



**HAL**  
open science

# Mélatonine et autorégulation du débit sanguin cérébral

Olivier Regrigny

► **To cite this version:**

Olivier Regrigny. Mélatonine et autorégulation du débit sanguin cérébral. Médecine humaine et pathologie. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2000. Français. NNT: 2000NAN12017. tel-01748190

**HAL Id: tel-01748190**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748190v1>**

Submitted on 29 Mar 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

**UNIVERSITE HENRI POINCARÉ – NANCY I**

2000

---

**ECOLE DOCTORALE "BIOLOGIE ET SANTE"**

**THESE**

DB 04537  
Présentée et soutenue publiquement

Le septembre 2000



Pour obtenir le titre de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE  
HENRI POINCARÉ – NANCY I**  
Mention Sciences du médicament

Par Olivier REGRIGNY

Titulaire du Diplôme d'Etudes approfondies :

Métabolisme et Mécanisme d'Action des Médicaments, Pharmacologie Clinique

Sujet :

**Mélatonine et Autorégulation du Débit Sanguin  
Cérébral**

**MEMBRES DU JURY**

Juges :

Professeur Jeffrey Atkinson, Nancy

Professeur Gary Baumbach, Iowa City, USA

Docteur Philippe Delagrangé, Paris

Rapporteurs

Professeur Diane Krause, Irvine, USA

Docteur E.T. MacKenzie, Caen

BU PHARMA-ODONTOL



D

104 057250 7

# FACULTE DE PHARMACIE

UNIVERSITE Henri Poincaré - NANCY I

## Membres du personnel enseignant

**Doyen** : Mme Chantal FINANCE

**Vice Doyen** : Mme Anne ROVEL

### DOYENS HONORAIRES

M. BERNANOSE André  
M. VIGNERON Claude

### PROFESSEURS HONORAIRES

Mle BESSON Suzanne  
Mle GIRARD Thérèse  
M. LECTARD Pierre

M. MIRJOLET Marcel  
M. PIERFITTE Maurice

### PROFESSEUR EMERITE

M. LOPPINET Vincent

### PROFESSEURS

M.	ASTIER Alain	Pharmacie Clinique
M.	ATKINSON Jeffrey	Pharmacologie
M.	BAGREL Alain	Biochimie fondamentale et clinique, Biotechnologies
Mle	BATT Anne Marie	Toxicologie
M.	BLOCK Jean Claude	Santé et Environnement
M.	BONALY Roger	Biochimie microbienne
Mme	CAPDEVILLE-ATKINSON	Pharmacologie Cardiovasculaire
Mme	FINANCE Chantal	Microbiologie moléculaire
Mme	FRIANT-MICHEL Pascale	Biomathématiques, Biophysique et Audioprothèse
Mle	GALTEAU Marie Madeleine	Biochimie
M.	HENRY Max	Biologie végétale
M.	HOFFMAN Maurice	Pharmacie clinique
M.	JACQUE Michel	Pharmacodynamie
M.	LABRUDE Pierre	Physiologie
M.	LALLOZ Lucien	Chimie organique
M.	LEROY Pierre	Physico-chimie appliquée à la formulation pharmaceutique
M.	MAINCENT Philippe	Pharmacie galénique
M.	MARSURA Alain	Chimie thérapeutique
M.	MARTIN Jean Armand	Chimie minérale et Minéralogie
M.	MORTIER François	Pharmacognosie
M.	NICOLAS Alain	Chimie analytique et Bromatologie
M.	REGNOUF DE VAINS Jean Bernard	Chimie Thérapeutique
Mme	SCHWARTZBROD Janine	Bactériologie - Parasitologie
M.	SCHWARTZBROD Louis	Virologie - Immunologie
M.	SIEST Gérard	Chimie Biologique
M.	SIMON Jean Michel	Droit et Economie de la Santé
M.	VIGNERON Claude	Hématologie

## MAITRES DE CONFERENCES

Mme	ALBERT Monique	Bactériologie - Virologie
M.	BONNEAUX François	Chimie Thérapeutique
M.	CATAU Gérald	Pharmacodynamie
M.	CHEVIN Jean Claude	Chimie minérale
M.	CHILLON Jean Marc	Pharmacologie
M.	COLLIN Jean François	Pôle européen
Mme	COLLOMB Jocelyne	Parasitologie
M.	COULON Joël	Biochimie
M.	DECOLIN Dominique	Chimie analytique
M.	DUCOURNEAU Joël	Biophysique, Audioprothèse, Acoustique
Mme	FAIVRE-FIORINA Béatrice	GBM - Hématologie
M.	FERRARI Luc	Biochimie
Mle	FONS Françoise	Biologie Végétale et Mycologie
Mme	FUZELLIER Marie Claude	Pharmacognosie
M.	GANTZER Christophe	Virologie
M.	GIBAUD Stéphane	Pharmacie Clinique
Mme	HASENFRATZ-SAUDER Marie Paule	Biologie Végétale
Mle	HINZELIN Françoise	Biologie végétale et Pharmacognosie
M.	HUMBERT Thierry	Interactions moléculaires
Mle	IMBS Marie Andrée	Bactériologie - Virologie et Parasitologie
M.	JORAND Frédéric	Santé et Environnement
Mme	KEDZIEREWICZ Francine	Pharmacie Galénique
Mme	LARTAUD-IDJOUADIENE Isabelle	Pharmacologie
Mme	LEININGER-MULLER Brigitte	Biochimie
Mme	LETOT Michèle	Bactériologie - Virologie et Parasitologie
Mme	LIVERTOUX Marie Hélène	Toxicologie
Mme	MARCHAL-HEUSSLER Emmanuelle	Chimie Analytique
Mme	MARCHAND-ARVIER Monique	Immunologie - Hématologie
M.	MENU Patrick	Physiologie
M.	MONAL Jean Louis	Chimie Thérapeutique
M.	NOTTER Dominique	Biologie cellulaire
Mme	PAULUS Francine	Informatique
Mme	PERDICAKIS Christine	Chimie organique
Mme	PICHON Virginie	Biophysique
Mme	POCHON Marie France	Chimie analytique
Mme	ROVEL Anne	Immunologie - Hématologie
M.	VISVIKIS Athanase	Toxicologie
Mme	WELLMAN-ROUSSEAU Maria Monika	Biochimie
Mme	ZINUTTI Colette	Pharmacie galénique

## ASSISTANTS

Mme	BEAUD Mariette	Biologie Cellulaire
Mme	BERTHE Marie-Catherine	Biochimie
M.	DANGIEN Bernard	Botanique
Mme	MOREAU Blandine	Pharmacognosie
Mme	PAVIS Annie	Parasitologie
M.	TROCKLE Gabriel	Pharmacodynamie

## PROFESSEUR ASSOCIE

Mme	GRISON Geneviève	Pratiques officinales
-----	------------------	-----------------------

## PROFESSEUR AGREGE

M.	COCHAUD Christophe	Anglais
----	--------------------	---------

A ma Femme,

Qui a connu et subi une longue gestation de quatre ans sans jamais se plaindre et qui m'a tellement aidé m'entourant de son amour.

Que ce petit merci, lui révèle un peu l'étendu de ma reconnaissance et de mon amour.

A mes parents,

A Nicolas, Sophie, Clara, Valentin et Téo,

A Sylvie, Eric, Sarah et Zoé

A Paule, Roland, Anne Brigitte et Marion

En témoignage de mon amour

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à

**Monsieur le Professeur J. ATKINSON,**

Qui m'a accueilli dans son laboratoire et m'a permis de réaliser ce travail.

Je le remercie particulièrement pour sa disponibilité, sa grande rigueur et sa patience ainsi que pour la richesse de son enseignement.

Qu'il trouve ici les marques de ma reconnaissance et de mon profond respect.



**Monsieur le Docteur J.M. CHILLON,**

Qui a encadré mes recherches.

Je le remercie pour ses conseils, sa patience, ainsi que pour la rigueur et l'enthousiasme scientifique qu'il m'a transmis.

Son aide m'a permis de mener à bien ce travail et je lui exprime ici toute ma gratitude et ma sympathie.

**Madame le Docteur I. LARTAUD-IDJOUADIENE,**

Qui a encadré mes recherches.

Je la remercie pour ses nombreux conseils, sa patience, ainsi que pour  
l'enthousiasme scientifique qu'elle m'a transmis.

Son aide m'a permis de mener à bien ce travail et je lui exprime ici toute ma  
reconnaissance.

**Monsieur le Professeur E. MAC KENZIE,**

Qui m'a fait le grand honneur d'accepter de juger ce travail.

Je lui exprime ici toute ma gratitude et mon profond respect.

**Monsieur le Professeur G. BAUMBACH,**

Pour l'attention qu'il a porté à ce travail en acceptant de le juger.

Je lui exprime ici toute ma gratitude et mon profond respect.

**Madame le Professeur D. KRAUSE,**

Qui m'a fait le grand honneur d'accepter de juger ce travail.

Je lui exprime ici toute ma gratitude et mon profond respect.

**Monsieur le Docteur P. DELAGRANGE,**

Pour l'attention et l'intérêt qu'il a témoigné à mes recherches en les suivant  
tout au long de leurs réalisations et en participant à ce jury de thèse.

Je lui exprime ici toute ma gratitude et mon profond respect.

Je souhaite également exprimer ma reconnaissance et ma sympathie à

Madame le Professeur C. CAPDEVILLE-ATKINSON,

Monsieur le Docteur P. GIUMMELLY,

Monsieur P. LIMINANA,

Pour l'aide et le soutien qu'ils m'ont apportés tout au long de ce travail.

A tous mes amis, qui ont souffert de mes crises d'impatience, de désespoir ou de folle excitation, je demande pardon et je vous remercie d'avoir été présent à mes cotés.

Soyez assuré de mon amitié.

## Sommaire

	page
<b>SOMMAIRE</b>	<b>I</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS UTILISÉES</b>	<b>IV</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b>	<b>VI</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b>	<b>X</b>
<b>INTRODUCTION GÉNÉRALE</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE I : INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE</b>	<b>5</b>
<b><i>1. Le débit sanguin cérébral</i></b>	<b>6</b>
1.1. Anatomie	7
<i>1.1.1. Apport artériel</i>	7
<i>1.1.2. Capillaires</i>	10
1.2. L'autorégulation du débit sanguin cérébral	12
<i>1.2.1. Définition</i>	12
<i>1.2.2. Modèle de segmentation vasculaire</i>	14
<i>1.2.3. Les mécanismes de l'autorégulation du débit sanguin cérébral</i>	17
1.2.3.1. Théorie métabolique	18
1.2.3.2. Théorie myogénique	20
1.2.3.3. Théorie neurogénique	23
<i>1.2.4. Autres facteurs pouvant contribuer à l'autorégulation du débit sanguin cérébral</i>	26
1.2.4.1. Oxyde nitrique	26
1.2.4.2. Canaux potassiques	27
<i>1.2.5. Modulation physiologique de l'autorégulation du débit sanguin cérébral</i>	29
1.2.5.1. Le système rénine-angiotensine	29
1.2.5.2. Vasodilatateurs et vasoconstricteurs	30



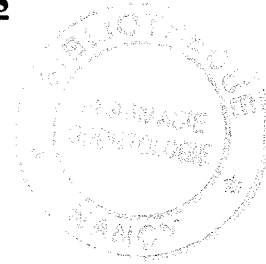
1.3. Autorégulation du DSC et vieillissement	32
1.3.1. <i>Variation des capacités d'autorégulation avec l'âge</i>	32
1.3.2. <i>Autorégulation et démences séniles d'origine vasculaire</i>	34
<b>2. La mélatonine</b>	<b>37</b>
2.1. Physiologie de la mélatonine	37
2.1.1. <i>La glande pinéale</i>	37
2.1.2. <i>Métabolisme</i>	38
2.1.3. <i>Le profil plasmatique de la concentration de mélatonine</i>	41
2.1.4. <i>Régulation de la sécrétion de mélatonine</i>	42
2.2. Pharmacologie de la mélatonine	44
2.2.1. <i>Pharmacocinétique</i>	44
2.2.2. <i>Pharmacodynamie</i>	45
2.2.3. <i>Mode d'action de la mélatonine au niveau de la cellule</i>	47
2.2.3.1. <i>Le récepteur MT<sub>1</sub></i>	47
2.2.3.2. <i>Le récepteur MT<sub>2</sub></i>	48
2.2.3.3. <i>Le récepteur MT<sub>3</sub></i>	49
2.2.3.4. <i>Signalisation intracellulaire</i>	51
2.3. Mélatonine et système cardiovasculaire	53
2.3.1. <i>Effets directs</i>	53
2.3.2. <i>Effets indirects</i>	53
2.4. Mélatonine et vieillissement	55
2.4.1. <i>Taux circulant de mélatonine et âge</i>	55
2.4.2. <i>Système immunitaire</i>	57
2.4.3. <i>Radicaux libres</i>	57
2.4.4. <i>Autres effets</i>	59
<b>3. Objectifs</b>	<b>60</b>



<b>CHAPITRE II : TRAVAUX PERSONNELS</b>	<b>62</b>
<i>1. La mélatonine augmente la marge de sécurité de la circulation cérébrale chez le rat</i>	<i>63</i>
<i>2. La mélatonine augmente le tonus des artérioles cérébrales et diminue la limite basse d'autorégulation du débit sanguin cérébral</i>	<i>85</i>
<i>3. Effets in vivo de la mélatonine sur le diamètre des artères cérébrales</i>	<i>104</i>
<i>4. Structure et fonction des artérioles cérébrales chez le rat pinealectomisé</i>	<i>128</i>
<i>5. Effets bénéfiques de la mélatonine sur la circulation cérébrale du rat âgé</i>	<i>150</i>
<b>CHAPITRE III: DISCUSSION</b>	<b>170</b>
<i>1. Effets "aigus" de la mélatonine</i>	<i>171</i>
1.1. Effets "aigus" de la mélatonine sur les artérioles cérébrales	171
1.2. Effets "aigus" de la mélatonine sur l'autorégulation du débit sanguin cérébral	174
<i>2. Effets "chroniques" de la mélatonine</i>	<i>178</i>
2.1. Effets "chroniques" de la mélatonine sur les artérioles cérébrales	178
2.2. Effets "chroniques" de la mélatonine sur l'autorégulation du débit sanguin cérébral	182
<b>CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES CLINIQUES</b>	<b>186</b>
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>192</b>



## Liste des abréviations utilisées



AMPC	adénosine 3',5' monophosphate cyclique
ATP	adénosine 3',5' triphosphate
AVC	accident vasculaire cérébral
BK <sub>Ca2+</sub>	canaux potassiques calcium-dépendant de grande conductance
bpm	battements par minute
CGRP	calcitonin gene-related peptide
CSA	surface de coupe transversale
CSF	liquide cérébro-spinal artificiel
DAG	diacylglycérol
ΔP	pression artérielle différentielle (ou pulsée) (mmHg)
DSC	débit sanguin cérébral
EC <sub>50</sub>	concentration d'agoniste produisant 50 % de E <sub>max</sub>
EDTA	acide éthylèneamintétraacétique
E <sub>max</sub>	effet maximal d'un agoniste
ESM	écart standard à la moyenne
GMPc	guanosine 3',5' monophosphate cyclique
HIOMT	hydroxyindole-0-méthyltransférase
IP <sub>3</sub>	inositol 1,4,5 triphosphate
K <sup>+</sup> <sub>ATP</sub>	canaux potassiques ATP-dépendant
L-NAME	L-nitrométhyl ester arginine
m	moyenne
min	minute
n	nombre d'animaux
N	nombre d'observations
NAT	N-acétyltransférase

NO	oxyde nitrique
NOS	oxyde nitrique synthase
NS	$P > 0,05$
NSC	noyau supra-chiasmatique
$pA_2$	logarithme inversé de signe de la concentration d'antagoniste qui nécessite une multiplication par 2 la concentration en agoniste pour obtenir le même effet qu'en absence d'antagoniste
PaCO <sub>2</sub>	pression partielle en CO <sub>2</sub> dans le sang artériel (mmHg)
PAD	pression artérielle diastolique (mmHg)
PAM	pression artérielle moyenne (mmHg)
PaO <sub>2</sub>	pression partielle en O <sub>2</sub> dans le sang artériel (mmHg)
PAS	pression artérielle systolique (mmHg)
PCO <sub>2</sub>	pression partielle en CO <sub>2</sub> dans le liquide extracellulaire (mmHg)
PKC	protéines kinases C
PKG	protéines kinases dépendantes du GMPC
PLC	phospholipase C
PvO <sub>2</sub>	pression partielle en O <sub>2</sub> dans le sang veineux
RCV	résistance cérébro-vasculaire
SNP	nitroprussiate de sodium
TEA	tétraéthylammonium

## Liste des figures

	page
<b>Chapitre I</b>	
Figure 1 : Schéma des artères cérébrales majeur et du polygone de Willis (artères en gras) chez l'Homme (Sokoloff, 1997).	9
Figure 2 : Schéma d'un capillaire cérébral. (AS = astrocyte; PER = pericyte) (Peters et coll., 1991).	11
Figure 3 : Schéma de l'autorégulation du débit sanguin cérébral.	14
Figure 4 : Schéma du modèle vasculaire segmentaire de l'autorégulation du DSC (d'après Johnson, 1986).	15
Figure 5 : Schéma de l'évolution du diamètre artériolaire et du débit sanguin cérébral lors d'une diminution de pression artérielle moyenne (d'Après Chillon et Baumbach, 1997).	17
Figure 6 : Schéma de l'effet des variations de PCO <sub>2</sub> sur le diamètre artériolaire.	19
Figure 7 : Effet d'une stimulation sympathique sur la courbe d'autorégulation (Barry et coll., 1984a).	25
Figure 8 : Schéma du fonctionnement des canaux potassiques ATP-dépendant (K <sub>ATP</sub> ) et des canaux potassiques calcium-dépendant (BK <sub>Ca2+</sub> ) (d'après Brian et coll., 1996).	29
Figure 9 : Effet de l'âge sur l'autorégulation du DSC (Lartaud et coll., 1993).	33
Figure 10 : Schéma de l'augmentation du risque d'hypoperfusion cérébrale avec l'âge (d'après Lartaud et coll., 1993).	36
Figure 11 : Localisation de la glande pinéale du rat sur une coupe transversal de cerveau.	38
Figure 12 : Synthèse de la mélatonine dans la glande pinéale. (NAT = N-acétyltransférase; HIOMT = hydroxyindole-O-méthyltransférase; SAM = S-adénosylméthionine; SAH = S-adénosylhomocysteine) (fevre-Montagne, 1985).	40
Figure 13 : Schéma du catabolisme de la mélatonine dans le foie et le cerveau et les métabolites retrouvées dans les urines (Touitou et coll., 1996).	41
Figure 14 : Impact de la mélatonine endogène ou exogène sur la régulation des rythmes nyctéméraux par le noyaux suprachiasmatique (d'après Claustrat et coll., 1996).	44
Figure 15 : Schéma du récepteur MT <sub>1</sub> de <i>Xenopus laevis</i> . (Dubocovich, 1995)	48
Figure 16 : Schéma des variations de la concentration plasmatique de la mélatonine en fonction de l'âge (Reiter, 1994).	56

## Chapitre II

### 1. La mélatonine augmente la marge de sécurité de la circulation cérébrale chez le rat

Figure 1 : Limite basse d'autorégulation du débit sanguin cérébral dans les groupes solvant (triangles ouverts) et contrôle (carrés ouverts), faible dose de mélatonine ( $60 \text{ ng.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ; cercles pleins) et forte dose de mélatonine ( $600 \text{ ng.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ; triangles pleins). 83

### 2. La mélatonine augmente le tonus des artérioles cérébrales et diminue la limite basse d'autorégulation du débit sanguin cérébral

Figure 1: Changements du diamètre artériolaire induit par le luzindole (superfusion,  $10^{-6} \text{ M}$ ; barres blanches), la mélatonine (i.v., barres hachurées) et la mélatonine plus luzindole (barres noires). 101

Figure 2: Effet de la mélatonine ( $60$ , cercles pleins,  $n = 7$ ;  $60 \text{ ng.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , carrés pleins,  $n = 7$ ; et control, carrés vides,  $n = 7$ ) sur la vasodilatation induite par une hémorragie hypotensive. 102

Figure 3: Effet de la mélatonine ( $60$ , cercles pleins,  $n = 7$ ;  $60 \text{ ng.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , carrés pleins,  $n = 7$ ; et control, carrés vides,  $n = 7$ ) sur le diamètre interne des artérioles cérébrales lors d'une hémorragie hypotensive. 103

### 3. effets in vivo de la mélatonine sur le diamètre des artères cérébrales

Figure 1 : Courbe dose-réponse des effets de la mélatonine sur le diamètre des artères cérébrales. 122

Figure 2 : Artérioles (a) et veines cérébrales (v) superfusées par du CSF (A) ou par du CSF plus de la mélatonine ( $10^{-6} \text{ M}$ ; B). 123

Figure 3 : Latence et durée des effets de la mélatonine ( $10^{-6} \text{ M}$ ) sur le diamètre des artérioles cérébrales. 124

Figure 4 : Effets de la mélatonine ( $3 \times 10^{-9}$  et  $3 \times 10^{-8} \text{ M}$ ) avant (aCSF) et après luzindole ( $2 \times 10^{-6} \text{ M}$ ). 125

Figure 5 : Effets de la mélatonine ( $3 \times 10^{-9}$  et  $3 \times 10^{-8} \text{ M}$ ;  $n = 6$ ) ou du L-NAME ( $10^{-8} \text{ M}$ ;  $n = 4$ ) avant (aCSF) et après  $\text{TEA}^+$  ( $10^{-4} \text{ M}$ ). 126

Figure 6: Effets de la mélatonine ( $3 \times 10^{-8} \text{ M}$ ) sur la vasodilatation induite par le NS1619 ( $10^{-5} \text{ M}$ ;  $n = 6$ ) or SNP ( $10^{-8} \text{ M}$ ;  $n = 4$ ). 127

### 4. Structure et fonction des artérioles cérébrales chez le rat pinealectomisé

Figure 1: Relation pression-diamètre des artérioles cérébrales dilatées au maximum par de l'EDTA ( $67 \text{ mmol/L}$ ) durant une hémorragie hypotensive dans les groupes contrôle (carrés pleins,  $n = 8$ ), témoins opérés (triangles pleins,  $n = 8$ ) et rats pinealectomisés non traité (cercles vides,  $n = 10$ ) et traités par de la mélatonine (carrés vides,  $n = 9$ ). 146

Figure 2: Relation contrainte-déformation des artérioles cérébrales durant une hémorragie hypotensive dans les groupes contrôle (carrés pleins,  $n = 8$ ), témoins opérés (triangles pleins,  $n = 8$ ) et rats pinealectomisés non traité (cercles vides,  $n = 10$ ) et traités par de la mélatonine (carrés vides,  $n = 9$ ). 147

- Figure 3: Courbe d'autorégulation du débit sanguin cérébral durant une hémorragie hypotensive dans les groupes contrôle (carrés pleins, n = 8), témoins opérés (triangles pleins, n = 8) et rats pinéalectomisés non traités (cercles vides, n = 10) et traités par de la mélatonine (carrés vides, n = 9). 148
- Figure 4: Relation pression-diamètre des artérioles cérébrales durant une hémorragie hypotensive dans les groupes contrôle (carrés pleins, n = 8), témoins opérés (triangles pleins, n = 8) et rats pinéalectomisés non traité (cercles vides, n = 10) et traités par de la mélatonine (carrés vides, n = 9). 149
- 5. Effets bénéfiques de la mélatonine sur la circulation cérébrale du rat âgé*
- Figure 1: Relation pression-diamètre des artérioles cérébrales dilatées par de l'EDTA (67 mmol/L) durant une hémorragie hypotensive chez les rats âgés de 3 mois (carrés pleins, n = 8), 12 mois (triangles pleins, n = 9), 24 mois non traités (cercles pleins, n= 9) et traités par de la mélatonine (carrés vides, n = 9). 166
- Figure 2: Relation contrainte-déformation des artérioles cérébrales durant une hémorragie hypotensive chez les rats âgés de 3 mois (carrés pleins, n = 8), 12 mois (triangles pleins, n = 9), 24 mois non traités (cercles pleins, n= 9) et traités par de la mélatonine (carrés vides, n = 9). 167
- Figure 3: Courbe d'autorégulation du débit sanguin cérébral durant une hémorragie hypotensive chez les rats âgés de 3 mois (carrés pleins, n = 8), 12 mois (triangles pleins, n = 9), 24 mois non traités (cercles pleins, n= 9) et traités par de la mélatonine (carrés vides, n = 9). 168
- Figure 4: Relation pression diamètre des artérioles cérébrales durant une hémorragie hypotensive chez les rats âgés de 3 mois (carrés pleins, n = 8), 12 mois (triangles pleins, n = 9), 24 mois non traités (cercles pleins, n= 9) et traités par de la mélatonine (carrés vides, n = 9). 169

### Chapitre III

- Figure 1 : Mécanisme d'action intracellulaire de la mélatonine au niveau des artérioles cérébrales aboutissant à la contraction. 172
- Figure 2 : Courbe de dilatation des artérioles cérébrales en fonction de la pression artérielle moyenne sans mélatonine (trait pointillé) et avec mélatonine (trait plein). 175
- Figure 3 : Effet de la mélatonine sur la limite basse d'autorégulation du débit sanguin cérébral. 176
- Figure 4 : Effet chronique de la mélatonine sur les artérioles cérébrales. 180
- Figure 5 : Mécanisme d'action intracellulaire de la mélatonine au niveau des artérioles cérébrales aboutissant à la contraction et à la réorganisation de la paroi vasculaire. 181
- Figure 6 : Effet d'un traitement chronique à la mélatonine (trait plein) sur la courbe de dilatation des artérioles cérébrales en fonction de la pression artérielle moyenne par rapport à l'absence de traitement à la mélatonine (trait pointillé). 183

Figure 7 : Effet d'un traitement chronique à la mélatonine sur la limite basse d'autorégulation du débit sanguin cérébral.

## Liste des tableaux

page

### Chapitre I

Table 1: Les récepteurs à la mélatonine et leurs principales caractéristiques d'après IUPHAR 1998.	50
--	----

### Chapitre II

#### *1. La mélatonine augmente la marge de sécurité de la circulation cérébrale chez le rat*

Table 1: Valeurs de base de la pression artérielle (mmhg), du rythme cardiaque (bpm), du DSC ( $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ), des résistances cérébro-vasculaires ( $\text{mmhg} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min} \cdot 100\text{g}$ ), des gaz sanguins (mm hg), du pH, et de la concentration plasmatique en mélatonine ( $\text{pg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ).	79
---	----

Table 2: Valeurs de la pression artérielle (mmhg), du rythme cardiaque (bpm), du DSC ( $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ), des résistances cérébro-vasculaires ( $\text{mmhg} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min} \cdot 100\text{g}$ ), des gaz sanguins (mmhg), et du pH durant l'inhalation de $\text{CO}_2$ .	80
--	----

Table 3 : DSC (valeur absolue, $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 100\text{g}^{-1}$ et % valeur de base), pression artérielle moyenne (mmHg), rythme cardiaque (bpm), gaz sanguins (mmhg), et pH suite à une hémorragie hypotensive.	81
--	----

#### *2. La mélatonine augmente le tonus des artérioles cérébrales et diminue la limite basse d'autorégulation du débit sanguin cérébral*

Table 1: Effets de la mélatonine sur la pression artérielle (mmhg), le rythme cardiaque (bpm), les gaz sanguins (mmhg), le pH, le DSC ( $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ), et le diamètre artériolaire ( $\mu\text{m}$ ) chez le rat anesthésié.	100
---	-----

#### *4. Structure et fonction des artérioles cérébrales chez le rat pinealectomisé*

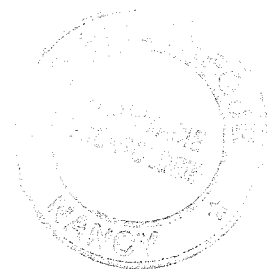
Table 1: Valeurs de base du poids corporel (g), de la pression artérielle (mmhg), du rythme cardiaque (bpm), des gaz sanguins (mmhg), du pH, de la limite basse d'autorégulation, et le diamètre artériolaire ( $\mu\text{m}$ ) dans les groupes contrôle, témoin opéré, pinealectomisé et pinealectomie plus mélatonine.	145
---	-----

#### *5. Effets bénéfiques de la mélatonine sur la circulation cérébrale du rat âgé*

Table 1: Valeurs de base du poids corporel (g), de la pression artérielle (mmhg), du rythme cardiaque (bpm), des gaz sanguins (mmhg), du pH, de la limite basse d'autorégulation, et le diamètre artériolaire ( $\mu\text{m}$ ) pour les rats de 3, 12, 24 mois et 24 mois traités avec de la mélatonine.	165
---	-----







# Introduction Générale

Si le neurone est la cellule clef du cerveau, la vascularisation cérébrale joue un rôle crucial dans le maintien de l'irrigation cérébrale, en permettant au cerveau de disposer de tous les apports métaboliques nécessaires pour maintenir son fonctionnement normal. Un mécanisme essentiel au maintien d'un débit approprié est l'autorégulation du DSC. Ce mécanisme repose sur une adaptation du diamètre des artères et artérioles cérébrales (qui constituent la vascularisation de résistance) en fonction de la pression sanguine. Ainsi, lorsque la pression artérielle diminue, les artères et artérioles cérébrales dilatent afin de diminuer les résistances et de maintenir le DSC constant, et inversement si la pression artérielle augmente.

Malheureusement, si ce système est très efficace chez l'individu jeune, les capacités d'autorégulation du DSC sont diminuées au cours du vieillissement (Lartaud et coll., 1993, Toyoda et coll., 1997a). Dans le même temps, la labilité tensionnelle augmente (Zito et coll., 1991). L'association de ces deux phénomènes au cours du vieillissement aboutit à une augmentation de la probabilité d'épisodes d'hypoperfusions cérébrales dues au simple dépassement de la limite basse d'autorégulation. Une telle répétition d'événements d'hypoperfusion cérébrale, pourrait être à l'origine des démences séniles par infarctus multiples d'origine vasculaire (Shuaib, 1992, Skoog, 1997).

Aux Etats Unis d'Amérique, les démences d'origines vasculaires sont la deuxième cause de démences après la maladie d'Alzheimer (Skoog, 1998). Certains auteurs pensent même que la maladie d'Alzheimer a une origine vasculaire (de la Torre, 1999). Skoog (1998) a trouvé que 30% de la population des gens âgés de plus de 85 ans était démente, et que la moitié de ces démences était d'origine vasculaire. Ainsi, les démences d'origines vasculaires sont un problème de santé publique d'importance et ce d'autant plus si l'on considère le vieillissement de la population dans les pays industrialisés. Or il n'existe pour l'instant aucun traitement permettant de restaurer chez un individu âgé des capacités d'autorégulation du DSC optimales.

La mélatonine, une hormone synthétisée par la glande pinéale, pourrait être impliquée dans la diminution des capacités d'autorégulation du DSC avec l'âge. En effet, de nombreuses observations laissent supposer un lien possible entre le système mélatoninergique et l'autorégulation du DSC. Tout d'abord, la concentration plasmatique en mélatonine diminue avec l'âge (Touitou et coll., 1981) parallèlement à l'augmentation du risque d'accident vasculaire cérébral (AVC). De plus, la fréquence des accidents ischémiques transitoires présente des variations circadiennes et saisonnières qui peuvent se rapprocher du cycle circadien et saisonnier de la mélatonine (Zuber et Mas, 1993). Un autre indice est que les patients souffrant de migraine présentent un taux de mélatonine plus faible que la moyenne (Brun et coll., 1995) et un plus grand risque de faire des AVC (Tatemachi et Mohr, 1992). Il a également été montré que la mélatonine possède des récepteurs sur les artères du système cérébro-vasculaire et qu'elle contracte les artères du polygone de Willis (Mahle et coll., 1995, Geary et coll., 1997) et qu'elle diminue le DSC de base de jeunes rats (Capsoni et coll., 1996).

Il est donc envisageable que la mélatonine puissent avoir une influence sur la circulation cérébrale et en particulier sur l'autorégulation du DSC. Les études expérimentales citées dans ce travail de thèse ont donc pour but d'étudier le lien éventuel entre la mélatonine et l'autorégulation du DSC.

Le premier chapitre regroupe les données bibliographiques concernant tout d'abord l'autorégulation du DSC et ensuite le système mélatoninergique.

Dans le deuxième chapitre sont citées les études expérimentales que nous avons réalisé pour examiner le lien éventuel entre système mélatoninergique et système cérébro-vasculaire. Dans un premier temps nous nous sommes intéressés aux effets aigus de la mélatonine sur le système cérébro-vasculaire. Nous avons d'abord analysé l'impact d'une perfusion de mélatonine sur le DSC et son autorégulation. Nous avons ensuite étudié l'effet de la mélatonine sur le

diamètre artériolaire et précisé son mécanisme d'action. Enfin, nous avons essayé de comprendre comment la mélatonine pouvait modifier l'autorégulation du DSC.

Nous avons ensuite étudié les effets chroniques de la mélatonine. Tout d'abord nous avons analysé l'effet de la privation de mélatonine sur la structure et le fonctionnement des artérioles cérébrales chez des animaux jeunes et sur leur capacité d'autorégulation. Finalement nous avons analysé l'effet d'un traitement chronique à la mélatonine sur la structure et le fonctionnement des artérioles cérébrales chez des animaux âgés et sur leur capacité d'autorégulation.

## **Chapitre I :**

# **Introduction bibliographique**

## **1. Le débit sanguin cérébral**

Le cerveau humain adulte pèse environ 1600 g et représente 2 % du poids corporel. Il reçoit 12 à 15 % du débit cardiaque, soit un DSC moyen de 45 à 55 ml/min/100 g de tissu cérébral (Matsumoto et coll., 1975, Magata et coll., 1995). Ce débit est en rapport avec une consommation d'oxygène importante de 40 à 50 ml/min, soit environ 20 % de la consommation d'oxygène totale de l'organisme (Sokoloff, 1997). Le cerveau utilise 60 % de cet oxygène consommé pour assurer le fonctionnement neuronal. Cette activité est due au maintien des gradients ioniques transmembranaires, à la transmission de l'influx nerveux et à l'action des neurotransmetteurs. Le reste de l'oxygène consommé est utilisé pour le maintien de l'intégrité cellulaire et le fonctionnement des cellules gliales, assurant un rôle de tissu de soutien et contribuant au métabolisme cérébral (transport des neurotransmetteurs, transformation des substrats, élimination des catabolites).

Il existe une grande hétérogénéité dans les circulations cérébrales locales. Le DSC est 3 à 4 fois plus important dans la substance grise que dans la substance blanche et donc plus important dans le cortex que dans les zones sous corticales. D'une région à l'autre du cerveau, le DSC est également variable en fonction de l'activité neuronale (Hurn et Traystman, 1997).

De tous les organes, le cerveau est le plus sensible à l'ischémie. Une interruption du DSC entraîne très rapidement une perte de connaissance suivie de dommages irréversibles (mort neuronale, etc..) (Sokoloff, 1997). Dans le cas d'un arrêt cardiaque, l'étendue des dommages au niveau du cerveau est l'un des facteurs critiques conditionnant le degré de récupération de ces capacités par le patient. Par conséquent, le cerveau dispose d'un réseau vasculaire et de processus physiologiques permettant de maintenir le DSC constant et ce, même dans des conditions relativement extrêmes et parfois au dépend de la perfusion sanguine d'autres organes.

## 1.1. Anatomie

### 1.1.1. Apport artériel

Les apports artériels au niveau du cerveau sont assurés par 2 paires d'artères : les 2 artères carotides internes et les 2 artères vertébrales (Figure 1). Les 2 artères vertébrales s'unissent pour former l'artère basilaire. Cette artère basilaire s'anastomose ensuite avec les artères carotides internes (par l'intermédiaire des artères communicantes antérieures et postérieures) pour donner, à la base du cerveau, le polygone de Willis. De ce polygone de Willis partent 3 paires d'artères, les artères cérébrales antérieures, moyennes et postérieures qui couvrent la surface externe du cerveau. Ces artères se divisent en artères de diamètre de plus en plus petites, et pénètrent dans le cerveau pour apporter le sang aux différentes régions cérébrales.

Les artères carotides internes et l'artère basilaire contribuent de façon égale aux apports sanguins du polygone de Willis et, comme les pressions artérielles sont égales, il n'y a pas mélange entre le sang arrivant par les artères carotides et le sang arrivant par les artères vertébrales. Des études par angiographie ou par injection de colorant ont montré que le système basilaire contribue essentiellement aux apports sanguins pour la partie postérieure du cerveau, le cervelet et le tronc cérébral, tandis que les artères carotides internes apportent le sang pour la partie antérieure (cérébrum, diencéphale) (Sokoloff, 1997). Dans des conditions pathologiques telles qu'une sténose d'une des artères d'apport du polygone de Willis, les pressions artérielles sont alors différentes et le polygone de Willis fonctionne comme un régulateur. En effet, la défaillance d'une artère d'apport sera compensée par les autres artères du polygone de Willis, permettant ainsi de maintenir les apports sanguins dans tout le cerveau (Sokoloff, 1997).

Une des caractéristiques importantes de la circulation cérébrale au niveau artériel est que, contrairement à ce que l'on peut observer dans d'autres régions, les artères de gros diamètre et notamment les artères carotides internes, l'artère basilaire, les artères du polygone de Willis ou les artères directement connectées à ce polygone de Willis sont d'importantes artères de résistance (30 à 50% des résistances cérébro-vasculaires totales) (Heistad et coll., 1978). Il a été suggéré qu'une telle organisation protège les microvaisseaux cérébraux. Les larges artères forme un réservoir d'égalisation de pression maintenant ainsi une pression uniforme à la surface du cerveau tandis que les artéioles (artères d'un diamètre inférieur à 100  $\mu\text{m}$ , Leeson et coll., 1988) servent à distribuer le flux sanguin pour satisfaire les besoins locaux en oxygène et en glucose (Hurn et Traystman, 1997).



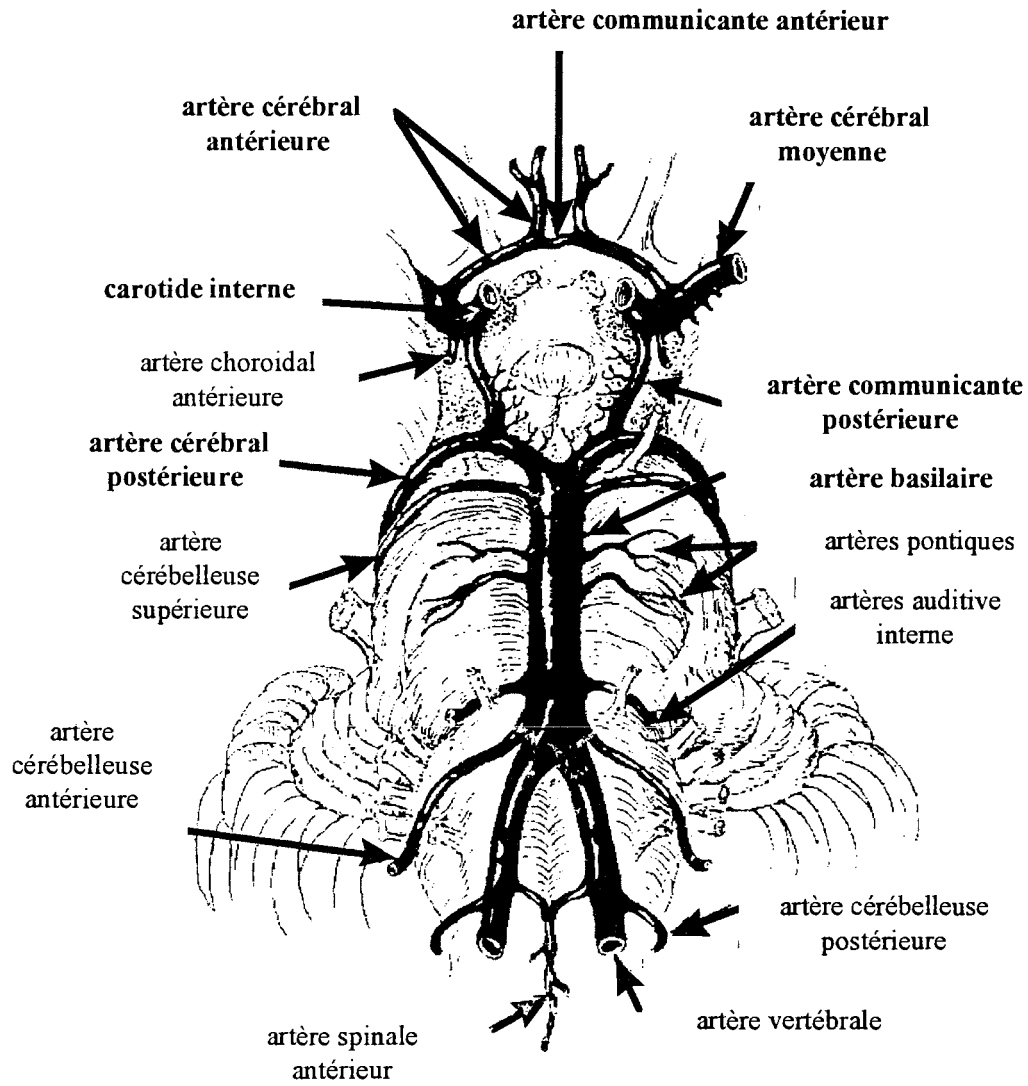


Figure 1 : Schéma des artères cérébrales majeur et du polygone de Willis (artères en gras) chez l'Homme (Sokoloff, 1997).

### 1.1.2. Capillaires

Chez l'Homme adulte, les capillaires au niveau du cerveau couvrent une surface de 10 m<sup>2</sup> et ont une longueur totale de 640 km. Ils sont très hautement spécialisés pour contrôler et maintenir les échanges tissus-sang permettant le bon fonctionnement des neurones. De ce fait, les capillaires cérébraux ont des caractéristiques structurales et fonctionnelles liées à l'existence de la barrière hémato-encéphalique (Pardridge, 1997).

Les capillaires dans les tissus neuronaux sont constitués d'une seule couche de cellules endothéliales, de pericytes associés, d'une membrane basale et d'une couche quasi continue d'astrocytes (Bar, 1978) (Figure 2). Ils possèdent des caractéristiques de barrière aussi bien structurelle que biochimique.

La barrière structurelle est constituée au niveau des cellules endothéliales par des jonctions complexes ("tight junctions") empêchant la diffusion libre existant normalement entre les cellules.

La barrière biochimique consiste en une forte concentration d'enzymes de dégradation empêchant les neurotransmetteurs circulant de passer du sang dans le cerveau. De plus, les vésicules endothéliales intracytoplasmiques (qui représentent un moyen pour les molécules de traverser les cellules) sont peu nombreuses au niveau des capillaires cérébraux (Rosenberg, 1997).

Les molécules liposolubles passent la barrière hémato-encéphalique ; les molécules polaires ne passent pas sauf pour certaines molécules métaboliquement importantes qui disposent de mécanismes de transport facilitant (en suivant le gradient de concentration) ou activant (contre le gradient de concentration) le passage (Pardridge, 1997). Il existe notamment des systèmes de transport pour le glucose, des acides aminés neutres et les acides

monocarboxylique. Il est à noter qu'un même transporteur peut véhiculer plusieurs acides aminés ou, dans le cas du transporteur pour les acides monocarboxyliques, plusieurs substances comme le lactate, le pyruvate et des corps cétoniques. Par conséquent, une augmentation de la concentration d'un acide aminé particulier ou du lactate par exemple peut avoir un effet délétère sur l'absorption d'autres acides aminés, du lactate ou des corps cétoniques (Pardridge, 1997). D'autres systèmes existent pour le transport de peptides circulants (insuline, transferrine...), de protéines et de lipoprotéines (Pardridge, 1997).

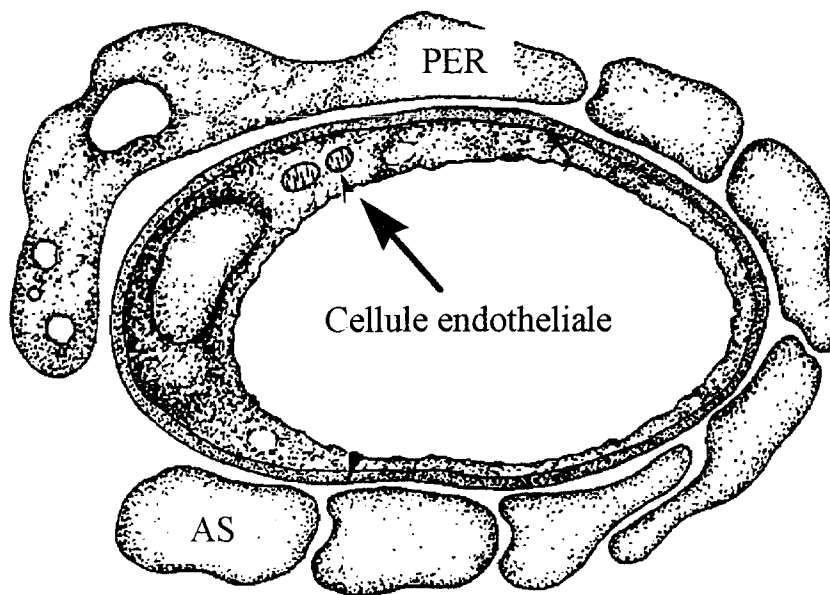


Figure 2 : Schéma d'un capillaire cérébral. (AS = astrocyte; PER = pericyte) (Peters et coll., 1991).

## 1.2. L'autorégulation du débit sanguin cérébral

### 1.2.1. Définition

L'autorégulation du DSC est définie comme étant la capacité intrinsèque du cerveau à maintenir un DSC relativement constant en dépit de variations de la pression de perfusion artérielle (Figure 3) (Lassen, 1959, Skinhøj et Strandgaard, 1973).

L'autorégulation du DSC permet d'assurer :

- un apport constant en oxygène, glucose et autres nutriments essentiels, car les réserves cérébrales sont très faibles pour un métabolisme très intense (Lassen, 1959),
- le maintien de la pression capillaire cérébrale, afin d'assurer un échange tissulaire optimum (Mellander, 1989).

Sans autorégulation, le DSC augmenterait ou diminuerait avec les variations de pression, entraînant ainsi un risque d'œdème ou d'ischémie.

Cependant, l'autorégulation du DSC est limitée et en dessous de la limite basse de l'autorégulation et au-dessus de la limite haute, le DSC suit les variations de la pression artérielle. Différents travaux ont fixé la limite basse entre 60-70 mm Hg (Strandgaard et coll., 1973) et  $85 \pm 5$  mm Hg (Schmidt et coll., 1990) chez l'Homme normotendu. Elle se situe également vers 60-70 mm Hg chez le rat normotendu jeune adulte (Muller et coll., 1990, Lartaud et coll., 1993). La limite haute est estimée entre 120 mm Hg chez l'Homme (Strandgaard et coll., 1973) et 160 mm Hg chez le rat (Hernandez et coll., 1978). Connaissant la limite basse d'autorégulation et la pression artérielle moyenne d'un individu, on peut calculer sa marge de sécurité, définie comme étant le pourcentage dont peut diminuer la pression artérielle moyenne avant que le débit sanguin cérébral ne commence à diminuer. Cette marge de sécurité est de l'ordre de 50% chez le rat jeune (Lartaud et coll., 1993).

Pour maintenir le DSC constant, l'autorégulation repose sur une adaptation des résistances cérébro-vasculaires à la pression artérielle. Ces changements de résistances résultent d'une vasodilatation ou d'une vasoconstriction du système cérébro-vasculaire (Shapiro et coll., 1971). L'observation directe, par fenêtres crâniennes, des artères et artérioles pie-mériennes montre une contraction des artères et artérioles cérébrales quand la pression artérielle augmente, et une vasodilatation quand elle diminue (Kontos et coll., 1978a, MacKenzie et coll., 1979).

Il est généralement accepté que les artérioles sont les composantes essentielles de la résistance des lits vasculaires. Cependant, une caractéristique distinctive du système cérébro-vasculaire est que les artères contribuent également à la résistance vasculaire. En effet, chez le chat anesthésié, 39% de la résistance vasculaire totale est due aux artères ayant un diamètre supérieur à 400 $\mu$ m alors que seulement 10% est due aux artères ayant un diamètre compris entre 400 et 25  $\mu$ m (Shapiro et coll., 1971). Des résultats très similaires ont été reportés pour d'autres espèces tel que le chien et le singe (Hurn et Traystman, 1997). Ainsi, les artérioles mais aussi les artères cérébrales contribuent à l'autorégulation du DSC.

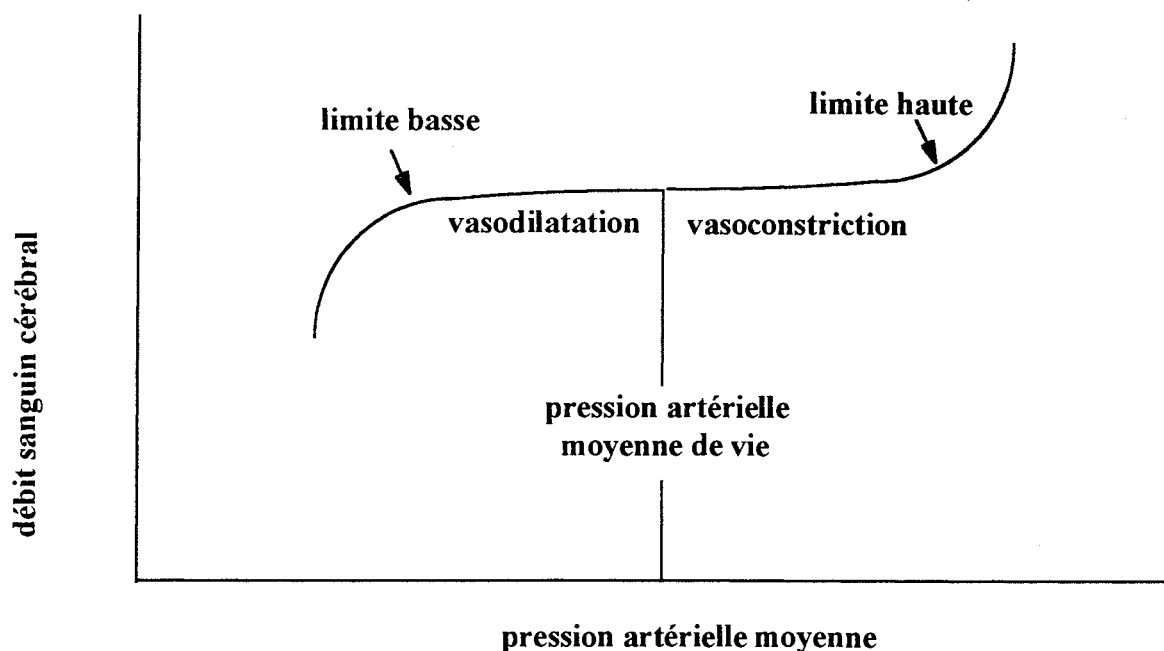


Figure 3 : Schéma de l'autorégulation du débit sanguin cérébral.

### 1.2.2. Modèle de segmentation vasculaire

A l'intérieur d'un tissu, les artères et artérioles répondent aux variations de pression artérielle de façon intégrée, selon un modèle en série ou segmentaire (Johnson, 1986, Mellander, 1989).

Quand la pression artérielle diminue, les artérioles proximales (les plus larges) se dilatent (Figure 4). Cette dilatation tend à restaurer la pression dans les artérioles moyennes en aval. Si cette dilatation est suffisante pour maintenir la pression de perfusion des artérioles moyennes à sa valeur normale, il n'y aura pas de baisse de DSC à leur niveau. Elles ne changeront donc pas de diamètre. Par contre, si la dilatation des artérioles les plus larges n'est pas adéquate, ou si la pression artérielle continue à chuter, la pression dans les artérioles moyennes sera diminuée, le DSC diminuera. Grâce aux mécanismes d'autorégulation, elles se dilateront pour restaurer la pression à sa valeur normale dans les petites artérioles distales. En aval du point du réseau artériolaire où la pression est restaurée, le profil de pression et les dimensions du réseau seront

normaux. Il s'ensuit que le débit se maintiendra à sa valeur normale. Si la pression diminue encore, la vasodilatation s'étendra en aval (Figure 4). Quand elle atteint les branches les plus distales du réseau, la capacité d'autorégulation est dépassée, et toute autre réduction de la pression artérielle entraînera une chute du DSC (Johnson, 1986).

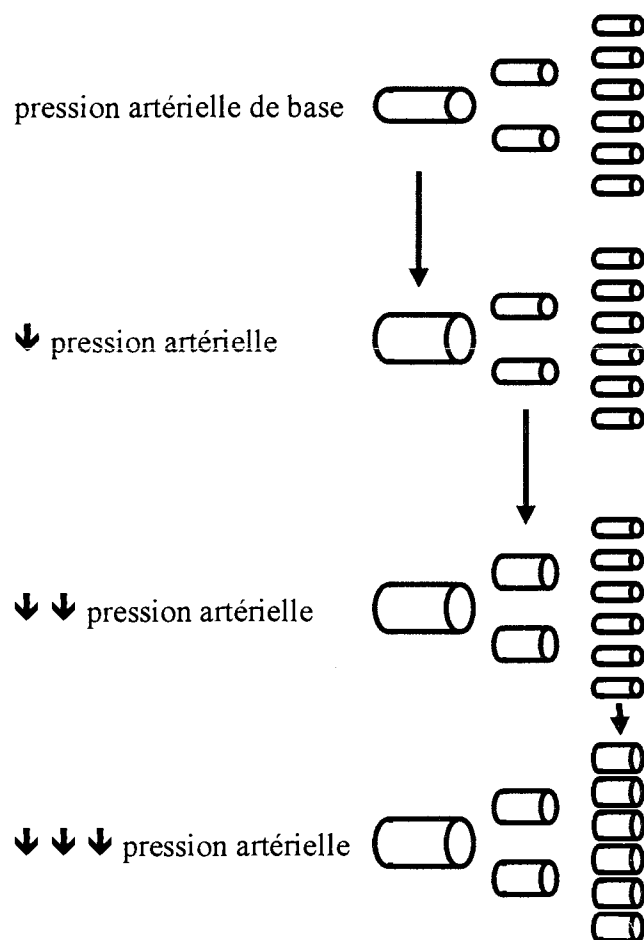


Figure 4 : Schéma du modèle vasculaire segmentaire de l'autorégulation du DSC (d'après Johnson, 1986).

Ce modèle a d'abord été décrit pour l'autorégulation rénale (Johnson, 1986). Il semble pouvoir également s'appliquer, au moins partiellement, à la circulation cérébrale, et impliquer non seulement les artérioles, mais aussi les artères de plus grand calibre (Kontos et coll., 1978a, Toyoda et coll., 1996). Chez le chat, les artères pie-mériennes les plus larges (185-227 et 268-384  $\mu\text{m}$  de diamètre) se dilatent dès le début de l'hypotension hémorragique, entre les valeurs de pression artérielle de 130 et 120 mm Hg. Leur réponse entre 120 et 80 mm Hg est plus importante que celle des artérioles les plus petites (75-30  $\mu\text{m}$ ). Par contre, en dessous de 80 mm Hg, les artères larges se dilatent moins que les petites artérioles, et leur réponse maximale est inférieure. Les artères moyennes de 150 à 173  $\mu\text{m}$  de diamètre commencent à se dilater quand la pression atteint 110 mm Hg. Leur réponse dilatatrice augmente avec la chute de pression. Cependant, leur réponse maximale (de l'ordre de 50% par rapport au diamètre basal) est inférieure à celle des petites artérioles, mais intervient dans la même classe de pression artérielle (30-40 mm Hg) (MacKenzie et coll., 1979, Toyoda et coll., 1996).

Ce modèle n'est que partiellement valable pour l'autorégulation du DSC car si les artérioles cérébrales ne se dilatent pas tant que la pression artérielle n'a pas atteint la valeur de 90 mm Hg chez le rat jeune, une hypotension plus sévère amplifie encore cette dilatation, jusqu'à une réponse maximale (de l'ordre de 50%) atteinte vers 40 mm Hg (Kontos et coll., 1978a, Toyoda et coll., 1996) (Figure 5). Donc, la valeur de la limite basse de l'autorégulation du DSC ne correspond pas à celle de la pression artérielle pour laquelle la dilatation du système cérébro-vasculaire est maximale. La limite basse est plus élevée que la limite de dilatation du cérébro-vasculaire (Kontos et coll., 1978a, MacKenzie et coll., 1979) (Figure 5). Elle correspond plutôt à une valeur de pression artérielle pour laquelle le système vasculaire cérébral ne peut plus mobiliser suffisamment de réserve de vasodilatation pour compenser entièrement la réduction de pression artérielle.



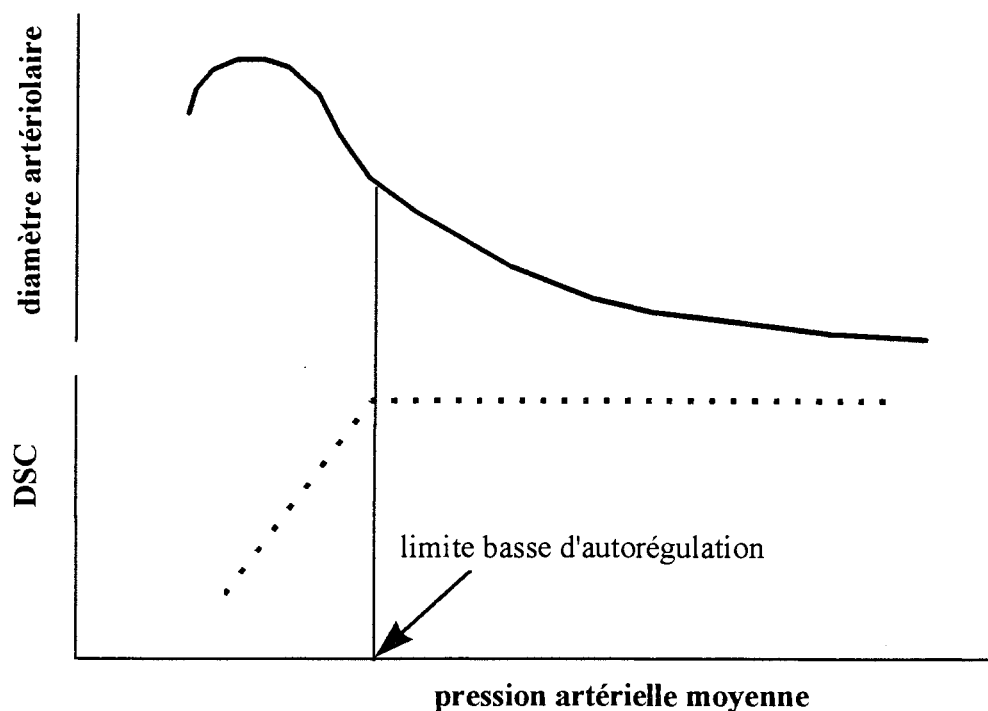


Figure 5 : Schéma de l'évolution du diamètre artériolaire et du débit sanguin cérébral lors d'une diminution de pression artérielle moyenne (d'après Chillon et Baumbach, 1997).

### 1.2.3. Les mécanismes de l'autorégulation du débit sanguin cérébral

De nombreuses hypothèses ont été proposées pour les mécanismes de l'autorégulation du DSC. Il y a tout d'abord une hypothèse dite métabolique, qui repose sur le fait qu'un changement de la pression de perfusion entraîne une variation transitoire du débit sanguin cérébral. Celle-ci induit un changement de concentration locale des agents vasoactifs normalement apportés ou éliminés du tissu cérébral par le flux sanguin. Il y a ensuite une hypothèse dite myogénique, reposant sur la capacité des muscles lisses vasculaires à se contracter ou à se relâcher en réponse à une variation de pression transmurale. Il y a ensuite l'hypothèse dite neurogénique pour laquelle l'innervation joue un rôle dans l'autorégulation. Finalement il a été proposé récemment que les canaux potassiques, qui contribuent au contrôle du tonus vasculaire pourraient être un facteur de l'autorégulation du DSC.

### 1.2.3.1. Théorie métabolique

La théorie métabolique repose sur le fait qu'un changement de la pression de perfusion entraîne une variation transitoire du débit sanguin cérébral. Celle-ci induit un changement de concentration locale des agents vasoactifs normalement apportés ou éliminés du tissu cérébral par le flux sanguin. De nombreuses molécules ont été proposées comme médiateurs de ce rétrocontrôle métabolique. Les facteurs essentiels semblent être les concentrations artérielles en anhydride carbonique et oxygène.

#### 1.2.3.1.1. Rôle de l'anhydride carbonique

Schématiquement, toute augmentation de la pression partielle en anhydride carbonique tissulaire ( $PCO_2$ ) entraînent une dilatation des artérioles cérébrales. Inversement, une diminution de la  $PCO_2$  conduit à une vasoconstriction. Plusieurs mécanismes ont été proposés mais la concentration en protons dans le liquide extracellulaire du cerveau semble être le plus important (Kontos et coll., 1977).

Les effets du  $CO_2$  passent par des effets directs de la concentration en  $H^+$  ( $[H^+]$ ) sur le muscle lisse cérébro-vasculaire, car des modifications importantes de la  $PCO_2$  ( $> 45$  mm hg) et des bicarbonates dans le liquide cérébro-spinal ne s'accompagnent pas de modification du diamètre des artérioles cérébrales sauf si le pH est modifié (Kontos et coll., 1977).

Une diminution du DSC est suivie d'une augmentation de la  $PCO_2$  (Figure 6). Le pH du liquide extracellulaire diminue, induisant une vasodilatation. Le phénomène inverse survient lorsque la  $PCO_2$  diminue (Figure 6) (Kontos et coll., 1977).

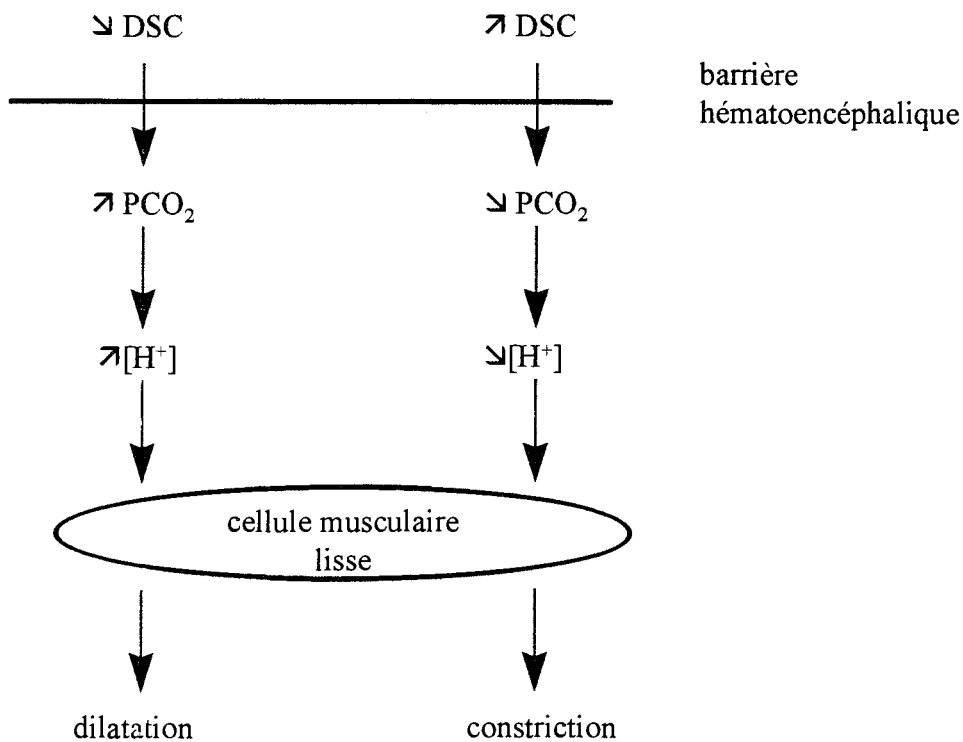


Figure 6 : Schéma de l'effet des variations de  $PCO_2$  sur le diamètre artériolaire.

#### 1.2.3.1.2. Rôle de l'oxygène

Contrairement au  $CO_2$ , toute augmentation de la pression partielle en oxygène tissulaire ( $PO_2$ ) entraîne une vasoconstriction des artéριοles cérébrales et une diminution de la  $PO_2$  conduit à une vasodilatation.

Une diminution de la  $PO_2$  hyperpolarise les cellules musculaires lisses vasculaires cérébrales par ouverture des canaux potassiques ATP-dépendant ( $K^+_{ATP}$ ), entraînant une diminution de l'entrée de calcium dans la cellule et donc une réduction de la contraction musculaire (Golanov et Reis, 1997) (voir paragraphe 1.2.4.2.). Pour une diminution de la  $PO_2$  plus importante ou prolongée, il y a déplétion des stocks intracellulaires d'ATP facilitant encore plus l'ouverture des  $K^+_{ATP}$  et compromettant ainsi le processus contractile (Golanov et Reis, 1997).

La diminution de la  $PO_2$  stimule également la formation de NO par l'endothélium des larges vaisseaux cérébraux, entraînant une vasodilatation (voir paragraphe 1.2.4.1.) ainsi que la libération d'adénosine, un vasodilatateur puissant. Cependant, son importance dans l'autorégulation n'est pas clairement élucidée, et reste controversée (Laudignon et coll., 1991).

Le rôle de la  $PO_2$  dans l'autorégulation doit être relativisé. En effet, même si il a été montré que la vasodilatation des artérioles cérébrales associée à l'hypotension est complètement annulée par une superfusion locale de fluorocarbure saturé en oxygène (Kontos et coll., 1978b), démontrant ainsi que l'hypoxie semble être un mécanisme dominant dans la réponse vasodilatatrice à l'hypotension, il a également été montré par d'autres auteurs que les capacités d'autorégulation, chez le chien soumis à une hémorragie, sont conservées pour un large domaine de  $PaO_2$  et de saturation en oxygène du sang artériel ( $SaO_2$ ) (Häggendal et Johansson, 1965). Les capacités d'autorégulation du DSC ne sont abolies que pour des hypoxies très sévères ( $SaO_2 < 60\%$ ), pour lesquelles le DSC suit passivement la pression artérielle même pour des valeurs de pression artérielle incluses dans le plateau d'autorégulation. Ces résultats montrent que les variations de la  $PO_2$  ne sont pas le seul facteur impliqué dans l'autorégulation du DSC.

### 1.2.3.2. Théorie myogénique

Cette théorie repose sur la capacité des muscles lisses vasculaires à se contracter en réponse à une force d'étirement ou plus précisément ici à une augmentation de pression transmurale (Folkow, 1964). En effet, une variation de la pression transmurale change l'état des filaments de myosine et d'actine de la cellule musculaire lisse. Cette altération induit une réponse myogénique en accord avec le principe énoncé par Bayliss (1902). Cette réponse ne dépend pas seulement de la loi de Frank-Starling, qui implique une réponse passive des éléments contractiles en fonction de leur longueur et de leur degré d'étirement. La réponse

myogénique aux variations de pressions intravasculaires ou transmurales nécessite une participation active des cellules musculaires lisses. Pour pouvoir s'exercer, cette réaction nécessite un tonus myogénique basal.

#### 1.2.3.2.1 Tonus myogénique basal

Le "tonus" est défini comme un état soutenu de contraction musculaire. Le terme "myogénique" qui lui est associé sous-entend un processus actif impliquant les protéines contractiles. Pour le mettre en évidence, il suffit de superfuser les vaisseaux cérébraux avec du liquide cérébro-spinal artificiel contenant de l'EDTA (67 mmol/L). on observe alors une dilatation de l'ordre de 100% (Baumbach et coll., 1988a).

Cet état de contraction basale est du à la vasomotricité spontanée du réseau artériolaire. Les microvaisseaux cérébraux sont en effet le siège de contractions rythmiques (Johansson, 1989). Cette rythmicité repose sur une dépolarisation membranaire spontanée et la génération de potentiels d'action (Harder et coll., 1989, Johansson, 1989). Des travaux ont montré les mêmes phénomènes pour les petites artères cérébrales chez le chat (Harder et coll., 1989). Ces potentiels d'action génèrent et maintiennent le tonus myogénique basal.

#### 1.2.3.2.2 Réponse myogénique

A partir de ce tonus myogénique basal, la réponse myogénique à une distension s'exerce par deux composantes :

- Une composante dynamique qui intervient pendant, ou immédiatement après la distension, en réponse à la variation cyclique de la force d'étirement, telle que celle induite par une variation de la pression artérielle.

- Une composante statique, qui se maintient aussi longtemps que le stimulus mécanique persiste, intervient en réponse à la pression artérielle (Johansson, 1989, Mellander, 1989).

Les réponses électriques et mécaniques à une variation de la force d'étirement et de la pression transmurale, tant dynamique que statique, ont été étudiées sur les artères cérébrales de chat (Harder et coll., 1989). Une augmentation de la pression transmurale ou de la force d'étirement entraîne une dépolarisation progressive de la membrane musculaire lisse et une génération de potentiels d'action et donc une constriction. Ces phénomènes sont associés à un accroissement de la force active développée par le vaisseau (Harder et coll., 1989, Johansson, 1989). Le retour à l'état basal entraîne une inhibition de la génération des pics de potentiel d'action (Johansson, 1989).

#### 1.2.3.2.3. Effecteurs de la réponse myogénique

Les mécanismes développés ci-dessus suggèrent l'existence d'un "réflexe à l'étirement" dans la paroi vasculaire. Ce système détecterait les variations des forces appliquées à la paroi, et, par un couplage électromécanique, stimulerait la réponse des cellules musculaires lisses vasculaires (Johnson, 1986, Johansson, 1989). La localisation, la constitution et le fonctionnement exacts de ce "détecteur" ne sont pas encore connus. D'après Johnson (1986), son siège serait la jonction myo-endothéliale. *In vitro*, les artères cérébrales de chat, dépourvues d'endothélium, se dilatent quand la pression de perfusion augmente, et la dépolarisation membranaire disparaît (Harder, 1987). Harder attribue donc un rôle essentiel à l'endothélium dans la réponse vasculaire à la distension. Cependant, l'importance de l'endothélium dans la réponse myogénique est controversée. En effet, d'autres auteurs (Garcia-Roldan et Bevan, 1991) montrent que la réponse vasoconstrictrice à l'augmentation de pression dans l'artère sylvienne isolée de lapin est indépendante de l'endothélium. De même, *in vivo*, la

destruction sélective des cellules endothéliales de rat n'a aucun effet sur la réponse d'autorégulation lors de la chute de pression artérielle induite par hémorragie (Faraci et coll., 1989).

Pour conclure, si *in vitro* le mécanisme myogénique de l'autorégulation est établi, il ne semble pas être le mécanisme essentiel *in vivo*. L'inhibition des facteurs métaboliques *in vivo* démasque une faible réponse myogénique des artères cérébrales en réponse à un stimuli d'autorégulation (Busija et Heistad, 1984). De plus, l'augmentation de la pression veineuse qui induit une augmentation de la pression artériolaire, devrait d'après la théorie myogénique, entraîner une constriction des artères cérébrales. Or, c'est l'inverse qui est observé, les artères dilatent (Wei et Kontos, 1982). Elles dilatent car suite à l'augmentation de la pression veineuse, le DSC diminue, et donc les facteurs métaboliques de l'autorégulation interviennent pour maintenir le DSC. Ainsi, *in vivo*, la théorie métabolique semble être plus importante que la théorie myogénique. Ces résultats suggèrent que la théorie myogénique ne prédomine sur la théorie métabolique que quand le métabolisme est faible (Wei et Kontos, 1982). Certains auteurs ont émis l'hypothèse que les facteurs myogéniques permettaient d'optimiser le tonus de base, améliorant ainsi l'autorégulation en réponse aux facteurs métaboliques (Osol et Halpern, 1985).

### 1.2.3.3. Théorie neurogénique

Les vaisseaux cérébraux sont innervés par un réseau dense de fibres adrénérgiques issues principalement du ganglion cervical supérieur (Edvinsson et Mac Kenzie, 1976). La densité de l'innervation est plus importante au niveau des larges artères, en particulier celles issues de l'artère carotide. De nombreux rapports ont démontré que les capacités d'autorégulation sont préservées chez des animaux ayant subis une sympathectomie et/ou une parasympathectomie (Busija et Heistad, 1984). L'innervation semble plus jouer un rôle en modulant l'autorégulation.

En effet, la stimulation du système sympathique modifie peu le DSC de base, malgré la constriction des larges artères. Cette constriction des larges artères entraîne une chute de pression dans les microvaisseaux en aval. Ceux-ci vont donc se dilater pour maintenir le DSC de base constant. Il s'ensuit que ces petites artérioles auront des capacités de contraction supérieures quand la pression artérielle augmentera. La limite haute de l'autorégulation du DSC est ainsi déplacée vers des valeurs tensionnelles plus élevées lors d'une stimulation sympathique (Barry et coll., 1984b) (Figure 7). Ce phénomène protège le cerveau lors d'une hypertension, car celle-ci stimule le système sympathique, évitant ainsi un dépassement de la limite haute de l'autorégulation. Par contre, ces artérioles auront une moins grande réserve de dilatation pour faire face à une chute de pression artérielle. La limite basse d'autorégulation est donc déplacée vers des valeurs de pression artérielle supérieure (Figure 7). Un phénomène similaire est observé pour la limite basse d'autorégulation lors d'une stimulation sympathique induite par une hypotension hémorragique et peut expliquer une surévaluation de la limite basse d'autorégulation suite à une hémorragie (Barry et coll., 1984b) (Figure 7).



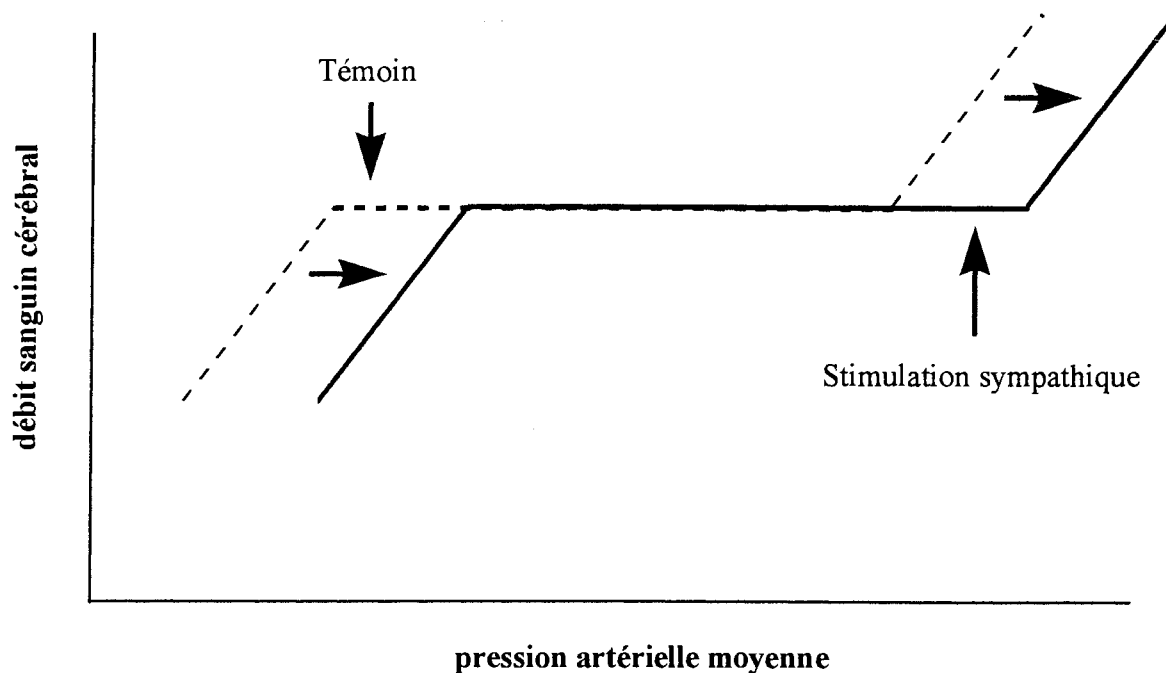


Figure 7 : Effet d'une stimulation sympathique sur la courbe d'autorégulation (Barry et coll., 1984a).

Un des effecteurs possible pourrait être le "Calcitonin gene related peptide" (CGRP). C'est un neurotransmetteur peptidique composé de 37 acides aminés produit à partir du gène codant pour la calcitonine. Le CGRP est présent dans les nerfs perivasculaires cérébraux qui sont originaire du ganglion trijumeau (Brian et coll., 1996). C'est un vasodilatateur cérébral puissant tant *in vivo* que *in vitro* (Kitazono et coll., 1993). Au niveau cérébral, le CGRP se comporte comme un vasodilatateur indépendant de l'endothélium, produisant une relaxation par activation de l'adénylate cyclase et augmentation d'AMP cyclique. Le CGRP agirait aussi, au moins en partie, par activation des canaux potassiques ATP-dépendants et des  $BK_{Ca2+}$  car son action est bloquée par la glibenclamide et la charybdotoxine (Hong et coll., 1996). Le CGRP pourrait donc jouer au rôle dans la vasodilatation répondant à l'hypotension au cours de l'autorégulation cérébrale.

#### 1.2.4. Autres facteurs pouvant contribuer à l'autorégulation du débit sanguin cérébral

##### 1.2.4.1. Oxyde nitrique

Le NO est produit à partir d'un acide aminé semi-essentiel pour l'Homme la L-arginine par un groupe d'enzymes, les NO synthetases (NOS). Trois isoformes de NOS ont été clonés à partir de gènes appartenant à des chromosomes différents. On distingue la NOS constitutive, c'est-à-dire qui ne nécessitent pas de synthèse protéique pour agir et la NOS inductible, qui n'existe pas à l'état basal et qui est synthétisée sous l'effet de différents stimuli, comme par exemple l'inflammation (Nathan et Xie, 1994). Lorsque le NO est formé, il diffuse librement vers la cellule musculaire lisse et stimule la guanylate cyclase soluble ce qui aboutit à la formation de GMP cyclique, responsable de la relaxation de la cellule.

L'étude d'anneaux vasculaires isolés suggère que l'endothélium secrète du NO à l'état basal, contribuant à une relaxation vasculaire cérébrale. L'application *in vitro* de L-NMNA sur des artères cérébrales de rat entraîne une vasoconstriction inhibée par la L-arginine (Faraci, 1990). Ceci est confirmé par des études *in vivo* chez le chat et le rat : l'inhibition de la NOS constitutive par du L-NAME réduit le DSC d'environ 20 à 50 % (Tanaka et coll., 1991). En utilisant une technique de fenêtre crânienne chez le chat, il a été montré que l'application de L-NAME entraîne une vasoconstriction des artères de diamètre supérieur à 100  $\mu\text{m}$  (Ishimura et coll., 1996). Ceci confirme le rôle du NO dans le tonus vasculaire cérébral de base, mais seulement au niveau des grosses artères (Ishimura et coll., 1996). Cependant, le rôle du NO dans l'autorégulation du DSC reste controversé *in vivo*. En effet de nombreux auteurs ont montré que le NO n'était pas impliqué dans l'autorégulation du DSC. Par exemple, l'utilisation d'inhibiteurs de la NOS ne modifie pas la limite basse d'autorégulation chez le rat (Wang et coll., 1992, Buchanan et Phillis, 1993). D'autres auteurs par contre ont attribué un rôle

essentiel au NO dans l'autorégulation du DSC, l'administration aiguë de L-NMMA modifiant l'autorégulation (Tanaka et coll., 1993, Kobari et coll., 1994). Récemment, Jones et Coll. (1999) ont montré que l'inhibition de la NO synthétase augmentait la limite basse d'autorégulation, suggérant l'implication du NO dans l'autorégulation.

Pour résumer, si *in vitro*, le NO semble être important dans l'autorégulation du débit sanguin cérébral, cela n'est pas encore clairement établi *in vivo*. Cela peut, peut-être, être expliqué par la prévalence des facteurs métaboliques *in vivo*, facteurs faiblement présents *in vitro*.

#### 1.2.4.2. Canaux potassiques

L'ouverture des canaux potassiques entraîne une sortie rapide de potassium de la cellule. Ce mouvement ionique produit une hyperpolarisation de la membrane qui entraîne une fermeture des canaux calciques voltage dépendant. Il s'ensuit une vasodilatation. Il existe quatre types de canaux potassiques : les canaux potassiques ATP-dépendants, les canaux potassiques calcium-dépendants, les canaux potassiques à ouverture retardée et les canaux potassiques ATP-indépendants. Seul les deux premiers types ont été bien étudiés.

Les canaux potassiques ATP-dépendants ne semblent pas impliqués dans le tonus vasculaire de base. En effet, l'application d'un inhibiteur, le glibenclamide, ne modifie ni le tonus du tronc basilaire, ni celui d'artères cérébrales (Faraci et Breeske, 1993) suggérant que ces canaux ne joueraient pas de rôle dans le tonus vasculaire cérébral de base. Les canaux potassiques ATP-dépendants semblent impliqués dans l'autorégulation du DSC car l'administration de glibenclamide diminue les capacités d'autorégulation chez le rat soumis à une hypotension graduelle (Lee et coll., 1993). De plus la vasodilatation induite par le CGRP

(voir le paragraphe 1.2.3.3) est médiée au moins en partie par les canaux potassiques ATP-dépendants (Kitazono et coll., 1993).

Les canaux potassiques calcium-dépendants sont activés par le calcium intracellulaire. On distingue deux sous types de canaux potassiques calcium-dépendants selon leur conductance. Ils sont dits à petite ou grande conductance (les  $BK_{Ca^{2+}}$ ). Ils peuvent être bloqué par le tétraéthylammonium (TEA), la charybdotoxine et l'iberiotoxine provoquant alors une dilatation des artérioles cérébrales (Kitazono et coll., 1995). Le NS 1619 (1,3-Dihydro-1-[2-hydroxy-5-(trifluorométhyl)phényl]-5-[trifluorométhyl]-2H-benzimidazol-2-one]) est capable d'activer les canaux potassiques calcium-dépendants des cellules musculaires lisses (Oelsen et coll., 1994) (Figure 8). La dilatation des artères cérébrales par la forskoline, un activateur direct de l'adénylate cyclase et de l'AMP cyclique, est inhibée par la charybdotoxine (Taguchi et coll., 1995) qui bloque également la vasodilatation des artères cérébrales de rat produite par l'isoprotérénol (Mayhan et Faraci, 1993). Ces résultats suggèrent que l'adénylate cyclase active les canaux potassiques calcium-dépendants (Figure 8). L'utilisation d'inhibiteurs de canaux potassiques calcium-dépendants produit une vasoconstriction à la fois *in vitro* (Asano et coll., 1993) et *in vivo* (Fujii et coll., 1991a). Ces résultats suggèrent que ces canaux joueraient un rôle dans le tonus vasculaire cérébral de base. En plus d'un rôle dans le tonus vasculaire de base, il pourraient jouer un rôle dans la vasodilatation au cours de l'autorégulation du DSC. En effet, l'hypotension en induisant une augmentation de la concentration en AMPc activerait les  $BK_{Ca^{2+}}$  entraînant ainsi une relaxation (Armstead, 1999)

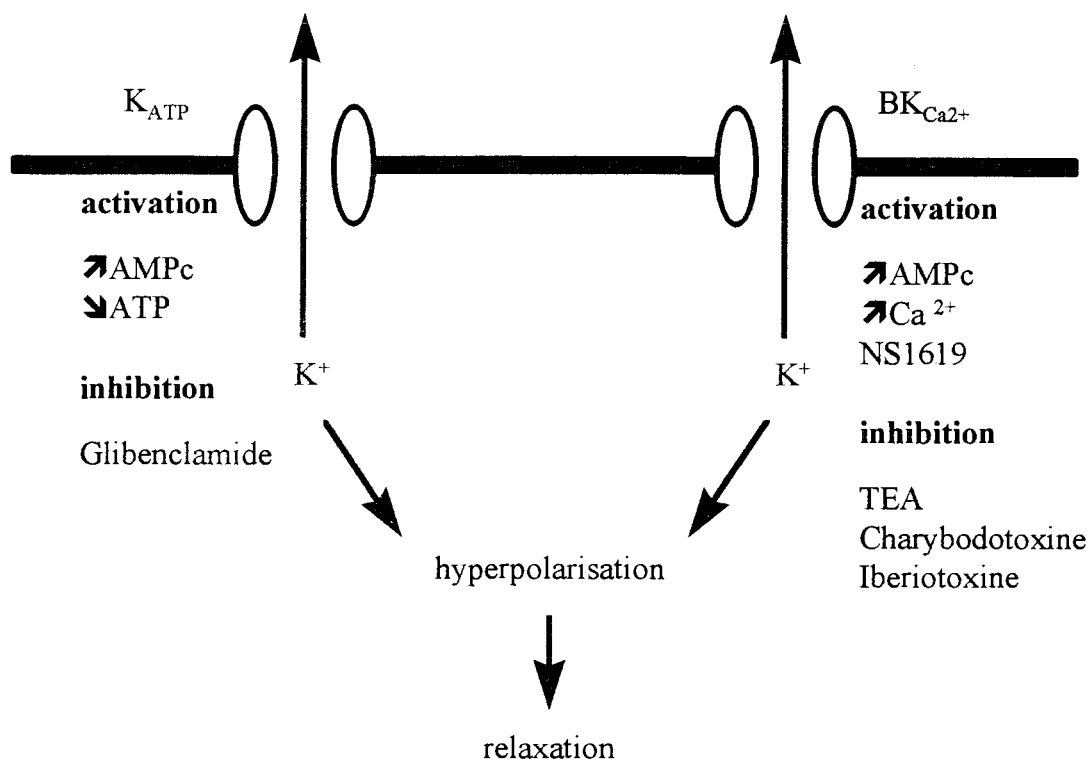


Figure 8 : Schéma du fonctionnement des canaux potassiques ATP-dépendant ( $K_{ATP}$ ) et des canaux potassiques calcium-dépendant ( $BK_{Ca^{2+}}$ ) (d'après Brian et coll., 1996).

### 1.2.5. Modulation physiologique de l'autorégulation du débit sanguin cérébral

Les limites de l'autorégulation du débit sanguin cérébral ne sont pas fixes chez un individu mais peuvent être influencées par de nombreux mécanismes physiologiques au rang desquels on peut citer entre autres le système sympathique (voir paragraphe 1.2.3.3.), l'hypercapnie (voir paragraphe 0), l'hypoxie (voir paragraphe 0) mais aussi le système rénine-angiotensine et de nombreux vasoconstricteurs et vasodilatateurs.

#### 1.2.5.1. Le système rénine-angiotensine

L'utilisation d'un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I, le captopril, déplace la limite basse et la limite haute de l'autorégulation vers des valeurs inférieures de pression artérielle (Barry et coll., 1984a). Ainsi, par un effet direct sur les vaisseaux cérébraux,

l'angiotensine II augmente la résistance des larges artères et diminue la pression dans les microvaisseaux, entraînant leur vasodilatation. La résultante est un maintien du débit sanguin cérébral de base mais une augmentation de la limite basse d'autorégulation (Faraci et Heistad, 1990, Bray-des-Boscs et coll., 1991). L'inhibition de l'enzyme de conversion entraînant une diminution de l'angiotensine II permet donc une diminution de la limite basse d'autorégulation.

Cet effet du captopril est conservé chez des rats ayant subi une sympathectomie (Waldemar, 1990), démontrant ainsi que le système rénine-angiotensine influence le DSC indépendamment du système nerveux sympathique. Cependant il existe tout de même un lien entre ces deux systèmes car la diminution de la limite haute observée suite à l'injection de captopril est amoindrie par la stimulation simultanée du ganglion cervical supérieur chez le rat (Waldemar et Paulson, 1989).

Lors d'une hémorragie, le système rénine-angiotensine est fortement stimulé (Semple, 1980). La libération d'angiotensine II diminue les capacités d'autorégulation du DSC et pourrait donc expliquer une surestimation de la limite basse d'autorégulation suite à une hémorragie.

#### 1.2.5.2. Vasodilatateurs et vasoconstricteurs

De nombreux vasodilatateurs et vasoconstricteurs influencent le diamètre des artéioles cérébrales et ainsi modifient les capacités d'autorégulation. On peut citer entre autres :

- 6-kéto-prostaglandine F<sub>1α</sub> : Une augmentation significative de la 6-kéto-prostaglandine F<sub>1α</sub> (métabolite stable de la prostacycline, puissant vasodilatateur) dans le tissu cortical du rat est observée quand la pression est abaissée par hémorragie à 80 mm Hg (Shohami et Sidi, 1984). Aucune augmentation supplémentaire n'intervient si la pression artérielle continue à descendre de 60 à 40 mm Hg. Le taux de thromboxane B<sub>2</sub> (métabolite stable du

thromboxane A<sub>2</sub>, puissant vasoconstricteur) n'est pas modifié durant l'hypotension. La production de prostacycline aurait donc un rôle à jouer dans le maintien du débit sanguin cérébral jusqu'à des valeurs proches de la limite basse d'autorégulation.

- l'adénosine : une libération d'adénosine est observée suite à une hypotension et cette libération est proportionnelle à la sévérité de l'hypotension (Winn et coll., 1979). *In vitro*, l'adénosine induit une dilatation d'anneaux d'artères cérébrales de chat (Wahl, 1985) et d'Homme (Hardebo et Edvindsson, 1979). *In vivo*, l'administration d'adénosine entraîne une augmentation du DSC (Tagashira et coll., 1977). L'effet relaxant de l'adénosine est attribué à un blocage de l'entrée de calcium dans la cellule musculaire lisse (Berne, 1980). L'effet dilatateur de l'adénosine couplé avec l'augmentation de sa concentration avec la diminution de pression artérielle laisse envisager un rôle possible dans l'autorégulation, mais celui-ci n'est pas encore clairement établi.
- la mélatonine : c'est une hormone synthétisée par la glande pinéale (voir paragraphe 2). Elle constrict les larges artères cérébrales (Geary et coll., 1997) et diminue le DSC des rats jeunes (Capsoni et coll., 1996). Une constriction des artères et artérioles cérébrales suite à une administration de mélatonine pourrait se traduire par une augmentation de la réserve de vasodilatation (pourcentage maximal de vasodilatation des artères et artérioles cérébrales lors d'une diminution de la pression artérielle systémique) et donc par une modification de l'autorégulation du DSC. Le rôle exact de la mélatonine sur l'autorégulation du DSC reste cependant à définir.

### 1.3. Autorégulation du DSC et vieillissement

#### 1.3.1. Variation des capacités d'autorégulation avec l'âge

Une diminution des capacités d'autorégulation du DSC face à une chute de pression artérielle est observé avec l'âge et ce aussi bien chez le rat (Lartaud et coll., 1993) que chez l'Homme (Wollner et coll., 1979), c'est à dire que la limite basse de l'autorégulation du débit sanguin cérébral est déplacée vers des valeurs supérieures de pression artérielles moyennes. Cela pourrait s'expliquer par une réduction des capacités de dilatation des artères et artérioles cérébrales au cours du vieillissement.

En effet, il a été montré que les capacités de dilatation des artères et artérioles cérébrales diminuaient au cours du vieillissement (Hadju et coll., 1990, Toyoda et coll., 1996). Cette diminution de la capacité de dilatation des artères et artérioles cérébrales avec l'âge peut s'expliquer par des altérations soit fonctionnelles soit morphologiques des artérioles cérébrales.

- altérations fonctionnelles : l'âge ne diminue pas la réponse des artérioles cérébrales à la nitroglycérine (Mayhan et coll., 1990) ni au nitroprussiate de sodium (Toyoda et coll., 1996). Cependant, l'âge atténue certaines réponses endothélium-dépendantes telles que celles à l'acétylcholine (Hongo et coll., 1988) et à la bradykinine (Mayhan et coll., 1990), ainsi que des réponses endothélium-indépendantes telles que celles aux agonistes (voir paragraphe 1.2.5.2.) des canaux potassiques ATP-dépendant ( $K_{ATP}$ ) (Toyoda et coll., 1997b). Or les canaux  $K_{ATP}$  sont d'importants modulateurs de la vasodilatation des artérioles cérébrales au cours de l'autorégulation du DSC (Lee et coll., 1993).



- altérations morphologiques : la diminution de ces capacités de vasodilatation peut aussi s'expliquer par des altérations morphologiques de la paroi des artérioles. En effet, au cours du vieillissement, dans les artères, le ratio du collagène sur l'élastine augmente et la distensibilité diminue (Cox, 1977, Nagasawa et coll., 1979). En ce qui concerne les artérioles, au cours du vieillissement, elles subissent une atrophie de leur paroi, leur distensibilité diminue, et la proportion d'élastine dans la paroi diminue. Ainsi le diamètre maximum que peuvent atteindre les artérioles cérébrales quand le muscle lisse vasculaire est complètement relâché est significativement diminué au cours du vieillissement à cause de cette réduction de distensibilité (Hadju et coll., 1990). Ceci peut expliquer au moins partiellement la diminution de dilatation des artères et artérioles cérébrales au cours du vieillissement.

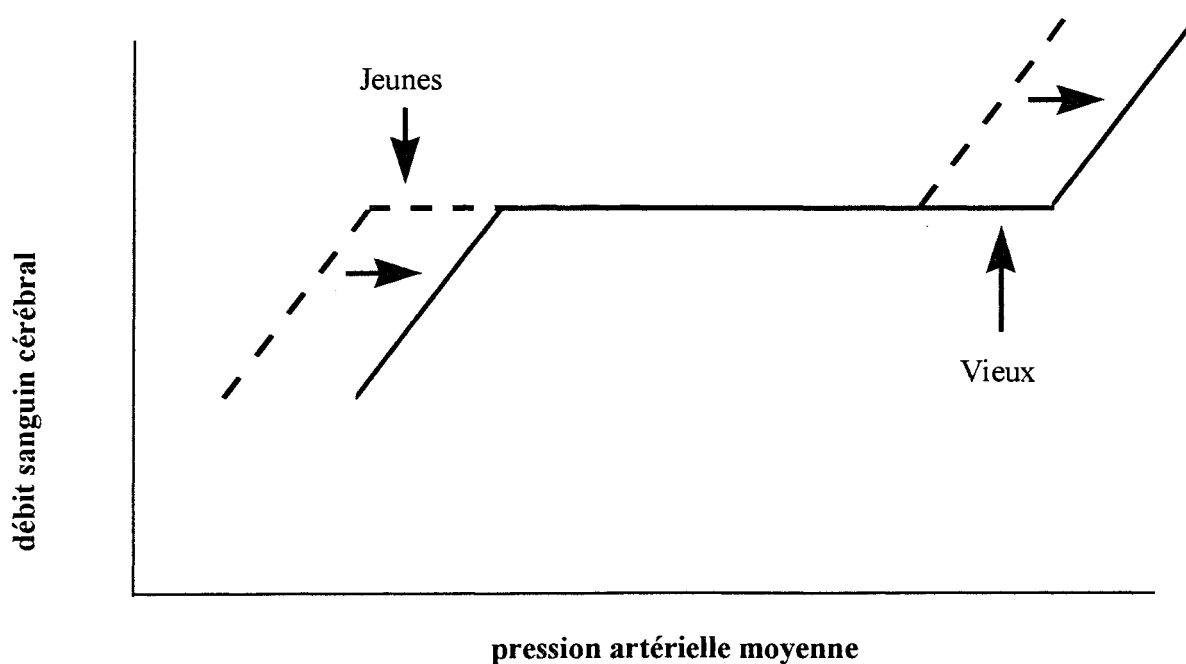


Figure 9 : Effet de l'âge sur l'autorégulation du DSC (Lartaud et coll., 1993).

### 1.3.2. Autorégulation et démences séniles d'origine vasculaire

Comme nous venons de le voir (voir paragraphe 1.3.1.), l'âge s'accompagne d'un déplacement de la limite basse d'autorégulation vers des valeurs de pression artérielles plus élevées. Ce déplacement de la limite basse de l'autorégulation du DSC en absence d'augmentation de la pression artérielle moyenne diminue la marge de sécurité.

Dans le même temps, la labilité tensionnelle augmente (Zito et coll., 1991). L'association de ces deux phénomènes au cours du vieillissement aboutirait à une augmentation de la probabilité d'hypoperfusions cérébrales dues au simple dépassement de la limite basse d'autorégulation (Figure 10). Or chez l'homme âgé, la répétition d'événements d'hypoperfusion cérébrale, pourrait être à l'origine des démences séniles par infarctus multiples d'origine vasculaire (Shuaib, 1992, Skoog, 1997).

De nombreux résultats expérimentaux confortent cette théorie :

- Il a été montré que l'hypotension systémique associée à un DSC réduit pouvait aboutir à l'ischémie neuronale dans des parties vulnérables du cerveau (Adams et coll., 1966).
- Il a également été montré que les sujets avec une hypotension orthostatique avaient une réduction du DSC de l'aire frontale durant un changement postural, témoignant d'une réduction de leur capacité d'autorégulation du DSC. Cette réduction de DSC due aux changements posturaux, est accentuée chez les gens atteints de démences (Passant et coll., 1993).
- De Jong et coll.(1999) ont montré que chez le rat, une hypoperfusion chronique par occlusion des artères carotides entraîne une diminution des capacités d'apprentissage et l'apparition d'anomalies vasculaires identiques à celle observée au cours du vieillissement.

- La présence d'anomalies vasculaires (diminution de la densité vasculaire et atrophie vasculaire) dans certaines zones cérébrales est corrélée à la présence de lésions neuropathologiques dans ces mêmes zones (Buée, 1999). Or ces anomalies vasculaires peuvent être provoquée par des hypoxies chroniques (Cervos-Navarro et coll., 1987) ou des ischémies chroniques (De Jong et coll., 1999), elles mêmes pouvant être due à un dépassement de la limite basse d'autorégulation.
- Bakker et coll. (1999) ont montré un lien entre la diminution de vasodilatation des artérioles cérébrales et les lésions de la substance blanche au cours du vieillissement.
- Les patients atteints de leucoaraiose présentent une baisse plus importante de la pression artérielle moyenne durant la nuit et des fluctuations de la pression artérielle moyenne plus forte au cours de la journée. Ils ont ainsi une fréquence de crise hypotensive plus importante. Comme ils présentent également une diminution de leur capacité d'autorégulation du DSC, ils ont un risque hypoperfusion cérébrale important ce qui peut expliquer la diminution de DSC observé dans les zones touchées (Pantoni et Garcia, 1997).

Tous ces résultats montrent l'existence d'un lien entre risques neurodégénératifs et problèmes vasculaires et en particulier l'autorégulation du DSC. Cependant, il est encore impossible de trancher entre cause et conséquence et vu l'impossibilité éthique d'expérimenter sur l'Homme et l'inexistence de modèle animaux appropriés, cette liaison entre la diminution des capacités d'autorégulation et les démences séniles d'origine vasculaire reste hypothétique.

Il n'existe pour l'instant aucun traitement permettant de restaurer des capacités d'autorégulation du DSC normale chez un individu âgé. De nombreuses observations laissant supposer un lien possible entre le système mélatonnergique et l'autorégulation du débit sanguin cérébral, nous avons voulu vérifier si la mélatonine pouvait diminuer les risques d'hypoperfusion avec l'âge.

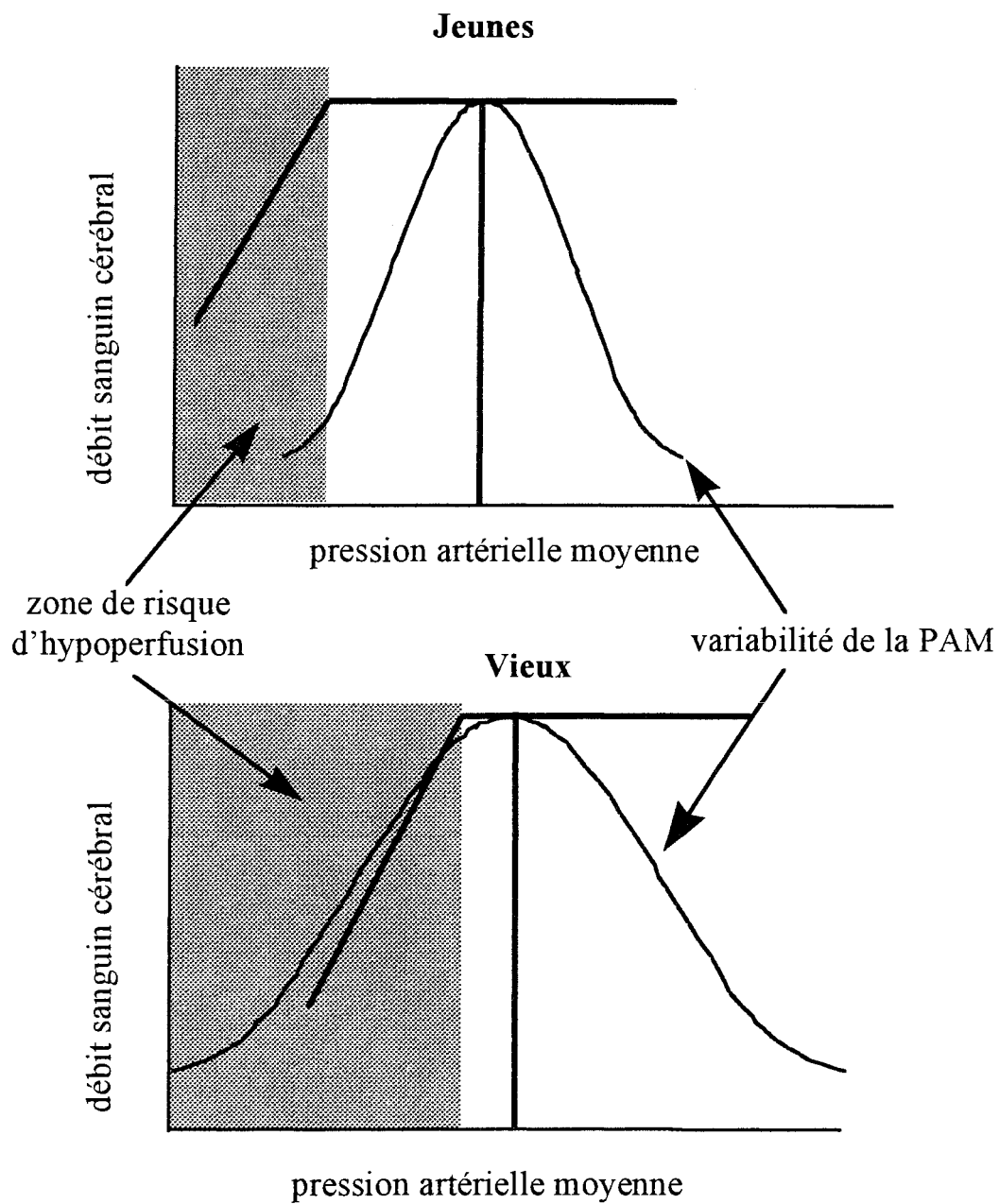


Figure 10 : Schéma de l'augmentation du risque d'hypoperfusion cérébrale avec l'âge (d'après Lartaud et coll., 1993).

## **2. La mélatonine**

La mélatonine (N-acétyl-5-méthoxytryptamine) est la principale hormone sécrétée par la glande pinéale. Elle a été identifiée dès 1958 (Lerner et coll., 1958). Le rôle de la mélatonine, hormone sécrétée pendant la nuit chez tous les vertébrés, est de renseigner l'organisme sur l'alternance jour/nuit, pour mettre en phase celui-ci avec son environnement. La mélatonine constitue chez l'Homme un synchroniseur endogène capable de stabiliser les rythmes circadiens générée par le noyau suprachiasmatique (NSC) ou de les renforcer (Claustrat et coll., 1996). Le message hormonal qui s'ajuste sur la durée de la nuit, variant elle même au cours de l'année, permet également de synchroniser l'individu avec les saisons. Ainsi, chez les animaux à reproduction saisonnière, les modifications annuelles de la sécrétion de mélatonine vont favoriser l'accouplement et par conséquent la mise-bas à un moment privilégié. De façon générale, la mélatonine participe à la régulation des phénomènes rythmiques, journaliers ou annuels.

### **2.1. Physiologie de la mélatonine**

#### **2.1.1. La glande pinéale**

La glande pinéale ou épiphyse est une structure nerveuse qui est reliée au système visuel. Elle pèse environ 1 mg chez le rat et se situe à la surface du cerveau, entre les deux hémisphères cérébraux et le cervelet (Figure 11). Chez l'Homme, elle pèse 100 mg et se situe sur le toit du troisième ventricule. Il s'agit d'un organe richement vascularisé dont l'élément unitaire est le pinéalocyte, cellule parenchymateuse caractérisée par un énorme noyau, un volumineux nucléole et des granulations abondantes au voisinage des fibres sympathiques. L'irrigation de la glande se fait par des ramifications artériolaires provenant des artères

choroïdiennes postérieures. La vascularisation de la glande pinéale des mammifères est caractéristique de celle d'un tissu doté d'une activité sécrétoire intense. Le débit sanguin épiphysaire du rat, calculé par gramme de tissu, est supérieur à celui de la plupart des glandes endocrines et équivaut à celui de la posthypophyse. La voie de connexion entre les yeux et la glande pinéale a été en grande partie établie. Elle inclut la liaison rétino-hypothalamique au noyau suprachiasmatique dont le rôle est fondamental dans la génération de certains rythmes circadiens.

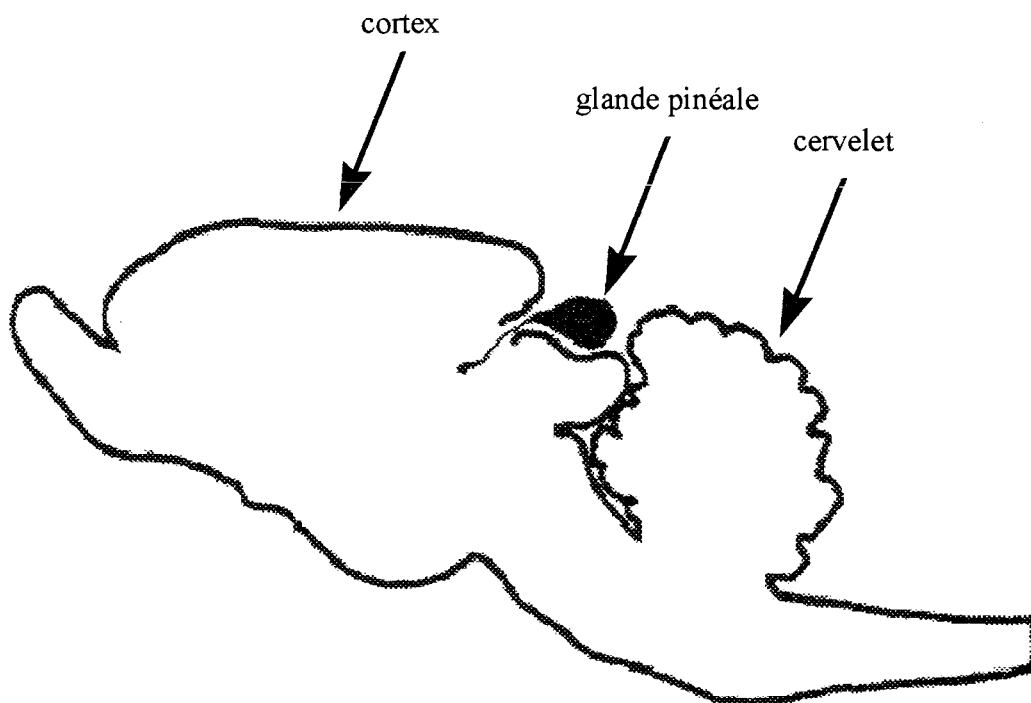


Figure 11 : Localisation de la glande pinéale du rat sur une coupe transversal de cerveau.

### 2.1.2. Métabolisme

La mélatonine est synthétisée dans la glande pinéale à partir d'un précurseur, le tryptophane, qui est transformé en 5-hydroxytryptophane par la tryptophane hydroxylase puis en 5-hydroxy-tryptamine ou sérotonine grâce à une décarboxylation. La voie de synthèse à partir de la sérotonine nécessite la présence de deux enzymes, la N-acétyltransférase (NAT) qui

est considérée comme l'enzyme-clef capable de contrôler la vitesse à laquelle la mélatonine est synthétisée, et l'hydroxyindole-0-méthyltransférase (HIOMT) (Figure 12). La mélatonine peut également être synthétisée de façon annexe (400 fois moins) par les cellules entérochromaffines de l'intestin (Martin et coll., 1998).

La mélatonine est catabolisée surtout au niveau du foie mais également dans le cerveau (Figure 13).

Dans le foie, la mélatonine est hydroxylée dans l'hépatocyte en 6-hydroxymélatonine dépourvue d'activité biologique par une 6-hydroxylase microsomale, puis conjuguée soit avec l'acide sulfurique (70-80 % du catabolisme total) soit avec l'acide glucuronique (5 % du catabolisme total). Il existe également des voies de désacétylation et de déméthylation au niveau hépatique. Après désacétylation, la mélatonine est transformée en 5-méthoxytryptamine, puis en acide 5-méthoxyindole acétique après oxydation. La mélatonine peut être déméthylée en N-acétylsérotonine qui peut se conjuguer avec l'acide glucuronique ou sulfurique dans le foie.

Le catabolisme cérébral (15% du catabolisme total) se fait par oxydation. L'ouverture du noyau pyrrole de la mélatonine aboutit à la formation de N-actyl-5-méthoxykinurénamine en passant par un intermédiaire N-formylé.

L'élimination se fait pour 70 % dans les urines et 20 % dans les fèces en 24 heures. L'élimination urinaire est donc la voie principale, et les métabolites suivants de la mélatonine sont retrouvés dans les urines : la 6-hydroxymélatonine sous forme de sulfate (70-80 %) et de glucuronide (5 %) et les kynurénamines (15 %). D'autres formes d'élimination urinaires sont représentées par la mélatonine elle-même (< 1 %) et l'acide 5-méthoxyindole acétique (0,5 %) (Figure 13).

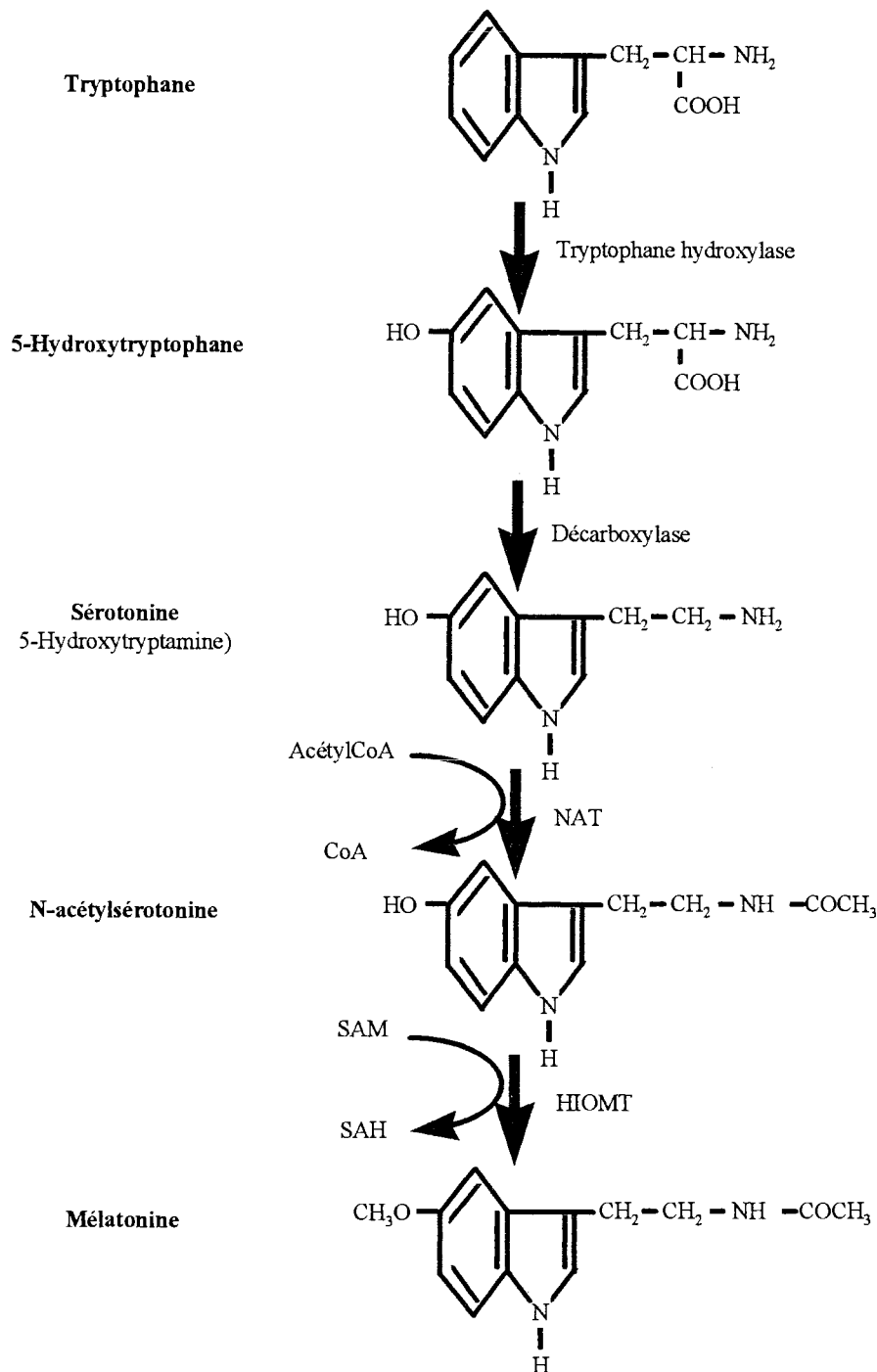


Figure 12 : Synthèse de la mélatonine dans la glande pinéale. (NAT = N-acétyltransférase; HIOMT = hydroxyindole-O-méthyltransférase; SAM = S-adénosylméthionine; SAH = S-adénosylhomocysteine) (d'après Fevre-Montagne, 1985).



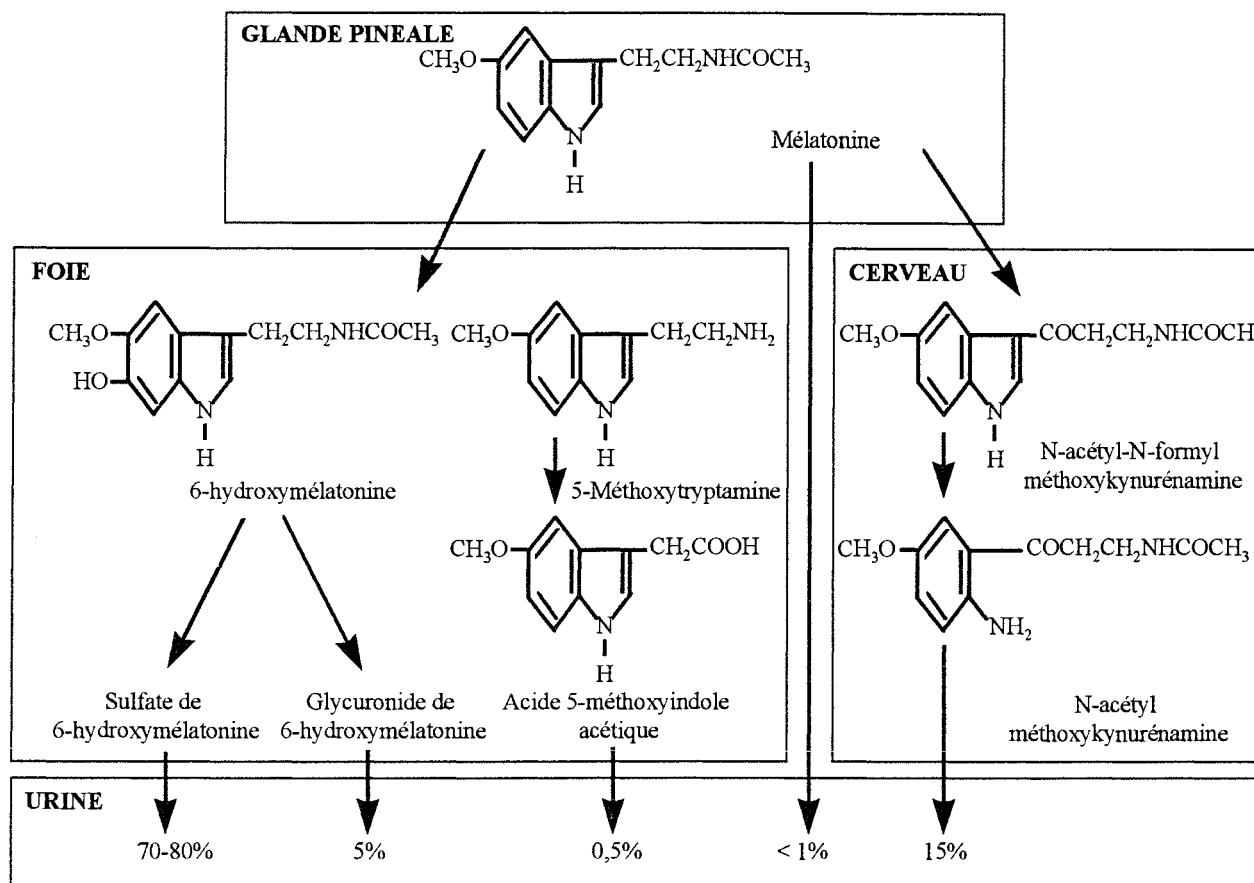


Figure 13 : Schéma du catabolisme de la mélatonine dans le foie et le cerveau et les métabolites retrouvées dans les urines (d'après Touitou et coll., 1996).

### 2.1.3. Le profil plasmatique de la concentration de mélatonine

Il n'existe pas de stockage intra-épiphysaire de la mélatonine et le taux de renouvellement de cette substance est très rapide. Le profil plasmatique représente donc la sécrétion hormonale. Celle-ci se situe préférentiellement pendant la nuit chez les mammifères, persistant pendant environ 10 heures; les taux maximum (100-300 pg/ml) (Lewy et coll., 1979) sont atteints vers 3 heures du matin alors que les taux diurnes sont très faibles (moins de 30 pg/ml) (Lewy et coll., 1979). Ce rythme nyctéméral est le plus marqué qui existe pour une hormone, plus marqué même que le rythme du cortisol.

Le profil plasmatique varie selon la fréquence des prélèvements. Une fréquence maximum d'une heure est nécessaire pour évaluer fidèlement ce profil. Le profil plasmatique de la sécrétion de mélatonine présente une grande hétérogénéité d'un sujet à l'autre. Par contre chez un même sujet, le profil est très reproductible d'un jour à l'autre. Chez certains sujets, les épisodes de sécrétion peuvent être très discrets ou même exceptionnellement absents. De plus, il existe une variation de la sécrétion de la mélatonine avec l'âge, le rythme allant en s'amortissant progressivement avec une tendance à l'avance ou au retard de phase selon les auteurs (Sack et coll., 1986); ce rythme peut être totalement absent chez l'individu âgé (Touitou et coll., 1981).

#### 2.1.4. Régulation de la sécrétion de mélatonine

Comme la plupart des rythmes circadiens chez les mammifères, le rythme de la sécrétion de mélatonine est sous le contrôle d'une horloge interne situé dans les noyaux suprachiasmatiques (Klein et Moore, 1979) (

Figure 14). L'alternance jour/nuit constitue le synchroniseur majeur du système : en présence de lumière, l'influx nerveux véhiculé par la voie rétino-hypothalamique inhibe la synthèse de la N-acétyltransférase. Au contraire, l'inhibition est levée à l'approche de la nuit et la synthèse de mélatonine est stimulée par suite de l'augmentation de la synthèse de la N-acétyltransférase, enzyme-clef qui catalyse l'avant-dernière étape de la biosynthèse de la mélatonine.

Il existe une boucle de rétrocontrôle de la mélatonine sur le NSC, puisque des récepteurs à la mélatonine ont été mis en évidence au niveau des NSC et que l'activité électrique ou métabolique de ces noyaux est modifiée par la mélatonine (Shibata et coll., 1989a, McArthur et coll., 1990).

L'effet de la lumière sur la sécrétion de mélatonine est double, soit synchroniseur, soit inhibiteur selon l'heure d'administration de la plage lumineuse. Il a été montré que la sécrétion de mélatonine peut être inhibée chez l'Homme, pour peu que soit administré un éclairage suffisant pendant un temps prolongé (2500 lux entre 2 heures et 4 heures du matin) (Lewy et coll., 1980). L'effet inhibiteur obtenu sur le profil plasmatique est dose-dépendant.

A côté de cet effet inhibiteur, la lumière naturelle ou artificielle exerce un effet synchroniseur sur la sécrétion de mélatonine : si des sujets sont éclairés avec 3000 lux entre 3 heures et 9 heures du matin, une avance de phase est obtenue (Buresova et coll., 1991). A l'inverse, un retard de phase est observé après administration vespérale de la plage lumineuse.

En l'absence totale de perception de la lumière - chez les aveugles - le rythme de mélatonine peut évoluer vers le libre cours, sa période devenant légèrement supérieure à 24 heures (environ 25 heures). La perception de la lumière permet donc de recalibrer le cycle mélatoninergique avec le cycle circadien.

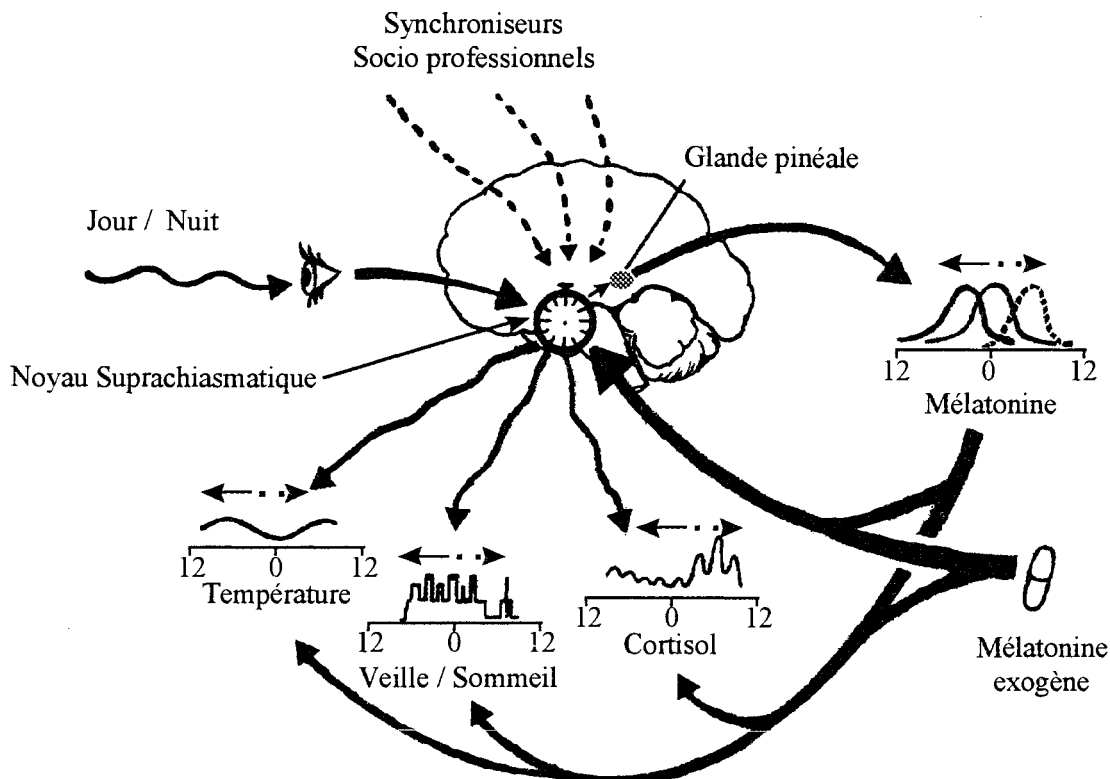


Figure 14 : Impact de la mélatonine endogène ou exogène sur la régulation des rythmes nycthéméraux par le noyaux suprachiasmatique. (d'après Claustrat et coll., 1996).

## 2.2. Pharmacologie de la mélatonine

### 2.2.1. Pharmacocinétique

Les profils plasmatiques de mélatonine suggèrent un taux de renouvellement de l'hormone très rapide. Ceci est confirmé après injection intraveineuse d'un bolus de mélatonine : les concentrations plasmatiques présentent une décroissance bi-exponentielle avec une phase de distribution de demi-vie très courte, d'environ 2 minutes, suivie d'une phase métabolique dont la demi-vie est de 20 à 30 minutes (Mallo et coll., 1990). Le métabolite hépatique de la mélatonine - la 6-sulfatoxymélatonine- apparaît rapidement dans le plasma, conséquence d'un effet de premier passage important.

### 2.2.2. Pharmacodynamie

Par analogie, avec l'effet inhibiteur sur la fonction de reproduction observé chez certaines espèces animales photopériodiques (hamster), une modification par la mélatonine de la fonction gonadique ou des taux d'hormones sexuelles a été recherchée chez l'Homme. Ainsi l'administration de 250 mg de mélatonine pendant 1 mois abaisse le taux de l'hormone lutéale plasmatique. Ce résultat a reçu une tentative non aboutie à ce jour d'application avec la mise au point d'une pilule contraceptive associant une forte dose de mélatonine (300 mg) à un progestatif (Voordouw et coll., 1992).

La mélatonine, composé lipophile, traverse la barrière hémato-encéphalique. De plus, à forte dose elle interagit avec la plupart des systèmes de neuromédiateurs, conduisant à des effets non spécifiques. On tente de l'utiliser en pathologie psychiatrique (dépression saisonnière) ou neurologique (maladie de Parkinson, épilepsie) depuis de nombreuses années (Anton-Tay, 1974).

Des observations montrent qu'une diminution de l'amplitude des rythmes de la mélatonine avec des taux plasmatiques de mélatonine élevés est observée dans la dépression (Arendt, 1989). De plus, l'injection de mélatonine dans le noyau accumbens induit une hypomobilité, réversée par l'administration d'antidépresseur (Durlach-Misteli et Van Ree, 1992). Ces résultats font penser que la mélatonine est un agent dépresseur. De plus la mélatonine pourrait être responsable des dépressions saisonnières dites lumino-dépendantes. En effet, en hiver la luminosité est minimale, et la concentration plasmatique de mélatonine est maximale. Ainsi pour traiter les dépressions saisonnières, une thérapie est d'inhiber la sécrétion de mélatonine en administrant de la lumière aux patients (lumino-thérapie). Cette thérapie est utilisée essentiellement dans les pays nordiques, où, du fait de la nuit polaire, la fréquence des

dépressions saisonnières lumino-dépendantes est beaucoup plus importante (Booker et Hellekson, 1992).

Ses tentatives d'utilisation dans des pathologies neurologiques reposent essentiellement sur l'espoir placés dans ses propriétés antioxydantes (voir paragraphe 2.4.3.).

A faible dose, la mélatonine est sédative, provoquant une augmentation de la sensation de fatigue, un allongement du temps de réaction lors des tests de performance et une diminution de la latence d'endormissement (Arendt et coll., 1984). A forte dose, les études ont montré un effet hypnotique ; les modifications de l'enregistrement du tracé du sommeil varient selon les doses ou les auteurs (Cramer et coll., 1974). Cependant, après plusieurs jours d'administration du traitement, l'architecture du sommeil présente des modifications (augmentation de la densité du sommeil paradoxal et du stade II) compatibles avec un effet médié par l'horloge circadienne (Dawson et Encel, 1993).

La mélatonine modifie sa sécrétion endogène mais pas selon un phénomène classique de rétrocontrôle négatif. En effet, la phase du rythme endogène est modifiée différemment (avance ou retard de phase) selon l'heure d'administration du stimulus exogène. Ce phénomène a été décrit en suivant la modification du profil plasmatique de mélatonine enregistré suite à l'administration répétée de mélatonine (2 gélules de mélatonine dosées à 0,25 mg pendant 4 jours) (Lewy et coll., 1992). Lorsque la mélatonine est administrée l'après-midi ou dans la soirée, une avance de phase est observée, alors qu'une administration matinale ou à midi induit un retard de phase. Le changement de signe du décalage se situe vers 15 heures, à l'opposé du pic nocturne de mélatonine. Cet effet de la mélatonine sur sa propre sécrétion va en sens inverse de celui observé avec la lumière (retard de phase si la lumière est donnée après 15H et avance de phase si elle est donnée avant 15H).

### 2.2.3. Mode d'action de la mélatonine au niveau de la cellule

La mélatonine exerce certaines activités sans mettre en jeu une liaison préalable à un récepteur membranaire : elle présente des propriétés antioxydantes et constitue un "piégeur" des radicaux libres plus puissant que la vitamine E, antioxydant puissant (voir paragraphe 2.4.3.) (Tan et coll., 1993).

Des sites de fixation de la mélatonine ont été mis en évidence dans le cytoplasme de cellules d'ovaire, de testicule, de foie, d'utérus de différentes espèces animales (Cohen et coll., 1978). De plus, *in vitro*, la mélatonine se fixe sur la calmoduline avec une haute affinité (Benítez-King et coll., 1993).

Par ailleurs, le développement d'un ligand iodé (2-[<sup>125</sup>I]-iodomélatonine) a permis de montrer que la mélatonine possède des récepteurs membranaires. Ces récepteurs sont de trois types : MT<sub>1</sub>, MT<sub>2</sub> et MT<sub>3</sub> (classification, 1998).

#### 2.2.3.1. Le récepteur MT<sub>1</sub> (Tableau 1)

Ce récepteur était anciennement appelé Mel<sub>1a</sub>, MEL<sub>1A</sub> ou ML<sub>1A</sub>. Il fait partie de la famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires (Figure 15). Il présente une affinité élevée pour la mélatonine (pM). Les fonctions connues de ce récepteur sont la potentialisation des vasoconstrictions à la noradrénaline de l'artère caudale de rat (Krause et coll., 1995, Ting et coll., 1997), l'inhibition de la stimulation par la forskoline de l'adénylate cyclase dans la pars tuberalis de mouton (Morgan et coll., 1994), et l'inhibition du "firing" neuronal dans le noyau suprachiasmatique de la souris (Liu et coll., 1997). Il n'existe pas d'agoniste ou d'antagoniste spécifique de ce récepteur. Il est cependant antagonisé par le luzindole avec un pA<sub>2</sub> de 6,4-6,9 (Krause et coll., 1995).

Ce récepteur a été localisé au niveau du noyau suprachiasmatique, de la pars tuberalis, du noyau paraventriculaire, du cervelet, de l'hypothalamus, du rein, de l'épithélium intestinal, du cortex occipital, frontal, temporal, de l'hippocampe et du thalamus (Krause et Dubocovich, 1991, Viswanathan et coll., 1993, Morgan et coll., 1994, Sugden et coll., 1998), ainsi que sur les artères du polygone de Willis, les artères cérébrales et l'artère caudale de rat (Viswanathan et coll., 1990, Capsoni et coll., 1994).

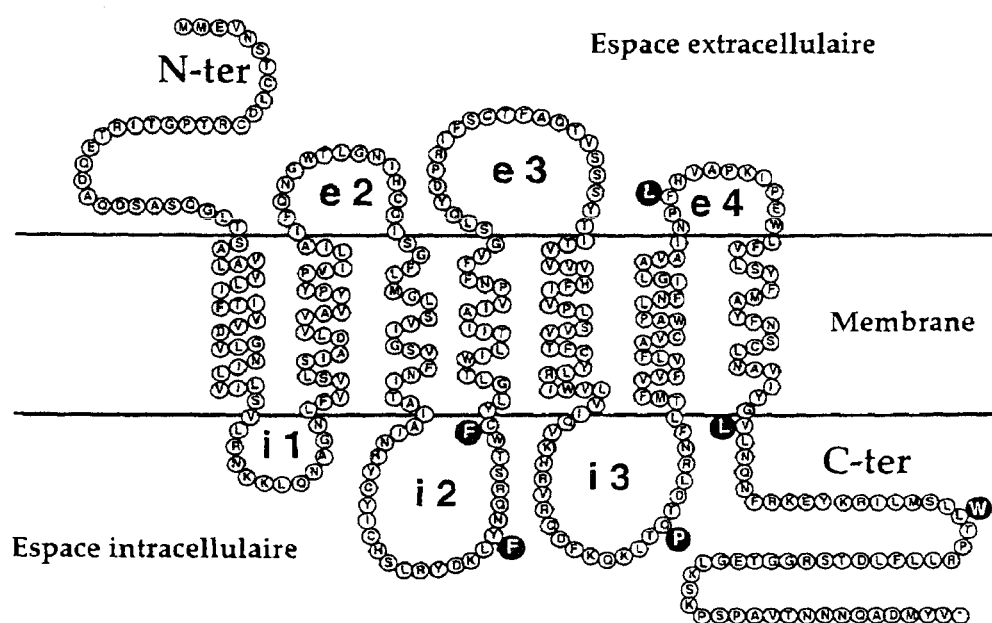


Figure 15 : Schéma du récepteur MT<sub>1</sub> de *Xenopus laevis*. (Dubocovich, 1995)

### 2.2.3.2. Le récepteur MT<sub>2</sub> (Tableau 1)

Anciennement appelé Mel<sub>1b</sub>, MEL<sub>1B</sub> ou ML<sub>1B</sub>, il fait également partie de la famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires, et présente 60 % d'homologie avec le récepteur MT<sub>1</sub>. Il présente une affinité comparable à MT<sub>1</sub> pour la mélatonine (pM). Il a été montré que ce récepteur inhibait le largage de dopamine par la rétine de lapin (Dubocovich, 1985, 1988, Krause et Dubocovich, 1990) et qu'il était impliqué dans le déplacement de phase des rythmes



circadiens (Dubocovich et coll., 1998). Il n'existe pas non plus d'agoniste ou d'antagoniste spécifique de ce récepteur, il est également antagonisé par le luzindole ( $pA_2$  de 5,7 dans le cerveau (Dubocovich et coll., 1997)).

Il a été localisé au niveau de la rétine, de l'hippocampe, et du cerveau (Dubocovich et coll., 1997).

### 2.2.3.3. Le récepteur $MT_3$ (Tableau 1)

Le récepteur  $MT_3$ , anciennement appelé  $ML_2$ , n'a pas encore été cloné. Il a une affinité faible pour la mélatonine (nM) La prazosine est un antagoniste de ce récepteur ( $pA_2$  de 8.0) (Molinari et coll., 1996, Dubocovich et coll., 1997). Sa fonction n'est pas encore établie, mais il a été localisé dans le cerveau, le rein et les testicules (Duncan et coll., 1988, 1989, Molinari et coll., 1996).

	<b>MT<sub>1</sub></b>	<b>MT<sub>2</sub></b>	<b>MT<sub>3</sub></b>
<b>autres noms</b>	Mel <sub>1b</sub> , MEL <sub>1B</sub> , ML <sub>1B</sub>	Mel <sub>1b</sub> , MEL <sub>1B</sub> , ML <sub>1B</sub>	ML <sub>2</sub>
<b>affinité pour la mélatonine</b>	pM	pM	nM
<b>agonistes</b>	iodomélatonine	2 iodomélatonine, S20098	GR135531, N-acétylsérotonine, 2 iodomélatonine
<b>antagonistes</b>	luzindole	GR128107, luzindole	prazosine
<b>gènes</b>	chromosome 4 q35.1	chromosome 11 q21-22	
<b>localisations</b>	NSC, pars tuberalis, noyau paraventriculaire, cervelet, hypothalamus, rein, épithélium intestinal, cortex occipital, frontal, et temporal, hippocampe, thalamus, artères du polygone de Willis, cérébrales, et caudale de rat	rétine, l'hippocampe, cortex	cerveau, rein, testicules
<b>fonctions</b>	constriction des artères du polygone de Willis, potentialisation des vasoconstrictions à la noradrénaline de l'artère caudale de rat, inhibition de la "décharge" neuronale dans le NSC	inhibe le largage de dopamine par la rétine de lapin, impliquée dans le déplacement de phase des rythmes circadiens	
<b>transduction intracellulaire</b>	inhibitions de l'AMPC	inhibitions de l'AMPC	

Tableau 1 : Les récepteurs à la mélatonine et leurs principales caractéristiques (d'après IUPHAR committee 1998).

#### 2.2.3.4. Signalisation intracellulaire

- Couplage des récepteurs à l'adénylate cyclase par les protéines  $G_i/G_o$

Dès l'identification de récepteurs spécifiques de la mélatonine des études sur la transduction du signal ont montré que la mélatonine inhibait l'adénylate cyclase diminuant ainsi la concentration intracellulaire d'AMPc (Godson et Reppert, 1997, Roth et coll., 1997, Vanecek, 1998, Witt-Enderby et coll., 1998). Cette inhibition de l'adénylate cyclase par la mélatonine est sensible à la toxine pertussique et implique donc une protéine de la famille  $G_i/G_o$  (Morgan et coll., 1989). Cet effet s'est révélé commun aux récepteurs  $MT_1$  et  $MT_2$ .

- Modulation du niveau de GMPc

La modulation par la mélatonine de la concentration intracellulaire de GMPc (guanosine 3',5' monophosphate cyclique) a été observée dans plusieurs systèmes cellulaires (Morgan et coll., 1994). Lorsque qu'on stimule directement et spécifiquement les guanylates cyclases solubles par un donneur de NO, le nitroprussiate de sodium (SNP), l'effet inhibiteur de la mélatonine ne peut être reproduit (Jockers et coll., 1997). Ceci suggère que la mélatonine interfère en amont des guanylate-cyclases et pourrait agir sur diverses cibles comme la NO synthase qui produit le NO, un activateur direct des guanylates cyclases, ou sur des partenaires interagissant avec la NO synthase comme le calcium ou la calmoduline. D'autre part il a été montré que cette inhibition est sensible à la toxine pertussique. Les cibles potentielles du GMPc sont les canaux dont l'ouverture est contrôlée par le GMPc, les protéines kinases dépendantes du GMPc (PKG) et des phosphodiesterases dont le rétrocontrôle négatif est assuré par phosphorylation par une PKG.

- Autres voies de signalisation

Diverses voies de signalisation ont été décrites par différentes équipes. La stimulation du récepteur  $MT_1$  exprimé dans les cellules NIH 3T3 permet de potentialiser l'effet du récepteur  $PGF_{1\alpha}$  stimulé par son ligand (prostaglandine) qui est couplé à une protéine  $G_q$  et qui a pour effet d'activer la phospholipase C (PLC) (Godson et Reppert, 1997). Cette enzyme produit, par hydrolyse de phosphoinositides deux seconds messagers l'inositol 1,4,5 trisphosphate ( $IP_3$ ) qui libère le calcium des stocks intracellulaires et le diacylglycérol (DAG) qui active les protéines kinases C (PKC). La mélatonine induit une potentialisation de la synthèse d' $IP_3$  et également celle d'acide arachidonique par la phospholipase  $A_2$ . La sous-unité  $\beta\gamma$  de la protéine  $G_i$  couplée au récepteur  $MT_1$  serait responsable de l'activation de ces différents effecteurs.

Au niveau électrophysiologique, la mélatonine est capable d'inhiber le déclenchement du potentiel d'action dans les neurones du noyau suprachiasmatique par l'intermédiaire de la sous-unité  $\beta\gamma$  de la protéine  $G_i$  (phénomène pertussis-toxine-sensible) (Liu et coll., 1997). De plus il a été montré que la mélatonine augmente la conductance au potassium dans les neurones des noyaux suprachiasmatiques de rat (Jiang et coll., 1995). Les récepteurs humains  $MT_1$  exprimés dans des oocytes de xénope peuvent activer des canaux potassiques de la famille Kir3 par l'intermédiaire des sous-unités  $\beta\gamma$  des protéines  $G_i$  (Nelson et coll., 1996).

### **2.3. Mélatonine et système cardiovasculaire**

La mélatonine a peu d'effet sur les paramètres hémodynamiques globaux (Bosman et coll., 1991). Cependant, elle joue un rôle dans les rythmes circadiens de pression artérielle et de fréquence cardiaque. En effet, dans des conditions de lumière continue, le cycle circadien de pression artérielle disparaît chez le rat (Witte et Lemmer, 1995). Ces effets passent par le couple NSC-mélatonine.

La mélatonine possède cependant des effets locaux propres sur des régions spécifiques du système cardiovasculaire, tel que la circulation cérébrale (artères du polygone de Willis) ou bien les artères impliquées dans la thermorégulation (artère caudale) (Viswanathan et coll., 1990, Capsoni et coll., 1996).

#### 2.3.1. Effets directs

Il a été démontré que la mélatonine possède une activité directe sur le réseau vasculaire cérébral. En effet, chez le rat, la mélatonine constrict de façon dose-dépendante les artères cérébrales antérieures (Mahle et coll., 1995) et moyennes (Geary et coll., 1997). D'après ces auteurs, cet effet serait dû à la fixation de la mélatonine sur les récepteurs  $MT_1$  et/ou  $MT_2$  qui fermentaient, par l'intermédiaire d'une protéine G, les canaux potassique calcium-dépendant de large conductance ( $BK_{Ca^{2+}}$ ). Cette fermeture entraînerait une dépolarisation des cellules musculaires lisses, aboutissant ainsi à une vasoconstriction.

La mélatonine constrict également l'artère caudale de rat jeune (Evans et coll., 1992).

#### 2.3.2. Effets indirects

Chez le rat adulte, la mélatonine ne présente pas d'effet direct sur les vasoconstrictions de l'artère caudale (Evans et coll., 1992, Vandeputte et coll., 1997). Par contre la mélatonine,

potentialise les vasoconstrictions induites par des stimulations électriques (Krause et coll., 1995) ou par un agoniste des récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques tel que la noradrénaline (Viswanathan et coll., 1990, Vandeputte et coll., 1997).

La mélatonine potentialise également la réponse vasoconstrictrice des artères coronaires de porc induite par une solution hyperpotassique (Weekley, 1993). Un traitement par un antagoniste des récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques abolit cet effet. Donc soit la mélatonine augmente la quantité de noradrénaline disponible (augmentation de la libération à partir des terminaisons nerveuses ou diminution du recaptage) soit la mélatonine amplifie la signalisation intracellulaire du message noradrénergique.

La mélatonine est également capable de diminuer l'amplitude des constriction induites par le KCl ou la sérotonine dans l'artère basilaire (Shibata et coll., 1989b, Satake et coll., 1991a, 1991b) et l'artère pulmonaire (Weekley, 1993). Ces résultats, *in vitro*, suggèrent une action vasodilatatrice de la mélatonine. Cependant, cet effet n'apparaît que pour des concentrations de mélatonine beaucoup plus élevées (mM ou  $\mu$ M) que son affinité pour ses récepteurs (pM ou nM) et ne semble donc pas être physiologique (Viswanathan et coll., 1990, Capsoni et coll., 1994).

## 2.4. Mélatonine et vieillissement

Les interrogations sur les liens unissant mélatonine et vieillissement reposent essentiellement sur 2 observations :

1. La production de mélatonine diminue avec l'âge et le rythme circadien de sa sécrétion est même complètement perdu chez les sujets très âgés de nombreuses espèces (Touitou et coll., 1981, Reiter, 1994)

2. La restriction alimentaire, qui augmente la durée de vie, augmente la concentration plasmatique de mélatonine (Masoro, 1988)

Ces différentes observations ont fait penser que la mélatonine pouvait être une molécule "anti-vieillessement".

### 2.4.1. Taux circulant de mélatonine et âge

De nombreux auteurs ont rapporté une diminution des taux circulants de mélatonine avec l'âge (Touitou et coll., 1981, Sack et coll., 1986, Pang et coll., 1990, Reiter, 1994, Zhang et coll., 1997). Comme le montre la Figure 16, les concentrations plasmatiques de mélatonine sont élevées pendant l'enfance, puis diminuent avec l'âge.

Certains auteurs montrent même une disparition des cycles mélatoninergiques avec l'âge (Touitou et coll., 1981, Reiter, 1994). La diminution de sécrétion de mélatonine avec l'âge serait due à une diminution de sa sécrétion par la glande pinéale, elle-même due à une diminution de la masse de la glande pinéale, à sa calcification, à une diminution du nombre de pinéalocytes (Humbert et Pévet, 1991, 1995), mais également à une augmentation de la dilution de la mélatonine due à l'accroissement de la masse corporelle des animaux (Skene et coll., 1990, Zhang et coll., 1997). Le vieillissement pourrait s'accompagner d'un ou plusieurs des facteurs suivants : diminution de la libération de la mélatonine par la glande pinéale,

augmentation de son métabolisme ou de son excrétion, augmentation de la sensibilité à la lumière de l'axe rétine-NCS-pinéale chez le sujet âgé. Par ailleurs il a été décrit chez les rongeurs une diminution avec l'âge du nombre des récepteurs noradrénergiques dans la membrane du pinéaloocyte ou de leur sensibilité à la noradrénaline (Greenberg et coll., 1978) qui pourrait dans une certaine mesure participer à la diminution des taux circulants de mélatonine avec l'âge puisque l'activation des récepteurs noradrénergique est nécessaire à la synthèse de mélatonine.

En plus de cette diminution de sécrétion de la mélatonine avec l'âge, il y a une diminution avec l'âge du nombre de récepteurs à la mélatonine dans l'artère caudale de rat (Viswanathan et coll., 1993). Cette diminution âge-dépendante du nombre de récepteurs à la mélatonine a aussi été démontrée dans les artères cérébrales antérieures de rat (Laitinen et coll., 1992). Les mécanismes de cette diminution ne sont pas encore élucidés.

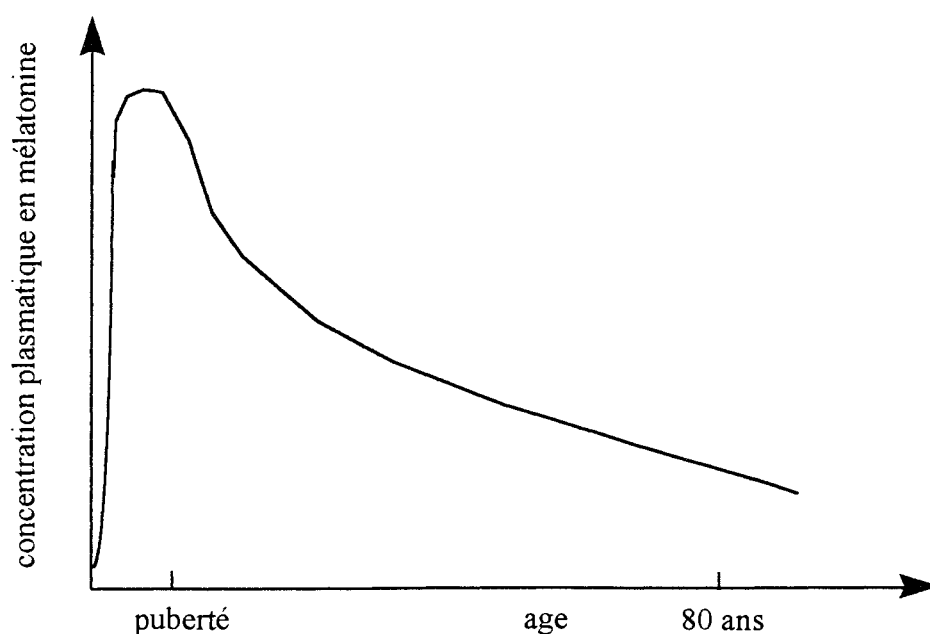


Figure 16 : Schéma des variations de la concentration plasmatique de la mélatonine en fonction de l'âge (d'après Reiter, 1994).



### 2.4.2. Système immunitaire

De nombreuses expériences ont montré l'existence d'un lien entre la mélatonine et le système immunitaire. Il a été montré par exemple qu'une suppression fonctionnelle ou pharmacologique de la mélatonine nocturne entraîne une dépression des lymphocytes-T et de la réponse immunitaire, phénomène qui est reversé par une injection de mélatonine (Maestroni et coll., 1988). De plus un traitement à la mélatonine augmente la production d'interleukine 2, le ratio "T-helper/T-suppresseur" ou bien encore la sécrétion de lymphokines (Lissoni et coll., 1988, Del Gobbo et coll., 1989). Les mécanismes par lesquelles la mélatonine module la fonction immunitaire sont inconnus. Les peptides opioïdes et les lymphokines ont été suggérés comme de possible médiateurs (Maestroni, 1993).

La mélatonine stimule donc le système immunitaire. Dans le contexte du vieillissement, l'allégement de la stimulation de la mélatonine sur le système immunitaire pourrait être un des mécanismes expliquant l'immuno-dépression âge dépendante. Ainsi, on peut supposer qu'un traitement à la mélatonine en évitant cette immuno-dépression, pourrait éviter l'augmentation avec l'âge de nombreuses maladies.

### 2.4.3. Radicaux libres

L'oxygène représente environ 21% de l'atmosphère terrestre et est essentiel pour la vie aérobie. Cependant, l'oxygène peut être létal pour les organismes qui dépendent d'elle pour survivre.

La majorité de l'oxygène inspiré est utilisé pour générer de l'énergie sous la forme d'ATP (Reiter, 1995). Il existe cependant une partie de l'oxygène, environ 5%, qui est transformée en radicaux libres, dont la plus grande part sont très toxiques (Reiter, 1995). La formation de radicaux libres est une des causes de destruction du tissu neuronal avec l'âge. Chez l'Homme,

les radicaux libres interagissent avec les protéines, les phospholipides, et les acides nucléiques et produisent des dégâts irréversibles (Reiter et coll., 1996, Suzuki et coll., 1997). Les radicaux libres sont supposés être responsables des dommages tissulaires dans de nombreux désordres pathophysiologiques tel que l'hypoxie, l'inflammation, ou encore l'ischémie (Coyle et Puttfarcken, 1993). Ils pourraient aussi être responsables des dysfonctions neurologiques associées à certaines maladies neurodégénératives tel que la maladie de Parkinson, d'Alzheimer et d'autre (Coyle et Puttfarcken, 1993). Ils semblent être impliqués dans le processus normal de vieillissement (Reiter et coll., 1996).

L'organisme a développé des systèmes de défense contre ces radicaux libres avec des enzymes tel que la carnityl acétyl transférase et la glutathion peroxydase et des molécules antioxydantes tel que les vitamines C et E et le  $\beta$ -carotène (Reiter et coll., 1996). De nombreux auteurs ont montré que la mélatonine est une molécule antioxydante très puissante, 5 fois plus que la glutathion peroxydase, 15 fois plus que le mannitol, et 2 fois plus que la vitamine E qui est la molécule de référence des antioxydants (Pieri et coll., 1996). Cependant, ces observations sont à moduler car les effets antioxydants de la mélatonine sont observés *in vitro* pour des doses supraphysiologiques (entre  $\mu\text{M}$  et  $\text{mM}$ ) (Scwerynek et coll., 1995, Duell et coll., 1998). En revanche, *in vivo*, des doses physiologiques de mélatonine protègent les cellules hépatiques contre les dégâts dus aux radicaux libres produit par une injection de safrole (Tan et coll., 1994). De plus, une pinéalectomie qui permet de diminuer très fortement les taux plasmatiques de mélatonine par ablation de la source principale de synthèse de cette hormone, augmente les altérations au niveau de l'ADN induit par le safrole, produit carcinogène (Tan et coll., 1994).

Ces résultats permettent de penser que la mélatonine est une molécule endogène qui fait partie du système antioxydant naturel. Etant donné que la production de mélatonine diminue

avec l'âge, on peut penser que la mélatonine joue un rôle physiologique dans l'augmentation avec l'âge des dommages dans l'ADN, la mort cellulaire et la neurodégénération (Beyer et coll., 1998).

#### 2.4.4. Autres effets

La diminution progressive de la concentration plasmatique mélatoninergique avec l'âge entraîne une perturbation de nombreuses fonctions physiologiques. Des processus physiologiques tels que la sexualité, le rythme veille-sommeil, ou encore la diminution de la température corporelle préalable à l'endormissement sont perturbés au cours du vieillissement et améliorés par un traitement à la mélatonine (Young, 1996).

De plus un traitement à la mélatonine permet de resynchroniser les cycles hormonaux tel que celui du cortisol qui est désynchronisé au cours du vieillissement (Ferrari et coll., 1995).

### **3. Objectifs**

Plusieurs observations nous ont donc poussé à étudier les liens possibles entre le système mélatoninergique et l'autorégulation du débit sanguin cérébral.

Premièrement, le facteur de risque le plus important des AVC est l'âge, le risque doublant avec chaque décade après 50 ans (Zuber et Mas, 1993). Dans le même temps la concentration plasmatique en mélatonine diminue (Touitou et coll., 1981).

Deuxièmement, la fréquence des accidents ischémiques transitoires présente des variations circadiennes et saisonnières qui peuvent se rapprocher du cycle circadien et saisonnier de la mélatonine (Zuber et Mas, 1993).

Troisièmement, les patients souffrant de migraine présentent un taux de mélatonine plus faible que la moyenne (Brun et coll., 1995) et un plus grand risque de faire des AVC (Tatemachi et Mohr, 1992).

Finalement, la mélatonine constrict les artères du polygone de Willis (Mahle et coll., 1995, Geary et coll., 1997) et diminue le DSC de jeunes rats (Capsoni et coll., 1996).

Tous ces éléments laissent envisager l'existence d'un lien entre le système mélatoninergique et le système cérébro-vasculaire mais ne le démontrent pas. Ainsi, l'objectif de ce travail sera de démontrer l'existence d'un lien entre ces deux systèmes. Pour cela nous avons cherché au cours des cinq études qui suivent à répondre à plusieurs questions:

1. La mélatonine peut-elle modifier l'autorégulation du débit sanguin cérébral? (Chapitre II-1)
2. Est ce que la modification des capacités d'autorégulation du DSC que nous avons précédemment observé est due à une constriction du système cérébro-vasculaire? (Chapitre II-2)
3. Comment la mélatonine contracte-t-elle les artérioles cérébrales? (Chapitre II-3)
4. Quel effet a la suppression de la mélatonine endogène sur le système cérébro-vasculaire des animaux jeunes? (Chapitre II-4)
5. Est ce qu'un traitement chronique à la mélatonine peut améliorer les capacités d'autorégulation du DSC d'animaux âgés? (Chapitre II-5)

**Chapitre II :**  
**Travaux personnels**

**1.La mélatonine augmente la marge de sécurité de la circulation  
cérébrale chez le rat**

**Melatonin improves cerebral circulation security margin in rats**

*Am. J. Physiol.* 275, 1 : H139-H144.

Olivier Régrigny, Philippe Delagrange<sup>1</sup>, Elizabeth Scalbert<sup>1</sup>, Jeffrey Atkinson & Isabelle Lartaud-Idjouadiene.

Laboratoire de Pharmacologie Cardiovasculaire (EA 3116), Faculté de Pharmacie de l'Université Henri Poincaré-Nancy I, 5 rue Albert Lebrun, 54000 Nancy and <sup>1</sup> IRIS, 6 place des Pléiades, 92415 Courbevoie Cedex, France

## RESUME

Nous avons vu dans l'introduction que la mélatonine est un vasoconstricteur direct des grosses artères cérébrales d'influx *in vitro* (Geary et coll., 1997) et diminue le DSC (Capsoni et coll., 1996). Nous avons alors émis l'hypothèse que la mélatonine, en administration aiguë, pourrait augmenter la réserve vasodilatatrice du système vasculaire cérébral face à une chute de pression améliorant ainsi les mécanismes d'autorégulation du DSC mis en jeu lors d'une chute de pression artérielle moyenne.

Cette étude a pour but de démontrer que la mélatonine peut augmenter la marge de sécurité du DSC en augmentant la réserve vasodilatatrice du système vasculaire cérébral *in vivo*.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons mesuré l'effet d'une perfusion de mélatonine à différentes doses chez le rat adulte éveillé sur le DSC de base, les résistances cérébro-vasculaires de base, la réactivité au CO<sub>2</sub> (test de vasodilatation cérébro-vasculaire) et la limite basse d'autorégulation suite à une hypotension hémorragique.

Cette étude montre que la mélatonine induit un déplacement dose-dépendant de la limite basse d'autorégulation vers des valeurs de pression artérielle moyenne moins élevées. Comme la mélatonine n'a pas d'effet sur la pression artérielle moyenne de base, une telle diminution de la limite basse d'autorégulation entraîne une augmentation de la marge de sécurité cérébro-vasculaire. Ce déplacement de la limite basse d'autorégulation peut être relié à une augmentation de la capacité de dilatation cérébro-vasculaire face à une chute de pression artérielle moyenne. Cette meilleure réserve vasodilatatrice est d'ailleurs retrouvée lors du test au CO<sub>2</sub> et est corrélée à l'augmentation des résistances cérébro-vasculaires de base.

Ces résultats nous ont permis de conclure que la mélatonine augmente la réserve vasodilatatrice du système vasculaire, et ce, sans effet sur la pression artérielle moyenne. Cette



augmentation de la réserve vasodilatatrice du système vasculaire aboutit à une augmentation de la marge de sécurité de l'autorégulation du débit sanguin cérébral.

Nous pouvons émettre l'hypothèse que cette augmentation de la réserve vasodilatatrice du système cérébro-vasculaire est due à la constriction aussi bien des grosses artères d'influx que des petites artères intra-cérébrales par la mélatonine.

## ABSTRACT

As melatonin is a cerebral vasoconstrictor agent, we tested whether it could shift the lower limit of cerebral blood flow autoregulation to a lower pressure level, by improving the cerebrovascular dilatory reserve, and thus widen the security margin. Cerebral blood flow and cerebrovascular resistance were measured by hydrogen clearance in the frontal cortex of adult male Wistar rats. The cerebrovasodilatory reserve was evaluated from the increase in the cerebral blood flow under hypercapnia. The lower limit of cerebral blood flow autoregulation was evaluated from the fall in cerebral blood flow following hypotensive hemorrhage. Rats received melatonin infusions of 60, 600, or 60000 ng.kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, a vehicle infusion, or no infusion (n = 9 per group). Melatonin induced concentration-dependent cerebral vasoconstriction (up to 25% of the value for cerebrovascular resistance of the vehicle group). The increase in vasoconstrictor tone was accompanied by an improvement in the vasodilatory response to hypercapnia (+ 50 to + 100% *versus* vehicle) and by a shift in the lower limit of cerebral blood flow autoregulation to a lower mean arterial blood pressure level (from 90 to 50 mmHg). As melatonin had no effect on baseline mean arterial blood pressure, the decrease in the lower limit of cerebral blood flow autoregulation led to an improvement of the cerebrovascular security margin (from 17% in vehicle to 30%, 55% and 55% in the low, medium and high dose melatonin groups, respectively). This improvement in the security margin suggests that melatonin could play an important role in the regulation of cerebral blood flow and may diminish the risk of hypoperfusion-induced cerebral ischemia.

## INTRODUCTION

Melatonin influences many physiological responses (Goldman, 1983). Furthermore, melatonin has been shown to constrict large diameter cerebral arteries *in vitro* (Geary *et al.*, 1997). We investigated, therefore, the impact of melatonin on cerebrovascular resistance (CVR) reserve *in vivo*. We postulated that an increase in cerebral vasoconstrictor tone would improve the cerebral vasodilatory capacity. The cerebrovascular dilatory reserve was investigated by measuring the effect of melatonin on the increase in cerebral blood flow (CBF) produced by hypercapnia, a challenge which is frequently used to test the cerebrovascular dilatory reserve (Heistad *et al.*, 1980, Wei *et al.*, 1980, Jones *et al.*, 1989). Finally, as the autoregulatory capacity of CBF is related to the cerebrovascular dilatory reserve (Paulson and Waldemar, 1990), we investigated whether melatonin modifies the lower limit of CBF autoregulation. Experiments were performed in chronically instrumented, non-anesthetized, unrestrained rats which received an i.v. infusion of melatonin.

## METHODS

### *Animals.*

Adult, male Wistar rats (Ico : WI, IOPS AF/Han ; Iffa-Credo, 69210 l'Arbresle, France, n = 45, weight =  $516 \pm 16$ g) were randomized into control (no infusion), vehicle (infusion of solvent : NaCl 9‰ plus 1% of absolute ethanol), or treated groups (melatonin 60, 600, or 60000 ng.kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) (n = 9 per group). The illumination schedule was lights on at 6 am and off at 6 pm.

*Baseline CBF, cerebrovascular resistance, blood gases, blood pH, arterial blood pressure and heart rate.*

The methods used have been described in full elsewhere (Haining *et al.*, 1968, Lartaud *et al.*, 1993). A brief summary will be given here.

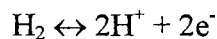
Following implantation of cortical electrodes (a platinum anode : diameter = 150  $\mu\text{m}$  at coordinates A = + 2 mm, L = + 2 mm from the bregma, and a silver cathode : diameter = 200  $\mu\text{m}$  at coordinates A = + 2 mm, L = - 2 mm from the bregma) under sodium pentobarbital anesthesia (60  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , i.p.) on day 0, animals were allowed 12 days to recover. A polyethylene cannula (0.96/0.58 mm o.d./i.d.; Merck Biotrol, 95380 Chennevieres, France) was placed *via* the femoral artery in the dorsal aorta, and a silicone catheter (1.94/0.64 mm o.d./i.d, Sigma Medical, 92008 Nanterre, France) in the femoral vein under halothane (2%)-O<sub>2</sub> anesthesia. Animals were allowed 2 days to recover.

On the 14th. day following implantation of the electrodes, and 3h after the lights came on, awake rats were placed in an air-tight cage (255 × 215 × 175 mm) through which air was passed at a flow rate of 10  $\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ . The electrodes were connected to an amperometric circuit which applied +200 mV to the platinum, cortical anode.

The femoral artery cannula was flushed, and connected to a low volume, strain-gauge transducer (Baxter, Bentley Laboratories, Europe). The femoral vein cannula was connected to an infusion pump (Bioblock Scientific, 75000 Paris, France) *via* a silicone tube and a plastic syringe (to avoid melatonin adsorption). Infusion of melatonin or vehicle at a rate of 0.254  $\text{ml}\cdot\text{h}^{-1}$  was begun and continued throughout the experiment, *i.e.* 5 hours.

A 60 minutes' equilibration period allowed the plasma concentration of melatonin to equilibrate (results not shown). A mixture of air plus hydrogen (5 %) was passed through the

cage. The potential gradient between the two cortical electrodes produced a hydrogen oxidation current :



Rats inhaled hydrogen until the oxidation current reached a stable level, showing that the cerebral cortex was saturated with hydrogen (5 minutes). At saturation, a blood sample (50  $\mu\text{l}$ ) was taken *via* the femoral artery cannula for the determination of pH, PaO<sub>2</sub> (mmHg) and PaCO<sub>2</sub> (mmHg ; 170 pH/Blood Gas Analyzer, Corning Medical, Medfield, USA). Arterial blood pressure (mmHg) was recorded and heart rate (bpm) was determined from a high chart speed recording of the pulse pressure signal.

The gas mixture was changed from air plus hydrogen to air alone. The cortical elimination of hydrogen (hydrogen clearance curve) was an exponential function, the rate of which (logarithmic function) was directly proportional to cortical blood flow. Hydrogen clearance data were treated according to the initial slope technique (Aukland *et al.*, 1964), CBF being calculated from the first order rate equation :

$$\text{CBF (ml.min}^{-1}\text{.100g}^{-1}\text{ brain)} = [(0.693/t_{0.5}) \times \lambda] \times 100$$

where :  $t_{0.5}$  = the half-time of hydrogen clearance, and  $\lambda$  = the partition coefficient for hydrogen between blood and tissue (= 1). Cerebrovascular resistance ( $\text{mmHg.ml}^{-1}\text{.min.100g}$ ) was calculated as : mean arterial blood pressure / CBF. Two further measurements of baseline blood pH, PaO<sub>2</sub> and PaCO<sub>2</sub>, arterial pressure, heart rate and CBF were carried out at 15 min intervals. In none of the groups was there any significant difference (one-way analysis of variance, ANOVA) between any of the three baseline measurements.

### *Cerebrovascular reactivity to hypercapnia.*

Cerebrovascular reactivity to CO<sub>2</sub> was determined 15 minutes following the third and final measurement of baseline CBF, by switching the gas mixture from air to air plus CO<sub>2</sub> (10%). After 5 min exposure to CO<sub>2</sub>, hydrogen was added for a further 5 min. Blood pH, PaO<sub>2</sub> and PaCO<sub>2</sub>, arterial pressure, heart rate and CBF were then determined. Cerebrovascular reactivity to hypercapnia is given as : increase in CBF / increase in PaCO<sub>2</sub> (ml.min<sup>-1</sup>. 100g<sup>-1</sup>.mmHg<sup>-1</sup>). Rats next breathed air for 20 min in order to allow for blood pH, PaO<sub>2</sub>, PaCO<sub>2</sub>, arterial pressure, heart rate, and CBF to return to baseline (data not shown).

### *Lower limit of CBF autoregulation.*

After a further 20 min recovery period, *i.e.* 2.5 hours after the beginning of infusion, hemorrhage (20.8 ± 0.3 ml.kg<sup>-1</sup> in 10 ± 2 min ; in none of the groups was there any significant difference (two-way ANOVA) between volume and time of hemorrhage) was performed by disconnecting the femoral artery cannula from the pressure transducer. Arterial pressure fell rapidly, then recovered within the next 2.5 hours. The rise in blood pressure was similar in all groups (data not shown), suggesting that the neurohormonal compensatory reflexes of the extracranial circulation reacted to hypotensive hemorrhage in a similar fashion in all groups.

One ml of the blood removed during hypotensive hemorrhage was used to measure the plasma concentration of melatonin by radio-immunoassay, using 2-[<sup>125</sup>I]iodomelatonin (IM 215, Amersham, UK) and a melatonin anti-body (19540/16876, Guilford, UK).

During the 2.5 hours' period during blood pressure rose, 10 measurements of blood pH, PaO<sub>2</sub> and PaCO<sub>2</sub>, arterial pressure, heart rate, and CBF were performed. For each treatment group (control, vehicle or melatonin) CBF (absolute values and % baseline), arterial pressure, heart rate, and blood gases values were presented in the form used by Barry *et al.* (1982).

Baseline values as well as values measured during the rise in blood pressure were pooled and grouped by categories over mean arterial blood pressure ranges of 20 mmHg. One-way ANOVA within these different mean arterial blood pressure ranges was performed for each treatment group. The lower limit of CBF autoregulation (mmHg) was defined as the lower limit of the lowest mean arterial blood pressure range in which CBF was not significantly less than baseline CBF. The security margin (%) was defined as :

$$\frac{((\text{baseline mean arterial blood pressure} - \text{lower limit of CBF autoregulation}) \times 100)}{\text{baseline mean arterial blood pressure}}$$
 (Lartaud *et al.*, 1993).

#### *Substances used.*

Melatonin was purchased from Sigma Chemical Company (St Louis, MO, USA) and was dissolved in saline plus absolute ethanol (1%). Doses are expressed in terms of base. Halothane (Halothane Trofield®) was purchased from Bélamont (75000 Paris, France). Oxygen, hydrogen and carbon dioxide were purchased from Air Liquide (54000 Nancy, France). Sodium pentobarbital was purchased from Sanofi Santé Animale (33501 Libourne, France). All solutions were protected from light to prevent the photodecomposition of melatonin.

#### *Statistical analysis.*

Results are expressed as means  $\pm$  SEM. The experimental protocol was designed to use a one-way analysis of variance (ANOVA), with the variable "treatment" (control, vehicle, melatonin at 60, 600 or 60000 ng.kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>). Significant differences between means were determined using the Bonferonni test. One-way ANOVA using the variable "mean arterial blood pressure range" was performed for each treatment group separately for the analysis of values obtained following hypotensive hemorrhage. The probability level chosen was  $P < 0.05$  (NS = not significant).

## RESULTS

Body weight decreased slightly ( $7 \pm 2\%$ ) from day 0 to day 14 ( $516 \pm 16$  versus  $478 \pm 10$ g,  $n = 45$ ,  $P = 0.016$ ); there were no differences amongst the groups at day 14.

### *Plasma concentration of melatonin.*

Plasma melatonin concentration was low in control and vehicle groups (Table 1). The low dose infusion rate ( $60 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ) produced a six-fold increase in plasma melatonin concentration. A ten-fold increase in infusion rate doubled the plasma melatonin concentration; a further hundred-fold increase produced a sixteen-fold increase in plasma melatonin concentration.

### *Baseline arterial blood pressure, heart rate, cerebral blood flow, cerebrovascular resistance, blood gases, and blood pH.*

Arterial blood pressure (systolic, diastolic, mean and pulse), heart rate, pH and blood gases were similar in all groups (Table 1).

CBF and cerebrovascular resistance were similar in vehicle and control groups (Table 1). Melatonin induced a concentration-dependent diminution of CBF associated with an increase in cerebrovascular resistance (Table 1). Cerebrovascular resistance was linearly related to the logarithm of the plasma concentration of melatonin. Parameters of the linear regression were: slope =  $0.16 \pm 0.03$  ( $\text{mmHg}\cdot\text{min}\cdot 100\text{g}\cdot\text{pg}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$ ); intercept =  $1.14 \pm 0.09$  ( $\text{mmHg}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{min}\cdot 100\text{g}$ );  $n = 45$ ;  $r^2 = 0.35$ ;  $P < 0.05$ .

### *Cerebrovascular reactivity to hypercapnia.*

$\text{CO}_2$  inhalation produced a similar increase in  $\text{PaCO}_2$  in all groups (Table 2) and an increase in CBF of + 50 to + 170% (Table 2). Melatonin potentiated the vasodilatory response to hypercapnia in a concentration-dependent fashion as witnessed by the greater increase in



cerebrovascular reactivity during hypercapnia (Table 2). There was a linear relation between the hypercapnia-induced decrease in cerebrovascular resistance (Y) and the logarithm of the melatonin plasma concentration (X). Parameters of the linear regression were : slope =  $0.22 \pm 0.04$  (mmHg.min.100g.pg<sup>-1</sup>), intercept =  $0.14 \pm 0.09$  (mmHg.ml<sup>-1</sup>.min.100g), n = 45, r<sup>2</sup> = 0.48, P < 0.01. Furthermore there was a significant correlation between the hypercapnia-induced fall in cerebrovascular resistance (Y) and baseline cerebrovascular resistance (X) : slope =  $-0.98 \pm 0.11$  (no units), intercept =  $0.82 \pm 0.17$  (mmHg.ml<sup>-1</sup>.min.100g), n = 45, r<sup>2</sup> = 0.68, P < 0.01.

CO<sub>2</sub> inhalation induced a similar degree of bradycardia in all groups, but had no effect on mean or pulse arterial blood pressures (Table 2).

*Lower limit of cerebral blood flow autoregulation and security margin.*

Following hypotensive hemorrhage in control and vehicle groups, CBF remained constant in the 110-129 and 90-109 ranges of mean arterial blood pressure, but significantly decreased in the pressure ranges below 90 mmHg (Table 2). The lower limit of cerebral blood flow autoregulation was, therefore, 90 mmHg in these two groups. The security margin was 17% (Figure 1, Table 3).

In the melatonin treated groups, the lower limit of cerebral blood flow autoregulation was shifted to lower mean arterial blood pressure values (70 or 50 mmHg) and the security margin was improved (from 17% in the vehicle group to 33% and 55% in the melatonin treated groups, Figure 1, Table 3).

Heart rate decreased in the lower blood pressure ranges in all treatment groups except the 600 ng.kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> melatonin group. PaO<sub>2</sub> increased and pH decreased as pressure fell below baseline values (Table 3). PaCO<sub>2</sub> decreased at lower blood pressures in the two higher melatonin dose groups.

## DISCUSSION

The present study shows that melatonin induces concentration-dependent cerebral vasoconstriction. This increase in vasoconstrictor tone amplifies the vasodilatory response to hypercapnia and shifts the lower limit of CBF autoregulation towards lower mean arterial blood pressure values. As melatonin had no effect on baseline mean arterial blood pressure, the decrease in the lower limit leads to an improvement in the cerebrovascular security margin.

Such effects were obtained at physiological concentrations of melatonin. The plasma concentration of melatonin in control and vehicle groups was similar to the day-time value (10 to 50 pg.ml<sup>-1</sup>) (Lewy *et al.*, 1979). The plasma concentration of melatonin following infusion at a rate of 60 ng.kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> was similar to the night-time plasma concentration of melatonin (100 to 300 pg.ml<sup>-1</sup>) (Lewy *et al.*, 1979).

Melatonin increases baseline cerebral vasoconstrictor tone (present results and (Capsoni *et al.*, 1996)). This amplifies the vasodilatory response to hypercapnia and shifts the lower limit of CBF autoregulation. This mechanism could involve large cerebral influx arteries and/or cerebral microvessels. The diameter of the large cerebral influx arteries is as important in the regulation of CBF as is that of the cerebral microvessels (Heistad *et al.*, 1978). It has been shown that melatonin has a direct vasoconstrictor effect on large cerebral influx arteries such as the anterior, middle and posterior cerebral arteries (Geary *et al.*, 1997). However, this is probably not the only factor involved. Indeed, Paulson and Waldemar (1990) proposed that a change in the diameter of the large influx arteries modifies the response of the intracerebral arterioles downstream. Thus, if large cerebral arteries are constricted by melatonin, then small diameters vessels would dilate and their vasodilatory response to a fall in pressure would be lower. This would lead to no change in baseline CBF but a shift in the lower limit of CBF to a higher pressure level. Our results are in contradiction with this hypothesis as we found that

melatonin lowered baseline CBF and shifted the lower limit of CBF autoregulation to a lower pressure level. Furthermore, the cerebrovascular reactivity to CO<sub>2</sub> - which is a measure of the dilatory capacity of cerebral microvessels (Heistad *et al.*, 1980, Wei *et al.*, 1980, Jones *et al.*, 1989) - increased in a concentration-dependent way following melatonin. All these observations lead us to suggest that melatonin constricts both large cerebral influx arteries and cerebral microvessels.

The vasoconstrictor effect of melatonin on large cerebral arteries has been reported to be direct and mediated by an Mel<sub>1</sub> receptor (Geary *et al.*, 1997). Concerning the effect of melatonin on cerebral microvessels, information is lacking. However, the concentration-dependent nature of the cerebrovascular responses observed in the present study suggests that a receptor mechanism is involved. One can postulate that the beneficial effect of melatonin on the lower limit of CBF autoregulation should be antagonized by Mel<sub>1</sub> antagonists (*e.g.*, luzindolol, S20928, or S20929; (Dubocovich *et al.*, 1997, Ting *et al.*, 1997)).

Indirect and nonspecific effects of melatonin cannot be ruled out. Firstly, melatonin-induced vasoconstriction may partially be provoked by a reduction of neuronal metabolism (Stankov *et al.*, 1992) and cerebral glucose uptake (Vitte *et al.*, 1989) in the frontal cortex. Experiments using 2-deoxyglucose or other compounds which lower neuronal metabolism could clarify this matter. Secondly, melatonin-induced vasoconstriction may partially be related to an increase in the intracerebral concentration of serotonin (Miguez *et al.*, 1994). Thirdly, although melatonin induces a decrease in intracerebral concentration of nitric oxide (Guerrero *et al.*, 1996) this is unlikely to be involved, as melatonin potentiates the vasodilatory response to hypercapnia, which is amplified by release of nitric oxide (Iadecola, 1992).

Whatever the mechanism involved in the melatonin-induced vasoconstriction, our results may have clinical relevance in the area of stroke. The most important risk factor for stroke is

age. After age 50, the risk of stroke doubles with each succeeding decade. Ischemic stroke is more common than hemorrhagic stroke in all age groups, but particularly in the elderly group where (in France) it comprises nearly 85% of all strokes (Alperovitch *et al.*, 1986). The increased frequency of ischemic stroke may be related to the fact that, with age, the lower limit of CBF autoregulation is shifted to a higher mean arterial blood pressure value (Wollner *et al.*, 1979, Shuaib, 1992, Lartaud *et al.*, 1993). Furthermore blood pressure lability increases with age although mean arterial blood pressure tends to remain stable. Thus in elderly normotensive subjects the security margin is reduced. This decrease in the security margin, in association with the higher blood pressure lability, increases the risk of periodic cerebral hypoperfusion leading to cerebral ischemia. This could increase the frequency of cerebrovascular disorders in the elderly (Bowen and Davidson, 1986, Shuaib, 1992). Our finding that acute melatonin infusion increases the vasodilatory reserve and improves the security margin suggests that melatonin, even if it induces a slight decrease in baseline CBF, may diminish the age-related increase risk of cerebral ischemia. Along the same lines it is interesting to note that melatonin secretion decreases with age (Sack *et al.*, 1986) and the incidence of stroke shows circadian (Wroe *et al.*, 1992) and circa-annual (Pasqualetti *et al.*, 1990) cycles similar to these reported for plasma levels of melatonin. Finally patients suffering from migraine have lower plasma melatonin concentrations (Brun *et al.*, 1995) and a higher risk of stroke (Tatemachi and Mohr, 1992). Taken together all these observations suggest that melatonin may have a cerebrovascular protective role and that this may involve an improvement in the security margin.

It should be noted that other factors may play a minor role in the response to hypotensive hemorrhage. PaO<sub>2</sub> increased, and pH decreased slightly in all groups. Thus although such changes may modify the lower limit of CBF autoregulation, the effect would be similar in all

groups. PaCO<sub>2</sub> decreased to a greater extent in the lowest blood pressure ranges in the two higher dose groups. Given the linear relationship between CBF and PaCO<sub>2</sub> (Hernandez *et al.*, 1978), the decrease in PaCO<sub>2</sub> does not explain why CBF is maintained until 50 mmHg in the two higher dose groups; but it may explain the fall in CBF at lower blood pressure values in these two groups.

In conclusion, acute melatonin administration increased the cerebrovascular dilatory capacity and thus improved the cerebrovascular security margin. This improvement in security margin suggests that melatonin may play an important role in the regulation of CBF. The relation of this to a possible involvement in hypoperfusion-induced cerebral ischemia in the elderly merits further study.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr J.P. Jeannot, Technologie Servier, 25-27 rue Eugène Vignat - BP 1749, 45007 Orléans, for measuring plasma melatonin concentrations, Dr. R. Peslin and C. Duvivier, INSERM U14, Nancy, Dr. P. Giummelly, Laboratoire de Pharmacologie Cardiovasculaire, Faculté de Pharmacie, Nancy, for help with signal analysis.

This study was funded by grants from the French Education and Research Ministry, Paris, the Regional Development Committee, Metz, the Greater Nancy Urban Council, Nancy, the H. Poincaré University, Nancy, and IRIS, Paris.

Table 1: Baseline arterial blood pressure, heart rate, cerebral blood flow (CBF), cerebrovascular resistance (CVR), blood gases, pH, arterial blood pressure, and plasma melatonin concentration.

	control	vehicle	Melatonin (ng.kg <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )		
			60	600	60000
n	9	9	9	9	9
diastolic arterial blood pressure (mmHg)	89 ± 3	88 ± 2	83 ± 1	89 ± 2	85 ± 2
systolic arterial blood pressure (mmHg)	139 ± 2	138 ± 2	130 ± 2	138 ± 2	133 ± 2
mean arterial blood pressure (mmHg)	109 ± 2	109 ± 2	105 ± 1	110 ± 2	106 ± 2
pulse pressure (mmHg)	50 ± 2	50 ± 2	46 ± 2	48 ± 2	48 ± 2
heart rate (bpm)	393 ± 13	374 ± 8	372 ± 7	385 ± 10	394 ± 8
CBF (ml.min <sup>-1</sup> .100g <sup>-1</sup> )	81 ± 1	80 ± 1	70 ± 1*	64 ± 1*	63 ± 1*
CVR (mmHg.ml <sup>-1</sup> .min.100g)	1.36 ± 0.06	1.36 ± 0.05	1.52 ± 0.03*	1.72 ± 0.05*	1.69 ± 0.07*
PaO <sub>2</sub> (mmHg)	86.1 ± 1.5	83.8 ± 1.4	87.1 ± 1.2	84.1 ± 1.1	86.2 ± 1.3
PaCO <sub>2</sub> (mmHg)	30.8 ± 0.7	30.1 ± 1.5	30.7 ± 0.3	30.7 ± 0.5	29.8 ± 0.3
pH	7.449 ± 0.007	7.460 ± 0.006	7.456 ± 0.006	7.466 ± 0.006	7.446 ± 0.006
plasma concentration of melatonin (pg.ml <sup>-1</sup> )	42 ± 12	51 ± 10	292 ± 37	553 ± 165	8697 ± 2762

n = number of rats.

\* = P < 0.05, one-way ANOVA and Bonferonni test, *versus* vehicle.

Table 2: Arterial blood pressure, heart rate, cerebral blood flow (CBF), cerebrovascular resistance (CVR), blood gases, and pH during CO<sub>2</sub> inhalation.

	control	vehicle	Melatonin (ng.kg <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )		
			60	600	60000
n	9	9	9	9	9
mean arterial pressure (mmHg)	120 ± 7	117 ± 3	110 ± 2	114 ± 5	117 ± 6
pulse pressure (mmHg)	53 ± 4	53 ± 3	48 ± 5	53 ± 2	51 ± 2
heart rate (bpm)	304 ± 20§	313 ± 16§	297 ± 17§	333 ± 14§	335 ± 17§
CBF (ml.min <sup>-1</sup> .100g <sup>-1</sup> )	134.1 ± 8.2§	121.2 ± 7.3§	142.0 ± 7.6§	143.2 ± 3.2§*	168.2 ± 0.9§*
CVR (mmHg.ml <sup>-1</sup> .min.100g)	0.96 ± 0.06§	0.99 ± 0.07§	0.79 ± 0.04§*	0.85 ± 0.03§	0.75 ± 0.05§*
RCO <sub>2</sub> (ml.min <sup>-1</sup> .100g <sup>-1</sup> .mmHg <sup>-1</sup> )	1.9 ± 0.3	1.8 ± 0.3	2.8 ± 0.2*	3.6 ± 0.3*	3.8 ± 0.2*
PaO <sub>2</sub> (mmHg)	112.2 ± 1.9§	108.9 ± 1.7§	107.6 ± 2.3§	109.5 ± 2.4§	112.2 ± 3.0§
PaCO <sub>2</sub> (mmHg)	58.4 ± 2.3§	55.0 ± 1.9§	56.9 ± 1.3§	53.3 ± 1.5§	57.4 ± 2.1§
pH	7.241 ± 0.013§	7.245 ± 0.009§	7.230 ± 0.012§	7.239 ± 0.013§	7.221 ± 0.022§

Reactivity to CO<sub>2</sub> is expressed as RCO<sub>2</sub> = increase in CBF / increase in PaCO<sub>2</sub>.

n = number of rats.

\* = P < 0.05, one-way ANOVA and Bonferonni test, *versus* vehicle.

§ = P < 0.05, one-way ANOVA and Bonferonni test, *versus* baseline in the same group (Table 1).



Table 3: Cerebral blood flow (absolute values, CBF,  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 100\text{g}^{-1}$  and % baseline), mean arterial pressure (MAP, mmHg), heart rate (HR, bpm), blood gases, and pH following hypotensive hemorrhage.

MAP <sub>1</sub>	CBF	% baseline	MAP <sub>2</sub>	HR	PaCO <sub>2</sub>	PaO <sub>2</sub>	pH	N
<b>control (n = 9)</b>		lower limit = 90 mmHg		security margin = 17%				
110-129	78 ± 1	97 ± 1	118 ± 1	413 ± 16	29.9 ± 0.9	92.7 ± 2.7	7.428 ± 0.007	19
90-109	78 ± 1	98 ± 2	102 ± 1	408 ± 12	29.2 ± 1.0	99.5 ± 2.8	7.428 ± 0.007	35
70-89	69 ± 2§	85 ± 2§	83 ± 1	383 ± 9	29.0 ± 0.7	100.9 ± 1.5	7.418 ± 0.010	36
50-69	60 ± 2§	73 ± 2§	60 ± 2	421 ± 9	23.9 ± 0.7§	108.9 ± 3.5	7.397 ± 0.015	12
30-49	41	52	41	253	19.9	119.8	7.512	1
P	<0.001	<0.001		0.022	0.003	0.091	0.101	
<b>vehicle (n = 9)</b>		lower limit = 90 mmHg		security margin = 17%				
110-129	77 ± 1	100 ± 1	115 ± 1	384 ± 11§	30.2 ± 1.9§	80.3 ± 2.0§	7.458 ± 0.007§	21
90-109	78 ± 1	97 ± 2	98 ± 1	430 ± 6	26.5 ± 0.5	95.5 ± 1.5	7.433 ± 0.004	49
70-89	65 ± 2§	81 ± 2§	85 ± 1	428 ± 9	27.8 ± 0.8	98.8 ± 1.5	7.426 ± 0.006	24
50-69	50 ± 2§	63 ± 3§	58 ± 2	399 ± 11	27.3 ± 1.2	104.4 ± 1.1	7.440 ± 0.005	8
30-49	44 ± 2§	55 ± 3§	47 ± 1	393 ± 5	25.6 ± 1.1	102.1 ± 5.6	7.467 ± 0.018§	5
P	<0.001	<0.001		<0.001	0.049	<0.001	<0.001	
<b>melatonin</b>								
<b>60 ng.kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> (n = 9)</b>		lower limit = 70 mmHg		security margin = 33%				
110-129	68 ± 3	100 ± 3	113 ± 2	373 ± 17	30.2 ± 0.4	88.0 ± 2.1	7.444 ± 0.016	5
90-109	69 ± 1	99 ± 5	99 ± 1	416 ± 10	27.9 ± 0.8	89.6 ± 1.3	7.458 ± 0.005	39
70-89	71 ± 2	101 ± 2	81 ± 1	446 ± 5§	25.9 ± 0.6	101.1 ± 1.4§	7.424 ± 0.006§	39
50-69	59 ± 3§	84 ± 4§	60 ± 1	403 ± 6	29.5 ± 0.8	106.9 ± 1.7§	7.406 ± 0.009§	17
30-49	47 ± 2§	64 ± 2§	49 ± 1	404 ± 6	28.0 ± 2.8	107.1 ± 1.4§	7.392 ± 0.007§	3
P	<0.001	<0.001		<0.001	0.099	<0.001	<0.001	

<b>600 ng.kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> (n = 9) lower limit = 50 mmHg</b>				<b>security margin = 55%</b>				
110-129	65 ± 2	100 ± 1	118 ± 1	384 ± 12§	30.6 ± 0.6	82.7 ± 1.7§	7.467 ± 0.009	13
90-109	62 ± 1	96 ± 2	99 ± 1	442 ± 10	26.2 ± 0.9	94.9 ± 1.7	7.431 ± 0.012	35
70-89	60 ± 2	92 ± 4	79 ± 1	448 ± 11	25.0 ± 1.2	105.5 ± 1.8§	7.409 ± 0.009	20
50-69	62 ± 2	100 ± 4	63 ± 1	437 ± 10	24.6 ± 1.4	110.3 ± 1.5§	7.400 ± 0.010	22
30-49	44-37§	66-55§	50-45	547-488§	21.1-13.0§	95.6-119.3§	7.439-7.269	2
P	0.048	0.014		0.007	0.002	<0.001	<0.001	
<b>60000 ng.kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> (n = 9) lower limit = 50 mmHg</b>				<b>security margin = 55%</b>				
110-129	63 ± 2	100 ± 1	118 ± 3	397 ± 15	30.2 ± 0.5	85.7 ± 0.5	7.455 ± 0.012	8
90-109	61 ± 1	97 ± 2	99 ± 1	421 ± 11	26.5 ± 1.0	93.9 ± 2.8	7.413 ± 0.012	25
70-89	63 ± 1	98 ± 2	82 ± 1	406 ± 12	21.5 ± 0.9§	106.0 ± 2.1§	7.405 ± 0.010	23
50-69	68 ± 2	98 ± 2	62 ± 1	459 ± 10	22.6 ± 1.1§	101.2 ± 1.8	7.401 ± 0.010	19
30-49	50 ± 4§	81 ± 5§	39 ± 2	396 ± 42	15.6 ± 1.1§	119.3 ± 5.3§	7.367 ± 0.040	7
P	0.001	0.003		0.015	<0.001	<0.001	0.007	

MAP<sub>1</sub> = MAP ranges (mmHg).

MAP<sub>2</sub> = average MAP values (mmHg) measured in the corresponding MAP range.

n = number of rats.

N = total number of CBF values measured inside the treatment group (control, vehicle or melatonin groups) at each MAP range.

P = probability value following one-way ANOVA (variable = MAP range).

§ = P < 0.05, one-way ANOVA and Bonferonni test, *versus* value in baseline MAP range (*i.e.*, 90-109 mmHg for all groups).

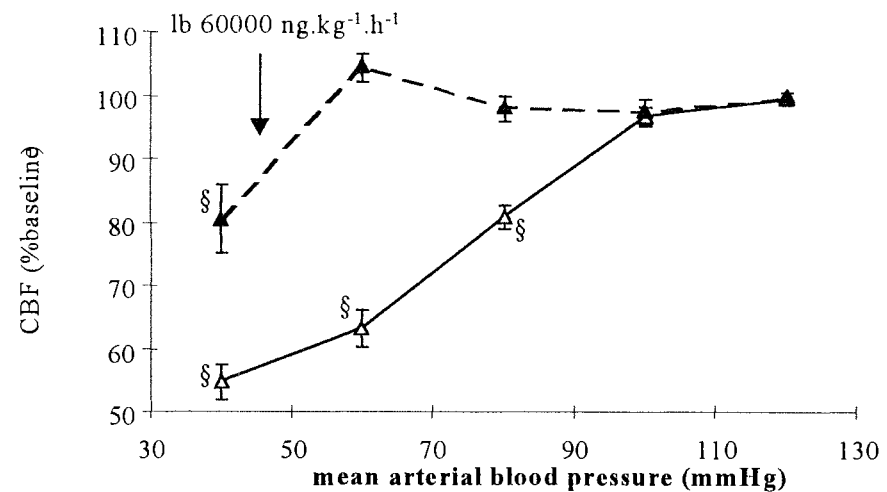
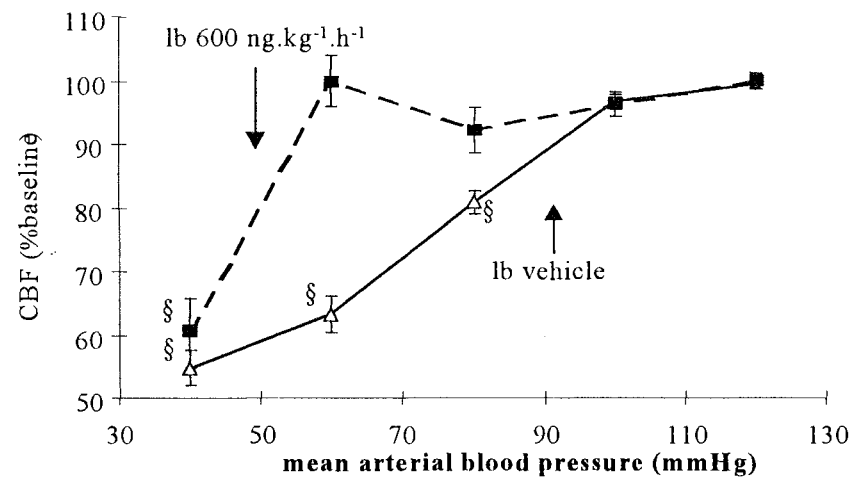
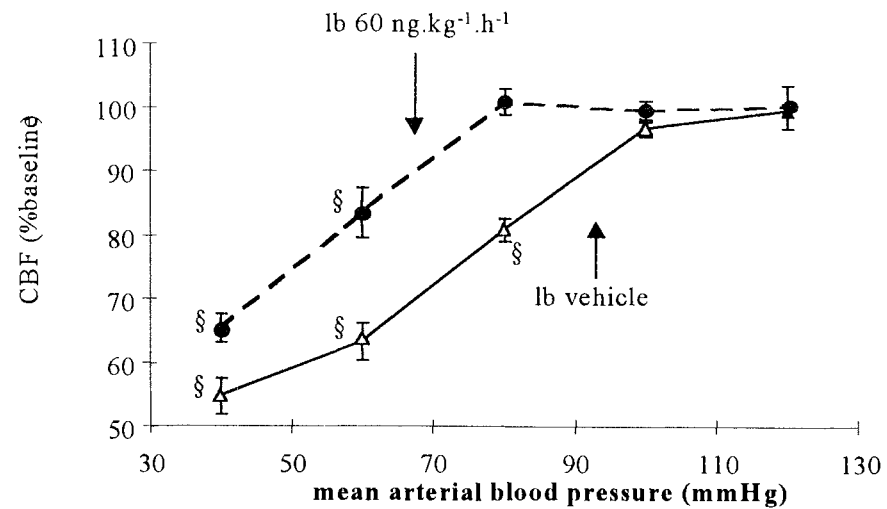
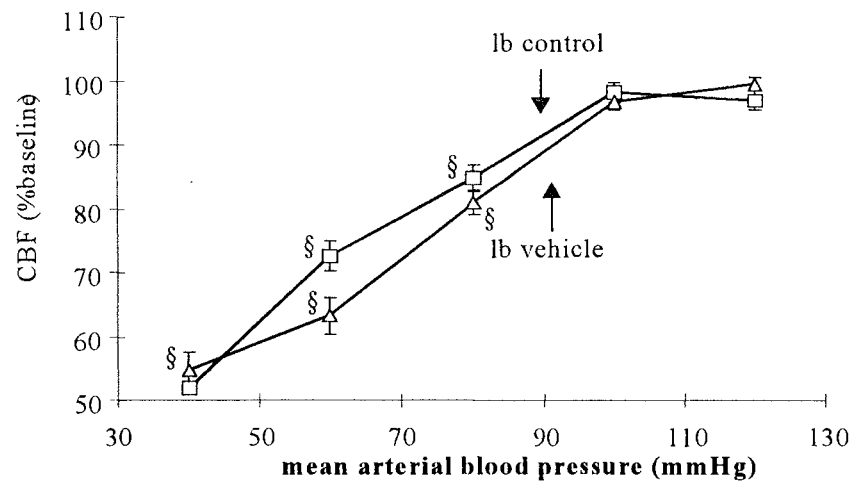


Figure 1: Lower limit (ll) of CBF autoregulation in vehicle (open triangles) and control (open squares) groups (upper left), vehicle and low dose melatonin ( $60 \text{ ng.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ; full circles) groups (upper right), vehicle and medium dose melatonin ( $600 \text{ ng.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ; full squares) groups (lower left), vehicle and high dose melatonin ( $60000 \text{ ng.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ; full triangles) groups (lower right).

CBF values (% baseline,  $\pm$  SEM) are grouped by mean arterial blood pressure ranges of 20 mmHg (30-49; 50-69; 70-89; 90-109; 110-130 mmHg) and graphically represented in the center of each range (according to Barry *et al* (1982) and Lartaud *et al* (1993)). For statistical significance see Table 3.

**2. La mélatonine augmente le tonus des artérioles cérébrales et diminue la limite basse d'autorégulation du débit sanguin cérébral**

**Melatonin increases pial artery tone and the lower limit of CBF  
autoregulation**

*Fund. Clin. Pharmacol. (soumis)*

Olivier Régrigny, Philippe Delagrange<sup>1</sup>, Elizabeth Scalbert<sup>1</sup>, Jeffrey Atkinson & Jean-Marc Chillon.

Laboratoire de Pharmacologie Cardiovasculaire (EA 3116), Faculté de Pharmacie de l'Université Henri Poincaré-Nancy I, 5 rue Albert Lebrun, 54000 Nancy and <sup>1</sup> IRIS, 6 place des Pléiades, 92415 Courbevoie Cedex, France

## RESUME

Les résultats de la première étude ont montré que la mélatonine diminue la limite basse de l'autorégulation du débit sanguin cérébral sans modifier la pression artérielle systémique moyenne. Il en résulte une augmentation de la marge de sécurité du débit sanguin cérébral. Nos avons émis l'hypothèse que ce déplacement de la limite basse était consécutif à une constriction des artères et artérioles cérébrales de résistances. Il a déjà été démontré que la mélatonine constrict des artères cérébrales de large diamètre telles que l'artère cérébrale moyenne (Geary et coll., 1997). Dans cette deuxième étude, nous avons examiné l'effet d'une perfusion de mélatonine sur le diamètre des petites artérioles cérébrales de résistance. Pour ce faire, nous avons réalisé la même expérience que précédemment mais en observant cette fois ci les artères cérébrales par l'intermédiaire d'une fenêtre crânienne.

Nous avons donc étudié l'effet d'une perfusion de mélatonine sur le diamètre des artérioles cérébrales, ainsi que l'effet du luzindole (un antagoniste de la mélatonine) sur ces changements de diamètre. Puis nous avons observé les changements de diamètre des artérioles cérébrales, de rats soumis ou non à une perfusion de mélatonine, suite à une hémorragie hypotensive.

Les résultats obtenus ont montré que :

1. La mélatonine constrict le système cérébro-vasculaire. Cet effet constricteur de la mélatonine est contrecarré partiellement par une vasodilatation compensatrice. Cette dilatation compensatrice est due aux mécanismes de l'autorégulation. En effet, la mélatonine constrict les artères cérébrales d'influx. Selon les caractéristiques de l'autorégulation développées dans l'introduction, une telle vasoconstriction des artères

cérébrales d'influx entraîne une baisse du DSC au niveau des artères de plus petit diamètre. En conséquence, celles-ci vont dilater afin de maintenir le DSC constant. Donc, au niveau des artérioles cérébrales que nous observons par l'intermédiaire de notre préparation, la mélatonine provoque directement une vasoconstriction et indirectement une vasodilatation suite à la vasoconstriction des artères de plus gros diamètres. La résultante de ces deux effets contraires au niveau des artérioles cérébrales reste une diminution de diamètre provoqué par la mélatonine. La vasodilatation indirecte est mise en évidence lors de la superfusion de luzindole dans la fenêtre crânienne simultanément à l'administration *i.v.* de mélatonine. Dans ces conditions, le luzindole bloque les effets vasoconstricteurs directs de la mélatonine sur les artérioles cérébrales, mais pas les vasodilatations indirectes.

2. L'augmentation des capacités d'autorégulation du débit sanguin cérébral suite à une perfusion de mélatonine, que nous avons déjà observé et que nous avons retrouvé ici, est bien due à une augmentation de la réserve vasodilatatrice du système cérébro-vasculaire, elle-même consécutive à la constriction du système cérébro-vasculaire par la mélatonine.

Ces résultats posent la question de savoir si l'effet vasoconstricteur de la mélatonine est médié par des récepteurs ou bien par d'autres mécanismes.

**ABSTRACT**

We studied a possible link between the melatonin-induced increase in cerebral arteriolar tone and the melatonin-induced shift in cerebral blood flow (CBF) autoregulation to a lower pressure level.

Using the cranial window technique, we showed that intravenous infusion of melatonin constricted pial arterioles ( $-5.1 \pm 1.3$  and  $-5.4 \pm 0.7$   $\mu\text{m}$  at 60 and 600  $\text{ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , respectively). Perivascular application of luzindole alone had no significant effect but abolished vasoconstriction induced by melatonin ( $-0.5 \pm 0.7$  and  $+3.0 \pm 1.2$   $\mu\text{m}$  at 60 and 600  $\text{ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , respectively).

Using a combination of the hydrogen clearance and cranial window techniques, we showed that intravenous infusion of melatonin had no effect on baseline CBF but shifted the lower limit (LL) of CBF (CBF) autoregulation (stepwise hypotension) to a lower pressure ( $90 \pm 2$  mmHg in vehicle vs  $71 \pm 3$  and  $51 \pm 5$  mmHg, both  $P < 0.05$ , after melatonin at 60 and 600  $\text{ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , respectively). The high i.v. infusion rate of melatonin increased the arteriolar dilatory response to hypotension. As melatonin had no effect on systemic blood pressure yet shifted the LL of CBF autoregulation, the security margin increased ( $28 \pm 5$  in controls vs  $38 \pm 3$  and  $55 \pm 5\%$  after melatonin at 60 and 600  $\text{ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  respectively, both  $P < 0.05$ ).

Our results suggest that melatonin increases cerebral arteriolar smooth muscle tone so augmenting arteriolar dilations capacity leading to a melatonin-induced shift in the LL of CBF autoregulation to a lower systemic pressure level.

**KEYWORDS:** CBF; autoregulation; cranial window; hydrogen clearance



## 1. Introduction

We recently reported that perivascular application of melatonin dose-dependently constricted cerebral arterioles *via* stimulation of MT<sub>1</sub> and/or MT<sub>2</sub> melatonin receptors followed by blockade of calcium-activated large conductance potassium channels (BK<sub>Ca</sub>) (Régrigny *et al.*, 1999). We had previously reported that i.v. infusion of melatonin shifts the lower limit (LL) of cerebral blood flow (CBF) autoregulation to a lower systemic pressure level (Régrigny *et al.*, 1998). In the present paper we pursue our theory that the shift in the LL of CBF autoregulation is linked to an increase in arteriolar tone produced by melatonin.

Using an open skull preparation in anesthetized rats we investigated the effects of an i.v. infusion of melatonin on arteriolar diameter and the LL of CBF autoregulation (stepwise, hypotensive hemorrhage).

## 2. Methods

### 2.1. Animals

Adult male Wistar rats (Ico: WI, IOPS AF/Han; Iffa-Credo, l'Arbresle, France) were allowed free access to food and water, housed at 24°C and exposed to 12 hours of light (lights on 0600h and off 1800h). Experiments were performed in accordance with the guidelines of the French Ministry of Agriculture (permits 54-4 and 03575).

Animals were anesthetized with sodium pentobarbital (60 mg.kg<sup>-1</sup>, i.p.) at 0900h. A polyethylene cannula (Merck Biotrol, Chennevieres, France) was introduced into the left femoral artery, and connected to a low volume, strain-gauge transducer (Baxter, Bentley Laboratories, Europe) for measurement of blood pressure and heart rate. A second cannula was introduced into the right femoral artery to withdraw blood for measurement of arterial

blood gases and induction of hypotension. Silicone catheters (Sigma Medical, Nanterre, France) were introduced into each femoral vein. In order to maintain a satisfactory level of anesthesia throughout the experiments, the left catheter was connected to a pump (Bioblock Scientific, Paris, France) and sodium pentobarbital ( $0.25 \text{ ml h}^{-1}$ ;  $20 \text{ mg kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) infused continuously. After surgery was completed, paralysis of skeletal muscle was obtained with gallamine triethiodide ( $20 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ i.v.}$ ) repeated every hour (Régrigny *et al.*, 1999) and animals were mechanically ventilated with room air ( $60 \text{ strokes min}^{-1}$ ;  $10 \text{ ml kg}^{-1}$ ). Since animals were paralyzed, the depth of anesthesia was evaluated by applying pressure to the tail and confirming the lack of change in heart rate or blood pressure. Rectal temperature was maintained at  $37^\circ\text{C}$  with a heating pad. At the end of the experiment, animals were killed with a sodium pentobarbital overdose ( $200 \text{ mg.kg}^{-1}$ , i.v.).

## 2.2. Arteriolar diameter

We measured diameter in first order arterioles of the cerebrum (Harper and Bohlen, 1984) through an open skull preparation (Chillon *et al.*, 1996, 1999). The head was placed in an adjustable head holder and a 1 cm incision made in the skin to expose the skull. Ports were placed for inflow and outflow of artificial cerebrospinal fluid (aCSF, pH = 7.3, mmol/L: KCl, 3.0;  $\text{MgCl}_2$ , 0.6;  $\text{CaCl}_2$ , 1.5; NaCl, 131.9;  $\text{NaHCO}_3$ , 24.6; urea, 6.7; and glucose, 3.7 (Chillon *et al.*, 1996, 1999)). Craniotomy was performed over the left parietal cortex, and the dura was incised to expose cerebral vessels which were continuously suffused with aCSF, warmed to  $37^\circ \text{C}$  and equilibrated with 5%  $\text{CO}_2$ -95%  $\text{N}_2$ .

Arteriolar diameter was measured using a microscope (Stemi 200-C, Carl Zeiss Jena GMBH, Jena, Germany) connected to a closed-circuit video system with a final magnification

of x400, using image analysis software (Saisam<sup>®</sup>, Microvision Instruments, Evry, France). The precision of this system is 0.5  $\mu\text{m}$ .

### 2.3. Cerebral blood flow

The methods used have been described elsewhere (Haining *et al.*, 1968 ; Lartaud *et al.*, 1993). Briefly, cortical electrodes (a platinum anode: diameter = 150  $\mu\text{m}$  at coordinates A = - 2 mm, L = + 2 mm, and a silver cathode: diameter = 200  $\mu\text{m}$  at coordinates A = - 4 mm, L = + 2 mm from the bregma) were implanted in the right parietal cortex. The electrodes were connected to an amperometric circuit which applied +200 mV to the platinum, cortical anode for measurement of the hydrogen oxidation current following inhalation of hydrogen (5%, v/v in air).

At saturation, a blood sample (50  $\mu\text{l}$ ) was taken *via* the femoral artery cannula for the determination of pH, PaO<sub>2</sub> (mmHg) and PaCO<sub>2</sub> (mmHg; 170 pH/Blood Gas Analyzer, Corning Medical, Medfield, USA). The gas mixture was changed to air alone and the elimination of hydrogen from the cortex was evaluated. Hydrogen clearance data were analyzed according to the initial slope technique (Aukland *et al.*, 1964) and CBF calculated as:

$$\text{CBF (ml.min}^{-1}\text{.100g}^{-1}\text{ brain)} = [(0.693/t_{0.5}) \times \lambda] \times 100$$

where :  $t_{0.5}$  = the half-time of hydrogen clearance, and  $\lambda$  = the partition coefficient of hydrogen between blood and tissue (= 1).

Each CBF measurement was followed by a 10 minutes' interval in order to ensure that the cortex was fully desaturated.

#### 2.4. Experimental protocols

Thirty minutes after surgery, baseline arteriolar diameter, CBF, heart rate, arterial blood pressure, pH, PaO<sub>2</sub> and PaCO<sub>2</sub> were measured. Luzindole (10<sup>-6</sup> M) was superfused for 20 minutes and measurements repeated. Luzindole was then washed out and the right femoral vein cannula connected to a pump (Bioblock Scientific, Paris, France) for infusion of melatonin (60 or 600 ng.kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) or vehicle (0.15 M NaCl + 1% v/v ethanol) (n= 5 per group, body weight = 524 ± 17g). Sixty minutes later, when the plasma concentration of melatonin was stable (Régrigny *et al.*, 1998), measurements were repeated. Luzindole (10<sup>-6</sup> M) was again superfused (20 min) and measurements repeated.

In a second experiment, following baseline measurements, intravenous infusion of melatonin (60 or 600 ng.kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) or vehicle was begun (n = 7 per group, body weight = 530 ± 19g). Sixty minutes later, measurements were repeated and stepwise hypotension (10 mmHg per step) induced by withdrawal of blood via the femoral arterial cannula. At each pressure step, measurements were repeated. Ventilation was adjusted as a function of blood gas values such that pH, PaO<sub>2</sub> and PaCO<sub>2</sub> were maintained within the physiological range.

#### 2.5. Calculations

Effect of melatonin on cerebral arteriolar diameter is reported as change from baseline (i.e., values obtained before melatonin or vehicle administration). Cerebral arteriolar diameter during pressure steps are reported as absolute values or as change from perfusion values (i.e., values obtained during melatonin or vehicle administration). The lower limit of CBF autoregulation was calculated for each animal using the least squares method previously described by Schmidt *et al* (1990). The security margin (%) was defined as:

(baseline mean arterial blood pressure - lower limit of CBF autoregulation) x 100) / (baseline mean arterial blood pressure) (Lartaud *et al.*, 1993).

## 2.6. Substances used

Melatonin, luzindole and gallamine triethiodide were purchased from Sigma Chemical Company (St Louis, MO, USA). Melatonin was dissolved in saline (0.15 M NaCl) plus absolute ethanol (1% v/v). All solutions were protected from light. Doses are expressed as base. Nitrogen was purchased from Air Liquide (Nancy, France). Sodium pentobarbital was purchased from Sanofi Santé Animale (Libourne, France). KCl, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, NaCl, NaHCO<sub>3</sub>, urea and glucose from Merck KGaA (Darmstadt, Germany).

## 2.7. Statistical analysis

Results are expressed as means  $\pm$  s.e.mean. Significant differences between means were determined with the paired or unpaired t-test and the Bonferroni correction for multiple comparisons with a single control after ANOVA using SPSS SYS STAT (v 8.0). The probability level chosen was  $P \leq 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Effect of local application of luzindole on vasoconstriction induced by melatonin (*i.v.*)

Melatonin constricted cerebral arterioles but its effect was not related to dose (table 1 and figure 1). Luzindole alone had no effect on arteriolar diameter but blocked vasoconstriction induced by the low and high doses of melatonin (figure 1). Luzindole had no effect on arterial blood pressure, heart rate or blood gases (data not shown).

### 3.2. Effect of melatonin (*i.v.*) on changes in CBF and arteriolar diameter induced by stepwise hypotension

Melatonin reduced cerebral arteriolar diameter but had no effect on other parameters (table 1).

Melatonin shifted the lower limit of CBF autoregulation to a lower blood pressure value in a dose-dependent fashion (table 1). As melatonin had no effect on mean arterial blood pressure, the CBF security margin significantly increased (table 1).

Cerebral arterioles dilated as mean arterial blood pressure decreased; at any given pressure level, dilatation was greater following the high dose of melatonin (figure 2). However internal diameters were not significantly different between the different groups for all the pressure steps (figure 3).

## 4. Discussion

The present study shows that *i.v.* administration of a low dose of melatonin ( $60 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) constricted cerebral arterioles with no reduction in CBF, and shifted the lower limit of CBF autoregulation to a lower level of systemic mean arterial pressure. A still greater shift in CBF autoregulation but no further increase in arteriolar constriction was obtained with a higher dose of melatonin ( $600 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ). In parallel, arteriolar dilatation induced by hypotensive hemorrhage was greater in rats treated with the high dose of melatonin.

### 4.1. Effect of melatonin on cerebral arterioles

We have already reported (Régrigny *et al.*, 1999), that local application of melatonin constricts cerebral arterioles in a dose-dependent manner following stimulation of  $\text{MT}_1$  and/or  $\text{MT}_2$  receptors. In the present study, vasoconstriction induced by *i.v.* infusion of melatonin was

not dose-dependent and four hypotheses can be put forward to explain this discrepancy. Firstly, the dose of  $60 \text{ ng.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$  may already be a maximal effective concentration for cerebral arteriolar constriction. Secondly, *i.v.* melatonin may induce constriction by a mechanism which is not mediated by vascular  $\text{MT}_1$  and/or  $\text{MT}_2$  receptors, involving for example neuronal metabolism (Stankov *et al.*, 1992) or glucose uptake (Vitte *et al.*, 1989). However, local application of the  $\text{MT}_1$  and/or  $\text{MT}_2$  melatonergic receptor antagonist, luzindole, blocked vasoconstriction induced by *i.v.* infusion of melatonin. Thirdly, different vascular receptors may have different affinities for melatonin, an  $\text{MT}_1$  receptor inducing vasoconstriction at nanomolar concentrations and an  $\text{MT}_2$  receptor inducing relaxation at higher concentrations (Doolen *et al.*, 1998). According to this hypothesis the overall effect of the high dose of melatonin may result from the interaction between contractile and dilator responses. However, in our previous experiment we did not observe vasodilatation after superfusion of melatonin at micromolar concentrations (Régrigny *et al.*, 1999). Fourthly, melatonin constricts large diameter cerebral arteries *in vitro* (Geary *et al.*, 1997). According to the corollary of the Paulson and Waldemar (1990) hypothesis, such a constriction of large diameter cerebral arteries may lead to a compensatory autoregulatory dilatation of smaller arterioles down stream in order to maintain CBF constant. Thus, we propose the following working hypothesis: after intravenous infusion of melatonin direct constriction of cerebral arterioles is compensated by indirect vasodilatation following constriction of large diameter cerebral arteries. This hypothesis would explain results obtained with luzindole: local application (directly in the cranial window mixed to aCSF) abolishing a direct vasoconstrictor effect of melatonin (*i.v.*) on small diameter cerebral arterioles and so revealing the indirect

vasodilator effect of melatonin on small diameter cerebral arterioles subsequent to vasoconstriction of large diameter upstream cerebral arteries.

#### 4.2. *Effect of melatonin on baseline CBF*

Although melatonin vasoconstricted cerebral arterioles, it had no effect on baseline CBF. This result does not confirm previous findings showing that i.v. melatonin lowers CBF in unanesthetized rats (Régrigny *et al.*, 1998 ; Capsoni *et al.*, 1996). This may be explained by the fact that in unanesthetized rats metabolic control of CBF is more important and that melatonin, *via* its effects on neuronal metabolism (Stankov *et al.*, 1992) or glucose uptake (Vitte *et al.*, 1989), leads to a decrease in recruitment of capillaries (Klein *et al.*, 1986). Such a mechanism may be less important in anesthetized rats in which neuronal metabolism and glucose uptake are greatly diminished by anesthesia (Van Aken and Van Hemelrijck, 1991). This may also explain the low value of CBF that we ( $50 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ) and others ( $60 \pm 7$  (Magata *et al.*, 1995);  $41 \pm 8 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 100\text{g}^{-1}$  (Matsumoto *et al.*, 1975)) observe in anesthetized rats. The technique used here (hydrogen clearance plus cranial window) is not responsible of the low CBF values as others have reported higher CBF values using such techniques in anesthetized rats and cats (Auer and Mokry, 1986 ; Auer and Ishiyama, 1986). This hypothesis would suggest that the decrease in CBF observed after melatonin in unanesthetized rats is due to a decrease in neuronal metabolism and glucose intake rather than to arteriolar constriction and that the minor changes in diameter observed in the present experiment do not reduce flow. However, using the Poiseuille equation and presuming that all the others parameters remain constant, we can calculate that a reduction of the internal diameter of 13% should induce a reduction of more than 40% in flow.



#### *4.3. Effect of melatonin on the lower limit of CBF autoregulation and hypotension-induced dilatation of cerebral arterioles*

Melatonin shifted the lower limit of CBF autoregulation to a lower value of systemic mean arterial pressure in anesthetized rats, as it did in unanesthetized rats (Régrigny *et al.*, 1998). Our working hypothesis was that the shift in the lower limit of CBF autoregulation observed in unanesthetized rats stems from an increase in the arteriolar dilatory response to a fall in blood pressure. This is in part supported by the concomitance of the shift in the lower limit of CBF autoregulation and the increase in the amplitude of hypotension-induced arteriolar dilatation in anesthetized rats treated with the high dose of melatonin. However, it is not confirmed by the fact that melatonin-induced constriction in anesthetized rats was not related to dose, whereas the shift in the lower limit of CBF autoregulation was dose-dependent. It is also not confirmed by the fact that cerebral arteriolar diameters are not significantly different between the 3 groups used in this study for all the pressure steps. Melatonin-induced vasoconstriction of larger cerebral arteries or non-vascular effects of melatonin may contribute to the shift of the lower limit of CBF autoregulation.

#### **5. Conclusion and perspectives**

As melatonin did not increase systemic mean arterial blood pressure, the security margin, *i.e.*, the degree to which the blood pressure decreases before falling below the lower limit of CBF autoregulation, was increased. This would protect the brain against hypotension-induced ischemia and may be an important element of the endogenous circadian control of the lower limit of CBF autoregulation. Plasma melatonin levels show a circadian rhythm. In man, blood pressure shows a circadian rhythm and during the inactive night period, when blood pressure is low, the high levels of melatonin may shift the lower limit of CBF autoregulation to a lower

value of systemic mean arterial pressure and so protect the brain from hypotension-induced ischemia.

Following on from this, in the elderly in which melatonin rhythms are less marked (Touitou *et al.*, 1981) this endogenous system may be less efficient. This merits further investigation as periodic hypotension-induced ischemia may play an important role in the etiology of vascular dementia (Skoog, 1997).

## ACKNOWLEDGMENTS

This study was funded by grants from the French Ministry of Education, Research and Technology (EA3116, Paris, France), the Regional Development Committee (Metz, France), the Greater Nancy Urban Council (Nancy, France), the Scientific Research Council of Henri Poincaré University (Nancy, France) and the Institut de Recherches Internationales Servier (Courbevoie, France).

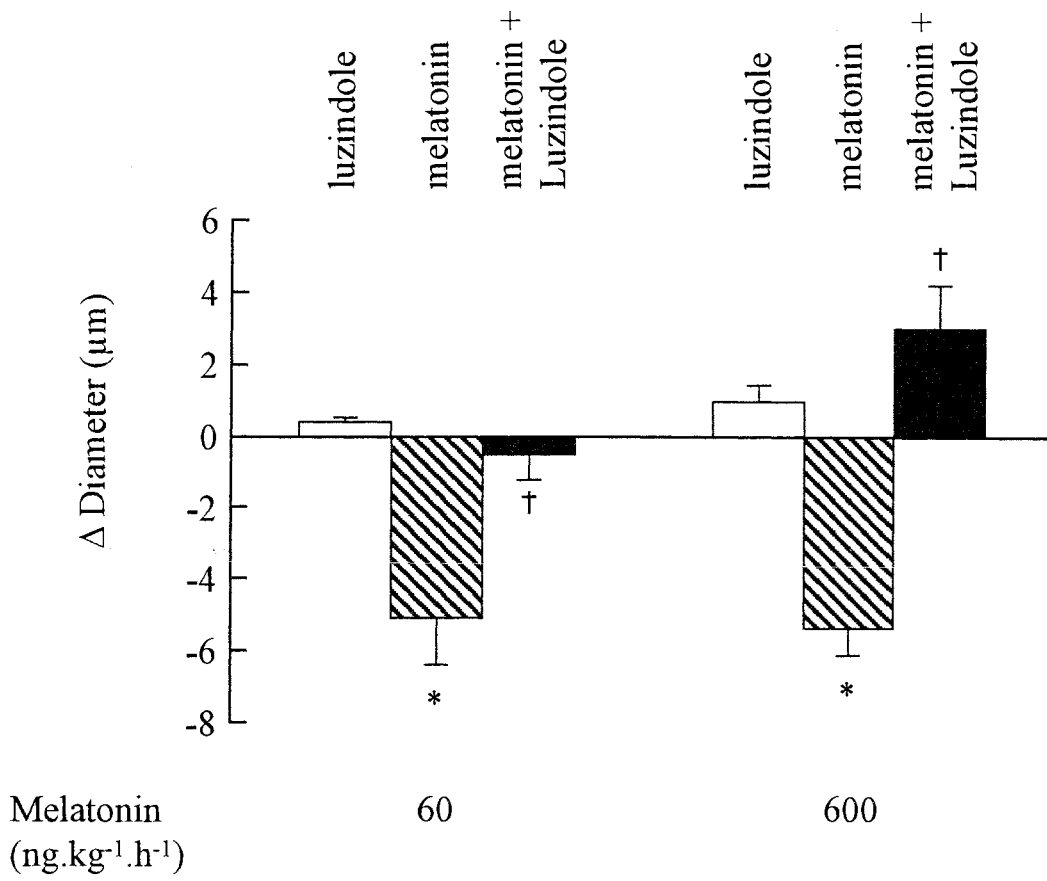
**Table 1:** Effect of melatonin (i.v.) on systemic arterial blood pressure, heart rate, blood gases, pH, cerebral blood flow (CBF), the lower limit of cerebral blood flow autoregulation (LLCBF), the security margin (SM), cerebral arteriolar diameter (ID) and changes in arteriolar diameter ( $\Delta$ ID) in anesthetized rats.

	vehicle		Melatonin (ng.kg <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )			
	baseline	infusion	60		600	
			baseline	infusion	baseline	infusion
N	7		6		6	
Body weight	530 ± 13		566 ± 16		494 ± 12	
Arterial blood pressure (mmHg)						
systolic	144 ± 3	140 ± 3	141 ± 2	138 ± 3	146 ± 2	139 ± 2
diastolic	107 ± 4	106 ± 3	101 ± 3	101 ± 2	112 ± 2	106 ± 2
mean	122 ± 3	119 ± 3	117 ± 3	116 ± 3	123 ± 2	117 ± 2
pulse	37 ± 2	34 ± 2	40 ± 2	37 ± 2	34 ± 3	33 ± 1
Heart rate (bpm)	363 ± 11	363 ± 9	339 ± 21	340 ± 19	363 ± 16	370 ± 11
pH	7.39 ± .0	7.40 ± .01	7.41 ± .01	7.39 ± .01	7.40 ± .02	7.39 ± .02
PaCO <sub>2</sub> (mmHg)	35 ± 2	36 ± 1	34 ± 1	36 ± 1	35 ± 1	37 ± 1
PaO <sub>2</sub> (mmHg)	88 ± 3	85 ± 2	88 ± 2	88 ± 1	87 ± 3	84 ± 6
CBF (ml.min <sup>-1</sup> .100g <sup>-1</sup> )	50 ± 2	51 ± 2	51 ± 2	51 ± 2	52 ± 3	49 ± 3
LLCBF (mmHg)	-	90 ± 2	-	71 ± 3	-	51 ± 5
SM (%)	-	28 ± 3	-	38 ± 3	-	55 ± 5
ID (μm)	40 ± 3	41 ± 3	41 ± 3	35 ± 3*	38 ± 6	33 ± 5*
$\Delta$ ID (μm)	-	0.7 ± 1.0	-	-6.7 ± 1.1†	-	-4.9 ± 1.1†

n = number of rats.

\* =  $P \leq 0.05$ , vs baseline, paired t-test with Bonferroni correction after ANOVA

† =  $P \leq 0.05$ , vs vehicle, unpaired t-test with Bonferroni correction after ANOVA.



**Figure 1:** Changes in arteriolar diameter induced by luzindole (superfusion,  $10^{-6}$  M; open bar), melatonin (i.v., cross-hatched bar) and melatonin plus luzindole (full bar) ( $n = 5$  per group).

\*  $P \leq 0.05$ , *versus* baseline, paired t-test with Bonferroni correction after ANOVA.

†  $P \leq 0.05$ , *versus* melatonin, unpaired t-test with Bonferroni correction after ANOVA.

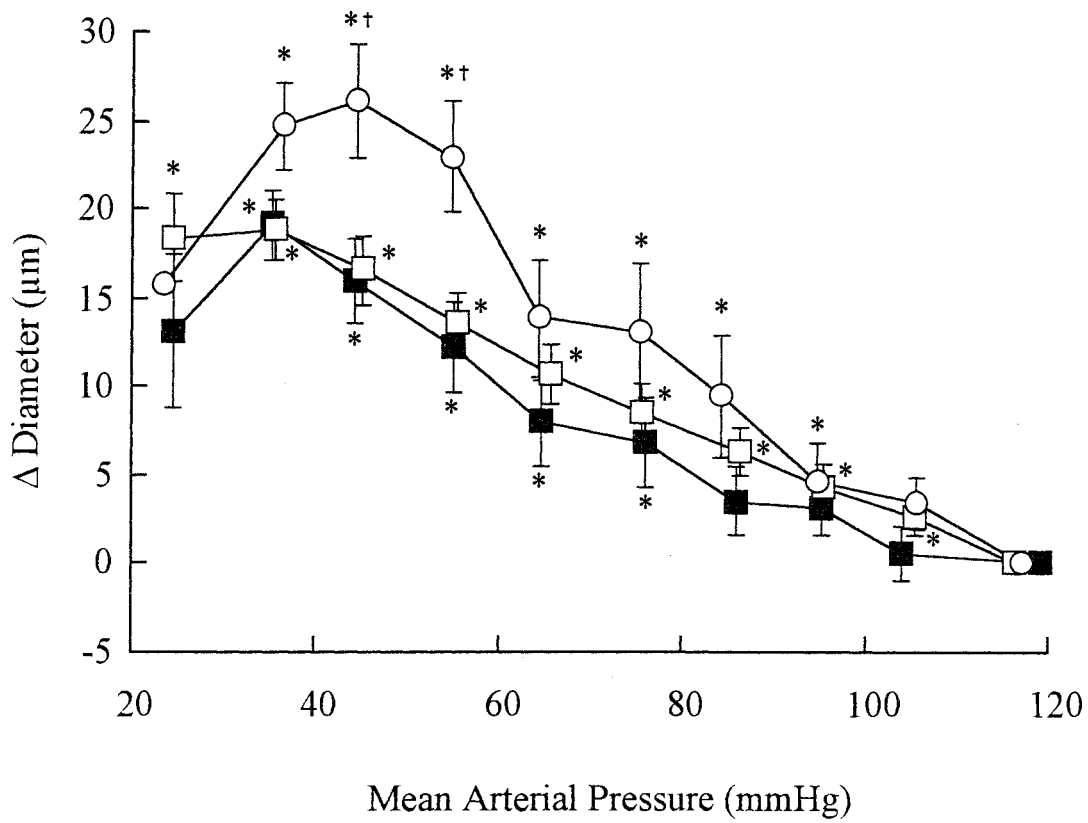


Figure 2: Effect of melatonin (vehicle: full squares,  $n = 7$ ; melatonin 60; open squares,  $n = 7$ ; melatonin 600  $\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ , open circles,  $n = 7$ ) on changes in cerebral arteriolar diameter (from baseline) produced by hypotensive hemorrhage.

\* =  $P \leq 0.05$ , versus baseline, paired t-test with Bonferroni correction after ANOVA.

† =  $P \leq 0.05$ , versus vehicle, unpaired t-test with Bonferroni correction after ANOVA.

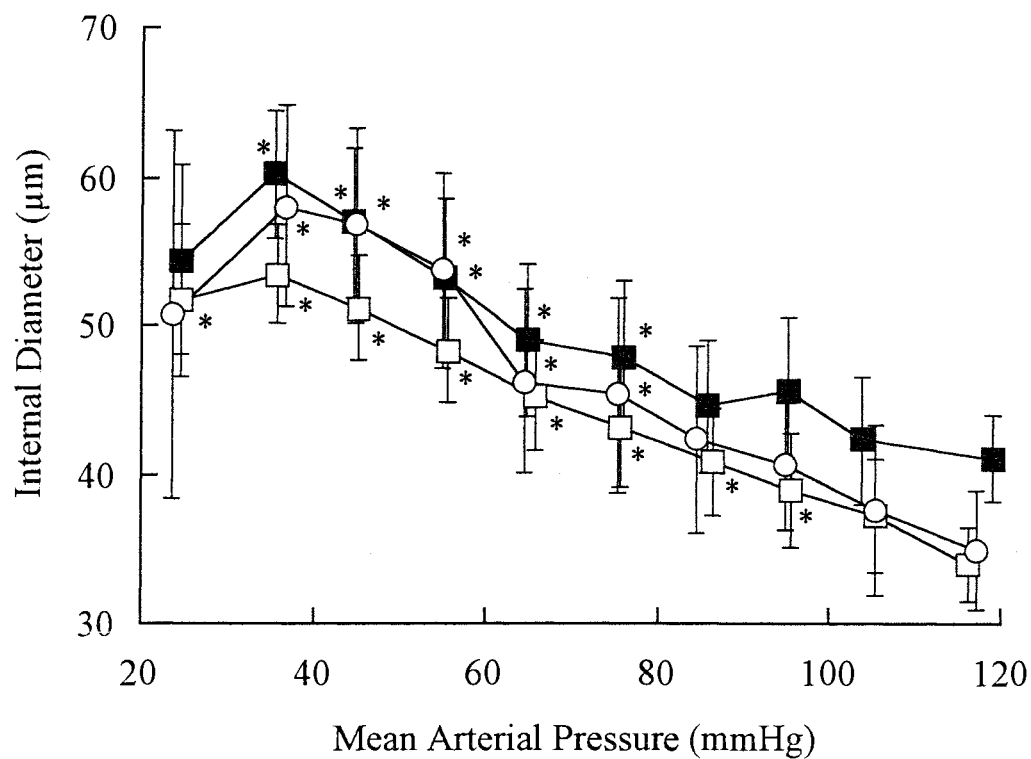


Figure 3: Effect of melatonin (vehicle: full squares,  $n = 7$ ; melatonin 60; open squares,  $n = 7$ ; melatonin 600  $\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ , open circles,  $n = 7$ ) on cerebral arteriolar diameter during hypotensive hemorrhage.

\* =  $P \leq 0.05$ , versus baseline, paired t-test with Bonferroni correction after ANOVA.

### **3. Effets de la mélatonine sur le diamètre des artères cérébrales *in vivo***

#### **Effects of melatonin on rat pial arteriolar diameter *in vivo***

*Br. J. Pharmacol.* 127 : 1666-1670, 1999.

Olivier Régrigny, Philippe Delagrange<sup>1</sup>, Elizabeth Scalbert<sup>1</sup>, Isabelle Lartaud-Idjouadiene, Jeffrey Atkinson, & Jean-Marc Chillon.

Laboratoire de Pharmacologie Cardiovasculaire (EA 3116), Faculté de Pharmacie de l'Université Henri Poincaré-Nancy I, 5 rue Albert Lebrun, 54000 Nancy, France and <sup>1</sup> IRIS, 6 place des Pléiades, 92415 Courbevoie Cedex, France



## RESUME

Les résultats obtenus dans l'étude précédente nous ont permis de conclure que la mélatonine augmentait les capacités de vasodilatation du système cérébro-vasculaire face à une chute de pression artérielle moyenne. Cette augmentation est due à une constriction du système cérébro-vasculaire par la mélatonine. En effet, la mélatonine constrict aussi bien les artères cérébrales de large diamètre telles que l'artère cérébrale moyenne (Geary et coll., 1997) et les artérioles de petit diamètre visualisées par l'intermédiaire de la fenêtre crânienne. Il a déjà été établi que la mélatonine constrict les artères cérébrales moyennes après activation d'un récepteur (MT<sub>1</sub> et/ou MT<sub>2</sub>) par blocage des canaux potassiques calcium-dépendant de large conductance (Geary et coll., 1997).

Dans cette étude, nous avons voulu déterminer à l'aide d'outils pharmacologiques si les mécanismes d'action de la mélatonine sur les artérioles cérébrales étaient similaires.

La troisième étude présentée dans ce chapitre a donc été réalisée afin :

1. de vérifier que la mélatonine, administrée *in situ* dans la fenêtre crânienne et non plus *i.v.* est bien un constricteur des artérioles cérébrales
2. de déterminer le mécanisme d'action par lequel la mélatonine constrict les artérioles cérébrales.

Pour cela, nous utiliserons la technique de la "fenêtre crânienne", qui nous permet d'appliquer directement les différents outils pharmacologiques (agonistes, antagonistes, ...) sur les artérioles cérébrales en superfusant la préparation. Nous avons dans un premier temps vérifié que la mélatonine constrict les artérioles cérébrales dans ces conditions expérimentales. Pour ensuite étudier son mécanisme d'action, nous avons utilisé le luzindole (un antagoniste

des récepteurs  $MT_1$  et  $MT_2$ ) afin de déterminer si cet effet était médié ou non par les récepteurs mélatoninergiques. Finalement, comme il a déjà été reporté que la mélatonine constrict les artères cérébrales par l'intermédiaire des  $BK_{Ca^{2+}}$  (Geary et coll., 1997), nous avons voulu vérifier leur rôle dans la constriction des artérioles cérébrales induite par la mélatonine. Nous avons donc utilisé un inhibiteur des  $BK_{Ca^{2+}}$ , le TEA, et un activateur des  $BK_{Ca^{2+}}$ , le NS1619, afin de voir leurs effets sur les constriction induites par la mélatonine.

Les résultats de cette étude, nous ont permis de conclure que :

1. la mélatonine est bien un vasoconstricteur direct des artérioles cérébrales ( $EC_{50}$  de  $3,0 \pm 0,1 \cdot 10^{-8}$  M),
2. cet effet vasoconstricteur est médié par l'inhibition des canaux  $BK_{Ca^{2+}}$  suite à l'activation des récepteurs  $MT_1$  et/ou  $MT_2$ .

Sur la figure 2 de cette publication, le diamètre des veines cérébrales apparaît augmenté suite à l'administration de mélatonine dans la fenêtre crânienne. Au cours de nos expérimentations, nous avons mesuré uniquement le diamètre des artérioles cérébrales et pas celui des veines et donc nous ne disposons pas de valeurs précises pour quantifier ce phénomène. Un effet potentiel de la mélatonine sur la circulation veineuse cérébrale et son influence éventuel sur l'autorégulation du DSC reste donc à déterminer.

Nous avons donc démontré que la mélatonine est un vasoconstricteur des artérioles cérébrales. Il est établi que les traitements chroniques par des vasoconstricteurs peuvent avoir des effets trophiques sur la paroi vasculaire (Du et coll., 1996). Au cours du vieillissement, la concentration plasmatique de mélatonine diminue (Sack et coll., 1986), et la structure de la paroi des artérioles cérébrales change (Hadju et coll., 1990) avec en particulier une atrophie de

la paroi. Il est donc envisageable que la mélatonine contribue aux changements structuraux que subissent les artérioles cérébrales au cours du vieillissement.

## SUMMARY

**1** Based on our finding that melatonin decreased the lower limit of cerebral blood flow autoregulation in rat, we previously suggested that melatonin constricts cerebral arterioles. The goal of this study was to demonstrate this vasoconstrictor action and investigate the mechanisms involved.

**2** The effects of cumulative doses of melatonin ( $10^{-10}$  to  $10^{-6}$  M) were examined in cerebral arterioles (30-50  $\mu\text{m}$ ) of male Wistar rats using an open skull preparation. Cerebral arterioles were exposed to 2 doses of melatonin ( $3 \times 10^{-9}$  and  $3 \times 10^{-8}$  M) in the absence and presence of the  $\text{MT}_1$  and/or  $\text{MT}_2$  receptor antagonist, luzindole ( $2 \times 10^{-6}$  M) and the  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  ( $\text{BK}_{\text{Ca}}$ ) channel blocker, tetraethylammonium ( $\text{TEA}^+$ ,  $10^{-4}$  M). The effect of L-nitro arginine methyl ester (L-NAME,  $10^{-8}$  M) was examined on arterioles after  $\text{TEA}^+$  superfusion. Cerebral arterioles were also exposed to the  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  activator, NS1619 ( $10^{-5}$  M), and to sodium nitroprusside (SNP,  $10^{-8}$  M) in the absence and presence of melatonin ( $3 \times 10^{-8}$  M).

**3** Melatonin induced a dose-dependent constriction with an  $\text{EC}_{50}$  of  $3.0 \pm 0.1$  nM and a maximal constriction of  $-15 \pm 1\%$ . Luzindole abolished melatonin-induced vasoconstriction.  $\text{TEA}^+$  induced significant vasoconstriction ( $-10 \pm 2\%$ ). No additional vasoconstriction was observed when melatonin was added to the aCSF in presence of  $\text{TEA}^+$ , whereas L-NAME still induced vasoconstriction ( $-10 \pm 1\%$ ). NS1619 induced vasodilatation ( $+11 \pm 1\%$ ) which was 50% less in presence of melatonin. Vasodilatation induced by SNP ( $+12 \pm 2\%$ ) was not diminished by melatonin.

4 Melatonin directly constricts small diameter cerebral arterioles in rats. This vasoconstrictor effect is mediated by inhibition of BK<sub>Ca</sub> channels following activation of MT<sub>1</sub> and/or MT<sub>2</sub> receptors.

KEYWORDS: melatonin, cerebral arterioles, potassium channels, cerebral blood flow autoregulation

LIST OF ABBREVIATIONS:

aCSF	artificial cerebrospinal fluid
BK <sub>Ca</sub>	Ca <sup>2+</sup> activated large-conductance K <sup>+</sup> channel
L-NAME	L-nitro arginine methyl ester
SNP	sodium nitroprusside
TEA <sup>+</sup>	tetraethylammonium

## INTRODUCTION

We recently reported that melatonin increased the autoregulatory cerebrovascular dilatory capacity and improved the cerebrovascular security margin in rats (Régrigny *et al.*, 1998), suggesting a potential protective effect of melatonin against hypotension-induced cerebral ischemia (Shuaib, 1992, Daffertshofer and Hennerici, 1995, Skoog, 1997). We suggested that melatonin increases the cerebrovascular dilatory capacity by constricting not only large cerebral influx arteries but also cerebral microvessels (Régrigny *et al.*, 1998). Melatonin is known to constrict large-diameter cerebral arteries *in vitro*, following G protein-dependent inhibition of  $\text{Ca}^{2+}$  activated large-conductance  $\text{K}^+$  ( $\text{BK}_{\text{Ca}}$ ) channels (Geary *et al.*, 1997). In contrast, little is known of the effects of melatonin on small diameter cerebral arterioles which are involved in cerebral blood flow autoregulation.

The first goal of this study was to investigate the contractile effects of melatonin on small diameter (less than 50  $\mu\text{m}$ ) cerebral arterioles. The second goal was to determine whether the contractile effect of melatonin on small diameter cerebral arterioles was mediated by inhibition of  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  channels following activation of melatonin ( $\text{MT}_1$  and/or  $\text{MT}_2$ ) receptors, as previously described for large-diameter cerebral arteries (Geary *et al.*, 1997). Experiments were performed using an open skull preparation in anesthetized rats.

Part of these results was presented at the Winter Meeting of the British Pharmacological Society, Brighton (Chillon *et al.*, 1999).

## METHODS

### *Animals and open skull preparation.*

Experiments were performed on adult, male Wistar rats (Ico : WI, IOPS AF/Han ; Iffa-Credo, l'Arbresle, France, body weight =  $538 \pm 22$  g; 8-9 months). Animals were allowed free access to food and water, and housed at 24°C under controlled conditions of light-dark cycle (L/D: 12H/12H, lights on at 6 am and off at 6 pm). Experiments were performed in accordance with the guidelines of the European Union and the French Ministry of Agriculture (permits 54-4 and 03575)..

Animals were anesthetized with sodium pentobarbitone ( $60 \text{ mg kg}^{-1}$ , i.p.) at 9 am. A polyethylene cannula (Merck Biotrol, Chennevieres, France) was introduced into the left femoral artery, and connected to a low volume, strain-gauge transducer (Baxter, Bentley Laboratories, Europe) for measurement of blood pressure and heart rate. A polyethylene cannula was introduced into the right femoral artery to withdraw blood for measurement of arterial blood gases (pH,  $\text{PaO}_2$  and  $\text{PaCO}_2$ , mmHg; 170 pH/Blood Gas Analyzer, Corning Medical, Medfield, USA). A silicone catheter (Sigma Medical, Nanterre, France) was introduced into the left femoral vein, and connected to a pump (Bioblock Scientific, Paris, France) for infusion of sodium pentobarbitone (at a rate of  $0.25 \text{ ml h}^{-1}$ ;  $20 \text{ mg kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) throughout the experiment to maintain anesthesia. Animals were intubated and mechanically ventilated with room air ( $60 \text{ strokes min}^{-1}$ ;  $10 \text{ ml kg}^{-1}$ ). Paralysis of skeletal muscle was obtained with gallamine triethiodide ( $20 \text{ mg kg}^{-1}$  i.v.) repeated every hour. Because the animals were paralyzed, the depth of anesthesia was evaluated by applying pressure to the tail and observing changes in heart rate and blood pressure. Rectal temperature was maintained at 37-

38°C with a heating pad. At the end of the experiment, animals were killed while under general anesthesia.

#### *Measurement of arteriolar diameter.*

We measured the diameter of first order arterioles of the cerebrum (Harper and Bohlen, 1984) through an open skull preparation (Chillon *et al.*, 1996, 1997). The head was placed in an adjustable head holder, and a 1 cm incision was made in the skin to expose the skull. The skin edges were retracted with sutures, and ports placed for inflow and outflow of artificial cerebrospinal fluid (aCSF). Craniotomy was performed over the left parietal cortex, and the dura was incised to expose cerebral vessels. The exposed brain was continuously suffused (3 ml min<sup>-1</sup>) with aCSF, warmed to 37-38° C and equilibrated with a gas mixture of 5% CO<sub>2</sub>-95% N<sub>2</sub>. The composition of the aCSF was (mM) KCl, 3.0; MgCl<sub>2</sub>, 0.6; CaCl<sub>2</sub>, 1.5; NaCl, 131.9; NaHCO<sub>3</sub>, 24.6; urea, 6.7; and glucose, 3.7 (Chillon *et al.*, 1996, 1997).

Arterioles were monitored through a microscope (Stemi 2000-C, Carl Zeiss Jena GMBH, Jena, Germany) connected to a closed-circuit video system with a final magnification of x 400. Images of arterioles were digitized using a video frame. Arteriolar diameter was measured from the digitized images with image analysis software (Saisam<sup>®</sup>, Microvision Instruments, Evry, France). The precision of this system is 0.5 μm (1 pixel = 0.5 μm).

#### *Experimental protocols.*

In a first experiment, we determined the effects of melatonin on cerebral arterioles. We examined latency and duration of the response induced by melatonin. For this we measured cerebral arteriolar diameter ( $n = 5$ ) every 5 min during perfusion with aCSF plus melatonin (10<sup>-6</sup> M). After 25 min, melatonin perfusion was stopped and we measured return in diameter



to baseline. A cumulative concentration-response curve for melatonin ( $n = 8$ ) was constructed by adding increasing concentrations of melatonin in the range of  $10^{-10}$  to  $10^{-6}$  M. For each rat, a sigmoid curve fit was then calculated with the least squares method:

$$Y = \min + (\max - \min) / (1 + (10^{\log EC_{50}} / 10^{\log X})^{\text{slope}})$$

where:  $Y$  = diameter variation ( $\mu\text{m}$ ),  $X$  = dose of melatonin (M),  $\min$  = minimum,  $\max$  = maximum,  $EC_{50}$  = the half-maximum effect, and  $\text{slope}$  = the slope of the curve.

The averages of  $\min$ ,  $\max$ ,  $EC_{50}$  and slopes were then used to determine the average response curve. For the remainder of the experiments, 2 doses of melatonin,  $3 \times 10^{-9}$  M ( $EC_{50}$ , see results) and  $3 \times 10^{-8}$  M (inframaximal, see results) were used.

In a second set of experiments, we explored the mechanisms by which melatonin induced contraction of cerebral arterioles. The effects of the melatonin receptor ( $MT_1$  and  $MT_2$ ) antagonist, luzindole (Dubocovich, 1995) ( $n = 7$ ), and the  $BK_{Ca}$  channel blocker, tetraethylammonium (Brayden and Nelson, 1992) ( $TEA^+$ ,  $n = 6$ ) on arteriolar vasoconstriction induced by melatonin were determined. Cerebral arterioles were exposed to 2 cumulative doses of melatonin ( $3 \times 10^{-9}$  and  $3 \times 10^{-8}$  M) prior to and after 20 min of superfusion of the cranial window with aCSF plus luzindole ( $2 \times 10^{-6}$  M) or  $TEA^+$  ( $10^{-4}$  M). In order to verify that cerebral arterioles were still able to constrict after  $TEA^+$ , we repeated this experiment ( $n = 4$ ) with L-nitro arginine methyl ester (L-NAME,  $10^{-8}$  M, a concentration which induced constriction of amplitude similar to that induced by melatonin,  $3 \times 10^{-8}$  M) instead of melatonin. The effect of melatonin on the vasodilatation of cerebral arterioles induced by the  $BK_{Ca}$  channel activator NS1619 (Holland *et al.*, 1996) ( $n = 6$ ) was also assessed in the same rats. For this, cerebral arterioles were exposed to NS1619 ( $10^{-5}$  M) prior to and 15 min after

addition of melatonin at  $3 \times 10^{-8}$  M in the aCSF. To verify that the effect of melatonin on NS1619-induced vasodilatation was specific, we repeated this experiment ( $n = 4$ ) with another vasodilator, sodium nitroprusside (SNP,  $10^{-8}$  M, a concentration which induced a similar degree of dilatation to that induced by NS1619). Finally, to verify that NS1619 acts via  $BK_{Ca}$  channel in this preparation, we studied the effect of  $TEA^+$  ( $10^{-4}$  M) on NS1619-induced vasodilatation ( $10^{-5}$  M,  $n = 6$ ). For this, cerebral arterioles were exposed to NS1619 prior to and 15 min after addition of  $TEA^+$  in the aCSF.

All experiments started 30 min after completion of surgery which lasted about 2 hours. All drugs, individually or in combination, were added to the aCSF at their final concentration and superfused in the cranial window until a stable response was obtained. For each drug concentration, diameters of cerebral arterioles, arterial blood pressure, heart rate, and blood gases were measured prior to the infusion of the drug and after stabilization of the diameter under drug infusion (about 20 min). Responses of cerebral arterioles to the various drugs were defined as the differences in diameters measured at the same point on the cerebral arteriole prior to and during drug infusion. Responses of cerebral arterioles were expressed either as absolute change in diameter ( $\mu\text{m}$ ) or as percentage change, using the diameter measured prior to drug infusion as baseline. The cranial window was continuously superfused with aCSF between drug exposure for 30 min to washout drugs and allow the diameter of the cerebral arterioles to return to baseline.

### *Substances used.*

Melatonin, luzindole, TEA<sup>+</sup>, NS1619, SNP, L-NAME and gallamine triethiodide were purchased from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA). Melatonin, luzindole and NS1619 were dissolved in aCSF plus absolute ethanol (0.1% v v<sup>-1</sup>) and protected from light. Control studies showed that the solvent had no effect on cerebral arteriolar diameter (43 ± 3 vs baseline 45 ± 2 μm). Doses are expressed as base. Gases were purchased from Air Liquide (Nancy, France). Sodium pentobarbitone was purchased from Sanofi Santé Animale (Libourne, France). KCl, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, NaCl, NaHCO<sub>3</sub>, urea and glucose were purchased from Merck KGaA (Darmstadt, Germany).

### *Statistical analysis.*

Results are expressed as means ± s.e.mean. The experimental protocol was designed to use one-way analysis of variance (ANOVA). Significant differences between means were determined using the Bonferroni test. The probability level chosen was  $P \leq 0.05$ .

## RESULTS

### *Cumulative concentration-response curve for melatonin.*

Melatonin induced dose-dependent constriction of cerebral arterioles (figures 1, 2 and 3). The constriction of cerebral arterioles was maximal after 10 min perfusion with aCSF plus melatonin (10<sup>-6</sup> M). Thirty minutes after the end of the melatonin superfusion, cerebral arteriolar diameter returned to baseline values (figure 3). The responses of cerebral arterioles to cumulative doses of melatonin were fit to a sigmoid curve ( $Y = (-5.6 \pm 0.2) + ((5.7 \pm 0.5) / (1 + (10^{8.5 \pm 0.2} / 10^{\log X}))^{1.0 \pm 0.1})$ );  $R^2 = 0.98$ ;  $P < 0.01$ ) with an EC<sub>50</sub> of 3.0 ± 0.1 nM, a maximum

constriction of  $-5.6 \pm 0.2 \mu\text{m}$  ( $-15 \pm 1\%$  vs baseline  $38 \pm 2 \mu\text{m}$ ) and a slope of  $1.0 \pm 0.1 \mu\text{m}\cdot\text{mmol}^{-1}\cdot\text{L}$ .

*Effects of luzindole on melatonin-induced constriction.*

Luzindole ( $2 \times 10^{-6} \text{ M}$ ), had no significant effect on cerebral arteriolar diameter ( $46 \pm 2 \mu\text{m}$  vs baseline diameter:  $46 \pm 2 \mu\text{m}$ ) but abolished the constriction induced by melatonin (figure 4).

*Effects of TEA<sup>+</sup> on melatonin-induced constriction.*

The BK<sub>Ca</sub> channel blocker, TEA<sup>+</sup> ( $10^{-4} \text{ M}$ ), induced significant constriction of cerebral arterioles ( $-10 \pm 2\%$  vs baseline  $48 \pm 2 \mu\text{m}$ ) of a similar amplitude to that induced by melatonin ( $3 \times 10^{-8} \text{ M}$ :  $-14 \pm 1\%$  vs baseline  $47 \pm 3 \mu\text{m}$ ). No additional vasoconstriction was observed when melatonin ( $3 \times 10^{-9}$  and  $3 \times 10^{-8} \text{ M}$ ) was added to the aCSF in presence of TEA<sup>+</sup> (figure 5).

*Effects of L-NAME on TEA<sup>+</sup>-induced constriction.*

The absence of vasoconstriction in cerebral arterioles precontracted with TEA<sup>+</sup> was specific for melatonin as L-NAME ( $10^{-8} \text{ M}$ ) in the presence of TEA<sup>+</sup> induced an additional, significant vasoconstrictor response (figure 5).

*Effects of melatonin on NS1619- or SNP- induced dilatation of cerebral arterioles.*

The BK<sub>Ca</sub> channel activator NS1619 ( $10^{-5} \text{ M}$ ) induced a significant increase in cerebral arteriolar diameter ( $+11 \pm 1\%$ ; vs baseline  $45 \pm 3 \mu\text{m}$ ; figure 6). Melatonin ( $3 \times 10^{-8} \text{ M}$ ) induced significant constriction of cerebral arterioles ( $-13 \pm 1\%$  vs baseline  $45 \pm 3 \mu\text{m}$ ). NS1619-induced vasodilatation in the presence of melatonin was reduced by 50% ( $+5 \pm 1\%$  vs

baseline  $39 \pm 3 \mu\text{m}$ ; figure 6).  $\text{TEA}^+$  significantly reduced vasodilatation induced by NS1619 ( $+16 \pm 2\%$  vs  $+8 \pm 1\%$ ).

SNP ( $10^{-8}$  M) induced significant vasodilatation ( $+12 \pm 2\%$ ; vs baseline  $39 \pm 6 \mu\text{m}$ ; figure 6). Melatonin ( $3 \times 10^{-8}$  M) induced significant constriction of cerebral arterioles ( $-12 \pm 1\%$  vs baseline  $37 \pm 6 \mu\text{m}$ ). The vasodilator response to SNP in the presence of melatonin ( $+17 \pm 4\%$  vs baseline  $33 \pm 6 \mu\text{m}$ ) was equal to that obtained prior to melatonin superfusion (figure 6).

Luzindole, melatonin,  $\text{TEA}^+$ , NS1619, L-NAME or SNP in the cranial window had no significant effect on systemic hemodynamics or blood gas parameters as heart rate ( $357 \pm 14$  bpm), mean arterial blood pressure ( $120 \pm 2$  mmHg), pH ( $7.39 \pm 0.01$ ),  $\text{PaO}_2$  ( $96 \pm 3$  mmHg) and  $\text{PaCO}_2$  ( $36 \pm 1$  mmHg) did not change significantly throughout the experiment.

## DISCUSSION

The present study shows that melatonin constricts small diameter cerebral arterioles *in situ* in anesthetized rats. This effect appears to be mediated by the binding of melatonin on  $\text{MT}_1$  and/or  $\text{MT}_2$  receptors as the melatonergic receptor ( $\text{MT}_1$  and  $\text{MT}_2$ ) antagonist, luzindole, abolished the response of cerebral arterioles to melatonin. Furthermore, our results suggest that the vasoconstriction induced by melatonin is due to inhibition of  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  channels as melatonin failed to elicit vasoconstriction when  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  channels were already inhibited by  $\text{TEA}^+$  and reduced the vasodilatation induced by the  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  activator, NS1619.

We previously suggested that melatonin constricts not only large cerebral influx arteries but also cerebral arterioles (Régrigny *et al.*, 1998). A direct vasoconstrictor effect of melatonin on large-diameter cerebral arteries has already been established (Geary *et al.*, 1997). Our

hypothesis that melatonin would vasoconstrict small diameter cerebral arterioles was based on the following observations. First, the cerebrovascular response to carbon dioxide, which is a measure of the dilatory capacity of cerebral microvessels (Heistad *et al.*, 1980, Wei *et al.*, 1980, Jones *et al.*, 1989), was increased in a concentration-dependent manner following melatonin infusion (Régrigny *et al.*, 1998). Second, melatonin infusion shifted the lower limit of cerebral blood flow autoregulation towards a lower level of blood pressure (Régrigny *et al.*, 1998), an effect that, according to the hypothesis of Paulson and Waldemar (1990), would only be observed if melatonin constricted not only large diameter cerebral arteries but also cerebral microvessels.

The present results confirm our hypothesis that melatonin constricts small diameter cerebral arterioles. In our study, melatonin constricted cerebral arterioles *in situ* with a potency ( $EC_{50} = 3.0 \pm 0.1$  nM) similar to that described for large diameter cerebral arteries *in vitro* pressurized to physiological levels ( $EC_{50} = 2.7$  nM) (Geary *et al.*, 1997) or for pressurized tail arteries (0.7-3.2 nM) (Ting *et al.*, 1997). Furthermore, the maximal decrease in diameter observed in our study (-15%) was also similar to that measured in large-diameter cerebral (10-17%) (Geary *et al.*, 1997) or in tail arteries (19-20%) (Ting *et al.*, 1997). The response to melatonin was similar to that produced by maximum dose of another vasoconstrictor, endothelin ( $22 \pm 5\%$ ) (Faraci, 1989).

The contractile effect of melatonin on cerebral arterioles was abolished by pretreatment with luzindole, a melatonergic receptor antagonist (Krause and Dubocovich, 1991) at a concentration that has been reported to antagonize melatonin-induced vasoconstriction in isolated middle cerebral arteries (Geary *et al.*, 1997). This result supports the hypothesis that, as in large-diameter cerebral arteries (Geary *et al.*, 1997), melatonin acts on a vascular  $MT_1$

and/or  $MT_2$  receptor. However, as melatonin is known to be an anti-oxidant (Reiter, 1997) and as free radicals are known to dilate blood vessels *via* effects on potassium channels (Archer *et al.*, 1994) we cannot rule out the possibility that such a mechanism is at least partly responsible for melatonin-induced constriction in our experiments.

In large diameter cerebral arteries, such as the middle cerebral artery, melatonin induces vasoconstriction by blockade of receptor-coupled  $BK_{Ca}$  (Geary *et al.*, 1997). The present results suggest that the same mechanism operates in arterioles. Melatonin failed to elicit further vasoconstriction in cerebral arterioles precontracted with the  $BK_{Ca}$  channel blocker  $TEA^+$ , suggesting that the two drugs act *via* the same pathway. This was confirmed when we examined the effect of a vasoconstrictor with a different mechanism of action, L-NAME, on cerebral arterioles precontracted with  $TEA^+$ . L-NAME significantly constricted cerebral arterioles precontracted with  $TEA^+$ . An additional indication that melatonin-induced vasoconstriction in cerebral arterioles is mediated by the  $BK_{Ca}$  channels is given by the results of the experiment using NS1619. NS1619, a  $BK_{Ca}$  channel opener, induced vasodilatation in cerebral arterioles and this was antagonized by melatonin and  $TEA^+$ . This effect of melatonin appears to be specific for the  $BK_{Ca}$  channel opener, NS1619, as melatonin failed to antagonize vasodilatation of cerebral arterioles induced by a vasodilatory agent with a different mechanism of action, SNP. NS1619 has been shown to inhibit L-type  $Ca^{2+}$  channels and voltage-activated  $K^+$  channels (Holland *et al.*, 1996), however the fact that  $TEA^+$  inhibits NS1619 vasodilatation is consistent with an effect of NS1619 on  $BK_{Ca}$  channels in our preparation.

### *Implications of our findings*

In conclusion, the present results show that melatonin vasoconstricts small diameter cerebral arterioles. This direct constrictor effect of melatonin in small diameter cerebral arterioles appears to be mediated by melatonergic (MT<sub>1</sub> and/or MT<sub>2</sub>) receptors. The results also suggest that, as observed in large-diameter cerebral arteries (Geary *et al.*, 1997), vasoconstriction induced by activation of the receptor is mediated by inhibition of BK<sub>Ca</sub> channels. This direct vasoconstrictor effect of melatonin observed *in vivo* on cerebral arterioles, together with the vasoconstrictor effect of melatonin observed *in vitro* on large-diameter cerebral arteries (Geary *et al.*, 1997), may explain the increase in the cerebrovascular dilatory capacity and the decrease of the lower limit of cerebral blood flow autoregulation that we have previously described (Régrigny *et al.*, 1998).



## ACKNOWLEDGMENTS AND FUNDING PAGE

This study was funded by grants from the French Ministry of Education and Research (EA/JE2166, Paris, France), the Regional Development Committee (Metz, France), the Greater Nancy Urban Council (Nancy, France), the Henri Poincaré University (Nancy, France) and Institut de Recherches Internationales Servier (Courbevoie, France).

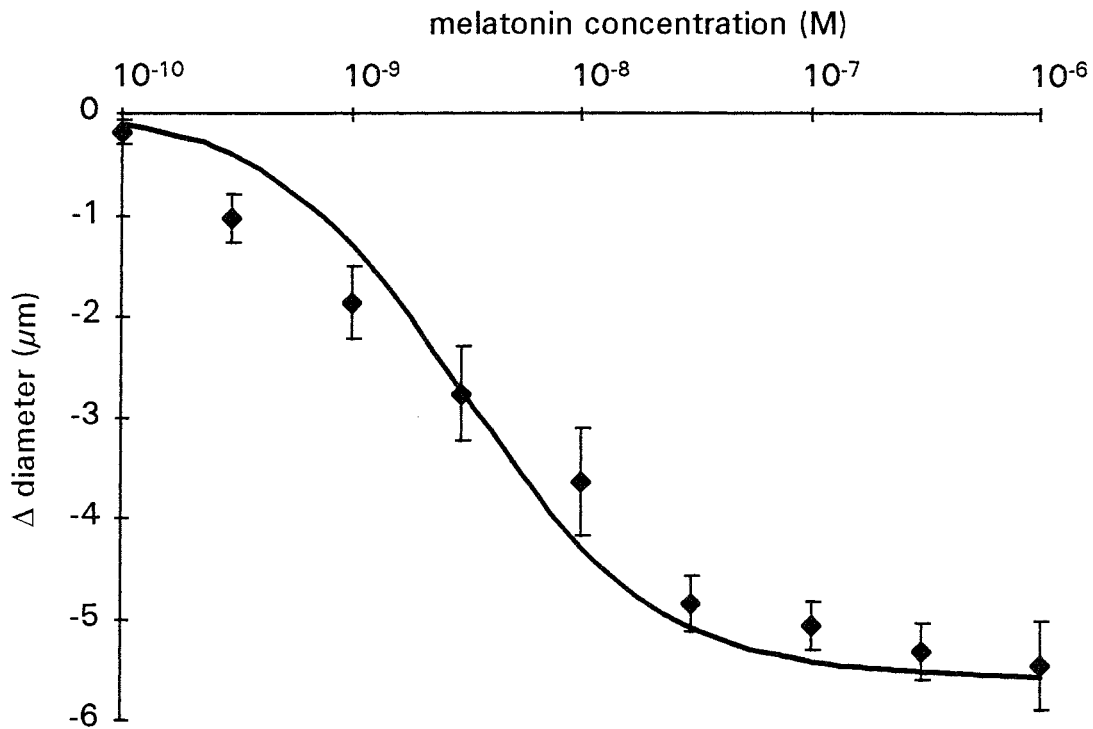


Figure 1: Cumulative concentration-response curve for melatonin. Results are expressed as change in diameter from baseline.

Values are means  $\pm$  s.e.mean;  $n = 8$ . The sigmoid curve was calculated as the average of the individual curves obtained by least squares analysis of each data set (see Methods).

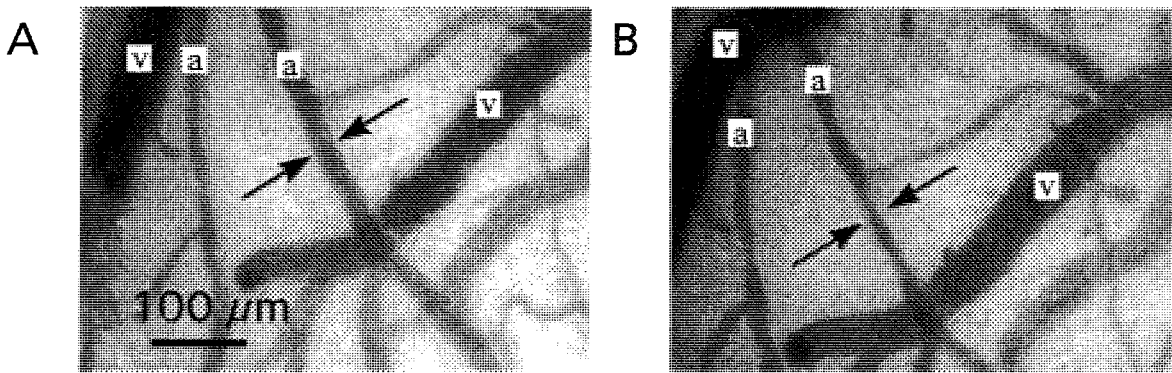


Figure 2: Cerebral arterioles (a) and cerebral veins (v) superfused with aCSF (A) or with aCSF plus melatonin ( $10^{-6}$  M; B). Arrows show the reduction in arteriolar diameter induced by melatonin.

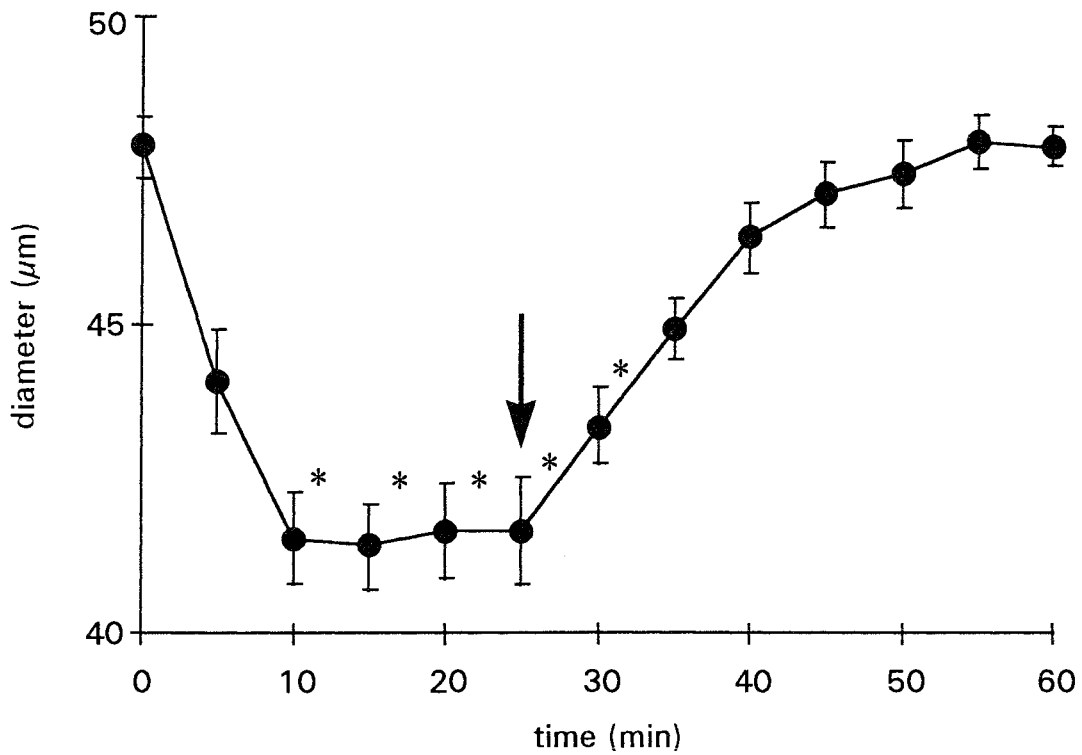


Figure 3: Latency and duration effect of melatonin ( $10^{-6}$  M) on cerebral arteriolar diameter.

Arrow shows the end of the melatonin perfusion.

Values are means  $\pm$  s.e. mean;  $n = 5$ . \*  $P \leq 0.05$  vs. baseline.

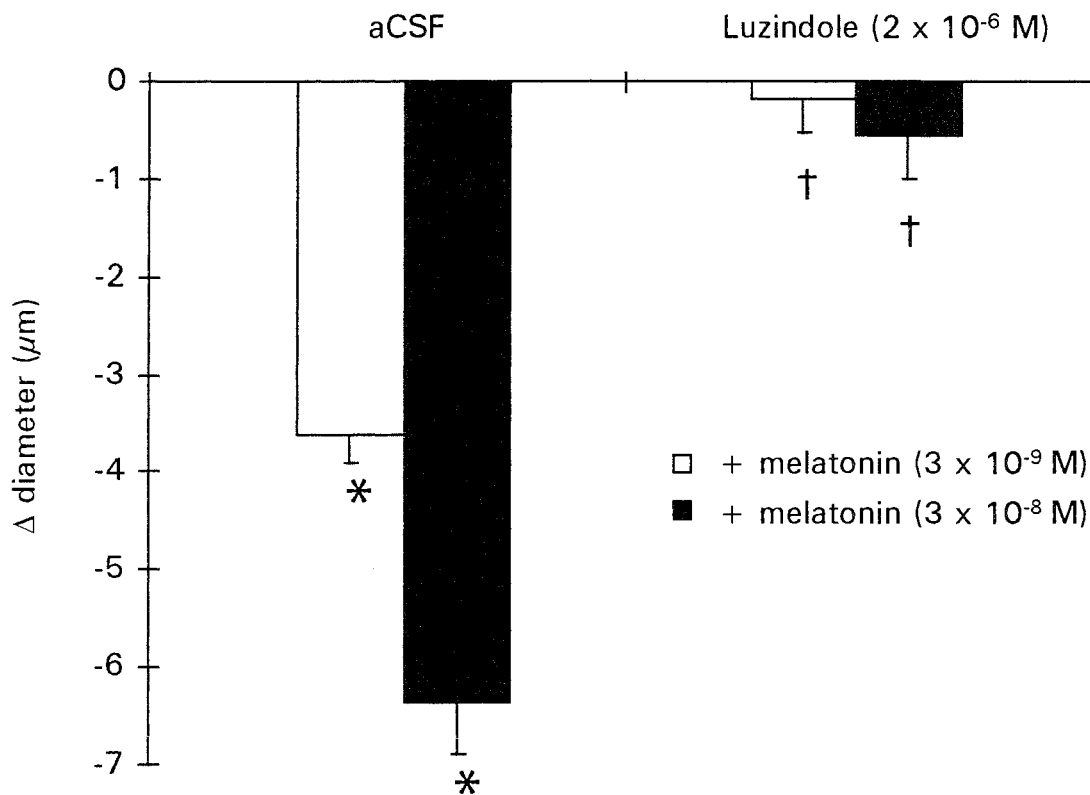
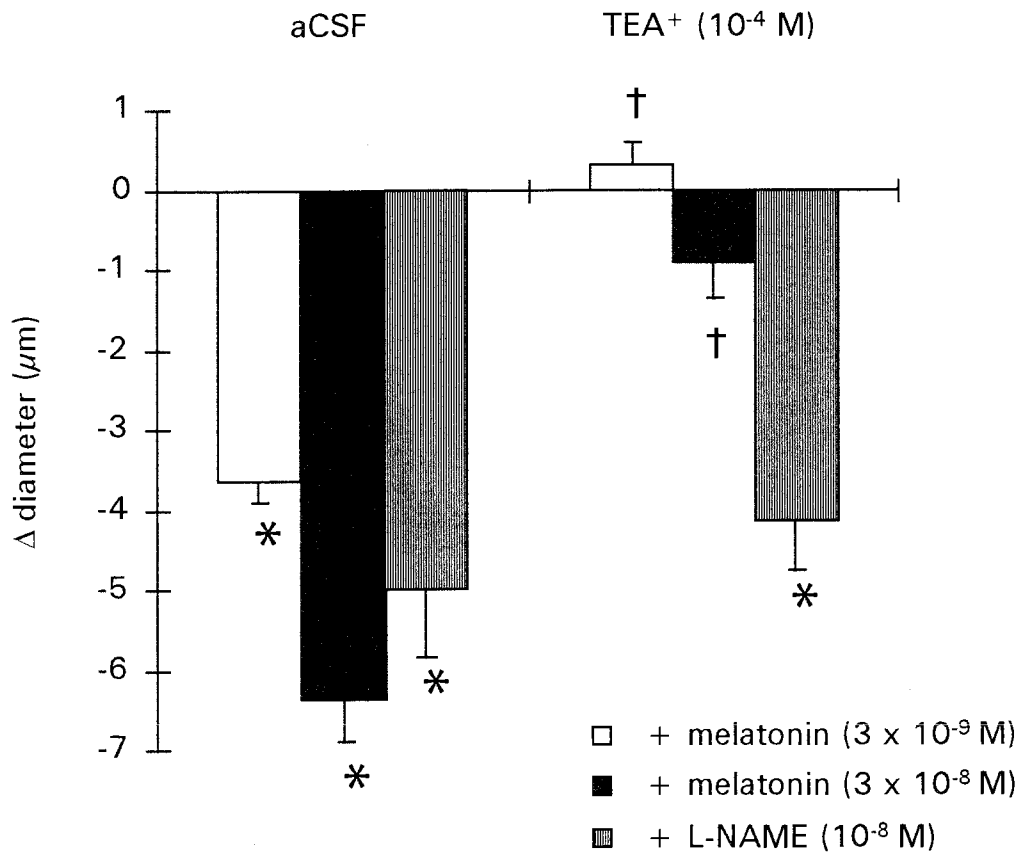


Figure 4: Effect of melatonin ( $3 \times 10^{-9}$  and  $3 \times 10^{-8}$  M) prior to (aCSF) and after luzindole ( $2 \times 10^{-6}$  M).

Values are means  $\pm$  s.e.mean;  $n = 7$ . \*  $P \leq 0.05$  vs. baseline. †  $P \leq 0.05$  vs. responses induced by melatonin alone.



**Figure 5:** Effect of melatonin ( $3 \times 10^{-9}$  and  $3 \times 10^{-8}$  M;  $n = 6$ ) or L-NAME ( $10^{-8}$  M;  $n = 4$ ) prior to (aCSF) and after TEA<sup>+</sup> ( $10^{-4}$  M).

Values are means  $\pm$  s.e.mean. \*  $P \leq 0.05$  vs. baseline. †  $P \leq 0.05$  vs. responses induced by melatonin alone.

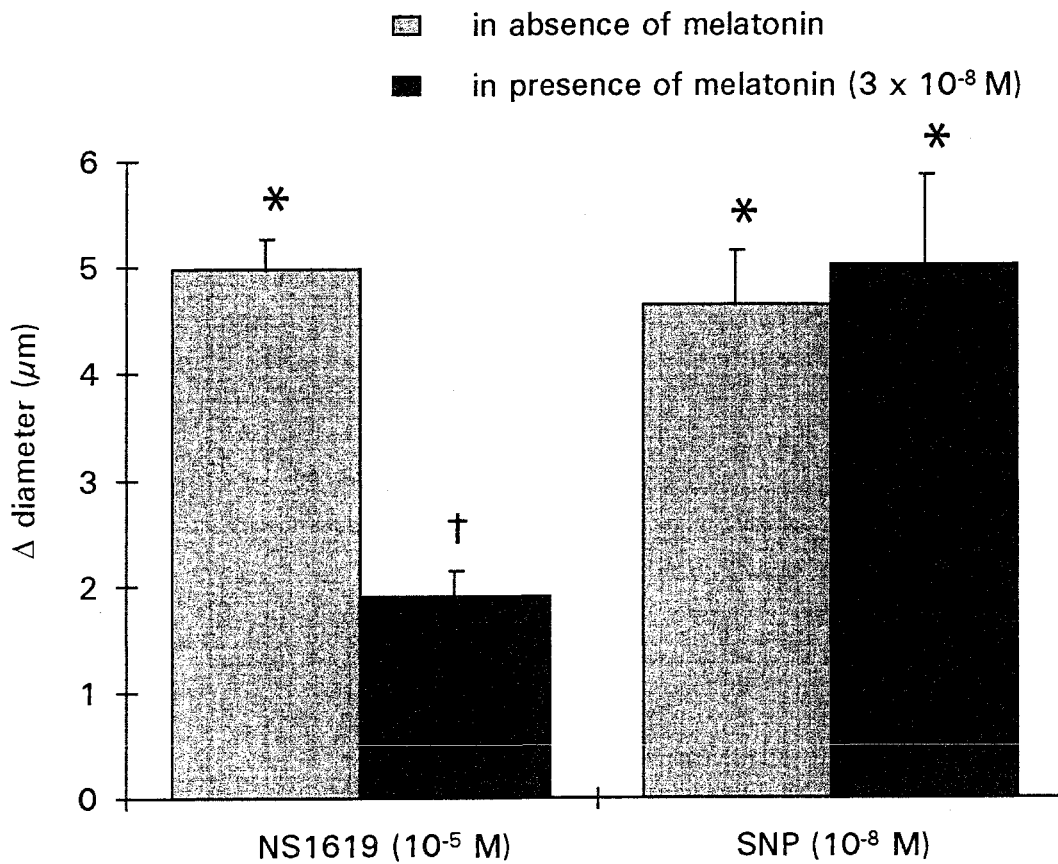


Figure 6: Effect of melatonin ( $3 \times 10^{-8}$  M) on the vasodilatory response to NS1619 ( $10^{-5}$  M;  $n = 6$ ) or SNP ( $10^{-8}$  M;  $n = 4$ ).

Values are means  $\pm$  s.e.mean. \*  $P \leq 0.05$  vs. baseline. †  $P \leq 0.05$  vs. responses induced by NS1619.

#### **4. Structure et fonction des artérioles cérébrales chez le rat pinealectomisé**

##### **Cerebral arteriolar structure and function in pinealectomized rats.**

Olivier Régrigny, François Dupuis, Jeffrey Atkinson, Patrick Limiñana, Philippe Delagrangé<sup>1</sup>,  
Elizabeth Scalbert<sup>1</sup>, & Jean-Marc Chillon.

Laboratoire de Pharmacologie Cardiovasculaire (EA 3116), Faculté de Pharmacie de  
l'Université Henri Poincaré-Nancy I, 5 rue Albert Lebrun, 54000 Nancy and <sup>1</sup> IRIS, 6 place  
des Pléiades, 92415 Courbevoie Cedex, France



## RESUME

Les expériences précédentes nous ont permis d'étudier les effets d'une administration aiguë de mélatonine. Nous avons ainsi observé que la mélatonine est un vasoconstricteur des artérioles cérébrales. Cet effet est médié par l'inhibition des canaux  $BK_{Ca^{2+}}$  suite à l'activation des récepteurs  $MT_1$  et/ou  $MT_2$ . Cette vasoconstriction des artérioles cérébrales de petit diamètre associée à celle des artères cérébrales de large diamètre (artère cérébrale moyenne (Geary et coll., 1997)) augmente la réserve de vasodilatation cérébro-vasculaire et déplace la limite basse de l'autorégulation du DSC vers de plus faibles valeurs de pression artérielle moyenne systémique. Comme la mélatonine n'a aucun impact sur la pression artérielle moyenne systémique, la marge de sécurité du DSC augmente. Les deux dernières expériences présentées dans cette thèse ont eu pour but d'examiner les effets chroniques de la mélatonine sur la structure des artérioles cérébrales et sur la limite basse de l'autorégulation du DSC.

Il est en effet établi que les traitements chroniques par des vasoconstricteurs (e.g. l'endothéline) peuvent avoir des effets trophiques sur la paroi vasculaire par des mécanismes de conversation croisée (Du et coll., 1996). Nous avons donc émis l'hypothèse que la mélatonine, en activant ces récepteurs, pouvait induire d'une part une vasoconstriction, et d'autre part entraîner une activation de voies de transduction intracellulaire induisant une stimulation des rho kinases et une prolifération cellulaire. Si tel est le cas, la diminution progressive de la concentration plasmatique de mélatonine observée avec l'âge (Sack et coll., 1986) pourrait être un des facteurs contribuant au développement de l'atrophie de la paroi des artérioles cérébrales avec le vieillissement (Hadju et coll., 1990). Cette atrophie étant associée à une diminution de la distensibilité de la paroi des artérioles cérébrales, cela pourrait contribuer à la diminution de la réserve vasodilatatrice et à l'augmentation de la limite basse observée chez les sujets âgés.

Nous avons donc émit l'hypothèse que la suppression de la production de mélatonine chez un animal jeune pourrait entraîner les mêmes altérations structurales des artérioles cérébrales que celles décrites chez le rat âgé, à savoir une atrophie de la paroi vasculaire associée à une diminution de sa distensibilité. Nous avons également supposé que, suite à ces altérations des artérioles cérébrales, la limite basse de l'autorégulation du DSC pourrait être augmentée chez ces rats jeunes privés de mélatonine.

Pour tester cette hypothèse, nous avons effectué des pinéalectomies sur des rats jeunes (2 mois) et nous avons comparé la structure et la fonction de leur artérioles cérébrales à celles de rats non pinéalectomisés. Afin de vérifier que les effets observés étaient bien dus à la privation de mélatonine nous avons également comparé la structure et la fonction des artérioles cérébrales des rats pinéalectomisés à celles de rats pinéalectomisés ayant reçu un traitement substitutif à la mélatonine.

Nous avons conclu que la pinéalectomie des jeunes rats induit une atrophie de la paroi des artérioles cérébrales ainsi qu'une réduction de leur distensibilité. Ces changements ne sont cependant pas suffisant pour modifier les capacités d'autorégulation du débit sanguin cérébral de ces animaux. Les effets de la pinéalectomie sur la structure des artérioles cérébrales étant reversés par la mélatonine, c'est probablement la diminution de la production de cette dernière qui est à l'origine des altérations obtenues.

Ainsi, une privation de mélatonine, même pour une courte période (ici 1 mois) induit des changements structuraux des artérioles cérébrales comparables à ceux retrouvés chez des rats âgés (Hadju et coll., 1990). Comme la production de mélatonine diminue avec l'âge (Sack et coll., 1986), on peut penser que la mélatonine joue un rôle dans les altérations structurelles des artérioles cérébrales associées à l'âge. Si tel est le cas, la mélatonine pourrait être un traitement efficace contre le vieillissement des artérioles cérébrales.

**ABSTRACT**

**Background:** As melatonin is a vasoconstrictor of cerebral arterioles and chronic treatment with vasoconstrictors has trophic effects on the vascular wall, we examined the effects of pinealectomy on cerebral arteriole structure and function and on cerebral blood flow (CBF) autoregulation in young male Wistar rats.

**Methods and results:** Rats were divided into 4 groups: controls (n=8), pinealectomized (n=10), pinealectomized plus melatonin ( $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$  in the drinking water; n=9) and sham-operated rats (n=8). Four weeks later, we studied the lower limit of CBF autoregulation by repeated measurement of CBF (a.u., laser doppler) and mean arterial pressure at baseline and during stepwise hemorrhage hypotension. Internal arteriolar diameter ( $\mu\text{m}$ , cranial window) was also measured. Following dilatation (EDTA, 67 mmol/L), stress-strain relationships were calculated from repeated measurement of internal arteriolar diameter during stepwise hypotension and cross-sectional area of the vessel wall (CSA). Pinealectomy had no effect on the lower limit of cerebral blood flow autoregulation or on the vasodilatory capacity of cerebral arterioles following stepwise hypotension. CSA decreased following pinealectomy ( $550 \pm 34$  vs  $819 \pm 36 \mu\text{m}^2$ ;  $P < 0.05$ ) and was restored by melatonin ( $924 \pm 39 \mu\text{m}^2$ ). The stress-strain curve was steeper and the tangential elastic modulus was higher in pinealectomized compared to sham-operated rats ( $6.8 \pm 1.0$  vs  $4.6 \pm 0.4 \cdot 10^{-5} \text{ N/m}^2$ ;  $P < 0.05$ ). Melatonin abolished the increase in the tangential elastic modulus ( $4.9 \pm 0.8 \cdot 10^{-5} \text{ N/m}^2$ ).

**Conclusions:** Pinealectomy of young rats induces atrophy of the cerebral arteriole wall associated with a decrease in passive distensibility. These effects are prevented by melatonin. They do not modify the cerebrovascular autoregulatory response to hypotension.

**CONDENSED ABSTRACT:**

We examined the effects of pinealectomy on cerebral arteriole structure and function and cerebral blood flow (CBF) autoregulation in rats. In controls (n=8), pinealectomized (n=10), pinealectomized plus melatonin ( $0.5 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{day}^{-1}$ ; n=9) and sham-operated rats (n=8) we measured the lower limit of CBF autoregulation, the cross-sectional area of the vessel wall and the stress-strain relationship. Pinealectomy had no effect on the vasodilatory capacity of cerebral arterioles following a fall in blood pressure or on the lower limit of CBF autoregulation but decreased CSA and increased the tangential elastic modulus. These latter effects were prevented by melatonin.

**KEYWORDS:** cerebral circulation; blood flow; mechanics; hemorrhage

We recently reported that melatonin shifted the lower limit of cerebral blood flow autoregulation toward lower values of pressure without any change in systemic mean arterial pressure (Régrigny *et al.*, 1998). Thus, melatonin improved the cerebrovascular security margin in rats, suggesting a potential protective effect of melatonin against hypotension-induced cerebral ischemia (Shuaib, 1992, Daffertshofer and Hennerici, 1995, Skoog, 1997). We reported that melatonin shifted the lower limit of cerebral blood flow autoregulation by constricting cerebral arteries and arterioles following activation of MT<sub>1</sub> and/or MT<sub>2</sub> receptors (Régrigny *et al.*, 1999).

As vasoconstrictors acting *via* membrane receptors trigger intracellular responses (Machesky et Hall, 1996) that lead to hypertrophy (Finkel, 1999) following interaction with growth factors (*via* a cross talk mechanism), we speculated that a decrease in melatonin production by pinealectomy lead to hypotrophy, that this alters arteriolar structure and function and so produces a shift in autoregulation.

The goal of this study was to examine the effects of melatonin deprivation following pinealectomy on cerebral arteriole structure and mechanics and on the lower limit of cerebral blood flow autoregulation in young normotensive rats. In order to evaluate to what extent the alterations produced by pinealectomy were consecutive to melatonin deprivation, we also studied arteriolar structure and function in pinealectomized rats treated for 1 month with melatonin.

## METHODS

### *Animals and operative procedures.*

Experiments were performed on male Wistar rats (Ico: WI, IOPS AF/Han; Iffa-Credo, l'Arbresle, France; body weight =  $378 \pm 11$ g). At 8 weeks of age, rats were divided into 4 groups: controls (n = 8), pinealectomized (n = 10), pinealectomized plus melatonin ( $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$  in the drinking water; n = 9) and sham-operated rats (n = 8).

The animals were pinealectomized under pentobarbital anesthesia (60 mg/kg). Briefly the head was placed in a stereotaxic device, the skull was exposed and a hole (5 mm in diameter) was drilled above the lambda. The venous sinus was incised and the pineal gland located underneath the sinus was removed by aspiration. The skin was then sutured and the rats received a single injection of penicillin (120000 IU/kg, im). Sham-operated animals were submitted to the same procedure except that the pineal gland was not removed. Control animals were not submitted to the operation.

Melatonin was prepared three times a week by dissolving the drug (12 mg) in ethanol (1 ml; 100% v/v). This solution was then diluted with demineralized water to a final concentration of 6 mg/L (concentration of ethanol: 0.05%). Untreated rats received a solution prepared in the same way except that melatonin was omitted. Fluid consumption and body weights of untreated or treated rats were determined weekly throughout the treatment.

Animals were allowed free access to food and fluid, housed at 24°C and exposed to 12 hours of light (lights on at 6 am and off at 6 p.m.). Experiments were performed in accordance with the guidelines of the French Ministry of Agriculture (permits 54-4 and 03575).

After 1 month of treatment, we examined the cerebral circulation and the structure and mechanics of cerebral arterioles. Animals were weighed and anesthetized with sodium pentobarbital (60 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.) at 9 am. A polyethylene cannula (Merck Biotrol, Chennevieres, France) was introduced into the left femoral artery, and connected to a low volume, strain-gauge transducer (Baxter, Bentley Laboratories, Europe) for measurement of blood pressure and heart rate. A polyethylene cannula (Merck Biotrol, Chennevieres, France) was introduced into the right femoral artery to withdraw blood for measurement of arterial blood gases and the production of hypotension. A silicone catheter (Sigma Medical, Nanterre, France) was introduced into a femoral vein, and was connected to a pump (Bioblock Scientific, Paris,

France) for infusion of sodium pentobarbital ( $0.25 \text{ ml}\cdot\text{h}^{-1}$ ;  $20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ) to maintain anesthesia throughout the experiment. Animals were intubated and mechanically ventilated with room air (60 strokes per minutes; 10 ml per kg). Paralysis of skeletal muscles was obtained with an injection of gallamine triethiodide ( $20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  i.v.) repeated every hour. Because the animals were paralyzed, the depth of anesthesia was periodically evaluated by applying pressure to the tail and observing changes in heart rate and blood pressure. Rectal temperature was maintained at  $37\text{-}38^\circ\text{C}$  with a heating pad.

#### *Measurement of arteriolar diameter.*

We measured diameter in first order arterioles of the cerebrum (Harper and Bohlen, 1984) through an open skull preparation (Chillon *et al.*, 1996, 1997). The head was placed in an adjustable head holder. A 1 cm incision was made in the skin to expose the skull. Ports were placed for inflow and outflow of artificial cerebrospinal fluid (CSF). Craniotomy was performed over the left parietal cortex, and the dura was incised to expose cerebral vessels. The exposed brain was continuously suffused with artificial CSF, warmed to  $37\text{-}38^\circ\text{C}$  and equilibrated with a gas mixture of 5%  $\text{CO}_2$ -95%  $\text{N}_2$ . The composition of the CSF was (in mmol/L) KCl, 3.0;  $\text{MgCl}_2$ , 0.6;  $\text{CaCl}_2$ , 1.5; NaCl, 131.9;  $\text{NaHCO}_3$ , 24.6; urea, 6.7; and glucose, 3.7 (Chillon *et al.*, 1996, 1997).

Arterioles were monitored through a microscope (Stemi 200-C, Carl Zeiss Jena GMBH, Jena, Germany) connected to a closed-circuit video system with a final magnification of x400. Images of arterioles were digitized using a video frame grabber. Arteriolar diameter was measured from the digitized images using image analysis software (Saisam<sup>®</sup>, Microvision Instruments, Evry, France). The precision of this system is  $0.5 \mu\text{m}$ .

### *Measurement of cerebral blood flow.*

CBF was measured by laser doppler flowmetry using a BLF 21 system (Transonic Systems Inc., Ithaca, NY, USA) equipped with a 1.2 mm diameter needle probe. (Fujii *et al.*, 1991b) The probe was placed in the cranial window into the CSF above the surface of the brain cortex. CBF was expressed as arbitrary units or as percentage (of baseline) changes in CBF during stepwise hypotension.

### *Experimental protocol.*

Thirty minutes after completion of surgery, cerebral arteriolar diameter was measured at baseline. Stepwise hypotension (10 mmHg per step) down to 20-30 mmHg was induced by controlled withdrawal of blood. At each step, systemic pressure, arteriolar diameter, CBF and blood gases were measured 1 min. after the decrease in blood pressure. After the final step, blood was re-injected to restore blood pressure.

Vascular smooth muscle was then deactivated by suffusion of cerebral vessels with artificial CSF containing EDTA (67 mmol/L), which produces complete deactivation of smooth muscle in cerebral arterioles (Baumbach *et al.*, 1988b). Pressure-diameter relationships were obtained in deactivated cerebral arterioles between mean arterial pressures of 130 and 20 mmHg, using hemorrhage to reduce pressure in steps of 10 mmHg. At each pressure step, arteriolar diameter reached a steady state within 15 sec. and internal diameter was measured 30 sec. later. After the final step, blood was re-injected to restore blood pressure. Arterioles maximally dilated by EDTA were then fixed *in vivo* at physiological pressure by suffusion of vessels with glutaraldehyde (2.25% v/v glutaraldehyde in 0.10 mol/L cacodylate buffer). Arterioles were considered to be adequately fixed when blood flow through the arterioles ceased. After the animal was killed, the arteriolar segment used for pressure-diameter measurements was removed, processed for microscopy and embedded in paraffin.



The cross-sectional area (CSA) of the arteriolar wall was determined on 7  $\mu\text{m}$  sections using the video image analyzing system described above. Luminal and total (lumen plus vessel wall) CSA of the arteriole were measured by tracing the luminal and outer edges of the vessel wall. CSA of the vessel wall was calculated by subtraction of luminal CSA from total CSA.

#### *Calculations.*

Cerebral arteriolar diameter and blood flow values are reported as absolute values or as percentage change from baseline. For each group, CBF (absolute values and percentage baseline), arterial pressure, heart rate and blood gas values were presented in the form used by Barry *et al* (1982). Values were pooled and grouped by categories over mean arterial pressure ranges of 10 mmHg. One-way ANOVA between these different mean arterial pressure ranges was performed for each treatment group. The lower limit of cerebral blood flow autoregulation was defined as the lower limit of the lowest mean arterial blood pressure range in which CBF was not significantly less than baseline CBF. The security margin (%) was defined as ((baseline mean arterial blood pressure - lower limit of cerebral blood flow autoregulation) x 100) divided by baseline mean arterial blood pressure (Lartaud *et al.*, 1993).

#### *Calculation of Mechanical Characteristics*

The assumptions upon which we based calculations of circumferential stress, circumferential strain and tangential elastic modulus have been described in detail previously (Baumbach *et al.*, 1988b, Baumbach and Heistad, 1991). It should be noted, however, that in the present experiments, as in previous experiments (Régrigny *et al.*, 2000), systemic arterial pressure, and not pial arteriolar pressure was used.

Circumferential stress ( $\sigma$ ) was calculated from systemic arterial pressure (P), inner diameter of cerebral arterioles ( $D_i$ ), and wall thickness (WT):  $\sigma = (P \times D_i)/(2WT)$ . Systemic blood pressure was converted from mmHg to Newtons per  $\text{m}^2$  (1 mmHg =  $1.334 \times 10^2 \text{ N/m}^2$ ).

Wall thickness was calculated from cross-sectional area of the vessel wall (CSA) and inner cerebral arteriolar diameter:  $WT = [(4CSA/\pi + D_i^2)^{1/2} - D_i]/2$ . External diameter of cerebral arterioles ( $D_e$ ) was calculated as:  $D_e = D_i + 2WT$ . Histological determination of cross-sectional area were used in all calculations of wall thickness and circumferential stress. Circumferential strain ( $\epsilon$ ) was calculated as  $\epsilon = (D_i - D_o)/D_o$ , where  $D_o$  is original diameter (= diameter at 20-30 mmHg of pressure).

To obtain tangential elastic modulus, the stress-strain data from each animal were fitted to an exponential curve ( $y = ae^{bx}$ ) using least squares analysis:  $\sigma = \sigma_o e^{\beta\epsilon}$ , where  $\sigma_o$  is the stress at the original diameter ( $D_o$ ) and  $\beta$  is a constant that is related to the rate of increase of the stress-strain curve. Tangential elastic modulus ( $E_T$ ) was calculated from the tangent of the exponential curve:  $E_T = d\sigma/d\epsilon = \beta\sigma_o e^{\beta\epsilon}$ .

#### *Substances used.*

Gallamine triethiodide and melatonin were purchased from Sigma Chemical Company (St Louis, MO, USA). Nitrogen and carbon dioxide were purchased from Air Liquide (Nancy, France). Sodium pentobarbital was purchased from Sanofi Santé Animale (Libourne, France). KCl, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, NaCl, NaHCO<sub>3</sub>, urea and glucose were purchased from Merck KGaA (Darmstadt, Germany).

#### *Statistical analysis.*

Results are expressed as means  $\pm$  s.e.mean. The experimental protocol was designed for the use of a one-way ANOVA with the variable "treatment" (control, sham, pinealectomized, and pinealectomized plus melatonin). Significant differences between means were determined using the Bonferroni test. One-way ANOVA using the variable "mean arterial blood pressure

range” was performed separately for each treatment group for the analysis of values obtained following hypotensive hemorrhage. The probability level chosen was  $P \leq 0.05$ .

## RESULTS

### *Baseline values (Table 1)*

Neither pinealectomy or treatment with melatonin modified body weight in rats. Cerebral arteriolar internal diameter was not influenced by pinealectomy or melatonin, whereas CSA was decreased by pinealectomy and restored to values similar to those of control and sham-operated rats after treatment with melatonin. Heart rate, blood pressure, pH and blood gases were similar in all groups of rats.

### *Vascular Mechanics*

Following deactivation of cerebral arterioles with EDTA, external diameter was significantly less in pinealectomized rats than in control, sham-operated or melatonin-treated rats at mean arteriolar pressures between 110 and 50 mmHg (Figure 1).

The stress-strain curve was shifted to the left (Figure 2) and the slope of tangential elastic modulus *versus* stress was significantly higher (Table 1) in pinealectomized than in control rats. Thus, passive distensibility decreased in cerebral arterioles of pinealectomized rats. Treatment with melatonin attenuated the leftward shift of the stress-strain curve (Figure 2) and the increase in the slope of tangential elastic modulus *versus* stress (Table 1).

### *Lower limit of cerebral blood flow, security margin and dilatation of cerebral arterioles*

Following hypotensive hemorrhage in control rats, CBF remained constant until the 30-39 pressure range then significantly decreased; the lower limit of cerebral blood flow autoregulation was 40 mmHg and the security margin 62% (Figure 3). The lower limit of

cerebral blood flow autoregulation was the same in sham-operated, pinealectomized or melatonin-treated rats (Figure 3) and the security margin remained constant (Table 1).

In all rats, cerebral arterioles dilated significantly at pressures less than 70 mmHg; maximal dilatation ( $41 \pm 4\%$  controls,  $40 \pm 2\%$  sham-operated,  $43 \pm 2\%$  melatonin-treated, and  $31 \pm 2\%$  pinealectomized) was observed at 20-29 mmHg. There was no significant effect of pinealectomy or melatonin on active dilatation during stepwise hypotension (figure 4).

## DISCUSSION

The present study shows that pinealectomy reduces wall thickness, without changing internal diameter prior to inactivation with EDTA, and increases the rigidity of the cerebral arteriolar wall. Treatment with melatonin restores normal wall thickness and rigidity. As the vasodilatory capacity of cerebral arterioles following a fall in blood pressure was not modified with any of the treatments, the lower limit of cerebral blood flow autoregulation was similar in all groups.

### *Effects of melatonin on cerebral arteriole structure and mechanics.*

Melatonin deprivation for one month reduced wall thickness; this was prevented by melatonin treatment. This result confirms our hypothesis that melatonin has trophic effect on cerebral arterioles vessel wall. There are at least 3 mechanisms by which melatonin could modify smooth muscle cell proliferation. Firstly, vasoconstrictors acting *via* a G protein, such as angiotensin II, interact with growth factor pathways *via* a cross talk mechanism mediated by Rho (Du *et al.*, 1996). It has previously been reported that melatonin constricted middle cerebral arteries following activation of a G protein linked receptor (Geary *et al.*, 1997). Secondly, melatonin vasoconstricts small diameter cerebral arteries *in vivo* (Régigny *et al.*, 1999). Even if melatonin has no effect on systemic pressure, this vasoconstriction may be associated with an increase in pial arteriolar pressure. It has previously been shown that a

relationship exists between pressure and hypertrophy in cerebral arterioles of rats *in vivo* (Baumbach *et al.*, 1991; Baumbach, 1996, Chillon et Baumbach, 1999). However, it has also already been reported that pinealectomy increases (Harlow, 1987) whereas melatonin treatment decreases systemic mean blood pressure (Laflamme *et al.*, 1998, Arangino *et al.*, 1999, Kilic *et al.*, 1999, Wang and Ng, 2000). In the present experiment, we did not monitor blood pressure during treatment but, according to published results, an increase in pressure after pinealectomy should induce vascular wall hypertrophy and melatonin should produce vascular wall atrophy. We observed the opposite in the present study. Thirdly, an anti-apoptotic effect of melatonin on smooth muscle cells cannot be excluded (as shown by Mayo *et al.* (1998) on neuronal cells or in thymic tissue by Sainz *et al.* (1999)). This anti-apoptotic effect could disturb the equilibrium between cell proliferation and death in favor of proliferation and so explain the trophic effect of melatonin. However, the cellular mechanism remains to be clarified.

The trophic effect of melatonin observed in the present experiment is not supported by the fact that melatonin has been shown to prevent cell proliferation in cancer (Slominski and Pruski, 1993) or to have no effect on bovine aortic smooth muscle cells mitogenesis (Nemecek *et al.*, 1986). There are, however, certain important differences which may explain this apparent discrepancy with our results. In our experiment melatonin deprivation was chronic (1 month) whereas the other studies were performed *in vitro* after a short exposure to melatonin. Secondly, the other experiments were performed on carcinoma cells or aortic smooth muscle cells. Trophic effects of melatonin may be limited to vascular smooth muscle cells of resistance vessels such as cerebral arterioles.

Distensibility of cerebral arterioles decreased in pinealectomized rats. This may be due to a reduction in the proportion of compliant (smooth muscle, elastin and endothelium) to stiff

(collagen and basement membrane) components. Therefore, melatonin may attenuate the decrease in distensibility in pinealectomized rats by increasing the proportion of smooth muscle cells.

*Effects of melatonin on the lower limit of cerebral blood flow autoregulation.*

Despite the differences in structure and mechanics obtained after melatonin deprivation there were no consequences on the lower limit of cerebral blood flow autoregulation. This result may be explained by the fact that the vasodilatory reserve (defined as the difference between basal diameter and maximal diameter during autoregulatory hemorrhage) remained unchanged. Indeed, basal diameter was similar in all groups and there was no change in active vasodilatory capacity of cerebral arterioles following a fall in blood pressure in the different groups. Another explanation could be the pronounced autoregulatory capacity that we observed in young rats. We observed a security margin of 70% versus only 20% in 12 month old rats (Régrigny *et al.*, 1998). We can thus hypothesize that young normotensive rats have sufficient cerebrovascular vasodilatory reserve to compensate for structural and mechanical alterations. A longer period of melatonin deprivation may be required to produce profound structural alterations which do modify autoregulation. As melatonin production decreases with age (Sack *et al.*, 1986), old rats may be an adequate model to study effects of melatonin deprivation on cerebral arterioles structure and function.

*Conclusion and implications.*

Pinealectomy of young normotensive rats induces atrophy of the cerebral arteriole vessel wall associated with a decrease in passive distensibility. As these structural and mechanical alterations were reversed by melatonin treatment, they were probably consecutive to melatonin deprivation. Albeit, the structural and mechanical alterations had no effect on the lower limit of

cerebral blood flow autoregulation in young rats, perhaps following compensatory mechanisms.

Melatonin deprivation in young normotensive rats induces changes in the structure and mechanics of cerebral arterioles similar to those observed in old rats (Hadju *et al.*, 1990) in which the lower limit of cerebral blood flow autoregulation increases (Lartaud *et al.*, 1993). This, together with an increase in blood pressure variability (Zito *et al.*, 1991), may contribute to vascular dementia in aging (Shuaib, 1992, Skoog, 1998). As melatonin production decreases with age (Sack *et al.*, 1986), this may be an important element of the age-associated alteration in structure and mechanics of cerebral arterioles and may play an important role in the etiology of vascular dementia.

## ACKNOWLEDGMENTS

This study was funded by grants from the French Ministry of Education, Research and Technology (EA3116, Paris, France), the Regional Development Committee (Metz, France), the Greater Nancy Urban Council (Nancy, France), Henri Poincaré University (Nancy, France) and Institut de Recherches Internationales Servier (Courbevoie, France).

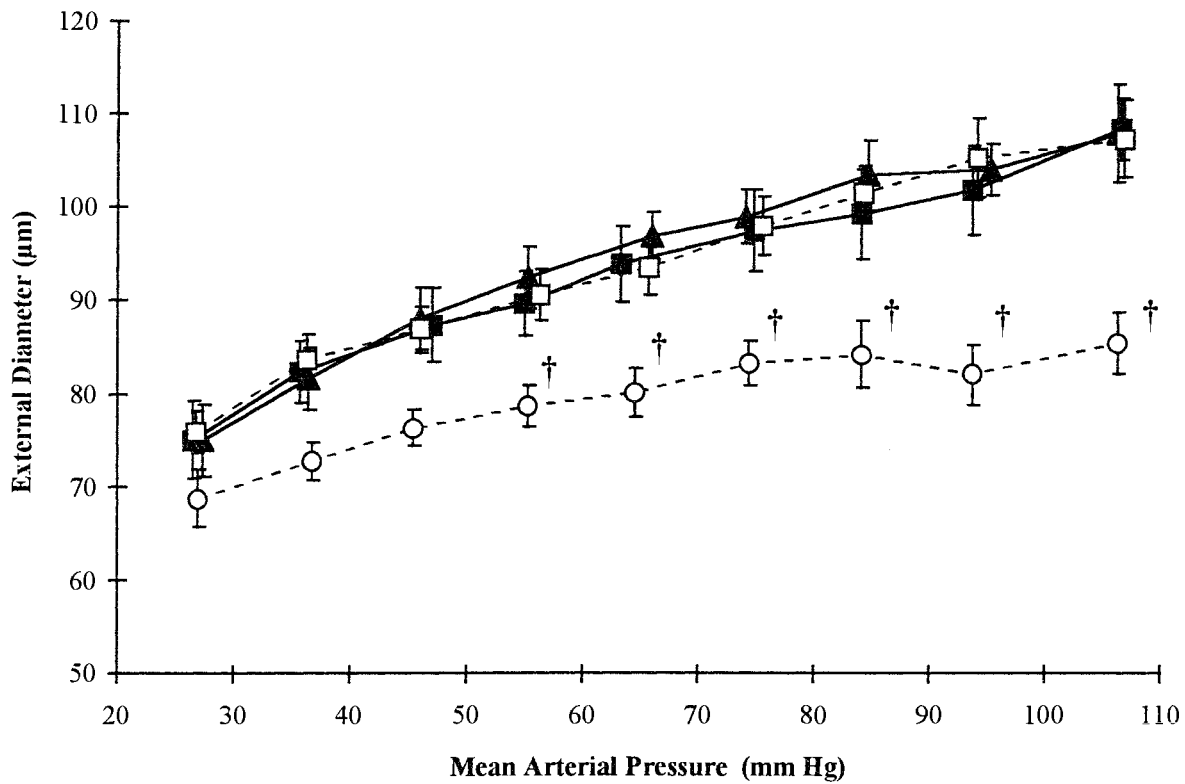


**Table 1:** Baseline values in control, sham, pinealectomized, and pinealectomized plus melatonin rats.

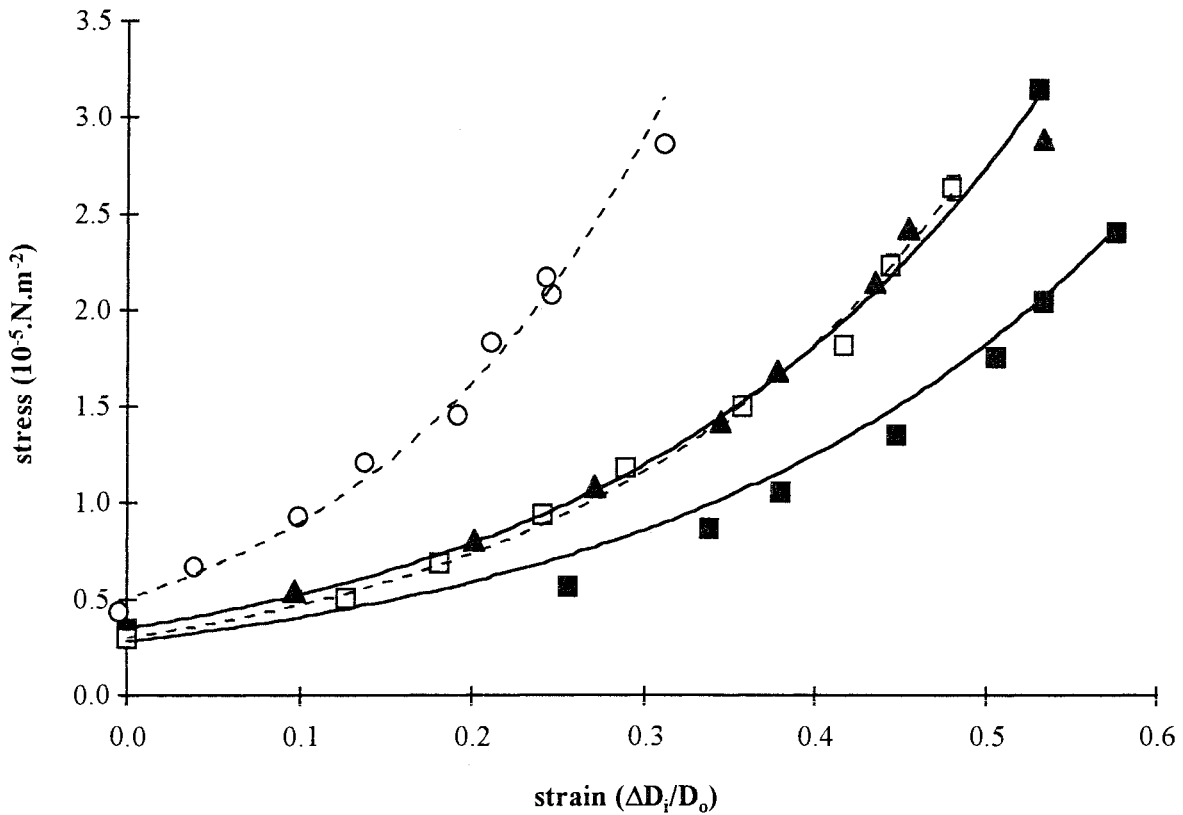
Parameters	Control	Sham	Pinealectomized	Pinealectomized + Melatonin
<i>Baseline Measurements</i>				
Body Weight (g)	455 ± 13	439 ± 7	415 ± 6	427 ± 13
Systemic Arterial Pressure (mmHg)				
systolic	135 ± 3	128 ± 3	131 ± 3	132 ± 5
diastolic	92 ± 3	90 ± 4	88 ± 4	88 ± 3
mean	106 ± 2	104 ± 3	103 ± 4	104 ± 3
pulse	43 ± 4	38 ± 3	43 ± 3	44 ± 6
Arterial Blood Gases				
PaCO <sub>2</sub> (mmHg)	34 ± 1	33 ± 1	34 ± 1	33 ± 1
pH	7.47 ± .01	7.49 ± .01	7.47 ± .01	7.49 ± .01
PaO <sub>2</sub> (mmHg)	86 ± 1	88 ± 2	89 ± 1	94 ± 3
Lower Limit of CBF (mmHg)	40	40	40	40
Security Margin (%)	62	61	61	61
<i>Cerebral Arterioles Prior to EDTA</i>				
Internal Diameter (µm)	50 ± 4	51 ± 3	49 ± 2	53 ± 3
<i>Cerebral Arterioles After EDTA</i>				
Internal Diameter (µm)	99 ± 6	102 ± 4	84 ± 3 <sup>†</sup>	100 ± 4
External Diameter (µm)	105 ± 5	108 ± 4	88 ± 3 <sup>†</sup>	106 ± 3
CSA of Wall (µm <sup>2</sup> )	826 ± 46	819 ± 36	550 ± 34 <sup>†</sup>	924 ± 39
E <sub>T</sub> vs Stress	4.6 ± 0.4	4.4 ± 0.4	6.8 ± 1.0 <sup>†</sup>	4.9 ± 0.8

Measurement of internal diameter prior to deactivation of smooth muscle was obtained at baseline levels of arterial pressure. Measurement of internal diameter after deactivation of smooth muscle by EDTA was made at a mean arterial pressure of 100 to 109 mmHg. External diameter after deactivation of smooth muscle by EDTA was calculated from video measurement of internal diameter at 100 to 109 mmHg mean arterial pressure and histological measurement of cross-sectional area (CSA) of the vessel wall. E<sub>T</sub> vs Stress: slope of tangential elastic modulus (E<sub>T</sub>) versus stress. Values are mean ± s.e.mean in 8 control, 8 sham, 10 pinealectomized, and 9 pinealectomized plus melatonin (0.5 mg.kg<sup>-1</sup> in drinking water) rats.

<sup>†</sup> P ≤ 0.05 vs Control.



Figures 1: Pressure-external diameter relationship in arterioles during maximal dilatation with EDTA (67 mmol/L) in control (full squares,  $n = 8$ ), sham-operated (full triangles,  $n = 8$ ) and pinealectomized rats that were untreated (open circles,  $n = 10$ ) or treated with melatonin (open squares,  $n = 9$ ). Values are means  $\pm$  s.e.mean. †  $P \leq 0.05$  vs control.



**Figure 2:** Stress-strain relationship in arterioles during maximal dilatation with EDTA (67 mmol/L) in control (full squares,  $n = 8$ ), sham-operated (full triangles,  $n = 8$ ) and pinealectomized rats that were untreated (open circles,  $n = 10$ ) or treated with melatonin (open squares,  $n = 9$ ). Values are mean  $\pm$  s.e.mean.  $D_i$  = cerebral arteriolar inner diameter at pressure steps of 130 to 20 mmHg;  $D_o$  = diameter at 20-29 mmHg.

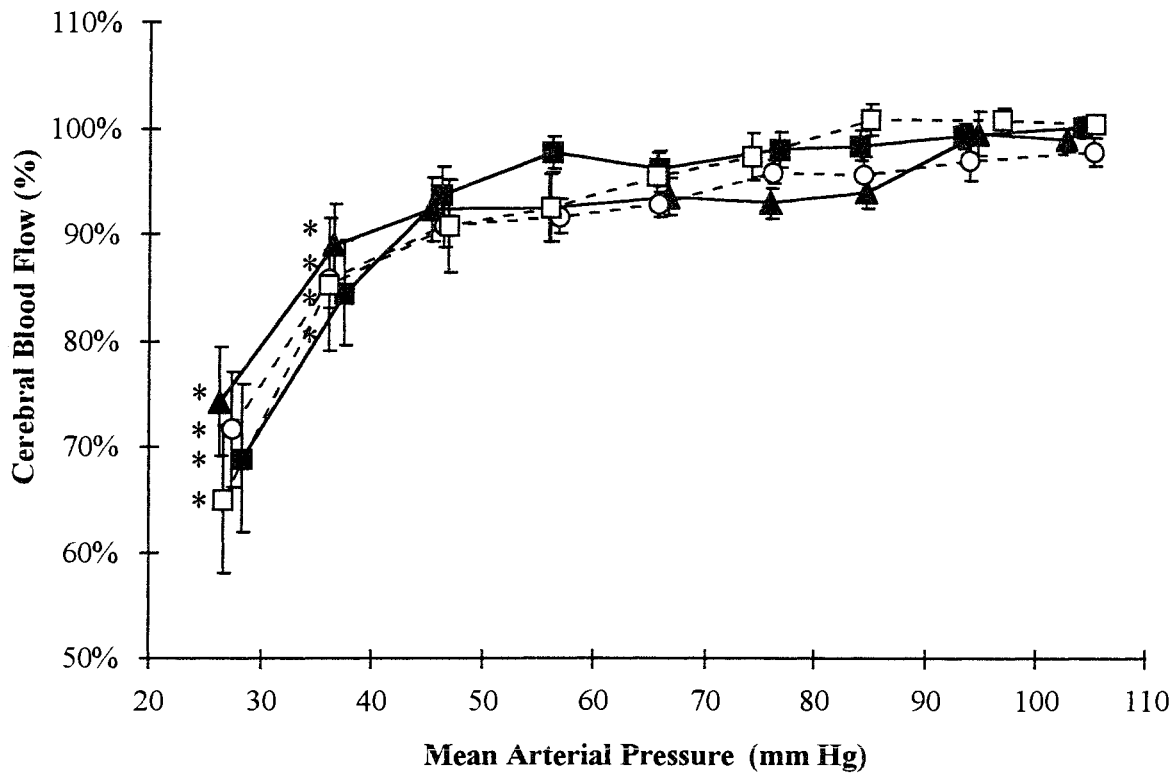
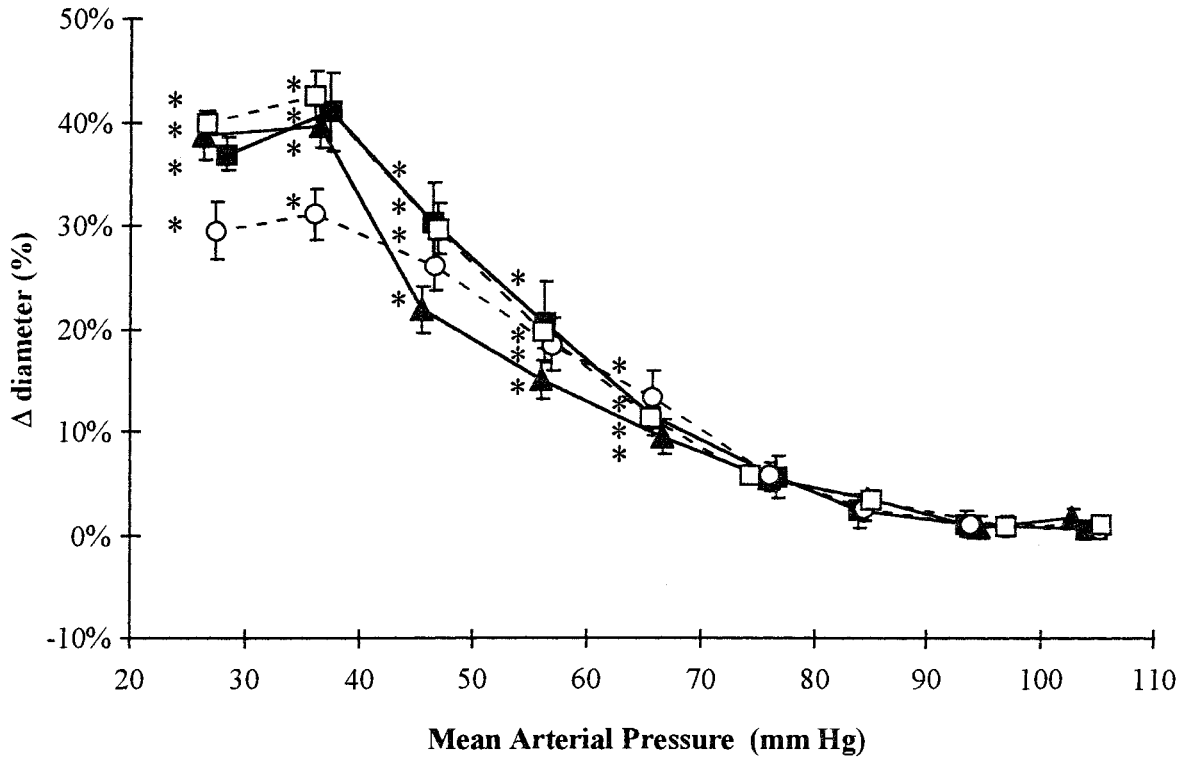


Figure 3: CBF autoregulation during stepwise hypotension in control (full squares,  $n = 8$ ), sham-operated (full triangles,  $n = 8$ ) and pinealectomized rats that were untreated (open circles,  $n = 10$ ) or treated with melatonin (open squares,  $n = 9$ ). CBF values (% baseline,  $\pm$  s.e.mean) are grouped by mean arterial blood pressure ranges of 10 mmHg (20-29 to 100-109 mmHg) (Barry *et al.*, 1982, Lartaud *et al.*, 1993). \*  $P \leq 0.05$  vs baseline values in same group.



**Figure 4:** Pressure-internal diameter relationship in arterioles during hypotensive hemorrhage in control (full squares,  $n = 8$ ), sham-operated (full triangles,  $n = 8$ ) and pinealectomized rats that were untreated (open circles,  $n = 10$ ) or treated with melatonin (open squares,  $n = 9$ ).

Values are mean  $\pm$  s.e.mean. \*  $P \leq 0.05$  vs baseline values in same group.

## **5. Effets bénéfiques de la mélatonine sur la circulation cérébrale du rat âgé**

### **Beneficial effects melatonin on the cerebral circulation of the old rat.**

Olivier Régrigny, Jeffrey Atkinson, Patrick Limiñana, Philippe Delagrange<sup>1</sup>, Elizabeth Scalbert<sup>1</sup>, & Jean-Marc Chillon.

Laboratoire de Pharmacologie Cardiovasculaire (EA 3116), Faculté de Pharmacie de l'Université Henri Poincaré-Nancy I, 5 rue Albert Lebrun, 54000 Nancy and <sup>1</sup> IRIS, 6 place des Pléiades, 92415 Courbevoie Cedex, France

## RESUME

Comme nous l'avons vu dans l'étude précédente, la privation de mélatonine chez des rats jeunes induit des changements structuraux des artérioles cérébrales comparables à ceux retrouvés chez des rats âgés (Hadju et coll., 1990). Cependant, ces altérations structurales et fonctionnelles ne s'accompagnaient pas d'un déplacement de la limite basse de l'autorégulation du DSC. Cette dernière observation peut être due au fait que le laps de temps entre l'opération et l'expérience (1 mois) était trop court pour obtenir des altérations de l'autorégulation du DSC chez des animaux jeunes. Pour s'affranchir de ce handicap, nous avons utilisé des animaux âgés. En effet, comme la production de mélatonine diminue avec l'âge (Sack et coll., 1986), on peut penser que la mélatonine joue un rôle dans les altérations structurelles des artérioles cérébrales associées à l'âge. Si ces altérations structurales et fonctionnelles des artérioles cérébrales s'accompagnent au cours du temps d'un déplacement de la limite basse, la diminution de la production de mélatonine avec l'âge pourrait être un élément important de l'étiologie des démences vasculaires.

Pour vérifier l'implication de la mélatonine dans les modifications structurales des artérioles cérébrales observées au cours du vieillissement, nous avons traité des rats âgés par la mélatonine durant 3 mois. Sur ces animaux, nous avons étudié la structure (épaisseur de la paroi et distensibilité) des artérioles cérébrales que nous avons comparé à celle de rats jeunes et de rats âgés n'ayant pas suivi de traitement chronique à la mélatonine. Afin de voir si la mélatonine améliore les capacités d'autorégulation des rats âgés, nous avons également étudié les capacités d'autorégulation du DSC de ces différents groupes d'animaux.

Les résultats de cette étude nous ont montré que la mélatonine pouvait empêcher, au moins partiellement, les effets du vieillissement sur la structure et la fonction des artérioles cérébrales, permettant ainsi d'améliorer les capacités d'autorégulation du débit sanguin cérébral

des animaux âgés. La mélatonine protégerait les animaux âgés contre les risques d'hypoperfusion cérébrale dus au dépassement des capacités d'autorégulation du débit sanguin cérébral. Cependant, l'absence de modèles animaux d'hypoperfusion cérébrale ne nous permet pas de vérifier expérimentalement cette hypothèse.



**ABSTRACT**

As melatonin is a vasoconstrictor of cerebral arterioles and chronic treatment with vasoconstrictors has a trophic effect on the vascular wall, we examined the effects of chronic treatment with melatonin on cerebral arteriole structure and function and on cerebral blood flow (CBF) autoregulation in old Wistar rats.

Rats were divided into 4 groups: 3 (n=8), 12 (n=9), 24 month-old (n=9) and 24 month-old rats treated for 3 months with melatonin ( $0.4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$ ; n=10). We determined the lower limit of CBF autoregulation (LLCBF) by repeated measurement of CBF (a.u., laser doppler) and mean arterial pressure at baseline, and during stepwise hypotension induced by hemorrhage. Internal arteriolar diameter ( $\mu\text{m}$ , cranial window) was also measured. Cerebral arteriolar stress-strain relationships were studied following restoration of blood volume and deactivation (EDTA,  $67 \text{ mmol/L}$ ), from repeated measurement of internal arteriolar diameter during a second stepwise hypotension and cross-sectional area of the vessel wall (CSA) determined by histology.

Aging reduced the maximal vasodilatory capacity of cerebral arterioles ( $23 \pm 4\%$  vs  $41 \pm 4\%$ ;  $P < 0.05$ ), shifted LLCBF to higher value ( $80 \text{ mmHg}$  vs  $40 \text{ mmHg}$ ) and reduced the security margin of the CBF autoregulation ( $44$  vs  $62\%$ ). CSA was also reduced ( $500 \pm 27$  vs  $826 \pm 47 \mu\text{m}^2$ ;  $P < 0.05$ ); the stress-strain curve was steeper and the tangential elastic modulus higher ( $8.1 \pm 0.6$  vs  $4.6 \pm 0.4 \cdot 10^{-5} \text{ N/m}^2$ ;  $P < 0.05$ ). Melatonin partially restored vasodilatory capacity ( $44 \pm 5\%$ ), LLCBF ( $60 \text{ mmHg}$ ), security margin ( $41\%$ ), CSA ( $643 \pm 34 \mu\text{m}^2$ ) and tangential elastic modulus ( $5.5 \pm 0.3 \cdot 10^{-5} \text{ N/m}^2$ ).

In conclusion, treatment with melatonin reduced age-linked atrophy of the cerebral arteriole wall, restored passive distensibility and increased the security margin of CBF autoregulation.

**KEYWORDS:** cerebral circulation; blood flow; mechanics; hemorrhage

## INTRODUCTION

With age, the LLCBF is shifted to a higher blood pressure value (Lartaud *et al.*, 1993), following structural and functional changes such as atrophy and a decrease in distensibility of the arteriolar wall (Hadju *et al.*, 1990) which reduce the vasodilatory capacity of the arterioles. The shift in the LLCBF produces a reduction in the security margin (degree to which pressure may fall before CBF starts to decrease (Lartaud *et al.*, 1993)). This, associated with an increase in blood pressure variability (Zito *et al.*, 1991), may contribute to vascular dementia (Shuaib, 1992, Skoog, 1998). We recently reported that, in young rats, melatonin vasoconstricts cerebral arterioles *via* activation of MT<sub>1</sub> and/or MT<sub>2</sub> membrane receptors (Régrigny *et al.*, 1999) and shifts the LLCBF to a lower pressure value (Régrigny *et al.*, 1998). As membrane receptors trigger intracellular responses (Machesky and Hall, 1996) leading to cellular hypertrophy (Finkel, 1999), we speculated that chronic treatment of old rats with melatonin prevents vascular wall atrophy and the decrease in passive distensibility as well as the shift in LLCBF. We therefore undertook the present study to examine the effects of 3 months' treatment with melatonin on cerebral arteriolar structure and mechanics, and on the LLCBF in old rats.

## METHODS

### *Animals and operative procedures.*

Experiments were performed on male Wistar rats (Ico: WI, IOPS AF/Han; Iffa-Credo, l'Arbresle, France) divided into 4 groups: 3 (n = 8), 12 (n = 9), 24 month-old rats (n = 9) and 24 month-old rats treated for 3 months with melatonin (0.4 mg.kg<sup>-1</sup>.day<sup>-1</sup> in the drinking water; n = 10).

The melatonin (6 mg.L<sup>-1</sup>; 0.1% v/v ethanol) solution was prepared three times a week. Untreated rats received a solvent. Water consumption and body weight were measured weekly.

Animals were allowed free access to food and fluid, housed at 24°C and exposed to 12 hours' light (6 a.m. to 6 p.m.). Experiments were performed in accordance with the guidelines of the French Ministry of Agriculture (permits 54-4 and 03575).

After 3 months' of treatment, we determined the lower limit of CBF autoregulation and the structure and mechanics of cerebral arterioles. Animals were anesthetized with sodium pentobarbital (60 mg.kg<sup>-1</sup>, i.p.) at 9 a.m. A polyethylene cannula (Merck Biotrol, Chennevieres, France) was introduced into the left femoral artery, and connected to a low volume, strain-gauge transducer (Baxter, Bentley Laboratories, Europe) for measurement of blood pressure and heart rate. A second polyethylene cannula was introduced into the right femoral artery to withdraw blood for measurement of arterial blood gases and the production of hypotension. A silicone catheter (Sigma Medical, Nanterre, France) was introduced into a femoral vein and connected to a pump (Bioblock Scientific, Paris, France) for infusion of sodium pentobarbital (0.25 ml.h<sup>-1</sup>; 20 mg.kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) to maintain anesthesia. Animals were intubated and mechanically ventilated with room air (60 strokes per minutes; 10 ml.kg<sup>-1</sup>). Paralysis of skeletal muscles was obtained with gallamine triethiodide (20 mg.kg<sup>-1</sup> i.v., repeated every hour). Because the animals were paralyzed, the depth of anesthesia was periodically evaluated by applying pressure to the tail and observing changes in heart rate and blood pressure. Rectal temperature was maintained at 37-38°C with a heating pad.

#### *Measurement of arteriolar diameter.*

We measured internal diameter in first order arterioles of the cerebrum (Harper and Bohlen, 1984) through an open skull preparation (Chillon *et al.*, 1996, 1997). The head was placed in an adjustable head holder. A 1 cm incision was made in the skin to expose the skull. Ports were placed for inflow and outflow of artificial cerebrospinal fluid (CSF). Craniotomy was performed over the left parietal cortex, and the dura was incised to expose cerebral

vessels. The exposed brain was continuously suffused with artificial CSF, warmed to 37-38° C and equilibrated with a gas mixture of 5% CO<sub>2</sub>-95% N<sub>2</sub>. The composition of the CSF was (mmol/L) KCl, 3.0; MgCl<sub>2</sub>, 0.6; CaCl<sub>2</sub>, 1.5; NaCl, 131.9; NaHCO<sub>3</sub>, 24.6; urea, 6.7; and glucose, 3.7 (Chillon *et al.*, 1996, 1997).

Arteriolar diameter was monitored through a microscope (Stemi 200-C, Carl Zeiss Jena GMBH, Jena, Germany) connected to a closed-circuit video system with a final magnification of x400. Images were digitized using a video frame grabber and arteriolar diameter measured using image analysis software (Saisam<sup>®</sup>, Microvision Instruments, Evry, France). The precision of this system is 0.5 μm.

#### *Measurement of cerebral blood flow.*

CBF was measured by laser doppler flowmetry using a 1.2 mm diameter probe (BLF 21, Transonic Systems Inc., Ithaca, NY, USA). (Fujii *et al.*, 1991b) CBF was expressed as arbitrary units or as percentage (of baseline) change in CBF (during stepwise hypotension).

CBF, arterial pressure, heart rate and blood gas values were grouped by categories over mean arterial pressure ranges of 10 mmHg (Barry *et al.*, 1982). One-way ANOVA between pressure ranges was performed and the lower limit of CBF autoregulation defined as the lower limit of the lowest mean arterial blood pressure range in which CBF was not significantly less than baseline CBF. The security margin (%), which indicates the degree to which mean arterial pressure may fall before CBF starts to decrease, was defined as ((baseline mean arterial blood pressure - lower limit of cerebral blood flow autoregulation) x 100) divided by baseline mean arterial blood pressure (Lartaud *et al.*, 1993).

### *Experimental protocol.*

Thirty minutes after completion of surgery, cerebral arteriolar diameter was measured at baseline. Stepwise hypotension (10 mmHg per step) down to 20-30 mmHg was induced by controlled withdrawal of blood. At each step, systemic pressure, arteriolar diameter, CBF and blood gases were measured 1 min. after the fall in blood pressure. After the final step, blood was re-injected to restore blood pressure.

Vascular smooth muscle was then deactivated by suffusion of cerebral vessels with artificial CSF containing EDTA (67 mmol/L), which produces complete deactivation of smooth muscle in cerebral arterioles (Baumbach *et al.*, 1988b). Pressure-diameter relationships were obtained in deactivated cerebral arterioles between mean arterial pressures of 130 and 20 mmHg, using hemorrhage to reduce pressure in steps of 10 mmHg. At each pressure step, arteriolar diameter reached a steady state within 15 sec. and internal diameter was measured 30 sec. later. After the final pressure step, blood was re-injected to restore pressure. Arterioles were fixed *in vivo* by suffusion with glutaraldehyde (2.25% v/v glutaraldehyde in 0.10 mol/L cacodylate buffer) and were considered to be adequately fixed when blood flow ceased. The animal was killed by sodium pentobarbital overdose, the arteriolar segment removed and embedded in paraffin.

The cross-sectional area (CSA) of the arteriolar wall was determined on 7  $\mu\text{m}$  sections using the video image analyzing system described above. Luminal and total (lumen plus vessel wall) CSA of the arteriole were measured by tracing the luminal and outer edges of the vessel wall. CSA of the vessel wall was calculated by subtraction of luminal CSA from total CSA.

$$\text{CSA} = \text{Total CSA} - \text{Luminal CSA}$$

### *Calculations.*

The assumptions upon which we based calculations of circumferential stress, circumferential strain and tangential elastic modulus have been described in detail previously

(Baumbach *et al.*, 1988b, 1991). It should be noted, however, that in the present experiments, as in previous experiments (Régrigny *et al.*, 2000), systemic arterial pressure, and not pial arteriolar pressure, was used.

Circumferential stress ( $\sigma$ ) was calculated from systemic arterial pressure (P), inner diameter of cerebral arterioles ( $D_i$ ), and wall thickness (WT):  $\sigma = (P \times D_i)/(2WT)$ . Systemic blood pressure was converted from mmHg to Newtons.m<sup>2</sup> (1 mmHg = 1.334 x 10<sup>2</sup> N/m<sup>2</sup>). Wall thickness was calculated from cross-sectional area of the vessel wall (CSA) and inner cerebral arteriolar diameter:  $WT = [(4CSA/\pi + D_i^2)^{1/2} - D_i]/2$ . External diameter of cerebral arterioles ( $D_e$ ) was calculated as:  $D_e = D_i + 2WT$ . Histological determination of cross-sectional area was used in all calculations of wall thickness and circumferential stress. Circumferential strain ( $\epsilon$ ) was calculated as  $\epsilon = (D_i - D_o)/D_o$ , where  $D_o$  is original diameter (= diameter at 20-29 mmHg of pressure).

The stress-strain data from each animal were fitted to an exponential curve ( $\sigma = \sigma_o e^{\beta\epsilon}$ ) using least squares analysis where  $\sigma_o$  is stress at the original diameter and  $\beta$  is a constant related to the rate of increase of the stress-strain curve. Tangential elastic modulus ( $E_T$ ) was calculated as the tangent of the exponential curve:  $E_T = d\sigma/d\epsilon = \beta\sigma_o e^{\beta\epsilon}$ .

#### *Substances used.*

Gallamine triethiodide and melatonin were purchased from Sigma Chemical Company (St Louis, MO, USA), nitrogen and carbon dioxide from Air Liquide (Nancy, France), sodium pentobarbital from Sanofi Santé Animale (Libourne, France) and KCl, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, NaCl, NaHCO<sub>3</sub>, urea and glucose from Merck KGaA (Darmstadt, Germany).

### *Statistical analysis.*

Results are expressed as means  $\pm$  s.e.mean. The experimental protocol was designed for the use of a one-way ANOVA (3, 12, 24 months, and 24 months treated with melatonin). Significant differences between means were determined using the Bonferroni test. One-way ANOVA using the variable "mean arterial blood pressure range" was performed separately for each treatment group for the analysis of values obtained following hypotensive hemorrhage. The probability level chosen was  $P \leq 0.05$ .

## RESULTS

### *Baseline values (Table 1)*

Body weight increased significantly between 3 and 12 months and remained stable thereafter; melatonin did not modify body weight. Heart rate, blood pressure, pH and blood gases were similar in all groups. Cerebral arteriolar internal diameter prior to deactivation with EDTA was not influenced by aging or melatonin. CSA decreased with age in rats, treatment with melatonin increased CSA in 24 month-old rats to a value similar of 12 month-old rats.

### *Vascular Mechanics*

Following deactivation of cerebral arterioles with EDTA, external diameter was significantly less in 24 month-old rats than in 3 month-old rats at mean arteriolar pressures between 100 and 60 mmHg (Table 1 and Figure 1). The stress-strain curve was shifted to the left (Figure 2) and the tangent elastic modulus vs stress was significantly higher (Table 1). Thus, passive distensibility was decreased with age. Treatment with melatonin attenuated this age-linked shift of the stress-strain curve (Figure 2) and the increase in the tangent elastic modulus vs stress (Table 1).

*Lower limit of cerebral blood flow, security margin and dilatation of cerebral arterioles*

Following hypotensive hemorrhage in 3 month-old rats, CBF remained constant until the 30-39 pressure range and then significantly decreased; the lower limit of CBF autoregulation was 40 mmHg (Figure 3) and the security margin 62% (Table 1). The lower limit of CBF autoregulation increased with age (Figure 3 and Table 1) and as mean arterial pressure was similar in all groups, the security margin decreased with age (Table 1). Treatment of 24 month-old rats with melatonin decreased the lower limit of CBF autoregulation (Figure 3 and Table 1) and the security margin (Table 1) in to values similar to those observed in 12 month-old rats.

Hypotension-induced dilatation of cerebral arterioles occurred at an increasingly lower pressure step with age (60-69 mmHg, 50-59 mmHg and 40-49 mmHg in 3, 12 and 24 month-old rats respectively, Figure 4). Maximal dilatation was observed at a pressure step of 30-39 mmHg regardless of age, but was significantly less in 24 month-old rats ( $41 \pm 4\%$ ,  $34 \pm 5\%$  and  $23 \pm 4\%$  in 3, 12 and 24 month-old rats respectively, Figure 4). After treatment with melatonin hypotension-induced dilatation of cerebral arterioles occurred at a higher pressure step (60 mmHg) and maximal dilatation was similar to that measured in 3 month-old rats ( $44 \pm 5\%$ , Figure 4).

**DISCUSSION**

The present study shows that the cerebral arteriolar wall undergoes atrophy with age and that its passive distensibility falls. The lower limit of CBF autoregulation is shifted to a higher pressure level and this reduces the security margin. Melatonin treatment of old rats restores CSA, distensibility and CBF autoregulation.



*Effects of melatonin on cerebral arteriole structure and mechanics*

In the present experiment aging is associated in rats with cerebral arteriolar vascular wall atrophy and increases in passive distensibility as previously described (Hadju *et al.*, 1990). Furthermore, the structural and mechanical alterations observed with aging in rats are similar to the alterations observed after pinealectomy in young rats. As melatonin production decreases with age, it is somewhat tempting to speculate that this decrease contribute to the development of atrophy in old rats (Sack *et al.*, 1986). This may in part be support by our finding in this experiment that vascular wall atrophy was prevented by melatonin. However, we have to remain cautious as such a finding does not in and of itself confer a cause-and-effect relationship between melatonin deprival and vascular wall atrophy.

Assuming that changes in wall thickness are mainly due to changes in smooth muscle mass, there are several mechanisms by which melatonin could modify smooth muscle cell proliferation. Three of those potential mechanisms (stimulation of growth factor pathways *via* cross talk mechanisms, increases in pial arteriolar pulse pressure, antiapoptotic effects of melatonin) have already been discussed in the previous paper. Melatonin could also modify cell growth by interacting with other potential trophic factors. For example, melatonin may decrease estrogen receptors expression (Ram *et al.*, 1998, Ram *et al.*, 2000), decrease apoptosis indirectly by decreasing glucocorticoid receptors (Sainz *et al.*, 1999) or modulate sympathetic output (Carneiro *et al.*, 1994) and thus indirectly induce vascular wall hypertrophy. Future studies should be performed to determine the effective concentration of melatonin for trophic effects, if this effect is a direct one on smooth muscle cells and it is receptor-mediated.

Distensibility of cerebral arterioles decreases in old rats. This may be due to a reduction in the proportion of compliant (smooth muscle, elastin and endothelium) to stiff (collagen and basement membrane) components as previously reported by Hadju *et al* (1990).

*Effects of melatonin on the lower limit of cerebral blood flow autoregulation*

In the present experiment, aging induced a shift of the lower limit of CBF autoregulation. This result is similar to those reported by Lartaud *et al* (1993) and Toyoda *et al* (1997a). This shift may be explained by the fact that the vasodilatory reserve (defined as the difference between baseline diameter and maximal diameter during hypotensive hemorrhage) decreased with aging. This reduction in the vasodilatory reserve may be linked to the decrease in passive distensibility observed in cerebral arterioles of aged rats. To our knowledge however, there is no direct link established between distensibility and vasoconstriction and/or vasodilatation of cerebral arterioles. How the decrease in distensibility may contribute to the shift of the lower limit of CBF autoregulation towards higher blood pressure values in old rats remain to be investigated. Furthermore, similar structural and functional alterations in young pinealectomized rats were not accompanied by an increase of the lower limit of cerebral blood flow autoregulation.

Melatonin treatment increased vasodilatory reserve and so shifted the lower limit of CBF autoregulation to a lower blood pressure. As this shift occurred in the absence of any change in mean arterial pressure, the security margin of cerebral blood flow was increased. Effects of melatonin on the vasodilatory reserve and on the lower limit of CBF autoregulation may be related to its effect on distensibility of cerebral arteriolar vessel wall but, once again, there is no evidences yet for such a relationship. At least another explanation can be put forward to explain the effects of melatonin on vasodilatory reserve and the lower limit of CBF autoregulation. Several studies suggest that endothelial factors play a role in cerebral

autoregulation (Kobari *et al.*, 1994; Jones *et al.*, 1999). Melatonin, a free radicals scavenger, may improve endothelium-dependent dilatation, and thus may improve autoregulatory dilatation and shift the lower limit of cerebral blood flow autoregulation towards lower level of blood pressure values. However, we have to remain cautious with this interpretation as others have reported that endothelial factors do not influence cerebral autoregulation (Faraci *et al.*, 1989; Takahashi *et al.*, 1995).

### *Conclusion and implications*

Aging induces atrophy of the cerebral arteriole wall associated with a decrease in passive distensibility. These changes may contribute to the decrease of the lower limit of cerebral blood flow autoregulation. As these structural and mechanical alterations were reversed by melatonin treatment, the lower limit of cerebral blood flow autoregulation in aged rats was decreased to that of 12 month-old rats.

As melatonin production decreases with age (Sack *et al.*, 1986), this may be an important element of the age-associated alteration in structure and mechanics of cerebral arterioles and the shift of the lower limit of CBF autoregulation. This increase in the lower limit of CBF autoregulation with aging, associated with an increase in blood pressure variability (Zito *et al.*, 1991), may contribute to vascular dementia in aging (Shuaib, 1992; Skoog, 1998). Thus, the decrease in melatonin production with age may play an important role in the etiology of vascular dementia.

## ACKNOWLEDGMENTS

This study was funded by grants from the French Ministry of Education, Research and Technology (EA3116, Paris, France), the Regional Development Committee (Metz, France), the Greater Nancy Urban Council (Nancy, France), Henri Poincaré University (Nancy, France) and the Institut de Recherches Internationales Servier (Courbevoie, France).

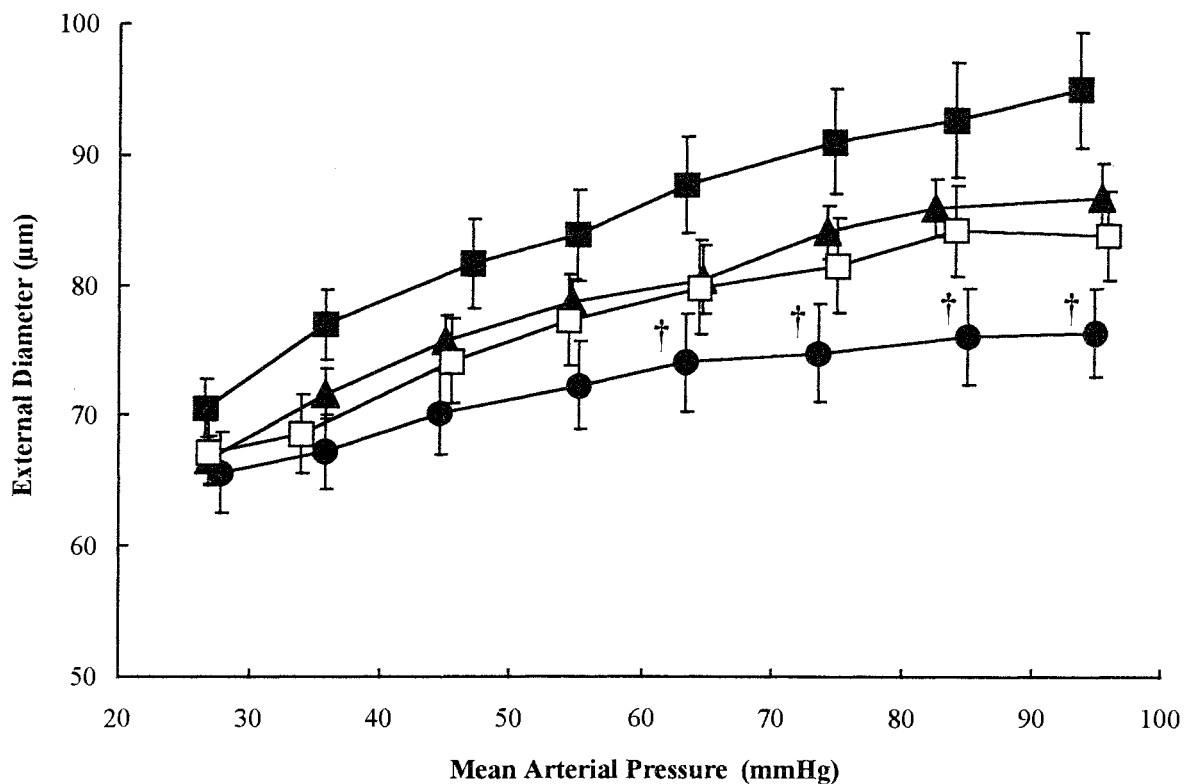
**Table 1:** Baseline values in 3-, 12-, and 24-month old rats, and 24-month old rats treated with melatonin.

	3 m	12 m	24 m	24 m + Melatonin
Number of animals (N)	8	9	9	10
<i>Baseline Measurements</i>				
Body Weight (g)	382 ± 11	626 ± 29*	640 ± 30*	643 ± 34*
Systemic Arterial Pressure (mmHg)				
systolic	135 ± 3	134 ± 4	128 ± 3	126 ± 5
diastolic	92 ± 3	95 ± 5	87 ± 2	88 ± 4
mean	106 ± 2	108 ± 5	102 ± 3	102 ± 4
pulse	43 ± 4	39 ± 3	41 ± 2	40 ± 3
<i>Arterial Blood Gases</i>				
PaCO <sub>2</sub> (mmHg)	34 ± 1	33 ± 1	32 ± 1	33 ± 1
pH	7.47 ± .01	7.48 ± .01	7.49 ± .01	7.50 ± .01
PaO <sub>2</sub> (mmHg)	90 ± 2	93 ± 4	92 ± 2	90 ± 1
Lower Limit of CBF autoregulation (mmHg)	40	60	80	60
Security Margin (%)	62	44	21	41
Cerebral Arteriole Internal Diameter (µm) Prior to EDTA	43 ± 2	43 ± 1	39 ± 2	39 ± 2
<i>Cerebral Arterioles morphology After EDTA</i>				
Internal Diameter (µm)	89 ± 5	82 ± 3	72 ± 3*	79 ± 4
External Diameter (µm)	95 ± 4	87 ± 2	76 ± 3*	84 ± 3
CSA of Wall (µm <sup>2</sup> )	826 ± 47	616 ± 20*	500 ± 27* <sup>†</sup>	643 ± 34*
E <sub>T</sub> vs Stress	4.6 ± 0.4	5.2 ± 0.7	8.1 ± 0.6*	5.6 ± 0.8

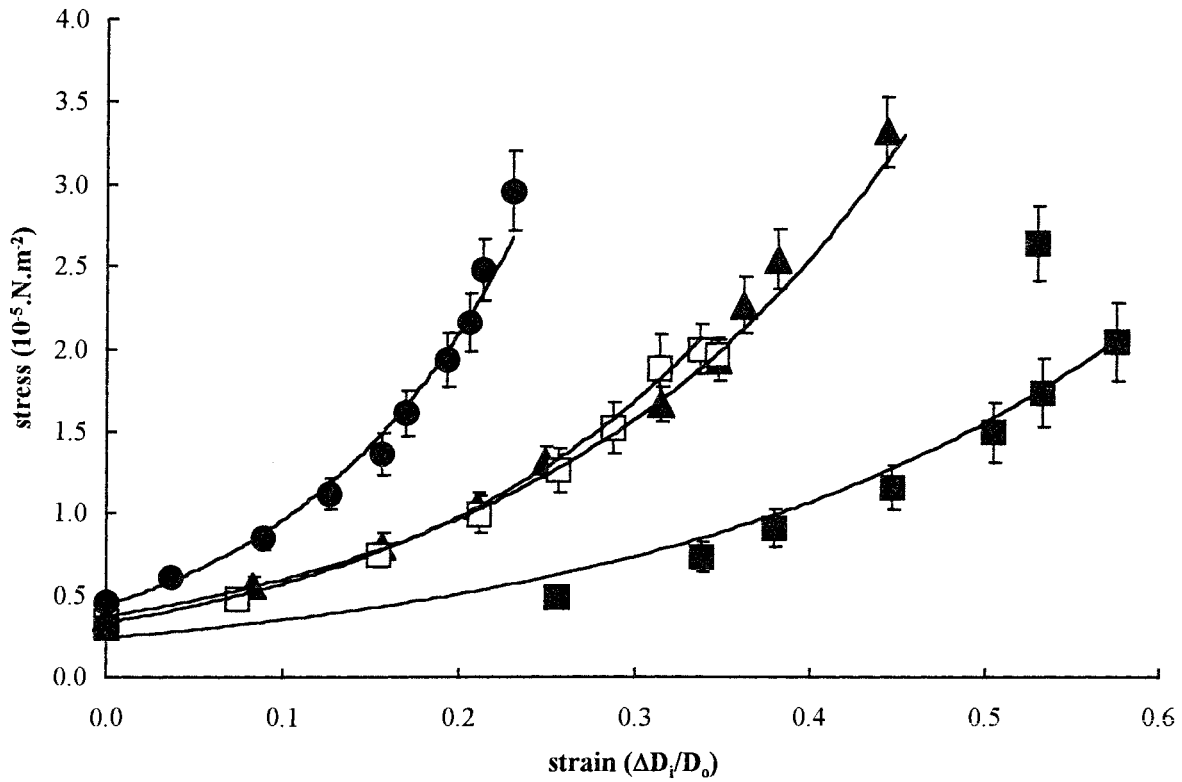
Measurement of internal diameter prior to deactivation of smooth muscle was obtained at baseline levels of arterial pressure. Measurement of internal diameter after deactivation of smooth muscle by EDTA was made at a mean arterial pressure of 90 to 99 mmHg. External diameter after deactivation of smooth muscle by EDTA was calculated from video measurement of internal diameter at a mean arterial pressure of 90 to 99 mmHg and histological measurement of cross-sectional area (CSA) of the vessel wall. E<sub>T</sub> vs Stress: slope of tangential elastic modulus (E<sub>T</sub>) versus stress. Values are mean ± s.e.mean.

\* P ≤ 0.05 vs 3 months.

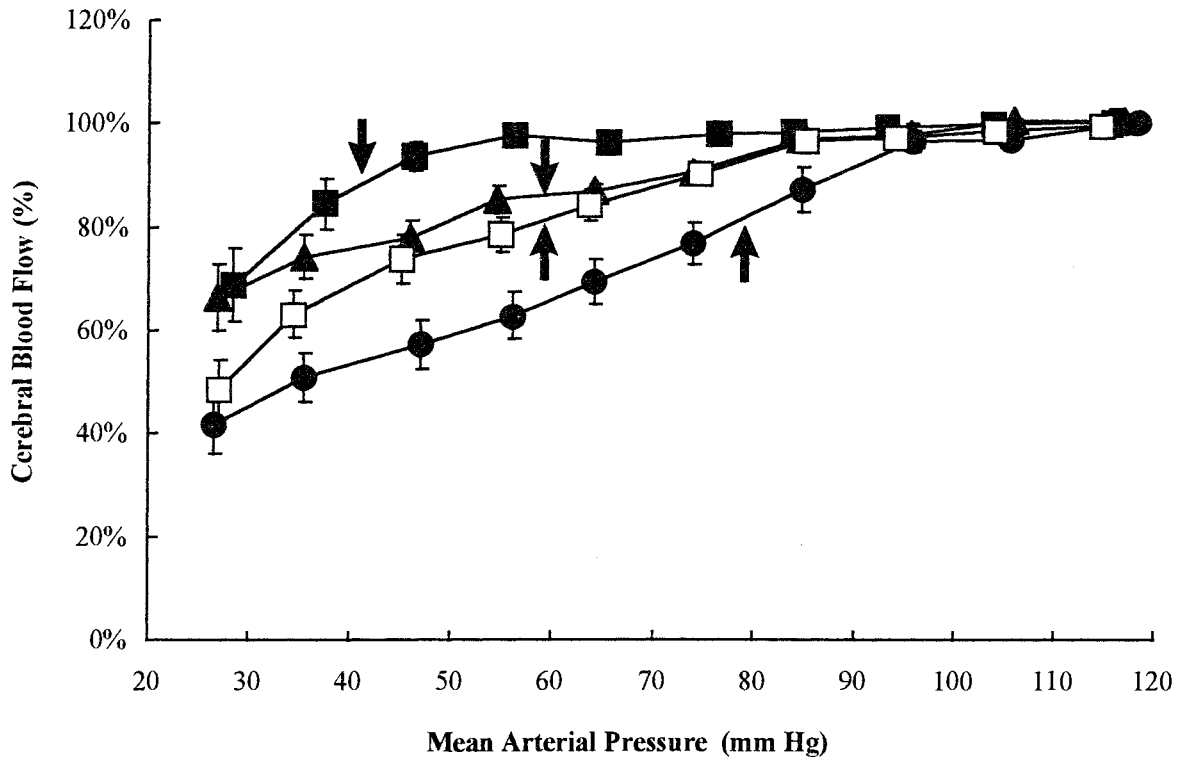
† P ≤ 0.05 vs 12 months.



Figures 1: Pressure-external diameter relationship in arterioles during maximal dilatation with EDTA (67 mmol/L) in 3 (full squares,  $n = 8$ ), 12 (full triangles,  $n = 9$ ) and 24 month-old rats (full circles,  $n = 9$ ) and 24 month-old rats treated for 3 months with melatonin (open squares,  $n = 10$ ). Values are mean  $\pm$  s.e.mean. †  $P \leq 0.05$  vs 3 month old.

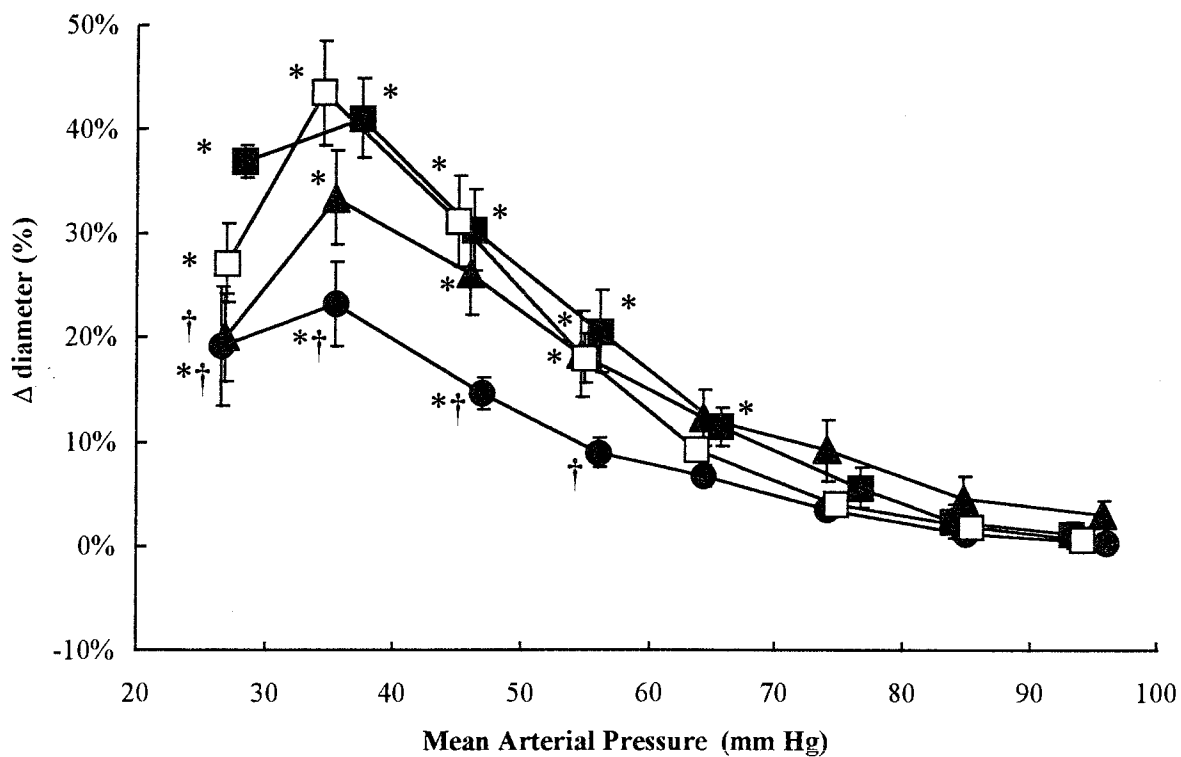


Figures 2: Stress-strain relationship in arterioles during maximal dilatation with EDTA (67 mmol/L) in 3 (full squares,  $n = 8$ ), 12 (full triangles,  $n = 9$ ) and 24 month-old rats (full circles,  $n = 9$ ) and 24 month-old rats treated for 3 months with melatonin (open squares,  $n = 10$ ). Values are mean  $\pm$  s.e.mean.  $D_i$  = cerebral arteriolar inner diameter at pressure steps of 130 to 20 mmHg;  $D_o$  = diameter at 20-29 mmHg.



**Figure 3:** CBF autoregulation during stepwise hypotension in 3 (full squares,  $n = 8$ ), 12 (full triangles,  $n = 9$ ) and 24 month-old rats (full circles,  $n = 9$ ) and 24 month-old rats treated for 3 months with melatonin (open squares,  $n = 10$ ). CBF values (% baseline,  $\pm$  s.e.mean) are grouped by mean arterial blood pressure ranges of 10 mmHg (20-29 to 100-109 mmHg) (Barry *et al.*, 1982, Lartaud *et al.*, 1993). Arrows show the lower limit of cerebral blood flow autoregulation.





**Figure 4:** Pressure-internal diameter relationship in arterioles during hypotensive hemorrhage in 3 (full squares,  $n = 8$ ), 12 (full triangles,  $n = 9$ ) and 24 month-old rats (full circles,  $n = 9$ ) and 24 month-old rats treated for 3 months with melatonin (open squares,  $n = 10$ ). Values are mean  $\pm$  s.e.mean. \*  $P \leq 0.05$  vs baseline values in same group. †  $P \leq 0.05$  vs 3 month old.

## **Chapitre III: Discussion**

## **1. Effets aigus de la mélatonine**

Dans les trois premières études présentées ici, nous nous sommes intéressés aux effets aigus de la mélatonine sur le système cérébro-vasculaire, et en particulier aux effets sur les artérioles cérébrales et sur l'autorégulation du DSC.

### **1.1. Effets aigus de la mélatonine sur les artérioles cérébrales**

Au cours de ce travail nous avons mis en évidence une action vasoconstrictrice de la mélatonine sur les artérioles cérébrales, et ce de 2 façons :

- Méthode indirecte : une perfusion intraveineuse de mélatonine diminue le DSC d'un rat éveillé sans modifier sa pression artérielle moyenne (voir Chapitre II-1), ce qui est un indice d'une constriction du système cérébro-vasculaire.
- Méthode directe : la technique de la fenêtre crânienne nous a permis d'observer l'effet constricteur de la mélatonine suite à une perfusion *i.v.* (voir Chapitre II-2) ou à une superfusion directement dans la fenêtre crânienne (voir Chapitre II-3).

Cet effet constricteur de la mélatonine sur les artérioles cérébrales est dose dépendant ( $EC_{50}$  de  $3,0 \pm 0,1 \cdot 10^{-8}$  M) et du à la stimulation des récepteurs  $MT_1$  et/ou  $MT_2$  (inhibition par le luzindole qui est un antagoniste de ces récepteurs). Les récepteurs  $MT_1$  et/ou  $MT_2$  sont associés à des protéines  $G_{i/o}$ . On peut émettre comme hypothèse que la stimulation de ces protéines G va entraîner une fermeture des  $BK_{Ca^{2+}}$ , soit directement, soit indirectement suite à inhibition de l'adénylate cyclase avec réduction de la concentration intracellulaire en AMPc (Figure 1). La fermeture des  $BK_{Ca^{2+}}$  aboutit à une dépolarisation, entraînant ainsi une constriction des artérioles cérébrales.

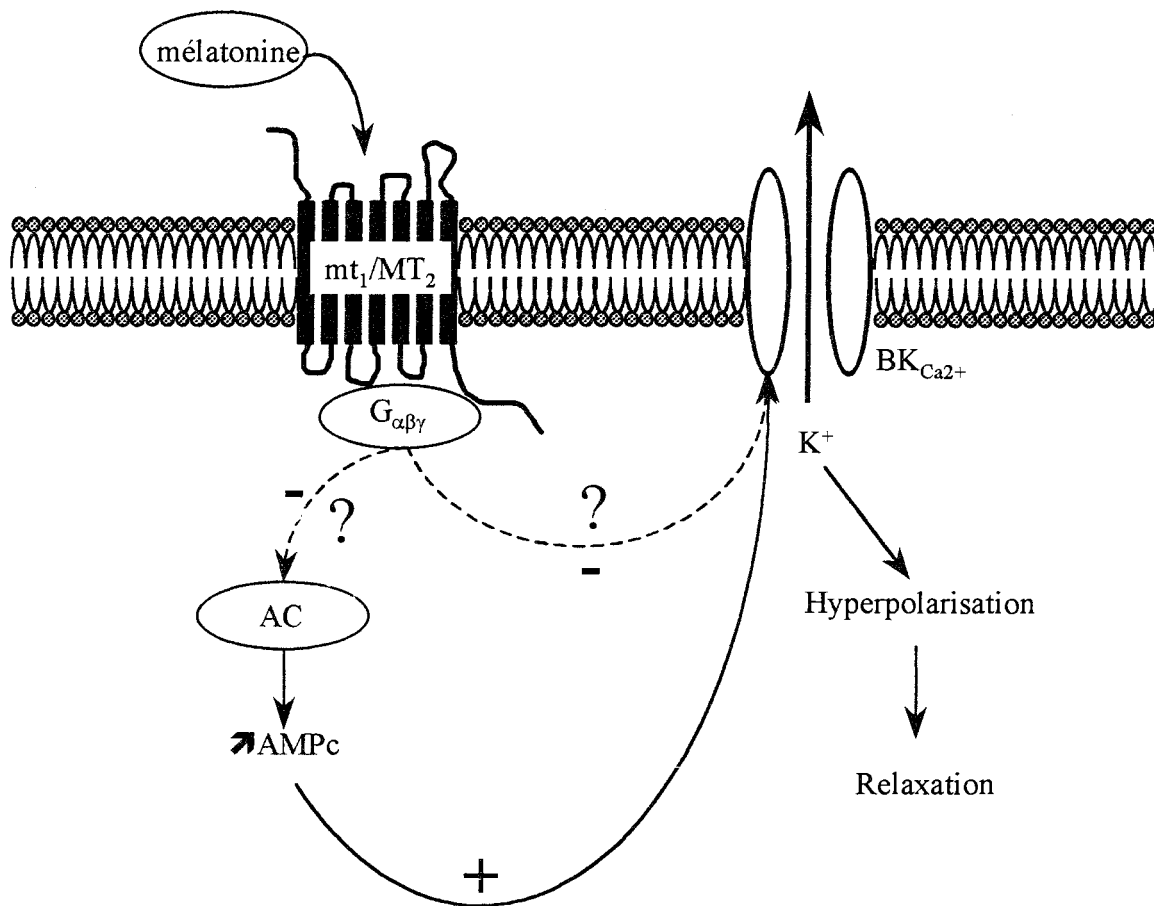


Figure 1 : Hypothèse du mécanisme d'action intracellulaire de la mélatonine au niveau des artérioles cérébrales aboutissant à la contraction. AC = Adénylate Cyclase. ;  $AMP_c$  = Adénosine Monophosphate cyclique ;  $G_{\alpha\beta\gamma}$  = Protéine G hétérotrimérique. .

Quel que soit le mécanisme mis en jeu dans la vasoconstriction des artérioles cérébrales par la mélatonine, les résultats obtenus suggèrent l'intervention d'autres éléments lors d'une perfusion *i.v.* de mélatonine. En effet, si la vasoconstriction observée suite à une perfusion *in situ*, directement dans la fenêtre crânienne, est dose-dépendante (voir Chapitre II-3), tel n'est pas le cas lors d'une perfusion *i.v.* En effet, au lieu d'observer une augmentation de la constriction avec la dose supérieure, nous avons observé une diminution. Une première explication possible de ce résultat est que la faible dose utilisée dans cette expérience soit déjà une dose supramaximale. Une autre explication repose sur le modèle de segmentation

vasculaire précédemment décrit (voir Chapitre I-0). En effet, d'après ce modèle, une constriction des larges artères cérébrales entraîne une dilatation compensatrice en amont pour maintenir le DSC constant. Or la mélatonine, lorsqu'elle est administrée par voie *i.v.*, contracte non seulement les artérioles cérébrales mais également les artères de plus grand diamètre telles que les artères cérébrales moyennes (Mahle et coll., 1995, Geary et coll., 1997). La réponse des artérioles cérébrales à une administration *i.v.* de mélatonine serait donc la résultante d'un effet direct, vasoconstricteur, de la mélatonine sur les artérioles cérébrales et d'un effet indirect, vasodilatateur, suite à la constriction des artères plus larges en aval par la mélatonine.

Cette hypothèse est renforcée par les résultats obtenus dans l'expérience décrite dans le Chapitre II-0. Dans cette expérience la mélatonine est administrée en perfusion *i.v.* et peut donc exercer son action vasoconstrictrice sur les artères et artérioles cérébrales. Par contre, le luzindole, superfusé dans la fenêtre crânienne, antagonise l'action vasoconstrictrice de la mélatonine uniquement sur les artérioles cérébrales. Nous avons alors observé une vasodilatation de ces artérioles cérébrales suite à la perfusion *i.v.* de la forte dose de mélatonine. Cette vasodilatation peut être due à la fixation de la mélatonine sur d'autres récepteurs que les récepteurs MT<sub>1</sub> et/ou MT<sub>2</sub> ou peut être induite par la vasoconstriction des artères d'influx situées en amont. Cette vasodilatation indirecte aurait alors pour but de maintenir le DSC constant. La variation de diamètre des artérioles cérébrales suite à la perfusion de mélatonine serait donc la somme de l'effet vasoconstricteur direct de la mélatonine et d'une dilatation due à l'autorégulation du DSC. Cependant, pour confirmer cette hypothèse, l'observation de tous les « étages » du système cérébrovasculaire est nécessaire.

## 1.2. Effets aigus de la mélatonine sur l'autorégulation du débit sanguin cérébral

La vasoconstriction induite par les effets aigus de la mélatonine n'est pas sans conséquence sur les capacités d'autorégulation du DSC. En effet, suite à une administration *i.v.* de mélatonine, nous avons observé une réponse vasodilatatrice plus importante du système cérébro-vasculaire suite à une baisse de pression artérielle moyenne (Figure 2). Au moins 2 hypothèses peuvent être proposées pour expliquer cette augmentation des vasodilatations induites par une diminution de la pression artérielle moyenne :

- Les artères cérébrales étant contractées, leur réserve de dilatation est plus importante. Ceci explique que le maximum de dilatation est plus important dans les artères ayant reçus de la mélatonine que dans les autres (voir Figure 3 Chapitre II-2).
- Les  $BK_{Ca^{2+}}$  sont impliqués dans la dilatation des artéioles cérébrales durant l'autorégulation du DSC (voir Chapitre I-1.2.4.2.). En les fermant, la mélatonine permet une plus grande sensibilité à l'hypotension, et donc une dilatation plus importante des artéioles cérébrales en réponse à l'hypotension.

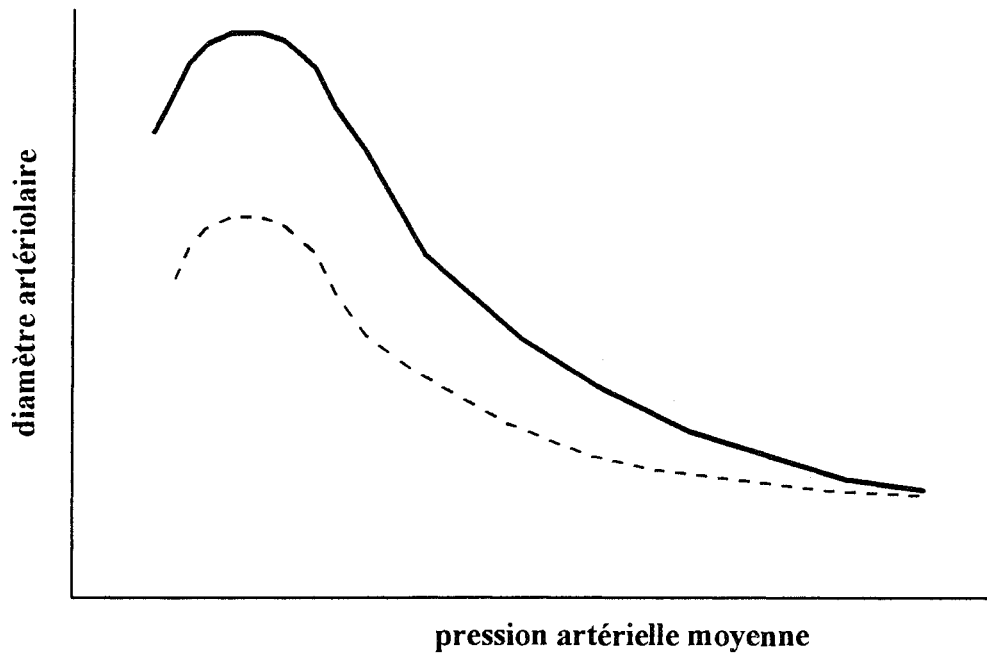


Figure 2 : Courbe de dilatation des artérioles cérébrales en fonction de la pression artérielle moyenne sans mélatonine (trait pointillé) et avec mélatonine (trait plein).

Cette augmentation de la réserve de dilatation des artérioles cérébrales face à une chute de pression artérielle moyenne se traduit par un déplacement de la limite basse d'autorégulation du débit sanguin cérébral vers des valeurs inférieures de pression artérielle. Comme cette réduction s'effectue sans diminution de pression artérielle moyenne, il en résulte une augmentation de la marge de sécurité de l'autorégulation du débit sanguin cérébral (Figure 3).

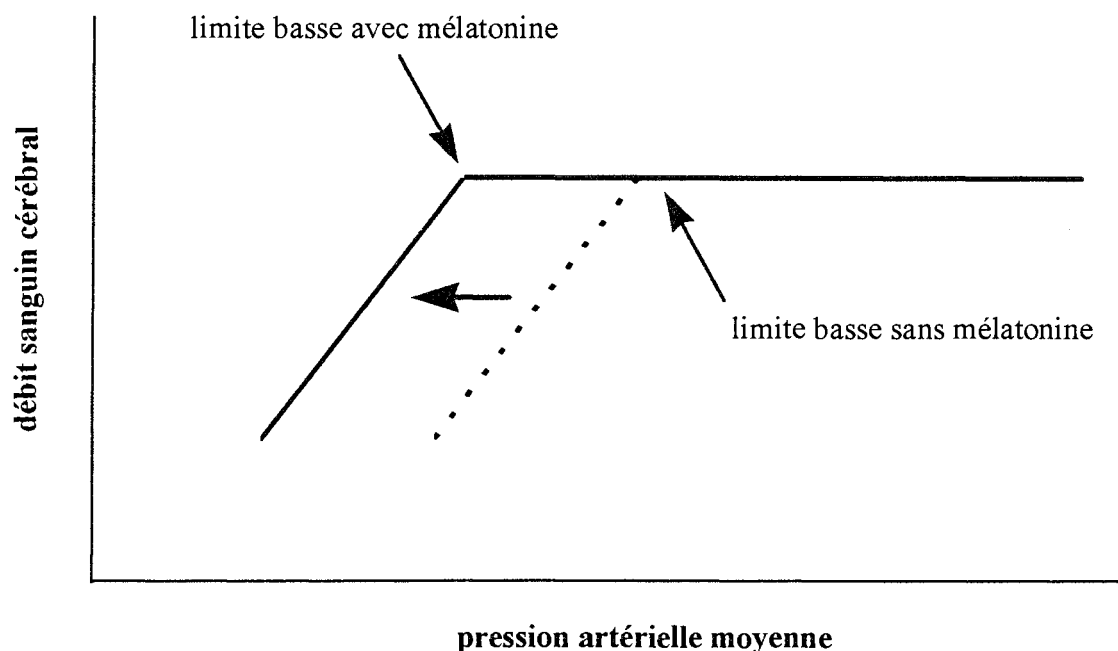


Figure 3 : Effet de la mélatonine sur la limite basse d'autorégulation du débit sanguin cérébral.

Il est important de constater que la mélatonine a des effets sur le débit sanguin cérébral à des concentrations plasmatiques physiologiques. En effet, la concentration plasmatique en mélatonine dans les groupes contrôle et placebo est similaire aux valeurs photophasiques mesurées chez le rat (10 à 50  $\text{pg.ml}^{-1}$ ) (Lewy et coll., 1979), et la concentration plasmatique en mélatonine du groupe faible dose est proche des valeurs scotophasiques (100 à 300  $\text{pg.ml}^{-1}$ ) (Lewy et coll., 1979). Cela suggère que la mélatonine pourrait induire chez l'animal un cycle circadien d'autorégulation du débit sanguin cérébral.

Ces observations qui tendent à démontrer un effet positif de la mélatonine suite à une administration aiguë sont cependant à moduler. En effet, l'administration *i.v.* de mélatonine induit également, en tout cas chez les animaux éveillés, une diminution du DSC. Par conséquent, le gain réel en débit sanguin cérébral, lors de l'hypotension, est faible voir nul (voir tableau 1 Chapitre II-1). Ainsi, les effets protecteurs de l'administration aiguë de mélatonine sur l'ischémie cérébrale rapportés par d'autres auteurs (Mesenge et coll., 1998) ne semble pas,



dans ce cas, être dus au déplacement de la limite basse de l'autorégulation du DSC mais probablement plus à l'effet antioxydant de la mélatonine décrit dans l'introduction bibliographique (voir Chapitre I-2.4.3.). En effet, les radicaux libres sont supposés être responsables des dommages tissulaires dans l'ischémie (Coyle et Puttfarcken, 1993). La mélatonine par son action antioxydante (Tan et coll., 1994), empêche les dégâts cellulaires dus aux radicaux libres. Ainsi la mélatonine, en aigu, protégerait le cerveau non pas de la survenue de l'ischémie mais des conséquences de celle-ci. Cependant, encore une fois cette observation est à moduler puisque certains auteurs ont observé les effets antioxydants de la mélatonine que pour des doses supérieures aux doses physiologiques (Scwerynek et coll., 1995, Duell et coll., 1998).

## **2. Effets chroniques de la mélatonine**

Dans les deux dernières études de ce travail, nous avons étudié les effets chroniques de la mélatonine sur le système cérébro-vasculaire. En effet, nous avons démontré que la mélatonine est un vasoconstricteur. Beaucoup de vasoconstricteurs (e.g. l'endothéline (Du et coll., 1996)) peuvent également exercer des effets trophiques sur la paroi vasculaire (notamment par des mécanismes de « cross talk »). Nous avons donc voulu savoir s'il en était de même pour la mélatonine. En effet, si tel est le cas, la diminution de la concentration plasmatique de mélatonine au cours du vieillissement (Sack et coll., 1986) pourrait contribuer à l'atrophie de la paroi des artérioles cérébrales apparaissant avec l'âge (Hadju et coll., 1990).

### **2.1. Effets chroniques de la mélatonine sur les artérioles cérébrales**

Nous avons étudié les effets chroniques de la mélatonine sur les artérioles cérébrales de deux façons. Tout d'abord nous avons voulu savoir si une suppression de la production de mélatonine endogène chez des animaux jeunes pouvait provoquer des effets sur la structure et la fonction des artérioles cérébrales comparables à ceux du vieillissement (Chapitre II-4). Dans cette expérience, pour nous assurer que les altérations observées étaient bien consécutives à la privation de la mélatonine et non à d'autres facteurs dus aux traumatismes opératoires ou à la pinéalectomie, nous avons également étudié des rats opérés mais non pinéalectomisés et des rats pinéalectomisés traités par la mélatonine. Suite à ces premiers résultats, nous avons regardé si ce traitement chronique à la mélatonine sur des rats âgés pouvait empêcher la dégradation de la structure et de la fonction des artérioles cérébrales observée avec l'âge (Chapitre II-5).

La Figure 4 schématise les effets de la pinéalectomie et du vieillissement sur la structure des artérioles cérébrales. La privation de mélatonine après la pinéalectomie induit chez

l'individu jeune une atrophie associée à une diminution de la distensibilité de la paroi de l'artériole cérébrale. Ces effets peuvent être attribués à la réduction de la concentration plasmatique en mélatonine puisqu'aucune altération structurale ou fonctionnelle n'est observée chez les animaux opérés non pinéalectomisés et chez les animaux pinéalectomisés traités par la mélatonine. Les altérations structurales au niveau des artérioles cérébrales observées chez les rats pinéalectomisés sont similaires à celles observées au cours du vieillissement (Hadju et coll., 1990). En effet, le vieillissement induit également une atrophie de la paroi et une diminution de la distensibilité des artérioles cérébrales. Tout comme pour la pinéalectomie, un traitement chronique à la mélatonine reverse au moins partiellement les altérations structurales des artérioles cérébrales des rats âgés. Etant donné que la production de mélatonine diminue avec l'âge (Sack et coll., 1986), il est tentant de spéculer que cette diminution des taux plasmatiques de mélatonine au cours du vieillissement participe au développement des altérations structurales observées au niveau des artérioles cérébrales des rats âgés. Cependant les travaux présentés ici ne nous permettent pas d'établir un lien de cause à effet entre diminution de la production de mélatonine et altérations structurales des artérioles cérébrales. Très probablement, la mélatonine n'est pas le seul facteur impliqué dans la dégradation des artérioles cérébrales au cours du vieillissement.

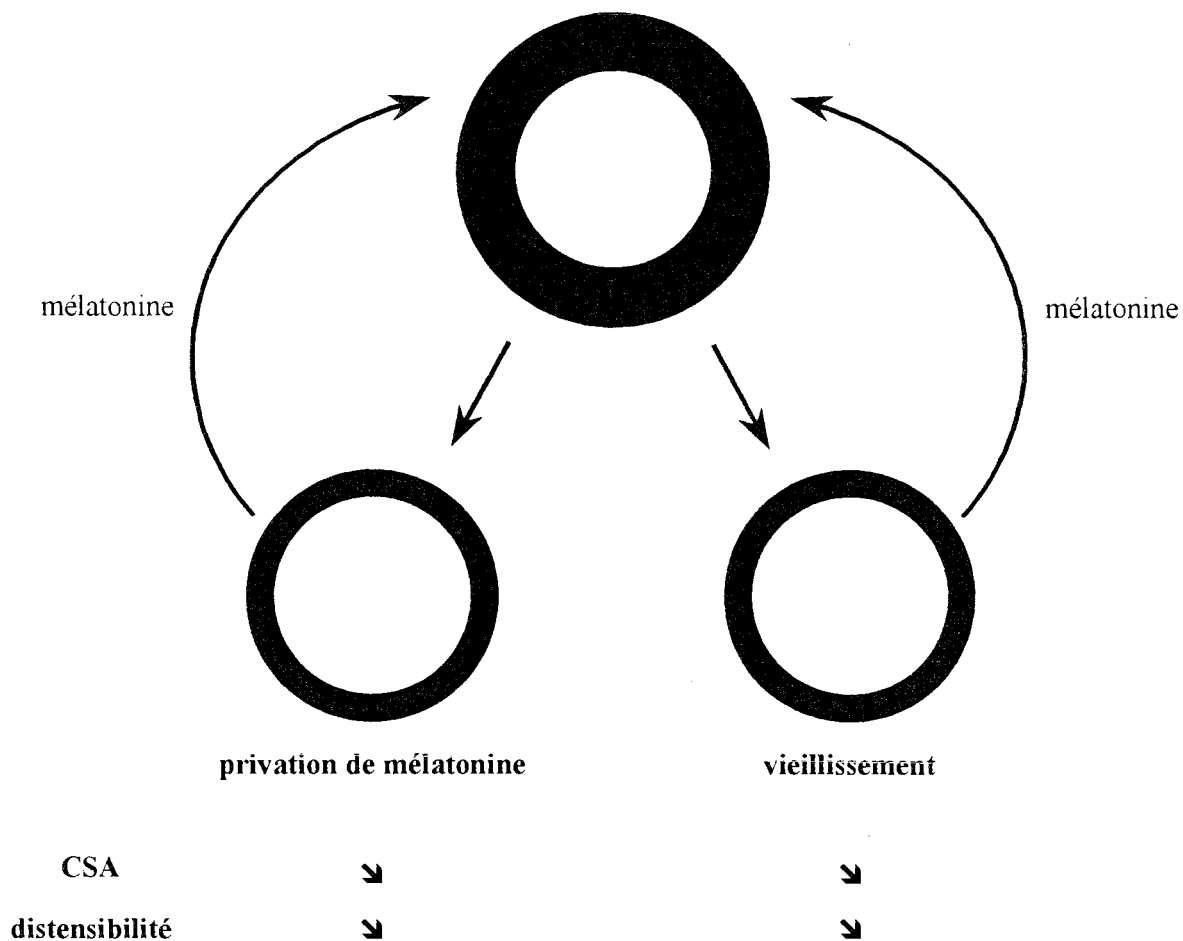


Figure 4 : Effet chronique de la mélatonine sur les artérioles cérébrales.

Nous n'avons pas, à l'heure actuelle de résultats pour expliquer l'effet trophique de la mélatonine sur la paroi des artérioles cérébrales. Ce mécanisme pourrait reposer sur un « cross-talk » comme déjà décrit pour beaucoup d'autres vasoconstricteurs. Un tel « cross-talk » pourrait faire suite à la diminution d'AMP<sub>c</sub> observée après la fixation de la mélatonine sur les récepteurs MT<sub>1</sub> et/ou MT<sub>2</sub>. En effet, une diminution du taux d'AMP<sub>c</sub> entraîne une stimulation des Rho-kinases qui elles-mêmes, vont par une cascade intracellulaire stimuler la prolifération cellulaire (Seasholtz et coll., 1999). Cette hypothèse reste à valider et d'autres voies intracellulaires peuvent être mis en jeu. Ainsi la Figure 1 pourrait se compléter comme suit.

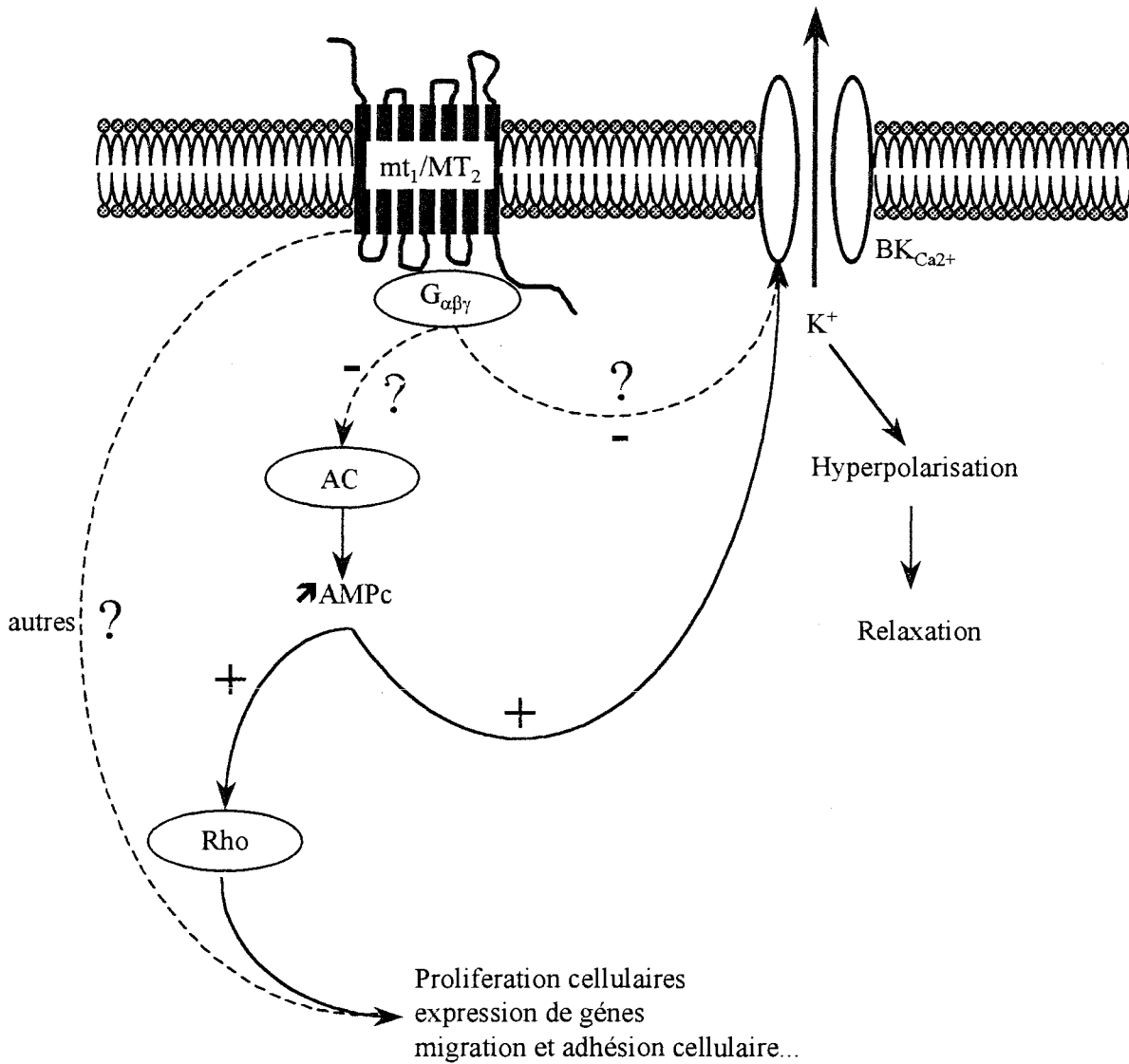


Figure 5 : Hypothèse sur le mécanisme d'action intracellulaire de la mélatonine au niveau des artérioles cérébrales aboutissant à la contraction et au remodelage de la paroi vasculaire. AC = Adénylate Cyclase ; AMP<sub>c</sub> = Adénosine Monophosphate cyclique ; Rho = Rho kinase ; G<sub>αβγ</sub> = Proteine G hétérotrimérique

Finalement, nous ne pouvons pas rejeter un effet trophique de la mélatonine sur la paroi des vaisseaux cérébraux suite à une augmentation de la pression artérielle dans les artérioles cérébrales. L'administration, aussi bien aiguë que chronique, de mélatonine n'entraîne pas d'augmentation de la pression artérielle systémique. Nous n'avons cependant pas de mesure de la pression artérielle dans les artérioles cérébrales pour nous assurer que cela est également vrai dans la circulation cérébrale. Une augmentation de la pression et notamment de la pression pulsatile dans ces artérioles peut induire une hypertrophie de la paroi vasculaire (Baumbach, 1996)

## **2.2. Effets chroniques de la mélatonine sur l'autorégulation du débit sanguin cérébral**

Les résultats obtenus quant aux effets chroniques de la mélatonine sur la limite basse de l'autorégulation du débit sanguin cérébral sont plus contrastés. En effet, la pinéalectomie, bien que produisant les mêmes altérations structurales et fonctionnelles que le vieillissement, n'induit ni une diminution de la réserve de vasodilatation ni un déplacement de la limite basse de l'autorégulation du débit sanguin cérébral. Par contre, la réserve de vasodilatation est augmentée et la limite basse de l'autorégulation du débit sanguin cérébral est diminuée chez des rats âgés traités par la mélatonine (Figure 6). Cette différence pourrait être due à des taux plasmatiques de mélatonine différents au cours des expériences (donc à des effets aigus de la mélatonine présent dans certains groupes et pas dans d'autres). Cela est peu probable cependant puisqu'au moment de l'expérimentation, quel que soit le groupe considéré, la concentration de mélatonine plasmatique doit être très faible chez les animaux traités. En effet, les mesures sont effectuées environ 4 à 5 heures après l'arrêt du traitement. La mélatonine ayant une demi-vie de moins de 30 minutes (Mallo et coll., 1990), la concentration plasmatique de mélatonine exogène est donc divisée par plus de 1000. Par conséquent, l'augmentation de la réserve de dilatation face à une chute de pression des artérioles cérébrales observée chez les

rats âgés est probablement due à des changements constitutifs. On peut penser que cela est à relier aux changements structuraux et en particulier à l'amélioration de la distensibilité induit par la mélatonine (voir paragraphe précédent). Nous ne pouvons pas cependant avec nos résultats expérimentaux rejeter d'autres mécanismes tels que, par exemple, une augmentation de la quantité de NO suite à un effet antioxydant de la mélatonine. En effet, certains auteurs ont suggéré que le NO pouvait intervenir dans la vasodilatation observée au cours de l'autorégulation du DSC (Kobari et coll., 1994 ; Jones et coll., 1999).

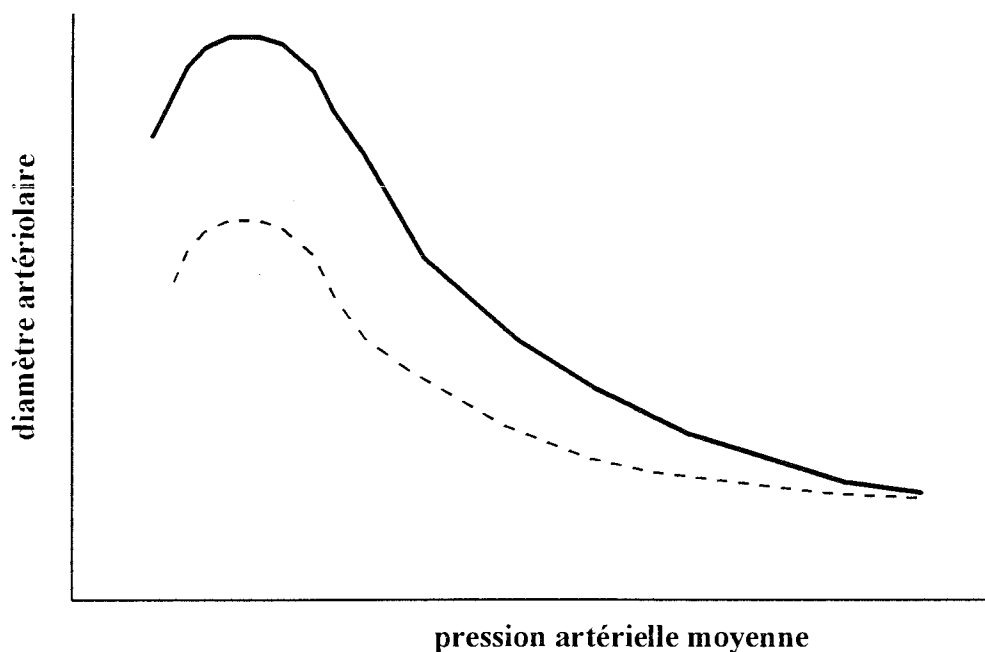


Figure 6 : Effet d'un traitement chronique à la mélatonine (trait plein) sur la courbe de dilatation des artérioles cérébrales en fonction de la pression artérielle moyenne par rapport à l'absence de traitement à la mélatonine (trait pointillé).

Cette augmentation de la réserve de dilatation des artérioles cérébrales face à une baisse de la pression artérielle moyenne aboutit à un déplacement de la limite basse d'autorégulation du débit sanguin cérébral vers valeurs inférieures de pression artérielle moyenne chez les rats

âgés. Comme cela se fait sans diminution de pression artérielle moyenne il y a augmentation de la marge de sécurité de l'autorégulation du débit sanguin cérébral (Figure 7).

Mais, contrairement à ce qui se passe lors d'un traitement aigu à la mélatonine, on peut penser que cela ne s'accompagne pas d'une diminution du DSC de base. En effet, d'après la loi de Poiseuille, comme la pression artérielle moyenne et le diamètre interne de base des artérioles cérébrales ne change pas, le DSC de base doit être identique. Un traitement chronique à la mélatonine induit donc un gain en débit face à une chute de pression artérielle. La mélatonine, en traitement chronique, protège donc le cerveau contre les risques d'hypoperfusion dus au dépassement de la limite basse d'autorégulation du DSC.

Il faut noter cependant que la pinéalectomie chez des rats jeunes, ne modifie pas leur capacité d'autorégulation du DSC et ce malgré la diminution de distensibilité des artérioles cérébrales.

Ceci peut être dû au fait que les animaux jeunes témoins ayant une capacité d'autorégulation du DSC extrêmement importante (limite basse d'autorégulation = 40 mm Hg), les animaux jeunes pinéalectomisés aient suffisamment de réserve de vasodilatation pour compenser une éventuelle réduction suite à la diminution de leur distensibilité. On peut alors penser qu'une privation de mélatonine d'une durée plus importante, provoque un déplacement de la limite basse d'autorégulation comme dans le cas du vieillissement. Cela reste à vérifier.

Par ailleurs, à notre connaissance, il n'existe aucune étude démontrant qu'une diminution de la distensibilité des artérioles cérébrales conduise à une diminution de la réserve de vasodilatation au cours de l'autorégulation. Cette diminution de la distensibilité se traduit certes par une réduction de la vasodilatation maximale comme montré par les relations diamètre externe-pression moyenne systémique ou par les valeurs de diamètres internes dans les différents groupes de rats des études pinéalectomies ou vieillissement (étude 4 et 5 du



chapitre II). Cependant, rien ne démontre qu'une diminution de la vasodilatation à un stimulus induisant une réponse maximale tel que l'EDTA se traduise nécessairement par une réduction de la réponse vasodilatatrice à des stimulus submaximaux tels que des réductions de pression artérielle moyenne systémique.

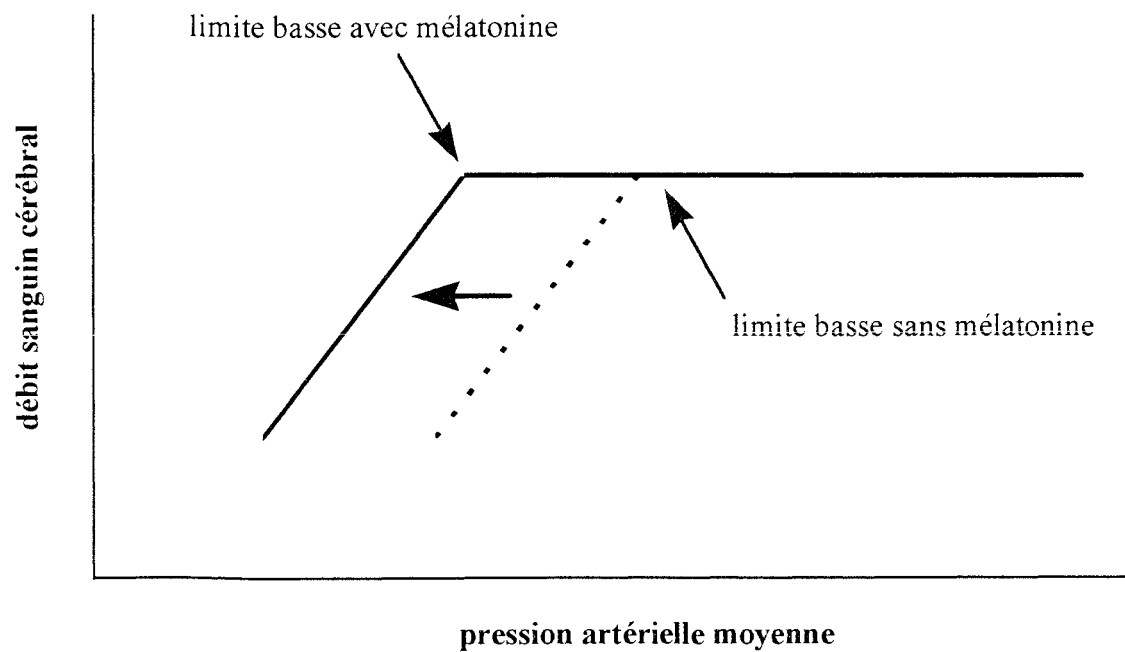


Figure 7 : Effet d'un traitement chronique à la mélatonine sur la limite basse d'autorégulation du débit sanguin cérébral.

**Conclusion générale et perspectives**

**cliniques**

De nombreux éléments nous ont laissé envisager l'existence d'un lien entre le système mélatoninergique et le système cérébro-vasculaire. Par exemple, la concentration plasmatique en mélatonine diminue avec l'âge (Touitou et coll., 1981) parallèlement à l'augmentation du risque d'accident vasculaire cérébral (AVC). De plus, la mélatonine possède des récepteurs sur les artères du système cérébro-vasculaire et elle constrict les artères du polygone de Willis (Mahle et coll., 1995, Geary et coll., 1997) et diminue le DSC de base de jeunes rats (Capsoni et coll., 1996).

Il est donc envisageable que la mélatonine puisse avoir une influence sur la circulation cérébrale et en particulier sur l'autorégulation du DSC. Les études expérimentales citées dans ce travail de thèse, avaient pour but d'étudier le lien éventuel entre la mélatonine et l'autorégulation du DSC.

Nous avons établi un lien entre la mélatonine et l'autorégulation du DSC, en démontrant que :

- La mélatonine est un vasoconstricteur direct des artérioles cérébrales ( $EC_{50}$  de  $3,0 \pm 0,1 \cdot 10^{-8}$  M). Cet effet vasoconstricteur est médié par l'inhibition des canaux  $BK_{Ca^{2+}}$  suite à l'activation des récepteurs  $MT_1$  et/ou  $MT_2$ .
- Suite à la constriction du système cérébro-vasculaire par la mélatonine, les réserves de dilatation face à une baisse de la pression artérielle moyenne sont accrues. Cela induit un déplacement de la limite basse d'autorégulation du DSC vers des valeurs inférieures de pression artérielle moyenne. Comme ce déplacement de la limite basse se fait sans diminution de la pression artérielle moyenne de l'animal, la marge de sécurité de l'autorégulation du DSC est augmentée. Ainsi, la mélatonine augmente les capacités d'autorégulation des animaux face à une chute de pression, les protégeant ainsi contre les risques d'hypoperfusion cérébrale.

- La mélatonine possède des effets trophiques sur la paroi des artérioles cérébrales. En effet, la suppression de la mélatonine chez des animaux jeunes aboutit à une atrophie de la paroi vasculaire, alors qu'un traitement chronique à la mélatonine chez des animaux âgés, aboutit à une augmentation de l'épaisseur de la paroi vasculaire. Nous n'avons pas déterminé la voie de signalisation intracellulaire de cet effet de la mélatonine. On peut cependant supposer qu'elle agit par un mécanisme de "cross talk" avec les Rho-kinases. Grâce à cet effet trophique, la mélatonine peut empêcher, au moins partiellement, les effets du vieillissement sur la structure et la fonction des artérioles cérébrales, permettant ainsi d'améliorer les capacités d'autorégulation du débit sanguin cérébral des animaux âgés.

Grâce à ces effets sur la circulation cérébrale, la mélatonine pourrait avoir un effet protecteur contre les démences séniles par infarctus multiples d'origine vasculaire.

En effet comme nous l'avons vu, une diminution des capacités d'autorégulation du DSC face à une chute de pression artérielle est observée avec l'âge et ce aussi bien chez le rat (Lartaud et coll., 1993) que chez l'Homme (Wollner et coll., 1979), c'est à dire que la limite basse de l'autorégulation du débit sanguin cérébral est déplacée vers des valeurs supérieures de pression artérielles moyennes. Ce déplacement de la limite basse de l'autorégulation du DSC en absence d'augmentation de la pression artérielle moyenne diminue la marge de sécurité. Dans le même temps, la labilité tensionnelle augmente (Zito et coll., 1991). L'association de ces deux phénomènes au cours du vieillissement aboutirait à une augmentation de la probabilité d'hypoperfusions cérébrales dues au simple dépassement de la limite basse d'autorégulation. Or chez l'homme âgé, la répétition d'événements d'hypoperfusion cérébrale, pourrait être à l'origine des démences séniles par infarctus multiples d'origine vasculaire (Shuaib, 1992, Skoog, 1997).

Or un traitement chronique à la mélatonine de rats âgés de 24 mois permet de restaurer la structure et la fonction des artérioles cérébrales à des niveaux équivalents à ceux de rats âgés de seulement 12 mois. En restaurant de bonnes capacités d'autorégulation chez des individus âgés, la mélatonine les protège contre les risques d'hypoperfusion cérébrale dues au dépassement de la limite basse d'autorégulation du DSC.

De plus, non seulement la mélatonine protège contre les risques d'hypoperfusion cérébrale, mais sa disparition progressive avec l'âge est probablement responsable d'une partie de la diminution des capacités d'autorégulation avec l'âge. En effet, la suppression de la mélatonine chez des animaux jeunes induit des modifications structurelles et fonctionnelles des artérioles cérébrales assez proches de celle décrites lors du vieillissement (Hadju et coll., 1990).

Deux questions, importantes pour la compréhension du mécanisme d'action de la mélatonine sur l'autorégulation du DSC, restent encore cependant sans réponse :

1. Quel récepteur médie l'action de la mélatonine ? En effet nous ne savons pas encore si l'action de la mélatonine est médiée par le récepteur  $MT_1$  et/ou le récepteur  $MT_2$ .
2. Quel est le mécanisme qui médie l'action trophique de la mélatonine ?

La réponse à ces questions permettrait de clarifier l'application thérapeutique potentielle de la mélatonine ou des ses analogues spécifiques pour des sous types de récepteurs. En effet, on pourrait envisager l'utilisation d'un agoniste de la mélatonine pour diminuer le risque d'hypoperfusion cérébrale au cours du vieillissement. Cette prévention des épisodes d'hypoperfusion cérébrale au cours de la vie pourrait réduire la survenue de démence sénile d'origine vasculaire. Etant donné le vieillissement générale de la population occidentale et la fréquence des démences d'origine vasculaire dans la population âgée, l'impact de telle traitement sur le confort de vie des personnes âgées serait considérable. Cependant, avant

d'envisager de telle applications thérapeutiques, il apparaît nécessaire d'explorer plus profondément le lien existant entre l'augmentation de la limite basse de l'autorégulation du DSC, les épisodes d'hypoperfusion cérébrale et les démences séniles d'origine vasculaire. Un tel développement nécessite dans un premier temps la mise au point de modèles animaux d'hypoperfusion cérébrale. Ces modèles pourraient être développés en ligaturant les artères carotides de rats normotendus comme déjà décrits par de la Torre et coll. (1992) et Pappas et coll. (1996).

Ce travail de thèse a établi l'existence d'un lien entre mélatonine et autorégulation du DSC. Ce lien est dû aux propriétés vasoconstrictrices et trophiques de la mélatonine sur les artérioles cérébrales. Grâce à ces effets sur les artérioles cérébrales, la mélatonine augmente les capacités d'autorégulation du DSC. Il est donc envisageable que la mélatonine protège le cerveau contre les risques d'hypoperfusion et donc contre les démences séniles par infarctus multiples d'origine vasculaire. Cette hypothèse nécessitera pour être étudiée le développement de modèles d'hypoperfusion cérébrale animaux.

## **Références bibliographiques**



Adams, J.H., Brierley, J.B., Connor, R.C.R. et Treips, C.S. (1966). The effects of systemic hypotension upon the human brain. Clinical and neuropathological observations in 11 cases. *Brain*, 89, 235-267.

Alperovitch, A., Mas, J.L., Doyon, B. et Myquel, P. (1986). Mortality from stroke in France 1968-1982. *Neuroepidemiology*, 5, 80-87.

Anton-Tay, F. (1974). Melatonin: effects on brain function. *Adv Biochem Psychopharmacol*, 11, 315-324.

Arangino, S., Cagnacci, A., Angiolucci, M., Vacca, A.M. Longu, G., Volpe, A., et Melis, G.B. (1999). Effects of melatonin on vascular reactivity, catecholamine levels, and blood pressure in healthy men. *Am J Cardiol*, 83, 1417-1419.

Archer, S.L., Huang, J.M., Hampl, V., Nelson, D.P., Shultz, P.J. et Weir, E.K. (1994). Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91, 7583-7587.

Arendt, J. (1989). Melatonin: a new role in psychiatric investigation. *Brit J Psychiat*, 155, 585-590.

Arendt, J., Borbley, A.A., Franey, C. et Wright, J. (1984). The effects of chronic small doses of melatonin given in the late afternoon on fatigue in man: a preliminary study. *Neurosci Lett*, 45, 317-321.

Armstead, W.M. (1999). Hypotension dilates pial arteries by  $K_{ATP}$  and  $K_{Ca}$  channel activation. *Brain Res*, 816, 158-164.

Asano, M., Masuzawa, I.K. et Matsuda, T. (1993). Functional role of charybdotoxin-sensitive  $K^+$  channels in the resting state of cerebral, coronary and mesenteric arteries in the dog. *J Pharmacol Exp Pharmacol*, 267, 1277-1285.

Auer, L.M. et Ishiyama, N. (1986). Pial vascular behavior during bilateral and contralateral cervical sympathetic stimulation. *J Cereb Blood Flow Metab*, 6, 298-304.

Auer, L.M. et Mokry, M. (1986). Effect of topical nimodipine versus its ethanol-containing vehicle on cat pial arteries. *Stroke*, 17, 225-228.

- Aukland, K., Bower, B.F. et Berliner, R.W. (1964). Measurement of local blood flow with hydrogen gas. *Circ Res*, 14, 164-187.
- Bakker, S.L., de Leeuw, F.E., de Groot, J.C., Hofman, A., Koudstaal, P.J. et Breteler, M.M. (1999). Cerebral vasomotor reactivity and cerebral white matter lesions in the elderly. *Neurology*, 52, 578-583.
- Bar, T. (1978). Morphometric evaluation of capillaries in different laminae of rat cerebral cortex by autonomic image analysis: changes during development and aging. *Adv Neurol*, 20, 1-9.
- Barry, D.I., Jarden, J.O., Paulson, O.B., Graham, D.I. et Strandgaard, S. (1984a). Cerebrovascular aspects of converting-enzyme inhibition I: Effects of intravenous captopril in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *J Hypertens*, 2, 589-597.
- Barry, D.I., Paulson, O.B., Jarden, J.O., Juhler, M., Graham, D.I. et Strandgaard, S. (1984b). Effects of captopril on cerebral blood flow in normotensive and hypertensive rats. *Am J Med*, 76, 79-85.
- Barry, D.I., Strandgaard, S., Graham, D.I., Braendstrup, O., Svendsen, U.G., Vorstrup, S., Hemmingsen, R. et Bolwig, T.G. (1982). Cerebral blood flow in rats with renal and spontaneous hypertension: resetting of the lower limit of autoregulation. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2, 347-353.
- Baumbach, G.L. (1996). Effects of increased pulse pressure on cerebral arterioles. *Hypertension*, 27, 159-167.
- Baumbach, G.L. et Heistad, D.D. (1991). Adaptive changes in cerebral blood vessels during chronic hypertension. *J Hypertens*, 9, 987-991.
- Baumbach, G.L., Siems, J.E. et Heistad, D.D. (1991). Effects of local reduction in pressure on distensibility and composition of cerebral arterioles. *Circ Res*, 68, 338-351.
- Baumbach, G.L., Dobrin, P.B., Hart, M.N. et Heistad, D.D. (1988a). Mechanics of cerebral arterioles in hypertensive rats. *Circ Res*, 62, 56-64.

- Baumbach, G.L., Walmsley, J.G. et Hart, M.N. (1988b). Composition and mechanics of cerebral arterioles in hypertensive rats. *Am J Pathol*, 133, 464-471.
- Bayliss, W.M. (1902). On the local reaction of the arterial wall to changes of internal pressure. *J Physiol (London)*, 28, 220-231.
- Benítez-King, G., Huerto-Delgado, L. et Antón-Tay, F. (1993). Binding of <sup>3</sup>H-melatonin to calmodulin. *Life Sci*, 53, 201-207.
- Berne, R.M. (1980). The role of adenosine in the regulation of coronary blood flow. *Circ Res*, 47, 807-813.
- Beyer, C.E., Steketee, J.D. et Saphier, D. (1998). Antioxidant properties of melatonin-an emerging mystery. *Biochem Pharmacol*, 56, 1265-1272.
- Booker, J.M. et Hellekson, C.J. (1992). Prevalence of seasonal affective disorder in Alaska. *Am J Psychiatry*, 149, 1176-1182.
- Bosman, H., Dormehl, I.C., Hugo, N., Redelinghuys, I.F. et Theron, J.J. (1991). The effect of intravenous administration of melatonin on cardiovascular parameters of the baboon (*Papio ursinus*). *J Pineal Res*, 11, 179-181.
- Bowen, D.M. et Davidson, A.N. (1986). Can the pathophysiology of dementia lead to rational therapy ? In *Treatment Development Strategies for Alzheimer's Disease*. ed. Crook, T., Bartus, R. et Gershon, S. pp. 36-66. Connecticut: Mark Powley Associates.
- Brayden, J.E. et Nelson, M.T. (1992). Regulation of arterial tone by activation of calcium-dependent potassium channels. *Science*, 256, 532-535.
- Bray-des-Boscs, L., Lartaud, I., Muller, F., Atkinson, J. et Capdeville, C. (1991). Effects of the angiotensin I converting enzyme inhibitor perindopril on cerebral blood flow in awake hypertensive rats. *Am J Hypert*, 4, 246S-252S.
- Brian, J.E., Jr, Faraci, F.M. et Heistad, D.D. (1996). Recent insight into the regulation of cerebral circulation. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 23, 449-457.

- Brun, J., Claustrat, B., Saddir, P. et Chazot, G. (1995). Nocturnal melatonin excretion is decreased in patients with migraine without aura attacks associated with menses. *Cephalgia*, 15, 136-139.
- Buchanan, J.E. et Phillis, J.W. (1993). The role of nitric oxide in the regulation of cerebral blood flow. *Brain Res*, 610, 248-255.
- Buée, L. (1999). Vieillessement cérébrovasculaire. *Thérapie*, 54, 155-165.
- Buresova, M., Dvorakova, M., Zvolisky, P. et Illnerova, H. (1991). Early morning bright light phase advances the human circadian pacemaker within one day. *Neurosci Lett*, 121, 47-50.
- Busija, D.W. et Heistad, D.D. (1984). Factors involved in the physiological regulation of the cerebral circulation. *Rev. Physiol, Biochem Pharmacol*, 101, 161-211.
- Capsoni, S., Stankov, B.M. et Fraschini, F. (1996). Reduction of regional cerebral blood flow by melatonin in young rats. *NeuroReport*, 6, 1346-1348.
- Capsoni, S., Viswanathan, M., De Oliveira, A.M. et Saavedra, J.M. (1994). Characterization of melatonin receptors and signal transduction system in rat arteries forming the circle of Willis. *Endocrinology*, 135, 373-378.
- Carneiro, R.C., Tofolletto, O., Cipolla-Neto, J. et Markus, R.P. (1994). Modulation of sympathetic neurotransmission by melatonin. *Eur J Pharmacol*, 257, 73-77.
- Cervos-Navarro, J., Gertz, H.J. et Frydl, V. (1987). Cerebral blood vessel changes in old people. *Mech Ageing Dev*, 39, 223-231.
- Chillon, J.M. et Baumbach, G.L. (1999). Effects of an angiotensin-converting enzyme inhibitor and a  $\beta$ -blocker on cerebral arterioles in rats. *Hypertension*, 33, 856-891.
- Chillon, J.M., Régrigny, O., Lartaud-Idjouadiene, I., Delagrangé, P., Scalbert, E. et Atkinson, J. (1999). Melatonin constricts rat cerebral arterioles in vivo by blocking  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  ( $\text{BK}_{\text{Ca}}$ ) channels. *Brit J Pharmacol*, 126, 34P (abstract).

Chillon, J.M. et Baumbach, G.L. (1997). Autoregulation of cerebral blood flow. In *Primer on Cerebrovascular Diseases*. ed. Welch, K.M.A., Caplan, L.R., Reis, D.J., Siesjö, B.K. et Weir, B. pp. 51-54. San Diego: Academic Press .

Chillon, J.M., Ghoneim, S. et Baumbach, G.L. (1997). Effects of chronic nitric oxide synthase inhibition on cerebral arterioles in rats. *Hypertension*, 30, 1097-1104.

Chillon, J.M., Heistad, D.D. et Baumbach, G.L. (1996). Effects of endothelin receptor inhibition on cerebral arterioles in hypertensive rats. *Hypertension*, 27, 794-798.

Claustrat, B., Geoffriau, M., Brun, J. et Chazot, G. (1996). La mélatonine: de l'hormone au médicament? *Pathol Biol*, 44, 645-653.

Cohen, M., Roselle, D., Chabner, B., Schmidt, T.J. et Lippman, M. (1978). Evidence for a cytoplasmic melatonin receptor. *Nature*, 274, 894-895.

Cox, R.H. (1977). Effects of age on the mechanical properties of rat carotid artery. *Am J Physiol*, 233, H 256-H263.

Coyle, J.T. et Puttfarcken, P. (1993). Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science*, 262, 689-695.

Cramer, H., Rudolph, J., Consbruck, V. et Kendel, K. (1974). On the effects of melatonin on sleep and behaviour on man. In *Advances in Biochemical Psychopharmacology*. ed. Costa, E., Costa, G. et Sandler, P. pp. 187-191: Raven Press.

Daffertshofer, M. et Hennerici, M. (1995). Cerebrovascular regulation and vasoneuronal coupling. *J Clin Ultrasound*, 23, 125-138.

Dawson, D. et Encel, N. (1993). Melatonin and sleep in humans. *J Pineal Res*, 15, 1-12.

De Jong, G.I., Farkas, E., Stienstra, C.M., Plass, J.R.M., Keijser, J.N., De La Torre, J.C. et Luiten, P.G.M. (1999). Cerebral hypoperfusion yields capillary damage in the hippocampal CA<sub>1</sub> area that correlates with spatial memory impairment. *Neuroscience*, 91, 203-210.

de la Torre, J.C. (1999). Critical threshold cerebral hypoperfusion causes Alzheimer's disease? *Acta Neuropathologica*, 98, 1-8.

de la Torre, J.C., Fortin, T., Park, G.A., Butler, K.S., Kozlowski, P., Pappas, B.A., de Socarr Saunders, J.K. et Richard, M.T. (1992). Chronic cerebrovascular insufficiency induces dementia-like deficits in aged rats. *Brain Res*, 582, 186-195.

Del Gobbo, V., Libri, V., Villani, N., Calio, R. et Nistico, G. (1989). Pinealectomy inhibits interleukin-2 production and natural killer activity in mice. *Int J Immunopharmacol*, 11, 567-577.

Doolen, S., Krause, D.N., Dubocovich, M.L. et Duckles, S.P. (1998). Melatonin mediates two distinct responses in vascular smooth muscle. *Eur J Pharmacol*, 345, 67-69.

Du, J., Sperling, L.S., Marrero, M.B., Phillips, L. et Delafontaine, P. (1996). G-protein and tyrosine kinase receptor cross-talk in rat aortic smooth muscle cells: thrombin- and angiotensin II-induced tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 and insulin-like growth factor 1 receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 218, 934-939.

Dubocovich, M.L., Yun, K., Al-Ghoul, W.M., Benloucif, S. et Masana, M.I. (1998). Selective MT2 melatonin receptor antagonists block melatonin-mediated phase advances of circadian rhythms. *FASEB J*, 12, 1211-1220.

Dubocovich, M.L., Masana, M.I., Iacob, S. et Sauri, D.M. (1997). Melatonin receptor antagonists that differentiate between the human Mella and Mellb recombinant subtypes are used to assess the pharmacological profile of the rabbit retina ML1 presynaptic heteroreceptor. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 355, 365-375.

Dubocovich, M.L. (1995). Melatonin receptors: are there multiple subtypes? *Trends Pharmacol Sci*, 16, 50-56.

Dubocovich, M.L. (1988). Luzindole (N-0774): a novel melatonin receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther*, 246, 902-910.

Dubocovich, M.L. (1985). Characterization of a retinal melatonin receptor. *J Pharmacol Exp Ther*, 234, 395-401.

Duell, P.B., Wheaton, D.L., Shultz, A. et Nguyen, H. (1998). Inhibition of LDL oxydation by melatonin requires supraphysiologic concentrations. *Clinical Chemistry*, 44, 1931-1936.

- Duncan, M.J., Takahashi, J.S. et Dubocovich, M.L. (1989). Characteristics and autoradiographic localization of 2-[<sup>125</sup>I]iodomelatonin binding sites in Djungarian hamster brain. *Endocrinology*, 125, 1011-1018.
- Duncan, M.J., Takahashi, J.S. et Dubocovich, M.L. (1988). 2-[<sup>125</sup>I]iodomelatonin binding sites in hamster brain membranes: pharmacological characteristics and regional distribution. *Endocrinology*, 122, 1825-1833.
- Durlach-Misteli, C. et Van Ree, J.M. (1992). Dopamine and melatonin in the nucleus accumbens may be implicated in the mode of action of antidepressant drugs. *Eur J Pharmacol*, 217, 15-21.
- Edvinsson, L. et Mac Kenzie, E.T. (1976). Amine mechanisms in the cerebral circulation. *Pharmacol Rev*, 28, 275-348.
- Evans, B.K., Mason, R. et Wilson, V.G. (1992). Evidence for direct vasoconstrictor activity of melatonin in "pressurized" segments of isolated caudal artery from juvenile rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 346, 362-365.
- Faraci, F.M. et Breeske, K.R. (1993). Nitric oxide mediates vasodilatation in response to activation of N-methyl-D-aspartate receptors in brain. *Circ Res*, 72, 476-480.
- Faraci, F.M. (1990). Role of nitric oxide in regulation of basilar artery tone in vivo. *Am J Physiol*, 259, H1216-H1221.
- Faraci, F.M. et Heistad, D.D. (1990). Regulation of large cerebral arteries and cerebral microvascular pressure. *Circ Res*, 66, 8-17.
- Faraci, F.M. (1989). Effects of endothelin and vasopressin on cerebral blood vessels. *Am J Physiol*, 257, H799-H803.
- Faraci, F.M., Baumbach, G.L. et Heistad, D.D. (1989). Myogenic mechanisms in the cerebral circulation. *J Hypertens*, 7, S61-S64.
- Ferrari, E., Magri, F., Dori, D., Migliorati, G., Nescis, T., Molla, G., Fioravanti, M. et Solerte, S.B. (1995). Neuroendocrine correlates of the aging brain in humans. *Neuroendocrinology*, 61, 464-470.

- Fevre-Montagne, M. (1985). La mélatonine. *la Presse Médicale*, 14, 1659-1663.
- Finkel, T. (1999). Myocyte hypertrophy: the long and winding RhoA'd. *J Clin Invest*, 103, 1619-1620.
- Folkow, B. (1964). Description of the myogenic hypothesis. *Circ Res*, 15, 279-287.
- Fujii, K., Heistad, D.D. et Faraci, F.M. (1991a). Flow-mediated dilatation of the basilar artery *in vivo*. *Circ Res*, 69, 697-705.
- Fujii, K., Heistad, D.D. et Faraci, F.M. (1991b). Role of the basilar artery in the regulation of blood flow to the brain stem in the rats. *Stroke*, 22, 763-767.
- Garcia-Roldan, J.L. et Bevan, J.A. (1991). Augmentation of endothelium-independent flow constriction in pial arteries at high intravascular pressures. *Hypertension*, 17, 870-874.
- Geary, G.G., Krause, D.N. et Duckles, S.P. (1997). Melatonin directly constricts rat cerebral arteries through modulation of potassium channels. *Am J Physiol*, 273, H1530-H1536.
- Godson, C. et Reppert, S.M. (1997). The Mel1a melatonin receptor is coupled to parallel signal transduction pathways. *Endocrinology*, 138, 397-404.
- Golanov, E.V. et Reis, D.J. (1997). Oxygen and cerebral blood flow. In *Cerebrovascular Diseases*. ed. Welch, K.M.A., Caplan, L.R., Reis, D.J., Siesjö, B.K. et Weir, B. pp. 58-60. San Diego: Academic Press.
- Goldman, B.D. (1983). The physiology of melatonin in mammals. In *Pineal Research Reviews*. ed. Reiter, R.J. pp. 145-182. New-York: Liss.
- Greenberg, L., Weiss, B. et Cantor, E. (1978).  $\beta$ -adrenergic receptors in aged rat brain: reduced number and capacity of pineal gland to develop supersensitivity. *Science*, 201, 61-63.
- Guerrero, J.M., Pablos, M.I., Ortiz, G.G., Agapito, M.T. et Reiter, R.J. (1996). Nocturnal decreases in nitric oxide and cyclic GMP contents in the chick brain and their prevention by light. *Neurochem Int*, 29, 417-421.
- Hadju, M.A., Heistad, D.D., Siems, J.E. et Baumbach, G.L. (1990). Effects of aging on mechanics and composition of cerebral arterioles in rats. *Circ Res*, 66, 1747-1754.



- Häggendal, E. et Johansson, B. (1965). Effects of arterial carbon dioxide tension and oxygen saturation on cerebral blood flow autoregulation in dogs. *Acta Physiol Scand*, 66, 27-53.
- Haining, J.L., Turner, M.D. et Pantall, R.M. (1968). Measurement of local cerebral blood flow in the unanesthetized rat using a hydrogen clearance method. *Circ Res*, 23, 313-324.
- Hardebo, J.E. et Edvindsson, L. (1979). Adenine compounds : cerebrovascular effects *in vitro* with reference to their possible involvement in migraine. *Stroke*, 10, 58-62.
- Harder, D.R., Sanchez-Ferrer, C., Kauser, K., Stekiel, W.J. et Rubanyi, G.M. (1989). Pressure releases a transferable endothelial contractile factor in cat cerebral arteries. *Circ Res*, 65, 193-198.
- Harder, D.R. (1987). Pressure-induced myogenic activation of cat cerebral arteries is dependant on intact endothelium. *Circ Res*, 60, 102-107.
- Harlow, H.J. (1987). Influence of the pineal gland and melatonin on blood flow and evaporative water loss during heat stress in rats. *J Pineal Res*, 4, 147-159.
- Harper, S.L. et Bohlen, H.G. (1984). Microvascular adaptation in the cerebral cortex of adult spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 6, 408-419.
- Heistad, D.D., Marcus, M.L., Piegors, D.J. et Armstrong, M.L. (1980). Regulation of cerebral blood flow in atherosclerotic monkeys. *Am J Physiol*, 239, H539-H544.
- Heistad, D.D., Marcus, M.L. et Abboud, F.M. (1978). Role of large arteries in regulation of cerebral blood flow in dogs. *J Clin Invest*, 62, 761-768.
- Hernandez, M.J., Brennan, R.W. et Bowman, G.S. (1978). Cerebral blood flow autoregulation in the rat. *Stroke*, 9, 150-155.
- Holland, M., Langton, P.D., Standen, N.B. et Boyle, J.P. (1996). Effects of the BK<sub>Ca</sub> channel activator, NS1619, on rat cerebral artery smooth muscle. *Brit J Pharmacol*, 117, 119-129.
- Hong, K.W., Yoo, S.E., Yu, S.S., Lee, J.Y. et Rhim, B.Y. (1996). Pharmacological coupling and functional role for CGRP receptors in the vasodilation of rat pial arterioles. *Am J Physiol*, 270, H317-H323.

- Hongo, K., Nakagomi, T., Kassel, N.F., Sasaki, T., Lehman, M., Vollmer, D.G., Tsukahara, T., Ogawa, H. et Torner, J. (1988). Effects of aging and hypertension on endothelium-dependent vascular relaxation in rat carotid artery. *Stroke*, 19, 892-897.
- Humbert, W. et Pévet, P. (1995). The pineal gland of the aging rat: calcium localization and variation in the number of pinealocytes. *J Pineal Res*, 18, 32-40.
- Humbert, W. et Pévet, P. (1991). Calcium content and concentration of pineal glands of young and old rats. A scanning and X-ray microanalytical study. *Cell Tissue Res*, 263, 593-596.
- Hurn, P.D. et Traystman, R.J. (1997). Overview of cerebrovascular hemodynamics. In *Cerebrovascular Diseases*. ed. Welch, K.M.A., Caplan, L.R., Reis, D.J., Siesjö, B.K. et Weir, B. pp. 42-44. San Diego: Academic Press.
- Iadecola, C. (1992). Does nitric oxide mediate the increases in cerebral blood flow elicited by hypercapnia ? *Proc Natl Acad Sci USA*, 89, 3913-3916.
- Ishimura, N., Kitaguchi, K., Tatsumi, K. et Furuya, H. (1996). Nitric oxide involvement in hypoxic dilation of pial arteries in the cat. *Anesth*, 85, 1350-1356.
- IUPHAR Committee (1998). Classification c.b.t.I.c.o.r.n.a.d.. In *The IUPHAR Compendium of Receptor Characterization and Classification*, 188-193.
- Jiang, Z., Nelson, C. et Allen, C. (1995). Melatonin activates an outward current in rat suprachiasmatic circadian clock. *Brain Res*, 687, 125-132.
- Jockers, R., Petit, L. et Lacroix, I. (1997). Novel isoforms of Mel1c melatonin receptor modulating intracellular cyclic guanosine 3',5'-monophosphate level. *Mol Endocrinol*, 11 (abstract).
- Johansson, B. (1989). Myogenic tone and reactivity: definitions based on muscle physiology. *J Hypertens*, 7, S5-S8.
- Johnson, P.C. (1986). Autoregulation of blood flow. *Circ Res*, 59, 483-495.

- Jones, S.C., Radinsky, C.R., Furlan, A.J., Chyatte, D. et Perez-Trepichio, A.D. (1999). Cortical NOS inhibition raises the lower limit of cerebral blood flow-arterial pressure autoregulation. *Am J Physiol*, 276, H1253-H1262.
- Jones, S.C., Bose, B., Furlan, A.J., Friel, H.T., Easley, K.A., Meredith, M.P. et Little, J.R. (1989). CO<sub>2</sub> reactivity and heterogeneity of cerebral blood flow in ischemic, border zone, and normal cortex. *Am J Physiol*, 257, H473-H482.
- Kilic, E., Ozdemir, Y.G., Bolay, H., Kelestimur, H. et Dalkara, T. (1999). Pinealectomy aggravates and melatonin administration attenuates brain damages in focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 26, 1713-1723.
- Kitazono, T., Faraci, F.M., Taguchi, H. et Heistad, D.D. (1995). Role of potassium channels in cerebral blood vessels. *Stroke*, 26, 1713-1723.
- Kitazono, T., Heistad, D.D. et Faraci, F.M. (1993). Role of ATP sensitive K<sup>+</sup> channels in CGRP induced dilatation of basilar artery *in vivo*. *Am J Physiol*, 265, H677-H681.
- Klein, B., Kuschinsky, W., Schröck, H. et Vetterlein, F. (1986). Interdependency of local capillary density, blood flow, and metabolism in rat brains. *Am J Physiol*, 251, H1333-H1340.
- Klein, D.C. et Moore, R.Y. (1979). Pineal N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase: control by the retinohypothalamic tract and the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res*, 174, 245-262.
- Kobari, M., Fukuuchi, Y., Tomita, M., Tanahashi, N. et Takeda, H. (1994). Role of nitric oxide in regulation of cerebral microvascular tone and regulation of cerebral blood flow in cats. *Brain Res*, 667, 255-262.
- Kontos, H.A., Wei, E.P., Navari, R.M., Levasseur, J.E., Rosenblum, W.I. et Patterson, J.L.J. (1978a). Responses of cerebral arteries and arterioles to acute hypotension and hypertension. *Am J Physiol*, 234, 371-383.
- Kontos, H.A., Wei, E.P., Raper, J.A., Rosenblum, W.I., Navari, R.M. et Patterson, J.L.J. (1978b). Role of tissue hypoxia in local regulation of cerebral microcirculation. *Am J Physiol*, 234, H582-H591.

- Kontos, H.A., Wei, E.P., Raper, A.J. et Patterson, J.L.J. (1977). Local mechanism of CO<sub>2</sub> action on cat pial arterioles. *Stroke*, 8, 227-229.
- Krause, D.N., Barrios, V.E. et Duckles, S.P. (1995). Melatonin receptors mediate potentiation of contractile responses to adrenergic nerve stimulation in rat caudal artery. *Eur J Pharmacol*, 276, 207-213.
- Krause, D.N. et Dubocovich, M.L. (1991). Melatonin receptors. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, 31, 549-568.
- Krause, D.N. et Dubocovich, M.L. (1990). Regulatory sites in the melatonin system of mammals. *Trends Neurosci*, 13, 464-470.
- Laflamme, A., Wu, L., Foucart, S. et de Champlain, J. (1998). Impaired basal sympathetic tone and alpha<sub>1</sub>-adrenergic responsiveness in association with the hypotensive effect of melatonin in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypert*, 11, 219-229.
- Laitinen, J.T., Viswanathan, M., Vakkuri, O. et Saavedra, J.M. (1992). Differential regulation of the rat melatonin receptors: selective age-associated decline and lack of melatonin-induced changes. *Endocrinology*, 130, 2139-2144.
- Lartaud, I., Bray-des-Boscs, L., Chillon, J.M., Atkinson, J. et Capdeville-Atkinson, C. (1993). *In vivo* cerebrovascular reactivity in Wistar and Fischer 344 rat strains during aging. *Am J Physiol*, 264, H851-H858.
- Lassen, N.A. (1959). Cerebral blood flow and oxygen uptake. *Physiol Rev*, 39, 183-238.
- Laudignon, N., Beharry, K., Farri, E. et Aranda, J.V. (1991). The role of adenosine in the vascular adaptation of neonatal cerebral blood flow during hypotension. *J Cereb Blood Flow Metab*, 11, 424-431.
- Lee, W.S., Kwon, Y.J., Yu, S.S., Rhim, B.Y. et Hong, K.W. (1993). Disturbances in autoregulatory responses of rat pial arteries by sulfonyleureas. *Life Sci*, 52, 1527-1534.
- Leeson, T.S., Leeson, C.R. et Paparo, A.A. (1988). In *Atlas of Hystologie*. ed. Saunders, W.B. Philadelphia.

- Lerner, A.B., Case, J.D., Takakashi, Y. et Sack, R.L. (1958). Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J Am Chem Soc*, 80, 2587 (abstract).
- Lewy, A.J., Ahmed, S., Latham Jackson, J.M. et Sack, R.L. (1992). Melatonin shifts human circadian rhythms according to a phase-response curve. *Chronobiol Int*, 9, 380-392.
- Lewy, A.J., Wehr, T.A., Goodwin, F.K., Newsome, D.A. et Markey, S.P. (1980). Light suppress melatonin secretion in humans. *Science*, 210, 1267-1269.
- Lewy, A.J., Tetsuo, M. et Markey, S.P. (1979). Pinealectomy abolishes plasma melatonin in rat. *J Clin Endocr*, 50, 204-205.
- Lissoni, P., Morabito, F., Esposti, G., Esposti, D., Ripamonti, G. et Fraschini, F. (1988). A study on the thymus-pineal axis: interactions between thymic hormones and melatonin secretion. *Acta Med Auxol*, 20, 35-39.
- Liu, C., Weaver, D.R., Jin, X., Shearman, L.P., Pieschl, R.L., Gribkoff, V.K. et Reppert, S.M. (1997). Molecular dissection of two distinct actions of melatonin on the suprachiasmatic circadian clock. *neuron*, 19, 91-102.
- Machesky, L.M. et Hall, A. (1996). Rho: a connection between membrane receptor signalling and the cytoskeleton. *Trends in Cell Biology*, 6, 304-310.
- MacKenzie, E.T., Farrar, J.K., Fitch, W., Graham, D.I., Gregory, P.C. et Harper, A.M. (1979). Effects of hemorrhagic hypotension on the cerebral circulation. I: Cerebral blood flow and pial arteriolar caliber. *Stroke*, 10, 711-718.
- Maestroni, G.J.M. (1993). The immunoneuroendocrine role of melatonin. *J Pineal Res*, 14, 1-10.
- Maestroni, G.J., Conti, A. et Pierpaoli, W. (1988). Pineal melatonin, its fundamental immunoregulatory role in aging and cancer. *Ann N Y Acad Sci*, 521, 140-148.

- Magata, Y., Saji, H., Choi, S.R., Tajima, K., Takagaki, T., Sasayama, S., Yonekura, Y., Kitano, H., Watanabe, M., Okada, H., Yoshikawa, E., Yamashita, T., Yokoyama, A. et Konishi, J. (1995). Noninvasive measurement of cerebral blood flow and glucose metabolic rate in the rat with high-resolution animal positron emission tomography (PET): a novel *in vivo* approach for assessing drug action in the brains of small animals. *Biol Pharm Bull*, 18, 753-756.
- Mahle, C.D., Goggins, G.D. et Yocca, F.D. (1995). Melatonin modulates vascular tone in rat anterior cerebral artery. *Neuroscience*, 21, 183 (abstract).
- Mallo, C., Zaidan, R., Galy, G., Vermeulen, E., Brun, J., Chazot, G. et Claustrat, B. (1990). Pharmacokinetics of melatonin in man after intravenous infusion and bolus injection. *Eur J Clin Pharmacol*, 38, 297-301.
- Martin, M.T., Azpiroz, F. et Malagelada, J.R. (1998). Melatonin and the gastrointestinal tract. *Thérapie*, 53, 453-458.
- Masoro, E.J. (1988). Food restriction in rodents: an evaluation of its role in aging. *J Gerontol*, 43, B59-B64.
- Matsumoto, A., Namon, R., Utsunomiya, Y., Kogure, K., Scheinberg, P. et Reinmuth, O.M. (1975). The measurement of cerebral blood flow in the rat. *Stroke*, 6, 630-637.
- Mayhan, W.G. et Faraci, F.M. (1993). Responses of cerebral arterioles in diabetic rats to activation of ATP-sensitive potassium channels. *Am J Physiol*, 265, H152-H157.
- Mayhan, W.G., Faraci, F.M., Baumbach, G.L. et Heistad, D.D. (1990). Effects of aging on responses of cerebral arterioles. *Am J Physiol*, 258, H1138-H1143.
- Mayo, J.C., Sainz, R.M., Uria, H., Antolin, I., Esteban, M.M. et Rodriguez (1998). Inhibition of cell proliferation: a mechanism likely to mediate the prevention of neuronal cell death by melatonin. *J Pineal Res*, 25, 12-18.
- McArthur, A.J., Gillette, M.U. et Prosser, R.A. (1990). Melatonin directly resets the rat suprachiasmatic circadian clock *in vitro*. *Brain Res*, 565, 158-161.

- Mellander, S. (1989). Functional aspects of myogenic vascular control. *J Hypertens*, 7, S21-S30.
- Mesenge, C., Margail, I., Verrecchia, C., Allix, M., Boulu, R.G. et Plotkine, M. (1998). Protective effect of melatonin in a model of traumatic brain injury in mice. *J Pineal Res*, 25, 41-46.
- Miguez, J.M., Martin, F.J. et Aldegunde, M. (1994). Effects of single doses and daily melatonin treatments on serotonin metabolism in rat brain regions. *J Pineal Res*, 17, 170-176.
- Molinari, E.J., North, P.C. et Dubocovich, M.L. (1996). 2-[<sup>125</sup>I]iodo-5-methoxycarbonylamino-N-acetyltryptamine: a selective radioligand for the characterization of melatonin ML<sub>2</sub> binding sites. *Eur J Pharmacol*, 301, 159-168.
- Morgan, P.G., Barrett, P., Howell, H.E. et Helliwell, R. (1994). Melatonin receptors: localization, molecular pharmacology and physiological significance. *Neurochem Int*, 24, 101-146.
- Morgan, P., Lawson, W., Davidson, G. et Howell, H. (1989). Melatonin inhibits cyclic AMP in cultured ovine pars tuberalis cells. *J Mol Endocrinol*, 3, R5-R8.
- Muller, F., Jania, P., Bray-des-Boscs, L., Atkinson, J., Scalbert, E., Devissaguet, M. et Capdeville, C. (1990). Perindopril resets the lower limit of cerebral blood flow autoregulation in awake renovascular hypertensive rats. *Eur J Pharmacol*, 183, 1308 (abstract).
- Nagasawa, S., Handa, H., Okumura, A., Naruo, Y., Moritake, K. et Hayashi, K. (1979). Mechanical properties of human cerebral arteries. Part 1: effects of age and vascular smooth muscle activation. *Surg Neurol*, 12, 297-304.
- Nathan, C. et Xie, Q. (1994). Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem*, 269, 13725-13728.
- Nelson, C.S., Marino, J.L. et Allen, C.N. (1996). Melatonin receptors activate heterotrimeric G-protein coupled Kir3 channels. *NeuroReport*, 7, 717-720.

- Nemecek, G.M., Coughlin, S.R., Handley, D.A. et Moskowitz, M.A. (1986). Stimulation of aortic smooth muscle cell mitogenesis by serotonin. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 83, 674-678.
- Oelsen, Munch, E., Moldt, P. et Drejer, J. (1994). Selective activation of Ca<sup>+</sup> dependant K<sup>+</sup> channels by novel benzimidazolone. *Eur J Pharmacol*, 251, 53-59.
- Osol, G. et Halpern, W. (1985). Myogenic properties of cerebral blood vessels from normotensive and hypertensive rats. *Am J Physiol*, 249, H914-H921.
- Pang, S.F., Tsang, C.W., Hong, G.X., Yip, P.C., Tang, P.L. et Brown, G.M. (1990). Fluctuation of blood melatonin concentrations with age: result of changes in pineal melatonin secretion, body growth, and aging. *J Pineal Res*, 8, 179-192.
- Pantoni, L. et Garcia, J.H. (1997). Pathogenesis of leukoaraiosis: a review. *Stroke*, 28, 652-659.
- Pappas, B.A., de la Torre, J.C., Davidson, C.M., Keyes, M.T. et 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.
- Pardridge, W.M. (1997). Blood-Brain Barrier Transport Mechanisms. In *Cerebrovascular Diseases*. ed. Welch, K.M.A., Caplan, L.R., Reis, D.J., Siesjö, B.K. et Weir, B. pp. 21-25. San Diego: Academic Press.
- Pasqualetti, P., Natali, G., Casale, R. et Colantonio, D. (1990). Epidemiological chronorisk of stroke. *Acta Neurol Scand*, 81, 71-74.
- Passant, U., Warkentin, S., Minthon, L., Fäldt, R. et Edvinsson, L. (1993). Cortical blood flow during head-up postural change in subjects with orthostatic hypotension. *Clin Auton Res*, 3, 311-318.
- Paulson, O.B. et Waldemar, G. (1990). Inhibition of the renin angiotensin system and the autoregulation of cerebral circulation. In *Coronary and Cerebrovascular Effects of Antihypertensive Drugs*. ed. Atkinson, J., Capdeville, C. et Zannad, F. pp. 129-144. London: Transmedica.



Peters, A., Palay, S.L. et Webster, H.D. (1991). *The Fine Sstructure of the Nervous System: Neurons and their Supporting Cells*. New York: Oxford Univ. Press.

Pieri, C., Marra, M., Moroni, F., Recchioni, R. et Marcheselli, F. (1996). Melatonin: a peroxy radical scavenger more effective than vitamine E. *Life Sci*, 55, 271-276.

Ram, P.T., Yuan, L., Dai, J., Kiefer, T., Koltz, D.M., Spriggs, L.L. et Hill, S.M. (2000). Differential responsiveness of MCF-7 breast cancer cell line stocks to the pineal hormone, melatonin. *J Pineal Res*, 28, 210-218.

Ram, P.T., Kiefer, T., Silverman, M., Song, Y. Brown, G.M. et Hill, S.M. (1998). Estrogen receptor transactivation in MCF-7 breast cancer cells by melatonin and growth factors. *Molecular Cellular Endocrinol*, 141, 53-64.

Régrigny, O., Atkinson, J., Capdeville-Atkinson, C., Liminana, P. et Chillon, J.M. (2000). Effects of lovastatine on pial arteriolar diameter and cerebral circulation in rats. *Hypertension*, 35, 1105-1110.

Régrigny, O., Delagrangé, P., Scalbert, E., Lartaud-Idjouadiene, I., Atkinson, J. et Chillon, J.M. (1999). Effects of melatonin on rat pial arteriolar diameter *in vivo*. *Brit J Pharmacol*, 127, 1666-1670.

Régrigny, O., Delagrangé, P., Scalbert, E., Atkinson, J. et Lartaud-Idjouadiene, I. (1998). Melatonin improves cerebral circulation security margin in rats. *Am J Physiol*, 275, H139-H144.

Reiter, R.J. (1997). Antioxidant actions of melatonin. *Adv Pharmacol*, 38, 103-117.

Reiter, R.J., Pablos, M.I., Agapito, T.T. et Guerrero, J.M. (1996). Melatonin in the context of the free radical theory of aging. *Ann NY Acad Sci*, 786, 362-378.

Reiter, R.J. (1995). Oxygen radical detoxification processes during aging: the functional importance of melatonin. *Aging (Milano)*, 7, 340-351.

Reiter, R.J. (1994). Pineal function during aging: attenuation of the melatonin rhythm and its neurobiological consequences. *Acta Neurobiol Exp (Warsz)*, 54 Suppl, 31-39.

- Rosenberg, G.A. (1997). CSF: formation, absorption, markers, and relationship to blood-brain barrier. In *Cerebrovascular Diseases*. ed. Welch, K.M.A., Caplan, L.R., Reis, D.J., Siesjö, B.K. et Weir, B. pp. 29-33. San Diego: Academic Press.
- Roth, J.A., Rabin, R. et Agnello, K. (1997). Melatonin suppression of PC12 cell growth and death. *Brain Res*, 768, 63-70.
- Sack, R.L., Lewy, A.J., Erb, D.L., Vollner, W.M. et Singer, C.M. (1986). Human melatonin production decreases with age. *J Pineal Res*, 3, 379-388.
- Sainz, R.M., Mayo, J.C., Reiter, R.J., Antolin, I., Esteban, M.M. et Rodriguez, C. (1999). Melatonin regulates glucocorticoid receptor: an answer to its antiapoptotic action in thymus. *FASEB J*, 13, 1547-1556.
- Satake, N., Oe, H., Sawada, T. et Shibata, S. (1991a). The mode of relaxing action of melatonin in rabbit aorta. *Gen Pharmacol*, 22, 219-221.
- Satake, N., Oe, H. et Shibata, S. (1991b). Vasorelaxing action of melatonin in rat isolated aorta; possible endothelium-dependent relaxation. *Gen Pharmacol*, 22, 1127-1133.
- Schmidt, J.F., Waldemar, G., Vorstrup, S., Andersen, A.R., Gjerris, F. et Paulson, O.B. (1990). Computerized analysis of cerebral blood flow autoregulation in humans: validation of a method for pharmacologic studies. *J Cardiovasc Pharmacol*, 15, 983-988.
- Scwerynek, E., Poeggeler, B., Melchiorri, D. et Reiter, R.J. (1995). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced peroxydation in rat brain homogenates is greatly reduced by melatonin. *Neuroscience Letters*, 195, 203-205.
- Seasholtz, T.M., Majumdar, M., Kaplan, D.D. et Brown, J.H. (1999). Rho and Rho kinase mediate thrombin-stimulated vascular smooth muscle cell DNA synthesis and migration. *Circ Res*, 84, 1186-1193.
- Semple, P.F. (1980). The effects of hemorrhage and sodium depletion on plasma concentrations of angiotensin II and [des-Asp<sup>1</sup>]angiotensin II in the rat. *endocrinology*, 107, 771-773.

- Shapiro, H.M., Stromberg, D.D., Lee, D.R. et Wiederhielm, C.A. (1971). Dynamic pressures in the pial arterial microcirculation. *Am J Physiol*, 221, 279-283.
- Shibata, S., Cassone, V.M. et Moore, R.Y. (1989a). Effects of melatonin on neuronal activity in the rat suprachiasmatic nucleus *in vitro*. *Neurosci Lett*, 97, 140-144.
- Shibata, S., Satake, N., Takagi, T. et Usui, H. (1989b). Vasorelaxing action of melatonin in rabbit basilar artery. *Gen Pharmacol*, 20, 677-680.
- Shohami, E. et Sidi, A. (1984). Accumulation of prostacyclin in rat brain during haemorrhagic hypotension - possible role of PGI<sub>2</sub> in autoregulation. *J Cereb Blood Flow Metab*, 4, 107-109.
- Shuaib, A. (1992). Alteration of blood pressure regulation and cerebrovascular disorders in the elderly. *Cerebrovasc Brain Metab Rev*, 4, 329-345.
- Skene, D.J., Vivien-Roels, B., Sparks, D.L., Hunsaker, J.C., Pévet, P., Ravid, D. et Swaab, D.F. (1990). Daily variation in the concentration of melatonin and 5-methoxytryptophol in the human pineal gland: effect of age and Alzheimer's disease. *Brain Res*, 528, 170-174.
- Skinhøj, E. et Strandgaard, S. (1973). Pathogenesis of hypertensive encephalopathy. *Lancet*, 1, 461-462.
- Skoog, I. (1998). Status of risk factors for vascular dementia. *Neuroepidemiology*, 17, 2-9.
- Skoog, I. (1997). The relationship between blood pressure and dementia: a review. *Biomed Pharmacother*, 51, 367-375.
- Slominski, A. et Pruski, D. (1993). Melatonin inhibits proliferation and melanogenesis in rodent melanoma cells. *Exp Cell Res*, 206, 189-194.
- Sokoloff, L. (1997). Anatomy of cerebral circulation. In *Cerebrovascular Diseases*. ed. Welch, K.M.A., Caplan, L.R., Reis, D.J., Siesjö, B.K. et Weir, B. pp. 3-5. San Diego: Academic Press.
- Stankov, B.M., Biella, G., Panar, C., Lucini, V., Capsoni, S., Fauteck, J. et Fraschini, F. (1992). Melatonin signal transduction and mechanism of action in the central nervous system using the rabbit cortex as a model. *Endocrinology*, 130, 2152-2159.

- Strandgaard, S., Olesen, J., Skinhoj, E. et Lassen, N.A. (1973). Autoregulation of brain circulation in severe arterial hypertension. *Brit Med J*, 1, 507-510.
- Sugden, D., Pickering, H., Teh, M.T. et Garratt, P.J. (1998). Melatonin receptor pharmacology: toward subtype specificity. *Biol Cell*, 89, 531-537.
- Suzuki, Y.J., Forman, H.J. et Sevanian, A. (1997). Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radic Biol Med*, 22, 269-285.
- Tagashira, Y., Matsuda, M., Welch, K.M.A., Chabi, E. et Meyer, J.S. (1977). Effect of cyclic AMP and dibutyryl cyclic AMP on cerebral hemodynamics and metabolism in the baboon. *J Neurosurg*, 46, 484-493.
- Taguchi, H., Heistad, D.D., Kitazono, T. et Faraci, F.M. (1995). Dilatation of cerebral arterioles in response to activation of adenylate cyclase is dependant on activation of  $Ca^{2+}$  - dependant  $K^{+}$  channels. *Circ Res*, 76, 1057-1062.
- Takahashi, S., Cook, M., Jehle, J., Kennedy, C., Sokoloff, L. (1995). Preservation of autoregulatory cerebral vasodilator responses to hypotension after inhibition of nitric oxide synthesis. *Brain Res*, 678, 21-28.
- Tan, D., Reiter, R.J., Chen, L.D., Poeggeler, B., Manchester, L.C. et Barlow-Walden, L.R. (1994). Both physiological and pharmacological levels of melatonin reduce DNA adduct formation induced by the carcinogen safrole. *Carcinogenesis*, 15, 215-218.
- Tan, D.X., Poeggeler, B., Manchester, L.C. et Reiter, R.J. (1993). Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *J Endocr*, 1, 57-60.
- Tanaka, K., Fukuuchi, Y., Gomi, S., Mihara, B., Shirai, T., Nogawa, S., Nozaki, H. et Nagata, E. (1993). Inhibition of nitric oxide synthesis impairs autoregulation of local cerebral blood flow in the rat. *NeuroReport*, 4, 267-270.
- Tanaka, K., Gotoh, F., Gomi, S., Takashima, S., Mihara, B., Shirai, T., Nogawa, S. et Nagata, E. (1991). Inhibition of nitric oxide synthesis induces a significant reduction in local cerebral blood flow in the rat. *Neurosci Lett*, 127, 129-132.

- Tatemachi, T.K. et Mohr, J.P. (1992). Migraine and stroke. In *Stroke: Pathophysiology, Diagnosis and Management*. ed. Barnett, H.J.M., Stein, B.M., Mohr, J.P. et Yatsu, F.M. pp. 761-785. New York: Churchill Livingstone.
- Ting, K.N., Dunn, W.R., Davies, D.J., Sugden, D., Delagrangé, P., Guardiola-Lemaître, B., Scalbert, E. et Wilson, V.G. (1997). Studies on the vasoconstrictor action of melatonin and putative melatonin receptor ligands in the tail artery of juvenile Wistar rats. *Brit J Pharmacol*, 122, 1299-1306.
- Touitou, Y., Selmaoui, B. et Zhao, Z.Y. (1996). Mélatonine et rythmes biologiques : quelques aspects en physiopathologies humaines. *Ann. Pharmaceutiques Françaises*, 54, 241-250.
- Touitou, Y., Fevre, M., Lagoguey, M., Carayon, A., Bogdan, A., Reinberg, A., Beck, H., Cesselin, F. et Touitou, C. (1981). Age and mental health-related circadian rhythms of plasma levels of melatonin, prolactin, luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in man. *J Endocr*, 91, 467-475.
- Toyoda, K., Fujii, K., Takata, Y., Ibayashi, S., Fujikawa, M. et Fujishima, M. (1997a). Effect of aging on regulation of brain stem circulation during hypotension. *J Cereb Blood Flow Metab*, 17, 680-685.
- Toyoda, K., Fujii, K., Takata, Y., Ibayashi, S., Kitazono, T., Nagao, T., Fujikawa, M. et Fujishima, M. (1997b). Age-related changes in response of brain stem vessels to opening of ATP-sensitive potassium channels. *Stroke*, 28, 171-175.
- Toyoda, K., Fujii, K., Ibayashi, S., Sadoshima, S. et Fujishima, M. (1996). Changes in arterioles, arteries, and local perfusion of the brain stem during hemorrhagic hypertension. *Am J Physiol*, 270, H1350-H1354.
- Van Aken, H. et Van Hemelrijck, J. (1991). Influence of anesthesia on cerebral blood flow and cerebral metabolism: an overview. *Agressologie*, 32, 303-306.
- Vandeputte, C., Delagrangé, P., Scalbert, E., Tran, N.P.N., Atkinson, J. et Capdeville-Atkinson, C. (1997). Melatonin potentiates the contractile response to noradrenaline without modifying intracellular calcium mobilisation in the perfused rat tail artery. *Brit J Pharmacol*, 122, P97 (abstract).

- Vanecek, J. (1998). Cellular mechanisms of melatonin action. *Physiol Rev*, 78, 687-721.
- Viswanathan, M., Laitinen, J.T. et Saavedra, J.M. (1993). Vascular melatonin receptors. *Biol Signals*, 2, 221-227.
- Viswanathan, M., Laitinen, J.T. et Saavedra, J.M. (1990). Expression of melatonin receptors in arteries involved in thermoregulation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87, 6200-6203.
- Vitte, P.A., Brun, J., Lestage, P., Claustrat, B. et Bobillier, P. (1989). The effects of melatonin and pinealectomy upon local cerebral glucose utilization in awake unrestrained rats are restricted to a few specific regions. *Brain Res*, 489, 273-282.
- Voordouw, B.C.G., Euser, R., Verdonk, R.E.R., Alberda, B.T.H., De Jong, F.H., Drogendijk, A.A.T.C., Fauser, B.C.J.M. et Cohen, M. (1992). Melatonin and melatonin-progestin combinations alter pituitary-ovarian function in women and can inhibit ovulation. *J Clin Endocr*, 74, 107-117.
- Wahl, M. (1985). Local chemical, neural and humoral regulation of cerebrovascular resistance vessels. *J Cardiovasc Pharmacol*, 7, S36-S46.
- Waldemar, G. (1990). Acute sympathetic denervation does not eliminate the effect of angiotensin converting enzyme inhibition on CBF autoregulation in spontaneously hypertensive rats. *J Cereb Blood Flow Metab*, 10, 43-47.
- Waldemar, G. et Paulson, O.B. (1989). Angiotensin converting enzyme inhibition and cerebral circulation - a review. *Brit J Clin Pharmacol*, 28, 177S-182S.
- Wang, H., et Ng, T.B. (2000). Hypotensive activity of the pineal indolamine hormones melatonin, 5-methoxytryptophol and 5-methoxytryptamine. *Pharmacol Toxicol*, 86, 125-128.
- Wang, Q., Paulson, O.B. et Lassen, N.A. (1992). Is autoregulation of cerebral blood flow in rats influenced by nitro-L-arginine, a blocker of the synthesis of nitric oxide? *Acta Physiol Scand*, 145, 297-298.
- Weekley, L.B. (1993). Effects of melatonin on pulmonary and coronary vessels are exerted through perivascular nerves. *Clin Auton Res*, 3, 45-47.

- Wei, E.P. et Kontos, H.A. (1982). Responses of cerebral arterioles to increased venous pressure. *Am J Physiol*, 243, H442-H447.
- Wei, E.P., Kontos, H.A. et Patterson, J.L.J. (1980). Dependence of pial arteriolar response to hypercapnia on vessel size. *Am J Physiol*, 238, H697-H703.
- Winn, H.R., Rubio, R. et Berne, R.M. (1979). Brain adenosine production in the rat during 60 seconds of ischemia. *Circ Res*, 45, 486-492.
- Witte, K. et Lemmer, B. (1995). Free-running rhythms in blood pressure and heart rate in normotensive and transgenic hypertensive rats. *Chronobiol Int*, 12, 237-247.
- Witt-Enderby, P.A., Masana, M.I. et Dubocovich, M.L. (1998). Physiological exposure to melatonin supersensitizes the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent signal transduction cascade in Chinese hamster ovary cells expressing the human mtl melatonin receptor. *Endocrinology*, 139, 3064-3071.
- Wollner, L., Maccarthy, S.T., Soper, N.D.w. et Macy, D.J. (1979). Failure of cerebral autoregulation as a cause of brain dysfunction in the elderly. *Brit J Pharmacol*, 1, 1117-1118.
- Wroe, S.J., Sandercock, P., Bamford, J., Dennis, M., Slattery, J. et Warlow, C. (1992). Diurnal variation in the incidence of stroke : Oxfordshire community stroke project. *Brit J Pharmacol*, 22, 312-318.
- Young, S.N. (1996). Melatonin, sleep, aging, and the health protection branch [editorial]. *J Psychiatry Neurosci*, 21, 161-164.
- Zhang, Z., Inserra, P.F., Liang, B., Ardestani, S.K., Elliott, K.K., Molitor, M. et Watson, R.R. (1997). Melatonin, immune modulation and aging. *Autoimmunity*, 26, 43-53.
- Zito, M., Parati, G., Omboni, S., Cervone, C., Ulian, L., D'Aviero, M., Abate, G. et Mancia, G. (1991). Effect of ageing on blood pressure variability. *J Hypertens*, 9, S328-S329.
- Zuber, M. et Mas, J.L. (1993). Epidémiologie des accidents vasculaires cérébraux. In *Accidents Vasculaires Cérébraux*. ed. Bougousslavsky J., B.M.G., Mas J.L. pp. 13-24. Paris: Doin.



Le Directeur

RAPPORT SUR LE MÉMOIRE DE THÈSE DE DOCTORAT DE  
L'UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ de NANCY I

(Mention Science du Médicament)

Présenté par

Monsieur Olivier REGRIGNY

avec comme titre :

*"Mélatonine et autorégulation du débit sanguin cérébral"*

La thèse de Monsieur REGRIGNY est classique. Après une introduction générale le mémoire se décompose en deux parties majeures : un aperçu historique du sujet et les travaux personnels du candidat. Le mémoire se termine par une courte discussion et des perspectives.

Le plan de travail est bien énoncé mais ce rapporteur considère que la motivation scientifique de ses recherches est mal argumentée et souvent basée sur des observations périphériques.

*Partie bibliographique :*

La revue de la littérature de Monsieur REGRIGNY se décompose en deux parties majeures. D'abord, il a traité le phénomène de l'autorégulation de la circulation cérébrale. Les faits et les concepts majeurs sont correctement abordés. Cependant, on peut regretter que son analyse soit dirigée sur la limite inférieure de l'autorégulation et que l'analyse intellectuelle de la limite supérieure (ce qui se passe lors d'une hypertension aiguë) ne soit ni traitée ni assimilée. La deuxième partie de l'introduction historique traite du rôle biologique de l'hormone pinéale : la mélatonine. Cette partie est particulièrement riche et couvre l'implication de la mélatonine dans des systèmes cardio-vasculaires : le système cérébral et immunitaire. Le tout donne une bonne fondation pour les travaux propres de Monsieur REGRIGNY.



### *Résultats personnels :*

Les objectifs des travaux personnels de Monsieur REGRIGNY sont clairement énoncés et justifiés, même si cela est d'une manière concise.

Dans le premier chapitre, le candidat a pu démontrer grâce aux mesures classiques que la mélatonine diminue le débit sanguin cérébral de base, augmente le débit cérébro-vasculaire hypercapnique et diminue la limite inférieure de l'auto-régulation cérébrale. Ces études ont été publiées dans l'*American Journal of Physiology*. La seule critique que l'on puisse émettre sur la présentation de cet aspect de ses recherches est que les résultats sont présentés en pourcentage et non en valeur absolue du débit sanguin cérébral. Ce point peut être l'objet d'une discussion lors de la soutenance.

Le deuxième chapitre des travaux personnels de Monsieur REGRIGNY concerne les effets directs de la mélatonine sur le calibre des artéioles pie-mériennes. La mélatonine induit une vasoconstriction des petits vaisseaux d'environ 40  $\mu\text{m}$ . Cet effet n'est pas une fonction de la dose administrée et peut être supprimée par l'administration d'un antagoniste relativement sélectif par les récepteurs mélatoninergiques. Par contre, cette étude, qui est soumise au *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, ne peut mettre en évidence un effet direct de la mélatonine sur le débit sanguin cérébral de base. Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer cette dichotomie et méritent d'être défendues publiquement.

Le troisième chapitre concerne les effets directs de la mélatonine administrée par une fenêtre crânienne sur les vaisseaux pic-mériens. Le candidat a pu démontrer un effet « vasoconstricteur » sur les artéioles cérébrales. Ce paradigme a permis un certain nombre de manipulations pharmacologiques pour mieux comprendre la nature des effets contractiles de la mélatonine. Néanmoins, il n'y a aucune discussion sur la possibilité que les effets de ces substances sont exercés non pas directement sur le muscle lisse cérébro-vasculaire mais via un effet métabolique sur le neurone.

Le quatrième chapitre est une étude biophysique du lit cérébro-vasculaire. Monsieur REGRIGNY démontre par des paramètres standardisés que l'ablation de l'épiphyse provoque une perte des masses musculaires dans la couche médiane des vaisseaux cérébraux. Cette situation est rétablie quand la mélatonine est administrée après l'épiphyssectomie. Malgré ce changement mécanique il y a pas de modification de la limite inférieure de l'autorégulation. Ces résultats sont à discuter en parallèle avec les syndromes tels que Shy-Drager ou l'hypotension idiopathique chronique, situation dans laquelle il y a une hypotrophie vasculaire et une modification des limites de l'autorégulation cérébrale.

Le dernier chapitre concerne des modifications significatives des relations entre pression et débit dans le cerveau liées au vieillissement. L'impétrant montre que, chez le rat âgé, de nombreux paramètres sont affectés, y compris la limite inférieure de l'autorégulation. Ces modifications sont partiellement rétablies chez le rat âgé de 24 mois par l'administration de la mélatonine pendant les trois mois précédant l'étude. L'ensemble de ces données conforte la thèse de Monsieur REGRIGNY selon laquelle la diminution de la production de la mélatonine liée au vieillissement a des conséquences néfastes sur le plan physiopathologique.

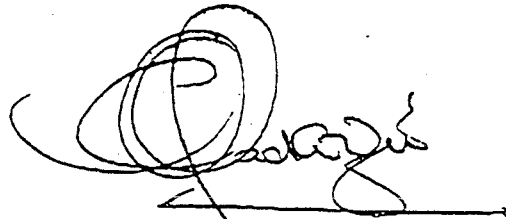
Le mémoire se termine par une discussion synthétique de l'ensemble des résultats de Monsieur REGRIGNY couvrant l'ensemble de ses recherches et faisant le lien entre ses divers travaux.

*Conclusion :*

L'ensemble des travaux de Monsieur REGRIGNY est impressionnant par le volume des recherches effectuées ainsi que par les méthodologies mises en œuvre. La thèse est *ambitieuse*, même si elle est susceptible à certaines critiques et déjà couronnée par trois publications dans des revues internationales à un comité de lecture. D'autres publications sont soumises. En conclusion, ce travail important est d'une qualité scientifique tout à fait remarquable

Ce rapporteur considère que ce candidat mérite de présenter ses travaux publiquement devant un jury afin de postuler au grade de Docteur d'Université de Nancy.

Fait à Caen, le 11 septembre 2000

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'E. F. MacKenzie', written over a horizontal line.

Docteur E. F. MacKENZIE  
Directeur de Recherches au CNRS  
Directeur de l'Unité UMR 6551

FORMULAIRE A JOINDRE A VOTRE RAPPORT  
POUR AUTORISER LA SOUTENANCE  
DU DOCTORAT DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARÉ - NANCY I

FORMATION DOCTORALE : BIOLOGIE ET SANTE

CANDIDAT(E) : Olivier REGRIGNY

Date de soutenance envisagée : 1<sup>ère</sup> quinzaine de septembre

RAPPORTEUR :

Nom et Prénom : .....MackENZIE.....Eric.....T.....

Qualité : .....Directeur.....de.....Recherches.....

Etablissement : .....Université.....de.....Caen.....,.....CNRS.....UMR.....6551.....,.....Centre.....Cyceron.....

Adresse : .....Boulevard.....Henri.....Becquerel.....-.....BP.....5229.....

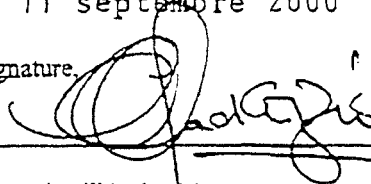
.....14074.....CAEN.....Cedex.....

Il est demandé au rapporteur de cocher une des trois cases ci-dessous et de rédiger un rapport détaillé sur papier à l'entête du laboratoire.

- Le mémoire de thèse n'a pas besoin de modification, la thèse peut être soutenue.
- Quelques modifications doivent être apportées au mémoire de thèse, la thèse peut être soutenue sans être à nouveau soumise à mon examen.
- Des modifications importantes doivent être apportées au mémoire de thèse, la thèse ne peut être soutenue en l'état, une nouvelle version doit être à nouveau soumise à un rapporteur.

Fait à, CAEN  
le 11 septembre 2000

Signature.



Ce document doit être retourné accompagné d'un rapport détaillé, signé à :

Catherine Weisse  
Service de la Scolarité  
FACULTE DE PHARMACIE  
5, rue Albert Lebrun  
B.P. 403  
54001 Nancy Cedex  
Fax : (00) 03.83.17.88.79



Department of Pharmacology  
College of Medicine

Room 360, Med. Surge II  
Irvine, CA 92697-4625  
(949) 824-6771  
FAX (949) 824-4855

August 14, 2000

Ph.D. Report for the Thesis of Olivier Regrigny

Referee: Diana N. Krause, Ph.D., Professor of Pharmacology

The Ph.D. Candidate, Olivier Regrigny, has completed a series of novel experiments that provides important insight into the role of the hormone melatonin in the cerebral circulation. He chose a new area of research where little is yet known and logically built upon the initial published findings in the field. His research is particularly valuable for establishing cerebrovascular effects of melatonin *in vivo*, in both young and old rats, and elucidating putative roles for melatonin in extending the range of autoregulation to protect the brain from hypoperfusion and in influencing atrophy and passive distensibility of the vessel wall.

Overall, Olivier has done an excellent job on his Thesis. Two of the chapters have already been published in top journals. The remaining three experimental chapters have been submitted for publication. The experimental work is appropriate to the stated goals and hypotheses and is carefully conducted and interpreted. The results are interesting and important contributions to the field. The candidate has a good understanding of the dynamics of the cerebral circulation and the relevant literature on this area as well as the area of melatonin. Although I am not fluent in French, it is obvious to me that the Introduction chapter is well-organized and comprehensive, including all of the primary points appropriate to this work. Because of the language, I also cannot comment on the actual Discussion chapter, but base my remarks on the English summary provided. I have no additional comments on the two published studies (Chapter II, 1 and 3); however I do have some corrections and suggestions for revising the other experimental chapters, which are detailed below.

General comments:

While the overall Introduction in Chapter I is well done, I found the introduction section on each of the unpublished studies (#2, 4, 5) in Chapter II to be too brief. The previous findings of the authors are presented without much discussion of the broader literature context for the study, in particular the role of melatonin and why it is of interest (appropriate references should be included).

*Study #2: Melatonin increases pial artery tone and the lower limit of CBF autoregulation:*

1. I do not agree with the conclusions regarding the lack of a dose-response to melatonin. The most likely explanation is that both i.v. doses achieve a maximal constrictor effect (which was

found in study #3 to be  $15 \pm 1\%$ , similar to the diameter change seen here,  $13 \pm 3\%$ ). Study #1 indicates that the lower dose (60 ng/kg/h) gives maximum physiological levels, thus it is not surprising that the higher dose has no further effect. Without testing lower doses, one cannot make any conclusions regarding the dose-dependency of the melatonin effect. On a related point, it is confusing that the first paragraph of the discussion states that constriction was “less marked” with a higher dose. There does not appear to be a significant difference between the effects of the 2 doses.

2. A more subtle point, but an important one, is that luzindole actually blocked the constriction to both doses of melatonin. Luzindole does not “reverse” the action of melatonin; but by blocking the constrictor effect, it appears to uncover another effect of melatonin, elicited by the higher dose. The latter effect is not blocked by locally applied luzindole and thus is not mediated by known melatonin receptors (such as  $MT_2$ ), at least not in the region of the cranial window.
3. The conclusion suggests the possibility that, in man, melatonin may shift the lower limit of autoregulation to protect against the circadian decrease in blood pressure at night. While this is an interesting idea, it should be noted that the current study was done in the rat, which has higher blood pressure at night when melatonin is produced – what might be the relevance of the findings in this species?

*Study #4: Cerebral arteriolar structure and function in pinealectomized rats:*

1. Figure 4 (and last paragraph of the results section) should indicate whether there are any significant differences among the 4 groups, e.g., is the change in diameter at 30-40 mm Hg in pinealectomized rats different from that in the intact and melatonin-treated rats? This is a critical question.
2. There should be some discussion of previous studies that found pinealectomy and/or melatonin treatment to affect systemic blood pressure (e.g., Harlow, 1987, *J. Pineal Res.* 4:147-159; Kawashima et al., 1987, *Clin. Exp. Hypertension* 9:1121-1131; Wang and Ng, 2000, *Pharmacol. Toxicol.* 86:125-128; Arangino et al., 1999, *Am. J. Cardiol.* 83:1417-1419; Kilic et al., 1999, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 19:511-516; Laflamme et al., 1998, *Am. J. Hyperten.* 11:219-229; Cagnacci et al., 1998, *Am. J. Physiol.* 274:R335-R338). These manipulations were performed in the present study, and possible alterations in blood pressure could affect the vascular wall. Blood pressure was not monitored over the month of treatment. However because pinealectomy has been associated with increased blood pressure and melatonin with lowered blood pressure, it does not seem likely that these effects could explain vascular wall atrophy and trophic effects, respectively. Nevertheless, this point should be discussed.
3. The suggestion that melatonin has trophic effects on the vessel wall is novel and intriguing, however several points in the current discussion of this effect (“*Effects of melatonin on cerebral arteriole structure and mechanics*” pg. 148-149) need revision and clarification.

a) The reference to angiotensin is not very compelling. There are a number of G proteins and the constriction by angiotensin is most likely mediated via Gq. Currently, there is no evidence that known melatonin receptors, thought to couple to Gi/o, interact with tyrosine kinase growth factor pathways. However, a possible association of Gi with Rho, which is discussed in Chapter III of the thesis, may be a more plausible mechanism to discuss here.

b) The third point (last sentence of paragraph 1 - second paragraph of this discussion) throws together a number of unrelated studies where melatonin is reported to have an effect on cell number, in an attempt to show some precedent for trophic effects. This discussion needs to be more thoughtful and careful in its interpretation of earlier work. A variety of mechanisms are likely involved, and none of these previous studies may be relevant to the effects seen in cerebral blood vessels. The Mayo et al., 1998, study cited actually shows melatonin to decrease cell proliferation in PC12 cells; the anti-apoptotic effect seen by this group involves counteracting the neurotoxin 6-OH-DA (perhaps via an antioxidant mechanism? A similar mechanism may underlie the effect of micromolar concentrations of melatonin to prevent cell death in striatal neurons in culture (Iacouitti et al., 1999, Brain Res. 816:276-285). In many cases, melatonin indirectly modifies cell growth by regulation of other trophic influences, e.g., inhibition of estrogen-sensitive breast cancer cells via decreasing expression of estrogen receptors (Ram et al., 1998, Mol. Cell. Endocrinol. 141:53-64 and Ram et al., 2000, J. Pineal Res. 28:210-208); antiapoptotic effect in thymic tissue via decrease expression of glucocorticoid receptors (Sainz et al., 1999, FASEB J. 13:1547-1556); decrease in the sympathetic trophic effect on smooth muscle in vas deferens by modulating sympathetic output (Carneiro et al., 1994, Eur J Pharmacol. 251:73-77). Critical questions that need to be addressed in future studies are - what is the effective concentration of melatonin for trophic effects, is the effect receptor-mediated, is the effect a direct one of melatonin on vascular smooth muscle?

c) Since we do not know the plasma levels of melatonin resulting from the oral administration in the present study, I would omit the final sentence (pg. 149, lines 10-13) of the second paragraph regarding effects of different doses of melatonin in vitro.

*Study #5: Beneficial effects melatonin on the cerebral circulation of the old rat:*

1. The discussion for this study is the only weak part of the Thesis. In some places, it repeats, verbatim, the discussion in Study #4. This is not acceptable. The same comments given above in point 3 for Study #4 apply here as well. A unique and more comprehensive discussion is needed and should include a comparison of the current study with findings made previously in young rats.

References: Correct "Mable, C.D." to "Mahle, C.D." in the reference section and throughout the text.

THIS FORM SHOULD BE ENCLOSED WITH YOUR Ph.D. REPORT.  
IT IS REQUIRED TO DEFEND A Ph. D. THESIS AT  
UNIVERSITE HENRI POINCARÉ - NANCY I

Ph.D. PROGRAMME IN HEALTH AND BIOLOGY

CANDIDAT : Olivier REGRIGNY

Date suggested for the thesis defence : about fifteen September's

Referee's Surname : Krause

Referee's Forename : Diana

Referee's Position : Professor of Pharmacology

Referee's Address : Department of Pharmacology, University of  
California at Irvine, CA 92697-4625, U.S.A.

The referee is requested to tick one of the boxes below and to write a detailed Ph. D. report on paper bearing his laboratory letterhead.

- This Ph. D. thesis does not require any alteration. It can be defended.
- A few changes should be made to this Ph. D. thesis. It can be defended without being submitted to me again.
- Major changes should be made to this Ph. D. thesis. It cannot be defended in its present version and a revised version will have to be submitted to a referee.

Signed : Diana N. Krause

Date : 8/14/00

This document should be signed and returned with a detailed Ph. D. report to :

Catherine Weisse  
Service de la Scolarité  
FACULTE DE PHARMACIE  
5, rue Albert Lebrun  
B.P. 403  
54001 Nancy Cedex  
Fax : (00) 03.83.17.88.79

Nom, prénom : **REGRIGNY Olivier**



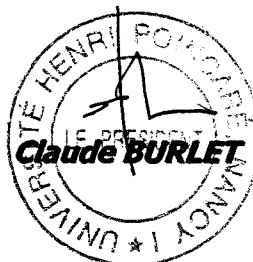
Nature de la thèse :

**Doctorat de l'Université Henri Poincaré, Nancy I  
en Biologie - Santé - Environnement**

**VU, APPROUVE et PERMIS D'IMPRIMER**

Nancy, le 5 février 2001 n° 412

Le Président de l'Université Henri Poincaré, Nancy I





**DOCTORAT DE L'UHP – (Pharmacie)**  
Mention Sciences du Médicament

Sujet : Mélatonine et autorégulation du débit sanguin cérébral

Prénom et Nom : Olivier Régrigny

Laboratoire et contact : Laboratoire de Pharmacologie Cardiovasculaire, Faculté de Pharmacie (Pr. Atkinson)

Date et lieu de soutenance : , salle des thèses, Faculté de Pharmacie

Jury : Professeurs Jeffrey Atkinson, Gary Baumbach, Diane Krause, Eric T MacKenzie, Docteur Philippe Delagrange.

**RESUME**

Les capacités d'autorégulation du débit sanguin cérébral (DSC), qui permettent de maintenir le DSC constant en dépit de variation de pression artérielle, sont diminuées au cours du vieillissement augmentant ainsi le risque d'hypoperfusions cérébrales. La répétition de ces épisodes d'hypoperfusions cérébrales, sans conséquences cliniques à court terme, pourrait être à l'origine des démences séniles par infarctus multiples d'origine vasculaire. Il n'existe pour l'instant aucun traitement permettant de restaurer chez un individu âgé des capacités d'autorégulation du DSC optimales.

De nombreuses observations laissent supposer que la mélatonine pourrait être impliquée dans cette diminution des capacités d'autorégulation du DSC avec l'âge. Les études expérimentales citées dans ce travail de thèse ont donc pour but d'étudier le lien éventuel entre la mélatonine et l'autorégulation du DSC.

Dans un premier temps nous nous sommes intéressés aux effets aigus de la mélatonine sur le système cérébro-vasculaire. Nous avons analysé l'effet d'une perfusion de mélatonine sur le DSC et son autorégulation. Nous avons également étudié le mécanisme d'action de la mélatonine sur les artérioles cérébrales et son impact sur les vasodilatations induites par l'hypotension..

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés aux effets chroniques de la mélatonine en examinant l'effet d'une privation de mélatonine chez des animaux jeunes ou d'un traitement chronique par la mélatonine chez des animaux âgés sur la structure et les vasodilatations induites par l'hypotension des artérioles cérébrales et les conséquences sur les capacités d'autorégulation.

Nous avons démontré un lien entre la mélatonine et l'autorégulation du DSC, en montrant que :

1. La mélatonine vasoconstricte les artérioles cérébrales en inhibant les canaux  $BK_{Ca2+}$  suite à l'activation des récepteurs  $mt_1$  et/ou  $MT_2$ .
2. La mélatonine, en constricte les artères et artérioles cérébrales, augmente les capacités d'autorégulation des animaux face à une chute de pression.
3. La mélatonine exerce des effets trophiques sur la paroi des artérioles cérébrales et atténue ainsi les effets du vieillissement sur la structure et la fonction des artérioles cérébrales, permettant d'améliorer les capacités d'autorégulation du débit sanguin cérébral des animaux âgés.

En conclusion, la diminution progressive avec l'âge de la sécrétion de mélatonine peut contribuer à la diminution des capacités d'autorégulation. Un traitement chronique par la mélatonine peut, en améliorant les capacités d'autorégulation du débit sanguin cérébral, protéger des démences séniles par infarctus multiples d'origine vasculaire.

Mots clés: mélatonine; artérioles cérébrales; hypertrophie; distensibilité.