, 1.

Czurko, A., Hirase, H., Csicsvari, J. & Buzsaki, G. (1999) Sustained activation of hippocampal pyramidal cells by 'space clamping' in a running wheel. *Eur J Neurosci*, 11, 344-352.

Damodaran, T., Hassan, Z., Navaratnam, V., Muzaimi, M., Ng, G., Muller, C.P., Liao, P. & Dringenberg, H.C. (2014) Time course of motor and cognitive functions after chronic cerebral ischemia in rats. *Behav Brain Res*, 275, 252-258.

de la Torre, J.C. & Aliev, G. (2005) Inhibition of vascular nitric oxide after rat chronic brain hypoperfusion: spatial memory and immunocytochemical changes. *J Cereb Blood Flow Metab*, 25, 663-672.

Dimmeler, S., Fleming, I., Fisslthaler, B., Hermann, C., Busse, R. & Zeiher, A.M. (1999) Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*, 399, 601-605.

Doreulee, N., Sergeeva, O.A., Yanovsky, Y., Chepkova, A.N., Selbach, O., Godecke, A., Schrader, J. & Haas, H.L. (2003) Cortico-striatal synaptic plasticity in endothelial nitric oxide synthase deficient mice. *Brain Res*, 964, 159-163.

Farkas, E., Luiten, P.G. & Bari, F. (2007) Permanent, bilateral common carotid artery occlusion in the rat: a model for chronic cerebral hypoperfusion-related neurodegenerative diseases. *Brain Res Rev*, 54, 162-180.

Figuroa, X.F., Gonzalez, D.R., Puebla, M., Acevedo, J.P., Rojas-Libano, D., Duran, W.N. & Boric, M.P. (2013) Coordinated endothelial nitric oxide synthase activation by translocation and phosphorylation determines flow-induced nitric oxide production in resistance vessels. *J Vasc Res*, 50, 498-511.

Haul, S., Godecke, A., Schrader, J., Haas, H.L. & Luhmann, H.J. (1999) Impairment of neocortical long-term potentiation in mice deficient of endothelial nitric oxide synthase. *J Neurophysiol*, 81, 494-497.

Henry, R.M., Ferreira, I., Kostense, P.J., Dekker, J.M., Nijpels, G., Heine, R.J., Kamp, O., Bouter, L.M. & Stehouwer, C.D. (2004) Type 2 diabetes is associated with impaired endothelium-dependent, flow-mediated dilation, but impaired glucose metabolism is not; The Hoorn Study. *Atherosclerosis*, 174, 49-56.

Hopper, R.A. & Garthwaite, J. (2006) Tonic and phasic nitric oxide signals in hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci*, 26, 11513-11521.

Hsieh, H.Y., Robertson, C.L., Vermehren-Schmaedick, A. & Balkowiec, A. (2010) Nitric oxide regulates BDNF release from nodose ganglion neurons in a pattern-dependent and cGMP-independent manner. *J Neurosci Res*, 88, 1285-1297.

Katusic, Z.S. & Austin, S.A. (2014) Endothelial nitric oxide: protector of a healthy mind. *Eur Heart J*, 35, 888-894.

Kingsbury, T.J., Murray, P.D., Bambrick, L.L. & Krueger, B.K. (2003) Ca<sup>2+</sup>-dependent regulation of TrkB expression in neurons. *J Biol Chem*, 278, 40744-40748.

Lee, T.H., Yang, J.T., Kato, H., Wu, J.H. & Chen, S.T. (2004) Expression of brain-derived neurotrophic factor immunoreactivity and mRNA in the hippocampal CA1 and cortical areas after chronic ischemia in rats. *J Neurosci Res*, 76, 705-712.

Li, S.T., Pan, J., Hua, X.M., Liu, H., Shen, S., Liu, J.F., Li, B., Tao, B.B., Ge, X.L., Wang, X.H., Shi, J.H. & Wang, X.Q. (2014) Endothelial nitric oxide synthase protects neurons against ischemic injury through regulation of brain-derived neurotrophic factor expression. *CNS Neurosci Ther*, 20, 154-164.

Lin, L.H., Taktakishvili, O. & Talman, W.T. (2007) Identification and localization of cell types that express endothelial and neuronal nitric oxide synthase in the rat nucleus tractus solitarii. *Brain Res*, 1171, 42-51.

Musicco, M., Palmer, K., Salamone, G., Lupo, F., Perri, R., Mosti, S., Spalletta, G., di Iulio, F., Pettenati, C., Cravello, L. & Caltagirone, C. (2009) Predictors of progression of cognitive decline in Alzheimer's disease: the role of vascular and sociodemographic factors. *J Neurol*, 256, 1288-1295.

Nathan, D.M., Cleary, P.A., Backlund, J.Y., Genuth, S.M., Lachin, J.M., Orchard, T.J., Raskin, P. & Zinman, B. (2005) Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. *N Engl J Med*, 353, 2643-2653.

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.

Ortiz, P.A. & Garvin, J.L. (2003) Cardiovascular and renal control in NOS-deficient mouse models. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 284, R628-638.

Ott, A., Stolk, R.P., van Harskamp, F., Pols, H.A., Hofman, A. & Breteler, M.M. (1999) Diabetes mellitus and the risk of dementia: The Rotterdam Study. *Neurology*, 53, 1937-1942.

Paniagua, O.A., Bryant, M.B. & Panza, J.A. (2001) Role of endothelial nitric oxide in shear stress-induced vasodilation of human microvasculature: diminished activity in hypertensive and hypercholesterolemic patients. *Circulation*, 103, 1752-1758.

Pappas, B.A., de la Torre, J.C., Davidson, C.M., Keyes, M.T. & Fortin, T. (1996) Chronic reduction of cerebral blood flow in the adult rat: late-emerging CA1 cell loss and memory dysfunction. *Brain Res*, 708, 50-58.

Pinnock, S.B. & Herbert, J. (2008) Brain-derived neurotrophic factor and neurogenesis in the adult rat dentate gyrus: interactions with corticosterone. *Eur J Neurosci*, 27, 2493-2500.

Quirie, A., Hervieu, M., Garnier, P., Demougeot, C., Mossiat, C., Bertrand, N., Martin, A., Marie, C. & Prigent-Tessier, A. (2012) Comparative effect of treadmill exercise on mature BDNF production in control versus stroke rats. *PLoS One*, 7, e44218.

Reitz, C., Brayne, C. & Mayeux, R. (2011) Epidemiology of Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol*, 7, 137-152.

Sakr, H.F., Khalil, K.I., Hussein, A.M., Zaki, M.S., Eid, R.A. & Alkhateeb, M. (2014) Effect of dehydroepiandrosterone (DHEA) on memory and brain derived neurotrophic factor (BDNF) in a rat model of vascular dementia. *J Physiol Pharmacol*, 65, 41-53.

Samdani, A.F., Newcamp, C., Resink, A., Facchinetti, F., Hoffman, B.E., Dawson, V.L. & Dawson, T.M. (1997) Differential susceptibility to neurotoxicity mediated by neurotrophins and neuronal nitric oxide synthase. *J Neurosci*, 17, 4633-4641.

Shu, Y., Zhang, H., Kang, T., Zhang, J.J., Yang, Y., Liu, H. & Zhang, L. (2013) PI3K/Akt signal pathway involved in the cognitive impairment caused by chronic cerebral hypoperfusion in rats. *PLoS One*, 8, e81901.

Stanarius, A., Topel, I., Schulz, S., Noack, H. & Wolf, G. (1997) Immunocytochemistry of endothelial nitric oxide synthase in the rat brain: a light and electron microscopical study using the tyramide signal amplification technique. *Acta Histochem*, 99, 411-429.

Vaynman, S., Ying, Z. & Gomez-Pinilla, F. (2004) Hippocampal BDNF mediates the efficacy of exercise on synaptic plasticity and cognition. *Eur J Neurosci*, 20, 2580-2590.

Wang, S., Jacobs, D., Andrews, H., Tsai, W.Y., Luo, X., Bergmann, C. & Sano, M. (2010) Cardiovascular risk and memory in non-demented elderly women. *Neurobiol Aging*, 31, 1250-1253.

Whyte, J.J. & Laughlin, M.H. (2010) The effects of acute and chronic exercise on the vasculature. *Acta Physiol (Oxf)*, 199, 441-450.

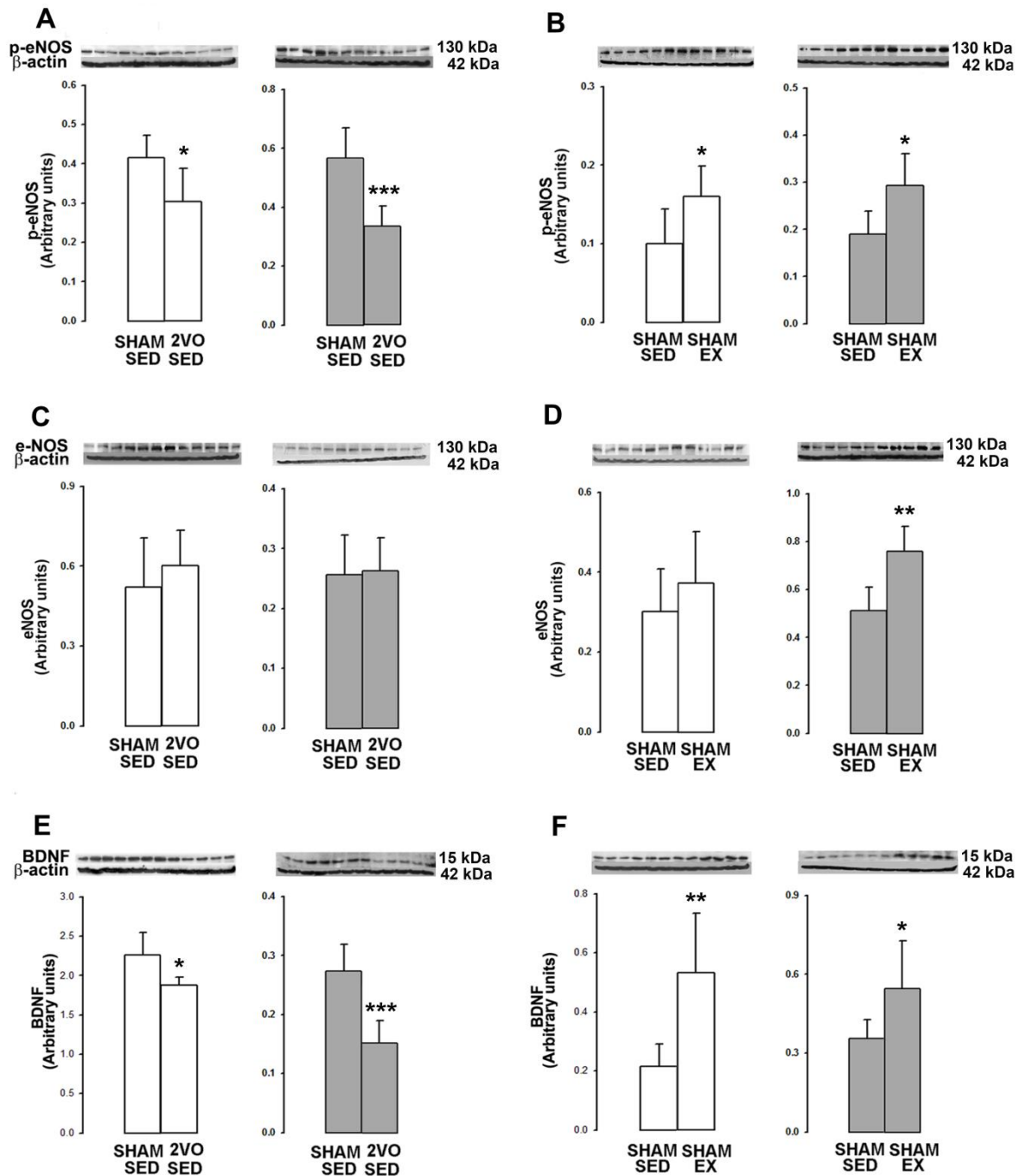
Won, J.S., Kim, J., Annamalai, B., Shunmugavel, A., Singh, I. & Singh, A.K. (2013) Protective role of S-nitrosoglutathione (GSNO) against cognitive impairment in rat model of chronic cerebral hypoperfusion. *J Alzheimers Dis*, 34, 621-635.

Xiong, H., Yamada, K., Han, D., Nabeshima, T., Enikolopov, G., Carnahan, J. & Nawa, H. (1999) Mutual regulation between the intercellular messengers nitric oxide and brain-derived neurotrophic factor in rodent neocortical neurons. *Eur J Neurosci*, 11, 1567-1576.

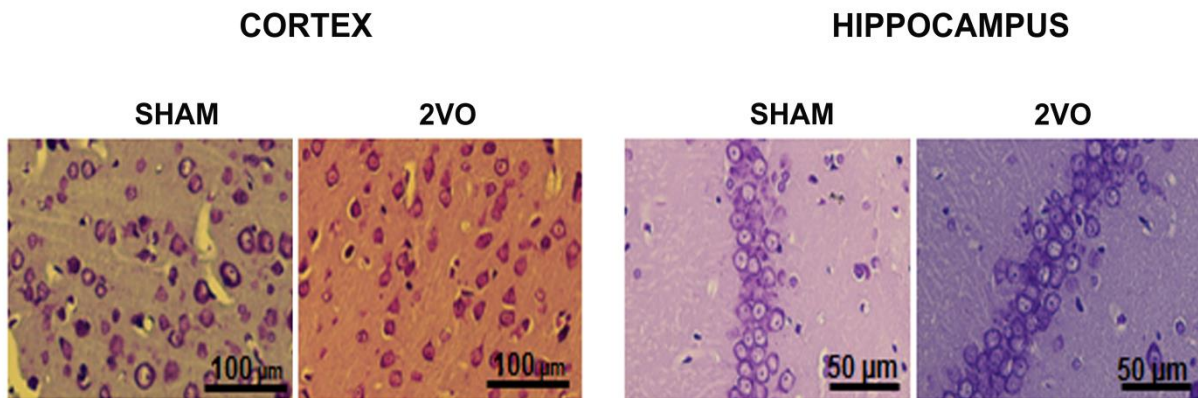
Yaffe, K., Vittinghoff, E., Pletcher, M.J., Hoang, T.D., Launer, L.J., Whitmer, R., Coker, L.H. & Sidney, S. (2014) Early adult to midlife cardiovascular risk factors and cognitive function. *Circulation*, 129, 1560-1567.

Zhao, Y. & Gong, C.X. (2015) From chronic cerebral hypoperfusion to Alzheimer-like brain pathology and neurodegeneration. *Cell Mol Neurobiol*, 35, 101-110.

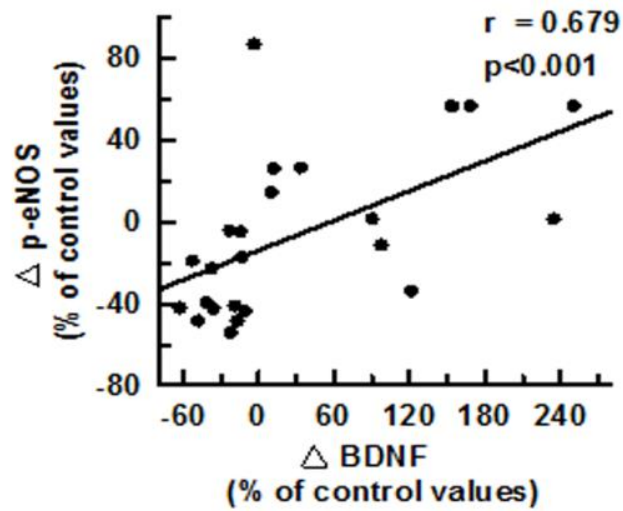
Zheng, P., Zhang, J., Liu, H., Xu, X. & Zhang, X. (2008) Angelica injection reduces cognitive impairment during chronic cerebral hypoperfusion through brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor. *Curr Neurovasc Res*, 5, 13-20.



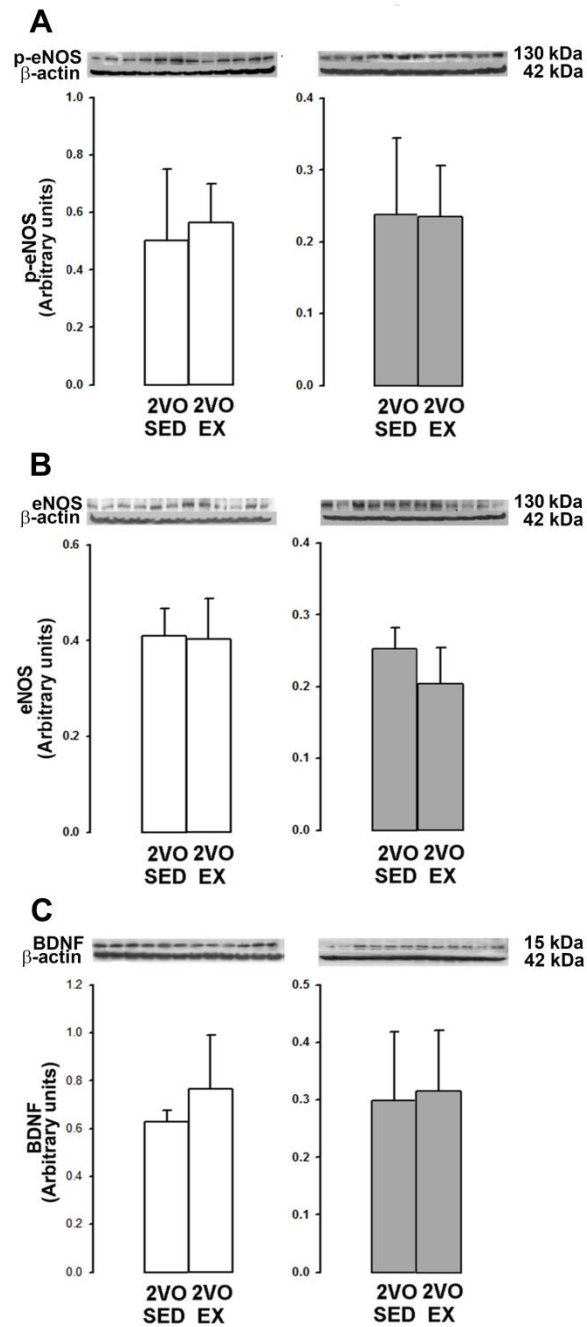
**Fig.1.** Effect of 2VO and EX on p-eNOS (A, B), eNOS (C, D) and BDNF (E, F) levels in the cortex (white bars) and hippocampus (grey bars). 2VO = bilateral carotid artery occlusion for 10 days, EX consisted in a daily treadmill activity (30 min/ day, 18m/ min, 0% decline) for 7 consecutive days, SED = sedentary rats. Values are means± SD of 6 rats, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  as compared to controls values. Corresponding immunoblots of p-eNOSser1177 (130 kDa), total eNOS (130 kDa), BDNF (15kDa), β-actin (42 kDa) are shown.



**Fig.2.** Neuronal morphology in the cortex and hippocampus did not differ between sham-operated rats and rats subjected to 2VO (bilateral carotid artery occlusion for 10 days).

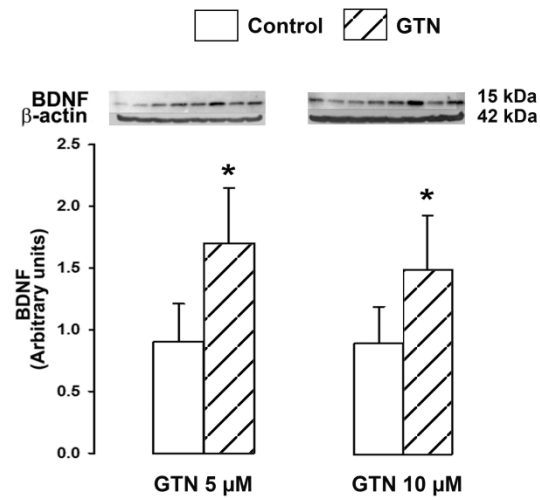


**Fig.3.** Changes in p-eNOSser1177 levels induced by 2VO or EX in the cortex and hippocampus were plotted against corresponding changes in brain BDNF levels. Changes were expressed as percentage of the mean of control values,  $r$  = Pearson's correlation coefficient. See legend of Fig.1 for more information on 2VO and EX.

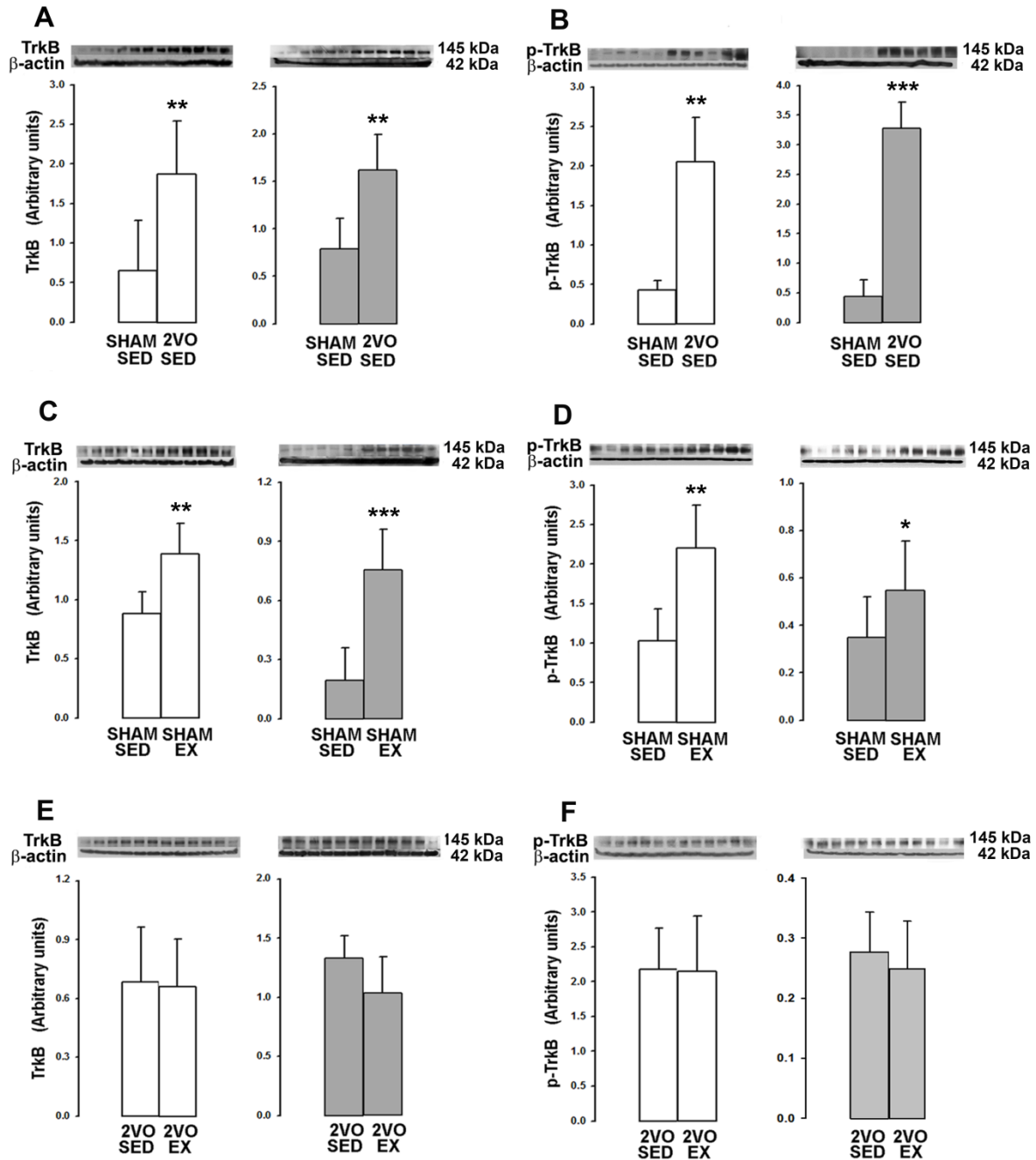


**Fig.4.** Effect of combination of 2VO and EX on p-eNOS (A), eNOS (B) and BDNF (C) expression in the cortex (white bars) and hippocampus (grey bars). EX was started on day 3 after 2VO induction (bilateral carotid artery occlusion). The measurements were performed at day 10 after vessel occlusion. See legend of Fig.1 for more information on 2VO and EX. Values are means $\pm$  SD of 6 rats. Corresponding immunoblots of p-eNOSser1177 (130 kDa), eNOS (130 kDa), BDNF (15kDa),  $\beta$ -actin (42 kDa) are shown.





**Fig.5.** Effect of a NO donor on BDNF levels in brain slices. BDNF levels were measured in cortical slices exposed for 24 hours to 5 and 10  $\mu$ M of glyceryl trinitrate (GTN). GTN was omitted for control conditions. Values are means  $\pm$  SD (n=4). Corresponding immunoblots of BDNF (15kDa) and  $\beta$ -actin (42 kDa) are shown. \*  $p < 0.05$  as compared to controls values.



**Fig.6.** Effect of 2VO (A, B), EX (C, D) and combination of both (E, F) on TrkB receptors (A, C, E) and p-TrkB (B, D, F) levels in the cortex (white bars) and hippocampus (grey bars). See legend of Fig.1 for more information on 2VO and EX. Values are means $\pm$  SD of 6 rats, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  as compared to controls values. Corresponding immunoblots of full-length TrkB receptors and its phosphorylated form at tyrosine 816 (145 kDa) and  $\beta$ -actin (42 kDa) are shown.





# **Discussion générale** **et perspectives**

---

Nos travaux donnent des arguments forts en faveur de l'hypothèse selon laquelle l'un des mécanismes par lesquels l'AP augmente les taux cérébraux de BDNF est d'origine hémodynamique et plus précisément est à relier à l'augmentation du flux sanguin dans les vaisseaux de la circulation cérébrale. Nos travaux suggèrent également qu'il existe une connexion entre le NO produit par l'endothélium des vaisseaux cérébraux et la teneur cérébrale en BDNF.

## **I. Considérations méthodologiques**

### **1. Modèle d'entraînement physique**

Dans nos études l'entraînement physique consiste en une activité sur tapis roulant selon les modalités suivantes : 30 min/j, 18m/min pendant 7 jours consécutifs, tapis en position horizontale. Il s'agit donc d'une activité physique imposée qui présente l'avantage par rapport à une activité physique volontaire (roue d'entraînement) de travailler sur des groupes homogènes d'animaux entraînés en termes d'intensité et de durée d'AP. Notre modèle permet également de s'affranchir d'un potentiel effet de la stratégie testée sur l'intensité ou la durée de l'AP. Par exemple, il a été montré que l'augmentation des taux de BDNF induit par le libre accès à une roue d'entraînement était moindre chez les animaux traités par le L-NAME (Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride, un inhibiteur des NO synthases) (Chen *et al.*, 2006). Or, le traitement diminuait la distance parcourue. Aussi, dans cette étude, l'effet du L-NAME sur le BDNF n'est peut-être pas la conséquence de la moindre production de NO mais celle d'une réduction de l'intensité de l'activité physique. Le principal inconvénient de notre modèle est que l'activité physique est (contrairement à la roue d'entraînement) imposée aux animaux pendant la période diurne ce qui correspond à la période d'activité de l'expérimentateur mais pas à celle du rat (qui est une espèce nocturne).

Notre protocole d'entraînement physique s'accompagne d'une élévation des taux de BDNF aussi bien dans le cortex moteur que dans l'hippocampe avec un effet plus marqué dans le cortex. La différence de réponse entre les 2 structures pourrait s'expliquer par une élévation plus marquée de l'activité neuronale et donc du flux sanguin dans le cortex. Cependant, on ne peut pas exclure la possibilité que la corticostérone libérée par les surrénales

lors de l'exercice physique s'oppose à la synthèse du BDNF dans l'hippocampe, une structure particulièrement riche en récepteurs aux glucocorticoïdes (Yau *et al.*, 2012). Il a en effet été montré que la corticostérone réprimait la transcription du gène codant le BDNF (Schaaf *et al.*, 1998).

La durée de notre protocole d'entraînement physique (7 jours) est courte comparée à celle reconnue pour exercer un impact positif sur les fonctions métaboliques et cardiovasculaires (au minimum 3 semaines, à raison de 3 à 5 séances/semaine). Cependant, dans nos conditions, la durée est suffisante pour augmenter l'activité de l'enzyme citrate synthase des muscles squelettiques (marqueur de la densité en mitochondries) et pour augmenter la production de NO par l'endothélium cérébral aussi bien dans le cortex que dans l'hippocampe comme l'atteste l'augmentation des taux de la eNOS phosphorylée dans ces 2 structures. Cependant, on peut noter que l'entraînement augmente l'expression de la NOS endothéliale totale de manière significative que dans l'hippocampe (figure 1, publication 2). Pour des entraînements plus longs, il a été montré que l'expression de la eNOS augmentait dans les vaisseaux périphériques de conductance et de résistance mais qu'une seule séance d'activité physique (60 min, à 50% de la vitesse maximale) était suffisante pour augmenter l'expression de la eNOS phosphorylée en ser1177 dans l'aorte (Tanaka LY *et al.*, 2015). Cependant, quelle que soit sa durée (7 jours ou plusieurs semaines), notre protocole d'AP est sans effet sur la pression artérielle aussi bien chez le rat normotendu qu'hypertendu (SHR) (Prigent-Tessier *et al.*, 2013).

Deux points importants restent à étudier pour caractériser notre protocole d'entraînement physique et qui sont:

- l'intensité de chaque séance exprimée en pourcentage de la consommation maximale en O<sub>2</sub>.
- l'impact de l'entraînement sur la fonction cérébrale comme l'apprentissage, la mémoire. En effet démontrer que l'entraînement augmente les taux de BDNF, la phosphorylation des récepteurs TrkB et les taux de synaptophysine ne permet pas de conclure définitivement sur son impact cognitif. Le laboratoire envisage d'évaluer l'effet du protocole sur le test de reconnaissance d'objet (test pour évaluer l'effet sur la mémoire).

## **2. Dosage des protéines par la technique de Western blotting**

Dans nos études, le BDNF, la synaptophysine, la eNOS, et les récepteurs TrkB ont été mesurés dans des homogénats cérébraux par la technique de Western blot. Il s'agit d'une technique semi-quantitative c'est à dire que la densité optique de la bande d'intérêt n'est pas linéairement proportionnelle à la concentration de protéines d'intérêt. Aussi, la quantité appropriée de protéines totales à déposer sur le gel est calculée à partir de l'analyse d'une courbe Densité Optique = f(quantité de protéines déposées) afin de repérer la portion linéaire de la courbe (Gassmann *et al.*, 2009). Nous nous plaçons donc dans les meilleures conditions pour mettre en évidence l'effet (augmentation ou diminution) de nos différentes stratégies sur la protéine d'intérêt. Par ailleurs, nous étudions l'effet des stratégies une par une ; nous déposons sur un même gel les échantillons n'appartenant qu'à 2 groupes de rats (6 rats par groupe). Les mêmes conditions sont répétées 3 fois et les résultats sont calculés à partir du gel le plus représentatif.

Ces conditions permettent de s'affranchir des multiples normalisations à faire lorsque plus de 2 conditions expérimentales sont testées sur un même gel.

## **3. Évaluation de la production de NO par l'endothélium des microvaisseaux cérébraux**

Pour évaluer la production de NO par l'endothélium des microvaisseaux cérébraux, nous avons dosé directement les taux de eNOS totale et eNOS phosphorylée en ser1177 dans l'homogénat cérébral alors que certains auteurs (Dinerman *et al.*, 1994; Doyle & Slater, 1997) mais pas tous (Seidel *et al.*, 1997; Stanarius *et al.*, 1997) ont montré que dans le cerveau, les eNOS pouvaient être exprimées par les neurones. Nos résultats montrent que l'entraînement physique augmente et le clampage bicarotidien diminue, dans l'homogénat cérébral, les taux des eNOS phosphorylées. Notre interprétation est que ces 2 stratégies exercent des effets opposés sur la phosphorylation de la eNOS endothéliale. En accord avec cette interprétation, le laboratoire a récemment montré que l'entraînement physique exerçait les mêmes effets sur la eNOS phosphorylée ser1177 qu'elle soit mesurée dans les microvaisseaux cérébraux isolés à partir du cortex cérébral que dans un homogénat de cortex cérébral. Par ailleurs, même s'il est classique d'évaluer la production endothéliale de NO par la mesure de l'expression endothéliale des enzymes, il serait plus pertinent de mesurer l'activité de la eNOS ou le taux



des nitrites-nitrates dans les vaisseaux isolés. Le dosage des nitrites nitrates a été réalisé dans l'homogénat cérébral de rats sédentaires et entraînés. Nous n'avons pas observé de différences entre les 2 lots. Cela ne signifie pas que l'entraînement n'a pas augmenté la production endothéliale de NO mais plutôt que les variations de la production du NO par l'endothélium sont masquées par l'importance de la production du NO par les neurones. En effet, à l'état basal, la production de NO par le cerveau est très majoritairement assurée par les neurones.

## **II. Contrôle des taux cérébraux de BDNF par le NO d'origine endothéliale**

Différentes études se sont déjà intéressées aux interactions existant entre le NO d'origine endothéliale et le BDNF cérébral. Il a été montré que l'inhibition génétique de la eNOS réduisait l'augmentation des taux cérébraux de BDNF induite par l'ischémie cérébrale (Chen *et al.*, 2005). Cependant, l'inhibition génétique de la eNOS induit une hypertension susceptible de compliquer l'interprétation des résultats. Une autre étude a montré que l'inhibition pharmacologique de la eNOS par le L-NAME pendant toute la durée d'un libre accès à une roue d'entraînement diminuait à la fois la distance parcourue et l'élévation des taux de BDNF (Chen *et al.*, 2006). Là encore, l'interprétation des résultats est délicate car nos travaux montrent que l'élévation des taux de BDNF induite par l'entraînement sur tapis roulant dépend de son intensité.

Notre première étude a montré que l'élévation des taux cérébraux de BDNF en réponse à l'entraînement physique était moindre en cas d'occlusion d'une carotide, d'hypertension, d'inhibition de la NOS endothéliale (par le L-NAME) et que cette élévation était d'autant plus marquée que l'intensité des exercices était forte. Notre deuxième étude a, quant à elle, montré l'existence d'une association positive entre l'expression de la eNOS phosphorylée et les taux de BDNF, les 2 paramètres étant mesurés dans le même échantillon cérébral (chez des animaux entraînés et soumis à un clampage bicarotidien). L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'exercice conduit à l'augmentation du flux dans la circulation cérébrale via la production endothéliale de NO qui contribue à augmenter les taux de BDNF dans le cerveau et inversement. Cependant, d'autres expériences devront être conduites *in vivo* pour confirmer que les taux de BDNF sont dépendants du NO produit par l'endothélium cérébral. En accord avec cette hypothèse, l'exposition de coupes cérébrales à la trinitrine augmente les taux de BDNF. Nous pourrions étudier :

1) dans quelle mesure, le traitement par un donneur de NO ou par les statines (qui stimulent à l'étage post-transcriptionnel l'expression de la eNOS) annule les effets du clampage carotidien sur les taux de BDNF.

2) dans quelle mesure le traitement par un inhibiteur sélectif de la eNOS s'oppose à l'élévation des taux de BDNF induite par l'entraînement, en sachant que l'inhibition de la eNOS peut s'accompagner d'une hypertension artérielle susceptible de déclencher les mécanismes à l'origine de l'autorégulation cérébrale.

Ces expériences complémentaires sont primordiales avant de conclure que le NO d'origine endothéliale est bien impliqué dans le contrôle des taux cérébraux de BDNF. Il est en effet possible que l'expression de eNOS ne soit le reflet que de l'intensité des forces de cisaillement exercées par le flux sanguin et que le contrôle de la synthèse du BDNF implique des mécanismes indépendants de la voie du NO mais dépendants des forces de cisaillements. Si c'est le cas, l'élucidation des voies impliquées va s'avérer délicate car les effets de la méchanotransduction se manifestent à de multiples localisations subcellulaires de la cellule endothéliale (Davies, 2009) et les détecteurs du stimulus mécanique que représentent les forces de cisaillement sont probablement aussi multiples. Un médiateur autre que le NO qui pourrait être impliqué est le t-PA (tissue type-plasminogen activator). En effet, le shear stress augmente la sécrétion endothéliale de t-PA (Diamond *et al.*, 1989). Or le t-PA traverse la BHE (Benchenane *et al.*, 2005) et est indirectement impliqué via la plasmine dans la maturation du BDNF à partir du proBDNF (Ding *et al.*, 2011). Cependant au laboratoire, nous avons montré que l'administration systémique de t-PA augmentait les taux cérébraux de BDNF via l'activation des récepteurs NMDA au glutamate et pas via la plasmine (Rodier *et al.*, 2014).

Si le NO d'origine endothéliale effectivement contrôle positivement la production de BDNF par le cerveau, il conviendra alors d'explorer les mécanismes impliqués. Le NO pourrait induire la transcription du gène ou encore activer les enzymes impliqués dans la transformation du proBDNF en BDNF. La question qui se posera alors concerne le type cellulaire qui répond au NO par une induction de la synthèse du BDNF.

### III. Type cellulaire répondant au NO d'origine endothéliale par une augmentation de sa synthèse de BDNF

Dans le cerveau, le neurone est traditionnellement considéré comme l'unique source de BDNF. Cependant, notre laboratoire a montré que le BDNF était exprimé à l'état basal dans les cellules endothéliales aussi bien des vaisseaux périphériques (aorte) (Prigent-Tessier *et al.*, 2013) que des vaisseaux de la circulation cérébrale microvaisseaux cérébraux (résultats non publiés). Il a également révélé que l'entraînement physique augmentait et l'hypertension diminuait l'expression endothéliale du BDNF tant au niveau de l'aorte (Prigent-Tessier *et al.*, 2013) que des microvaisseaux cérébraux (résultats non publiés). De ces données émerge la possibilité que l'augmentation des taux de BDNF induit par l'entraînement physique soit le résultat d'une augmentation de la synthèse du BDNF non seulement par les neurones mais aussi par les cellules endothéliales des microvaisseaux cérébraux. De la même façon, une moindre expression endothéliale du BDNF pourrait expliquer la réduction des taux cérébraux de BDNF observés chez les rats soumis au clampage bicarotidien.

Pour évaluer la contribution relative de chacun des types cellulaires endothélial versus neuronal, nous envisageons de mesurer les taux de BDNF dans le cerveau de rats entraînés après induction d'une désendothélialisation du cerveau. Le laboratoire a déjà montré que le retrait de l'endothélium cérébral induit par une perfusion transcardiaque de CHAPS (3- [(3-cholamidopropyl) diméthylammonio]-1-propanesulfonate), un détergent couramment utilisé pour éliminer l'endothélium dans les expériences de vasomotricité sur vaisseaux isolés, réduisait de façon très importante les taux de BDNF mesurés dans un homogénat cérébral indiquant que les taux de BDNF présents dans le cerveau correspondent pour une large part au BDNF présent dans les vaisseaux intracérébraux.

Si les résultats montrent une contribution importante des cellules endothéliales à l'augmentation cérébrale des taux de BDNF induite par l'AP, alors se poserait la question du rôle biologique du BDNF d'origine endothéliale. Le BDNF via une action autocrine pourrait conduire à une dilatation artériolaire et contribuer de ce fait à l'augmentation de l'apport sanguin au cerveau. En faveur de cette hypothèse, le BDNF est capable sur modèle de vaisseau isolé pré-contracté d'induire une relaxation (Meuchel *et al.*, 2011; Prigent-Tessier *et*

*al.*, 2013). Afin d'étayer cette hypothèse, le laboratoire envisage d'étudier *in vivo* l'effet de la perfusion directement dans la carotide interne de BDNF et d'agonistes des récepteurs TrkB sur le débit sanguin cérébral. Le BDNF d'origine endothéliale, du moins celui des capillaires sanguins (les vaisseaux les plus proches des neurones) pourrait également stimuler la neuroplasticité à la condition qu'il puisse être sécrété dans l'espace interstitiel cérébral soit via des transporteurs endothéliaux spécifiques (dont l'existence n'est pas certaine) soit via les pieds astrocytaires. Une fois dans le liquide interstitiel, le BDNF d'origine endothéliale pourrait alors directement agir sur les TrkB neuronaux et stimuler ainsi le nombre et l'activité des synapses.

Si les résultats montrent une contribution neuronale importante alors se poserait la question des mécanismes par lesquels l'augmentation du flux peut conduire à augmenter l'expression neuronale du BDNF. Il est bien connu que l'endothélium répond à une augmentation du flux sanguin par la sécrétion de différents médiateurs dont trois sont susceptibles d'interférer avec le BDNF : le NO, l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA) et la prostacycline. Le NO produit par les capillaires sanguins cérébraux pourrait stimuler la production de BDNF par les neurones. En effet, le NO est un médiateur liposoluble avec une demi-vie compatible avec une action à distance de son site de sécrétion (diffusion du NO des cellules endothéliales aux neurones). Cette possibilité pourrait être testée *in vitro* par l'exposition d'une culture de neurones au milieu d'incubation de microvaisseaux cérébraux prélevés chez des animaux entraînés. Le t-Pa est une sérine protéase sécrétée par les neurones (Louessard *et al.*, 2015) et qui pourrait augmenter les taux cérébraux de BDNF via l'activation des récepteurs neuronaux NMDA (N-Méthyl-D-aspartate) au glutamate, ou par le clivage extracellulaire du proBDNF en BDNF. De façon intéressante, il a été montré que les stratégies anti-t-PA réduisaient l'augmentation des taux de BDNF induite par l'entraînement physique (Ding *et al.*, 2011). La prostacycline est une prostaglandine dont les récepteurs sont couplés à des récepteurs couplés à une protéine Gs. Or l'AMPC est capable d'induire la transcription du gène *bdnf*.

#### **IV. Boucle hypothétique reliant hémodynamique cérébrale et cognition**

Pendant la réalisation d'une AP, les régions cérébrales hyperactives via le couplage neurovasculaire, la vasodilatation dépendante du flux, la vasodilatation rétrograde propagée et

l'augmentation du débit cardiaque conduit à élever le flux sanguin dans la circulation cérébrale. Cette augmentation du flux s'accompagne d'une élévation de la production endothéliale de NO. Le NO pourrait induire la synthèse de BDNF par les cellules endothéliales et les neurones. Le BDNF d'origine endothéliale pourrait exercer un effet vasodilatateur (activation des récepteurs TrkB endothéliaux) et renforcer l'augmentation de l'apport sanguin au cerveau. Il pourrait également activer les récepteurs TrkB neuronaux et en conséquence induire la neuroplasticité. Le BDNF d'origine neuronale s'accompagne quant à lui d'une augmentation de l'activité neuronale qui conduira à renforcer l'apport sanguin au cerveau et donc la production de NO. Cette boucle hypothétique à l'avantage de donner une explication au maintien d'un taux élevé de BDNF dans le cerveau pendant les 2 semaines qui suivent l'arrêt de l'AP (Berchtold *et al.*, 2011).

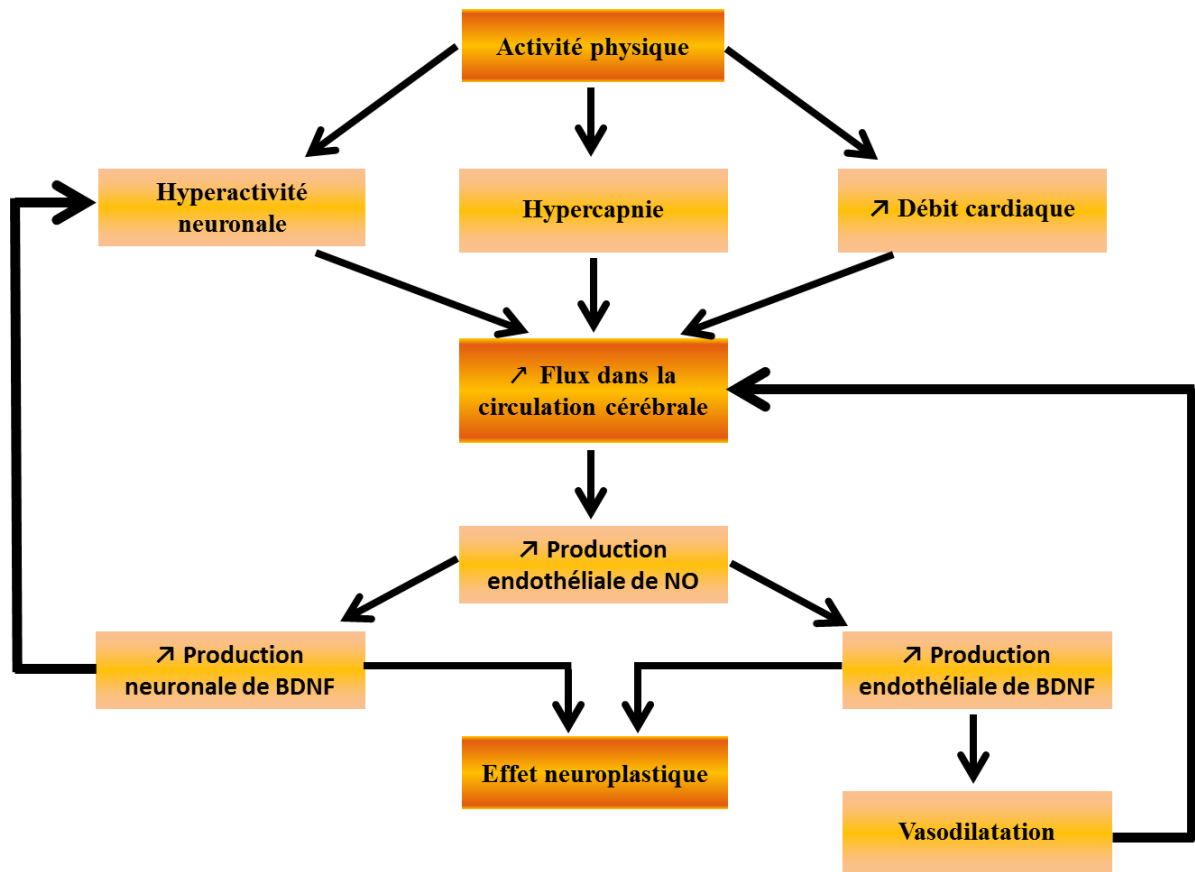


Figure 15 : Boucle reliant hémodynamique cérébrale et cognition.

## **V. Les retombées de nos résultats**

Que l'augmentation des taux de BDNF induite par l'entraînement physique soit le reflet d'une stimulation de la synthèse du BDNF par les cellules endothéliales, les neurones ou les 2, il est certain que l'endothélium cérébral joue une place centrale dans l'impact de l'AP sur les taux cérébraux de BDNF et par voie de conséquence sur les qualités plastiques du cerveau. Placer l'endothélium cérébral au sein de la cascade physiologique qui relie l'entraînement physique au BDNF cérébral pourrait donner une explication aux études montrant que les capacités cognitives sont moindres en cas d'hypertension, de diabète, d'obésité (Yaffe *et al.*), de polyarthrite rhumatoïde (Shin *et al.*, 2012) et chez les personnes âgées (Michalski *et al.*, 2015). En effet, toutes ces situations s'accompagnent d'une dysfonction endothéliale.

Nos résultats qui montrent que l'élévation des taux de BDNF induite par AP est proportionnelle à l'intensité de l'AP suggèrent que les bénéfices cognitifs de l'AP seront d'autant plus marqués que si l'AP est soutenue ou qu'elle engage une large masse musculaire. En effet, pendant la réalisation de l'AP, le débit cardiaque et donc le DSC s'élève d'autant plus que la demande énergétique des muscles est grande.

Nos résultats supportent également l'idée selon laquelle l'augmentation du flux sanguin dans les vaisseaux de la circulation cérébrale n'a pas pour seul rôle de satisfaire l'augmentation des besoins métaboliques des neurones mais aussi de stimuler la neuroplasticité.

En conclusion, nos travaux ouvrent de nouvelles perspectives dans la compréhension des mécanismes qui sous-tendent les effets salutaires de l'entraînement physique sur la santé cérébrale et dans l'élaboration des modalités d'AP les plus aptes à améliorer la neuroplasticité dépendante du BDNF.

# **Références bibliographiques**

- Aid, T., Kazantseva, A., Piirsoo, M., Palm, K. & Timmusk, T. (2007) Mouse and rat BDNF gene structure and expression revisited. *Journal of neuroscience research*, **85**, 525-535.
- Ainslie, P.N. & Brassard, P. (2014) Why is the neural control of cerebral autoregulation so controversial? *F1000Prime Rep*, **6**, 14.
- Alm, A. & Bill, A. (1973) The effect of stimulation of the cervical sympathetic chain on retinal oxygen tension and on uveal, retinal and cerebral blood flow in cats. *Acta Physiol Scand*, **88**, 84-94.
- Ando, J. & Yamamoto, K. (2009) Vascular mechanobiology: endothelial cell responses to fluid shear stress. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society*, **73**, 1983-1992.
- Battisti-Charbonney, A., Fisher, J. & Duffin, J. (2011) The cerebrovascular response to carbon dioxide in humans. *The Journal of physiology*, **589**, 3039-3048.
- Bayliss, W.M., Hill, L. & Gulland, G.L. (1895) On Intra-Cranial Pressure and the Cerebral Circulation: Part I. Physiological; Part II. Histological. *J Physiol*, **18**, 334-362.
- Bejot, Y., Prigent-Tessier, A., Cachia, C., Giroud, M., Mossiat, C., Bertrand, N., Garnier, P. & Marie, C. (2011) Time-dependent contribution of non neuronal cells to BDNF production after ischemic stroke in rats. *Neurochem Int*, **58**, 102-111.
- Benchenane, K., Berezowski, V., Ali, C., Fernandez-Monreal, M., Lopez-Atalaya, J.P., Brillault, J., Chuquet, J., Nouvelot, A., MacKenzie, E.T., Bu, G., Cecchelli, R., Touzani, O. & Vivien, D. (2005) Tissue-type plasminogen activator crosses the intact blood-brain barrier by low-density lipoprotein receptor-related protein-mediated transcytosis. *Circulation*, **111**, 2241-2249.
- Berchtold, N.C., Castello, N. & Cotman, C.W. (2011) Exercise and time-dependent benefits to learning and memory. *Neuroscience*, **167**, 588-597.
- Blum, R. & Konnerth, A. (2005) Neurotrophin-mediated rapid signaling in the central nervous system: mechanisms and functions. *Physiology (Bethesda)*, **20**, 70-78.
- Bolduc, V., Thorin-Trescases, N. & Thorin, E. (2013) Endothelium-dependent control of cerebrovascular functions through age: exercise for healthy cerebrovascular aging. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **305**, H620-633.
- Bondy, C.A. & Lee, W.H. (1993) Patterns of insulin-like growth factor and IGF receptor gene expression in the brain. Functional implications. *Ann N Y Acad Sci*, **692**, 33-43.
- Brian, J.E., Jr. (1998) Carbon dioxide and the cerebral circulation. *Anesthesiology*, **88**, 1365-1386.



- Brigadski, T., Hartmann, M. & Lessmann, V. (2005) Differential vesicular targeting and time course of synaptic secretion of the mammalian neurotrophins. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **25**, 7601-7614.
- Bryan, R.M., Jr., Marrelli, S.P., Steenberg, M.L., Schildmeyer, L.A. & Johnson, T.D. (2001a) Effects of luminal shear stress on cerebral arteries and arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **280**, H2011-2022.
- Bryan, R.M., Jr., Steenberg, M.L. & Marrelli, S.P. (2001b) Role of endothelium in shear stress-induced constrictions in rat middle cerebral artery. *Stroke*, **32**, 1394-1400.
- Caro, C.G., Fitz-Gerald, J.M. & Schroter, R.C. (1969) Arterial wall shear and distribution of early atheroma in man. *Nature*, **223**, 1159-1160.
- Chen, B.R., Kozberg, M.G., Bouchard, M.B., Shaik, M.A. & Hillman, E.M. (2015) A critical role for the vascular endothelium in functional neurovascular coupling in the brain. *J Am Heart Assoc*, **3**, e000787.
- Chen, J., Zacharek, A., Zhang, C., Jiang, H., Li, Y., Roberts, C., Lu, M., Kapke, A. & Chopp, M. (2005) Endothelial nitric oxide synthase regulates brain-derived neurotrophic factor expression and neurogenesis after stroke in mice. *J Neurosci*, **25**, 2366-2375.
- Chen, M.J., Ivy, A.S. & Russo-Neustadt, A.A. (2006) Nitric oxide synthesis is required for exercise-induced increases in hippocampal BDNF and phosphatidylinositol 3' kinase expression. *Brain Res Bull*, **68**, 257-268.
- Chen, Z.Y., Bath, K., McEwen, B., Hempstead, B. & Lee, F. (2008) Impact of genetic variant BDNF (Val66Met) on brain structure and function. *Novartis Found Symp*, **289**, 180-188; discussion 188-195.
- Chen, Z.Y., Patel, P.D., Sant, G., Meng, C.X., Teng, K.K., Hempstead, B.L. & Lee, F.S. (2004) Variant brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (Met66) alters the intracellular trafficking and activity-dependent secretion of wild-type BDNF in neurosecretory cells and cortical neurons. *J Neurosci*, **24**, 4401-4411.
- Conner, J.M., Yan, Q. & Varon, S. (1996) Distribution of brain-derived neurotrophic factor in the rat pituitary gland. *Neuroreport*, **7**, 1937-1940.
- Corson, M.A., James, N.L., Latta, S.E., Nerem, R.M., Berk, B.C. & Harrison, D.G. (1996) Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress. *Circulation research*, **79**, 984-991.
- Cotman, C.W. & Berchtold, N.C. (2002) Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends Neurosci*, **25**, 295-301.

- Cox, S.B., Woolsey, T.A. & Rovainen, C.M. (1993) Localized dynamic changes in cortical blood flow with whisker stimulation corresponds to matched vascular and neuronal architecture of rat barrels. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, **13**, 899-913.
- Czurko, A., Hirase, H., Csicsvari, J. & Buzsaki, G. (1999) Sustained activation of hippocampal pyramidal cells by 'space clamping' in a running wheel. *The European journal of neuroscience*, **11**, 344-352.
- Davies, P.F. (2009) Hemodynamic shear stress and the endothelium in cardiovascular pathophysiology. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, **6**, 16-26.
- Davies, P.F., Civelek, M., Fang, Y. & Fleming, I. (2013) The atherosusceptible endothelium: endothelial phenotypes in complex haemodynamic shear stress regions in vivo. *Cardiovascular research*, **99**, 315-327.
- de la Torre, J.C. & Aliev, G. (2005) Inhibition of vascular nitric oxide after rat chronic brain hypoperfusion: spatial memory and immunocytochemical changes. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, **25**, 663-672.
- del Zoppo, G.J. & Mabuchi, T. (2003) Cerebral microvessel responses to focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, **23**, 879-894.
- Deogracias, R., Espliguero, G., Iglesias, T. & Rodriguez-Pena, A. (2004) Expression of the neurotrophin receptor trkB is regulated by the cAMP/CREB pathway in neurons. *Mol Cell Neurosci*, **26**, 470-480.
- Di Francescomarino, S., Sciartilli, A., Di Valerio, V., Di Baldassarre, A. & Gallina, S. (2009) The effect of physical exercise on endothelial function. *Sports medicine*, **39**, 797-812.
- Diamond, S.L., Eskin, S.G. & McIntire, L.V. (1989) Fluid flow stimulates tissue plasminogen activator secretion by cultured human endothelial cells. *Science*, **243**, 1483-1485.
- Diamond, S.L., Sharefkin, J.B., Dieffenbach, C., Frasier-Scott, K., McIntire, L.V. & Eskin, S.G. (1990) Tissue plasminogen activator messenger RNA levels increase in cultured human endothelial cells exposed to laminar shear stress. *J Cell Physiol*, **143**, 364-371.
- Dimmeler, S., Fleming, I., Fisslthaler, B., Hermann, C., Busse, R. & Zeiher, A.M. (1999) Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*, **399**, 601-605.

- Dinerman, J.L., Dawson, T.M., Schell, M.J., Snowman, A. & Snyder, S.H. (1994) Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: implications for synaptic plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**, 4214-4218.
- Ding, Q., Ying, Z. & Gomez-Pinilla, F. (2011) Exercise influences hippocampal plasticity by modulating brain-derived neurotrophic factor processing. *Neuroscience*, **192**, 773-780.
- Ding, Y.H., Li, J., Zhou, Y., Rafols, J.A., Clark, J.C. & Ding, Y. (2006) Cerebral angiogenesis and expression of angiogenic factors in aging rats after exercise. *Current neurovascular research*, **3**, 15-23.
- Doyle, C.A. & Slater, P. (1997) Localization of neuronal and endothelial nitric oxide synthase isoforms in human hippocampus. *Neuroscience*, **76**, 387-395.
- Drake, C.T. & Iadecola, C. (2007) The role of neuronal signaling in controlling cerebral blood flow. *Brain Lang*, **102**, 141-152.
- Dunn, K.M. & Nelson, M.T. (2014) Neurovascular signaling in the brain and the pathological consequences of hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **306**, H1-14.
- Earley, S., Waldron, B.J. & Brayden, J.E. (2004) Critical role for transient receptor potential channel TRPM4 in myogenic constriction of cerebral arteries. *Circulation research*, **95**, 922-929.
- Egan, M.F., Kojima, M., Callicott, J.H., Goldberg, T.E., Kolachana, B.S., Bertolino, A., Zaitsev, E., Gold, B., Goldman, D., Dean, M., Lu, B. & Weinberger, D.R. (2003) The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell*, **112**, 257-269.
- Erinjeri, J.P. & Woolsey, T.A. (2002) Spatial integration of vascular changes with neural activity in mouse cortex. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, **22**, 353-360.
- Ernfors, P., Wetmore, C., Olson, L. & Persson, H. (1990) Identification of cells in rat brain and peripheral tissues expressing mRNA for members of the nerve growth factor family. *Neuron*, **5**, 511-526.
- Fenner, B.M. (2012) Truncated TrkB: beyond a dominant negative receptor. *Cytokine Growth Factor Rev*, **23**, 15-24.

- Fisher, J.P., Hartwich, D., Seifert, T., Olesen, N.D., McNulty, C.L., Nielsen, H.B., van Lieshout, J.J. & Secher, N.H. (2013) Cerebral perfusion, oxygenation and metabolism during exercise in young and elderly individuals. *The Journal of physiology*, **591**, 1859-1870.
- Foreman, D.L., Sanders, M. & Bloor, C.M. (1976) Total and regional cerebral blood flow during moderate and severe exercise in miniature swine. *J Appl Physiol*, **40**, 191-195.
- Frazzitta, G., Maestri, R., Bertotti, G., Riboldazzi, G., Boveri, N., Perini, M., Uccellini, D., Turla, M., Comi, C., Pezzoli, G. & Ghilardi, M.F. (2015) Intensive rehabilitation treatment in early Parkinson's disease: a randomized pilot study with a 2-year follow-up. *Neurorehabil Neural Repair*, **29**, 123-131.
- Garcia, C., Chen, M.J., Garza, A.A., Cotman, C.W. & Russo-Neustadt, A. (2003) The influence of specific noradrenergic and serotonergic lesions on the expression of hippocampal brain-derived neurotrophic factor transcripts following voluntary physical activity. *Neuroscience*, **119**, 721-732.
- Gassmann, M., Grenacher, B., Rohde, B. & Vogel, J. (2009) Quantifying Western blots: pitfalls of densitometry. *Electrophoresis*, **30**, 1845-1855.
- Gerecke, K.M., Jiao, Y., Pagala, V. & Smeyne, R.J. (2012) Exercise does not protect against MPTP-induced neurotoxicity in BDNF haploinsufficient mice. *PLoS one*, **7**, e43250.
- Girouard, H. & Iadecola, C. (2006) Neurovascular coupling in the normal brain and in hypertension, stroke, and Alzheimer disease. *Journal of applied physiology*, **100**, 328-335.
- Goekint, M., Bos, I., Heyman, E., Meeusen, R., Michotte, Y. & Sarre, S. (2012) Acute running stimulates hippocampal dopaminergic neurotransmission in rats, but has no influence on brain-derived neurotrophic factor. *Journal of applied physiology*, **112**, 535-541.
- Gomez-Pinilla, F., Vaynman, S. & Ying, Z. (2008) Brain-derived neurotrophic factor functions as a metabotrophin to mediate the effects of exercise on cognition. *The European journal of neuroscience*, **28**, 2278-2287.
- Gondin, J., Duclay, J. & Martin, A. (2006) Soleus- and gastrocnemii-evoked V-wave responses increase after neuromuscular electrical stimulation training. *J Neurophysiol*, **95**, 3328-3335.
- Grabowski, E.F., Naus, G.J. & Weksler, B.B. (1985) Prostacyclin production in vitro by rabbit aortic endothelium: correction for unstirred diffusional layers. *Blood*, **66**, 1047-1052.
- Gross, P.M., Marcus, M.L. & Heistad, D.D. (1980) Regional distribution of cerebral blood flow during exercise in dogs. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol*, **48**, 213-217.

- Guo, J., Yu, C., Li, H., Liu, F., Feng, R., Wang, H., Meng, Y., Li, Z., Ju, G. & Wang, J. (2010) Impaired neural stem/progenitor cell proliferation in streptozotocin-induced and spontaneous diabetic mice. *Neurosci Res*, **68**, 329-336.
- Hambrecht, R., Adams, V., Erbs, S., Linke, A., Krankel, N., Shu, Y., Baither, Y., Gielen, S., Thiele, H., Gummert, J.F., Mohr, F.W. & 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.
- Hamel, E. (2006) Perivascular nerves and the regulation of cerebrovascular tone. *J Appl Physiol (1985)*, **100**, 1059-1064.
- Hamner, J.W. & Tan, C.O. (2014) Relative contributions of sympathetic, cholinergic, and myogenic mechanisms to cerebral autoregulation. *Stroke; a journal of cerebral circulation*, **45**, 1771-1777.
- Hamner, J.W., Tan, C.O., Tzeng, Y.C. & Taylor, J.A. (2012) Cholinergic control of the cerebral vasculature in humans. *J Physiol*, **590**, 6343-6352.
- Harper, A.M., Deshmukh, V.D., Rowan, J.O. & Jennett, W.B. (1972) The influence of sympathetic nervous activity on cerebral blood flow. *Arch Neurol*, **27**, 1-6.
- Heerssen, H.M. & Segal, R.A. (2002) Location, location, location: a spatial view of neurotrophin signal transduction. *Trends Neurosci*, **25**, 160-165.
- Heistad, D.D., Marcus, M.L. & Gross, P.M. (1978) Effects of sympathetic nerves on cerebral vessels in dog, cat, and monkey. *Am J Physiol*, **235**, H544-552.
- Hellstrom, G., Fischer-Colbrie, W., Wahlgren, N.G. & Jogestrand, T. (1996a) Carotid artery blood flow and middle cerebral artery blood flow velocity during physical exercise. *J Appl Physiol (1985)*, **81**, 413-418.
- Hellstrom, G., Magnusson, G., Wahlgren, N.G., Gordon, A., Sylven, C. & Saltin, B. (1996b) Physical exercise may impair cerebral perfusion in patients with chronic heart failure. *Cardiology in the Elderly*, **4**, 191-194.
- Henry, R.M., Ferreira, I., Kostense, P.J., Dekker, J.M., Nijpels, G., Heine, R.J., Kamp, O., Bouter, L.M. & Stehouwer, C.D. (2004) Type 2 diabetes is associated with impaired endothelium-dependent, flow-mediated dilation, but impaired glucose metabolism is not; The Hoorn Study. *Atherosclerosis*, **174**, 49-56.
- Hernandez, S.S., Sandreschi, P.F., Silva, F.C., Arancibia, B.A., da Silva, R., Gutierrez, P.J. & Andrade, A. (2014) What are the Benefits of Exercise for Alzheimer's Disease? A Systematic Review of Past 10 Years. *J Aging Phys Act*.

- Hilton, S.M. (1959) A peripheral arterial conducting mechanism underlying dilatation of the femoral artery and concerned in functional vasodilatation in skeletal muscle. *J Physiol*, **149**, 93-111.
- Hiura, M., Nariai, T., Ishii, K., Sakata, M., Oda, K., Toyohara, J. & Ishiwata, K. (2014) Changes in cerebral blood flow during steady-state cycling exercise: a study using oxygen-15-labeled water with PET. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, **34**, 389-396.
- Hofer, M., Pagliusi, S.R., Hohn, A., Leibrock, J. & Barde, Y.A. (1990) Regional distribution of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the adult mouse brain. *EMBO J*, **9**, 2459-2464.
- Holschneider, D.P., Maarek, J.M., Yang, J., Harimoto, J. & Scremin, O.U. (2003) Functional brain mapping in freely moving rats during treadmill walking. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, **23**, 925-932.
- Hopkins, M.E. & Bucci, D.J. (2010) BDNF expression in perirhinal cortex is associated with exercise-induced improvement in object recognition memory. *Neurobiol Learn Mem*, **94**, 278-284.
- Howarth, C. (2014) The contribution of astrocytes to the regulation of cerebral blood flow. *Front Neurosci*, **8**, 103.
- Iadecola, C. (2004) Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci*, **5**, 347-360.
- Ide, K., Pott, F., Van Lieshout, J.J. & Secher, N.H. (1998) Middle cerebral artery blood velocity depends on cardiac output during exercise with a large muscle mass. *Acta Physiol Scand*, **162**, 13-20.
- Ide, K. & Secher, N.H. (2000) Cerebral blood flow and metabolism during exercise. *Prog Neurobiol*, **61**, 397-414.
- Ikai, S., Uchida, H., Suzuki, T., Tsunoda, K., Mimura, M. & Fujii, Y. (2013) Effects of yoga therapy on postural stability in patients with schizophrenia-spectrum disorders: a single-blind randomized controlled trial. *J Psychiatr Res*, **47**, 1744-1750.
- Ivy, A.S., Rodriguez, F.G., Garcia, C., Chen, M.J. & Russo-Neustadt, A.A. (2003) Noradrenergic and serotonergic blockade inhibits BDNF mRNA activation following exercise and antidepressant. *Pharmacol Biochem Behav*, **75**, 81-88.

- Jensen, L.J. & Holstein-Rathlou, N.H. (2013) The vascular conducted response in cerebral blood flow regulation. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, **33**, 649-656.
- Ke, Z., Yip, S.P., Li, L., Zheng, X.X. & Tong, K.Y. (2011) The effects of voluntary, involuntary, and forced exercises on brain-derived neurotrophic factor and motor function recovery: a rat brain ischemia model. *PLoS one*, **6**, e16643.
- Kelleher, R.J. & Soiza, R.L. (2013) Evidence of endothelial dysfunction in the development of Alzheimer's disease: Is Alzheimer's a vascular disorder? *Am J Cardiovasc Dis*, **3**, 197-226.
- Kety, S.S. & Schmidt, C.F. (1948) The Nitrous Oxide Method for the Quantitative Determination of Cerebral Blood Flow in Man: Theory, Procedure and Normal Values. *J Clin Invest*, **27**, 476-483.
- Kim, H., Li, Q., Hempstead, B.L. & Madri, J.A. (2004) Paracrine and autocrine functions of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and nerve growth factor (NGF) in brain-derived endothelial cells. *J Biol Chem*, **279**, 33538-33546.
- Kim, K.J., Iddings, J.A., Stern, J.E., Blanco, V.M., Croom, D., Kirov, S.A. & Filosa, J.A. (2015) Astrocyte contributions to flow/pressure-evoked parenchymal arteriole vasoconstriction. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **35**, 8245-8257.
- Kimura, A., Okada, K., Sato, A. & Suzuki, H. (1994) Regional cerebral blood flow in the frontal, parietal and occipital cortices increases independently of systemic arterial pressure during slow walking in conscious rats. *Neurosci Res*, **20**, 309-315.
- Kirk-Sanchez, N.J. & McGough, E.L. (2014) Physical exercise and cognitive performance in the elderly: current perspectives. *Clin Interv Aging*, **9**, 51-62.
- Kitazono, T., Ibayashi, S., Nagao, T., Fujii, K. & Fujishima, M. (1997) Role of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in acetylcholine-induced dilatation of the basilar artery in vivo. *British journal of pharmacology*, **120**, 102-106.
- Kobayashi, S., Tsukahara, S., Sugita, K. & Nagata, T. (1981) Adrenergic and cholinergic innervation of rat cerebral arteries. Consecutive demonstration on whole mount preparations. *Histochemistry*, **70**, 129-138.
- Kontos, H.A., Wei, E.P., Navari, R.M., Levasseur, J.E., Rosenblum, W.I. & Patterson, J.L., Jr. (1978) Responses of cerebral arteries and arterioles to acute hypotension and hypertension. *Am J Physiol*, **234**, H371-383.

- Lansman, J.B. (1988) Endothelial mechanosensors. Going with the flow. *Nature*, **331**, 481-482.
- Lassen, N.A. (1959) Cerebral blood flow and oxygen consumption in man. *Physiol Rev*, **39**, 183-238.
- Lee, R.M. (1995) Morphology of cerebral arteries. *Pharmacol Ther*, **66**, 149-173.
- Lehoux, S., Castier, Y. & Tedgui, A. (2006) Molecular mechanisms of the vascular responses to haemodynamic forces. *Journal of internal medicine*, **259**, 381-392.
- Lessmann, V. & Brigadski, T. (2009) Mechanisms, locations, and kinetics of synaptic BDNF secretion: an update. *Neuroscience research*, **65**, 11-22.
- Lessmann, V., Gottmann, K. & Malsangio, M. (2003) Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. *Progress in neurobiology*, **69**, 341-374.
- Liu, Y.F., Chen, H.I., Wu, C.L., Kuo, Y.M., Yu, L., Huang, A.M., Wu, F.S., Chuang, J.I. & Jen, C.J. (2009) Differential effects of treadmill running and wheel running on spatial or aversive learning and memory: roles of amygdalar brain-derived neurotrophic factor and synaptotagmin I. *J Physiol*, **587**, 3221-3231.
- Liu, Y.F., Chen, H.I., Yu, L., Kuo, Y.M., Wu, F.S., Chuang, J.I., Liao, P.C. & Jen, C.J. (2008) Upregulation of hippocampal TrkB and synaptotagmin is involved in treadmill exercise-enhanced aversive memory in mice. *Neurobiol Learn Mem*, **90**, 81-89.
- Louessard, M., Lacroix, A., Martineau, M., Mondielli, G., Montagne, A., Lesept, F., Lambolez, B., Cauli, B., Mothet, J.P., Vivien, D. & Maubert, E. (2015) Tissue Plasminogen Activator Expression Is Restricted to Subsets of Excitatory Pyramidal Glutamatergic Neurons. *Mol Neurobiol*.
- Luft, A.R., Macko, R.F., Forrester, L.W., Villagra, F., Ivey, F., Sorkin, J.D., Whittall, J., McCombe-Waller, S., Katzel, L., Goldberg, A.P. & Hanley, D.F. (2008) Treadmill exercise activates subcortical neural networks and improves walking after stroke: a randomized controlled trial. *Stroke*, **39**, 3341-3350.
- Macko, R.F., Ivey, F.M., Forrester, L.W., Hanley, D., Sorkin, J.D., Katzel, L.I., Silver, K.H. & Goldberg, A.P. (2005) Treadmill exercise rehabilitation improves ambulatory function and cardiovascular fitness in patients with chronic stroke: a randomized, controlled trial. *Stroke*, **36**, 2206-2211.
- Madinier, A., Bertrand, N., Mossiat, C., Prigent-Tessier, A., Beley, A., Marie, C. & Garnier, P. (2009) Microglial involvement in neuroplastic changes following focal brain ischemia in rats. *PLoS One*, **4**, e8101.



- Madsen, P.L., Sperling, B.K., Warming, T., Schmidt, J.F., Secher, N.H., Wildschiodtz, G., Holm, S. & Lassen, N.A. (1993) Middle cerebral artery blood velocity and cerebral blood flow and O<sub>2</sub> uptake during dynamic exercise. *J Appl Physiol* (1985), **74**, 245-250.
- Manohar, M. (1986) Regional brain blood flow and O<sub>2</sub> delivery during severe exertion in the pony. *Respir Physiol*, **64**, 339-349.
- McCarty, M.F. (2000) Up-regulation of endothelial nitric oxide activity as a central strategy for prevention of ischemic stroke - just say NO to stroke! *Med Hypotheses*, **55**, 386-403.
- Mehta, N.R., Jones, L., Kraut, M.A. & Melhem, E.R. (2000) Physiologic variations in dural venous sinus flow on phase-contrast MR imaging. *AJR Am J Roentgenol*, **175**, 221-225.
- Meuchel, L.W., Thompson, M.A., Cassivi, S.D., Pabelick, C.M. & Prakash, Y.S. (2011) Neurotrophins induce nitric oxide generation in human pulmonary artery endothelial cells. *Cardiovascular research*, **91**, 668-676.
- Michalski, B., Corrada, M.M., Kawas, C.H. & Fahnestock, M. (2015) Brain-derived neurotrophic factor and TrkB expression in the "oldest-old," the 90+ Study: correlation with cognitive status and levels of soluble amyloid-beta. *Neurobiol Aging*.
- Mulligan, S.J. & MacVicar, B.A. (2004) Calcium transients in astrocyte endfeet cause cerebrovascular constrictions. *Nature*, **431**, 195-199.
- Murrell, C.J., Cotter, J.D., Thomas, K.N., Lucas, S.J., Williams, M.J. & Ainslie, P.N. (2013) Cerebral blood flow and cerebrovascular reactivity at rest and during sub-maximal exercise: effect of age and 12-week exercise training. *Age (Dordr)*, **35**, 905-920.
- Nakajima, K., Uchida, S., Suzuki, A., Hotta, H. & Aikawa, Y. (2003) The effect of walking on regional blood flow and acetylcholine in the hippocampus in conscious rats. *Auton Neurosci*, **103**, 83-92.
- Nelson, M.T. & Quayle, J.M. (1995) Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *The American journal of physiology*, **268**, C799-822.
- Nemoto, K., Fukamachi, K., Nemoto, F., Miyata, S., Hamada, M., Nakamura, Y., Senba, E. & Ueyama, T. (1998) Gene expression of neurotrophins and their receptors in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **245**, 284-288.
- Nishijima, T., Okamoto, M., Matsui, T., Kita, I. & Soya, H. (2012) Hippocampal functional hyperemia mediated by NMDA receptor/NO signaling in rats during mild exercise. *Journal of applied physiology*, **112**, 197-203.

- Nishijima, T. & Soya, H. (2006) Evidence of functional hyperemia in the rat hippocampus during mild treadmill running. *Neurosci Res*, **54**, 186-191.
- Ogoh, S. (2008) Autonomic control of cerebral circulation: exercise. *Med Sci Sports Exerc*, **40**, 2046-2054.
- Ogoh, S. & Ainslie, P.N. (2009) Cerebral blood flow during exercise: mechanisms of regulation. *Journal of applied physiology*, **107**, 1370-1380.
- Ogoh, S., Brothers, R.M., Barnes, Q., Eubank, W.L., Hawkins, M.N., Purkayastha, S., A, O.Y. & Raven, P.B. (2005) The effect of changes in cardiac output on middle cerebral artery mean blood velocity at rest and during exercise. *The Journal of physiology*, **569**, 697-704.
- Orgogozo, J.M. & Larsen, B. (1979) Activation of the supplementary motor area during voluntary movement in man suggests it works as a supramotor area. *Science*, **206**, 847-850.
- Paniagua, O.A., Bryant, M.B. & Panza, J.A. (2001) Role of endothelial nitric oxide in shear stress-induced vasodilation of human microvasculature: diminished activity in hypertensive and hypercholesterolemic patients. *Circulation*, **103**, 1752-1758.
- Pannier, J.L. & Leusen, I. (1977) Regional blood flow in response to exercise in conscious dogs. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, **36**, 255-265.
- Parks, C.M. & Manohar, M. (1983) Distribution of blood flow during moderate and strenuous exercise in ponies (*Equus caballus*). *Am J Vet Res*, **44**, 1861-1866.
- Pinard, E., Purves, M.J., Seylaz, J. & Vasquez, J.V. (1979) The cholinergic pathway to cerebral blood vessels. II. Physiological studies. *Pflugers Arch*, **379**, 165-172.
- Prigent-Tessier, A., Quirie, A., Maguin-Gate, K., Szostak, J., Mossiat, C., Nappey, M., Devaux, S., Marie, C. & Demougeot, C. (2013) Physical training and hypertension have opposite effects on endothelial brain-derived neurotrophic factor expression. *Cardiovasc Res*, **100**, 374-382.
- Pruunsild, P., Kazantseva, A., Aid, T., Palm, K. & Timmusk, T. (2007) Dissecting the human BDNF locus: bidirectional transcription, complex splicing, and multiple promoters. *Genomics*, **90**, 397-406.
- Querido, J.S. & Sheel, A.W. (2007) Regulation of cerebral blood flow during exercise. *Sports Med*, **37**, 765-782.

- Quirie, A., Hervieu, M., Garnier, P., Demougeot, C., Mossiat, C., Bertrand, N., Martin, A., Marie, C. & Prigent-Tessier, A. (2012) Comparative effect of treadmill exercise on mature BDNF production in control versus stroke rats. *PLoS One*, **7**, e44218.
- Rasmussen, P., Brassard, P., Adser, H., Pedersen, M.V., Leick, L., Hart, E., Secher, N.H., Pedersen, B.K. & Pilegaard, H. (2009) Evidence for a release of brain-derived neurotrophic factor from the brain during exercise. *Exp Physiol*, **94**, 1062-1069.
- Reading, S.A. & Brayden, J.E. (2007) Central role of TRPM4 channels in cerebral blood flow regulation. *Stroke; a journal of cerebral circulation*, **38**, 2322-2328.
- Rees, D.D., Palmer, R.M., Hodson, H.F. & Moncada, S. (1989) A specific inhibitor of nitric oxide formation from L-arginine attenuates endothelium-dependent relaxation. *Br J Pharmacol*, **96**, 418-424.
- Reichardt, L.F. (2006) Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **361**, 1545-1564.
- Rhyu, I.J., Bytheway, J.A., Kohler, S.J., Lange, H., Lee, K.J., Boklewski, J., McCormick, K., Williams, N.I., Stanton, G.B., Greenough, W.T. & Cameron, J.L. (2010) Effects of aerobic exercise training on cognitive function and cortical vascularity in monkeys. *Neuroscience*, **167**, 1239-1248.
- Rodier, M., Prigent-Tessier, A., Bejot, Y., Jacquin, A., Mossiat, C., Marie, C. & Garnier, P. (2014) Exogenous t-PA administration increases hippocampal mature BDNF levels. plasmin- or NMDA-dependent mechanism? *PloS one*, **9**, e92416.
- Rybakowski, J.K., Wykretowicz, A., Heymann-Szlachcinska, A. & Wysocki, H. (2006) Impairment of endothelial function in unipolar and bipolar depression. *Biol Psychiatry*, **60**, 889-891.
- Sato, K., Ogoh, S., Hirasawa, A., Oue, A. & Sadamoto, T. (2011) The distribution of blood flow in the carotid and vertebral arteries during dynamic exercise in humans. *The Journal of physiology*, **589**, 2847-2856.
- Sato, K. & Sadamoto, T. (2010) Different blood flow responses to dynamic exercise between internal carotid and vertebral arteries in women. *J Appl Physiol (1985)*, **109**, 864-869.
- Schaaf, M.J., de Jong, J., de Kloet, E.R. & Vreugdenhil, E. (1998) Downregulation of BDNF mRNA and protein in the rat hippocampus by corticosterone. *Brain research*, **813**, 112-120.
- Scheewe, T.W., Backx, F.J., Takken, T., Jorg, F., van Strater, A.C., Kroes, A.G., Kahn, R.S. & Cahn, W. (2013) Exercise therapy improves mental and physical health in schizophrenia: a randomised controlled trial. *Acta Psychiatr Scand*, **127**, 464-473.

- Scheinberg, P., Blackburn, L.I., Rich, M. & Saslaw, M. (1954) Effects of vigorous physical exercise on cerebral circulation and metabolism. *Am J Med*, **16**, 549-554.
- Secher, N.H., Seifert, T. & Van Lieshout, J.J. (2008) Cerebral blood flow and metabolism during exercise: implications for fatigue. *J Appl Physiol (1985)*, **104**, 306-314.
- Segal, S.S. & Duling, B.R. (1986) Flow control among microvessels coordinated by intercellular conduction. *Science*, **234**, 868-870.
- Seidel, B., Stanarius, A. & Wolf, G. (1997) Differential expression of neuronal and endothelial nitric oxide synthase in blood vessels of the rat brain. *Neurosci Lett*, **239**, 109-112.
- Seifert, T., Rasmussen, P., Secher, N.H. & Nielsen, H.B. (2009) Cerebral oxygenation decreases during exercise in humans with beta-adrenergic blockade. *Acta physiologica*, **196**, 295-302.
- Seifert, T. & Secher, N.H. (2011) Sympathetic influence on cerebral blood flow and metabolism during exercise in humans. *Progress in neurobiology*, **95**, 406-426.
- Shi, L.H., Luo, F., Woodward, D.J. & Chang, J.Y. (2004) Neural responses in multiple basal ganglia regions during spontaneous and treadmill locomotion tasks in rats. *Exp Brain Res*, **157**, 303-314.
- Shimoda, L.A., Norins, N.A., Jetter, D.C. & Madden, J.A. (1996) Flow-induced responses in piglet isolated cerebral arteries. *Pediatr Res*, **39**, 574-583.
- Shin, S.Y., Katz, P., Wallhagen, M. & Julian, L. (2012) Cognitive impairment in persons with rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)*, **64**, 1144-1150.
- Soya, H., Nakamura, T., Deocaris, C.C., Kimpara, A., Iimura, M., Fujikawa, T., Chang, H., McEwen, B.S. & Nishijima, T. (2007) BDNF induction with mild exercise in the rat hippocampus. *Biochem Biophys Res Commun*, **358**, 961-967.
- Stanarius, A., Topel, I., Schulz, S., Noack, H. & Wolf, G. (1997) Immunocytochemistry of endothelial nitric oxide synthase in the rat brain: a light and electron microscopical study using the tyramide signal amplification technique. *Acta Histochem*, **99**, 411-429.
- Stoquart-Elsankari, S., Lehmann, P., Villette, A., Czosnyka, M., Meyer, M.E., Deramond, H. & Baledent, O. (2009) A phase-contrast MRI study of physiologic cerebral venous flow. *J Cereb Blood Flow Metab*, **29**, 1208-1215.
- Strohle, A. (2009) Physical activity, exercise, depression and anxiety disorders. *J Neural Transm*, **116**, 777-784.

- Swain, R.A., Harris, A.B., Wiener, E.C., Dutka, M.V., Morris, H.D., Theien, B.E., Konda, S., Engberg, K., Lauterbur, P.C. & Greenough, W.T. (2003) Prolonged exercise induces angiogenesis and increases cerebral blood volume in primary motor cortex of the rat. *Neuroscience*, **117**, 1037-1046.
- Tan, C.O. (2012) Defining the characteristic relationship between arterial pressure and cerebral flow. *Journal of applied physiology*, **113**, 1194-1200.
- Teixeira, R.B., Marins, J.C., de Sa Junior, A.R., de Carvalho, C.J., da Silva Moura, T.A., Lade, C.G., Rizvanov, A.A., Kiyasov, A.P., Mukhamedyarov, M.A., Zefirov, A.L., Palotas, A. & Lima, L.M. (2015) Improved cognitive, affective and anxiety measures in patients with chronic systemic disorders following structured physical activity. *Diab Vasc Dis Res*.
- Teng, H.K., Teng, K.K., Lee, R., Wright, S., Tevar, S., Almeida, R.D., Kermani, P., Torkin, R., Chen, Z.Y., Lee, F.S., Kraemer, R.T., Nykjaer, A. & Hempstead, B.L. (2005) ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *J Neurosci*, **25**, 5455-5463.
- ter Laan, M., van Dijk, J.M., Elting, J.W., Staal, M.J. & Absalom, A.R. Sympathetic regulation of cerebral blood flow in humans: a review. *Br J Anaesth*, **111**, 361-367.
- ter Laan, M., van Dijk, J.M., Elting, J.W., Staal, M.J. & Absalom, A.R. (2013) Sympathetic regulation of cerebral blood flow in humans: a review. *Br J Anaesth*, **111**, 361-367.
- Teri, L., Gibbons, L.E., McCurry, S.M., Logsdon, R.G., Buchner, D.M., Barlow, W.E., Kukull, W.A., LaCroix, A.Z., McCormick, W. & Larson, E.B. (2003) Exercise plus behavioral management in patients with Alzheimer disease: a randomized controlled trial. *JAMA*, **290**, 2015-2022.
- Trejo, J.L., Carro, E. & Torres-Aleman, I. (2001) Circulating insulin-like growth factor I mediates exercise-induced increases in the number of new neurons in the adult hippocampus. *J Neurosci*, **21**, 1628-1634.
- Uda, M., Ishido, M., Kami, K. & Masuhara, M. (2006) Effects of chronic treadmill running on neurogenesis in the dentate gyrus of the hippocampus of adult rat. *Brain Res*, **1104**, 64-72.
- Udina, E., Cobianchi, S., Allodi, I. & Navarro, X. (2011) Effects of activity-dependent strategies on regeneration and plasticity after peripheral nerve injuries. *Ann Anat*, **193**, 347-353.
- van Praag, H., Kempermann, G. & Gage, F.H. (1999) Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci*, **2**, 266-270.

- Vancampfort, D., De Hert, M., Knapen, J., Wampers, M., Demunter, H., Deckx, S., Maurissen, K. & Probst, M. (2011) State anxiety, psychological stress and positive well-being responses to yoga and aerobic exercise in people with schizophrenia: a pilot study. *Disabil Rehabil*, **33**, 684-689.
- Vancampfort, D., Stubbs, B., Sienaert, P., Wyckaert, S., De Hert, M., Rosenbaum, S. & Probst, M. (2015) What are the factors that influence physical activity participation in individuals with depression? A review of physical activity correlates from 59 studies. *Psychiatr Danub*, **27**, 210-224.
- Vaynman, S., Ying, Z. & Gomez-Pinilla, F. (2003) Interplay between brain-derived neurotrophic factor and signal transduction modulators in the regulation of the effects of exercise on synaptic-plasticity. *Neuroscience*, **122**, 647-657.
- Viboolvorakul, S. & Patumraj, S. (2014) Exercise training could improve age-related changes in cerebral blood flow and capillary vascularity through the upregulation of VEGF and eNOS. *BioMed research international*, **2014**, 230791.
- Vrselja, Z., Brkic, H., Mrdenovic, S., Radic, R. & Curic, G. (2014) Function of circle of Willis. *J Cereb Blood Flow Metab*, **34**, 578-584.
- Wetmore, C., Ernfors, P., Persson, H. & Olson, L. (1990) Localization of brain-derived neurotrophic factor mRNA to neurons in the brain by in situ hybridization. *Exp Neurol*, **109**, 141-152.
- Willie, C.K., Macleod, D.B., Shaw, A.D., Smith, K.J., Tzeng, Y.C., Eves, N.D., Ikeda, K., Graham, J., Lewis, N.C., Day, T.A. & Ainslie, P.N. (2012) Regional brain blood flow in man during acute changes in arterial blood gases. *The Journal of physiology*, **590**, 3261-3275.
- Willie, C.K., Tzeng, Y.C., Fisher, J.A. & Ainslie, P.N. (2014) Integrative regulation of human brain blood flow. *J Physiol*, **592**, 841-859.
- Wrann, C.D., White, J.P., Salogiannis, J., Laznik-Bogoslavski, D., Wu, J., Ma, D., Lin, J.D., Greenberg, M.E. & Spiegelman, B.M. (2013) Exercise induces hippocampal BDNF through a PGC-1alpha/FNDC5 pathway. *Cell Metab*, **18**, 649-659.
- Yaffe, K., Vittinghoff, E., Pletcher, M.J., Hoang, T.D., Launer, L.J., Whitmer, R., Coker, L.H. & Sidney, S. Early adult to midlife cardiovascular risk factors and cognitive function. *Circulation*, **129**, 1560-1567.
- Yamamoto, M., Sobue, G., Yamamoto, K., Terao, S. & Mitsuma, T. (1996) Expression of mRNAs for neurotrophic factors (NGF, BDNF, NT-3, and GDNF) and their receptors (p75NGFR, trkA, trkB, and trkC) in the adult human peripheral nervous system and nonneural tissues. *Neurochemical research*, **21**, 929-938.

- Yang, J., Siao, C.J., Nagappan, G., Marinic, T., Jing, D., McGrath, K., Chen, Z.Y., Mark, W., Tessarollo, L., Lee, F.S., Lu, B. & Hempstead, B.L. (2009) Neuronal release of proBDNF. *Nat Neurosci*, **12**, 113-115.
- Yau, S.Y., Lau, B.W., Zhang, E.D., Lee, J.C., Li, A., Lee, T.M., Ching, Y.P., Xu, A.M. & So, K.F. (2012) Effects of voluntary running on plasma levels of neurotrophins, hippocampal cell proliferation and learning and memory in stressed rats. *Neuroscience*, **222**, 289-301.
- You, J., Johnson, T.D., Childres, W.F. & Bryan, R.M., Jr. (1997) Endothelial-mediated dilations of rat middle cerebral arteries by ATP and ADP. *The American journal of physiology*, **273**, H1472-1477.
- Zafra, F., Castren, E., Thoenen, H. & Lindholm, D. (1991) Interplay between glutamate and gamma-aminobutyric acid transmitter systems in the physiological regulation of brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor synthesis in hippocampal neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **88**, 10037-10041.
- Zhu, X.H., Zhang, Y., Zhang, N., Ugurbil, K. & Chen, W. (2007) Noninvasive and three-dimensional imaging of CMRO(2) in rats at 9.4 T: reproducibility test and normothermia/hypothermia comparison study. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, **27**, 1225-1234.
- Zlokovic, B.V. (2011) Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. *Nat Rev Neurosci*, **12**, 723-738.
- Zonta, M., Angulo, M.C., Gobbo, S., Rosengarten, B., Hossmann, K.A., Pozzan, T. & Carmignoto, G. (2003) Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nature neuroscience*, **6**, 43-50.