



Université
de Lille

Université de Lille – Faculté de médecine

Année : 2018

N° _____

THÈSE

POUR L'OBTENTION DU GRADE DE
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE

Discipline : Pharmacologie

Présentée et soutenue publiquement le 7 Décembre 2018 par

Sandrine Bergeron

**MICROHÉMORRAGIES CÉRÉBRALES ET COGNITION :
IMPACT FONCTIONNEL À COURT, MOYEN ET LONG TERMES
DANS UN MODÈLE MURIN**

Directeur de Thèse : Dr. Sophie Gautier

JURY :

Pr. Yannick Béjot

Examineur, Président du Jury

Dr. Odile Viltart

Examineur

Pr. Thomas Freret

Rapporteur

Pr. Jean-luc Cracowski

Rapporteur

Dr. Sophie Gautier

Directeur

« Qu'est-ce qui caractérise une civilisation ? Est-ce l'exceptionnel génie ? Non ; c'est la vie de tous les jours... »

Pierre Boulle, La planète des singes

À Gary,

À mes parents,

À ma grand-mère,

À mon frère

Remerciements

Je tiens tout d'abord à adresser mes sincères et chaleureux remerciements à **Madame le Docteur Sophie Gautier**. Merci d'avoir accepté d'encadrer ce travail et d'avoir su rebondir dans chaque situation. Je te remercie pour ta tolérance, ta présence mais aussi pour la liberté que tu as accepté de me donner. Ta patience, ta confiance et tes conseils toujours avisés m'ont permis d'aller au bout de ce travail et je te suis profondément reconnaissante de m'avoir aidée à progresser. Ton optimisme, ton efficacité et ton grand cœur m'auront accompagnée ces cinq dernières années et j'espère avoir la chance d'apprendre encore de toi.

Je tiens à remercier l'ensemble des membres du jury de thèse pour l'honneur qu'ils me font d'avoir accepté de juger ce travail :

Messieurs les Professeurs Thomas Freret et Jean-Luc Cracowski, pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail et d'avoir accordé du temps à la correction de ce manuscrit.

Soyez assurés de toute ma reconnaissance et de mes sincères remerciements.

Madame le Docteur Odile Viltart et Monsieur le Professeur Yannick Béjot, merci d'avoir eu la gentillesse de participer à ce jury ainsi qu'aux comités de suivi de thèse au cours desquels vous avez bien voulu partager vos réflexions et vos conseils. Soyez assurés de ma gratitude et veuillez trouver ici mes respectueux remerciements.

Je tiens également à remercier **Monsieur le Professeur Régis Bordet**, qui a accepté de m'accueillir au sein de son unité de recherche. Merci pour tout le sens que vous donnez au mot « unité ». Au cours de ces années, vous avez toujours gardé un œil bienveillant et expert. Soyez assuré de toute mon estime, ma reconnaissance et mon profond respect.

Je voudrais ensuite remercier Yao, ma chère et gourmande co-thésarde. Traverser ces années de thèse avec toi aura rendu l'épreuve plus douce, agrémentée de petits plaisirs gustatifs, de rires, de larmes... Merci de ton soutien, de ta bonne humeur et de ton amitié, ils ont été précieux.

Je tiens à remercier Romain pour son aide dans ce travail. Sérieux et appliqué, la relève est assurée.

À l'équipe de choc, Jackie, Marion et Christian. Merci pour votre soutien, chacun à votre manière, merci pour vos sourires et pour les moments partagés, en attendant les prochains. J'ajoute ici une pensée pour Nadine qui m'a aussi soutenue au cours de ces années et qui profite maintenant de sa retraite sportive.

Je remercie très chaleureusement Kelly et Charlotte pour leur aide, leur soutien et leurs conseils. Vous avez toujours été présentes et m'avez beaucoup appris humainement et professionnellement. Un petit supplément de remerciements pour la plateforme d'exploration fonctionnelle qui a été ma deuxième maison ces dernières années...!

Je tiens à remercier Julie pour ses conseils et les échanges de tous types pouvant aller de la chanson française (« Si tu n'as pas tout du grimaud,... ») à l'évaluation neurocomportementale des rongeurs en passant par les stratégies, plus ou moins hasardeuses, de prise en charge de la migraine. Pour ces années de bureau commun, les moments partagés, et ce rire qui résonne...fort, merci.

Un grand merci à Johana, Anne-Sophie, Camille, Louise C. et Flore pour leur gentillesse, les petits mots réconfortants des unes et les propositions d'aide des autres.

Je remercie très sincèrement l'équipe des imageurs, Flo, Nico et Clémence pour leur aide, leur investissement et leur patience.

Merci à Émilie pour les analyses statistiques et la patience dont elle a fait preuve.

Merci à l'équipe du DHURE qui a pris soin de nos souris et plus particulièrement à Franck qui a bien voulu prendre de son temps pour les dosages, ce temps était précieux.

Je voudrais remercier l'ensemble de l'équipe, recherche et pharmacovigilance. Merci de créer un environnement de travail chaleureux et convivial et d'avoir bien voulu partager vos connaissances et techniques. Merci à Michèle (les journées de TP sont chargées mais très agréables grâce à toi et à Zineb, merci de m'avoir donné l'opportunité de partager cette expérience), Maud et Cédrick (champions dans l'art de manier le cryostat et les réactifs chimiques... je ne préciserai pas lesquels), Thavarak, Thibaut, J.C. (de loin mais toujours

présent papi), Aurélie, Vincent, David, Mary, Bérangère, Olivier, Dominique (oserais-je un « Domi Domi »), Louise G., Sylvie, Joëlle, Elodie, Anne-Sylvie.

Je voudrais également remercier Perrine, Hubert et Fabienne à qui je dois mes meilleurs souvenirs d'internat et qui continuent de partager les moments importants.

Je souhaiterais maintenant adresser mes très sincères remerciements aux personnes sans lesquelles je ne serais pas là :

À mes parents, ma grand-mère, mon frère, vous m'avez menée jusqu'ici et c'est avec beaucoup d'émotion que je pense à vous en écrivant ces quelques lignes.

À Gary, mon compagnon, sans qui cette thèse n'aurait simplement pas été possible. Merci pour ton soutien à toute épreuve, ton aide, ton calme, ta patience. Merci d'être toi. Ce travail t'est dédié.

À Nadira et Nisa, les frangines, qui m'accompagnent et me soutiennent depuis maintenant presque 20 ans.

Un grand merci à Nico, Flavien et Elodie, pour votre présence constante et vos encouragements. Très peu de gens peuvent passer aussi aisément de Simone de Beauvoir à Nicki Minaj... Merci pour les rires !

À Alix Mathurin qui, sans le savoir, a contribué à mon parcours.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	1
I. Les microhémorragies cérébrales	2
A. Description – Définition	2
B. Données épidémiologiques.....	3
C. Etiologies et facteurs de risque.....	4
D. Pistes physiopathologiques.....	6
E. Implications cliniques : MHC et troubles cognitifs.....	8
1. Dans la population générale	9
2. Dans la population avec démences et maladie d’Alzheimer	11
II. Modèles précliniques.....	13
A. Critères de validité d’un modèle.....	13
B. Modèles d’hémorragie et de microhémorragie cérébrale	14
C. Les modèles rongeurs de la maladie d’Alzheimer.....	17
1. Rappels sur la maladie d’Alzheimer.....	17
2. Les modèles lésionnels	20
3. Les modèles pharmacologiques.....	21
4. Les modèles de souris âgées.....	21
5. Les modèles transgéniques	22
5.1. Les souris transgéniques porteuses d’un gène APP muté.....	22
5.2. Les souris transgéniques porteuses de mutations multiples	23
5.3. Les souris transgéniques porteuses du gène Tau humain muté	25
5.4. Les modèles transgéniques mixtes	25
5.5. Les modèles transgéniques rats	26
5.6. Limites des modèles transgéniques	26
III. Evaluation cognitive chez le rongeur	27
A. Rappels généraux sur les systèmes de mémoires	27
B. Evaluation cognitive chez le rongeur	29
1. Mémoire de type épisodique	30
2. Mémoire de travail	34
3. Mémoire de référence.....	37
C. Recherche translationnelle sur la cognition.....	38
1. De la recherche préclinique vers la recherche clinique : Cognition spatiale en réalité virtuelle (RV)	38
2. De la recherche clinique vers la recherche préclinique : tests automatisés sur écrans tactiles, Touchscreen®	39
IV. Statines et cognition	40
A. Pharmacologie des statines.....	40
B. Statines et cognition : données cliniques.....	43

1.	Population générale	43
2.	Patients présentant des troubles cognitifs (TCL à Alzheimer)	45
C.	Statines et cognition : effets sur le cholestérol et effets pléiotropes	46
1.	Effets dépendants du cholestérol	46
2.	Effets pléiotropes	46
2.1.	Effets sur la neurogénèse, angiogénèse, synaptogénèse	47
2.2.	Effets sur le métabolisme du peptide A β	48
2.3.	Effets sur l'inflammation	48
2.4.	Effets sur le stress oxydant et nitrosant	48
2.5.	Effets vasculaires	49
V.	Objectifs du travail de thèse	50
MATÉRIEL ET MÉTHODES		51
I.	Les animaux	52
A.	Description de la lignée animale utilisée	52
B.	Élevage	53
C.	Génotypage	53
1.	Extraction de l'ADN génomique	53
2.	PCR quantitative en temps réel	54
D.	Stabulation	55
E.	Modulation pharmacologique par Atorvastatine	55
II.	Protocoles expérimentaux	55
A.	Constitution des groupes	55
B.	Caractérisation fonctionnelle du modèle de microhémorragie chez la souris WT	56
C.	Etude de l'effet neurocomportemental de la MHC au cours du temps : suivi longitudinal... ..	56
D.	Etude de l'effet neurocomportemental de la MHC à court terme chez la souris APP	57
E.	Etude morphologique par imagerie et immunohistochimique	57
III.	Chirurgie et induction de la lésion microhémorragique au niveau cortical (MHC)	58
IV.	Imagerie par résonance magnétique (IRM)	59
A.	Préparation de l'animal	60
B.	Acquisition des images 24h après la chirurgie	60
C.	Acquisition des images de fin de suivi à 1,5 mois, 6 mois et 12 mois	61
V.	Tomodensitométrie par émission de positons (TEP)	62
A.	Acquisition des images à 1,5 mois, 6 mois et 12 mois lors du suivi cinétique	62
B.	Post traitement des images	63
VI.	Tests neurocomportementaux	64
A.	Actimétrie : évaluation de l'activité locomotrice spontanée	64
B.	Le labyrinthe en croix surélevé : évaluation du niveau d'anxiété	65
C.	Labyrinthe en Y : test d'alternance spontanée pour l'évaluation de la mémoire de travail... ..	65
D.	Le labyrinthe de Barnes : évaluation de la mémoire de référence spatiale	66

1.	Phase d'habitation et d'acquisition.....	67
2.	Test de rétention	68
E.	Touchscreen®, système automatisé : Paired-associate learning (PAL) task pour l'évaluation de la mémoire visuo-spatiale.....	69
VII.	Sacrifice et préparation des tissus.....	74
VIII.	Marquages immunohistochimiques.....	75
A.	Marquage des dépôts β amyloïdes.....	75
B.	Marquage des astrocytes activés	76
C.	Analyse semi-quantitative	76
IX.	Prélèvements sanguins et dosage plasmatique du cholestérol.....	77
X.	Statistiques.....	77
XI.	Ethique.....	78
RÉSULTATS	79
I.	Impact cognitif d'une MHC : preuve de concept	80
A.	Caractérisation fonctionnelle comportementale du modèle de MHC.....	80
1.	Locomotion et anxiété :.....	80
2.	Mémoire de référence spatiale :.....	81
3.	Mémoire de travail	82
4.	Mémoire visuospatiale.....	83
B.	Caractérisation fonctionnelle du métabolisme cérébral.....	84
II.	Effet cognitif de la MHC au cours du temps : étude fonctionnelle longitudinale sur 12 mois..	85
A.	Effectifs et mortalité.....	85
B.	Suivi longitudinal chez la souris WT	86
1.	Suivi de l'activité locomotrice spontanée.....	86
2.	Suivi du niveau d'anxiété	87
3.	Suivi de la mémoire de référence spatiale.....	87
C.	Suivi longitudinal chez la souris APP	91
1.	Suivi de l'activité locomotrice spontanée.....	91
2.	Suivi du niveau d'anxiété	92
3.	Suivi de la mémoire de référence spatiale	92
III.	Etude fonctionnelle approfondie sur le premier temps post-chirurgie chez les souris APP..	96
A.	Effectifs et mortalité.....	96
B.	Evaluation fonctionnelle non cognitive.....	97
1.	Activité locomotrice spontanée	97
2.	Niveau d'anxiété.....	97
C.	Mémoire de travail	98
D.	Mémoire visuospatiale.....	99
IV.	Etude morphométrique	101
A.	À 1,5 mois post-chirurgie.....	102

B.	A 6 mois post-chirurgie	104
C.	A 12 mois post-chirurgie	106
V.	Données préliminaires d’immunohistochimie	108
VI.	Dosage du cholestérol plasmatique	110
DISCUSSION.....		112
I.	Effet propre de la MHC : un effet étendu dans le temps et dans l’espace	114
A.	En condition « saine »	114
B.	En condition pathologique.....	117
II.	Effet de la modulation pharmacologique par atorvastatine	119
III.	Forces et limites de cette étude.....	124
IV.	Perspectives	130
V.	CONCLUSION	132
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES		134

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1: Illustration des microhémorragies cérébrales intraparenchymateuses en IRM cérébrales séquence T2*.....	5
Figure 2: Clivage enzymatique de l'APP, voies amyloïdogénique et non amyloïdogénique (LaFerma et al., 2007).....	18
Figure 3: Modèle d'évolution des biomarqueurs et des signes cliniques de la MA au cours du temps.	20
Figure 4: Taxonomie de la mémoire inspirée de Squire (2004).....	28
Figure 5: Représentation schématique des différentes versions du paradigme de préférence pour la nouveauté.	31
Figure 6: Test de mémoire de type épisodique selon le protocole de Dere et al., 2005.	32
Figure 7: Représentation schématique des phases du "What-Where-Which" selon Eacott et al., 2004.	34
Figure 8: Exemples de dispositifs utilisés pour l'évaluation de la mémoire de travail grâce à des tâches spatiales.	36
Figure 9: Voie de biosynthèse du cholestérol.....	41
Figure 10: Structures moléculaires des statines.....	42
Figure 11: Protocole de suivi longitudinal sur 12 mois post-chirurgie	56
Figure 12: Protocole de suivi à court terme chez la souris APP.....	57
Figure 13: Protocole de l'étude morphométrique et immunohistochimique.....	58
Figure 14: Description de la chirurgie stéréotaxique.....	59
Figure 15: Coupes coronales de cerveaux de souris à 24h post-chirurgie en IRM séquence T2*.	61
Figure 16: Exemple de délimitation des zones d'intérêt sur une coupe coronale en 3D T2.	62
Figure 17: Visualisation des zones d'intérêt sur les images TEP.	64
Figure 18: Représentation du labyrinthe en Y utilisé pour le test d'alternance spontanée.	66
Figure 19: Labyrinthe de Barnes et repères spatiaux.	67
Figure 20: Représentation schématique du test du labyrinthe de Barnes.	69
Figure 21: Chambres opérantes du système automatisé Touchscreen® utilisées pour le test dPAL.	70
Figure 22: Illustration de l'intérieur d'une chambre opérante en cours de test dPAL.	73
Figure 23: Diagramme représentant le déroulement d'un essai au cours du test dPAL. Adapté de Horner et al., 2013.	74
Figure 24: Localisation des coupes de cerveau d'après l'atlas de Paxinos et Franklin.	75
Figure 25: Évaluation de l'activité locomotrice spontanée et du niveau d'anxiété à 6 semaines post-chirurgie.	80
Figure 26: Évaluation, à 6 semaines post-chirurgie, de l'apprentissage et de la mémoire de référence spatiale par le labyrinthe de Barnes.	81
Figure 27: Évaluation de la mémoire de travail par le test de l'alternance spontanée à 6 semaines post-chirurgie.	82

Figure 28: Mémoire visuospatiale évaluée par le tes dPAL à 6 semaines post-chirurgie.	83
Figure 29: Métabolisme cérébral in vivo (TEP-[18F]FDG) à 6 semaines post-chirurgie.	84
Figure 30: Courbes de survie des groupes de souris incluses dans la cohorte de suivi longitudinal.	85
Figure 31: Activité locomotrice spontanée des groupes WT au cours du suivi longitudinal.	86
Figure 32: Niveau d'anxiété des souris WT évalué par le labyrinthe en croix surélevé au cours du suivi longitudinal.	87
Figure 33: Données d'apprentissage au cours des jours d'acquisition du labyrinthe de Barnes pour les souris WT.	89
Figure 34: Évolution de la latence primaire le jour du test de rétention pour les groupes WT.	90
Figure 35: Mémoire de référence spatiale évaluée lors du test de rétention du labyrinthe de Barnes pour les groupes WT.	90
Figure 36: Activité locomotrice spontanée des groupes APP au cours du suivi longitudinal.	91
Figure 37: Niveau d'anxiété des souris APP évalué par le labyrinthe en croix surélevé au cours du suivi longitudinal.	92
Figure 38: Données d'apprentissage au cours des jours d'acquisition du labyrinthe de Barnes pour les souris APP au cours du suivi longitudinal.	93
Figure 39: Évolution de la latence primaire le jour du test de rétention pour les groupes APP au cours du suivi longitudinal.	94
Figure 40: Évaluation de la mémoire de référence spatiale lors du test de rétention du labyrinthe de Barnes pour les groupes APP au cours du suivi longitudinal.	95
Figure 41: Courbes de survie des groupes de souris APP.	96
Figure 42: Activité locomotrice spontanée des souris APP à 6 semaines post-chirurgie.	97
Figure 43: Niveau d'anxiété des souris APP évalué par le labyrinthe en croix surélevé à 6 semaines post-chirurgie.	98
Figure 44: Évaluation, à 6 semaines post-chirurgie, de la mémoire de travail des souris APP par le test d'alternance spontanée.	98
Figure 45: Nombre d'essais convertis au cours du test du dPAL pour les groupes APP à 6 semaines post-chirurgie.	99
Figure 46: Mémoire visuospatiale évaluée par le pourcentage de réponses correctes au test dPAL pour les APP à 6 semaines post-chirurgie.	100
Figure 47: Mémoire visuospatiale évaluée par le pourcentage de réponses correctes au test dPAL, comparaison des groupes APP sham et WT sham à 6 semaines post-chirurgie.	100
Figure 48: Volumétrie des structures corticales et hippocampiques à 1,5 mois post-chirurgie.	102
Figure 49: Métabolisme cérébral in vivo à 1,5 mois post chirurgie.	103
Figure 50: Volumétrie des structures corticales et hippocampiques à 6 mois post-chirurgie.	104
Figure 51: Métabolisme cérébral in vivo à 6 mois post-chirurgie.	105
Figure 52: Volumétrie des structures corticales et hippocampiques à 12 mois post-chirurgie.	106

Figure 53: Métabolisme cérébral in vivo à 12 mois post-chirurgie.....	107
Figure 54: Marquage des astrocytes activés chez les souris WT à 12 mois post-chirurgie.....	108
Figure 55: Marquage des dépôts amyloïdes et des astrocytes activés chez les souris APP à 12 mois post-chirurgie.....	109
Figure 56: Dosage du cholestérol plasmatique total.....	110

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Principaux promoteurs utilisés dans les modèles transgéniques de MA.	22
Tableau 2: Liste des séquences d'amorces utilisées pour le géotypage	54
Tableau 3: Effectifs, par groupe et par temps, pour lesquels une acquisition IRM a été réalisée.	101
Tableau 4: Effectifs, par groupe et par temps, pour lesquels une acquisition TEP-FDG a été réalisée.	101

LISTE DES ABRÉVIATIONS

MHC : Microhémorragie cérébrale
IRM : Imagerie par résonance magnétique
AVC : Accident vasculaire cérébral
SWI : Susceptibility-weighted imaging,
AAC : Angiopathie amyloïde cérébrale
TCL : Trouble cognitif léger
MA : Maladie d'Alzheimer
TEP : Tomographie par émission de positons
APOE : Apolipoprotéine E
BHE : Barrière hémato-encéphalique
MEC : Matrice extracellulaire
HIC : Hémorragie intracérébrale
MMP: Matrix metalloproteinase
TNF α : Tumor Necrosis Factor α
MMSE : Mini-mental state examination
PSEN : Préséniline
A β : Amyloïde β
DNF : Dégénérescences neurofibrillaires
APP : Amyloid protein precursor
C57Bl/6 : Souris de lignée « C57 Black 6)
PDGF- β : Platelet-derived growth factor β -chain

RAM: Radial-arm maze
RV: Réalité virtuelle
CANTAB: Cambridge Neuropsychological Test Automated Battery
PAL: Paired-associate learning
HMG-CoA: 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A
SNC: Système nerveux central
ADAS-cog: Alzheimer's Disease Assessment Scale – cognitive subscale
ADCS-CGIC: Alzheimer's Disease Cooperative Study Clinical Global Impression of Change
GTPase: Guanosine Triphosphate hydrolase
PLT: Potentialisation à long terme
PPAR: Peroxysome Proliferator-Activated Receptor
WT: Wild Type
GFAP: Glial Fibrillary Acidic Protein
FDG: Fluorodésoxyglucose

INTRODUCTION

I. Les microhémorragies cérébrales

A. Description – Définition

Depuis le milieu des années 90, les microhémorragies (microbleeds) cérébrales (MHC) ont suscité un intérêt grandissant. L'amélioration des techniques d'imagerie par résonance magnétique (IRM) et leur utilisation plus répandue aussi bien en recherche clinique qu'en pratique courante notamment dans l'exploration d'atteintes neurologiques comme les accidents vasculaires cérébraux (AVC), a permis la détection de plus en plus fréquente de ces petites lésions d'aspect caractéristique (Cordonnier et al., 2007). Elles sont observées par IRM grâce à des séquences en écho de gradient T2* ou d'imagerie de susceptibilité magnétique (SWI) capables de mettre en évidence un fort contraste entre le parenchyme cérébral et les substances paramagnétiques comme l'hémosidérine. Le choix de la séquence et des paramètres utilisés comme la force du champ magnétique, le temps d'écho ou l'épaisseur des coupes peuvent influencer la détection des MHC (Nandigam et al. 2009). La SWI, qui utilise une séquence 3D en écho de gradient associée à un post-traitement permettant d'augmenter le contraste, est plus récente et plus sensible dans la détection des MHC que la T2* conventionnelle (Haddar, 2004; Shams et al., 2015). Les MHC apparaissent comme des petites lésions arrondies ou ovoïdes en hyposignal. Une des premières études de corrélation histopathologique a permis de montrer que ces lésions correspondent à des dépôts périvasculaires d'hémosidérine entourés de parenchyme cérébral (Fazekas et al., 1999). Des microsaignements provenant de petits vaisseaux sont à l'origine de la présence d'érythrocytes dans l'espace périvasculaire. L'hémoglobine contenue dans les érythrocytes est dégradée par des macrophages qui se retrouvent chargés en hémosidérine (Ungvari et al., 2017). Une revue de 2011 sur les corrélations entre les données de neuro-imagerie et les données histopathologiques a également confirmé l'association de ces lésions à d'anciens saignements principalement révélés par la présence de macrophages chargés d'hémosidérine (Shoamanesh et al., 2011). La taille des MHC a été définie de manière variable selon les études. Cordonnier et al, en 2007 ont relevé sur 54 études, 6 définitions différentes et arbitraires du diamètre de ces lésions : 2-5 mm, ≤ 5 mm, ≤ 7 mm, 2-10 mm, ≤ 10 mm, 2 mm minimum. Les MHC ou « microbleeds » ont également été définis comme des lésions de 1 à 3 mm de large, visibles macroscopiquement par opposition aux « minibleeds » visibles seulement à l'examen

microscopique (De Reuck 2012). Une étude s'est intéressée aux volumes des hémorragies cérébrales observées à l'IRM chez des patients diagnostiqués comme ayant une possible ou probable angiopathie amyloïde cérébrale. Elle a permis de mettre en évidence une distribution bimodale de ces volumes avec deux pics bien distincts, le premier autour d'un diamètre moyen de 37,5 mm (lésions appelées macrobleeds) et le deuxième autour d'un diamètre moyen de 2,6 mm (lésions correspondant aux microbleeds) avec un diamètre seuil de 5,7 mm permettant de distinguer ces deux populations de manière optimale. Les auteurs ont ainsi défini les macrobleeds et les microbleeds (MHC) comme deux entités physiopathologiques distinctes (Greenberg et al., 2009). La plupart des études utilisent aujourd'hui un diamètre maximal consensuel de 5 à 10 mm pour définir les MHC de façon à homogénéiser les travaux sur ces lésions (Greenberg et al., 2009).

B. Données épidémiologiques

En fonction des paramètres d'IRM utilisés et de la sélection des participants, la prévalence des MHC dans différentes situations cliniques peut être très variable. Des cohortes issues de la population générale, notamment la cohorte de la Rotterdam Scan Study, a permis de mettre en évidence une prévalence augmentant avec l'âge et allant de 6% chez des personnes âgées de 45 à 50 ans à 35,7% pour des sujets de 80 ans et plus avec une prévalence globale de 15,3% au sein de la cohorte (Poels et al. 2010). Dans la cohorte de la Framingham Heart Study, la prévalence est de 8,8% et augmente significativement avec l'âge (Romero et al., 2014). Une cohorte Japonaise ayant recruté 518 participants âgés d'au moins 30 ans a montré une prévalence de 6,8% (Yakushiji et al., 2008). Enfin, dans la cohorte AGES (Age, Gene/Environment Susceptibility) Reykjavik Study, la prévalence des MHC est de 16,8% (Ding et al. 2017). Chez les sujets ayant présenté un AVC, la prévalence des MHC est augmentée : autour de 34% pour les AVC ischémiques et de 60% pour les AVC hémorragiques et cette prévalence est encore plus élevée en cas d'AVC récurrent (Cordonnier et al., 2007). Dans l'angiopathie amyloïde cérébrale (AAC), la prévalence peut aller de 16 à 38% pour les formes sporadiques à 69% pour une forme héréditaire (Koennecke 2006). Comparée à la population générale, la prévalence des MHC retrouvée chez les personnes atteintes de troubles cognitifs ou de démence est plus élevée. On relève par exemple une prévalence de 20% (Cordonnier et al., 2006) à 43% (Haller 2010) chez les patients atteints de troubles cognitifs légers (TCL), d'environ 65% chez les patients atteints de démence

vasculaire (Cordonnier et al., 2006) et d'environ 23% chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer (MA) (Cordonnier et al., 2011; Sepehry et al., 2016).

C. Etiologies et facteurs de risque

Les quelques études histopathologiques qui ont été réalisées (Fazekas et al., 1999; Shoamanesh et al., 2011) ont montré une association des MHC avec deux principaux types de vasculopathies cérébrales qui sont les plus fréquents (Pantoni 2010) : la vasculopathie hypertensive ou artériosclérose et l'angiopathie amyloïde cérébrale . L'artériosclérose est une vasculopathie cérébrale liée à l'âge et aux facteurs de risque vasculaire comme l'hypertension dont elle est la conséquence. Elle est principalement caractérisée par la perte de cellules musculaires lisses au niveau de la media et par la présence de lipofibrohyalinose réduisant la lumière du vaisseau et conduisant à un épaissement de sa paroi. Elle affecte majoritairement les artérioles pénétrantes profondes. L'AAC résulte, elle, de l'accumulation progressive de dépôts de protéine β -amyloïde dans la paroi des petites et moyennes artères et artérioles leptoméningées et corticales. L'AAC sporadique est fréquemment rencontrée chez les sujets âgés (10 à 40%) et chez plus de 80% des personnes ayant une MA concomitante. L'allèle APOE ϵ 4 est associé à un risque accru d'AAC (Biffi et al., 2011). Ces vasculopathies cérébrales, qui peuvent coexister chez un même individu, sont à l'origine de lésions caractéristiques, les infarctus lacunaires et les lésions de la substance blanche qui sont considérés comme des marqueurs de ces maladies (Pantoni 2010).

Des études réalisées chez des sujets atteints d'AAC et ayant recours à des techniques d'IRM et de tomographie par émission de positons (TEP) avec injection de PiB (Pittsburgh compound B, analogue radioactif de la thioflavine T permettant de détecter les dépôts de protéine β -amyloïde) ont démontré une relation spatiale et prédictive entre les dépôts amyloïdes vasculaires et les MHC. Une rétention de PiB augmentée a été observée à proximité immédiate de MHC impliquant l'accumulation vasculaire locale de dépôt amyloïde comme une étape préalable à la rupture du vaisseau et à la survenue de la MHC qu'elle induit (Dierksen et al. 2010). Une autre étude a montré, grâce à un suivi longitudinal, que les nouvelles MHC apparues à un an de suivi se trouvent préférentiellement au niveau des zones où la rétention de PiB était plus élevée au départ (Gurol et al. 2012).

L'ensemble de ces observations est en faveur d'une distribution topographique des MHC différente selon l'étiologie sous-jacente. Ainsi, les MHC profondes sont plutôt associées à une vasculopathie hypertensive et les MHC strictement lobaires à l'AAC (Greenberg et al., 2009; Martinez-Ramirez et al., 2014; Yates et al., 2014). Aujourd'hui, les MHC sont considérées comme un marqueur supplémentaire des vasculopathies cérébrales. Le poids cumulé de ces lésions peut représenter un éclairage intéressant dans la progression de la ou des vasculopathies sous-jacentes et est un paramètre à prendre en compte dans diverses implications cliniques (critère de diagnostic, atteinte cognitive, risque de récurrence d'AVC ischémique ou hémorragique, mortalité, prise en charge médicamenteuse). Par exemple, la présence, le nombre et la localisation des MHC ont été intégrés dans les critères de Boston pour le diagnostic d'AAC afin d'en améliorer la sensibilité de détection notamment chez les individus asymptomatiques (Yates et al. 2014).

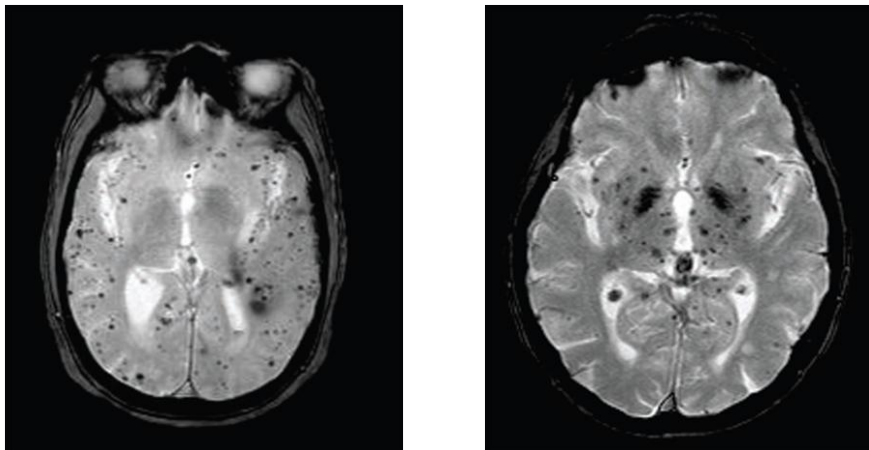


Figure 1: Illustration des microhémorragies cérébrales intraparenchymateuses en IRM cérébrales séquence T2*.

À gauche : localisation cortico sous-corticale des lésions suggérant une AAC ; À droite : localisation profonde suggérant une vasculopathie hypertensive.

Un ensemble de données cliniques obtenu grâce à des études de neuro-imagerie ou des études histopathologiques ainsi que des données épidémiologiques (Ding et al., 2015; Poels et al., 2010; Romero et al., 2014) ont permis d'associer les MHC, en fonction de leur localisation, à des facteurs de risques vasculaires (âge, hypertension), génétiques (APOE ϵ 4) et à des marqueurs déjà connus des vasculopathies cérébrales (infarctus lacunaires, lésions de la substance blanche). Ainsi, l'allèle ϵ 4 du gène de l'apolipoprotéine E (APOE) augmente le risque de MHC lobaires (régions cortico-subcorticales des lobes cérébraux et du cervelet). Les

facteurs de risques vasculaires comme l'hypertension ou la consommation de tabac augmentent le risque de MHC profondes (substance blanche profonde, ganglions de la base, thalamus, cervelet, tronc cérébral) et mixtes (profondes et lobaires). Des études ont montré que la présence de MHC ainsi que celle de lésions caractéristiques de vasculopathie cérébrale comme les lésions de la substance blanche ou les infarctus lacunaires, constituent un facteur de risque de survenue de nouvelles MHC (Ding et al. 2015; Poels et al. 2011). Le profil lipidique pourrait également influencer l'incidence des MHC. Ding et al, ont ainsi associé un taux élevé de HDL cholestérol et un taux bas de triglycérides à une augmentation du risque de MHC lobaires. Deux autres études ont trouvé une augmentation de l'incidence des MHC profondes lorsque le cholestérol total est bas (Poels et al., 2010; Romero et al., 2014).

D. Pistes physiopathologiques

Il est couramment évoqué que les MHC résultent d'une perte d'intégrité au niveau des microvaisseaux cérébraux permettant l'extravasation de cellules sanguines (décrit comme MHC primaires) ou de micro infarctus hémorragiques (décrits comme MHC secondaires) (Fisher 2014). Cependant, les mécanismes physiopathologiques qui sous-tendent le développement des MHC ne sont pas encore précisément connus. Les altérations des parois vasculaires entraînant une rupture de la barrière hémato-encéphalique (BHE) peuvent être à l'origine de la formation des MHC (Sweeney et al., 2018). Plusieurs mécanismes possibles ont été évoqués et exposés dans une revue de 2017 (Ungvari et al. 2017). Des altérations de la matrice extracellulaire (MEC) des vaisseaux cérébraux pourraient intervenir dans la pathogénèse des MHC. Les principaux composants de la MEC sont le collagène et l'élastine qui forment un réseau connecté aux cellules musculaires lisses situées dans la media. Ils sont responsables des propriétés mécaniques de la paroi des vaisseaux. Une altération de la MEC peut être un facteur important dans la formation de MHC. De nombreux modèles animaux cherchant à reproduire des hémorragies intracérébrales (HIC) ont d'ailleurs recours à l'injection d'enzymes de dégradation de la MEC comme la collagénase (Manaenko et al., 2011). Physiologiquement, ce sont les métalloprotéinases (MMP) exprimées par les artères cérébrales qui dégradent l'élastine, le collagène et d'autres composants de la MEC. Un modèle murin d'hémorragie intracérébrale induite par une hypertension aigüe surajoutée à une hypertension chronique a suggéré l'implication d'un stress oxydant induit par une injection d'Angiotensine II et pouvant entraîner une augmentation du niveau de MMP-9 responsable

d'une altération de la MEC des vaisseaux cérébraux (Wakisaka et al., 2010). Un autre modèle murin de MHC induit par un régime alimentaire entraînant une hyperhomocystéinémie a aussi retrouvé une expression augmentée des MMP-2 et 9 (Sudduth et al., 2013). Une étude, réalisée sur des coupes de cerveaux humains issues de patients atteints d'AAC à des stades plus ou moins avancés, a mis en évidence une accumulation de MMP-9 à proximité des MHC suggérant un éventuel rôle dans leur développement (Zhao et al. 2015).

Les sujets âgés ou atteints d'AAC présentent une perte d'élastine et de cellules musculaires lisses qui participent aux propriétés mécaniques et structurelles des vaisseaux cérébraux. Cette altération de la paroi vasculaire peut la fragiliser et favoriser les saignements (Ungvari et al. 2017). L'âge et l'hypertension ont été associés à une augmentation de la rigidité des artères centrales (aortes et carotides). La perte d'élasticité au niveau de ces artères peut entraîner une augmentation de la pression systolique et de la pression pulsatile qui est transmise jusqu'à la microcirculation cérébrale (Tarumi et al. 2014). Une altération du tonus myogénique impliqué dans les processus d'autorégulation limite son action protectrice vis-à-vis des événements hypertensifs, ici, de l'augmentation de la pression pulsatile venant s'exercer sur les microvaisseaux cérébraux (Ungvari et al. 2017). Ceci entraîne des dommages affectant ces microvaisseaux et pouvant causer une rupture de la barrière hémato-encéphalique. Un autre mécanisme a récemment été proposé, l'érythrophagocytose réalisée par l'endothélium des vaisseaux cérébraux lorsque les érythrocytes sont exposés à un stress oxydant. Une approche *in vitro*, sur une monocouche des cellules endothéliales cérébrales, a permis de mettre en évidence ce phénomène accompagné par un passage d'hémoglobine de l'autre côté de la monocouche et ceci sans altération de son intégrité. L'extravasation d'érythrocytes exposés à un stress oxydant au niveau de l'endothélium cérébral a ensuite été confirmée *in vivo* chez la souris (Chang et al. 2018). Ce résultat est intéressant car l'âge et les facteurs de risques vasculaires favorisent un état pro-oxydant. Enfin, des études ont montré l'association de différents marqueurs de l'inflammation avec les MHC suggérant leur potentielle implication dans la pathogénèse de ces dernières (Miwa et al. 2011; Shoamanesh et al. 2015). Des niveaux plasmatiques plus élevés du récepteur 2 au TNF α (Tumor Necrosis Factor α) et de la myéloperoxydase ont été retrouvés chez les sujets présentant des MHC. Les auteurs évoquent la possibilité, pour ces deux marqueurs, d'être à l'origine ou d'être la conséquence des MHC. En effet, ils peuvent tous les deux induire des dysfonctions endothéliales et de la BHE favorisant la survenue d'un saignement mais ils pourraient également être produits par la microglie activée suite à la survenue de la MHC. Un taux

plasmatique plus élevé de Lp-PLA2 (lipoprotein-associated phospholipase A2), marqueur de dysfonction endothéliale, a été constaté chez les sujets présentant un grand nombre de MHC (≥ 3) (Shoamanesh et al., 2015). Miwa et al, ont eux, associé la présence de MHC à des taux plasmatiques plus élevés de marqueurs inflammatoires (protéine C réactive, interleukines 6 et 18).

Par ailleurs, en dehors des deux principales étiologies (vasculopathie hypertensive et AAC), d'autres situations cliniques peuvent entraîner le développement de MHC comme par exemple l'endocardite infectieuse, les traumatismes crâniens, l'abus de cocaïne, la radiothérapie, la drépanocytose, les apnées obstructives du sommeil... Ces causes, moins communes, pourraient apporter des pistes différentes dans l'étude des mécanismes physiopathologiques à l'origine des MHC (Noorbakhsh-Sabe et al., 2017).

E. Implications cliniques : MHC et troubles cognitifs

Les fonctions cognitives sont les capacités du cerveau permettant de communiquer, de percevoir l'environnement, de se concentrer, de se souvenir d'un événement, de mémoriser, de raisonner, de produire des mouvements. Elles regroupent la mémoire, les fonctions instrumentales (langage, gestes, capacités visuospatiales, calcul) et les fonctions exécutives et l'attention impliquées dans la résolution de problèmes, la planification, l'anticipation, le raisonnement, la prise de décision, la flexibilité mentale, le jugement. Les fonctions cognitives interagissent entre elles. L'attention, par exemple, est impliquée dans le bon fonctionnement d'autres fonctions cognitives dont la mémoire et les fonctions exécutives. Elles peuvent être altérées, soit de façon sélective, soit de façon globale, au cours des syndromes confusionnels et démentiels. Pour rappel, les patients atteints de troubles cognitifs légers (TCL) répondent à plusieurs critères : ils présentent une altération cognitive sans toutefois correspondre aux critères diagnostiques de démence selon le Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux (DSM), les activités fonctionnelles sont principalement préservées ou avec une altération minimale, il existe des preuves de déclin cognitif (plainte du patient ou d'un proche, évaluations par des tests neuropsychologiques) (Winblad et al. 2004). Selon le DSM-V, la démence ou trouble neurocognitif majeur répond aux critères suivants : évidence d'un déclin cognitif significatif par rapport au niveau de performance antérieur dans un domaine cognitif ou plus (attention, fonctions exécutives, apprentissage et mémoire, langage, perception, motricité, cognition sociale), les déficits cognitifs interfèrent avec

l'indépendance dans les activités quotidiennes, ne se produisent pas exclusivement dans le cadre d'un délirium et ne sont pas mieux expliqués par un autre trouble mental (trouble dépressif majeur, schizophrénie).

1. Dans la population générale

Les répercussions cognitives des MHC sont un sujet de débat. D'abord considérées comme cliniquement silencieuses (Kwa et al., 1998; Roob et al., 2000), les MHC ont fait l'objet de nombreux travaux depuis une quinzaine d'années. Ils fournissent des résultats parfois contradictoires mais semblent démontrer un impact cognitif de ces lésions. L'une des premières études à avoir évalué l'impact cognitif des MHC a comparé deux groupes semblables en termes de genre, âge, quotient intellectuel, étendue de lésions de la substance blanche, présence, type et localisation d'AVC, l'un avec MHC et l'autre sans. Une batterie de tests neuropsychologiques a révélé une fréquence augmentée de dysfonction exécutive dans le groupe avec MHC (60%) par rapport au groupe sans MHC (30%), l'effet observé des MHC étant indépendant vis-à-vis de potentiels facteurs confondant comme les lésions de la substance blanche. Parmi les individus présentant une dysfonction exécutive, les MHC ont été localisées principalement au niveau des lobes frontaux et des ganglions de la base ce qui a amené les auteurs à l'hypothèse d'une altération par les MHC des circuits frontaux-subcorticaux considérés comme substrats des fonctions exécutives. Une association entre le nombre de MHC et le nombre de domaines cognitifs altérés a aussi été relevée suggérant une importance du poids cumulatif des MHC dans l'atteinte cognitive (Werring et al. 2004). En 2008, une étude Japonaise réalisée sur des sujets sans troubles neurologiques, a montré que la présence et le nombre des MHC sont associés à des scores subnormaux au MMSE (minimal state examination, test évaluant les fonctions cognitives globales) (Yakushiji et al., 2008). Une étude de 2016, réalisée sur une cohorte prospective issue de la population générale (The Rotterdam Study), a mis en évidence que la présence de plus de 4 MHC est associée à un déclin cognitif. Les MHC lobaires ont été associées à des altérations des fonctions exécutives, du traitement de l'information et de la mémoire, tandis que les MHC situées dans d'autres régions ont été associées à des altérations dans les vitesses de traitement de l'information et motrice. Un nombre élevé de MHC a été associé à un risque augmenté de détérioration cognitive et de survenue de démence (Akoudad et al. 2016). Cette étude suggère un rôle de la localisation et du poids des MHC présentes. Les auteurs évoquent l'hypothèse que les MHC sont plutôt le reflet de la sévérité des vasculopathies sous-jacentes, exerçant une influence

indirecte dans la mesure où les MHC multiples associées aux altérations cognitives étaient réparties dans des régions cognitives variées et non pas situées dans des régions stratégiques bien spécifiques. Une autre cohorte prospective issue de la population générale et composée de sujets âgés sans démence initiale (AGES-Reykjavik Study) a été étudiée pour rechercher les répercussions cognitives des MHC en fonction de leur nombre et de leur localisation. Après ajustement avec les facteurs démographiques, génétiques, cardiovasculaires, et les autres marqueurs de vasculopathie cérébrale, la présence des MHC profondes ou mixtes (profondes et lobaires) a été associée à une altération plus rapide des 3 domaines étudiés (mémoire verbale, vitesse de traitement de l'information et fonctions exécutives). Les MHC mixtes ont été plus fortement associées à une altération de la mémoire et des fonctions cognitives globales. Le nombre des MHC semble également avoir une influence car les individus ayant au moins 3 MHC ont présenté un déclin cognitif plus brutal, avec une association plus forte des MHC mixtes avec la mémoire et des MHC lobaires avec la vitesse de traitement de l'information. De plus, une incidence plus élevée de démence a été constatée chez ces individus (Ding et al. 2017). Une méta-analyse réalisée en 2017 et regroupant 25 études a conclu que la présence de MHC augmente l'incidence d'altérations cognitives, particulièrement dans les fonctions d'orientation, d'attention, de mémoire, de vitesse de traitement de l'information et des fonctions exécutives (Li et al. 2017). Une récente étude Australienne menée sur une population de sujets âgés non déments, avec ou sans MHC, et avec un suivi à 4 ans a montré, après ajustement avec les facteurs démographiques et les facteurs de risque vasculaires, une association entre la présence de MHC et des fonctions exécutives altérées sans atteinte des autres domaines cognitifs. L'analyse longitudinale a mis en évidence une plus forte atteinte des fonctions visuospatiales chez les sujets qui avaient des MHC par rapport à ceux qui n'en avaient pas. En revanche, aucune influence des MHC sur le taux d'incidence de démence n'a été constatée (Paradise et al. 2018). Certains résultats peuvent être contradictoires. Une étude a par exemple montré, sur une cohorte de sujets sans atteinte neurologique, une association entre la présence de MHC strictement profondes et une altération des fonctions cognitives globales évaluées par le MMSE (Yakushiji et al., 2012) tandis qu'une autre réalisée sur une cohorte de sujets âgés issus de la population générale a montré que seuls les MHC strictement lobaires étaient associées à un déficit cognitif global (évalué par le MMSE) et à une altération des fonction exécutives visuospatiales (Chung et al. 2016). Des résultats négatifs ont aussi été rapportés. Une étude a évalué les fonctions cognitives chez des individus « cognitivement intacts » et d'autres avec TCL, tous présentant des MHC et suivis sur 18 mois. Ni le nombre de MHC ni leur localisation n'ont été associés à

une altération cognitive. De plus, lors de l'analyse à 18 mois, la présence de MHC au début de l'étude n'a pas été associée à un déclin cognitif (Barnaure et al. 2017).

De nombreux facteurs peuvent influencer les résultats des différentes études comme par exemple les techniques d'imagerie utilisées, les caractéristiques des cohortes (démographique, génétiques, facteurs de risques vasculaires...), les tests neuropsychologiques employés. Cependant, la littérature disponible semble montrer un effet des MHC sur les fonctions cognitives dans la population générale. Cet effet est vraisemblablement indépendant d'autres facteurs (facteurs de risques vasculaires, autres marqueurs des vasculopathies cérébrales). Le nombre et la localisation semblent également avoir une importance. Deux principales hypothèses sont régulièrement évoquées concernant les mécanismes responsables de l'effet des MHC. Les MHC pourraient causer des dommages localisés du tissu cérébral et une modification microstructurale du tissu environnant ce qui pourrait entraîner une altération de certaines voies cortico-subcorticales et réseaux neuronaux impliqués dans les processus cognitifs. L'autre hypothèse présente les MHC comme le reflet des atteintes et de la sévérité des vasculopathies sous-jacentes qui seraient responsables de dommages cérébraux globaux comme une altération de la barrière hémato-encéphalique, une diminution du flux sanguin cérébral, une hypoxie (Ding et al. 2017; Haller et al. 2018).

2. Dans la population avec démences et maladie d'Alzheimer

Différentes études ont montré une prévalence plus élevée des MHC chez les sujets atteints de démence que dans la population générale. Shams et al, se sont intéressés à la topographie et à la prévalence des MHC dans les différents types de démence. Les MHC lobaires et occipitales sont très prédominantes dans la MA. Cette répartition, très typique de l'AAC, suggère l'importance de la pathologie amyloïde vasculaire dans la MA. Parmi les autres diagnostics de démence, des MHC lobaires et profondes sont retrouvées. De ce fait, certaines hypothèses proposent que les MHC, marqueurs à la fois des pathologies vasculaires amyloïde et hypertensive et de leur potentiel effet synergique ou additif, pourraient jouer un rôle important dans les mécanismes physiopathologiques des démences (Shams et al., 2015). En plus de constituer des pistes pour les mécanismes impliqués, pourraient-elles jouer le rôle de biomarqueur participant au diagnostic différentiel précoce, de marqueur prédictif d'évolution vers la démence, de progression plus sévère de la maladie ? Définissent-elles un phénotype particulier parmi les patients atteints de MA ?

Des études de population générale récentes ont montré une association entre MHC, plus particulièrement MHC profondes et mixtes, et un risque accru de démence de tous types (Akoudad et al. 2016) y compris de type Alzheimer (Romero et al., 2017), suggérant la contribution des maladies cérébrovasculaires dans le développement des démences et faisant des MHC des marqueurs d'évolution neurologique potentiellement utiles. En revanche une autre étude n'a pas retrouvé d'association entre la présence de MHC et le taux d'incidence de démence au cours d'un suivi longitudinal de 4 ans (Paradise et al. 2018).

L'intérêt des MHC comme biomarqueurs permettant d'identifier différents stades de démence a été récemment étudié (Rabelo et al. 2017). Pour cela, Rabelo et al, se sont intéressés à la prévalence des MHC dans 3 groupes de patients : des patients atteints de TCL amnésique dû à la MA, des patients présentant une démence légère due à la MA et des sujets âgés témoins. Aucune différence quant à la présence des MHC n'a été retrouvée entre ces groupes. Les auteurs ont conclu que les MHC ne constituent pas de bons candidats biomarqueurs pour la MA spécialement dans les phases précoces bien qu'elles soient impliquées dans le processus de la MA. L'incidence des MHC en revanche pourrait être plus informative sur la progression de la MA. Dans une étude prospective, 3 groupes ont été suivis sur 4 ans : sujets contrôles, patients atteints de TCL classés rétrospectivement en TCL stable et TCL en progression, et patients atteints de MA. Les patients atteints de MA et de TCL en progression ont développé significativement plus de nouvelles MHC durant le suivi que les patients TCL stable et contrôles suggérant que l'incidence des MHC pourrait être un biomarqueur utile notamment pour identifier les patients présentant un TCL en progression (Bassellerie et al. 2017).

L'impact cognitif des MHC dans la MA est un sujet très débattu et les résultats assez peu nombreux sont très contradictoires. En 2008, une étude réalisée sur des patients atteints de MA avec ou sans MHC et utilisant une batterie de tests neuropsychologiques en plus du MMSE, n'a pu montrer aucune association entre les MHC et les performances cognitives (Pettersen et al. 2008). Heringa et al., se sont intéressés aux réseaux neuronaux cérébraux chez des patients atteints de TCL amnésique ou de MA précoce. Aucune différence sur le fonctionnement cognitif n'a été retrouvée entre les patients sans MHC et ceux présentant ≥ 1 MHC ou ≥ 3 MHC mais des altérations structurales des réseaux cérébraux ont été démontrées chez les patients Alzheimer présentant ≥ 3 MHC (Heringa et al. 2014). Dans une méta-analyse de 2016, aucun effet significatif des MHC sur les performances neuropsychologiques globales de patients atteints de MA n'a été démontré (Amir et al., 2016). Le faible nombre d'études, la

petite taille des échantillons et le faible nombre de MHC (≥ 1) comme critère d'inclusion associé aux limites des techniques d'imagerie sont des explications possibles. L'auteur de la méta-analyse évoque également l'absence de recherche de pathologies psychiatriques associées dans les différentes études. Des pathologies comme la dépression pourraient masquer ou brouiller un effet subtil des MHC sur les fonctions cognitives évaluées par MMSE. Une étude récente a d'ailleurs montré une association entre les MHC et les symptômes dépressifs dans la MA (Leeuwis et al. 2018). Il est aussi possible que l'effet des MHC soit trop subtil ou minime par rapport au déficit cognitif lié à la MA elle-même. Une étude a cependant montré un impact des MHC multiples (≥ 8) dans la MA avec une atteinte cognitive plus sévère chez ces patients (Goos et al. 2009). Enfin, une étude a montré que les MHC n'ont pas d'influence sur le niveau de déclin cognitif (évalué par plusieurs tests MMSE au cours d'un suivi longitudinal d'environ 3 ans) au cours de la MA (Van Der Vlies et al., 2012).

Les MHC, marqueurs reconnus des pathologies vasculaires cérébrales, présentent de nombreuses associations avec la MA. Leur prévalence, leur topographie, leur association à un niveau plus bas de peptide β amyloïde 1-42 dans le liquide céphalo-rachidien des patients atteints de MA (Goos et al. 2009), la fréquence élevée de pathologie hypertensive et d'AAC associées à la MA (entre 80 et 95% des patients atteints de MA présentent une AAC à l'autopsie) (Cordonnier et al., 2011; Shams & Wahlund, 2016) semblent indiquer une intrication complexe entre les pathologies cérébrovasculaires amyloïdes et hypertensives et les processus neurodégénératifs de la MA. Les MHC pourraient jouer un rôle important dans la physiopathologie de la maladie en créant un lien entre les hypothèses amyloïdes et vasculaires de la MA (Cordonnier & Van Der Flier, 2011). Cependant, les résultats sont discordants sur leur impact cognitif dans la MA et celui-ci reste encore mal déterminé.

II. Modèles précliniques

A. Critères de validité d'un modèle

En neurosciences comportementales, un modèle animal est défini comme étant « un organisme vivant utilisé pour étudier les relations cerveau-comportement dans des conditions contrôlées avec l'objectif final de mieux comprendre et de permettre des prédictions sur ces

relations chez l'homme, chez une autre espèce que celle étudiée ou encore dans la même espèce mais sous des conditions différentes de celles dans laquelle l'étude a été réalisée » (van der Staay 2006). Les modèles animaux visent à étudier des processus physiopathologiques, identifier de nouvelles cibles thérapeutiques ou de nouveaux biomarqueurs ou encore évaluer de nouvelles thérapeutiques. Quelle que soit la pathologie modélisée, il existe 3 principaux critères permettant la validation d'un modèle animal. Le premier est le critère isomorphe (face validity) qui définit la capacité du modèle à reproduire un phénotype (caractéristiques anatomiques, neuropathologiques, cognitives et comportementales) proche de la pathologie humaine. Le deuxième critère représente la validité de construction (construct validity) selon laquelle le mécanisme pathologique à l'origine du trouble induit chez l'animal doit se rapprocher de celui de la maladie modélisée. Ce critère s'intéresse à la solidité de la théorie ou de l'hypothèse qui sous-tendent le modèle et fournit un cadre pour interpréter les données obtenues (van der Staay, Arndt, and Nordquist 2009). Enfin le troisième critère est la validité de prédiction (predictive validity) qui fait référence à la translation, en clinique, des tests réalisés sur le modèle. Il s'agit de la capacité du modèle à prédire l'effet d'un traitement chez l'homme à partir de ce qui a été observé expérimentalement. Des approches différentes mais néanmoins complémentaires permettent de caractériser un modèle. L'approche morphologique, grâce à des techniques d'imagerie morphologique, ou d'immunohistochimie, permet d'évaluer des caractéristiques neuropathologiques comme une atrophie cérébrale, une perte neuronale, la présence de marqueurs spécifiques. Elle peut être associée à une approche fonctionnelle qui vise à évaluer les fonctions cérébrales grâce à de l'imagerie fonctionnelle ou à des tests comportementaux adaptés.

B. Modèles d'hémorragie et de microhémorragie cérébrale

Différentes méthodes expérimentales permettant d'induire une hémorragie intracérébrale ont déjà été décrites (Ma et al., 2011; Manaenko et al., 2011). Trois principaux modèles précliniques ont été développés sur différentes espèces animales (lapins, souris, rats): par injection de sang autologue (Rynkowski et al. 2008), par injection de collagénase bactérienne, enzyme protéolytique, (James et al., 2008; Masuda et al., 2010; McAuley et al., 2012) ou par insertion d'un microballon (Ma et al. 2011). Dans une revue, Manaenko et al., ont comparé ces modèles chez le rongeur en prenant en compte les aspects techniques des différentes méthodes mais aussi leurs caractéristiques physiopathologiques. L'insertion d'un microballon

ne permet de mimer que l'effet de masse du à l'introduction d'un volume mais pas les mécanismes qui accompagnent une hémorragie tels que la libération d'éléments toxiques provenant du sang ou l'altération de la barrière hémato-encéphalique (BHE). L'injection de sang autologue et l'injection de collagénase bactérienne sont techniquement assez proches et permettent de réaliser des hémorragies de manière relativement simple, reproductible avec un bon contrôle de la taille de l'hémorragie. L'HIC induite par la collagénase semble entraîner des modifications histologiques plus proches de ce qui est observé dans le cerveau humain suite à une hémorragie cérébrale spontanée avec l'apparition d'œdème, une perte neuronale et une rupture de la BHE plus importante, une résolution de l'hématome moins rapide et des déficits neurologiques plus marqués et persistants sans récupération spontanée. Ces différents modèles produisent des macrohémorragies souvent situées au niveau du striatum et permettent d'étudier les accidents vasculaires cérébraux hémorragiques. Il n'existe que peu de données comportementales incluant des tests cognitifs sur des modèles d'HIC, pour lesquels les déficits moteurs sont le plus souvent explorés. On relève ainsi pour ces modèles (rats et souris) des déficits moteurs survenant assez rapidement après l'induction de la lésion (1 à 2 jours après) avec une résolution progressive après environ 1 mois (Hua et al., 2002; MacLellan et al., 2009; Nakamura et al., 2004). Aucune modification du niveau d'anxiété n'a été montré en post lésionnel (Hartman et al., 2009; MacLellan et al., 2009). Au plan cognitif, MacLellan et al., n'ont pas démontré, un mois après l'induction de la lésion, d'altération de la cognition. Hartman et al., ont démontré des déficits d'apprentissage 2 semaines après l'induction de la lésion mais pas de déficit de la mémoire spatiale évaluée grâce au test de la piscine de Morris.

Les modèles de microhémorragie sont assez peu nombreux. Il n'existe pas de critère défini concernant la taille de la lésion chez les modèles rongeurs. Une revue récente a cependant relevé des diamètres allant de 25 μm à 300 μm , la majorité des microhémorragies se situant autour de 100 μm (Shih et al., 2018). Le seul modèle de lésion induite présenté dans cette revue est réalisé à l'aide d'un laser biphotonique femtoseconde capable de cibler avec précision des microvaisseaux corticaux comme des artérioles pénétrantes ou des capillaires et d'entraîner leur rupture. Cette technique nécessite de créer une fenêtre d'accès au niveau du crâne de l'animal afin de visualiser, grâce à un équipement d'imagerie microscopique in vivo, les vaisseaux visés (He et al. 2016; Rosidi et al. 2011). La rupture du vaisseau entraîne une extravasation des érythrocytes formant une microhémorragie d'environ 100 μm de diamètre entourée de plasma ayant diffusé un peu plus loin dans le parenchyme (500 μm de diamètre).

Une réaction inflammatoire locale se produit alors avec un afflux de cellules microgliales activées et d'astrocytes (Rosidi et al. 2011). Les multiples microhémorragies induites au niveau cortical chez la souris par une autre équipe (He et al. 2016) ont entraîné une activation microgliale et une altération de la mémoire spatiale. Il existe quelques modèles de microhémorragies spontanées. Un modèle d'injection intra-péritonéale (IP) de lipopolysaccharide (LPS, 1 ou 3 mg/kg) réalisé chez la souris a permis de montrer le développement de MHC au niveau du cervelet et cortico-subcortical dès deux jours après l'injection de la plus forte dose. Une neuroinflammation a également été constatée (Sumbria et al. 2016). Un modèle de démence vasculaire induit par un régime alimentaire spécifique causant une hyperhomocystéinémie a également présenté de nombreuses microhémorragies localisées au niveau du cortex entorhinal et pariétal en majorité, du cortex frontal et de l'hippocampe. Après 11 semaines de ce régime, une neuroinflammation, une augmentation de l'expression et de l'activité des MMP 2 et 9, ainsi qu'une altération de la mémoire spatiale ont été retrouvées (Sudduth et al. 2013). Des modèles d'hypertension peuvent aussi entraîner le développement de MHC. Des souris transgéniques exprimant les gènes humains de la rénine et de l'angiotensinogène développent une hypertension chronique. Après un traitement de 10 semaines avec un régime riche en sel et un inhibiteur des NO synthases neuronales et endothéliales, le L-NAME (N-nitro-L-arginine méthyle ester), des microhémorragies se sont développées au niveau du cervelet, des ganglions de la base, et du tronc cérébral (Iida et al. 2005). Enfin, certains modèles murins d'AAC (PDAPP, TgSwDI, APP23, APPDutch), présentés plus en détail dans la section suivante, présentent des microhémorragies multiples et spontanées ainsi qu'une neuroinflammation (Shih et al. 2018).

Le modèle lésionnel de microhémorragie induite par laser femtoseconde permet de cibler un ou plusieurs microvaisseaux de façon précise et limitée à la zone corticale. Il offre la possibilité d'étudier la MHC et ses conséquences dans un environnement sans pathologie sous-jacente. Les modèles de microhémorragies spontanées, eux, produisent des MHC multiples et localisés de façon aléatoire. Ces modèles permettent de s'intéresser aux mécanismes physiopathologiques impliqués dans la formation de ces MHC. Ces différents modèles apportent chacun une contribution pour avancer dans la compréhension des causes, des facteurs de risques et des conséquences fonctionnelles des MHC (Shih et al. 2018).

C. Les modèles rongeurs de la maladie d'Alzheimer

1. Rappels sur la maladie d'Alzheimer

La MA est la première cause de démence. C'est une maladie complexe, et multifactorielle impliquant de nombreux facteurs génétiques et environnementaux. On distingue les formes familiales qui affectent un peu moins de 5% des personnes atteintes de MA et les formes sporadiques qui représentent donc plus de 95% des cas. Les formes familiales sont caractérisées par un début précoce (avant 65 ans) une présentation clinique différente des formes sporadiques (Tellechea et al. 2017). Elles sont dues à des mutations génétiques qui sont, dans 5 à 10% des cas, des mutations autosomiques dominantes touchant les gènes des présénilines 1 ou 2 (PSEN1 et PSEN2) ou du précurseur de la protéine amyloïde (APP) ce qui peut entraîner des phénotypes variés en fonction de la mutation impliquée (Cacace et al., 2016). Les formes sporadiques débutent plus tardivement (après 65 ans) et sont liées à des facteurs de risque génétiques, dont le plus important est l'allèle $\epsilon 4$ du gène de l'apolipoprotéine E qui intervient dans la clairance de la protéine amyloïde β ($A\beta$), et environnementaux (Drummond et al., 2017).

Plusieurs signes caractéristiques sont représentatifs de la MA. D'un point de vue microscopique, on retrouve dans le parenchyme cérébral une accumulation de protéine $A\beta$ extracellulaire formant des plaques séniles. Des dépôts amyloïdes peuvent également être observés au niveau des parois vasculaires en cas d'AAC associée. Des protéines Tau anormalement phosphorylées s'accumulent, elles, dans les neurones et forment des dégénérescences neurofibrillaires (DNF) (Ballard et al. 2011). Le peptide $A\beta$ est produit par clivages successifs du précurseur de la protéine amyloïde (APP) pouvant donner lieu à différentes formes de fragments $A\beta$. Le gène humain de l'APP se situe sur le chromosome 21 et des épissages alternatifs produisent différentes isoformes dont les plus fréquentes sont les formes APP_{695} , APP_{751} et APP_{770} (Esquerda-Canals et al., 2017). La voie non amyloïdogénique fait intervenir l' α sécrétase dont le site de coupure de l'APP se situe dans le domaine $A\beta$ empêchant ainsi sa formation. Dans la voie amyloïdogénique, l'APP est initialement clivé par la β sécrétase (BACE1), puis par la γ sécrétase, complexe dont le cœur catalytique contient les présénilines 1 ou 2 associées à d'autres protéines. Ces deux clivages aboutissent à la libération de peptides $A\beta$ de différentes tailles avec majoritairement du peptide $A\beta_{1-40}$ et du peptide $A\beta_{1-42}$ plus amyloïdogénique avec un ratio de 10:1 (Figure 2)

(LaFerla et al., 2007). Ce sont principalement ces deux formes qui sont retrouvées au sein des plaques. La forme A β 1-42 est plus hydrophobe et plus susceptible de s'agréger (Esquerda-Canals et al. 2017).

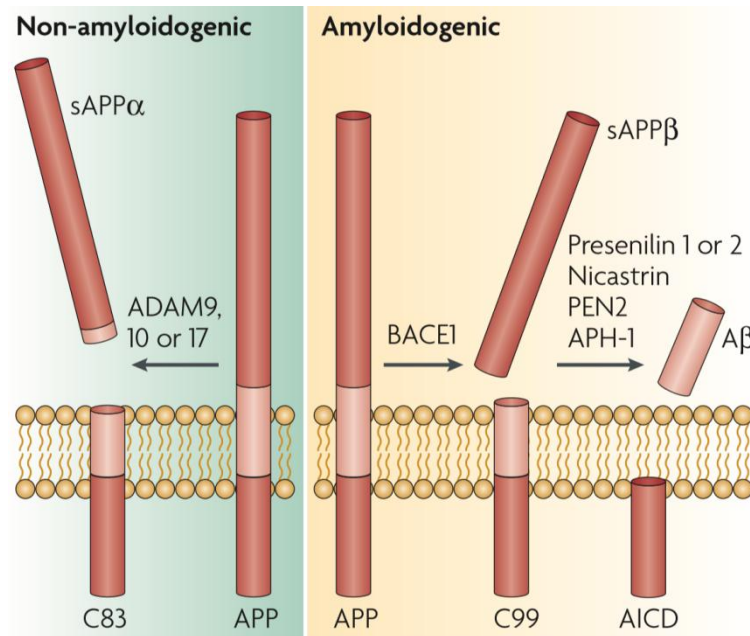


Figure 2: Clivage enzymatique de l'APP, voies amyloïdogénique et non amyloïdogénique (LaFerma et al., 2007)

Dans la MA, qu'il s'agisse des formes familiales ou sporadiques, il semble qu'un déséquilibre entre production du peptide A β (ou production de formes A β plus susceptible de s'agréger) et clairance de ce peptide soit à l'origine de son accumulation (Selkoe et al., 2016). Il en résulte une agrégation d'abord sous forme d'oligomères A β , considérés comme la forme la plus neurotoxique, puis sous forme de fibrilles dans le parenchyme cérébral et les parois des vaisseaux (Viola et al., 2015). Dans l'hypothèse de la cascade amyloïde qui donne un rôle central au peptide A β dans le processus de neurodégénération et de déclin cognitif, les oligomères A β solubles seraient à l'origine d'une altération du fonctionnement synaptique et pourraient entraîner une inflammation, un stress oxydant ainsi que l'hyperphosphorylation des protéines Tau (Selkoe, 2006).

En plus des dépôts amyloïdes et des DNF, la MA se caractérise par une perte de neurones, avec une atrophie cérébrale qui touche en priorité l'hippocampe (M. Dhenain 2013). On observe également une neuroinflammation, un hypométabolisme cérébral (Jack et al. 2013), une altération des neurones du système cholinergique touchant particulièrement les neurones corticaux provenant des projections du noyau basal de Meynert et de la bande diagonale de Broca (Coyle, Price, and DeLong 1983; P. M. Dhenain 2013). Des manifestations cliniques

sont associées et comportent des troubles cognitifs importants : perte de mémoire (altération des capacités à acquérir et à rappeler des informations nouvelles), difficultés à exécuter des tâches familières, dysfonctions exécutives (troubles du raisonnement ou de la capacité à mener une tâche complexe, altération du jugement, difficultés de planification), perte d'orientation spatio-temporelle, troubles du langage (parlé ou écrit), altération des capacités visuo-spatiales (difficultés de reconnaissance des objets ou des visages, difficultés pour orienter correctement un objet), du mouvement, changement d'humeur et de comportement (anxiété, dépression, apathie, repli social...) (Croisile et al., 2012). Ces différents marqueurs de la maladie apparaissent selon une dynamique qui leur est propre et un modèle d'évolution au cours du temps a été proposé (Figure 3) (Jack et al. 2013). Les modifications morphologiques microscopiques et macroscopiques précèdent l'apparition des signes cliniques de plusieurs années.

C'est sur la base de ces connaissances que les modèles rongeurs ont été développés en essayant de reproduire, autant que possible, les caractéristiques de la maladie observées chez l'homme (dépôts amyloïdes, DNF, perte neuronale, troubles cognitifs). Les modèles expérimentaux sont essentiels dans le but d'améliorer la compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués, la progression de la maladie et réaliser des études précliniques pour tester de nouvelles thérapeutiques (Esquerda-Canals et al., 2017; Puzzo et al., 2015).

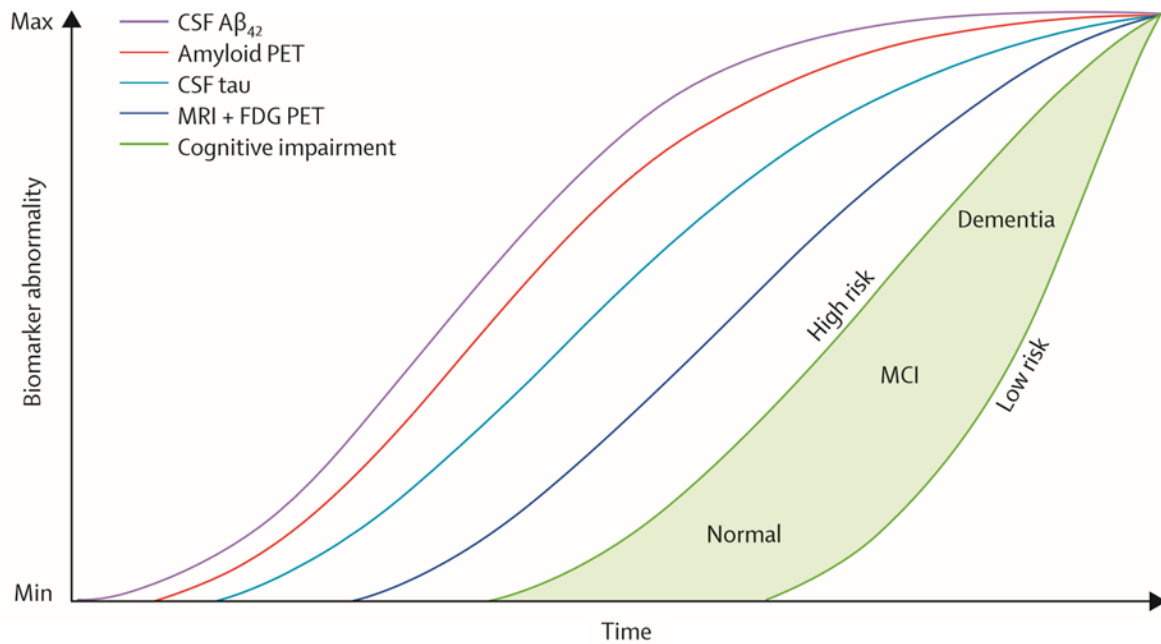


Figure 3: Modèle d'évolution des biomarqueurs et des signes cliniques de la MA au cours du temps.

L'axe des ordonnées représente une échelle allant des valeurs retrouvées chez des personnes non atteintes (Min) aux valeurs retrouvées chez les personnes au stade final de démence (Max), c'est-à-dire les valeurs les plus "anormales". L'Aβ42 présent dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) et la TEP (tomographie par émission de positons) amyloïde sont associés aux dépôts Aβ fibrillaires. La protéine Tau dans le LCR est liée aux DNF. L'IRM permet de mettre en évidence une atrophie cérébrale et la TEP FDG un hypométabolisme, ces deux marqueurs sont associés aux DNF et reflètent la neurodégénérescence. Enfin, les troubles cognitifs sont représentés par une zone (en vert). Les personnes les plus à risque se situent sur la gauche de cette zone et les moins à risque (profil génétique, absence de comorbidités, réserve cognitive importante) à droite. Issue de Jack et al., 2013.

2. Les modèles lésionnels

La conception de certains de ces modèles repose sur l'hypothèse cholinergique de la MA. En effet, la dégénérescence des neurones cholinergiques du noyau basal de Meynert projetant dans le néocortex se produit assez précocement au cours de la MA (Coyle et al., 1983; Van Dam et al., 2011). La méthode la plus utilisée pour modéliser cette atteinte consiste à induire chez les rongeurs une lésion au niveau des neurones cholinergiques du noyau basal magnocellulaire (analogue du noyau basal de Meynert) principalement. Pour cela, différentes techniques ont été utilisées, par exemple, des techniques électrolytiques ou des injections intraparenchymateuses ou intracérébroventriculaires de substances neurotoxiques. Selon la substance utilisée, il est possible de réaliser des lésions excitotoxiques non sélectives endommageant toute la zone comprenant les neurones cholinergiques et d'autres neurones ou des lésions sélectives grâce à des toxines ciblant spécifiquement les neurones cholinergiques. Les modèles peuvent varier considérablement en fonction de la technique utilisée pour induire la lésion (Toledano et al., 2004). D'autres lésions visent à altérer les structures ou les voies

neuronales impliquées dans divers aspects de l'apprentissage et de la mémoire. Les modèles lésionnels permettent ainsi de reproduire partiellement les troubles de la mémoire observés dans la MA et d'avancer dans la compréhension des mécanismes neuronaux qui les soutiennent (Van Dam et al., 2011). Leur étude a d'ailleurs participé au développement des traitements cholinergiques symptomatiques utilisés aujourd'hui. Il s'agit des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (AChE) (donépézil, rivastigmine, galantamine), enzyme de dégradation de l'acétylcholine (P. M. Dhenain 2013). Cependant, ces modèles ne reproduisent qu'un aspect spécifique et non pas un processus plus global de la MA.

3. Les modèles pharmacologiques

Le modèle pharmacologique le plus utilisé est l'injection (IP) de scopolamine (Ebert and Kirch 1998). La scopolamine est une drogue anticholinergique permettant d'induire des troubles cognitifs à des fins expérimentales. Elle agit comme un antagoniste compétitif de l'acétylcholine au niveau des récepteurs muscariniques centraux et entraîne des troubles de l'apprentissage et de la mémoire (Lee et al. 2014). Ce modèle a également participé au développement des inhibiteurs de l'Acétylcholine estérase mais il ne représente aucun marqueur caractéristique de la MA ni la progression de la pathologie concernant le déficit cognitif lié aux altérations des neurones cholinergiques (Van Dam et al., 2011).

4. Les modèles de souris âgées

Les rongeurs ne développent pas spontanément de pathologie de type Alzheimer. En revanche, les rongeurs âgés présentent des altérations cognitives, comportementales, et une fonction cholinergique diminuée (Puzzo et al., 2015; Sherman et al., 1990; Van Dam et al., 2011). Les altérations liées à l'âge ont été accélérées grâce à des modèles de souris transgéniques, les SAM (senescence-accelerated mouse). Les souches SAMP (SAM-prone) favorisent un vieillissement accéléré. Les souris SAMP8, notamment, sont atteintes de déficits de l'apprentissage et de la mémoire (Neha et al., 2014; Takeda, 1999; Van Dam et al., 2011).

Tout comme les modèles lésionnels et pharmacologiques, les modèles âgés ont participé au développement des traitements cholinergiques utilisés dans la MA mais ils ne peuvent pas être considérés comme de véritables modèles de MA.

5. Les modèles transgéniques

A partir de l'identification des formes familiales de la MA et de la description des principales mutations impliquées, de nombreux modèles transgéniques ont été développés et représentent la grande majorité des modèles animaux utilisés en recherche préclinique sur la MA. Les rongeurs ne développent pas spontanément de pathologie de type Alzheimer. La séquence de l'APP de souris a une homologie de 97% avec celle de l'APP humain et la différence entre les peptides A β ne porte que sur 3 acides aminés ce qui empêche l'agrégation et la formation de plaques amyloïdes chez la souris (Drummond et al., 2017; Esquerda-Canals et al., 2017). C'est pourquoi le recours à la transgénèse, permettant l'expression de gènes APP humains mutés, est nécessaire à la formation de plaques amyloïdes chez la souris. Le phénotype d'une lignée transgénique ne dépend pas uniquement du gène muté introduit mais également du promoteur, contrôlant son niveau d'expression et sa distribution, et du fond génétique de la lignée. Les principaux promoteurs utilisés sont présentés dans le tableau 1, adapté d'Esquerda-Canals et al., 2017. Le fond génétique le plus courant dans les modèles transgéniques est le fond C57Bl/6 (Puzzo et al. 2015).

Promoteur	Distribution spatiale	Niveau d'expression
PDGF-β	Spécifique des neurones (cerveau, corne dorsale, moelle épinière)	+
Thy-1	Spécifique des neurones (systèmes nerveux central et périphérique) Thy-1 humain est aussi exprimé dans les cellules neurogliales	++
PrP	Neurones, astrocytes, oligodendrocytes, microglie	+++

Tableau 1: Principaux promoteurs utilisés dans les modèles transgéniques de MA.

La distribution spatiale et le niveau d'expression sont indiqués pour les principaux promoteurs utilisés dans les modèles transgéniques de MA basés sur les mutations observées dans les formes familiales. PDGF- β : platelet-derived growth factor β -chain, Thy-1 : thymocyte differentiation antigen-1, PrP : prion protein. Adapté d'Esquerda-Canals et al., 2017.

5.1. Les souris transgéniques porteuses d'un gène APP muté

Les premiers modèles transgéniques de la MA ont été conçus à partir de l'hypothèse amyloïde avec l'objectif de reproduire la présence de dépôts amyloïdes dans le parenchyme cérébral (Puzzo et al. 2015). Il existe de nombreuses mutations du gène APP. En fonction de

leur localisation par rapport aux sites de clivage des différentes sécrétases, elles peuvent influencer l'activité des sécrétases concernées et la formation des peptides qui en découlent (Karran et al., 2011). Par exemple, la double mutation Swedish, localisée à proximité du site de clivage de la β sécrétase, favorise l'activité de celle-ci entraînant une augmentation de la production de peptide A β . D'autres mutations, London et Indiana notamment, situées à proximité du site de clivage de la γ sécrétase, n'augmentent pas le niveau total de peptide A β mais favorisent la production de la forme A β 1-42 (Esquerda-Canals et al. 2017).

Le premier modèle transgénique a été créé en 1995. Les souris PDAPP surexpriment le gène APP humain portant la mutation Indiana sous le contrôle du promoteur du PDGF (platelet derived growth factor). Ceci permet le développement de plusieurs signes caractéristiques associés à la MA tels que les plaques amyloïdes dès 6 à 9 mois de vie, une perte synaptique, une gliose au niveau de l'hippocampe et du cortex, et une altération de la mémoire âge-dépendante (Games et al. 1995). Les lignées Tg2576 et APP23 portent toutes les deux un gène APP portant la double mutation Swedish mais sous le contrôle de promoteurs différents. Les souris APP23 présentent une apparition plus précoce des différents marqueurs avec des dépôts amyloïdes dès 6 mois, des troubles de la mémoire dès 3 mois et une perte neuronale au niveau de l'hippocampe. Pour les souris Tg2576, les dépôts amyloïdes n'apparaissent qu'à 11 mois, les troubles de la mémoire autour de 10 mois et aucune perte neuronale n'est observée. Ces deux lignées présentent également une AAC (Esquerda-Canals et al. 2017). Les souris APP E693 Δ expriment la mutation Osaka qui produit un phénotype particulier comprenant une augmentation des oligomères A β intraneuronaux, des altérations synaptiques et des troubles cognitifs dès 8 mois mais pas de formation de plaque amyloïde avant 24 mois. L'activation microgliale et astrocytaire apparaît entre 12 et 18 mois (Tomiya et al. 2010). Ce dernier modèle fournit la possibilité d'étudier plus spécifiquement le rôle des oligomères A β considérés comme étant les plus neurotoxiques.

5.2. Les souris transgéniques porteuses de mutations multiples

En fonction du type et du nombre de mutations associées, les phénotypes peuvent varier mais présentent dans l'ensemble une atteinte plus précoce et plus sévère (Drummond et al., 2017). La lignée J20, par exemple, porteuse de la double mutation Swedish associée à la mutation Indiana, présente des signes pathologiques plus précoces que les lignées porteuses d'une seule mutation (Esquerda-Canals et al. 2017; Mucke et al. 2000).

D'autres lignées associent une ou des mutations du gène APP avec d'autres mutations connues des formes familiales de la MA. Chez la souris, les gènes mutés des présénilines permettent d'augmenter le niveau de peptide A β 1-42 mais ne suffisent pas pour entraîner la formation de plaques amyloïdes. L'association d'un gène muté PSEN1 à un gène APP muté a un effet synergique. C'est le cas notamment de la lignée APP/PS1 dans laquelle les dépôts amyloïdes et les troubles cognitifs apparaissent de façon plus précoce et évoluent plus rapidement que dans une lignée monogénique (Esquerda-Canals et al. 2017). La lignée 5xFAD associe 5 mutations différentes et présente une forme sévère et précoce avec une accumulation massive de peptide A β 1-42, l'apparition de plaques amyloïdes et d'une gliose dès 2 mois et des altérations cognitives se manifestant entre 4 et 6 mois (Oakley et al. 2006).

Globalement, on retrouve dans les lignées transgéniques exprimant un gène APP humain muté associé ou non à d'autres mutations connues impliquées dans les formes familiales de la MA, plusieurs signes pathologiques caractéristiques : la formation de plaques amyloïdes particulièrement au niveau de l'hippocampe et du cortex, une neuroinflammation avec des cellules microgliales et astrocytaires activées, des altérations synaptiques et des déficits cognitifs notamment dans les tâches spatiales (Drummond et al., 2017). Cependant, ces lignées ne parviennent pas à reproduire toute l'étendue de la neurodégénérescence avec l'atrophie de certaines régions cérébrales et elles ne développent pas de DNF.

Parmi ces lignées transgéniques, porteuses de simple mutation ou de mutations multiples, certaines constituent également des modèles d'AAC. La lignée APPDutch porteuse de la mutation E693Q du gène APP, développe des dépôts amyloïdes vasculaires entre 22 et 25 mois de vie, principalement au niveau des vaisseaux leptoméningés et corticaux et en absence de plaques amyloïdes parenchymateuses. Une activation microgliale et astrocytaire apparaît au niveau périvasculaire. Des microhémorragies se forment chez la souris âgée (29 mois). Il s'agit d'un modèle intéressant d'AAC dans la mesure où la pathologie amyloïde vasculaire se développe indépendamment de la formation de plaques amyloïdes mais la limite principale est l'âge tardif d'apparition de la pathologie (Jäkel et al., 2017). Une autre lignée conçue pour étudier l'AAC est la Tg-SwDI comportant trois mutations différentes du gène APP (Swedish, Dutch et Iowa). L'atteinte des microvaisseaux par l'accumulation de peptide A β est importante, touchant 50% des vaisseaux à 12 mois et augmentant jusqu'à 90% vers 24 mois. Les plaques amyloïdes parenchymateuses apparaissent dès 3 mois ainsi que l'augmentation des astrocytes et de la microglie activés et des altérations de l'apprentissage et de la mémoire. Des microhémorragies sont aussi retrouvées dans ce modèle (Davis et al., 2004; Drummond et

al., 2017; Jäkel et al., 2017). Les lignées APP23, Tg2576, et ArcA β sont aussi des modèles d'AAC présentant une prédominance de peptide A β 1-40, des dépôts amyloïdes vasculaires apparaissant entre 7 et 12 mois, une neuroinflammation et des microhémorragies (Jäkel et al., 2017).

5.3. Les souris transgéniques porteuses du gène Tau humain muté

Le gène Tau sauvage retrouvé chez la souris n'entraîne pas spontanément la formation de DNF. Il a été montré que l'expression du gène Tau humain non muté chez la souris KO pour son propre gène Tau cause la formation de DNF et suggère que la protéine Tau endogène de souris pourrait inhiber l'agrégation des protéines Tau humaines (Andorfer et al. 2003).

Il existe des mutations du gène Tau humain associées aux démences fronto-temporales lobaires. Les plus fréquentes ont été utilisées pour créer des lignées transgéniques de souris. Ces lignées développent des DNF, une atrophie cérébrale, une activation microgliale mais également des troubles moteurs (Lewis et al. 2000; Yoshiyama et al. 2007). Ces mutations humaines ne sont cependant pas associées à la MA et sont à l'origine de déficits moteurs qui peuvent interférer lors de tests cognitifs (Drummond et al., 2017).

5.4. Les modèles transgéniques mixtes

Des lignées transgéniques dans lesquelles apparaissent à la fois des plaques amyloïdes et des DNF, toutes deux caractéristiques de la MA, ont été créés. La lignée 3xTg est la plus utilisée et est considérée comme le modèle de pathologie Alzheimer le plus complet. Elle associe un gène APP portant la mutation Swedish, un gène PSEN1 muté (PS1 M146V) et un gène Tau muté (P301L). Une dysfonction synaptique incluant un déficit de potentialisation à long terme apparaît avant la formation des plaques amyloïdes et des DNF et de manière âge-dépendante. L'augmentation des niveaux de peptides A β 1-40 et 1-42, leur accumulation intracellulaire et la formation de plaques amyloïdes extracellulaires se produisent dès 6 mois de vie. La pathologie Tau associée à la formation de DNF apparaît plus tardivement, vers 12 mois (Oddo et al. 2003). Bien que présentant différents marqueurs de la MA, ce modèle reste malgré tout limité, d'abord par une surexpression des transgènes qui ne reproduit pas une expression physiologique et ensuite par l'expression de peptides A β et Tau mutés qui ne sont pas représentatifs de la forme la plus fréquente de la MA, la forme sporadique (Drummond et al., 2017).

5.5. Les modèles transgéniques rats

Peu de modèles de rats transgéniques ont été développés pour étudier la MA. Ils présentent pourtant certains avantages par rapport à la souris. En effet, ils sont plus proches de l'homme d'un point de vue physiologique, morphologique et génétique. Une étude comportementale et cognitive plus poussée peut être réalisée grâce à des tests plus complexes. Enfin il est plus aisé de réaliser des prélèvements de liquide céphalo-rachidien (Carmo et al., 2013). Les modèles transgéniques réalisés chez le rat montrent, comme chez la souris, des plaques amyloïdes et des altérations cognitives (Drummond et al., 2017).

5.6. Limites des modèles transgéniques

La plupart des modèles présentés ici répondent au critère isomorphique et en partie à la validité de construction. La validité de prédiction reste encore incertaine (Esquerda-Canals et al. 2017). L'ensemble des modèles transgéniques de la MA parvient, en fonction de la ou des mutations, du promoteur et du fond génétique utilisé, à reproduire diverses caractéristiques physiopathologiques de la MA (plaques amyloïdes, DNF, neuroinflammation, troubles cognitifs, altérations synaptiques et pertes neuronales) avec une temporalité variable. Néanmoins, le taux d'échec très important lors d'essais cliniques thérapeutiques dans la MA (plus de 99% d'échec), a suscité de nombreuses interrogations quant à la fiabilité de ces modèles dont la plupart avaient démontré des résultats encourageants lors d'essais précliniques (Cummings et al., 2014). Plusieurs éléments à prendre en compte peuvent en partie expliquer cette différence. Il faut tout d'abord rappeler que les modèles transgéniques reposent sur l'expression de mutations rencontrées dans les formes familiales de la MA. Ces formes ne représentent qu'environ 5% des cas de MA. Or, la grande majorité des essais cliniques sont conduits sur des sujets atteints de la forme sporadique de la MA dont les facteurs de risque à la fois génétiques et environnementaux et les manifestations cliniques diffèrent des formes familiales et peuvent constituer un premier obstacle à la translation de la préclinique à la clinique. Par ailleurs, les modèles transgéniques sont le plus souvent incomplets et ne reproduisent que partiellement les caractéristiques spécifiques de la pathologie et de manière non physiologique, les transgènes étant surexprimés. Ceci rend possible l'étude d'un aspect particulier de la maladie mais lors du passage en clinique, la maladie est présente dans toute la globalité de son processus. Il est donc important de connaître les spécificités neuropathologiques du modèle étudié de façon à avoir une interprétation plus pertinente des résultats. De plus, en réponse à l'expression non

physiologique de protéines humaines, les protéines endogènes du modèle peuvent réagir et entraîner des effets qui ne sont pas connus chez l'humain (Drummond et al., 2017). La dynamique d'apparition des marqueurs est différente entre les modèles rongeurs et l'homme. Cela constitue une difficulté translationnelle supplémentaire. Par exemple, les troubles cognitifs observés chez les rongeurs apparaissent généralement soit avant soit au moment où les plaques amyloïdes commencent à se former alors qu'ils n'apparaissent que plusieurs années après le développement des plaques chez l'homme (Drummond et al., 2017). Il est alors légitime de se demander si les mécanismes à l'origine de ces troubles cognitifs sont les mêmes chez le modèle rongeur et chez l'homme. Des modèles récents ont été conçus de façon à reproduire plus physiologiquement l'apparition des manifestations pathologiques. Dans ces modèles, le transgène est introduit par une recombinaison homologe qui invalide le gène sauvage et place le transgène sous le contrôle du promoteur naturel évitant ainsi l'influence de la surexpression (Drummond et al., 2017; Esquerda-Canals et al., 2017). Enfin, les différences d'apparition et d'évolution de la pathologie dues au genre sont aussi à considérer. Elles existent chez les patients atteints de MA mais également dans les modèles rongeurs (Esquerda-Canals et al., 2017; Finch et al., 2016).

III. Evaluation cognitive chez le rongeur

A. Rappels généraux sur les systèmes de mémoires

Depuis les années 60, de nombreux travaux ont participé au développement des connaissances sur la mémoire. Elles sont issues de données cliniques, notamment avec l'étude des syndromes amnésiques, de recherches expérimentales chez l'animal et ont été enrichies par le développement des techniques d'imagerie cérébrale. L'ensemble de ces travaux a abouti à une classification dichotomique des mémoires chez l'homme proposée par Squire en 1992 et améliorée en 2004 (Figure 4) (Squire 2004). Ce modèle reste le plus communément utilisé de nos jours.

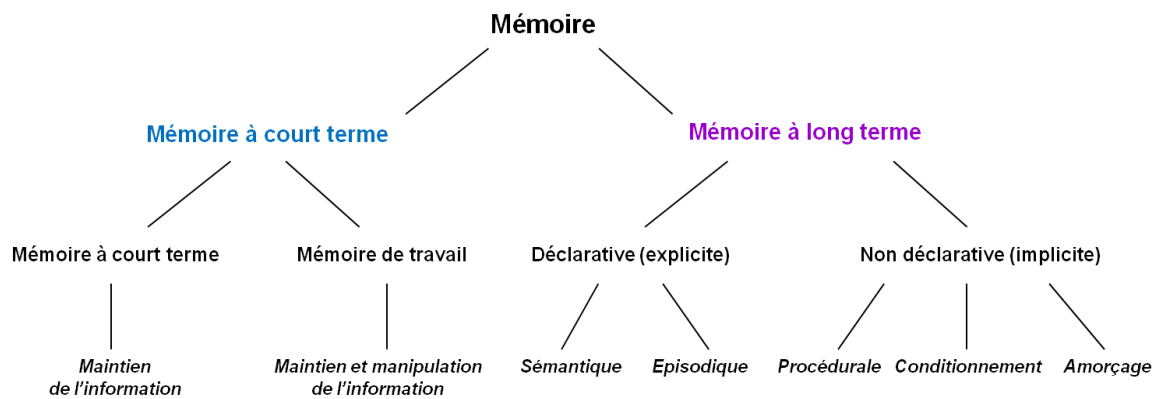


Figure 4: Taxonomie de la mémoire inspirée de Squire (2004)

La mémoire à court terme correspond à la capacité de saisir et de retenir une information de façon temporaire. L'information, pouvant aller de 6 à 9 items, peut être retenue et restituée sur une durée de quelques secondes, voire quelques dizaines de secondes. Le concept de mémoire de travail, défini par Baddeley et Hitch en 1974 puis amélioré en 2010, décrit la mémoire de travail comme le ou les systèmes permettant de retenir temporairement et de manipuler des informations nécessaires à la réalisation d'activités comme la compréhension, l'apprentissage ou le raisonnement (Baddeley 2010). On considère qu'elle est composée de deux systèmes satellites de stockage, la boucle phonologique responsable du stockage d'informations verbales et le calepin visuospatial impliqué dans le stockage d'informations spatiales et visuelles. Les informations provenant de ces deux systèmes sont contrôlées et coordonnées par un administrateur central. Ces informations peuvent être par la suite soit oubliées soit mémorisées grâce à des interactions entre le système de mémoire de travail et les systèmes de mémoire à long terme (Eustache et al., 2017). Les structures anatomiques qui sous-tendent la mémoire de travail sont principalement le cortex préfrontal, les aires visuelles associatives et l'aire de Broca (Budson et al., 2005).

La mémoire à long terme permet le stockage d'informations sur une période de temps indéterminée et avec une capacité de stockage illimitée. Le processus de mémorisation comprend 3 étapes : l'encodage qui est la phase d'acquisition de l'information, le stockage qui correspond à la mise en réserve de l'information et la restitution qui permet de rechercher et rappeler l'information. La mémoire à long terme est subdivisée en deux grands systèmes :

La mémoire déclarative ou explicite est accessible à la conscience et permet le stockage et la récupération intentionnelle des faits. Elle comprend, d'une part, la mémoire épisodique qui est définie comme la mémoire des événements vécus (mémoire autobiographique) situés dans

leur contexte spatio-temporel d'acquisition c'est-à-dire l'évènement (quoi), le lieu (où) et le moment (quand) où il s'est produit et d'autre part, la mémoire sémantique, mémoire du savoir et de la connaissance qui permet l'acquisition de connaissances générales sur soi (sémantique personnelle) ou sur le monde (faits publics) (Eustache et al., 2017; Tulving, 1972). Les principales structures anatomiques impliquées dans la mémoire épisodique sont le lobe temporal médian incluant l'hippocampe et le parahippocampe, les noyaux thalamiques, les corps mamillaires, le fornix et le cortex préfrontal. La mémoire sémantique quant à elle, repose majoritairement sur le lobe temporal inférieur (Budson et al., 2005).

La mémoire non déclarative ou implicite comprend un ensemble hétérogène de capacités telles que l'habileté, le conditionnement, l'amorçage. Ce sont des apprentissages inconscients. Parmi les mémoires implicites se trouve notamment la mémoire procédurale. Il s'agit d'une mémoire automatique qui permet d'acquérir progressivement des habiletés sensori-motrices ou un savoir-faire intellectuel (Eustache et al., 2017). Le cervelet, les ganglions de la base et les aires motrices supplémentaires sont les structures majoritairement impliquées dans la mémoire procédurale (Budson et al., 2005).

Il existe de nombreux tests neuropsychologiques utilisés en pratique clinique pour évaluer les fonctions cognitives et dépister d'éventuels déficits notamment dans le cas de maladies neurodégénératives comme la MA. Ils permettent de détecter des altérations cognitives globales et également des domaines plus spécifiques comme la mémoire de travail, la mémoire épisodique, la mémoire sémantique, les dysfonctions du langage ou encore exécutives (Kaufer 2015).

B. Evaluation cognitive chez le rongeur

Les modèles animaux utilisés en recherche préclinique tentent de reproduire les symptômes observés dans les pathologies humaines. Parmi ces symptômes, les altérations cognitives qui caractérisent différentes pathologies comme les maladies neurodégénératives ou psychiatriques constituent un domaine d'investigation important. Malgré les limites inhérentes à l'utilisation d'un modèle animal, l'étude des fonctions cognitives chez le rongeur permet par exemple de recueillir de nouvelles informations sur les structures anatomiques et les substrats neurobiologiques impliqués dans les différents types de mémoires ou de tester l'effet pharmacologique de molécules d'intérêt sur un plan fonctionnel. Il existe cependant

quelques nuances lorsqu'on évoque les types de mémoires chez le rongeur. Sur le même schéma que la classification de Squire, on peut distinguer une mémoire à court terme apparentée à la mémoire de travail et une mémoire à long terme. La mémoire à long terme est divisée en mémoire explicite et implicite, les termes déclarative et non déclarative ne convenant pas chez l'animal. La mémoire explicite comprend une mémoire de type épisodique et une mémoire dite de référence qui est plutôt associée à la mémoire sémantique humaine (Webster et al., 2014). La mémoire implicite comprend notamment la mémoire procédurale et le conditionnement. Les différents paradigmes mis en œuvre pour tester les fonctions cognitives chez le rongeur visent, autant que possible, à évaluer les mêmes domaines que ceux explorés chez l'homme. En clinique, l'évaluation des fonctions cognitives, réalisée grâce à des tests neuropsychologiques, fait souvent appel au langage parlé ou écrit ce qui est impossible chez l'animal et rend la tâche complexe, nécessitant l'élaboration de tests comportementaux adaptés.

1. Mémoire de type épisodique

Dans les années 70, Tulving a défini la mémoire épisodique comme un système de mémoire capable d'encoder, de stocker et de rappeler une expérience personnelle passée unique contenant l'évènement lui-même (quoi, what), le lieu (où, where) et le moment (quand, when) où il s'est produit (Tulving, 1972). Dans ses travaux ultérieurs, le concept de mémoire épisodique a été complété par une notion supplémentaire, la nécessité d'une conscience auto-néotique qui se caractérise par la capacité à revivre l'évènement remémoré et effectuer un voyage mental dans le temps (Tulving et al., 1998). Démontrer chez l'animal une telle capacité, sans l'intermédiaire du langage, n'est pas possible. Le terme de mémoire de type épisodique (episodic-like) est donc préférentiellement utilisé chez l'animal et les paradigmes conçus pour l'évaluer se sont basés sur la définition initiale fournissant des critères opérationnels utilisables en recherche neurocomportementale : ce sont les paradigmes « what-where-when ». De façon à se rapprocher le plus possible de la mémoire épisodique humaine, il semble important que ces paradigmes ne comportent qu'un seul essai afin de conserver le caractère unique de l'expérience (Pause et al. 2013).

De nombreux tests ont été développés en se basant sur les paradigmes de préférence pour la nouveauté illustrés dans la figure 5 (Dere et al., 2005). Un rongeur démontre une préférence pour un objet nouveau par rapport à un objet familier ce qui implique une mémoire de l'objet

familier; pour un objet déplacé par rapport à un objet resté à un emplacement familier ce qui implique une mémoire spatiale et pour un objet familier « ancien » par rapport à un objet familier rencontré récemment ce qui met en évidence une mémoire de l'ordre d'apparition des objets (Dere et al., 2005; Ennaceur, 2010; Ennaceur et al., 2005; Hannesson, 2004).

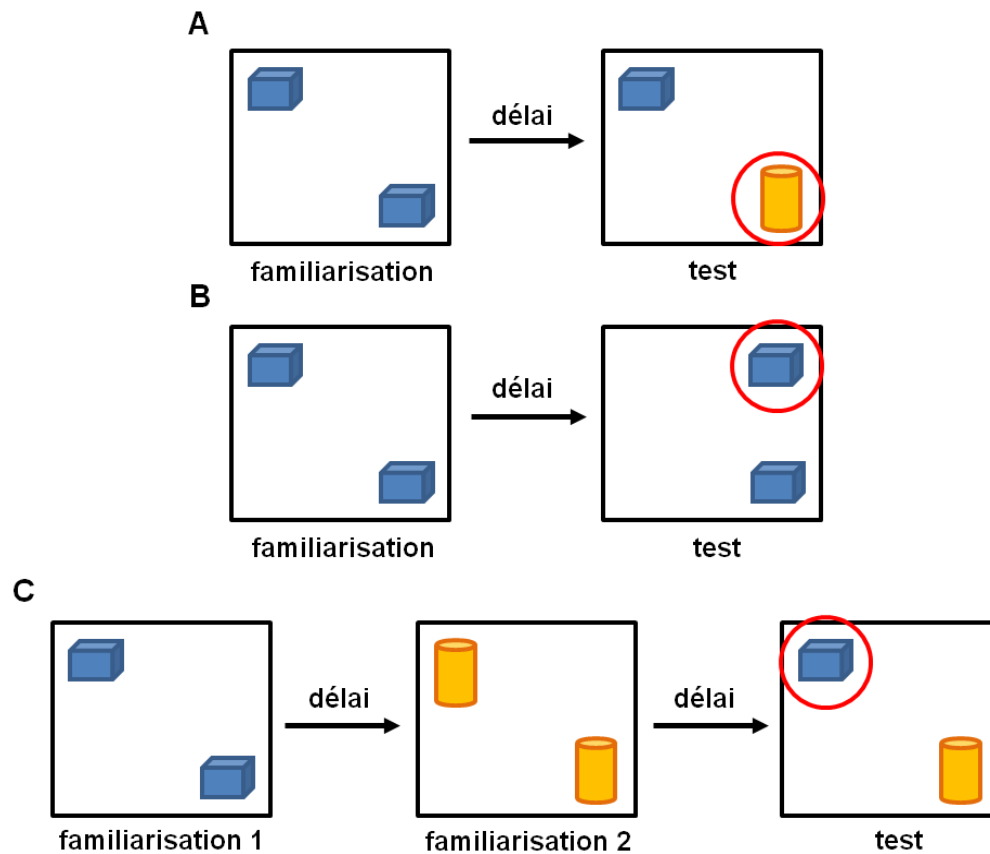


Figure 5: Représentation schématique des différentes versions du paradigme de préférence pour la nouveauté. (A) Reconnaissance d'objet : discrimination entre un objet familier et un objet nouveau. L'objet entouré indique une exploration plus importante du nouvel objet. (B) Reconnaissance spatiale : discrimination entre un objet placé de façon familière et le même objet placé à une nouvelle position. Le cercle indique une exploration plus importante de l'objet déplacé. (C) mémoire de l'ordre d'apparition des objets : discrimination de l'objet rencontré le moins récemment. Le cercle indique l'exploration préférentielle de l'objet présenté au cours de la première phase. Adapté de Dere et al, 2005.

Le test de reconnaissance du nouvel objet est un test très utilisé pour accéder à une mémoire de type épisodique. Relativement simple à mettre en œuvre, il comporte 3 phases : une phase d'habituation à l'arène, une phase de familiarisation au cours de laquelle l'animal est mis en présence de deux objets identiques puis, après un intervalle de rétention dont la durée peut varier, la phase de test. Pendant la phase de test, un des deux objets rencontrés lors de la phase de familiarisation est remplacé par un nouvel objet. Les modalités concernant les différentes phases et les intervalles peuvent être modifiés et donner lieu à de nombreuses

variantes. Ce test réalisé lors d'un essai unique, implique la mémoire de type épisodique dans la mesure où l'animal est exposé à des objets dans une configuration spatiale ou un contexte donné et à un moment particulier. En revanche, il ne permet d'évaluer que deux composantes de cette mémoire, l'objet et sa localisation, l'aspect temporel de l'expérience restant inaccessible (Antunes et al., 2012; Ennaceur, 2010).

Le What-Where-When a été développé en 2005 (Dere et al. 2005). Il est basé sur la combinaison de différentes variantes des tests de préférence pour la nouveauté. Il permet, selon les auteurs, d'évaluer, au cours d'un essai unique, les 3 composantes de la mémoire de type épisodique. Pour cela, l'animal est exposé de façon séquentielle à deux séries d'objets différentes, chaque série ayant une configuration spatiale différente de l'autre. Lors de la phase de test, des objets appartenant à chacune des deux séries sont présents et placés dans une configuration soit familière soit nouvelle (figure 6).

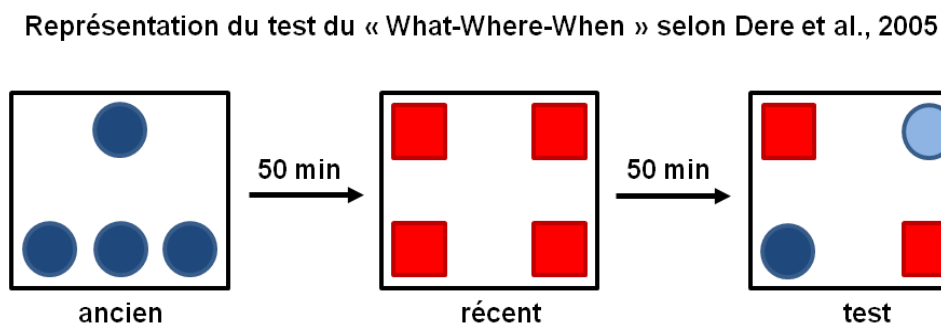


Figure 6: Test de mémoire de type épisodique selon le protocole de Dere et al., 2005.

Chaque animal effectue deux passages au cours desquels il est mis en présence de quatre objets identiques (mais différents à chacun des deux passages) disposés dans une certaine configuration. Lors de la phase de test, deux objets présents au cours du premier passage (objets anciens) sont disposés dans l'arène avec deux objets rencontrés au cours du deuxième passage (objets récents). L'un des objets anciens est placé à une nouvelle localisation. Figure adaptée de Binder et al, 2015.

Dans cette expérience, les objets familiers anciens ont ainsi été plus explorés que les récents ce qui reflète une mémoire des objets et de leur ordre d'apparition. De plus, l'objet familier ancien déplacé a été plus exploré que l'objet familier ancien resté à sa position initiale indiquant une mémoire spatiale. D'après les auteurs, ces éléments démontrent la capacité des rongeurs à associer des informations relatives à l'objet, à l'espace et au temps suite à une exposition unique à ces stimuli et ceci de façon intégrée (les différentes informations ne seraient pas encodées, stockées et rappelées indépendamment les unes des autres) (Binder et al., 2015; Dere et al., 2005). Ce test et des versions légèrement modifiées

ont été largement utilisés pour évaluer la mémoire de type épisodique chez le rongeur notamment dans le cadre d'études pharmacologiques (Binder et al. 2015). Il présente de nombreux avantages dans la mesure où il répond bien à la consigne de l'essai unique, il ne nécessite pas de recours à un renforcement et donc à l'apprentissage de règles comprenant plusieurs sessions d'entraînement qui pourrait par conséquent impliquer la mémoire de référence. Cependant, ce type de paradigme soulève une question qui reste sujette à débat et qui concerne la dimension temporelle de cette mémoire de type épisodique. Il s'agit de la difficulté à pouvoir identifier si la discrimination des objets observée lors du test résulte d'un processus mnésique de rappel de l'information encodée et stockée de façon intégrée lors des expériences uniques vécues aux cours des deux premières phases ou si elle est basée sur la familiarité relative vis-à-vis des deux différents objets (plus ou moins « récents ») c'est-à-dire sur la comparaison de la force de la trace mnésique laissée par chacun des objets et s'affaiblissant avec le temps (Binder et al., 2015; Eacott et al., 2010).

Une variante du What-Where-When se basant sur une approche différente a été proposée par Eacott et al. (Eacott, 2004). La difficulté, pour une expérience donnée, à définir et à évaluer l'élément « temps » qui peut être relatif (plus ou moins récent ou en référence à une autre expérience) ou absolu (le moment précis de l'expérience) a conduit certains chercheurs à un concept plus élargi de la mémoire de type épisodique. L'élément important serait de pouvoir identifier et se remémorer les événements qui se sont produits lors d'une occasion spécifique plutôt qu'à un temps spécifique. Ainsi, la possibilité d'utiliser des indices autres que les indices temporels, comme par exemple des informations contextuelles, pour différencier des occasions a été évoquée et a permis le développement du paradigme « What-Where-Which ». Il permet d'accéder à la mémoire de l'évènement comprenant les objets, leur configuration spatiale et l'occasion particulière représentée par le contexte (Eacott et al., 2010). La tâche se déroule en 3 phases, les deux premières sont des phases d'exposition au cours desquelles l'animal est mis en présence de deux objets différents dans une position donnée et dans un contexte particulier différent pour chacune des deux phases. Après un délai variable, lors de la phase de test, deux objets identiques sont positionnés dans l'un des deux contextes (figure 7).

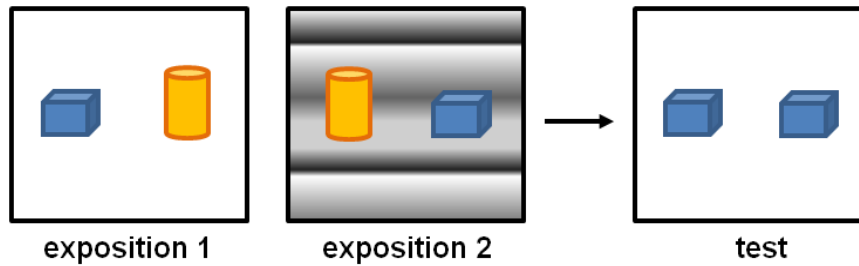


Figure 7: Représentation schématique des phases du "What-Where-Which" selon Eacott et al., 2004.

Comme le précédent paradigme, celui-ci présente l'intérêt d'être réalisé en un seul essai. Il ne nécessite pas d'apprentissage de règle et d'entraînement. En revanche, le concept même de substituer une information temporelle par une information contextuelle dans le cadre de l'évaluation d'une mémoire de type épisodique peut être débattu (Binder et al. 2015). En outre, le recours à un processus de familiarité plutôt qu'à un rappel de l'occasion n'est pas exclu non plus.

D'autres paradigmes nécessitant un apprentissage ont également été proposés. C'est le cas par exemple, d'un protocole de What-Where-When réalisé sur un labyrinthe à 8 bras (radial-arm maze, RAM) et utilisant des récompenses alimentaires de différentes natures. Chaque essai comprend 3 phases (une phase dite d'étude, un intervalle de durée variable et une phase de test) qui permettent d'évaluer la capacité de l'animal à retrouver quel type de nourriture peut se trouver dans quel bras du RAM et à quel moment. La nécessité d'un apprentissage et donc de nombreux essais d'entraînement peut mettre en jeu la mémoire de référence (Binder et al. 2015; Crystal 2010).

Tous ces tests ne présentent pas l'ensemble des critères requis pour l'évaluation de la mémoire épisodique au sens strict mais ils permettent d'accéder au moins partiellement à une mémoire de type épisodique. Cette mémoire étant l'une des premières à être affectée dans les maladies neurodégénératives, il est d'un grand intérêt de l'étudier dans les modèles animaux.

2. Mémoire de travail

La mémoire de travail correspond à un système de traitement permettant d'encoder, de maintenir et de manipuler, de façon transitoire, une information qui n'est plus présente dans l'environnement afin d'adapter le comportement. La capacité de cette mémoire est limitée et l'information est ainsi maintenue sur une durée relativement courte (Bizon et al., 2012;

Webster et al., 2014). D'un point de vue pratique, chez le rongeur, elle peut être définie comme la mémoire d'un objet, d'un stimulus ou d'une localisation utilisée au cours d'une session de test (Dudchenko 2004).

De nombreux paradigmes destinés à évaluer la mémoire de travail chez les rongeurs reposent sur des tâches spatiales et utilisent leur préférence naturelle pour la nouveauté. Certains dispositifs sont présentés à la figure 8. Parmi eux, les tests d'alternance retardée réalisés dans un labyrinthe en T ou en Y (T-maze ou Y-maze) sont très souvent utilisés. Au cours d'un essai, l'animal est placé dans le bras d'entrée du labyrinthe puis il choisit d'entrer dans l'un des bras ce qui entraîne une récompense alimentaire. Après un délai de rétention, l'animal n'est récompensé que s'il choisit le bras qu'il n'a pas visité précédemment ce qui implique la mémoire du premier bras où il est entré pour sélectionner la réponse alternative. Dans le cas décrit, il s'agit d'une alternance retardée et renforcée. L'alternance peut également avoir lieu sans renforcement, on parle alors d'alternance spontanée. L'alternance peut être basée sur plusieurs types d'informations : l'utilisation de repères spatiaux extérieurs au labyrinthe, l'utilisation d'odeurs lui permettant de détecter quel bras a été visité le plus récemment ou encore la mémoire de la direction dans laquelle l'animal a été précédemment. Il a été montré que les rats possèdent un « sens de la direction ou de la position dans l'espace » dont ils peuvent se servir pour identifier le bras précédemment visité (Dudchenko, 2004; Dudchenko et al., 2002). D'autres types de labyrinthes, plus complexes, sont aussi utilisés pour évaluer la mémoire de travail. Le RAM est composé d'une plateforme centrale de laquelle rayonnent un nombre variable de bras. Il existe différents protocoles faisant intervenir des récompenses alimentaires et des repères spatiaux. Après avoir visité des bras récompensés et respecté un délai de durée variable, l'animal doit se souvenir des bras déjà visités (et donc sans nourriture) pour ne pas y retourner (les revisites étant considérées comme des erreurs de mémoire de travail) et privilégier les autres bras (Bizon et al. 2012; Dudchenko 2004). La piscine de Morris peut également être utilisée pour évaluer cette mémoire. Grâce à des repères spatiaux et après un seul essai, l'animal doit apprendre à retrouver une plateforme submergée dont la localisation change chaque jour. Le temps mis par l'animal pour trouver la plateforme est sensé diminuer lors du deuxième essai reflétant ainsi la mémoire de travail (Frielingsdorf et al., 2006). Enfin, sur le même principe, elle peut aussi être testée grâce au labyrinthe de Barnes. Il s'agit d'une plateforme circulaire présentant sur toute sa périphérie entre 18 et 50 trous. Un seul de ces trous présente une boîte d'échappement que l'animal doit apprendre à localiser. Les erreurs de mémoire de travail peuvent être évaluées en comptabilisant le

nombre de revisites de trous incorrects (n'ayant pas la boîte d'échappement) (Barr et al., 2007; Bizon et al., 2012).

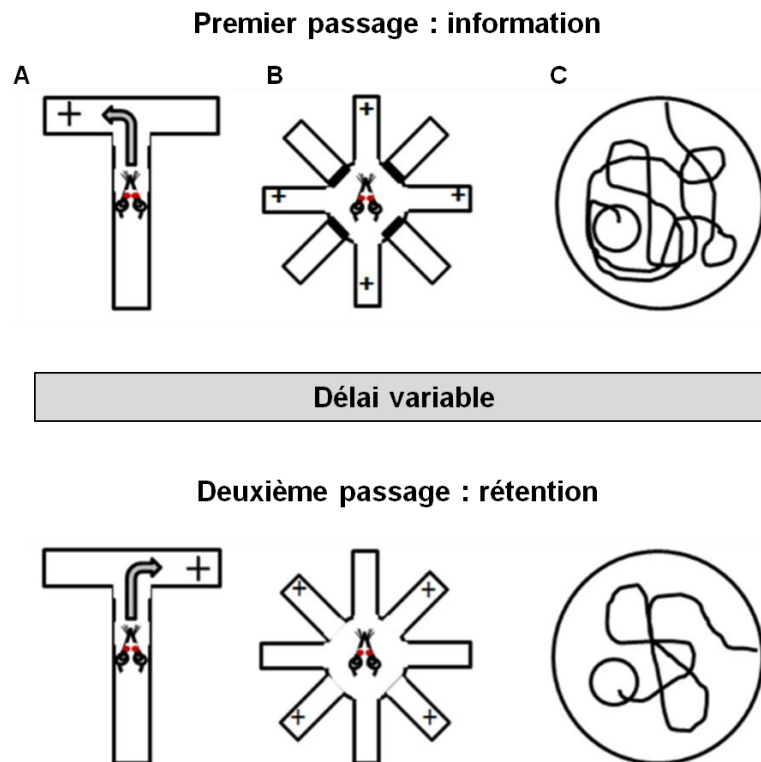


Figure 8: Exemples de dispositifs utilisés pour l'évaluation de la mémoire de travail grâce à des tâches spatiales.

Au cours d'un premier passage, l'information qui doit être maintenue pendant un délai variable afin de guider le comportement lors du deuxième passage, est présentée. A : tâche d'alternance retardée et renforcée (la croix indique une récompense alimentaire) dans un labyrinthe en T. B : évaluation de la mémoire de travail avec le RAM à 8 bras. Lors du premier passage, l'animal n'a accès qu'aux bras récompensés (indiqués par les croix) les autres bras étant bloqués. Au cours du deuxième passage, l'animal est libre de visiter tous les bras mais seuls les bras qui étaient bloqués sont récompensés. C : mémoire de travail évaluée par la piscine de Morris. L'animal doit retrouver une plateforme submergée rencontrée lors du premier passage. Figure adaptée de Bizon et al., 2012.

Des tâches non spatiales ont également été développées. Elles reposent sur la capacité de l'animal à retenir un stimulus (un objet, une odeur, un signal lumineux) qui lui a été présenté pendant un certain délai. Après ce délai, un choix lui est proposé entre le stimulus déjà rencontré et un stimulus alternatif. Selon le type de tâche, la réponse attendue et renforcée par une récompense alimentaire, peut correspondre soit au choix du stimulus dont il fallait se souvenir soit au choix du stimulus alternatif (Dudchenko 2004).

3. Mémoire de référence

La mémoire de référence relève d'un apprentissage. Elle permet l'acquisition et la rétention d'une nouvelle information qui reste constante au cours des essais d'entraînement réalisés dans le cadre d'une tâche donnée (Webster et al. 2014). La plupart du temps, elle est évaluée grâce à des tâches spatiales impliquant la formation d'une carte cognitive représentant l'environnement et élaborée notamment grâce aux cellules de lieu et aux cellules de grilles situées dans l'hippocampe et le cortex entorhinal. On distingue deux types de navigation dans un environnement : la navigation allocentrique ou spatiale qui se caractérise par la capacité à utiliser des repères ou indices situés à distance pour se déplacer et s'orienter et la navigation égocentrique qui utilise des indices internes (mouvements du corps, direction, séquence de virages) et des indices très proches. Il est donc important d'adapter l'aménagement de l'environnement (indices distaux ou proximaux) en fonction du type de navigation à tester (Vorhees et al., 2014). Les mêmes dispositifs et labyrinthes que ceux présentés pour l'exploration de la mémoire de travail peuvent être utilisés avec des protocoles différents. Dans tous les cas, ils nécessitent plusieurs jours d'apprentissage à raison d'au moins une session par jour comprenant plusieurs essais d'entraînement. Dans le cas de la piscine de Morris, il s'agit pour l'animal d'apprendre à retrouver, grâce à des repères spatiaux, une plateforme submergée non visible toujours positionnée au même emplacement au cours des sessions. Un entraînement préalable, dans lequel la plateforme est visible et porte un repère, est réalisé afin de s'assurer des capacités sensorimotrices et motivationnelles des animaux. Cette étape permet également de s'assurer que les animaux apprennent l'aspect procédural de la tâche (nager pour retrouver la plateforme) (Foster et al., 2012). L'apprentissage est observé lorsque le trajet pour atteindre la plateforme diminue au cours des sessions. Lors du test de rétention, pour lequel on retire la plateforme de la piscine, la mémoire de référence spatiale est évaluée en observant le temps que l'animal passe à chercher la plateforme à l'endroit où elle était cachée pendant les entraînements. Sur le même principe, avec le labyrinthe de Barnes, l'animal doit apprendre à localiser le trou sous lequel se trouve la boîte d'échappement grâce à des repères spatiaux. Le RAM est aussi utilisé pour tester la mémoire de référence spatiale. Il s'appuie sur le renforcement de certains des bras par des récompenses alimentaires et nécessite donc une mise sous restriction alimentaire des animaux pour s'assurer de leur motivation. L'animal apprend à retrouver les bras renforcés grâce aux repères spatiaux. Les revisites des bras renforcés sont considérées comme des erreurs de mémoire de travail tandis que les visites des bras qui ne sont jamais renforcés sont

considérées comme des erreurs de mémoire de référence (Sharma et al., 2010; Vorhees et al., 2014). Chacun de ces dispositifs présente des avantages et des inconvénients. La piscine de Morris permet un apprentissage rapide, elle ne présente aucun indice proximal et donne une motivation identique aux animaux sans que celle-ci ne diminue au fur et à mesure des essais. En revanche, elle est critiquée pour le stress que peut induire la nage notamment chez la souris qui montre un thigmotactisme ou se laisse flotter. Le labyrinthe de Barnes est un environnement sans repères internes et moins stressant. Cependant, la motivation, possiblement insuffisante, favorise des comportements exploratoires plutôt qu'un échappement et l'utilisation de stratégies non spatiales comme la recherche en série. Le RAM, moins stressant également, utilise une motivation alimentaire qui peut s'amenuiser au cours des essais. De plus, dans ce labyrinthe, l'animal est susceptible d'utiliser des repères proximaux ou olfactifs (Sharma et al., 2010; Vorhees et al., 2014).

C. Recherche translationnelle sur la cognition

La recherche préclinique et la recherche clinique interagissent et s'enrichissent mutuellement améliorant ainsi l'approche translationnelle.

1. De la recherche préclinique vers la recherche clinique : Cognition spatiale en réalité virtuelle (RV)

Les évolutions technologiques ont favorisé le développement et l'utilisation d'environnements écologiques reproduits en réalité virtuelle permettant de simuler une activité de navigation dans de grands espaces réalistes. Les études réalisées en RV sont particulièrement intéressantes chez les sujets âgés ou chez les patients atteints de MA qui présentent dans les deux cas des troubles de la cognition spatiale. La RV permet d'assurer des conditions d'étude contrôlées en réduisant le recours au langage (Cogné et al., 2017; Taillade et al., 2014). Certaines de ces tâches sont directement inspirées des tests utilisés chez le rongeur comme la piscine de Morris ou le RAM et reproduisent des environnements analogues (Astur et al., 2002; Jheng et al., 2009; Laczó et al., 2011; Moffat et al., 2002; Nedelska et al., 2012; Spieker et al., 2012). Les tâches en RV ont montré leur utilité dans la détection de déficits cognitifs. Comme chez le rongeur, les études en RV ont permis de montrer une association entre une atteinte hippocampique et une altération de la cognition

spatiale (Astur et al., 2002; Nedelska et al., 2012; Vorhees et al., 2014) ou encore de montrer l'intérêt translationnel de ce type d'outil appliqué parallèlement à l'homme et au rongeur et augmentant la validité prédictive des paradigmes utilisés en recherche préclinique (Etchamendy et al., 2012).

2. De la recherche clinique vers la recherche préclinique : tests automatisés sur écrans tactiles, Touchscreen®

Le touchscreen est aujourd'hui utilisé pour réaliser des tests cognitifs variés aussi bien dans le cadre d'évaluation cliniques grâce à des batteries de tests comme la CANTAB (Cambridge Neuropsychological Test Automated Battery) qu'en recherche préclinique (Shepherd et al., 2016). Il s'agissait au départ de développer, avec les nouvelles technologies, des moyens d'évaluation neuropsychologiques innovants pour les patients âgés en ciblant plus particulièrement les patients atteints de maladies neurodégénératives comme la MA. La CANTAB a été conçue à partir de paradigmes utilisés chez le rongeur et de tests complexes déjà existants chez l'homme dans le but d'obtenir un outil adapté aux patients pour la recherche clinique et qui puisse aussi, par la suite, être aménagé et transposé à d'autres espèces (singes, rongeurs) (Barnett et al., 2016).

La tâche de paired-associate learning (PAL), qui correspond à une partie de la CANTAB, a été directement transposée chez le rongeur et constitue un exemple d'approche translationnelle (Shepherd et al., 2016). Le PAL permet d'explorer la mémoire visuospatiale, qui est la capacité de définir la configuration, la position dans l'espace d'un stimulus visuel et de réaliser des opérations mentales impliquant des concepts spatiaux. Cette fonction comprend la perception visuelle (lumière, contraste, orientation, détection des couleurs), la construction et la mémoire visuelle dont les principales composantes sont la reconnaissance d'une information visuelle et la mémoire topographique (acquisition et encodage de l'orientation spatiale permettant la navigation) (Geldmacher 2003; Salimi et al. 2018). Les dysfonctions visuospatiales sont relativement fréquentes et précoces chez les patients atteints de MA (Quental et al., 2009) et pourraient constituer un marqueur utile pour la détection de la MA dès le stade préclinique (Junkkila et al., 2012; Salimi et al., 2018). Le PAL s'est révélé sensible aux troubles cognitifs précoces observés chez les patients Alzheimer (Blackwell et al. 2004). Chez l'homme, la tâche consiste à identifier un stimulus visuel qui peut apparaître dans l'une des 8 fenêtres de l'écran et à se rappeler de sa localisation de façon à choisir la bonne

fenêtre lorsque l'objet réapparaît ultérieurement (Salimi et al. 2018). Chez le rongeur, la tâche consiste à associer une image (parmi 3 possibles) à sa localisation correcte sur l'écran (parmi 3 possibles). Elle utilise un renforcement alimentaire et nécessite donc une mise sous restriction alimentaire des animaux (Horner et al., 2013; Talpos et al., 2009). Des similarités ont été observées entre l'homme et différentes espèces, notamment le rongeur, concernant structures neuroanatomiques impliquées dans la performance au PAL (lobe temporal, hippocampe et ses connectivités avec le cortex préfrontal) suggérant la validité translationnelle de cet outil (Barnett et al., 2016; Shepherd et al., 2016).

IV. Statines et cognition

A. Pharmacologie des statines

Les statines constituent une classe de médicaments hypolipémiants très utilisés en clinique dans la prise en charge des dyslipidémies, la prévention primaire et secondaires des maladies cardiovasculaires. Leur mécanisme d'action principal repose sur l'inhibition compétitive de l'HMG-CoA réductase (3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A réductase). L'HMG-CoA réductase catalyse la transformation de l'HMG-CoA en mévalonate, étape limitante de la biosynthèse du cholestérol (figure 9). Les statines entraînent donc une diminution de la production endogène de cholestérol dont la diminution dans les hépatocytes cause une augmentation de l'expression des récepteurs aux LDL (Low-Density Lipoprotein). Ainsi, la clairance des particules de LDL-cholestérol présentes dans le plasma augmente (Brown et al., 1986; Sirtori, 2014). Une inhibition de la synthèse hépatique de l'apolipoprotéine B100 et une diminution de la synthèse des lipoprotéines riches en triglycérides sont aussi observées. Les effets résultant de l'action des statines sont une diminution du cholestérol total, du LDL-cholestérol, des triglycérides et une augmentation du HDL-cholestérol (High-density lipoprotein) (McFarland et al. 2014).

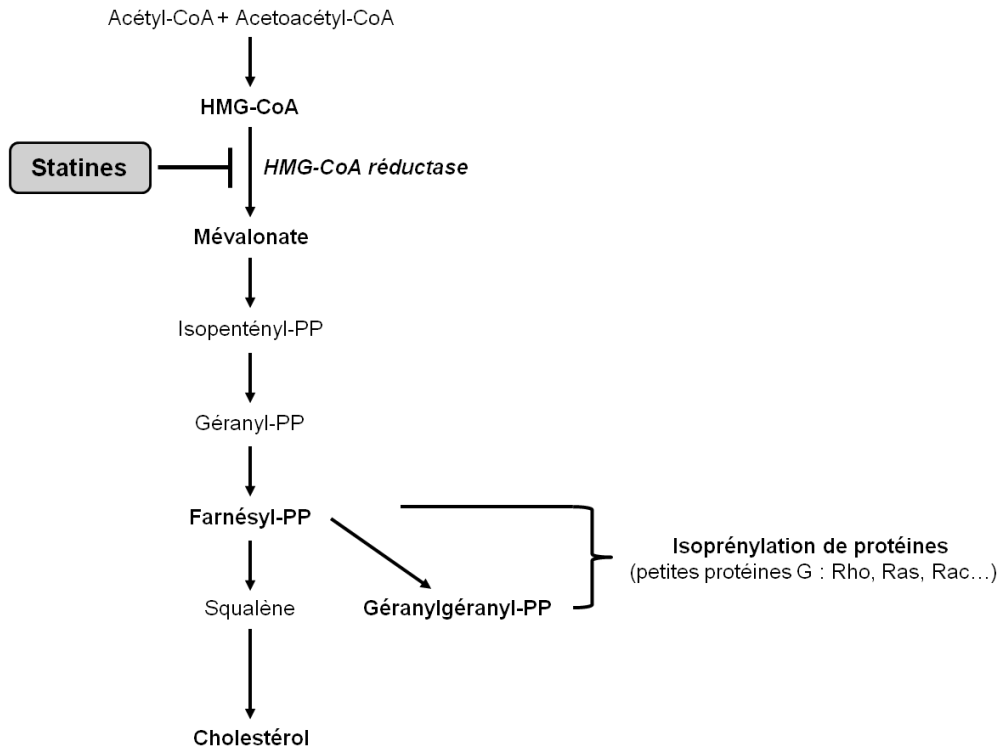


Figure 9: Voie de biosynthèse du cholestérol.

Les statines inhibent l'étape limitante catalysée par l'HMG-CoA réductase. Adapté de Sirtori et al, 2014.

Bien que les statines partagent le même mécanisme d'action, leurs profils pharmacocinétiques peuvent varier considérablement. Par voie orale, les statines sont bien absorbées et subissent un fort effet de premier passage hépatique qui diminue la biodisponibilité à 5 à 30% de la dose administrée. Dans la circulation, elles peuvent se lier à l'albumine de façon variable (43 à 99%) et présentent des demi-vies allant de 0,5 – 3 heures à plus de 20 heures. Elles sont majoritairement métabolisées par les cytochromes P450 (CYP3A4 et 2C9) (Shitara et al., 2006). Elles présentent des profils de liposolubilité variés (figure 10).

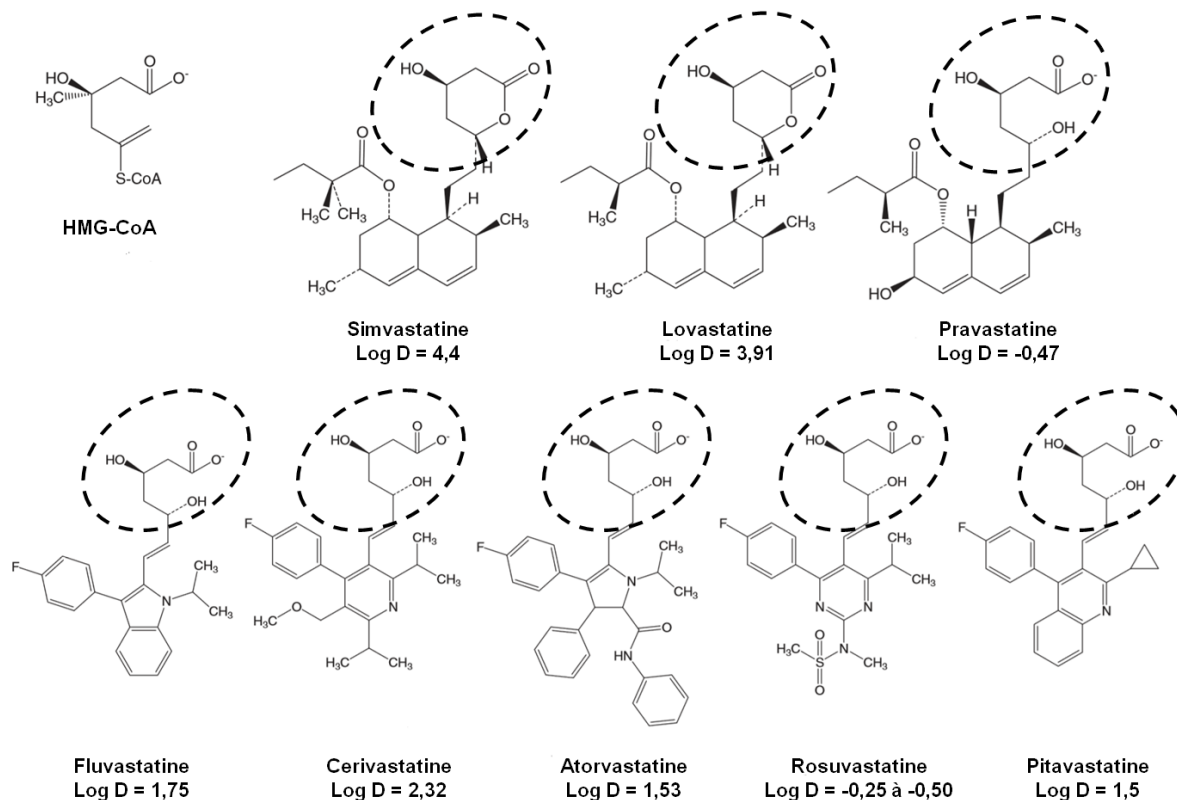


Figure 10: Structures moléculaires des statines.

Simvastatine, lovastatine et pravastatine sont des composés d'origine fongique, les autres statines sont des composés synthétiques. Le pharmacophore (entouré en pointillé) des statines mime l'HMG-CoA endogène, permettant leur fixation compétitive au niveau du site catalytique de l'HMG-CoA réductase. Le logarithme des coefficients de distribution octanol-eau (Log D) est présenté à pH 7,0 pour l'ensemble des statines sauf pour la rosuvastatine où il est donné à pH 7,4. Adapté de Shitara et al, 2006.

Dans le système nerveux central (SNC) mature, la synthèse de cholestérol de novo est maintenue à un faible niveau. Elle est assurée principalement par les astrocytes. Les neurones y contribuent également et sont capables de réutiliser le cholestérol libéré lors de la mort d'autres neurones. La barrière hémato-encéphalique (BHE) empêche un flux de lipoprotéines contenant du cholestérol et provenant de la circulation générale vers le cerveau. Le turnover métabolique du cholestérol dans le cerveau est donc limité avec une demi-vie de 6 mois à 5 ans alors qu'elle est de quelques jours dans le plasma (Björkhem et al., 2006). Par conséquent, il est envisageable qu'une administration prolongée de statine soit nécessaire avant de pouvoir observer une modification du cholestérol cérébral (McFarland et al. 2014). La capacité des statines à pénétrer dans le SNC est influencée par leur liposolubilité. Les plus liposolubles (simvastatine, lovastatine, fluvastatine, atorvastatine, pitavastatine) peuvent traverser passivement la BHE. De plus, il semble que les statines hydrophiles puissent également accéder au parenchyme cérébral (Johnson-Anuna et al. 2005), en impliquant peut-être des

transporteurs d'anions organiques (OATP : organic anion transporting polypeptides) présents dans le cerveau et dont elles sont les substrats (McFarland et al. 2014; Niemi 2007). La variabilité importante des paramètres pharmacocinétiques (demi-vie, liposolubilité et modalité de pénétration dans le SNC) des statines peut être à l'origine d'une variabilité des effets observés. Cette variabilité est donc à considérer notamment dans l'étude des effets neurologiques des statines.

B. Statines et cognition : données cliniques

En plus de leur action hypocholestérolémiante, les statines possèdent des effets pléiotropes dont les mécanismes variés, notamment neurologiques, suscitent un intérêt particulier. Depuis de nombreuses années, des études observationnelles de cohortes et des essais contrôlés randomisés ont été menés pour étudier l'action des statines sur les fonctions cognitives et particulièrement sur un potentiel effet préventif vis-à-vis du risque de démence ou de MA (Barone et al., 2014; McFarland et al., 2014).

1. Population générale

Au début des années 2000, deux études ont montré un effet bénéfique des statines. Jick et al ont trouvé une association entre la prise de statine (atorvastatine, cerivastatine, fluvastatine, pravastatine et simvastatine, analysées ensemble) et une diminution du risque de développer une démence (Jick et al., 2000). Wolozin et al., ont montré une association entre la prise de lovastatine ou de pravastatine et une prévalence de MA diminuée par rapport à la population générale ou aux patients sous traitements à visée cardiovasculaire autres que les statines (Wolozin et al., 2000). Ces premières études présentent cependant certaines limites concernant, par exemple, leur représentativité par rapport à la population générale, le manque de certaines informations comme le niveau d'éducation ou un biais de prescription (McGuinness et al. 2016). Dans les années suivantes, d'autres études réalisées sur des cohortes issues de la population générale ont montré un risque diminué de développer une MA en cas de traitement par statines (Haag et al., 2009; Hajjar et al., 2002; Rockwood et al., 2002; Sparks et al., 2008). Dans ces études de durées variables, le type de statine utilisé n'est pas spécifié à l'exception de celle de Haag et al., sur la cohorte Rotterdam study. D'autres travaux, en revanche, n'ont retrouvé aucune association entre la prise de statine et le risque de

développer une démence ou une MA (Rea et al. 2005; Zandi et al. 2005) ou de bénéfique sur les fonctions cognitives (Benito-León et al., 2010). En plus de ces études observationnelles, des essais contrôlés randomisés ont également été réalisés, dont deux, versus placebo et sur une durée d'au moins 12 mois afin de pouvoir détecter un effet préventif sur l'incidence de démence (McGuinness et al. 2016). Il s'agit des essais HPS (Heart Protection Study) 2002 (Collins et al., 2002) étudiant un groupe simvastatine versus placebo et PROSPER (Prospective Study of Pravastatin in the elderly at Risk) étudiant un groupe pravastatine versus placebo (Shepherd et al., 2002; Trompet et al., 2010). Dans les deux cas, le suivi des effets cognitifs et de l'incidence de démence ne faisaient pas partie des objectifs primaires de l'étude. Au total, McGuinness et al, ont conclu que les statines, administrées à des patients à un âge avancé et à risque de maladie vasculaire, n'ont pas d'effet sur l'incidence de démence ou le déclin cognitif (McGuinness et al. 2016). Néanmoins, deux méta-analyses de 2013 et une de 2018 ont conclu à un possible effet bénéfique des statines dans la prévention des démences et MA (Chu et al., 2018; Swiger et al., 2013; Wong et al., 2013). Enfin une revue systématique de la littérature (études observationnelles et essais contrôlés randomisés) est arrivée à la conclusion qu'initiales à un âge déjà avancé, les statines ne semblent pas prévenir un déclin cognitif ou une démence dans les années suivant l'initiation mais n'exclue pas un effet bénéfique sur la cognition en cas d'initiation plus précoce ou d'un traitement de longue durée (Power et al., 2015). Les résultats issus de ces différents travaux sont assez contradictoires. Plusieurs éléments peuvent expliquer ces différences : la diversité du type d'étude (observationnelles transversales ou longitudinales, essais contrôlés randomisés, méta-analyses) source d'hétérogénéité, de possibles biais, les méthodes d'analyse choisies, les caractéristiques des populations étudiées, le type de statine (avec la diversité de leur paramètres pharmacocinétiques), la dose et la durée de traitement, l'âge d'initiation du traitement, les modalités d'évaluation des fonctions cognitives.

Par ailleurs, des effets secondaires cognitifs ont été relevés lors de l'utilisation de statines. Une revue a décrit 60 cas rapportés de perte de mémoire à court terme, transitoire et réversible, survenant quelques mois après l'initiation du traitement ou après une augmentation de posologie et cessant à l'arrêt du traitement (Wagstaff et al., 2003). Une étude de 2014 a revu la mise en garde de la Food and Drug Administration américaine concernant les possibles effets secondaires des statines et a précisé que seules les statines les plus lipophiles présentent un risque plus élevé de troubles cognitifs (M Sahebzamani 2014). Enfin, une méta-analyse de 2015, étudiant plusieurs essais contrôlés randomisés, n'a retrouvé aucune

association entre la prise de statines et la survenue de troubles cognitifs (Ott et al. 2015). Des effets secondaires cognitifs à court terme et réversibles pourraient coexister avec des effets cognitifs bénéfiques après des expositions longues ayant débutées en milieu de vie, les deux phénomènes étant sous-tendus par des mécanismes différents (Schultz et al., 2018).

2. Patients présentant des troubles cognitifs (TCL à Alzheimer)

Des études se sont aussi intéressées à l'effet des statines dans la prévention et le traitement de la MA. Une étude observationnelle de 2005 réalisée chez des patients atteints de MA a trouvé un déclin cognitif (suivi par MMSE) plus lent dans le groupe de patients traités par des médicaments hypolipémiants (dont 47% de statines) (Masse et al. 2005). D'autres études observationnelles plus récentes ont montré une association entre la prise précoce (définie par une prise de statine avant l'instauration du traitement par inhibiteur de l'Acétylcholine Estérase) de statines et une progression ralentie de la MA chez des patients atteints de MA légère à modérée (Lin et al. 2015) et une tendance à un déclin cognitif diminué chez des patients TCL (Smith et al., 2017). En revanche, dans une étude longitudinale de 2012, Bettermann et al, montrent une association entre la prise de statine et une diminution du risque de démence et de MA avec une tendance neuroprotectrice sur le déclin cognitif chez des patients cognitivement normaux à l'inclusion mais cette association n'est pas retrouvée chez des patients TCL à l'inclusion (Bettermann et al. 2012). Des essais cliniques contrôlés randomisés versus placebo ont aussi été menés. En 2005, Sparks et al, ont montré une amélioration à 6 mois du score ADAS-cog (Alzheimer's Disease Assessment Scale – cognitive subscale) chez des patients atteints de MA légère à modérée (Sparks et al., 2005). En 2010 et 2011, deux autres essais (statine versus placebo) réalisés sur des patients ayant une MA légère à modérée, n'ont montré aucun bénéfice cognitif (évalué par des scores ADAS-cog ou ADCS-CGIC Alzheimer's Disease Cooperative Study Clinical Global Impression of Change) des statines (Feldman et al. 2010; Sano et al. 2011). Enfin des études se sont intéressées à l'association entre la prise de statines et les marqueurs caractéristiques de la MA. Dans l'une, des autopsies de cerveaux issus de patients cognitivement normaux à l'inclusion, ont mis en évidence une association entre la prise de statine et une diminution des dégénérescences neurofibrillaires (Li et al. 2007). En 2018, Ramanan et al, ont étudié des biomarqueurs de la MA (dépôts amyloïdes et dégénérescences neurofibrillaires par exemple) observés en imagerie (IRM et TEP) et n'ont retrouvé aucune différence entre les patients traités par statine et les patients non traités (Ramanan et al. 2018). Au total, des observations

contradictoires et hétérogènes sont aussi retrouvées chez les patients atteints de MA et sont encore insuffisantes pour définir un potentiel rôle bénéfique des statines dans le déclin cognitif ou encore émettre des recommandations d'utilisation dans la prévention ou le traitement de certains sous-groupes de patients (Barone et al. 2014; Feldman et al. 2010).

C. Statines et cognition : effets sur le cholestérol et effets pléiotropes

Les statines possèdent de nombreux mécanismes d'actions par lesquels elles pourraient avoir un effet protecteur sur la cognition.

1. Effets dépendants du cholestérol

Des taux élevés de cholestérol total ont été associés un risque augmenté de démence et de MA (Anstey et al., 2008). L'action hypolipémiant des statines pourrait donc jouer un rôle préventif vis-à-vis de ces altérations cognitives.

Le précurseur de la protéine amyloïde (APP) est une protéine membranaire impliquée dans plusieurs fonctions physiologiques (Zheng et al., 2006). Son clivage par les β et γ sécrétases présentes à la membrane entraîne la production de peptide A β capables de s'agréger en oligomères non solubles. Le clivage par l' α sécrétase, en revanche, produit une forme soluble facilement éliminée. Lorsque le cholestérol est présent de manière abondante au niveau des radeaux lipidiques membranaires des neurones, le clivage de l'APP par les β et γ sécrétases est augmenté (Wahrle et al. 2002) tandis qu'un niveau bas de cholestérol favorise la voie de l' α sécrétase, non amyloïdogénique (Kandiah et al., 2009; Kojro et al., 2001). Maintenir un niveau de cholestérol suffisamment bas pourrait ainsi avoir un effet protecteur limitant la voie menant à la production de peptides A β délétères.

2. Effets pléiotropes

Les statines inhibent l'HMG-CoA réductase qui intervient à la deuxième étape de la biosynthèse du cholestérol comprenant 28 étapes. De nombreux intermédiaires isoprénoïdes sont produits au cours de cette synthèse, notamment le géranylgeranylpyrophosphate (géranylgeranyl-PP) et le farnésylpyrophosphate (farnésyl-PP) qui interviennent dans la modification post-traductionnelle de nombreuses protéines comprenant la sous-unité γ des

protéines G hétérotrimériques, les petites protéines G liant le GTP comme Ras, Rho, Rac... (Takemoto et al., 2001). L'isoprénylation de ces protéines permet leur ancrage à la membrane, leur transport intracellulaire et leur passage de la forme inactive à la forme active. Les statines inhibent l'isoprénylation de Ras et Rho, conduisant à une accumulation de ces protéines sous forme inactive dans le cytoplasme. Les petites protéines G sont impliquées dans de nombreuses voies de signalisation et les conséquences sont donc très variées. Par exemple, les différents types de protéine Rho peuvent intervenir sur la forme, la motilité, la sécrétion ou encore la prolifération cellulaire. L'inhibition de Rho par les statines semble être un mécanisme important par lequel elles inhibent la prolifération vasculaire des cellules musculaires lisses (Takemoto et al., 2001). Une étude réalisée sur une culture cellulaire de neurones a suggéré que la pravastatine augmente la croissance des neurites en inhibant l'activité de protéines isoprénylées par le géranylgeranyl-PP comme RhoA (Pooler et al., 2006). Une étude réalisée chez la souris a montré que l'inhibition de la farnésylation due à la simvastatine a entraîné une augmentation de la potentialisation à long terme dans la région CA1 de l'hippocampe (Mans et al., 2012). Il a été suggéré que le géranylgeranyl-PP et le farnésyl-PP peuvent avoir des rôles différents et que des variations du ratio entre ces deux composés dans les différentes régions cérébrales pourraient par conséquent entraîner des effets différents des statines dans ces régions (McFarland et al. 2014).

2.1. Effets sur la neurogénèse, angiogénèse, synaptogénèse

Chez l'adulte, la neurogénèse a lieu au niveau du gyrus denté de l'hippocampe. Une altération de la neurogénèse, à laquelle l'inflammation semble participer, pourrait contribuer au déclin cognitif lié à l'âge ou à la MA (Ek Dahl et al., 2003). Des études sur le modèle de traumatisme crânien chez le rat ont mis en évidence une augmentation de la neurogénèse, un effet neuroprotecteur et une amélioration des performances d'apprentissage spatial chez les rats traités par statine (Lu et al. 2007; Wu et al. 2008). L'administration de simvastatine chez la souris a permis de mettre en évidence une augmentation de la neurogénèse au niveau du gyrus denté. Cet effet de la statine serait médié par la régulation de la synthèse des isoprénoïdes, entraînant une augmentation de la voie de signalisation de Wnt, elle-même impliquée dans la neurogénèse (Robin et al. 2014). Dans un modèle d'accident vasculaire cérébral chez le rat, Chen et al, ont montré que le traitement par atorvastatine administré dès le jour suivant la chirurgie, a permis d'observer une angiogénèse, une neurogénèse et une synaptogénèse (Chen et al. 2003).

2.2. Effets sur le métabolisme du peptide A β

Des mécanismes dépendants des isoprénoïdes peuvent aussi être impliqués dans une diminution de la production de peptide A β et une augmentation de sa clairance étudiés in vivo chez la souris et in vitro (Shinohara et al. 2010). Dans une lignée cellulaire de neuroblastome, un traitement par statine a entraîné une inhibition de l'isoprénylation de différentes GTPases. L'inhibition de l'isoprénylation des protéines de la famille Rab a causé une inhibition du transport cellulaire de l'APP et de la production d'A β et l'inhibition de l'activité des protéines membres de la famille Rho a altéré la production de peptide A β grâce à une augmentation du catabolisme des fragments C-terminaux de l'APP par les lysosomes (Ostrowski et al., 2007).

2.3. Effets sur l'inflammation

Plusieurs études chez l'animal ont montré des propriétés anti-inflammatoires des statines leur conférant un effet neuroprotecteur. L'atorvastatine a entraîné une diminution de l'activation microgliale et du déficit de potentialisation à long terme (PLT) chez un rat ayant subi une injection intracérébroventriculaire de peptide A β (Clarke et al., 2007). Dans un modèle de rat identique, l'atorvastatine a inhibé la réponse inflammatoire en diminuant la production d'interleukines 1, 6 et de TNF α (Tumor necrosis factor α) et a permis une amélioration des capacités d'apprentissage et de mémoire (Zhang et al., 2013). Chez une souris transgénique APP, Kurata et al, ont montré qu'un traitement par statine (atorvastatine ou pitavastatine) a permis de diminuer la réponse inflammatoire puis la formation de plaques séniles (Kurata, Miyazaki, et al. 2012).

L'action anti-inflammatoire des statines pourrait être liée à l'inhibition de l'activité de facteurs de transcription comme NF κ B ou l'interaction avec les récepteurs nucléaires PPAR α (peroxysome proliferator-activated receptor) tous deux impliqués dans de nombreux processus inflammatoires (Jasińska et al., 2007). Il a également été montré que plusieurs statines peuvent bloquer l'interaction entre l'intégrine LFA-1 (Lymphocyte function-associated antigen-1) exprimée à la surface des leucocytes et ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) ce qui pourrait empêcher l'adhésion et l'extravasation des leucocytes au niveau du site d'inflammation (Ouk et al. 2014; Weitz-Schmidt et al. 2001).

2.4. Effets sur le stress oxydant et nitrosant

La survenue d'altérations liées au stress oxydant est un événement précoce dans la MA (Nunomura et al. 2018). Des effets protecteurs des statines vis-à-vis des dommages liés au

stress oxydant ont été rapportés avec par exemple une diminution de la peroxydation lipidique, de l'oxydation et de la nitration des protéines, une diminution de la production d'espèces réactives de l'oxygène (Mendoza-Oliva et al., 2009). Dans un modèle de MA canin, l'administration de statine a entraîné une diminution de la lipoperoxydation, de l'oxydation et de la nitration des protéines et une augmentation du GSH (glutathion réduit) dans le cortex pariétal (Barone et al. 2011). Chez des souris ayant reçu une injection intracérébroventriculaire de peptide A β , le traitement par atorvastatine a permis une diminution de la réponse inflammatoire et oxydative induite par l'injection (Piermartiri et al. 2010). Sur des souris transgéniques modèles de MA traitées par statine entre 5 et 20 mois de vie, les analyses immunohistologiques des cerveaux ont montré une diminution du niveau de stress oxydant représenté par les produits de glycation avancés (AGE) et par les produits de peroxydation lipidique (4-hydroxy-2-nonenal, 4-HNE) (Kurata et al. 2013).

2.5. Effets vasculaires

Les statines exercent de nombreux effets sur la paroi vasculaire. Tout d'abord, elles sont capables d'améliorer la fonction endothéliale et le flux sanguin cérébral. En effet, elles augmentent la biodisponibilité du NO grâce à une régulation positive de la NO synthase endothéliale (eNOS). L'inhibition de l'isoprénnylation de RhoA qui régule négativement la stabilité de l'ARN messenger de la NOS endothéliale permet ainsi une augmentation de la demi-vie de ces ARN messagers (Endres 2005). L'effet antioxydant des statines participe aussi à l'amélioration de la fonction endothéliale (Takemoto et al., 2001). Par l'inhibition de Rho, elles inhibent la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires. L'hypercholestérolémie est associée à une réactivité augmentée des plaquettes (Opper et al. 1995). Il a été montré que les statines ont un effet antithrombotique (Huhle et al. 1999). Les statines ont également un effet sur la stabilité des plaques d'athérome dont le cholestérol est un composant majeur. Elles peuvent contribuer à la stabilité de la plaque en réduisant sa taille ou en modifiant les propriétés physicochimiques du cœur lipidique avec une diminution de l'accumulation de macrophages au niveau de la lésion et une inhibition de l'expression des métalloprotéinases (Takemoto et al., 2001). Par leurs différents effets les statines peuvent agir sur les facteurs de risque vasculaires, limiter les altérations liées aux maladies cérébrovasculaires et améliorer la perfusion cérébrale. Elles pourraient donc indirectement présenter un effet bénéfique dans la prévention des troubles cognitifs et de la MA (Kandiah et al., 2009).

V. Objectifs du travail de thèse

L'état de la littérature abordée dans ces différents chapitres soulève un certain nombre de questions.

Les MHC peuvent-elles, par leur simple présence, provoquer des altérations localisées du tissu cérébral et une modification structurelle du tissu environnant qui pourrait entraîner une altération de certaines voies cortico-subcorticales et réseaux neuronaux impliqués dans les processus cognitifs ? Ou bien sont-elles seulement le reflet des atteintes et de la sévérité des vasculopathies sous-jacentes, elles-mêmes responsables de dommages cérébraux impactant la cognition ? Par ailleurs, existe-t-il un rôle des MHC dans le déclin cognitif au cours de la MA ? Pourraient-elles avoir un effet précipitant ou aggravant dans cette pathologie ? Enfin, les statines, avec leurs effets hypocholestérolémiants et pléiotropes, peuvent-elles présenter un bénéfice dans ce contexte ?

Pour tenter d'apporter un éclairage sur le rôle d'une microhémorragie corticale (MHC) isolée, sans vasculopathie sous-jacente, l'objectif de ce travail de thèse a tout d'abord été i) de caractériser un nouveau modèle murin de MHC, réalisé sur la souris wild type (WT), avec une approche multimodale, ii) d'étudier l'impact fonctionnel à moyen et long termes de la MHC chez la souris WT et dans une lignée transgénique de souris APP présentant des dépôts amyloïdes et un déclin cognitif spontanés sans AAC, iii) d'étudier l'effet d'une modulation pharmacologique par atorvastatine chez les souris WT et APP.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. Les animaux

A. Description de la lignée animale utilisée

Nous avons choisi d'étudier l'impact de la MHC dans deux perspectives : celle d'un impact chez l'animal en condition saine (WT) et celle d'un impact chez l'animal en condition pathologique, c'est-à-dire développant des caractéristiques de la MA.

Les souris utilisées sont des souris mâles issues d'une lignée transgénique PDGFB-APPSwInd20Lms/2J, appelée lignée J20 (Mucke et al. 2000). Cette lignée exprime une forme mutée du précurseur humain de la protéine amyloïde (hAPP) portant à la fois la mutation suédoise (K670N/M671L) et la mutation indienne (V717F) et présente un ratio très élevé d'A β 42/A β 40. L'expression du transgène est sous le contrôle du promoteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes humaines (PDGF β). Le produit du transgène est exprimé dans les neurones et notamment à un niveau plus élevé dans le néocortex et l'hippocampe, deux régions précocement touchées chez l'homme au cours de la maladie d'Alzheimer (Webster et al., 2014). Les souris de cette lignée développent, au niveau de l'hippocampe et du cortex, des dépôts amyloïdes de façon progressive à partir du 5^{ème} mois de vie et de façon systématique à partir du 10^{ème} mois, et présentent une dysfonction synaptique sévère (Mucke et al. 2000). De façon plus précoce, le taux d'oligomères A β au niveau hippocampique et cortical augmente de manière progressive dès 6 semaines de vie, et ce jusqu'à la formation des plaques. La perte neuronale au niveau de la région CA1 de l'hippocampe, ainsi que la sur-activation de la microglie ont été décrites dès 12 semaines de vie (Wright et al. 2013). Par ailleurs, les souris de cette lignée présentent un déclin cognitif précoce avec altération de différentes mémoires et capacités d'apprentissage. La mémoire de référence spatiale ainsi que la capacité d'apprentissage, par exemple, sont altérées vers 4 mois de vie (Galvan et al. 2006; Wright et al. 2013). Sur le plan moteur et thymique, les souris de la lignée J20 présentent une hyperactivité motrice et un niveau d'anxiété réduit vers 2 mois de vie (Harris et al. 2010).

Les animaux n'exprimant pas le transgène sont les animaux WT (condition saine) servant de témoins dans cette étude. Ils sont littermates des souris exprimant le transgène, c'est-à-dire issus des mêmes reproductions, et ayant grandi dans les mêmes conditions d'élevage. Les

souris exprimant le transgène sont les animaux APP (condition pathologique). L'expression du transgène est vérifiée par génotypage.

B. Élevage

Après avoir obtenu l'accord du Dr Mucke pour exploiter la lignée J20, nous avons reçu 5 souris transgéniques mâles que nous avons croisées avec 10 souris femelles WT C57Bl6/J (Elevage Janvier, Le Genest Saint Isle, France). La lignée est ensuite progressivement amplifiée, et les souriceaux obtenus sont utilisés dans le cadre du protocole de l'étude. A noter, les souriceaux issus des couples de femelles transgéniques et de mâles WT ont une mortalité plus importante (<https://www.jax.org/strain/006293>). L'identification des souris est faite par des entailles au niveau des oreilles au moment du sevrage, à la 4^{ème} semaine de vie. Le sexage et le génotypage sont réalisés au même moment.

C. Génotypage

Le transgène est exprimé de manière hétérozygote (Mucke et al. 2000). Le génotypage est réalisé par PCR quantitative en temps réel à partir de l'ADN génomique, obtenu sur une biopsie de queue de 2 à 5 mm prélevée au moment du sevrage, à la 4^{ème} semaine de vie. Une première étape d'extraction de l'ADN génomique est nécessaire afin de pouvoir réaliser la PCR proprement dite.

1. Extraction de l'ADN génomique

Chaque biopsie de queue est tout d'abord incubée à 95 degrés pendant 40 minutes, dans 100 µL de solution A contenant du NaOH (S8045, Sigma-Aldrich, France) à la concentration de 25mM, et de l'EDTA (E6758, Sigma-Aldrich, France) à la concentration de 200mM, pour digérer les tissus et ainsi libérer l'ADN. Refroidi à 4 degrés pendant 5 min, on y ajoute ensuite 100 µL de solution B contenant du Tris HCL (T5941, Sigma-Aldrich, France) à une concentration de 40mM pour stopper la réaction. L'échantillon est ensuite centrifugé pendant 5min à 1300 rpm pour rassembler en pellet les poils et tout autre matériel non digéré. Enfin cette solution est diluée au 10^{ème} avec de l'eau moléculaire stérile pour obtenir l'échantillon final prêt pour la PCR.

2. PCR quantitative en temps réel

La PCR est réalisée avec le kit Roche LightCycler® Faststart DNA Master SYBR Green 1 (ref 12239264001), par la détection de l'intensité de fluorescence. Le mélange réactionnel est constitué de 1 µL de la solution du tube 1 (10 µL de tube 1a, LightCycler® Faststart Enzyme mélangé dans le tube 1b LightCycler® Faststart Réaction Mix SYBR Green, sans agitation), 3,2 µL d'eau stérile, 0,8 µL de MgCL2 à 25mM, 1 µL d'amorce sens à 3 µM, et 1 µL d'amorce anti-sens à 3 µM. Il est déposé dans les capillaires (LightCycler® Capillaire Roche) avec 3 µL d'échantillon à analyser, puis ensuite centrifugé pendant 10 secondes à 3000 rpm. La PCR en elle-même est réalisée automatiquement par le Thermocycleur (LightCycler® Instrument) selon les étapes suivantes : un cycle de 8 minutes à 95 degrés, suivi de 40 cycles répétés comprenant 10 secondes de dénaturation à 95 degrés, 10 secondes d'hybridation à 60 degrés et 10 secondes d'élongation à 72 degrés. Une courbe de fusion est établie permettant de vérifier la spécificité des amplicons. Si l'échantillon contient bien le gène cible, le nombre de cycles sera minimal pour atteindre un point pour lequel le signal est significativement supérieur au seuil de détection de l'appareil, soit en général aux alentours de 20 cycles.

Deux amplifications sont réalisées. La première pour vérifier la validité de l'échantillon à l'aide des amorces de contrôle positif de souris. La deuxième pour distinguer les souris transgéniques des non transgéniques à l'aide des amorces du transgène présent chez les souris APP J20. Les couples d'amorces utilisés (TIB® MOLBIOL) sont répertoriés dans le tableau 2.

Gènes d'intérêt	Séquences d'amorces
TcrD (Contrôle interne) sens	5' – caaatggtgcttgctggtg – 3'
TcrD (Contrôle interne) anti-sens	5' – gtcagtcgagtgacacagttt – 3'
hAPP muté J20 sens	5' – tcttcttctccacctcagc – 3'
hAPP muté J20 anti- sens	5' – ggtgagtttgaagtgatgcc – 3'

Tableau 2: Liste des séquences d'amorces utilisées pour le génotypage

D. Stabulation

Les souris sont stabulées dans une pièce éclairée de 8h à 20h, avec une température contrôlée entre 20°C et 24°C et une humidité comprise entre 45 et 65%. Elles disposent d'un accès *ad libitum* à l'eau et à la nourriture (aliments composés complets pour animaux A04, Scientific Animal Food and Engineering, France). Les cages contiennent au maximum 5 souris et sont enrichies en coton et rouleaux.

E. Modulation pharmacologique par Atorvastatine

Le traitement est administré *per os*, directement dans l'alimentation des rongeurs, afin d'éviter les traumatismes que pourraient engendrer un gavage dans le cadre d'un suivi à long terme. L'Atorvastatine est utilisée à la posologie de 5mg/kg/j (Zhang et al., 2013). Pour cela, un comprimé d'atorvastatine de 10mg (Tahor[®] 10mg en comprimé, Pfizer, France) a été dissout dans un liquide véhicule (pour 5L de liquide véhicule : 2,5g de Carboxy-méthyl cellulose (Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri), 1 mL de Tween 20 (Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri) et eau distillée q.s.p. 5 litres). La solution est ensuite incorporée dans 300g de poudre alimentaire pour souris (Aliments composés complets pour animaux A04, Scientific Animal Food and Engineering, France). L'administration du traitement par atorvastatine débute immédiatement après la chirurgie.

II. Protocoles expérimentaux

A. Constitution des groupes

Pour cette étude, les animaux WT littermate (WT) et transgéniques (APP) sont répartis de façon aléatoire dans différents groupes : les groupes sham, les groupes avec microhémorragie corticale (MHC) et les groupes avec microhémorragie et traitement par atorvastatine (MHC+AT). Ainsi, 6 groupes sont constitués : WT sham, WT+MHC, WT+MHC+AT, APP sham, APP+MHC, et APP+MHC+AT. Les animaux sont opérés entre 10 et 12 semaines de vie. Une IRM cérébrale est réalisée 24 heures après la chirurgie pour observer la présence, la taille et la localisation de la lésion et constitue un critère d'inclusion ou d'exclusion des

souris. Un nombre souhaité de 10 à 12 souris par groupe a été déterminé pour répondre à nos objectifs et pour respecter les règles de l'éthique animale (Décret no 2013-118 du 1^{er} février 2013 relatif à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques, 2013).

B. Caractérisation fonctionnelle du modèle de microhémorragie chez la souris WT

Une cohorte de souris a servi à l'étude fonctionnelle à 6 semaines post-chirurgie. Les souris ont été soumises à une évaluation par des tests d'actimétrie, du labyrinthe en croix surélevée, d'alternance spontanée, du labyrinthe de Barnes et au test d'object-location paired-associate learning (PAL), touchscreen.

C. Etude de l'effet neurocomportemental de la MHC au cours du temps : suivi longitudinal

Une cohorte de souris WT et APP a été constituée au fur et à mesure des portées obtenues. Après chirurgie, ces souris ont été suivies sur une période de 12 mois comportant plusieurs temps d'évaluation neurocomportementale (1,5 mois, 3 mois, 6 mois, 9 mois et 12 mois post-chirurgie). A chacun de ces temps, les animaux ont été soumis à une batterie de tests comprenant des tests non cognitifs (actimétrie, labyrinthe en croix surélevée) et cognitifs (labyrinthe de Barnes) (figure 11).

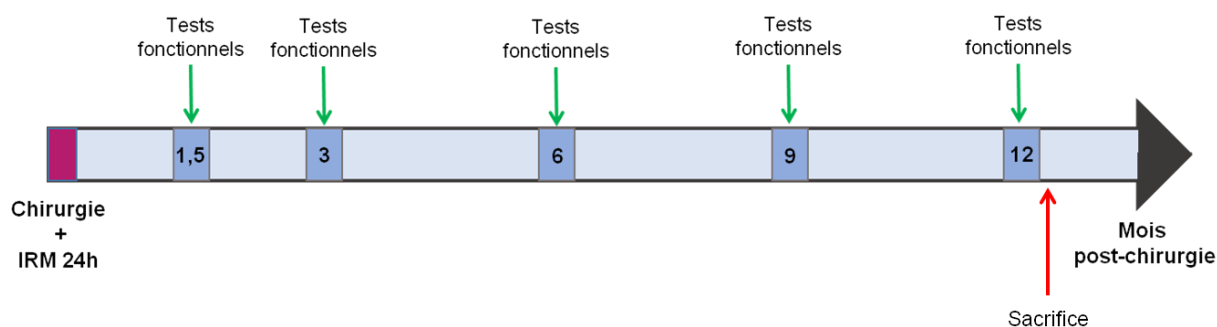


Figure 11: Protocole de suivi longitudinal sur 12 mois post-chirurgie

D. Etude de l'effet neurocomportemental de la MHC à court terme chez la souris APP

Une cohorte de souris APP a été constituée pour l'exploration fonctionnelle par le test du dPAL (Touchscreen), d'une durée de 2,5 à 3 mois à partir de 6 semaines post-chirurgie. Ces souris ont également été soumises à une batterie de tests comprenant des tests non cognitifs (actimétrie, labyrinthe en croix surélevée) et cognitifs (alternance spontanée). Le protocole de suivi est représenté à la figure 12.

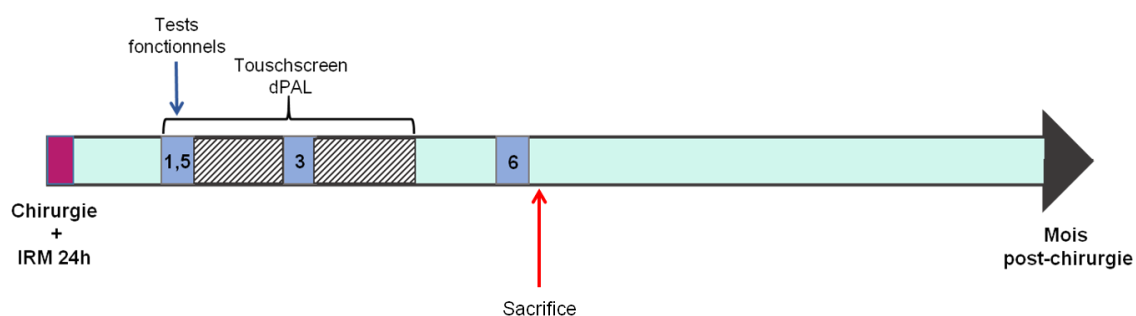


Figure 12: Protocole de suivi à court terme chez la souris APP

E. Etude morphologique par imagerie et immunohistochimique

En fin de protocole (à 1.5, 6 et 12 mois), avant le sacrifice, les animaux sont évalués en IRM et en TEP pour rechercher d'éventuelles modifications morphologiques (volumétrie de différentes structures cérébrales, évolution de la lésion) et métaboliques (métabolisme des régions cérébrales d'intérêt). Puis, les animaux sont sacrifiés et les cerveaux ainsi que des échantillons plasmatiques sont prélevés pour analyses immunohistochimiques et dosage du cholestérol (figure 13). Les souris WT et APP du suivi longitudinal ont été utilisées, dans un souci de raffinement, pour obtenir les données d'imagerie et les tissus à 12 mois post-chirurgie. De même, pour le temps 6 mois, les souris APP sont issues de la cohorte utilisée pour l'étude de l'effet neurocomportemental à court terme de la MHC, complétée par des souris WT. Enfin, pour les données d'imagerie et le prélèvement des tissus à 1,5 mois post-chirurgie, des souris WT et APP ont été opérées dans cet objectif.

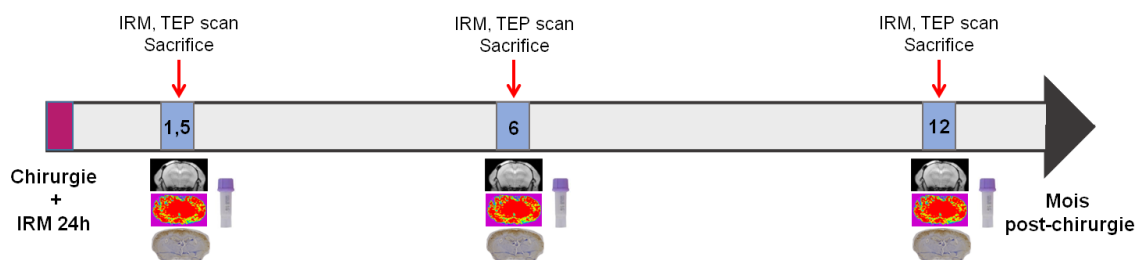


Figure 13: Protocole de l'étude morphométrique et immunohistochimique

III. Chirurgie et induction de la lésion microhémorragique au niveau cortical (MHC)

La chirurgie stéréotaxique est réalisée entre 10 et 12 semaines de vie (poids moyen des souris mâles entre 20 et 25 g). Les souris sont anesthésiées avec de l'isoflurane (induction à 3%, entretien de 2 à 2,5%). Pendant l'opération, l'anesthésie pouvant diminuer la température corporelle, la souris est placée sur une couverture chauffante, et la température est contrôlée par un thermomètre rectal afin d'être maintenue entre 36°C et 36,5°C. La souris est positionnée dans le cadre stéréotaxique (Knopf Instruments, Tujunga, CA, USA), maintenue par des barres d'oreilles et de gueule. Une incision sagittale médiane du scalp de la souris est ensuite effectuée afin de dégager le bregma, qui est mis en évidence grâce à l'application d'eau oxygénée. Puis, à l'aide d'une fraiseuse, une brèche arrondie de 1mm environ est réalisée, contrôlée sous microscope binoculaire. Les coordonnées stéréotaxiques retenues pour réaliser la brèche sont : - 1 mm en antéropostérieur (AP), - 2 mm en médiolatéral (ML), et -1 mm en dorsoventral (DV), le zéro étant l'entrée de l'aiguille dans le parenchyme cérébral (figure 14). L'injection se fait à l'aide d'une micro aiguille (Silica micro-needle, Phymep, Reno, NV, Etats-Unis) adaptée sur une seringue Hamilton (Phymep, Reno, NV, Etats-Unis) et introduite très lentement dans le cortex pour éviter tout traumatisme. Le débit lors de l'injection est contrôlé par un pousse seringue électrique (Micro 4® Microsyringe Pump Controller – World precisions instruments, Sarasota, Florida). L'induction de la MHC se fait par injection de 1 μ L de collagénase bactérienne de type IV (COL C2399, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). La collagénase est une enzyme intra cellulaire protéolytique qui catalyse l'hydrolyse du collagène, constituant essentiel de la lame basale de la barrière hémato-encéphalique (Rosenberg et al. 1992). La collagénase est injectée pendant 5 minutes à une vitesse de 200 nL/min. L'aiguille reste encore en place pendant 5 min puis est retirée très lentement à 0,5 mm/min. Un reflux éventuel lors du retrait de l'aiguille est tamponné. Le

scalp est ensuite suturé et la souris est placée sous une lampe chauffante jusqu'à son réveil. Le groupe témoin est soumis à la même procédure avec une injection d'1 μL de sérum physiologique (NaCl 0,9%).

Dans le cadre initial du développement d'un nouveau modèle expérimental de microlésion hémorragique corticale chez la souris, la collagénase a été testée à différentes concentrations (0,2 $\mu\text{UI}/\mu\text{L}$, 0,8 $\mu\text{UI}/\mu\text{L}$, et 2 $\mu\text{UI}/\mu\text{L}$). Cet effet-dose, validé au cours du master 2 de Yao Chen, a conduit à retenir pour la caractérisation fonctionnelle du modèle de MHC, une concentration de 0,8 $\mu\text{UI}/\mu\text{L}$, réalisée à 1mm de profondeur dans le cortex, afin d'induire une lésion hémorragique de petite taille (Bergeron S. & Chen Y. et al. 2018).

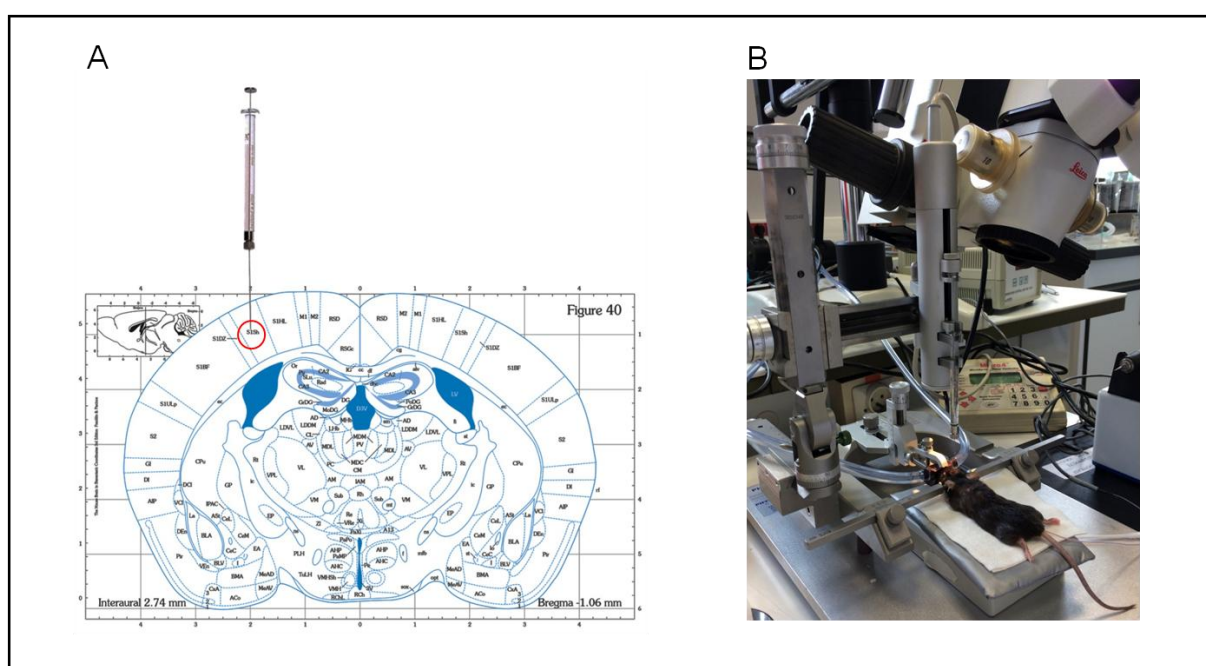


Figure 14: Description de la chirurgie stéréotaxique.

A : Représentation de l'endroit de l'injection sur une coupe de l'atlas de Paxinos et Franklin ; B : photo du placement de la souris dans le cadre stéréotaxique lors de la chirurgie.

IV. Imagerie par résonance magnétique (IRM)

Une Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) est réalisée 24h après la chirurgie pour caractériser la lésion en phase aiguë, ainsi qu'aux différents temps intermédiaires lors du suivi pour préciser l'évolution de la lésion induite et estimer la volumétrie des cortex et des hippocampes gauches et droits. Les images ont été obtenues sur une IRM 7 Teslas (Bruker, Biospec, Ettlingen Germany). Pour les acquisitions cérébrales, deux types d'antennes sont

utilisées, une antenne émettrice cylindrique de 72 mm de diamètre interne et une antenne de surface placée sur le scalp de l'animal pour la réception du signal.

A. Préparation de l'animal

Avant l'installation de l'animal dans l'IRM, ce dernier est anesthésié dans une boîte d'induction par inhalation continue de 3% d'isoflurane à un débit de 1 ml d'air par minute. L'animal est ensuite placé dans le berceau où il est maintenu sous anesthésie durant la totalité de l'acquisition par inhalation d'isoflurane à 1-1,5%. Durant l'acquisition, la saturation en oxygène et la fréquence respiratoire sont surveillées grâce à un capteur positionné sur la patte arrière de l'animal et à un capteur de pression positionné sous l'abdomen de l'animal respectivement. Le maintien de la température corporelle est assuré par une couverture chauffante sur le dos de l'animal.

B. Acquisition des images 24h après la chirurgie

Le délai de 24h après la chirurgie pour l'acquisition d'IRM a été déterminé après plusieurs essais réalisés à 3h, 6h, 18h, 24h, 48h, et 72h de la chirurgie. La lésion est encore nettement visible à 24h, ce qui permet à la fois une analyse satisfaisante des images et également un bon compromis pour l'organisation pratique des expérimentations.

Une séquence en écho de spin pondérée T2 de type TurboRARE (Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement) est réalisée systématiquement dans le plan coronal afin de visualiser l'œdème et le site d'injection. Les paramètres d'acquisition sont les suivants : Temps de Répétition (TR) / Temps d'Echo(TE) = 5000/33 ms. Le champ de vue (FOV : Field Of View) est un carré de 2 cm de côté, codé par une matrice carré de 256, la résolution spatiale dans le plan est de 78 μm , nombre d'excitation (Nex) = 2, le temps d'acquisition pour cette acquisition est de 5,20 minutes.

Une séquence en écho de gradient de type MGE (Multi-Gradient Echo) est réalisée pour révéler la présence d'hémosidérine et la localisation de la lésion hémorragique. Les paramètres d'acquisitions sont les suivants : (TR/TEs; 1500/4; 9; 14; 19; 24; 29; 34; 39; 43; 48; 53 et 58 ms ; Nex = 2) Le temps d'acquisition de cette séquence est de 9,36 minutes. Les paramètres de géométrie sont identiques à ceux de l'acquisition TurboRARE T2. Pour toutes

les séquences, des coupes coronales d'une épaisseur de 0,5 mm sont réalisées. La présence ou non de la MHC est évaluée sur la séquence T2*. Le critère d'inclusion pour les groupes MHC et MHC + AT est la présence d'une MHC à l'endroit du point d'injection de la collagénase. A l'inverse, le critère d'inclusion pour les groupes Sham est l'absence de MHC au niveau de la zone d'injection du sérum physiologique (figure 15).

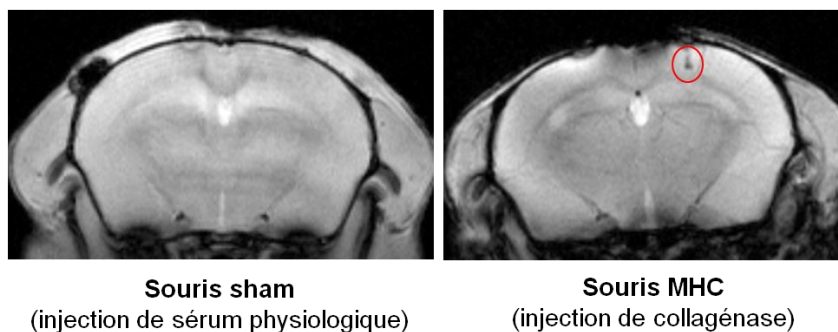


Figure 15: Coupes coronales de cerveaux de souris à 24h post-chirurgie en IRM séquence T2*.
A gauche : exemple de Sham sans lésion ; à droite : exemple de lésion microhémorragique indiquée par un cercle rouge.

C. Acquisition des images de fin de suivi à 1,5 mois, 6 mois et 12 mois

A chaque temps d'évaluation du suivi morphométrique, une séquence 3D TurboRARE T2 est réalisée afin de calculer les volumes des structures cérébrales. Les paramètres d'acquisition de la séquences sont les suivants : TR/TE: 2500/48 ms; une FOV cubique de 1,4 cm de côté, codée par une matrice de 112 afin d'obtenir une résolution isotropique de 125 μ m. La séquence MGE, identique à celle réalisé à 24h est réalisée afin de visualiser une éventuelle hémorragie résiduelle. Un ingénieur spécialiste de l'imagerie a procédé au post-traitement de toutes les images en aveugle. Tout d'abord, un prétraitement est effectué sur les images. Un filtre basé sur la méthode des moyennes non locales est appliqué (Coupe et al. 2008). L'inhomogénéité des images débruitées est alors lissée avec l'algorithme N4ITK (Tustison et al. 2011). Le cerveau est ensuite extrait des images T2 et segmenté avec la méthode de fusion de label à partir de multi-atlas (Ma et al. 2014). Le volume de chaque région d'intérêt (Cortex ipsi et controlatéral à la lésion; hippocampe ipsi et controlatéral à la lésion) est ensuite calculé de manière automatique (Figure 16).

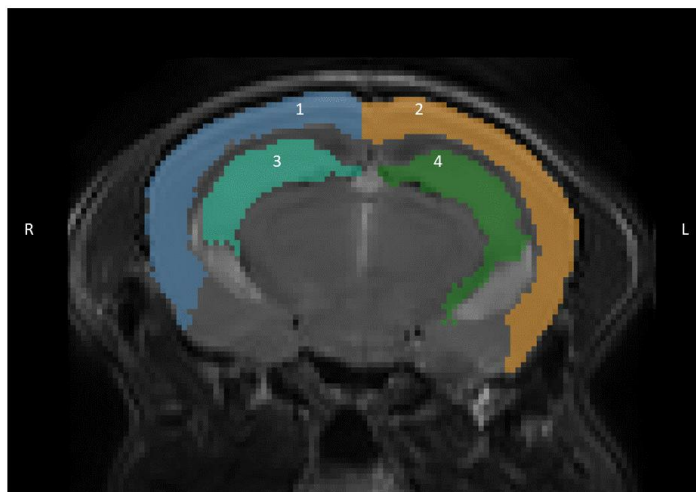


Figure 16: Exemple de délimitation des zones d'intérêt sur une coupe coronale en 3D T2.

1 : cortex droit controlatéral à la lésion; 2 : cortex gauche ipsilatéral; 3 : hippocampe droit controlatéral; 4: hippocampe gauche ipsilatéral.

V. Tomodensitométrie par émission de positons (TEP)

A. Acquisition des images à 1,5 mois, 6 mois et 12 mois lors du suivi cinétique

Dans le cadre du suivi à 1,5 mois, 6 mois et 12 mois après la chirurgie, une tomodensitométrie par émission de positons (TEP) (Siemens, Inveon) a été réalisée. L'évaluation du métabolisme cérébral in vivo est réalisée avec le fluorodésoxyglucose. Ce radiotracer est l'analogue radiomarqué du glucose et s'accumule dans les cellules de façon proportionnelle à leur activité glycolytique. Il a déjà été utilisé dans les modèles animaux pour caractériser l'évolution des lésions vasculaires en phase aigüe (Lee et al. 2011). Cependant, aucune donnée n'existe sur l'évolution en TEP, à long terme, des lésions vasculaires de petite taille. L'administration du radiotracer chez les souris est faite par voie intrapéritonéale, en situation consciente. La dose injectée varie entre 13 MBq et 15 MBq pour un volume injecté de 300 µl (IBA-CisBio, Saclay, France). Un scanner rayon X est tout d'abord réalisé 50 minutes après l'injection. A la fin du scanner, la souris est automatiquement déplacée dans le champ de vue TEP, pour y débiter l'acquisition, soit 60 minutes après l'injection du FDG. La durée de biodistribution du FDG est de 60 min, ce qui permet d'atteindre l'équilibre entre les compartiments plasmatique et cellulaire. Pendant les 15 min d'acquisition des images, les

souris sont maintenues sous anesthésie par isoflurane. Elles sont placées sous lampe chauffante et la respiration est contrôlée régulièrement de façon visuelle.

Lors de la reconstruction, l'acquisition TEP de 15 minutes a été divisée en trois frames de 5 minutes afin de vérifier que la tête de l'animal n'avait pas bougé au cours de l'acquisition. Les trois volumes obtenus ont été reconstruits avec l'algorithme 3D OSEM / SP-MAP (Ordered Subset Expectation Maximization / Shifted Poisson Maximum A Priori), en utilisant 2 itérations et 16 sous-ensembles pour l'algorithme OSEM et 18 itérations pour l'algorithme SP-MAP (Lasnon et al. 2015). Des corrections d'atténuation (à partir des images CT) et des rayonnements diffusés ont été également effectuées sur les images.

B. Post traitement des images

Le post traitement des images de TEP/CT a été réalisé en aveugle. Avant le recalage TEP/CT, plusieurs prétraitements sont nécessaires : les trois volumes TEP acquis par souris sont moyennés et une correction de l'intensité est appliquée sur l'image CT. Par suite, un recalage rigide est réalisé sous SPM8 (Wellcome Department of Cognitive Neurology, London, UK; <http://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm/>). Un sous-volume comprenant uniquement la tête a ensuite été extrait des images TEP et CT. Afin d'extraire le cerveau, l'image CT est recalée sur un modèle CT à l'aide de la commande antsRegistration (Advanced Normalization Tools package, ANTs). La transformation qui en découle est alors appliquée à l'image TEP. L'image TEP du cerveau de chaque souris est ensuite recalée sur son propre IRM à l'aide d'ANTs. Par suite, l'image TEP est convertie en SUV. ($SUV = \text{fixation [MBq/mL]} \times \text{poids [g]} / \text{dose injectée [Mbq]}$). Pour éviter les biais induits par une possible différence de radioactivité initialement injectée, la radioactivité de chaque région est rapportée à celle du cerveau entier considérée en tant que région de référence (Figure 17).

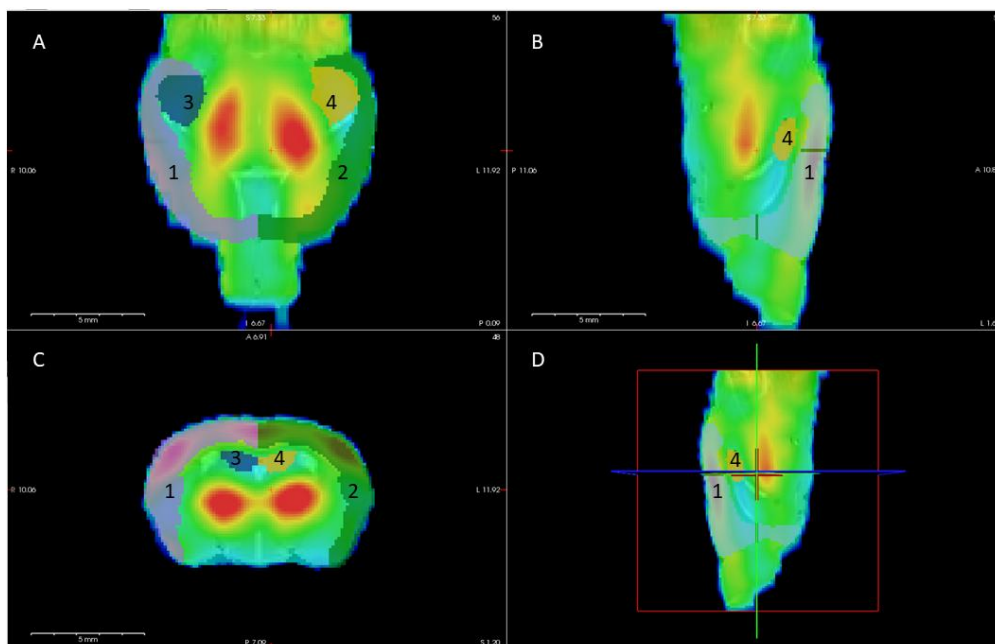


Figure 17: Visualisation des zones d'intérêt sur les images TEP.

Calcul de la radioactivité prise au sein de chaque zone d'intérêt lors du post traitement des images en TEP (les images IRM étant en superposition à l'arrière-plan). A : Vue en coronal, B : Vue en sagittal, C : Vue en axial, D : Vue dans les 3 plans. 1 : Cortex droit, 2 : Cortex gauche, 3 : Hippocampe droit, 4 : Hippocampe gauche.

VI. Tests neurocomportementaux

Une semaine avant chaque série de tests neurocomportementaux, les souris sont transférées et stabulées au sein de la plateforme d'exploration fonctionnelle (SFR, DN2M, Univ Lille), en armoire ventilée (éclairée de 8h à 20h, température contrôlée entre 19 et 24°C et humidité comprise entre 45 et 65%) et manipulées quotidiennement par l'expérimentateur afin de les y habituer. Les cages sont placées dans la pièce de test au moins 30 min avant chaque test. Pour la batterie réalisée lors du suivi longitudinal, les tests sont effectués sur deux semaines selon un ordre croissant de sollicitation mnésique et de stress induit pour la souris.

A. Actimétrie : évaluation de l'activité locomotrice spontanée

L'activité locomotrice spontanée des animaux est mesurée dans un open field au moyen d'un actimètre infrarouge (Bioseb, USA). Le système se compose d'une arène dont le fond est en plastique noir (45x45 cm) et les 4 parois en plexiglas transparent (34 cm de hauteur). Deux cadres comprenant 32 cellules infrarouges chacun entourent le système et permettent la

détection des mouvements horizontaux et verticaux. L'ensemble des déplacements est enregistré et analysé sur une période de 10 min grâce au logiciel d'acquisition Actitrack (Bioseb, USA). L'enregistrement démarre lorsque l'animal est déposé au centre de l'arène qu'il peut alors explorer librement. L'arène est nettoyée à l'éthanol 70% entre chaque souris. Le paramètre utilisé pour l'évaluation de l'activité locomotrice est la distance parcourue (cm).

B. Le labyrinthe en croix surélevé : évaluation du niveau d'anxiété

Ce test est couramment utilisé pour évaluer le comportement anxieux chez les rongeurs. Il représente le conflit de l'animal entre sa préférence pour les espaces « protégés » et sa motivation innée à explorer un nouvel environnement (Walf and Frye 2007). Plus l'animal est anxieux, plus il a tendance à rester dans les bras fermés. Le dispositif comporte quatre bras (36,5 x 6 cm) : deux bras ouverts et deux bras fermés par des parois en plastique noir (hauteur : 14,5 cm). Les bras de même type sont situés l'un en face de l'autre, formant une croix surélevée de 50 cm par rapport au sol. L'illumination du maze est comprise entre 30 et 40 Lux pour les bras ouverts et environ 10 à 20 Lux dans les bras fermés. L'animal est placé au centre du dispositif, toujours face au même bras ouvert. Il peut explorer librement les bras pendant 10 min. Un système de video tracking (caméra connectée à un ordinateur équipé du logiciel Ethovision XT 7.0, Noldus, Wageningen, Pays Bas) permet de suivre et d'analyser les déplacements de l'animal au cours de l'expérimentation. L'enregistrement démarre dès qu'un mouvement de l'animal est détecté. L'expérimentateur se place hors de la vue de l'animal et limite le plus possible le bruit et les mouvements. Après 10 min l'animal est remis dans sa cage et le dispositif est nettoyé à l'éthanol 70%. Le paramètre retenu pour évaluer le niveau d'anxiété des différents groupes de souris est le pourcentage de temps passé dans les bras ouverts.

C. Labyrinthe en Y : test d'alternance spontanée pour l'évaluation de la mémoire de travail

Le dispositif est constitué de trois bras identiques en plastique blanc (longueur : 30 cm, largeur : 8 cm, hauteur : 15,3 cm) positionnés à 120° les uns des autres et nommés bras A, B et C (figure 18 A). Le labyrinthe est toujours disposé de la même manière dans la pièce avec une intensité lumineuse d'environ 60 Lux. La souris est déposée au centre du labyrinthe et

peut explorer librement les 3 bras pendant 8 min. L'enregistrement démarre lorsque l'animal est détecté. Les déplacements sont traqués et enregistrés grâce au logiciel Ethovision XT 11.5. L'expérimentateur, hors de la vue de l'animal limite le bruit et les mouvements. Entre chaque souris, les parois du dispositif sont nettoyées à l'éthanol 70%. Utilisé dans ces conditions expérimentales, le labyrinthe en Y permet de réaliser le test d'alternance spontanée afin d'évaluer la mémoire de travail des animaux (Holcomb et al., 1999; Wolf et al., 2016). Pour cela, le nombre et la séquence des entrées dans les différents bras sont relevés. L'entrée dans un bras est prise en compte lorsque les 4 pattes de l'animal s'y trouvent. Une alternance correspond à l'entrée successive dans 3 bras différents, par exemple ABC, BAC, CBA... (figure 18 B). Des triplets tels qu'ABA, BCB... ne sont pas considérés comme des alternances (figure 18 C).

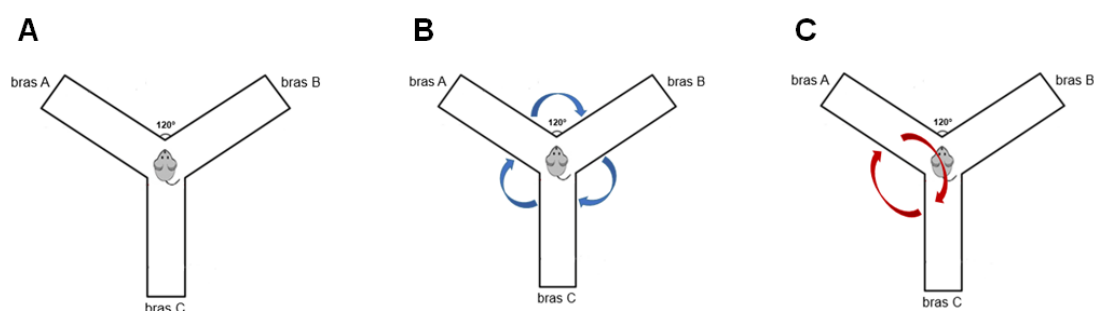


Figure 18: Représentation du labyrinthe en Y utilisé pour le test d'alternance spontanée.

La souris est placée au centre du dispositif (A) et peut explorer librement les 3 bras pendant 8 minutes. Les triplets comprenant 3 bras différents correspondent à une alternance (B) contrairement aux triplets comprenant au moins deux bras identiques (C).

Le pourcentage d'alternance est défini par la relation suivante : $[(\text{nombre total d'alternances}) / (\text{nombre total d'entrées}-2)] \times 100$. L'analyse est effectuée sur les 8 minutes d'expérimentation. Les souris ayant fait moins de 13 entrées au cours de cette période sont exclues de l'analyse (Wolf et al. 2016). Les paramètres utilisés pour ce test sont le pourcentage d'alternance et le nombre total d'entrées dans les bras.

D. Le labyrinthe de Barnes : évaluation de la mémoire de référence spatiale

Ce test permet d'étudier l'apprentissage et la mémoire de référence spatiale des animaux (Sunyer et al., 2007). La mémoire de référence est une mémoire à plus long terme que la précédente grâce à un apprentissage nécessitant un entraînement de plusieurs jours. Cette

mémoire suppose des associations complexes avec des paramètres qui restent constants lors de l'expérimentation. Ici, il s'agit d'indices spatiaux disposés sur les murs (figure 19).



Figure 19: Labyrinthe de Barnes et repères spatiaux.

Le dispositif est une plateforme circulaire en PVC blanc de 122 cm de diamètre et située à 1,40 m du sol. Elle présente, en périphérie, 40 trous de 5 cm de diamètre disposés à 4 cm du bord avec un intervalle régulier de 9°. Différents indices spatiaux sont disposés sur les murs de la pièce et restent à la même position pendant toute la durée de l'expérimentation. Ils constituent des repères permettant à la souris de s'orienter pour trouver une boîte d'échappement en PVC noire (22,9 x 5,3 x 8,6 cm) qui peut se fixer sous n'importe quel trou du labyrinthe. Dans la procédure mise en œuvre, un stimulus aversif, une lumière blanche intense (environ 800 Lux), est utilisé pour motiver l'animal à trouver la boîte d'échappement. Une caméra reliée à un ordinateur permet l'enregistrement des déplacements de l'animal au cours de l'expérimentation puis le logiciel de tracking Ethovision XT 11.5 permet l'analyse de ces déplacements. L'expérimentation se déroule sur 5 jours. Les 4 premiers jours permettent un apprentissage et comprennent une phase d'habituation (à J1) et d'acquisition spatiale.

1. Phase d'habituation et d'acquisition

Le jour 1, une étape d'habituation avant les 4 essais est nécessaire : l'animal est placé au centre de la plateforme dans un cylindre gris opaque pendant 10 secondes de façon à ne voir aucun repère et à être désorienté. Le cylindre est alors retiré et l'animal est guidé vers la boîte d'échappement par l'expérimentateur et doucement positionné de façon à y rentrer. Il est laissé ainsi dans la cachette pendant 2 min. Lors de la phase d'acquisition, chaque souris réalise 4 essais par jour pendant 4 jours en respectant un intervalle minimum de 15 minutes entre deux essais pour chaque souris. Pour chaque essai, une fois que le cylindre est retiré,

l'expérimentateur sort du champ de vision de l'animal et le laisse explorer la plateforme durant 3 minutes au maximum afin de trouver la boîte d'échappement. Une fois à l'intérieur, la souris y est laissée pendant 1 min. Si au bout des 3 min la souris n'a pas trouvé la cachette, l'expérimentateur l'y dépose et l'y laisse 1 min. L'animal est ensuite remis dans sa cage en attendant l'essai suivant. Entre chaque essai, la plateforme ainsi que la cachette sont nettoyées à l'éthanol 70 % pour éliminer les indices olfactifs. Chaque animal se voit attribuer de façon aléatoire un trou cible. C'est le trou sous lequel se trouve la boîte d'échappement. Il reste identique tout au long de l'expérimentation et n'est changé qu'à chaque nouvelle série de tests aux différents temps d'évaluation de l'étude. Les paramètres utilisés pour l'analyse lors de la phase d'acquisition spatiale sont les latences primaire (temps écoulé avant la 1^{ère} rencontre de l'animal avec le trou cible) et totale (temps écoulé avant que l'animal rentre dans la cachette) ainsi que les erreurs (trous visités en dehors du trou cible) primaire et totale. Ces paramètres sont sensés diminuer au fil des jours et reflètent l'apprentissage de l'animal.

2. Test de rétention

Le cinquième jour, 24h après le dernier essai, a lieu le test de rétention qui permet d'évaluer si l'animal a mémorisé la localisation du trou cible grâce aux repères spatiaux. Pour le test, le labyrinthe est tourné de 45° afin de limiter l'utilisation d'éventuels repères internes (traces d'usure, aspérités...) et la boîte d'échappement est retirée. L'animal est placé pendant 10 secondes dans le cylindre au centre de la plateforme puis il peut explorer librement le labyrinthe pendant 90 secondes. Une caméra connectée à un ordinateur équipé du logiciel Ethovision XT 11.5 (Noldus, Wageningen, Pays Bas) permet le tracking et l'analyse des déplacements de l'animal pendant l'enregistrement. La plateforme est nettoyée entre chaque test avec de l'éthanol à 70%. La latence primaire est également prise en compte le jour du test.

La mémoire de référence spatiale est évaluée à l'aide du pourcentage de temps passé dans le quadrant cible. En effet, l'animal est sensé passer plus de temps à chercher la cachette aux alentours du trou renforcé et donc dans la zone cible. Les quadrants permettant l'analyse sont définis et représentés dans la figure 20.

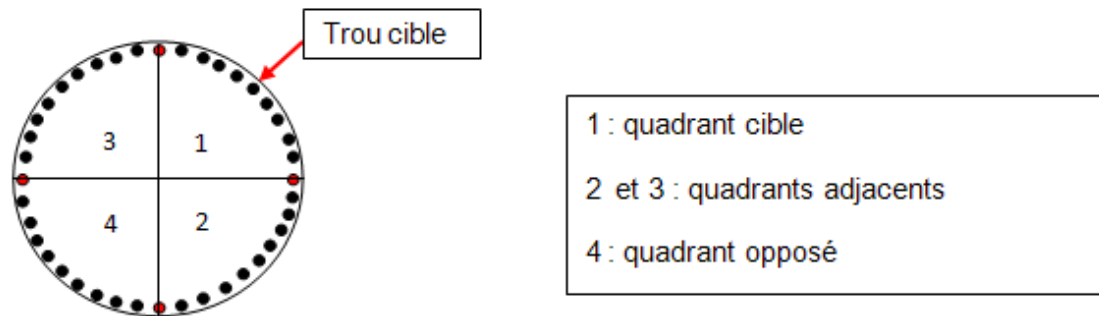


Figure 20: Représentation schématique du test du labyrinthe de Barnes.

Le trou cible est le trou sous lequel se trouvait la cachette au cours de la phase d'acquisition. Le quadrant cible est le quadrant centré sur le trou cible.

E. Touchscreen®, système automatisé : Paired-associate learning (PAL) task pour l'évaluation de la mémoire visuo-spatiale

La mémoire visuo-spatiale a été évaluée grâce à un système automatisé de tests neurocomportementaux sur écrans tactiles. La capacité des souris à former une association entre deux stimuli (un stimulus visuel et une localisation spatiale sur l'écran) est testée grâce à l'object-location paired-associate learning task. Lors de la phase d'acquisition du PAL, il s'agit pour l'animal d'apprendre trois associations objet/localisation distinctes. L'apprentissage se fait à l'aide d'un renforcement positif avec une récompense alimentaire (lait chocolaté) en cas de bonne réponse et aussi d'un renforcement négatif (éclairage de forte intensité) en cas de mauvaise réponse. L'appétence des souris pour une boisson sucrée est vérifiée au préalable grâce à un test de préférence au sucrose réalisé sur 24 heures, en cage isolée présentant un choix entre 2 biberons, l'un contenant de l'eau et l'autre la solution de sucrose 1% (Strekalova et al., 2004). Pour s'assurer d'une motivation suffisante, les animaux sont soumis à une restriction alimentaire durant toute l'expérimentation avec pour objectif 85% du poids initial pour les souris WT. En raison d'une fragilité et d'une mortalité plus importante chez les souris transgéniques, la restriction alimentaire est moins sévère et vise environ 95% du poids initial. La restriction alimentaire est instaurée progressivement la semaine précédant le début de l'expérimentation avec une pesée quotidienne des animaux pour atteindre l'objectif de poids et pour contrôler le poids des souris tout au long de l'expérimentation.

Le dispositif comprend deux fois quatre compartiments (figure 21 A) équipés d'une isolation phonique et de systèmes de ventilation. Chaque compartiment abrite une chambre

opérante (Campden Instruments Ltd., UK), un système permettant de délivrer la récompense, une lampe, un haut-parleur et une caméra située au-dessus de la chambre opérante afin d'observer et enregistrer le comportement de l'animal (figure 21 B). Comme décrite par Horner et al en 2013, chaque chambre opérante est constituée d'un écran tactile devant lequel est positionné un masque en plastique noir définissant les trois fenêtres de réponse (Horner et al. 2013). Trois autres parois en plastique noir forment l'arène trapézoïdale qui peut être fermée par un couvercle transparent. Le compartiment de récompense, accolé à la face opposée à l'écran, est relié par une tubulure à un réservoir contenant le lait chocolaté. Il est équipé de cellules infrarouges qui détectent la présence de la souris venant chercher la récompense. Le sol de l'arène est en acier inoxydable perforé. Les chambres opérantes sont connectées à un ordinateur d'acquisition muni du logiciel ABET II TOUCH (Campden Instruments Ltd., UK) permettant l'analyse des données.

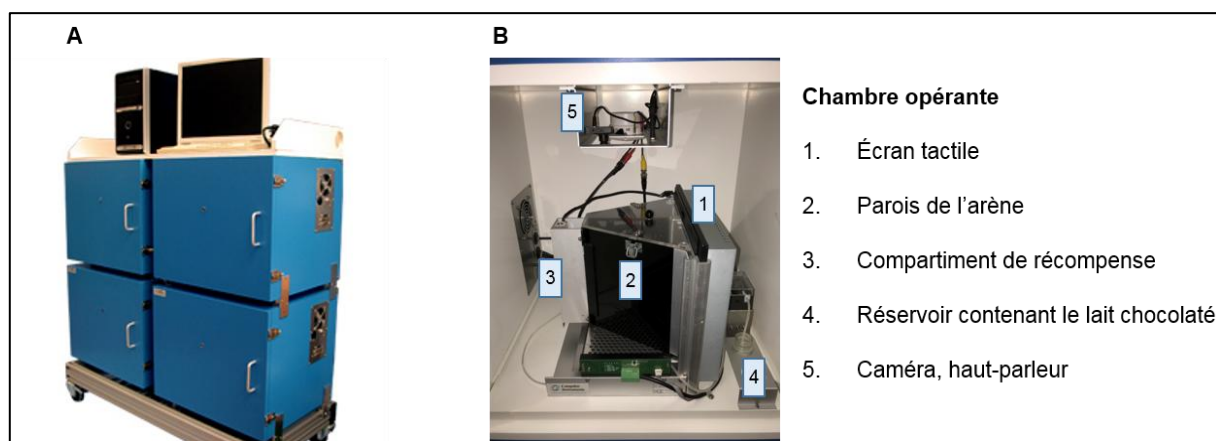
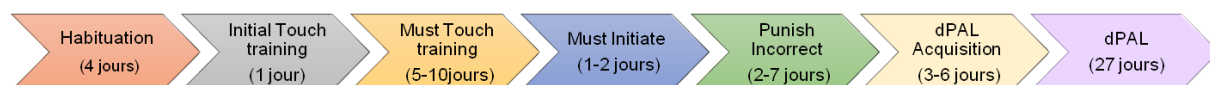


Figure 21: Chambres opérantes du système automatisé Touchscreen® utilisées pour le test dPAL. (A) quatre compartiments abritant chacun une chambre opérante. (B) différents constituants d'une chambre opérante.

Avant la phase d'acquisition du PAL, plusieurs étapes d'habituation et de conditionnement sont nécessaires (les durées des différentes étapes sont données à titre indicatif et peuvent varier selon les animaux):



Les étapes d'habituation et de conditionnement comprennent :

Habituation (4 jours) : le premier jour, la souris est laissée 10 min dans une chambre opérante de façon à explorer et s'habituer à ce nouvel environnement. Toutes les lumières sont éteintes, il n'y a aucun stimulus ni récompense. Les 3 jours suivants permettent d'associer l'éclairage du réservoir dans lequel est déversé le lait chocolaté (situé dans le compartiment de récompense), à l'émission d'un son (3 KHz). Le premier de ces trois jours, la session dure 20 minutes. Une première distribution de lait chocolaté (150 μ L) est amorcée avec éclairage du réservoir et émission du son. Lorsque la souris a pris la récompense et quitte le réservoir, la lumière s'éteint et un délai de 10 secondes est respecté avant qu'une nouvelle libération (7 μ L) se produise, accompagnée de l'éclairage du réservoir et du signal sonore. Ce cycle est répété jusqu'à la fin de la session. Les deuxième et troisième jours, la session se déroule de la même manière mais dure 40 minutes. Il s'agit de s'assurer que les récompenses sont bien prises par les souris, démontrant que le son et la récompense ont bien été associés pour pouvoir passer à l'étape suivante.

Initial touch training (1 jour) : Cette étape permet d'habituer l'animal à l'apparition d'un stimulus sur l'écran tactile (un carré blanc) et de l'encourager à toucher l'écran dans la fenêtre de réponse où le stimulus est apparu. La session dure au maximum 60 minutes au cours desquelles un carré blanc apparaît de façon aléatoire dans l'une des trois fenêtres de réponse (les deux autres restant sans image). Après un délai de 30 secondes, l'image disparaît et la récompense est délivrée, accompagnée de l'éclairage du réservoir et du signal sonore. Une fois que la souris a consommé le lait chocolaté, la lumière du réservoir s'éteint et un intervalle de 20 secondes est respecté avant que le stimulus n'apparaisse à nouveau. Si la souris touche l'écran au niveau du carré blanc, alors l'image disparaît et un volume de lait chocolaté 3 fois supérieur à la récompense habituelle est délivré immédiatement, accompagné du signal sonore. L'intervalle de 20 secondes débute après récupération de la récompense. Pour passer à l'étape suivante, la souris doit réaliser 36 essais en un temps maximum de 60 minutes.

Must touch training (5 à 10 jours) : Comme dans l'étape précédente, le stimulus visuel, un carré blanc, apparaît de façon aléatoire dans l'une des trois fenêtres de réponse. Pour obtenir la récompense, la souris doit toucher le carré blanc. Lorsqu'elle le touche, le réservoir s'allume, le signal sonore est émis et le lait chocolaté est délivré. L'intervalle de 20 secondes avant l'apparition d'un nouveau carré blanc débute quand la souris a récupéré la récompense.

Si l'animal touche l'écran dans l'une des fenêtres vides, aucune récompense n'est délivrée. Chaque session dure au maximum 60 minutes. Le critère à remplir pour passer à l'étape suivante est de réaliser 36 essais dans le temps imparti.

Must initiate (2 jours) : La session débute par la libération d'une récompense gratuite accompagnée de l'illumination du réservoir de récompense. Pour permettre l'apparition du stimulus (carré blanc) dans l'une des fenêtres de réponse, la souris doit d'abord aller récupérer le lait chocolaté dans le réservoir. Le stimulus visuel apparaît et l'essai se déroule comme dans l'étape précédente. Après l'intervalle de 20 secondes, le réservoir s'allume à nouveau et la souris doit y venir et ressortir pour initier l'essai suivant avec l'apparition d'un nouveau carré blanc. La souris doit effectuer 36 essais en une durée maximum de 60 minutes pour passer à l'étape suivante.

Punish incorrect (2 à 7 jours) : Au cours de cette étape, les essais se déroulent de la même manière que précédemment sauf en cas de réponse incorrecte, c'est-à-dire lorsque la souris touche l'écran au niveau des fenêtres de réponse vides. Alors, une punition sous forme d'une lumière intense dans la chambre opérante est déclenchée. Cette lumière reste allumée 5 secondes, la récompense n'est pas donnée, puis la chambre retrouve un éclairage normal et l'intervalle de 20 secondes avant l'essai suivant débute. Pour pouvoir passer à la phase d'acquisition du PAL, les animaux doivent réaliser 27 réponses correctes (toucher l'écran au niveau du stimulus visuel) sur les 36 essais à effectuer en 40 minutes (la durée maximale de la session est de 60 minutes). Ce score doit être atteint deux jours de suite.

Ces différentes étapes permettent de préparer l'animal à la phase de PAL proprement dite. Dans la version utilisée ici, lorsqu'une paire d'objets apparaît à l'écran, il s'agit de deux objets différents (dPAL) parmi les 3 possibles (fleur, araignée ou avion). Six paires différentes peuvent être présentées lors d'un essai. L'un des deux objets se trouve à son unique localisation correcte (+) et l'autre se trouve à une de ses deux localisations incorrectes (-) (figure 22). Les paires sont présentées de façon aléatoire mais une même paire n'apparaît pas plus de deux fois consécutives.

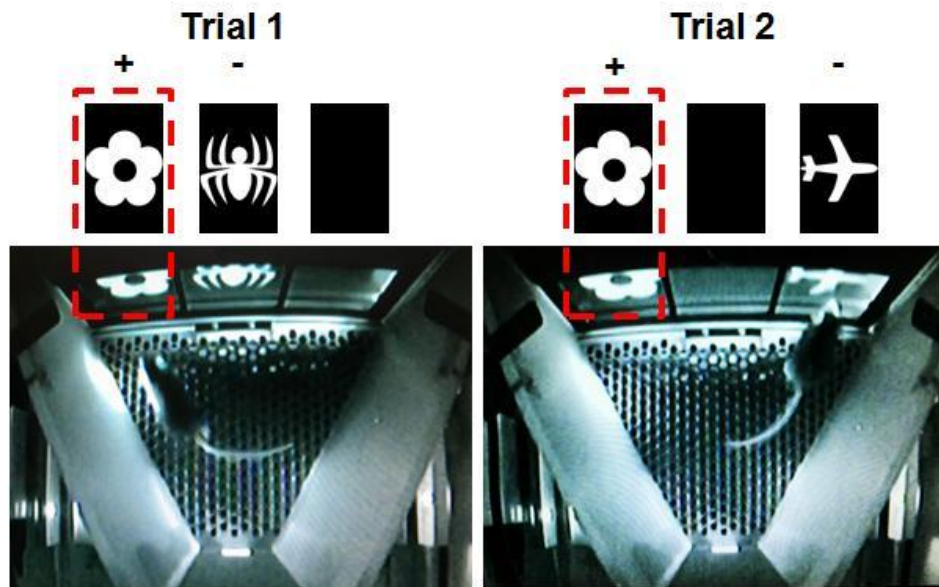


Figure 22: Illustration de l'intérieur d'une chambre opérante en cours de test dPAL.

La souris doit toucher l'écran sur l'objet qui se trouve à la localisation correct (+) pour obtenir une récompense. L'autre objet se trouve à une localisation incorrecte et aucune récompense n'est délivrée s'il est touché.

Le dPAL se déroule de la manière suivante :

dPAL acquisition (3 à 6 jours) : Pour initier le premier essai, c'est-à-dire la présentation de la première paire d'objets sur l'écran, la souris doit aller récupérer une récompense gratuite libérée dans le réservoir qui est allumé. Elle doit toucher l'objet qui se trouve à sa localisation correcte pour obtenir la récompense qui est accompagnée de l'illumination du réservoir et du signal sonore. Quand la souris a été chercher le lait chocolaté, le réservoir s'éteint et un intervalle de 20 secondes débute. Le réservoir de récompense se rallume et la souris doit initier l'essai suivant. Au cours de cette étape, les réponses incorrectes (coup sur une fenêtre de réponse vide ou sur l'objet à la localisation incorrecte) sont ignorées. Durant les sessions de 60 minutes au maximum, l'animal doit effectuer 36 essais.

dPAL (30 jours) : Les sessions se déroulent comme décrites à l'étape précédente mais les réponses incorrectes ne sont plus ignorées. En cas de réponse incorrecte, la récompense n'est pas délivrée et une lumière intense illumine la chambre opérante pendant une période d'arrêt de 5 secondes. Puis, la lumière s'éteint et un intervalle inter-essai débute. La souris a alors la possibilité de corriger son erreur grâce à des essais de correction au cours desquels la même paire d'objets, aux mêmes localisations, est présentée jusqu'à ce que la souris touche le stimulus correct (figure 23). L'animal doit réaliser 36 essais pendant une session de 60 min maximum. Dans ce protocole, 30 sessions sont effectuées (une session quotidienne).

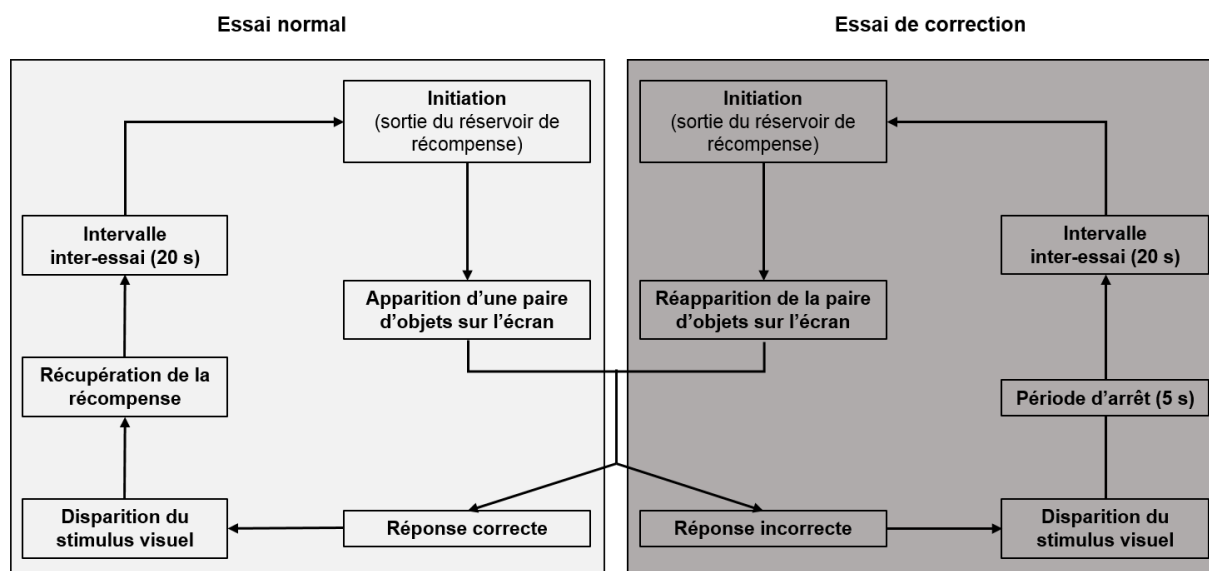


Figure 23: Diagramme représentant le déroulement d'un essai au cours du test dPAL. Adapté de Horner et al., 2013.

Pour la période de dPAL, au cours de chaque session, le nombre total d'essais convertis, le nombre de réponses correctes, le nombre d'essais de correction et le pourcentage de réponses correctes sont relevés. La mémoire visuo-spatiale des animaux est évaluée grâce au suivi du pourcentage de réponses correctes. Le nombre d'essais de correction n'est pas pris en compte dans le calcul de ce pourcentage. Etant donnée la variabilité que l'on peut rencontrer d'une session à l'autre pour un même animal, le pourcentage de réponses correctes est moyenné par bloc de 3 jours (3 sessions).

VII. Sacrifice et préparation des tissus

En fin de protocole, les animaux reçoivent une injection intrapéritonéale de pentobarbital (Doléthal[®], Vétquinol, France) à 150 mg/Kg. Les animaux sont ensuite perfusés par voie intracardiaque en positionnant un cathéter à l'apex du ventricule gauche et en incisant l'oreillette droite afin de laisser le sang s'écouler. La perfusion débute avec du sérum physiologique hépariné froid (environ 50 mL) jusqu'à ce que le sang soit remplacé par le sérum perfusé et que les organes, notamment le foie, soient décolorés. La perfusion est alors poursuivie avec 50 mL paraformaldéhyde (PFA) 4% (Diapath, Italie). Les cerveaux sont ensuite prélevés et placés une nuit en post-fixation dans un bain de PFA à 4°C. Les cerveaux sont ensuite déshydratés dans une solution de sucrose 30% (Sigma-Aldrich, France) pendant 24 heures pour permettre une cryoprotection. Enfin, ils sont plongés pendant 1 min dans de

l'isopentane maintenu à -40°C puis conservés à -80°C . Par la suite, des coupes de $20\ \mu\text{m}$ d'épaisseur sont réalisées à -20°C au cryostat (CM 3050 S, Leica, Allemagne) et recueillies sur lames (Superfrost plus[®], Thermo Fisher Scientific[®], Etats-Unis) en vue de marquages immunohistochimiques. Le niveau stéréotaxique de coupe a été choisi à partir des coordonnées stéréotaxiques d'injection lors de la chirurgie et permet d'encadrer la zone d'injection (bregma $-0,82\ \text{mm}$ à $-1,34\ \text{mm}$ selon l'atlas de Paxinos et Franklin, 2001) (figure 24).

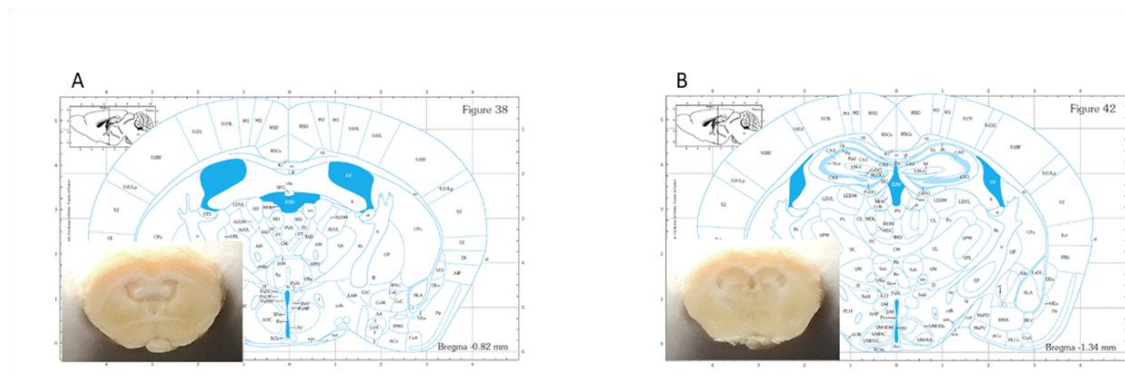


Figure 24: Localisation des coupes de cerveau d'après l'atlas de Paxinos et Franklin.

(A) premier niveau de coupe ($-0,82\ \text{mm}$) et (B) fin du niveau de coupe ($-1,34\ \text{mm}$) permettant d'encadrer la zone d'injection lors de la chirurgie stéréotaxique.

VIII. Marquages immunohistochimiques

A. Marquage des dépôts β amyloïdes

Les dépôts amyloïdes ont été marqués avec l'anticorps monoclonal murin 6E10 (Biolegend[®], San Diego, Californie) dirigé spécifiquement contre les résidus d'acides aminés 1 à 16 du peptide β amyloïde (Wright et al 2013, Saito et al, 2017). Les lames sont d'abord lavées 3 fois 10 minutes en PBS + triton (0,2%) afin de perméabiliser le tissu et faciliter la pénétration des anticorps. Les peroxydases endogènes sont ensuite inhibées grâce à un bain de 30 minutes en H_2O_2 0,3% (1/100) dans du PBS. Les lames sont à nouveau lavées 3 fois 10 minutes dans des bains de PBS + triton. Un traitement de 3 minutes à l'acide formique 80% est effectué, suivi de 6 lavages rapides à l'eau distillée. Un dernier bain de PBS est réalisé avant le détournage des lames qui consiste à appliquer une barrière hydrophobe avec un PAP pen (ImmEdge[®], Vector, Etats-Unis). Une étape de blocage des sites d'interactions non spécifiques est réalisée par incubation des lames dans du sérum de chèvre (S-1000, Vector,

Etats-unis) dilué au 1/100^{ème} dans du PBS + triton 0,2% pendant 1 heure à température ambiante. L'excès de solution de saturation est ensuite retiré et l'anticorps primaire 6E10 dilué au 1/1000^{ème} est déposé pour une durée de 12 heures, à 4°C. Les lames sont alors rincées 3 fois au PBS + triton (0,2%) et incubées avec un complexe avidine/peroxydase (kit ABC Vectastain[®], Vector, Etats-Unis) pendant 2 heures à température ambiante. Après rinçage des lames, l'activité enzymatique peroxydase permet, en présence d'H₂O₂, de transformer la diaminobenzidine (DAB) en un précipité brun. L'incubation en présence de DAB dure 4 min. Puis, les lames sont déshydratées par passages successifs dans des bains d'alcool de titre croissant et le marquage est fixé par deux bains de Neo-Clear[®] (Merck, France). Enfin, les lames sont séchées et montées avec lamelles (milieu de montage DPX, CellPath, Royaume-Uni).

B. Marquage des astrocytes activés

Les astrocytes ont été marqués grâce à l'anticorps de lapin anti-GFAP (glial fibrillary acidic protein, AB5804, Merck, Allemagne) (Wright et al. 2013). Le GFAP est le principal constituant des filaments intermédiaires retrouvés dans les astrocytes. Ce protocole comprend les mêmes étapes de lavage et d'inhibition des peroxydases endogènes que le précédent. Après un nouveau rinçage des lames au PBS + triton 0,2%, et l'étape de détournement, les lames sont incubées avec la solution de saturation (sérum de chèvre dilué au 1/100^{ème} dans du PBS + triton 0,2%) pendant 1 heure à température ambiante. L'anticorps primaire anti-GFAP (1/500^{ème}) est alors déposé pour une durée de 12 heures à 4°C. Après rinçage, l'anticorps secondaire biotinylé est utilisé au 1/400^{ème} (anti-rabbit IgG biotinylated, BA1000, Vector, Etats-Unis) et déposé sur les lames pour une durée d'une heure. Les étapes suivantes de rinçage, d'incubation avec le complexe avidine/peroxydase, de révélation par la DAB (incubation d'1 minute environ en présence d'H₂O₂) et de montage sont identiques au protocole précédent.

C. Analyse semi-quantitative

Toutes les lames ont été acquises au scanner de lame (objectif 20X, résolution 0,8, Axio Scan.Z1, Zeiss, Allemagne) puis analysées avec le logiciel d'analyse d'images Fiji. Pour cela, quatre régions d'intérêt ont été isolées sur chaque coupe analysée : les cortex droit et gauche

et les hippocampes droit et gauche. Des seuils de détection adaptés ont été définis de façon à quantifier l'intensité de marquage obtenue pour les dépôts amyloïdes d'une part et les astrocytes activés d'autre part. Le paramètre utilisé est le ratio de surface qui représente le rapport surface de marquage / surface de la région d'intérêt.

IX. Prélèvements sanguins et dosage plasmatique du cholestérol

Lors du sacrifice, un prélèvement sanguin intracardiaque est systématiquement réalisé avant la perfusion. Le sang est recueilli dans un tube EDTA (Microvette[®] 500µL K3E, SARSTEDT) et centrifugé à 4500 rpm pendant 20 minutes à 4°C afin de récupérer le plasma qui est conservé à -20°C.

Le dosage du cholestérol total a été effectué à partir des échantillons de plasma prélevés, dans la machine VetTest[®] 8008 (IDEXX), selon les recommandations du constructeur. Brièvement, après avoir inséré la cassette permettant le dosage du cholestérol (CHOL 4, réf FC01 AA20, IDEXX laboratoire), environ 50 µL de plasma sont prélevés à l'aide de la pipette fournie. Le résultat s'affiche automatiquement et est exprimé en pg/mL.

X. Statistiques

Les paramètres quantitatifs ont été exprimés en termes de moyenne et de déviation standard. La normalité des distributions a été vérifiée graphiquement et à l'aide du test de Shapiro-Wilk.

Une première analyse a été réalisée au sein des souris WT afin d'étudier les effets de la lésion et du traitement. Les tests comportementaux évalués une unique fois ont été comparés par une analyse de variance ou un test de Kruskal-Wallis (en cas d'écart à la normalité). En cas de différence significative, les groupes ont été comparés 2 à 2 avec correction de Bonferroni.

L'évolution des paramètres d'actimétrie, EPM et Barnes maze a été étudiée par un modèle mixte avec comme effet fixe le temps, le groupe et l'interaction groupe*temps. Ce modèle permet de tenir compte de la corrélation entre les mesures répétées. Une analyse post hoc à chaque temps de mesure a été réalisée en utilisant les contrastes linéaires. La différence

du Barnes apprentissage entre J1 et J4 a été calculée pour chaque souris puis analysée au cours du temps avec la même méthode que celle employée pour l'évolution de l'actimétrie.

Pour étudier l'effet du transgène, les souris WT sans lésion ont été comparées aux souris APP sans lésion. Les tests comportementaux évalués une unique fois ont été comparés par un test t de Student ou un test U de Mann-Whitney (en cas d'écart à la normalité). Les paramètres longitudinaux ont été analysés de la même façon que précédemment, grâce au modèle mixte.

Le niveau de significativité a été fixé à 5%. Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel SAS (SAS Institute version 9.4).

XI. Ethique

Les directives européennes et françaises relatives à la protection et à l'utilisation des animaux de laboratoire ont été respectées. Le protocole a reçu l'accord du comité d'éthique du ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. Il est enregistré sous le numéro 00279.03.

RÉSULTATS

I. Impact cognitif d'une MHC : preuve de concept

Le modèle murin de MHC a été mis au point par Yaohua Chen lors de son projet de Master 2 réalisé au laboratoire. Des souris ont été opérées selon le protocole ainsi décrit afin de réaliser la caractérisation fonctionnelle de ce modèle à 6 semaines de la chirurgie (Bergeron S. & Chen Y. et al. 2018). Pour l'évaluation comportementale, 62 souris WT ont été testées : 14 souris dans le groupe sham, 14 souris dans le groupe MHC et 9 souris dans le groupe MHC+AT ont été évaluées avec une batterie de tests comprenant l'actimétrie, le labyrinthe en croix surélevée et le labyrinthe de Barnes. Indépendamment, 7 souris sham, 9 souris MHC et 9 souris MHC+AT ont réalisé les tests d'alternance spontanée et de dPAL.

A. Caractérisation fonctionnelle comportementale du modèle de MHC

1. Locomotion et anxiété :

L'activité locomotrice spontanée et le niveau d'anxiété des animaux ont été évalués par les tests d'actimétrie et le labyrinthe en croix surélevée respectivement. Les résultats sont présentés dans la figure 25.

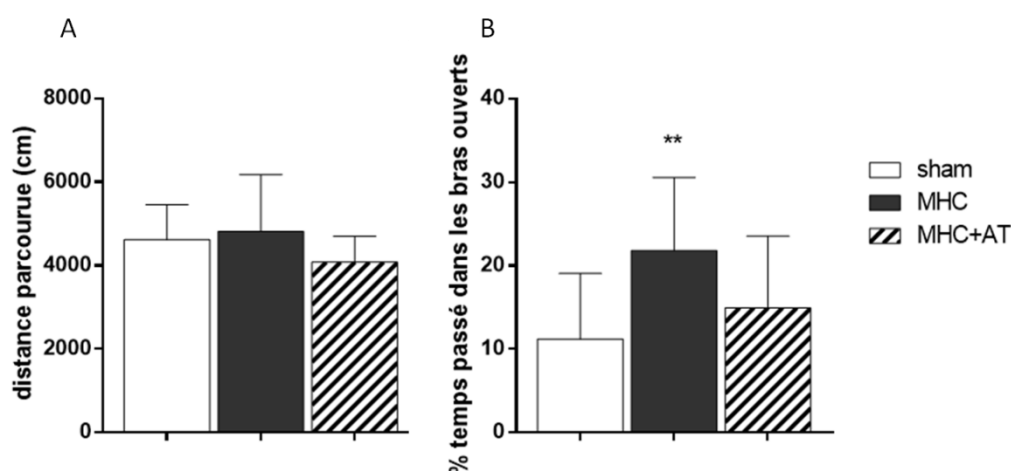


Figure 25: Évaluation de l'activité locomotrice spontanée et du niveau d'anxiété à 6 semaines post-chirurgie.

A. activité locomotrice spontanée. B. niveau d'anxiété. Comparaison des groupes sham (n=14), MHC (n=14) et MHC+AT (n=9), **p<0,01 MHC vs sham. Les données sont représentées en moyenne \pm SD.

Aucune différence d'activité locomotrice n'a été constatée entre les trois groupes. En revanche, les animaux avec MHC ont passé significativement plus de temps dans les bras ouverts que les souris du groupe sham suggérant une diminution du niveau d'anxiété liée à la présence de la MHC. Le traitement par atorvastatine ne semble modifier aucun de ces deux paramètres.

2. Mémoire de référence spatiale :

L'apprentissage et la mémoire de référence spatiale ont été évalués avec le labyrinthe de Barnes. L'évolution de la latence totale (en s) au cours des sessions d'acquisition reflète l'apprentissage (figure 26 A). Le test de rétention, avec le pourcentage de temps passé dans le quadrant cible, représente la mémoire de référence. Un animal ayant appris à localiser le trou cible a tendance à passer plus de temps à explorer la zone où se trouvait ce trou pendant l'apprentissage (figure 26 B).

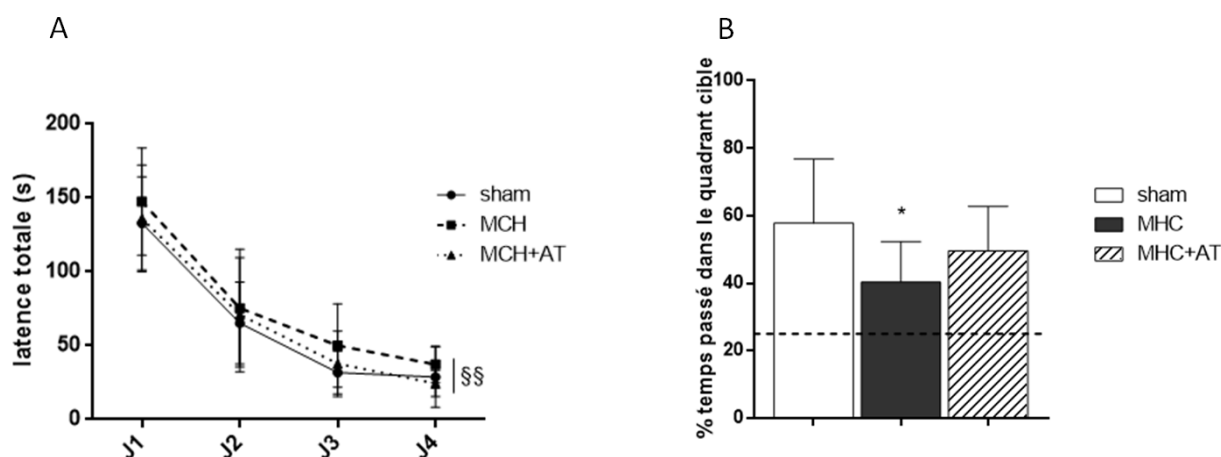


Figure 26: Évaluation, à 6 semaines post-chirurgie, de l'apprentissage et de la mémoire de référence spatiale par le labyrinthe de Barnes.

Apprentissage (A) et test de rétention (B) évalués avec le labyrinthe de Barnes. La ligne pointillée représente la valeur, due au hasard, du pourcentage de temps passé dans un quadrant (25%). §§ $p < 0,01$ J4 vs J1, * $p < 0,05$ MHC vs sham. Les données sont représentées en moyennes ± SD.

On observe une diminution significative des latences totales entre le premier et le dernier jour d'acquisition démontrant que les souris des trois groupes ont compris la tâche et appris à trouver la boîte d'échappement. Lors du test de rétention, on peut noter que pour les groupes sham, MHC et MHC+AT, l'exploration du quadrant cible est supérieure au hasard (25%). De plus, le groupe MHC a passé significativement moins de temps dans le quadrant cible que le groupe sham (pourcentage de temps passé dans le quadrant cible, moyenne ± SD, $40,3 \pm 12$ vs

57,8 ± 18,9 respectivement, $p=0,0126$), suggérant une altération de la mémoire de référence spatiale due à la MHC. Le traitement par atorvastatine semble améliorer la mémoire de référence chez les souris lésées. En effet, on observe une restauration partielle des performances du groupe MHC+AT par rapport au groupe MHC (pourcentage de temps passé dans le quadrant cible, moyenne ± SD, 49,5 ± 13,2 vs 40,3 ± 12 respectivement, $p=0,392$).

3. Mémoire de travail

La mémoire de travail a été explorée avec un test d'alternance spontanée dans un labyrinthe en Y. Le pourcentage d'alternance et le nombre total d'entrées dans les bras ont été relevés sur les 8 minutes de test. Les résultats sont présentés aux figure 27 A et B.

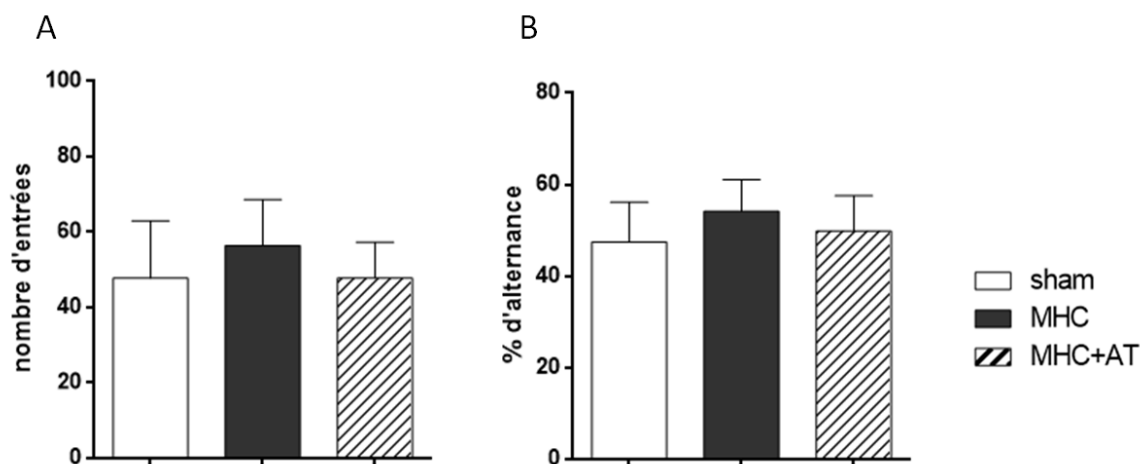


Figure 27: Évaluation de la mémoire de travail par le test de l'alternance spontanée à 6 semaines post-chirurgie.

Nombre total d'entrées (A) et pourcentage d'alternance (B) à 8 minutes. Les groupes sont constitués de $n=7$ souris dans le groupe WT sham, $n=9$ dans le groupe WT+MHC, $n=9$ dans le groupe WT+MHC+AT. Les résultats sont présentés en moyenne ± SD.

Le nombre d'entrées dans les bras, qui peut constituer un critère d'exclusion, est suffisant pour les trois groupes WT. On ne constate pas de différence significative concernant la mémoire de travail entre les différents groupes WT suggérant que ni la MHC ni le traitement n'impactent cette mémoire.

4. Mémoire visuospatiale

L'évolution du pourcentage de réponses correctes a été suivie sur 30 sessions réparties en blocs de 3 sessions de façon à limiter les variations inter-sessions du niveau de performance des souris. Les résultats sont présentés à la figure 28.

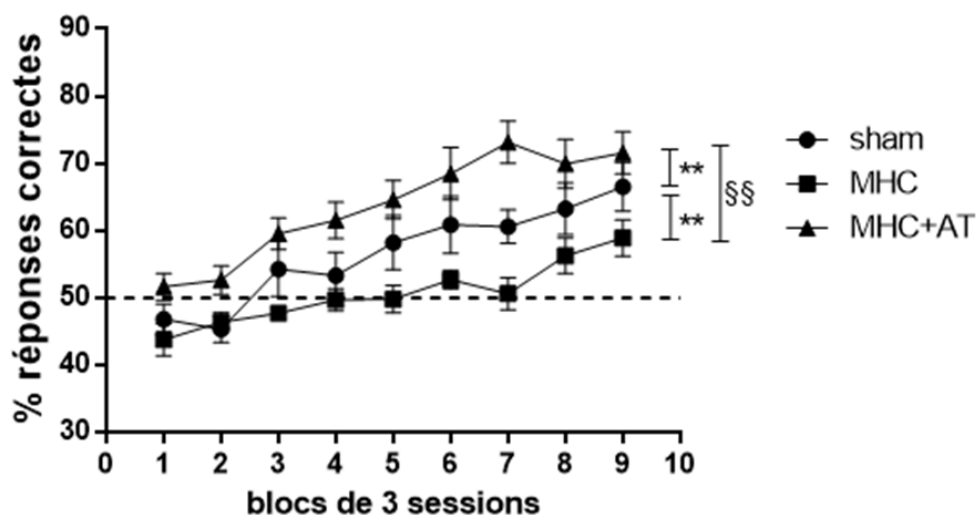


Figure 28: Mémoire visuospatiale évaluée par le tes dPAL à 6 semaines post-chirurgie.

Les effectifs sont les suivants : pour les groupes sham (n=7), MHC (n=9) et MHC+AT (n=9). La ligne pointillée représente le pourcentage de réponses correctes du au hasard. ** p<0,01 MHC ou MHC+AT vs sham et §§ p<0,01 MHC vs MHC+AT. Les données sont représentées en moyennes ± SD.

On observe une augmentation du pourcentage de réponses correctes au fur et à mesure des sessions démontrant un apprentissage pour les trois groupes (p<0,0001). On note un retard d'apprentissage dans le groupe MHC qui ne parvient à un pourcentage de réponses correctes supérieur au hasard qu'à partir du 22^{ème} jour de test. Ces résultats permettent de mettre en évidence une altération significative de la mémoire visuospatiale dans le groupe MHC par rapport au groupe sham (p<0,01). La modulation pharmacologique par atorvastatine montre un effet bénéfique significatif sur la mémoire visuospatiale avec de meilleures performances dès les premiers jours de test et maintenues jusqu'en fin de test. Le pourcentage de réponses correctes en fin de test atteint par le groupe MHC+AT (71,5%) est supérieur à celui du groupe MHC (58,9%) mais également à celui du groupe sham (66,5%) (p<0,01 dans les deux cas).

La caractérisation fonctionnelle du modèle de MHC à 6 semaines de la chirurgie a permis de démontrer un effet significatif de la MHC sur le plan cognitif. Le modèle de MHC a également montré une sensibilité à la modulation pharmacologique par atorvastatine qui apporte une amélioration des fonctions cognitives testées.

B. Caractérisation fonctionnelle du métabolisme cérébral

L'accumulation du radiotracer en TEP [18F]FDG dans le groupe MHC comparé au groupe sham a permis de montrer un hypométabolisme très localisé au niveau du gyrus denté ipsilatéral (moyenne \pm SD : 0.81 ± 0.04 vs. 0.92 ± 0.11 ; $p=0.0169$), du cortex (cortex ipsilatéral 0.85 ± 0.05 vs. 0.98 ± 0.10 ; $p=0.0118$ et cortex contralatéral 0.86 ± 0.04 vs. 0.97 ± 0.09 ; $p=0.0118$), et du striatum (striatum ipsilatéral 0.87 ± 0.06 vs. 1.03 ± 0.13 ; $p=0.0239$ et striatum contralatéral 0.86 ± 0.05 vs. 1.00 ± 0.11 ; $p=0.0169$) (Bergeron S. & Chen Y. et al. 2018).

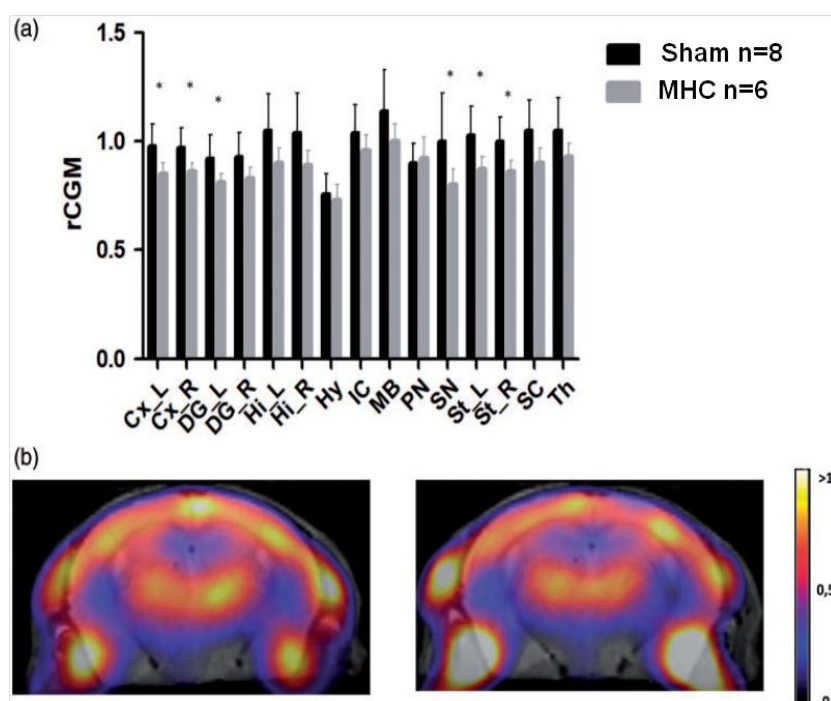


Figure 29: Métabolisme cérébral in vivo (TEP-[18F]FDG) à 6 semaines post-chirurgie.

(a) histogramme représentant la captation de [18F]FDG dans chaque région cérébrale exprimée en rCGM (métabolisme du glucose régional cérébral, calculé par rapport à la captation de glucose dans une zone de référence, le cervelet). Les données sont représentées en moyennes \pm SD, * $p<0,05$ MHC vs sham. Cx_L : cortex gauche ; Cx_R : cortex droit ; DG_L: gyrus denté gauche ; DG_R: gyrus denté droit ; Hi_L : hippocampe gauche ; Hi_R : hippocampe droit ; Hy : hypothalamus ; IC: collicule inférieur ; MB: mésencéphale ; PN: noyaux du pont ; SN: noyaux septaux ; St_L: striatum gauche ; St_R: striatum droit ; SC: collicule supérieur ; Th: thalamus. (b) Vue axiale des images de cerveaux de souris en TEP-[18F]FDG (à droite : groupe MHC ; à gauche : groupe sham).

La caractérisation fonctionnelle du modèle de MHC à 6 semaines de la chirurgie a permis de démontrer un effet significatif de la MHC sur le plan cognitif et sur le métabolisme cérébral (notamment hippocampique), permettant de valider l'hypothèse d'un impact cognitif

d'une MHC. Le modèle de MHC a également montré une sensibilité à la modulation pharmacologique par atorvastatine.

II. Effet cognitif de la MHC au cours du temps : étude fonctionnelle longitudinale sur 12 mois

Un suivi longitudinal comprenant 5 temps d'évaluation neurocomportementale (1,5 mois, 3 mois, 6 mois, 9 mois et 12 mois post-chirurgie) a été mené afin d'étudier l'effet de la lésion dans le temps chez les souris WT (condition « saine ») et dans un contexte pathologique chez les souris APP.

A. Effectifs et mortalité

Une cohorte de 90 souris a été suivie sur 12 mois après la chirurgie. Le nombre de souris incluses après la chirurgie était de 14 pour le groupe WT sham, 14 pour le groupe WT+MHC, 12 pour le groupe WT+MHC+AT, 17 pour le groupe APP sham, 15 pour le groupe APP+MHC et 18 souris pour le groupe APP+MHC+AT. Les courbes de survie sont représentées à la figure 30.

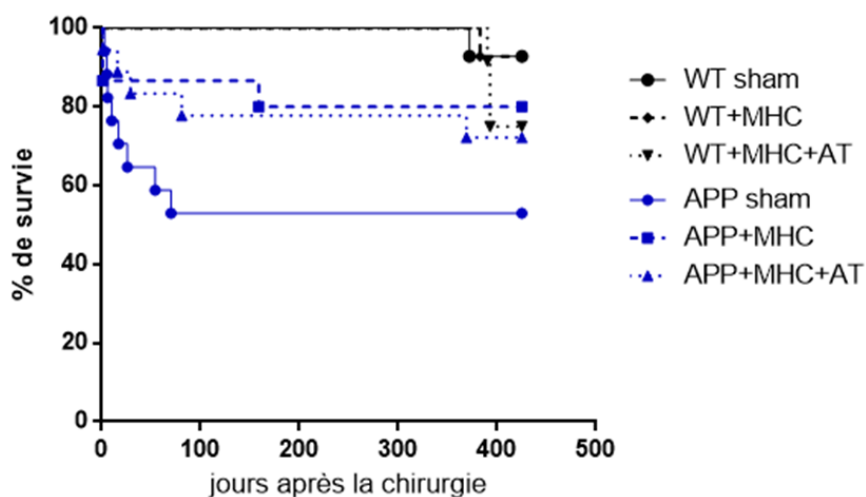


Figure 30: Courbes de survie des groupes de souris incluses dans la cohorte de suivi longitudinal.

Pour les souris WT, la MHC n'a pas d'effet sur la mortalité des animaux. La mortalité est globalement plus importante et plus précoce chez les souris APP. On observe notamment une mortalité plus marquée (53% de survie en fin de suivi) et survenant plus précocement (au cours du premier mois suivant la chirurgie) dans le groupe APP sham.

B. Suivi longitudinal chez la souris WT

La batterie de tests neurocomportementaux réalisée à chaque temps d'étude comprenait une évaluation de l'activité locomotrice spontanée, du niveau d'anxiété d'une part et de l'apprentissage et de la mémoire de référence spatiale d'autre part. Dans les groupes WT sham et WT+MHC, le nombre de souris était de n=14 à tous les temps sauf à 12 mois où n=13 ; dans le groupe WT+MHC+AT, l'effectif était de n=12 souris à tous les temps.

1. Suivi de l'activité locomotrice spontanée

Pour les trois groupes, on constate une diminution progressive de l'activité locomotrice au cours du temps ($p < 0,0001$), plus marquée chez les souris WT+MHC+AT ($p < 0,05$). L'activité n'est pas modifiée par la présence de la MHC (figure 31).

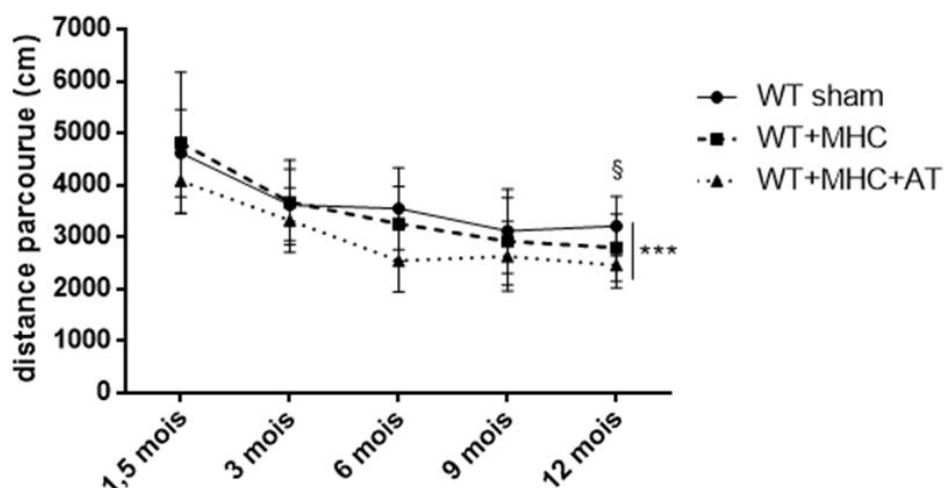


Figure 31: Activité locomotrice spontanée des groupes WT au cours du suivi longitudinal.

L'activité locomotrice est reflétée par la distance totale (en cm) parcourue dans l'arène lors du test. Les résultats sont représentés en moyenne \pm SD. *** $p < 0,0001$ pour les trois groupes au cours du temps, § $p < 0,05$ WT+MHC+AT vs WT sham.

2. Suivi du niveau d'anxiété

On observe au cours du suivi, une augmentation significative du niveau d'anxiété avec le temps ($p < 0,0001$) pour les groupes WT+MHC et WT+MHC+AT tandis qu'il reste stable au cours du temps pour le groupe WT sham. Au premier temps de suivi, on observe un effet de la MHC qui diminue significativement le niveau d'anxiété du groupe WT+MHC par rapport au groupe WT sham ($p < 0,01$). L'effet de la MHC semble persister à 3 mois. A moyen et long termes, le niveau d'anxiété est identique pour les 3 groupes. Le traitement par atorvastatine ne semble pas moduler le niveau d'anxiété (figure 32).

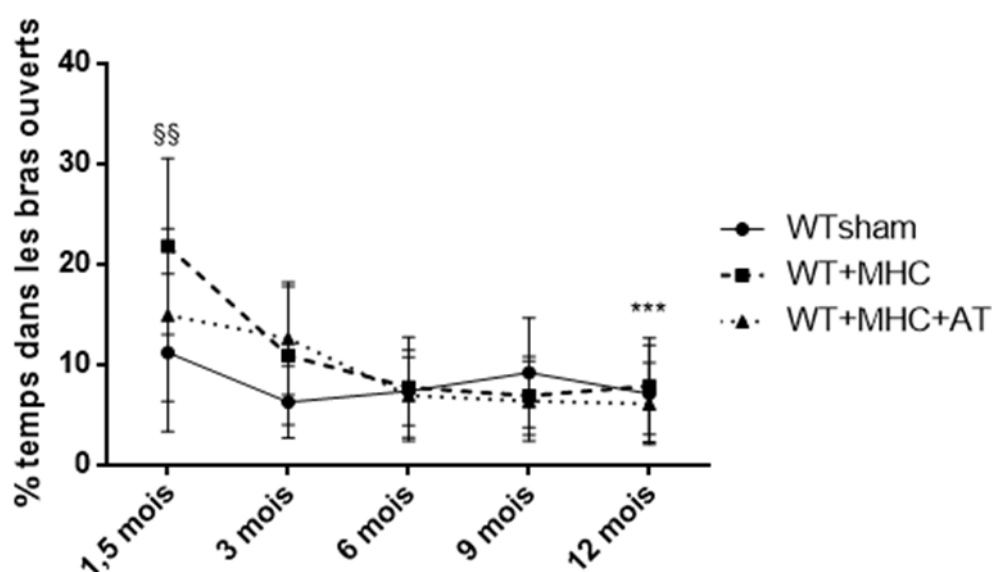


Figure 32: Niveau d'anxiété des souris WT évalué par le labyrinthe en croix surélevé au cours du suivi longitudinal.

Les résultats sont représentés en moyenne \pm SD. *** $p < 0,0001$ entre 1,5 mois et 12 mois pour les groupes WT+MHC et WT+MHC+AT, §§ $p < 0,01$ WT+MHC vs WT sham à 1,5 mois post-chirurgie.

3. Suivi de la mémoire de référence spatiale

Les courbes d'apprentissage représentées par les latences totales et les erreurs totales sont présentées à la figure 33. A chaque temps du suivi, on observe pour ces deux paramètres une différence significative entre le premier (J1) et le dernier jour d'acquisition (J4) ($p < 0,05$) montrant un apprentissage à chaque temps pour les trois groupes sans présenter de différence significative entre les groupes. Par ailleurs, pour ces deux paramètres, l'évolution de la différence entre J1 et J4 au cours du suivi longitudinal (sur les 5 temps) a également été analysée. Au cours du temps, cette différence diminue de façon significative ($p < 0,0001$ pour

les latences totales et $p=0,0002$ pour les erreurs totales) pour l'ensemble des groupes WT. L'évolution de la différence J1-J4 des latences totales montre également qu'au fur et à mesure des répétitions, il y a une connaissance de la tâche ce qui pourrait marquer un effet « retest ». On peut ainsi observer une variation notable des niveaux de valeurs des latences totales au J1 d'acquisition, passant de 130 - 150 secondes à 1,5 mois lors de la découverte de la tâche à 40 - 66 secondes à 3 mois, 28 - 53 secondes à 6 et 9 mois et enfin 24 - 39 secondes à 12 mois. L'évolution de la différence J1-J4 du nombre d'erreurs totales suggère qu'au cours du suivi, les animaux ont mis en place une stratégie leur permettant d'être plus efficace dès le premier jour d'apprentissage.

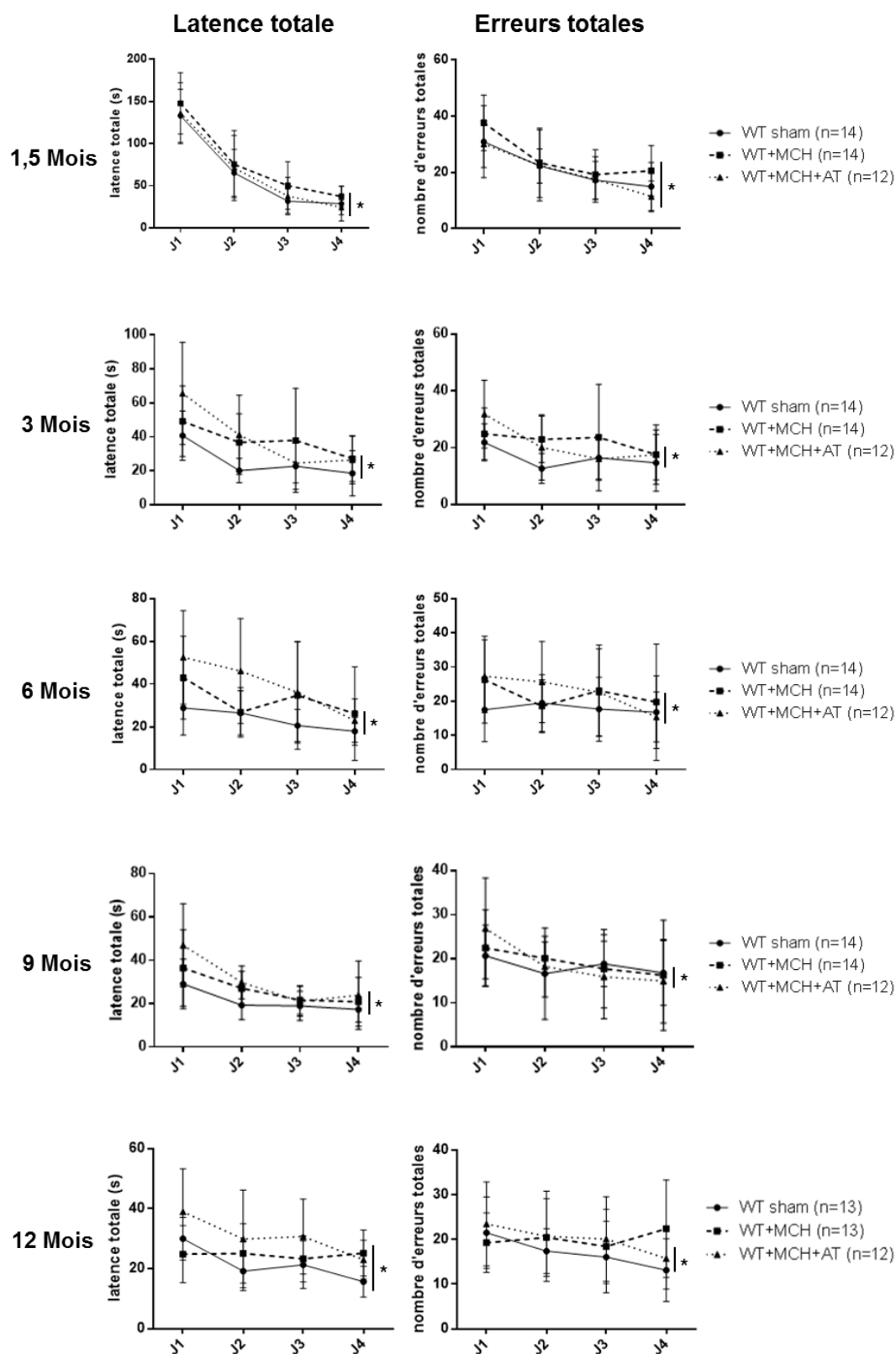


Figure 33: Données d'apprentissage au cours des jours d'acquisition du labyrinthe de Barnes pour les souris WT.

Evolution des latences totales (s) et du nombre d'erreurs totales au cours des quatre jours d'acquisition du labyrinthe de Barnes. Les résultats sont présentés en moyenne \pm SD. * $p < 0,05$ entre J1 et J4.

Le jour du test de rétention, la MHC induit un impact sur les latences primaires (augmentées par rapport au groupe sham) à 6 semaines ($p < 0.05$) qui n'est plus observé au cours du temps (figure 34). On observe un effet temps au cours du suivi pour les trois groupes ($p < 0,05$).

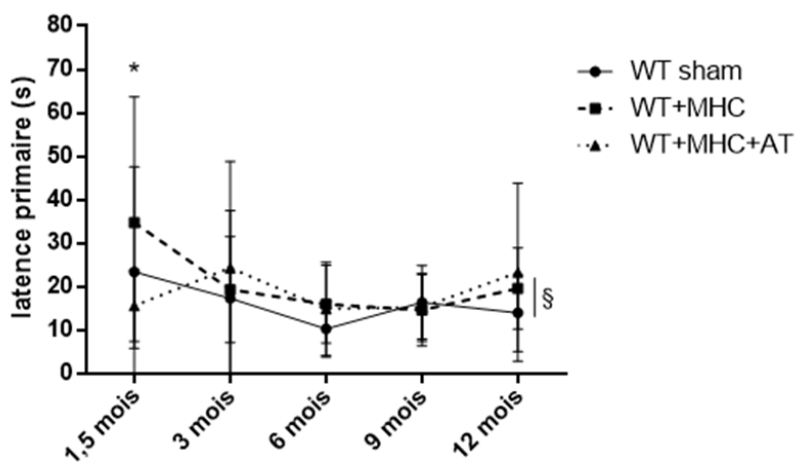


Figure 34: Évolution de la latence primaire le jour du test de rétention pour les groupes WT.

Les données sont représentées en moyennes \pm SD, * $p < 0,05$ MHC vs sham, § $p < 0,05$ au cours du temps pour les trois groupes.

Les résultats obtenus lors du test de rétention sont présentés à la figure 35.

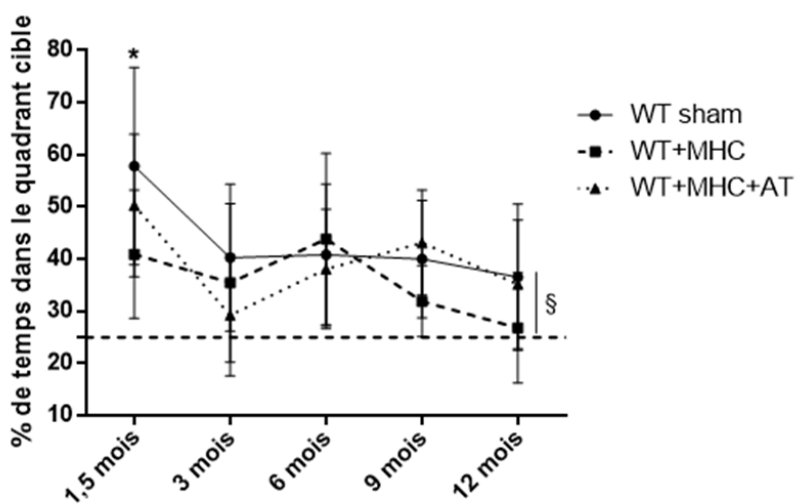


Figure 35: Mémoire de référence spatiale évaluée lors du test de rétention du labyrinthe de Barnes pour les groupes WT.

Pourcentage de temps passé dans le quadrant cible à chaque temps d'évaluation. La ligne pointillée horizontale représente la valeur, due au hasard, du pourcentage de temps passé dans un quadrant (25%). Les résultats sont représentés en moyennes \pm SD. * $p < 0,05$ WT+MHC vs WT sham, § $p < 0,05$ entre 1,5 et 12 mois.

On savait de la caractérisation du modèle qu'au premier temps de suivi, une altération significative de la mémoire de référence spatiale dans le groupe WT+MHC par rapport au groupe WT+sham ($p < 0,05$), avec une restauration partielle pour le groupe traité par atorvastatine, avait été observée. Au cours du temps, on observe une diminution du niveau de performance au test de rétention pour les trois groupes ($p < 0,05$). On constate une altération progressive de cette mémoire chez les souris WT+MHC, qui, en fin de suivi, arrivent à un pourcentage de temps passé dans le quadrant cible qui ne diffère plus du hasard contrairement aux groupes WT sham et WT+MHC+AT dont les performances restent stables. A 12 mois post-chirurgie, l'impact de la MHC est encore présent. Le traitement par atorvastatine semble avoir un effet cognitif bénéfique en maintenant le niveau de performance au test des souris WT+MHC+AT au dessus des souris WT+MHC à 9 et 12 mois.

C. Suivi longitudinal chez la souris APP

Les souris APP littermates ont été évaluées en même temps que les souris WT avec la même batterie de tests neurocomportementaux. Dans le groupe APP sham, le nombre de souris était de $n=10$ à 1,5 mois puis $n=9$ pour les autres temps. Le groupe APP+MHC était constitué de $n=13$ souris à 1,5 et 3 mois puis $n=12$ souris à partir de 6 mois. Enfin, dans le groupe APP+MHC+AT, l'effectif était de $n=15$ souris à 1,5 mois puis $n=14$ souris à 3, 6 et 9 mois et $n=13$ souris à 12 mois.

1. Suivi de l'activité locomotrice spontanée

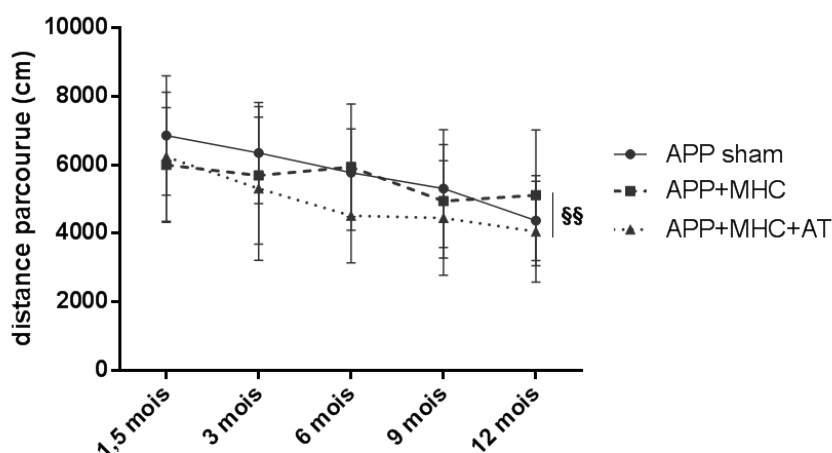


Figure 36: Activité locomotrice spontanée des groupes APP au cours du suivi longitudinal.

L'activité locomotrice est reflétée par la distance totale (en cm) parcourue dans l'arène lors du test. Les résultats sont représentés en moyenne \pm SD. §§ $p < 0,01$ entre 1,5 et 12 mois pour les trois groupes.

Comme les souris WT, on observe une diminution significative de l'activité locomotrice des souris APP au cours du temps ($p < 0,01$). Ni la MHC ni le traitement par atorvastatine ne semblent modifier ce paramètre (figure 36). Enfin, il est à noter une hyperactivité des souris APP sham par rapport aux souris WT sham tout au long du suivi ($p < 0,0001$).

2. Suivi du niveau d'anxiété

Les résultats sont présentés à la figure 37.

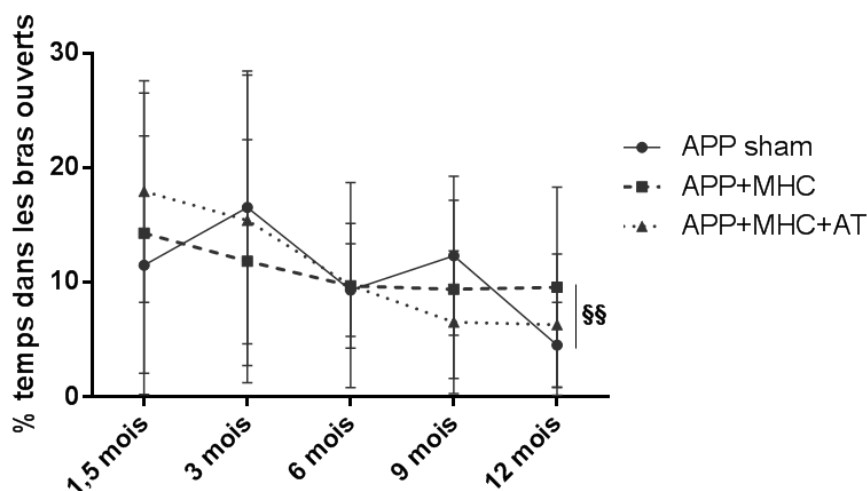


Figure 37: Niveau d'anxiété des souris APP évalué par le labyrinthe en croix surélevé au cours du suivi longitudinal.

Les résultats sont représentés en moyenne \pm SD. §§ $p < 0,01$ entre 1,5 et 12 mois pour les trois groupes.

On observe pour les trois groupes une augmentation significative du niveau d'anxiété au cours du suivi ($p < 0,01$). On peut noter une grande variabilité interindividuelle au sein des groupes concernant ce paramètre. Ces résultats ne permettent pas de mettre en évidence un effet de la MHC ou du traitement pharmacologique sur le niveau d'anxiété des souris APP. Il n'existe pas de différence de niveau d'anxiété entre les groupes APP sham et WT sham.

3. Suivi de la mémoire de référence spatiale

Les courbes d'apprentissage représentées par les latences totales et le nombre d'erreurs totales sont représentées à la figure 38.

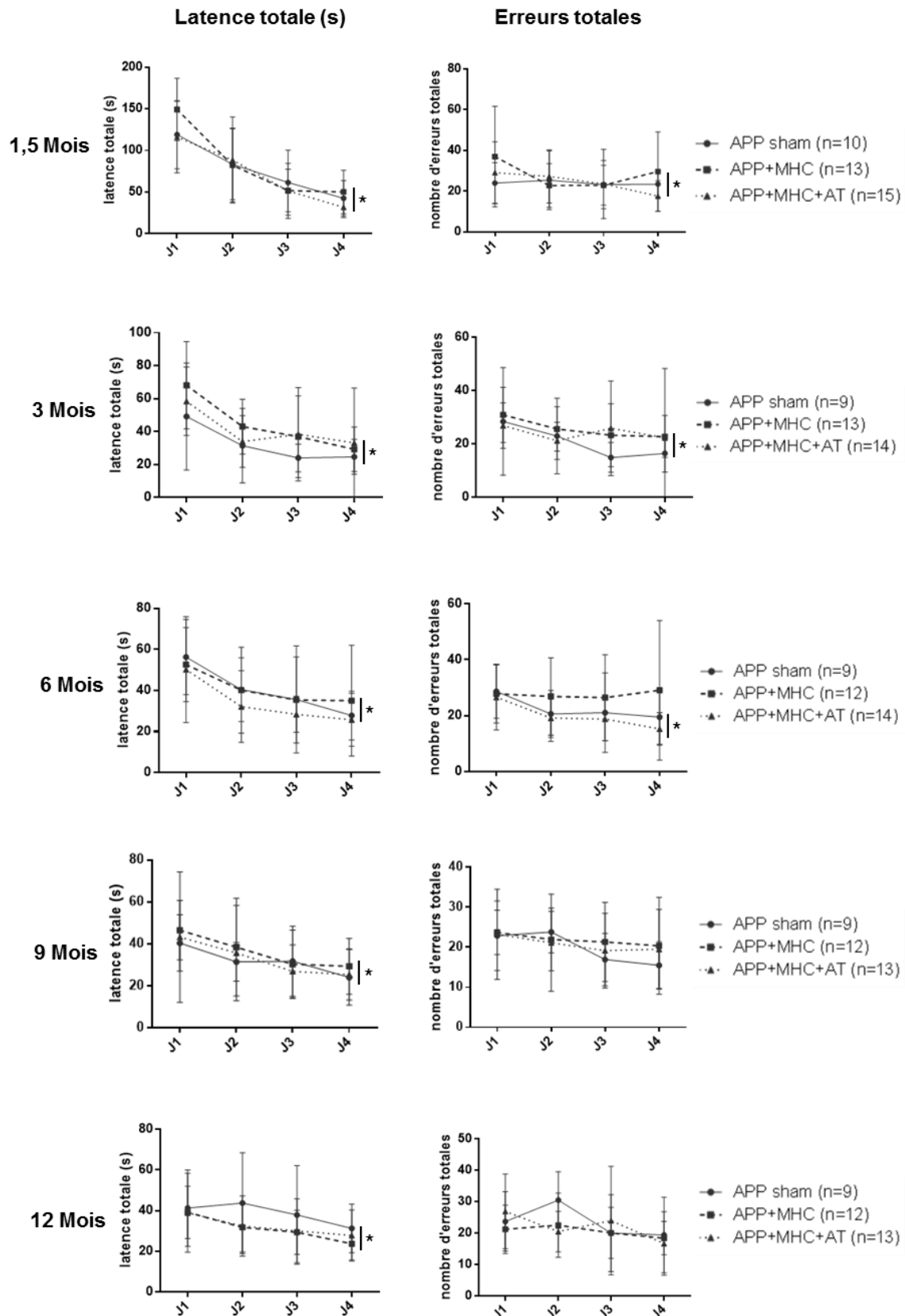


Figure 38: Données d'apprentissage au cours des jours d'acquisition du labyrinthe de Barnes pour les souris APP au cours du suivi longitudinal.

Evolution des latences totales et du nombre d'erreurs totales au cours des quatre jours d'acquisition du labyrinthe de Barnes. Les résultats sont présentés en moyenne \pm SD. * $p < 0,05$ entre J1 et J4.

Il n'existe pas de différence significative entre les groupes APP pour la phase d'acquisition au cours du temps. Pour les latences totales, à chaque temps du suivi, on observe une différence significative entre le premier (J1) et le dernier jour d'acquisition (J4) ($p < 0,05$) montrant un apprentissage de la tâche pour les trois groupes sans présenter de différence entre les groupes. Pour les trois groupes, on observe également un effet « retest » objectivé par une diminution significative de l'écart J1-J4 des latences totales au cours du suivi ($p < 0,0001$), et une diminution des niveaux de valeurs des latences totales au J1 à chaque temps. Concernant le nombre d'erreurs totales, la différence entre le J1 et le J4 n'est significative qu'aux premiers temps jusqu'à 6 mois post-chirurgie pour les trois groupes. Le nombre d'erreurs au J1 est, par contre, relativement stable au cours temps quel que soit le groupe, suggérant que les souris APP utilisent dès le premier temps d'évaluation une stratégie de recherche la plus efficace pour elles.

Lors du test de rétention, les latences primaires sont présentées à la figure 39.

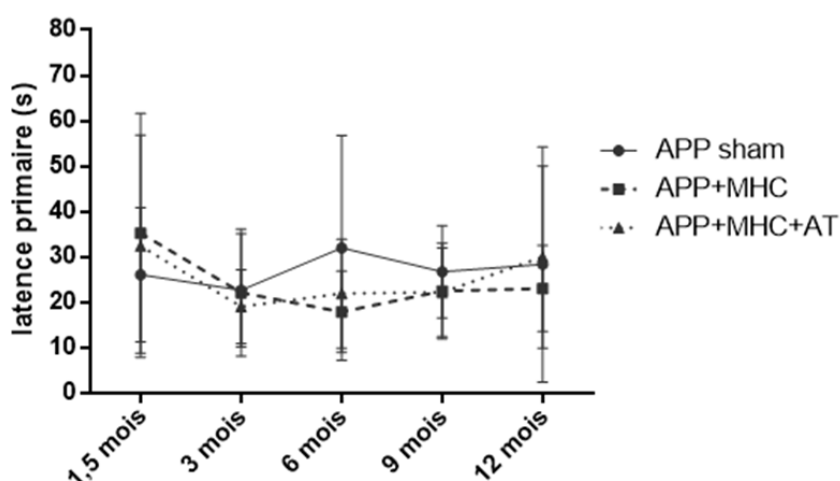


Figure 39: Évolution de la latence primaire le jour du test de rétention pour les groupes APP au cours du suivi longitudinal.

Les données sont représentées en moyennes \pm SD.

Le jour du test de rétention, aucune différence concernant les latences primaires n'est observée entre les groupes. Il n'y a pas non plus d'effet temps sur ce paramètre chez les souris APP.

Les résultats obtenus au test de rétention sont présentés à la figure 40.

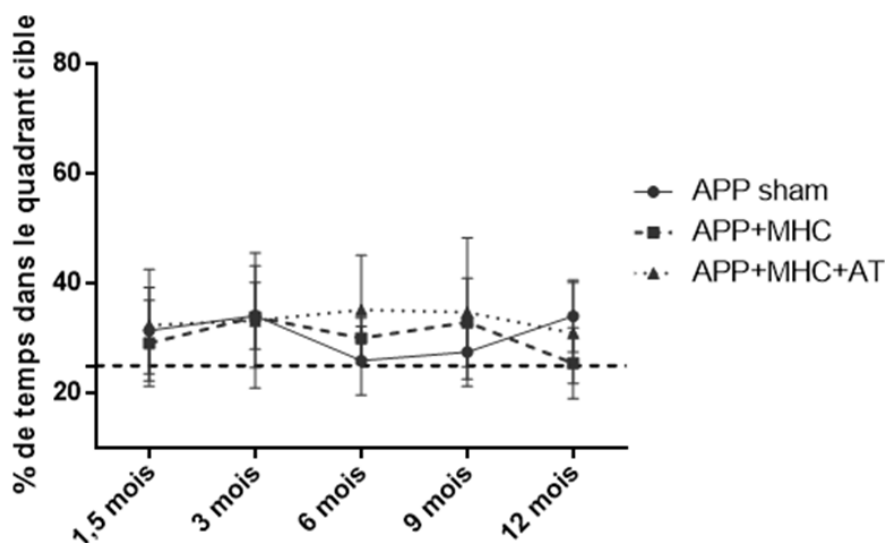


Figure 40: Évaluation de la mémoire de référence spatiale lors du test de rétention du labyrinthe de Barnes pour les groupes APP au cours du suivi longitudinal.

Elle est représentée par le pourcentage de temps passé dans le quadrant cible à chaque temps d'évaluation. La ligne pointillée horizontale représente la valeur, due au hasard, du pourcentage de temps passé dans un quadrant (25%). Les résultats sont représentés en moyennes \pm SD.

Pour les trois groupes APP, il n'y a pas, au cours du temps, d'évolution significative du pourcentage de temps passé dans le quadrant cible. Celui-ci diffère peu du hasard pour tous les groupes dès le premier temps d'évaluation. L'évolution de ce paramètre ne diffère pas entre les groupes APP au cours du suivi. Les résultats obtenus ne permettent pas de démontrer un impact cognitif de la MHC sur la mémoire de référence spatiale chez les souris APP au cours du temps.

Il est à noter un niveau de performance au test de rétention plus faible chez les souris APP par rapport aux souris WT. A 1,5 mois post-chirurgie, la différence entre le groupe APP sham et le groupe WT sham est significative ($p < 0,0001$). Ce résultat démontre une altération de la mémoire de référence spatiale liée au transgène qui s'exprime dès le début du suivi.

Au total :

Cette étude fonctionnelle longitudinale confirme un effet propre de la MHC en dehors de toute pathologie sous-jacente au cours du temps, modulée de façon précoce par l'administration d'atorvastatine. Dans un contexte pathologique, il n'est pas possible de conclure à un effet propre, précipitant ou aggravant de la MHC chez la souris APP, qui est déjà très altérée dès le premier temps d'évaluation.

III. Etude fonctionnelle approfondie sur le premier temps post-chirurgie chez les souris APP

Cette troisième étude s'est focalisée sur les premiers mois suivant la chirurgie avec l'objectif d'essayer de déceler plus finement un impact cognitif de la MHC chez les souris APP, comme cela avait été fait sur la souris WT (Bergeron S. & Chen Y. et al. 2018). Un nouveau groupe de souris APP a donc été soumis à une évaluation neurocomportementale comprenant l'activité locomotrice, le niveau d'anxiété, la mémoire de travail et la mémoire visuo-spatiale.

A. Effectifs et mortalité

Une cohorte de 53 souris a été constituée. Le nombre de souris incluses après la chirurgie était de 17 souris dans le groupe APP sham, 15 souris dans le groupe APP+MHC, et 21 souris dans le groupe APP+MHC+AT. Les courbes de survie sont présentées à la figure 41. Ces souris ont également été étudiées à l'IRM à 6 mois, selon le principe de raffinement.

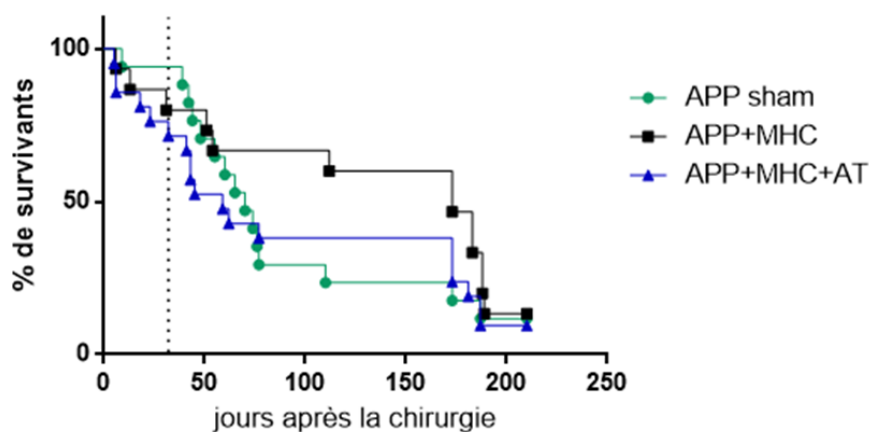


Figure 41: Courbes de survie des groupes de souris APP.

La ligne pointillée verticale indique le début de la mise sous restriction alimentaire.

On observe une mortalité très importante chez les souris APP tous groupes confondus, le pourcentage de survie n'étant que de 13% environ en fin de suivi. La grande majorité des décès est survenue après le début de la mise sous restriction alimentaire instaurée dans le cadre du protocole du test de dPAL, suggérant une sensibilité particulière des souris APP à cette condition.

B. Evaluation fonctionnelle non cognitive

1. Activité locomotrice spontanée

L'activité motrice des groupes de souris APP est présentée à la figure 42. Les valeurs de distance parcourue (en cm) sont élevées par rapport à celles observées précédemment chez les souris WT marquant l'hyperactivité des souris APP. La MHC et le traitement par atorvastatine ne modifient pas ce paramètre.

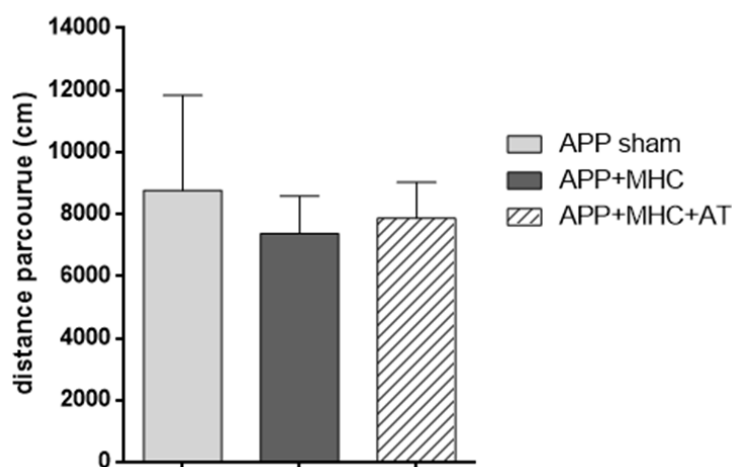


Figure 42: Activité locomotrice spontanée des souris APP à 6 semaines post-chirurgie.

Elle est représentée par la distance parcourue (en cm) dans l'arène au cours du test. Les groupes sont constitués de n=9 dans le groupe APP sham, n=10 dans les groupes APP+MHC et APP+MHC+AT. Les résultats sont présentés en moyenne ± SD.

2. Niveau d'anxiété

L'effet de la MHC entraînant une diminution du niveau d'anxiété chez les souris WT n'est pas retrouvé de façon significative chez les souris APP+MHC par rapport aux souris APP sham même si la tendance est nette ($p=0,07$). Le niveau d'anxiété est significativement plus élevé dans le groupe APP+MHC+AT par rapport au groupe APP+MHC ($p<0,001$) suggérant un effet du traitement par atorvastatine (figure 43).

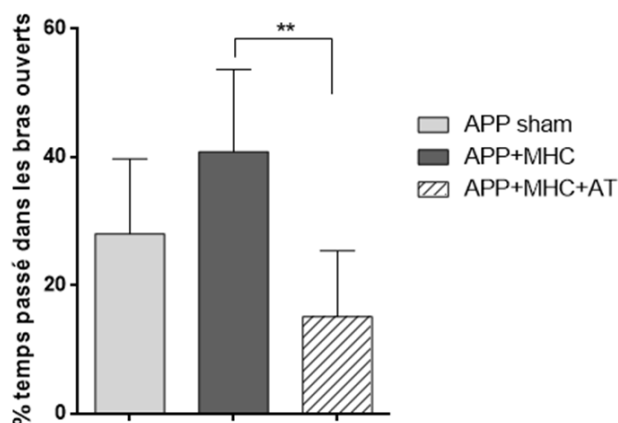


Figure 43: Niveau d'anxiété des souris APP évalué par le labyrinthe en croix surélevé à 6 semaines post-chirurgie.

Le niveau d'anxiété est représenté par le pourcentage de temps passé dans les bras ouverts au cours du test. Les groupes sont constitués de n=9 dans le groupe APP sham, n=10 dans les groupes APP+MHC et APP+MHC+AT. Les résultats sont présentés en moyenne \pm SD. **p<0,001 APP+MHC+AT vs APP+MHC.

C. Mémoire de travail

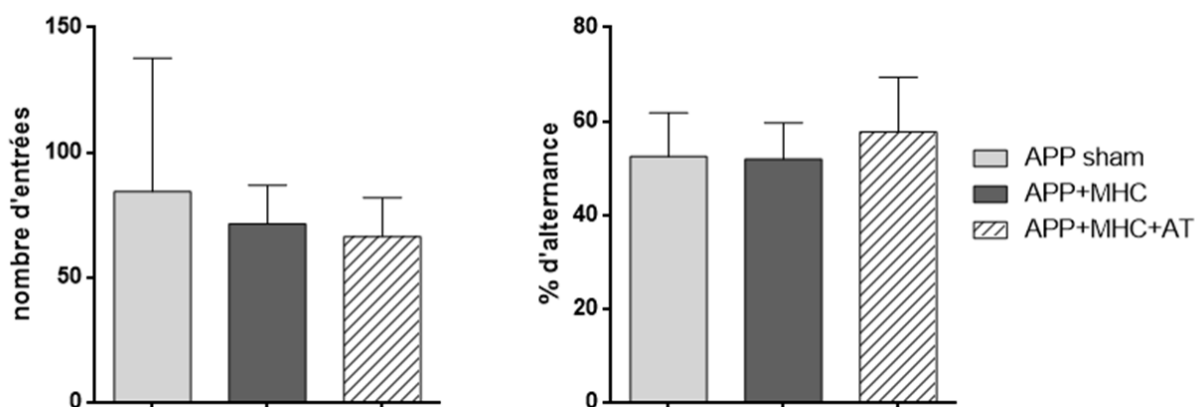


Figure 44: Évaluation, à 6 semaines post-chirurgie, de la mémoire de travail des souris APP par le test d'alternance spontanée.

Nombre total d'entrées dans les bras et pourcentage d'alternance à 8 minutes. Les groupes sont constitués de n=9 dans le groupe APP sham, n=10 dans les groupes APP+MHC et APP+MHC+AT. Les résultats sont présentés en moyenne \pm SD.

Le nombre d'entrées dans les bras, qui peut constituer un critère d'exclusion, est suffisant dans les trois groupes APP (figure 44). On ne constate pas de différence significative concernant la mémoire de travail entre les différents groupes APP, suggérant que ni la MHC ni le traitement n'influencent cette mémoire. De plus, une comparaison réalisée entre le pourcentage d'alternance des souris APP sham et celui des souris WT sham évaluées lors de la caractérisation du modèle n'a montré aucune différence entre ces deux groupes. Ceci indique qu'il n'y a pas d'effet du transgène sur la mémoire de travail à 1,5 mois post-chirurgie.

D. Mémoire visuospatiale

Au cours de la phase d'habituation et de conditionnement, les souris APP ont réussi à comprendre les étapes d'initial touch training, must touch training et must initiate. En revanche, l'étape de punish incorrect training a nécessité plus de temps que celui recommandé et n'obtenait pas les résultats escomptés : seules 1 souris sur 6 dans le groupe APP sham, 3 souris sur 10 dans le groupe APP+MHC et 2 souris sur 8 dans le groupe APP+MHC+AT ont pu atteindre le critère de 75% de réponses correctes en 40 minutes sur deux jours consécutifs. Pour le test du dPAL, les groupes étaient constitués de 6 souris APP sham, 10 souris APP+MHC et 8 souris APP+MHC+AT. En raison d'un effectif trop faible dans le groupe APP sham, les analyses statistiques n'ont pu être réalisées, ne permettant que des observations descriptives des résultats.

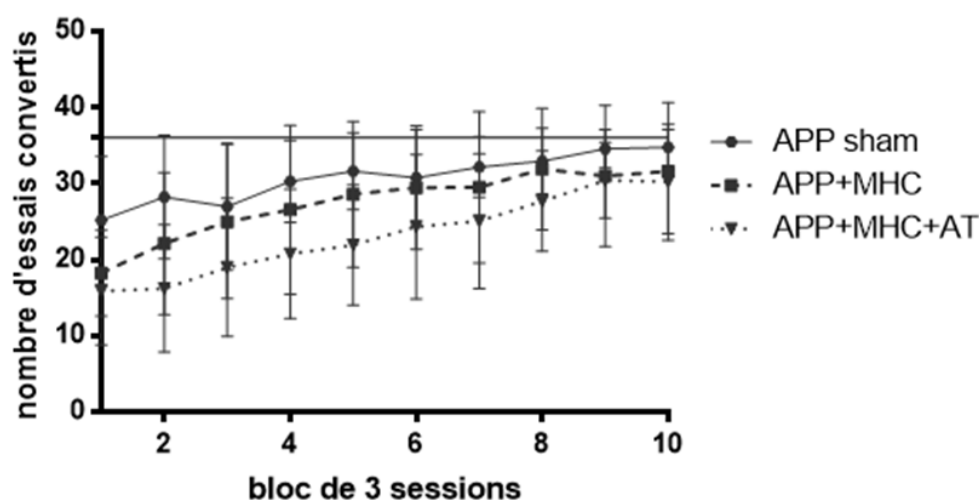


Figure 45: Nombre d'essais convertis au cours du test du dPAL pour les groupes APP à 6 semaines post-chirurgie.

La ligne horizontale indique le critère de 36 essais. Les groupes sont constitués de n=6 dans le groupe APP sham, n=10 dans le groupe APP+MHC et n=8 dans le groupe APP+MHC+AT. Les résultats sont présentés en moyenne \pm SD.

Les trois groupes de souris APP ne parviennent pas à atteindre le critère de 36 essais convertis par session bien qu'elles s'améliorent au cours des 30 jours (figure 45). Il semble que les souris porteuses d'une MHC soient moins performantes encore que les souris APP sham.

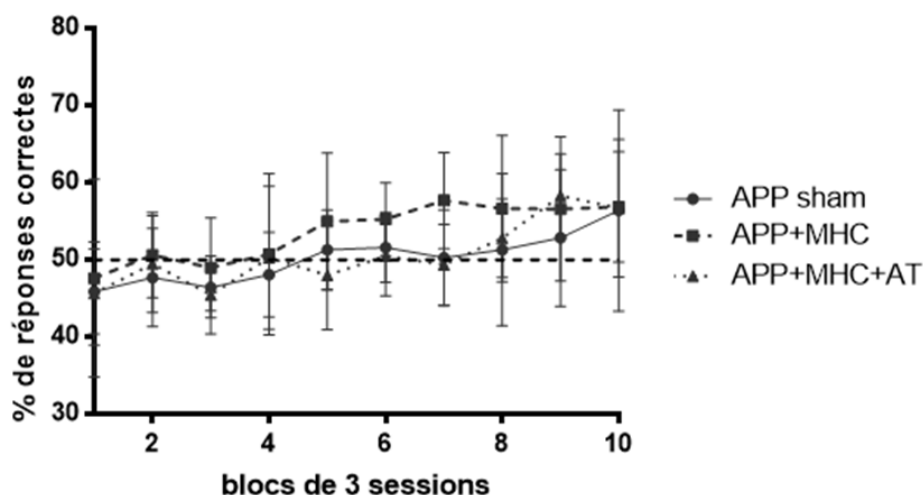


Figure 46: Mémoire visuospatiale évaluée par le pourcentage de réponses correctes au test dPAL pour les APP à 6 semaines post-chirurgie.

APP sham (n=6), APP+MHC (n=10) et APP+MHC+AT (n=8). La ligne pointillée horizontale représente le pourcentage de réponses correctes du au hasard (50%). Les données sont représentées en moyennes \pm SD.

Les groupes APP sham et APP+MHC+AT ne parviennent à s'écarter du hasard qu'après 24 jours de tests (figure 46) alors que le groupe APP+MHC s'en écarte à partir du 12^{ème} jour, avec un pourcentage de réponse correcte qui n'évolue plus à partir du 21^{ème} jour de test. Il n'est pas possible de conclure à une différence entre les groupes et donc à un impact de la MHC ou du traitement par atorvastatine sur la mémoire visuospatiale, la variabilité interindividuelle étant très importante.

Par rapport aux résultats obtenus chez les souris WT, les souris APP présentent une altération de la mémoire visuospatiale dès les premiers jours et jusqu'en fin de test où l'ensemble des groupes APP n'atteint que 52,4% de réponses correctes (figure 47).

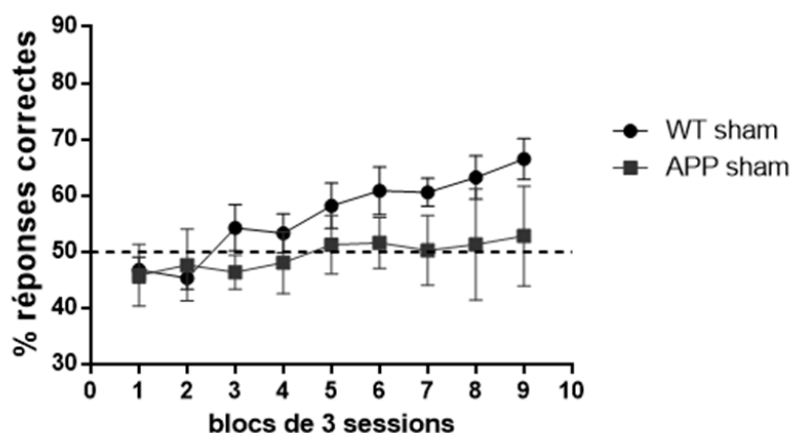


Figure 47: Mémoire visuospatiale évaluée par le pourcentage de réponses correctes au test dPAL, comparaison des groupes APP sham et WT sham à 6 semaines post-chirurgie.

Groupe APP sham, n=6 et groupe WT sham évalué lors de la caractérisation du modèle, n=7. La ligne pointillée horizontale représente le pourcentage de réponses correctes du au hasard (50%). Les données sont représentées en moyennes \pm SD.

Au total: À 6 semaines post-lésion, la mémoire de travail chez la souris APP n'est pas affectée par le transgène, la MHC ou le traitement par atorvastatine. La mémoire visuospatiale semble altérée dès les premiers mois post-chirurgie chez les souris APP, quel que soit le groupe.

IV. Etude morphométrique

Aux temps d'étude 1,5 mois, 6 mois et 12 mois post-chirurgie, une acquisition en imagerie par résonance magnétique a été réalisée avec la séquence 3D TurboRARE T2 afin de calculer les volumes des structures cérébrales d'intérêt (cortex droit, cortex gauche, hippocampe droit, hippocampe gauche). Une TEP au FDG a permis d'évaluer le métabolisme cérébral in vivo. Pour la volumétrie, le nombre de souris par groupe à chaque temps est présenté dans le tableau 3.

Groupe	1,5 mois	6 mois	12 mois
WT sham	7	6	11
WT+MHC	7	6	5
WT+MHC+AT	5	7	4
APP sham	3	7	5
APP+MHC	6	12	4
APP+MHC+AT	4	8	6

Tableau 3: Effectifs, par groupe et par temps, pour lesquels une acquisition IRM a été réalisée.

Pour l'étude du métabolisme cérébral in vivo, les effectifs par groupe et par temps sont présentés dans le tableau 4.

Groupe	1,5 mois	6 mois	12 mois
WT sham	7	6	10
WT+MHC	7	6	8
WT+MHC+AT	8	7	9
APP sham	3	7	7
APP+MHC	5	12	7
APP+MHC+AT	7	8	6

Tableau 4: Effectifs, par groupe et par temps, pour lesquels une acquisition TEP-FDG a été réalisée.

Etant donné les effectifs réduits ($n < 7$) dans différents groupes et à différents temps, l'étude n'est à ce stade que descriptive.

A. À 1,5 mois post-chirurgie

La volumétrie et le SUV moyen des structures d'intérêts sont présentés pour les groupes WT et APP à la figure 48 et à la figure 49 respectivement.

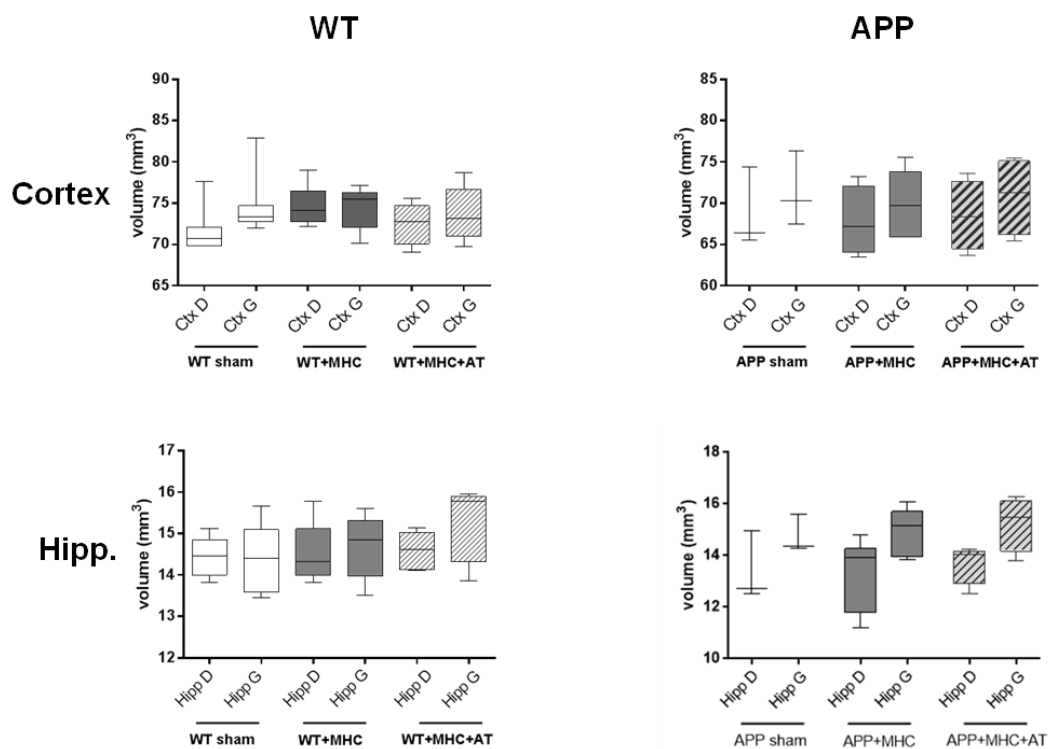


Figure 48: Volumétrie des structures corticales et hippocampiques à 1,5 mois post-chirurgie.

Volumes (en mm^3) des structures cérébrales : cortex droit (CTX D), cortex gauche (CTX G), hippocampe droit (HIP D) et hippocampe gauche (HIP G) à 1,5 mois post-chirurgie pour les groupes WT sham, WT+MHC, WT+MHC+AT, APP sham, APP+MHC et APP+MHC+AT.

A 1,5 mois post-chirurgie, il semble que les cortex et les hippocampes ipsilatéraux aient un volume supérieur aux structures contralatérales allant dans le sens d'un effet de la chirurgie, particulièrement pour les souris APP.

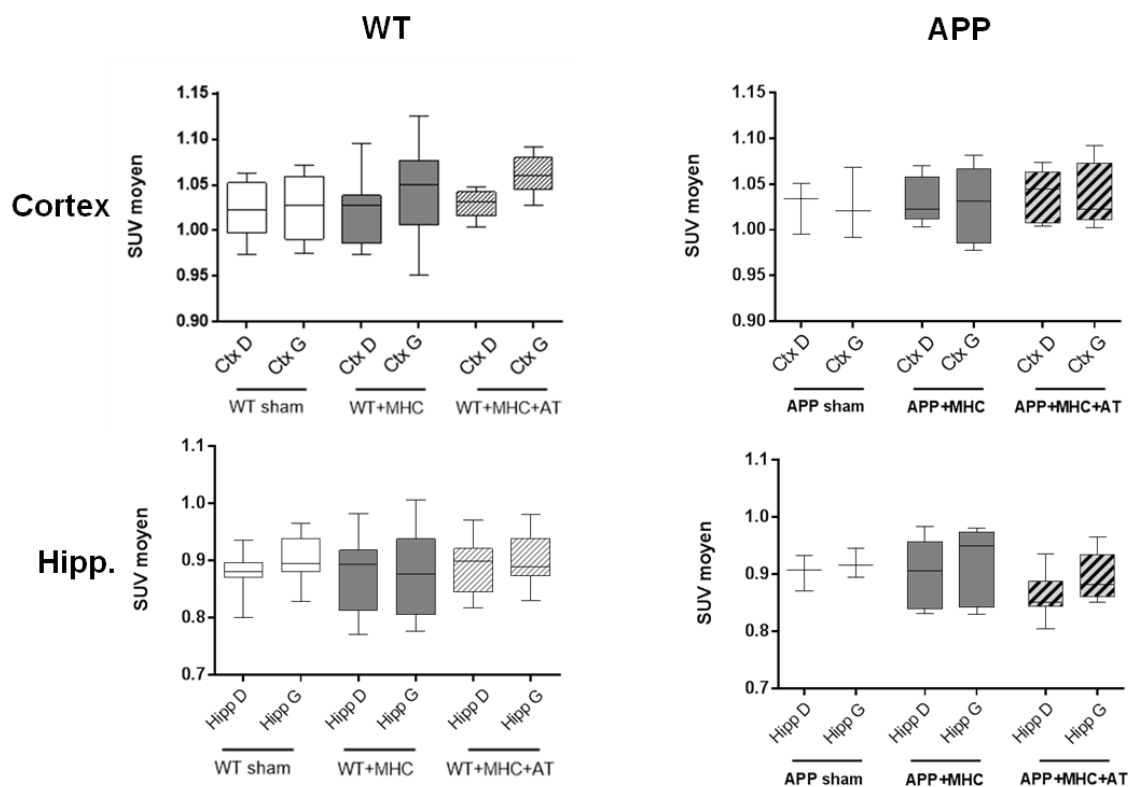


Figure 49: Métabolisme cérébral in vivo à 1,5 mois post chirurgie.

Valeurs de SUV moyens (normalisées par rapport à la valeur de SUV moyen du cerveau) des structures cérébrales: cortex droit (CTX D), cortex gauche (CTX G), hippocampe droit (HIPPO D) et hippocampe gauche (HIPPO G) à 1,5 mois post-chirurgie pour les groupes WT sham, WT+MHC, WT+MHC+AT, APP sham, APP+MHC et APP+MHC+AT.

Pour l'ensemble des groupes WT et APP, le métabolisme semble comparable entre les groupes.

A 1,5 mois, il semble que les volumes des structures (cortex et hippocampe) soient supérieurs du côté ipsilatéral par rapport au côté contralatéral quel que soit le groupe, suggérant un effet de la chirurgie.

B. A 6 mois post-chirurgie

La volumétrie et le SUV moyen des structures d'intérêts sont présentés pour les groupes WT et APP aux figures 50 et 51.

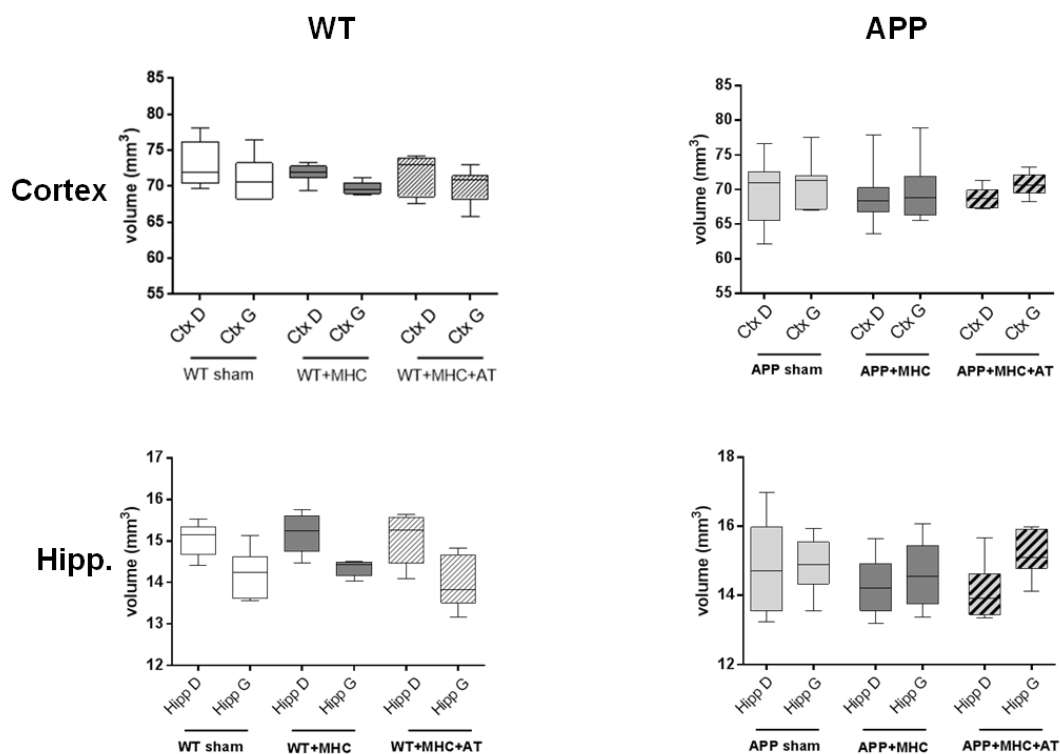


Figure 50: Volumétrie des structures corticales et hippocampiques à 6 mois post-chirurgie.

Volumes (en mm³) des structures cérébrales : cortex droit (CTX D), cortex gauche (CTX G), hippocampe droit (HIPPP D) et hippocampe gauche (HIPPP G) à 6 mois post-chirurgie pour les groupes WT sham, WT+MHC, WT+MHC+AT, APP sham, APP+MHC et APP+MHC+AT.

Pour les trois groupes WT, on observe une inversion par rapport au temps précédant avec des volumes corticaux et hippocampiques diminués du coté ipsilatéral par rapport au coté contralatéral suggérant un effet de la chirurgie. A 6 mois, cet effet ne semble pas apparaitre chez les souris APP. Pour les groupes APP sham et APP+MHC on n'observe pas de différence de volume des structures ipsi et contralatérale. Le groupe APP+MHC+AT présente par contre un volume cortical et hippocampique qui semble supérieur du coté ipsilatéral.

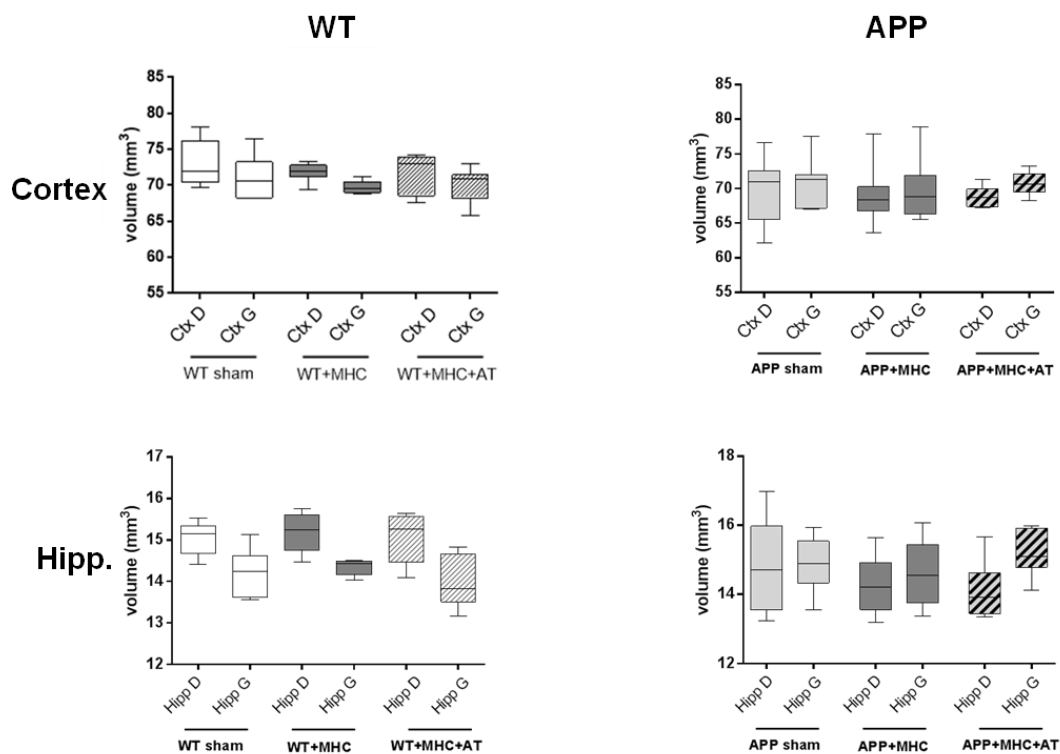


Figure 51: Métabolisme cérébral in vivo à 6 mois post-chirurgie.

Valeurs de SUV moyens (normalisées par rapport à la valeur de SUV moyen du cerveau) des structures cérébrales : cortex droit (CTX D), cortex gauche (CTX G), hippocampe droit (HIPP D) et hippocampe gauche (HIPP G) à 6 mois post-chirurgie pour les groupes WT sham, WT+MHC, WT+MHC+AT, APP sham, APP+MHC et APP+MHC+AT.

A 6 mois post-chirurgie, il ne semble pas y avoir de différence de métabolisme entre les structures ipsi et contralatérales en fonction des groupes. Il ne semble pas non plus exister de différence entre les groupes WT ou les groupes APP.

C. A 12 mois post-chirurgie

La volumétrie et le SUV moyen des structures d'intérêts sont présentés pour les groupes WT et APP aux figures 52 et 53.

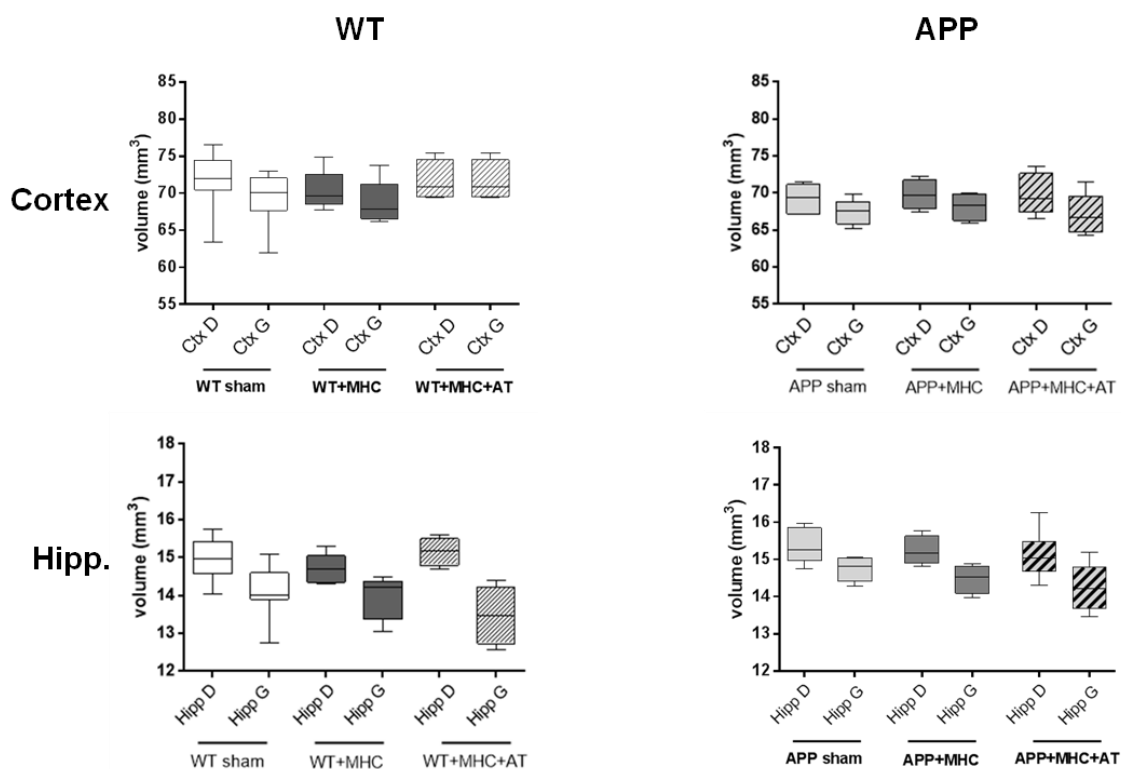


Figure 52: Volumétrie des structures corticales et hippocampiques à 12 mois post-chirurgie.

Volumes (en mm^3) des structures cérébrales : cortex droit (CTX D), cortex gauche (CTX G), hippocampe droit (HIPP D) et hippocampe gauche (HIPP G) à 12 mois post-chirurgie pour les groupes WT sham, WT+MHC, WT+MHC+AT, APP sham, APP+MHC et APP+MHC+AT.

A 12 mois post-chirurgie, l'effet de la chirurgie persiste et semble se confirmer pour l'ensemble des groupes WT alors qu'il apparait nettement chez les souris APP. On observe, en effet, pour tous les groupes de souris WT et APP, des structures corticales (à l'exception des cortex du groupe WT+MHC+AT) et hippocampiques avec des volumes diminués du côté ipsilatéral par rapport au côté contralatéral.

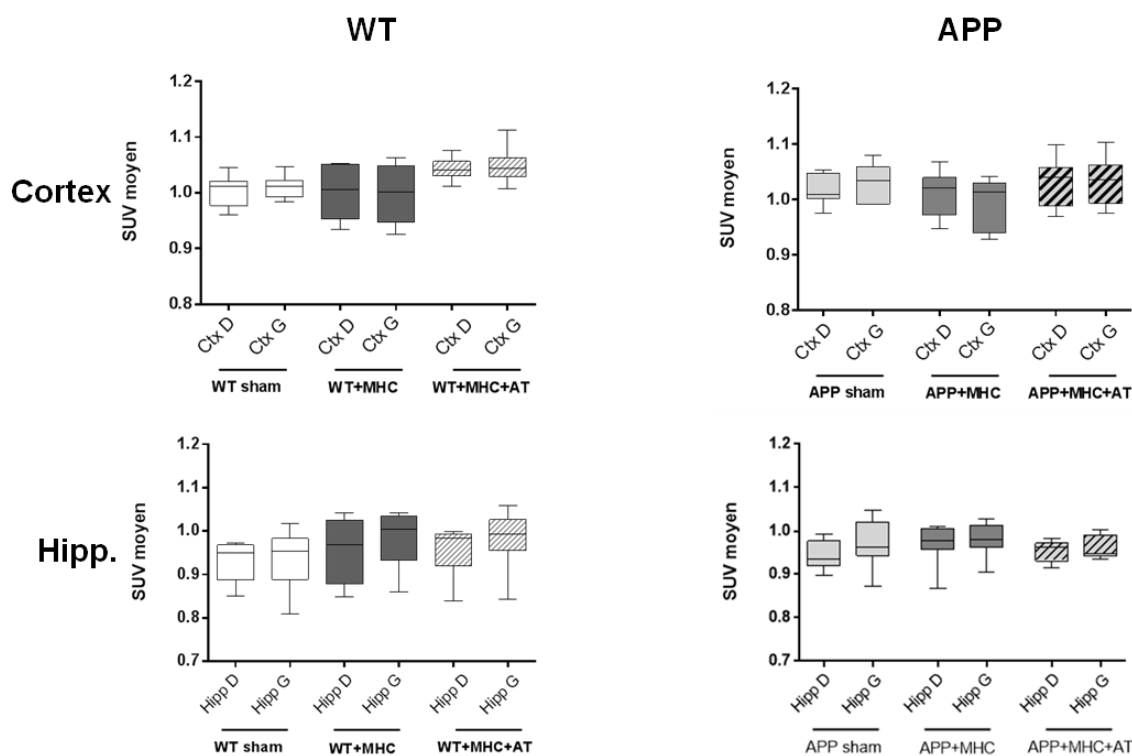


Figure 53: Métabolisme cérébral in vivo à 12 mois post-chirurgie.

Valeurs de SUV moyens (normalisées par rapport à la valeur de SUV moyen du cerveau) des structures cérébrales : cortex droit (CTX D), cortex gauche (CTX G), hippocampe droit (HIPPP D) et hippocampe gauche (HIPPP G) à 12 mois post-chirurgie pour les groupes WT sham, WT+MHC, WT+MHC+AT, APP sham, APP+MHC et APP+MHC+AT.

Pour les groupes APP et WT, il ne semble pas y avoir de différence de métabolisme entre les cortex ipsi et contralatéraux. En revanche, il semble y avoir un métabolisme plus élevé au niveau des cortex des souris WT et APP avec MHC et traitement par rapport aux souris avec MHC non traitées suggérant un possible effet du traitement à long terme. Au niveau de l'hippocampe, on n'observe pas de différence liée à la MHC ou au traitement.

Au total, il est vraisemblable que la chirurgie ait des conséquences sur les volumes corticaux et hippocampiques. Le métabolisme ne semble pas affecté au cours du temps quel que soit le groupe. Le traitement par atorvastatine pourrait avoir un effet sur le métabolisme cérébral à long terme.

V. Données préliminaires d'immunohistochimie

En fin de suivi longitudinal, à 12 mois post-chirurgie, un marquage des dépôts amyloïdes grâce à l'anticorps monoclonal 6E10, a été réalisé sur des coupes de cerveaux de souris APP appartenant aux différents groupes. Un marquage des astrocytes activés par le GFAP a également été réalisé sur des coupes de cerveaux de souris APP et WT appartenant aux différents groupes.

Pour les groupes WT, le marquage au GFAP est présenté à la figure 54.

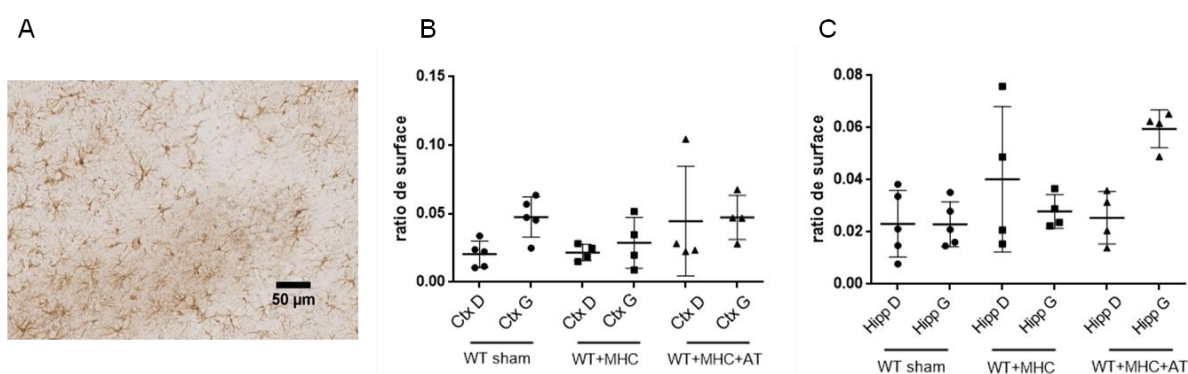


Figure 54: Marquage des astrocytes activés chez les souris WT à 12 mois post-chirurgie.

La photographie illustre le marquage des astrocytes réalisé avec le GFAP (A). Le marquage est représenté en ratio de surface (surface de marquage rapportée à la surface de la zone définie) pour les cortex (B) et les hippocampes (C). Les groupes sont constitués de n=5 dans le groupe WT sham, n=4 dans les groupes WT+MHC et WT+MHC+AT

Les effectifs réduits n'ont pas permis d'analyse statistique. Cependant, d'un point de vue descriptif, il semble que le ratio de surface soit plus important au niveau du cortex ipsilatéral pour les trois groupes suggérant un effet de la chirurgie sur la neuroinflammation à long terme. Au niveau de l'hippocampe, cette différence est particulièrement marquée dans le groupe APP+MHC+AT indiquant un éventuel effet du traitement.

Pour les groupes APP les marquages au GFAP et au 6E10 sont représentés à la figure 55.

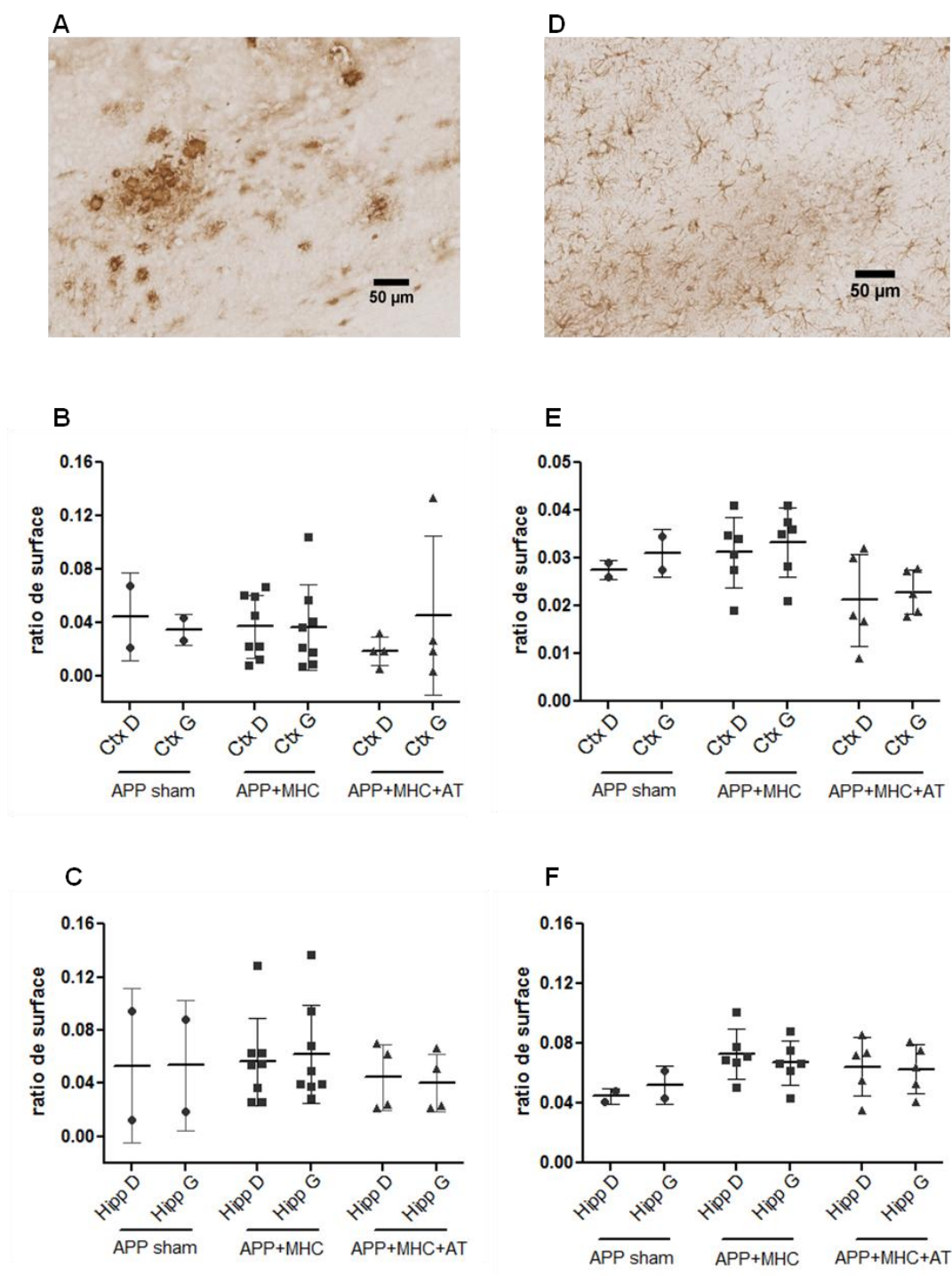


Figure 55: Marquage des dépôts amyloïdes et des astrocytes activés chez les souris APP à 12 mois post-chirurgie.

Photographie illustrant le marquage des dépôts amyloïdes (A). Ratio de surface représentant la surface de dépôts amyloïdes marqués au 6E10 rapportée à la surface de la zone d'intérêt définie pour les cortex droit (CTX D) et gauche (CTX G) (B) et pour les hippocampes droit (HIPP D) et gauche (HIPP G) (C). Photographie illustrant le marquage des astrocytes réalisé avec le GFAP (D). Ratio de surface représentant la surface de marquage des astrocytes activés au GFAP rapportée à la surface de la zone d'intérêt définie pour les cortex droit (CTX D) et gauche (CTX G) (E) et pour les hippocampes droit (HIPP D) et gauche (HIPP G) (F). Les groupes sont constitués de n=2 APP sham, n=8 APP+MHC et n=4 APP+MHC+AT.

Malgré le faible effectif du groupe APP sham et son hétérogénéité, il ne semble pas y avoir d'effet de la MHC sur la quantité de dépôts amyloïdes dans le cortex ou l'hippocampe des souris APP+MHC par rapport aux souris APP sham. Le traitement par atorvastatine semble diminuer légèrement la quantité de dépôts amyloïdes chez les souris APP+MHC+AT par rapport aux souris APP+MHC.

De même, pour le marquage GFAP, les effectifs réduits ne permettent pas de conclure sur les effets de la MHC, mais le groupe semble présenter une tendance à davantage d'activation astrocytaire corticale et hippocampique. Le traitement par atorvastatine semble entraîner une diminution de la quantité d'astrocytes activés par rapport au groupe APP+MHC, en particulier au niveau cortical.

VI. Dosage du cholestérol plasmatique

Le cholestérol total plasmatique a été dosé à partir d'échantillons plasmatiques prélevés à 1,5 mois et à 12 mois post-chirurgie chez les souris WT+MHC, WT+MHC+AT, APP+MHC et APP+MHC+AT afin de savoir, en plus de la pesée régulière des souris, si le traitement par atorvastatine a bien été pris (démonstration indirecte par l'effet hypocholestérolémiant) par les souris au cours de l'étude. Les résultats sont présentés à la figure 56.

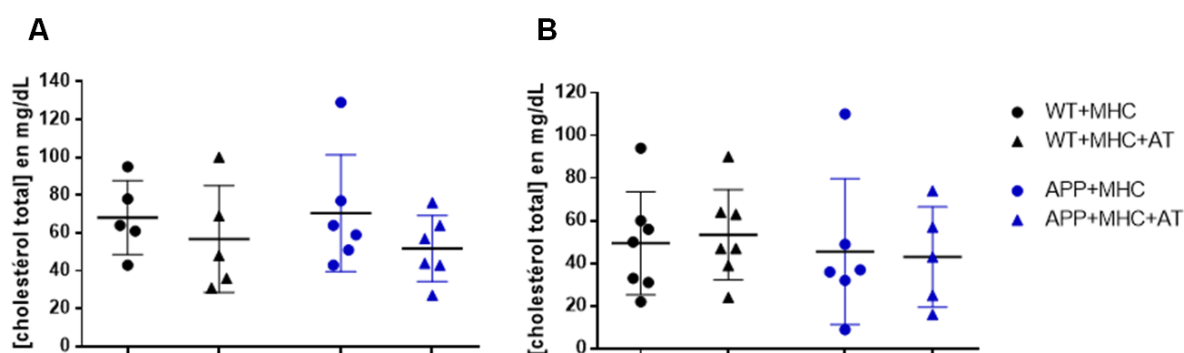


Figure 56: Dosage du cholestérol plasmatique total.

Résultats à 1,5 mois post-chirurgie (A) et à 12 mois post-chirurgie (B). Les dosages ont été effectués sur n=5 souris dans les groupes WT+MHC et WT+MHC+AT, n=6 dans le groupe APP+MHC et n=7 dans le groupe APP+MHC+AT à 1,5 mois et sur n=7 pour les groupes WT+MHC et WT+MHC+AT, n=6 dans le groupe APP+MHC et n=6 dans le groupe APP+MHC+AT à 12 mois. Les résultats sont représentés en moyenne \pm SD.

Pour les deux temps, il ne semble pas exister de différence significative entre groupe traité ou non par atorvastatine. On observe cependant une tendance à une concentration de

cholestérol plasmatique total diminuée chez les souris traitées à 1.5 mois post-chirurgie. Cette tendance n'est pas retrouvée à 12 mois post-chirurgie.

DISCUSSION

L'objectif de ce travail était de mieux comprendre l'impact d'une microhémorragie corticale isolée, sans vasculopathie sous-jacente, dans un contexte « sain » et dans un contexte « pathologique » reproduisant certaines caractéristiques de la MA et la modulation pharmacologique de cet impact.

La caractérisation fonctionnelle du modèle de MHC réalisée chez la souris WT, en dehors de tout contexte pathologique sous-jacent, a permis de mettre en évidence un effet propre de la MHC. Six semaines après la chirurgie, l'évaluation multimodale des souris a montré un impact comportemental de la MHC avec une diminution du niveau d'anxiété et un impact cognitif avec une altération des mémoires de référence spatiale et visuospatiale. L'activité locomotrice spontanée et la mémoire de travail n'ont, en revanche, pas été affectées par la présence de la MHC. L'évaluation en TEP a aussi montré un impact de la MHC sur le métabolisme cérébral in vivo avec un hypométabolisme cortical et hippocampique. Le modèle de MHC a montré une sensibilité à la modulation pharmacologique par atorvastatine avec une amélioration des fonctions cognitives testées chez les souris traitées. Le suivi longitudinal a permis de montrer que l'effet de la MHC persiste au cours du temps, avec un impact sur la mémoire de référence spatiale encore présent à 12 mois post-chirurgie. L'effet cognitif bénéfique du traitement par atorvastatine semble également persister en maintenant le niveau de performance au test des souris traitées au niveau des souris sham. L'impact sur le niveau d'anxiété ne perdure pas au cours du temps.

Dans un contexte pathologique, chez des souris transgéniques APP reproduisant les lésions amyloïdes de la MA sans atteinte cérébrovasculaire, l'impact de la MHC sur le niveau d'anxiété est retrouvé précocement : une diminution du niveau d'anxiété est observée avec un effet de la modulation pharmacologique par atorvastatine. En revanche, sur le plan cognitif, il n'a pas été possible de démontrer un effet propre, précipitant ou aggravant, de la MHC chez les souris APP qui présentent dès le premier temps d'évaluation une altération marquée des mémoires de référence spatiale et visuospatiale liée au transgène. La mémoire de travail des souris APP, comparable à 6 semaines à celle des souris WT, n'a pas été affectée par la MHC. L'activité locomotrice spontanée des souris APP n'a pas non plus été modifiée par la MHC. Les résultats préliminaires d'immunohistochimie semblent montrer un effet à long terme de la MHC et du traitement par atorvastatine. A 12 mois post-chirurgie, le nombre d'astrocytes activés apparaît plus important en présence de la MHC au niveau du cortex et de l'hippocampe. Le traitement par atorvastatine semble entraîner une diminution de la quantité d'astrocytes activés en particulier au niveau cortical. Sur les dépôts amyloïdes, la MHC ne

paraît pas avoir d'effet mais la modulation pharmacologique par atorvastatine semble diminuer leur quantité dans le cortex et l'hippocampe.

Le suivi volumétrique des structures cérébrales semble montrer une influence de la chirurgie avec des volumes corticaux et hippocampiques diminués du côté lésé à 12 mois chez tous les groupes de souris WT et APP, indépendamment de la MHC.

I. Effet propre de la MHC : un effet étendu dans le temps et dans l'espace

Les différents résultats de cette étude ont permis de montrer un impact précoce, cognitif et/ou comportemental, de la MHC chez les souris WT et les souris APP, indépendamment d'un contexte pathologique vasculaire. Sur le plan cognitif, l'effet de la MHC reste perceptible dans le temps jusqu'à 12 mois post-chirurgie chez les souris WT tandis que chez les souris APP il n'a pas été possible de le démontrer.

A. En condition « saine »

Il n'existe que peu de données comportementales incluant des tests cognitifs sur des modèles d'hémorragie intracérébrale. Sur des modèles de macrohémorragie intracérébrale, les déficits moteurs sont le plus souvent explorés. On relève ainsi pour ces modèles (rats et souris) des déficits moteurs survenant assez rapidement après l'induction de la lésion (1 à 2 jours après) avec une résolution progressive après environ 1 mois (Hua et al., 2002; MacLellan et al., 2009; Nakamura et al., 2004). Aucune modification du niveau d'anxiété n'a été montrée en post lésionnel (Hartman et al., 2009; MacLellan et al., 2009). Au plan cognitif, MacLellan et al., n'ont pas démontré, un mois après l'induction de la lésion, d'altération de la mémoire spatiale évaluée par la piscine de Morris et le RAM. Hartman et al., 2009 ont en revanche démontré des déficits d'apprentissage 2 semaines après l'induction de la lésion mais pas de déficit de la mémoire spatiale.

Parmi les modèles de microhémorragie, assez peu nombreux, l'impact cognitif de ces microhémorragies est également très peu étudié. En 2016, He et al., ont montré une altération de la mémoire de référence spatiale (évaluée par le test de la piscine de Morris) une semaine après l'induction de 5 microhémorragies corticales par irradiation laser (He et al. 2016). Bien

que ce modèle présente des MHC multiples et une évaluation cognitive plus précoce, il est intéressant de noter que les MHC sont corticales, indépendantes vis-à-vis d'une pathologie vasculaire sous-jacente et que l'altération de la mémoire de référence spatiale démontrée concorde avec les résultats présentés dans ce travail. Un autre modèle de MHC a montré des résultats intéressants sur le plan cognitif. Il s'agit d'un modèle de démence vasculaire induit par un régime alimentaire spécifique causant une hyperhomocystéinémie. Ce modèle présente de nombreuses microhémorragies disséminées au niveau du cortex entorhinal et pariétal en majorité, du cortex frontal et de l'hippocampe. Après 11 semaines de régime alimentaire particulier, une neuroinflammation, une augmentation de l'expression et de l'activité des MMP 2 et 9, ainsi qu'une altération de la mémoire spatiale évaluée par le radial arm water maze ont été retrouvées sans altération locomotrice (Sudduth et al., 2013). Ces résultats vont dans le même sens que ceux obtenus dans notre travail sur la mémoire spatiale. Il faut cependant noter, dans le modèle de Sudduth et al., qu'outre l'atteinte vasculaire avec les nombreuses MHC, l'activation des metalloprotéinases et l'atteinte neuroinflammatoire, l'hyperhomocystéinémie induite a pu, elle-même, participer aux troubles cognitifs (Belarbi et al. 2012; Sudduth et al. 2013; Troen et al. 2008). Il est donc difficile de déterminer si l'altération de la mémoire spatiale observée est en lien avec un effet propre des MHC dans ce modèle. Notre travail, avec la modélisation de la MHC indépendante de toute pathologie, permet de montrer avec certitude un rôle propre de cette petite lésion vasculaire sur la cognition.

Dans notre modèle de MHC, l'atteinte cognitive concerne la mémoire de référence spatiale (évaluée par le labyrinthe de Barnes) et la mémoire visuospatiale (évaluée par le test dPAL). Ces deux tests impliquent fortement l'hippocampe. Le test du labyrinthe de Barnes nécessite un apprentissage et une mémoire spatiale qui font appel au cortex entorhinal et à l'hippocampe, dont les cellules de lieu notamment, communiquent pour former une carte cognitive permettant la navigation allocentrique (Vorhees et al., 2014). Par ailleurs, dans ce test, bien que les repères internes soient évités, il est possible que la souris ait recours à une navigation egocentrique, qui fait appel au cortex entorhinal avec notamment les cellules de direction de tête, mais également à d'autres structures comme le thalamus, le striatum dorsal, l'hippocampe ou encore le cortex pariétal (Sherrill et al., 2013; Vorhees et al., 2014). Il y a donc des structures cérébrales communes impliquées par les deux systèmes. Concernant le test de dPAL, des travaux ont permis de montrer le rôle de l'hippocampe et notamment de l'hippocampe dorsal dans ce test (Kim et al., 2015; Talpos et al., 2009). L'altération des fonctions cognitives évaluées par ces deux tests indique bien une dysfonction hippocampique

dans notre modèle. La MHC étant induite au niveau cortical, il faut envisager qu'elle puisse induire des effets cognitifs « à distance » d'un point de vue spatial. On peut également noter un effet « à distance » dans le temps avec un effet de la MHC qui conduit à une progression plus marquée du déclin cognitif et à un impact encore perceptible à 12 mois sur la mémoire de référence spatiale. Ces effets dans le temps sont indépendants de ceux observés avec le vieillissement de la souris. En effet, la diminution de l'activité locomotrice, l'augmentation du niveau d'anxiété, et l'altération générale des performances en mémoire de référence spatiale mises en évidence dans tous les groupes concordent avec une étude sur le vieillissement réalisée sur différents groupes d'âges de souris C57Bl6 évaluées par une batterie de tests neurocomportementaux (Shoji et al., 2016).

Il est intéressant de noter que chez l'homme, des études réalisées sur des cohortes issues de la population générale ont montré une association entre la présence de MHC notamment lobaires et des altérations cognitives affectant la mémoire, les fonctions exécutives (Akoudad et al. 2016), les fonctions d'orientation (Li et al. 2017) et visuospatiales (Paradise et al. 2018). Buzsaki et al., ont montré que les réseaux neuronaux fournissant l'information spatiale chez le rongeur sont les mêmes que ceux impliqués dans les mémoires épisodiques et sémantiques chez l'homme. Il a aussi été suggéré que la mémoire sémantique serait une extension du système d'encodage spatial utilisé par le rongeur lorsque l'on teste son apprentissage et sa mémoire spatiale allocentrique (Buzsaki et al., 2013; Vorhees et al., 2014). Les atteintes cognitives retrouvées dans le modèle de MHC présenté dans ce travail semblent donc en faire un bon outil translationel. Les études cliniques étudiant l'impact des MHC sur la cognition évoquent souvent deux hypothèses : d'une part celle impliquant un effet propre des MHC dont la présence pourrait perturber le fonctionnement de réseaux neuronaux, d'autre part celle impliquant les effets de vasculopathies sous-jacentes dont les MHC ne seraient que le reflet (Akoudad et al. 2016). L'étude du modèle de MHC réalisée ici montre qu'il y a vraisemblablement un effet propre des MHC, ce qui n'exclut pas le rôle important des vasculopathies sous-jacentes chez l'homme. Enfin, la MHC a diminué le niveau d'anxiété des souris au temps précoce du suivi. Chez l'homme, la présence de MHC dans la population générale a été associée à des syndromes dépressifs mais pas anxieux (Direk et al. 2016).

B. En condition pathologique

Chez la souris APP, les tests cognitifs réalisés n'ont pas permis de mettre en évidence l'effet de la MHC sur les mémoires de référence spatiale et visuospatiale, déjà altérées dès le début du suivi. En effet, chez les souris APP, dès 6 semaines post-chirurgie, la mémoire de référence spatiale évaluée au labyrinthe de Barnes, est altérée par rapport aux souris WT. A ce stade du suivi, les souris sont âgées d'environ 4 mois. Ce résultat est cohérent avec les données de la littérature montrant une atteinte de cette mémoire dès 4 mois dans la lignée J20 (Webster et al., 2014; Wright et al., 2013) et maintenue avec l'âge (Karl et al., 2012). Par ailleurs, le niveau d'anxiété ne diffère pas de celui des souris WT mais les souris APP montrent une hyperactivité locomotrice, bien décrite (Wright et al. 2013). En revanche, les souris APP n'ont pas présenté d'altération de la mémoire de travail évaluée par le test d'alternance spontané dans notre étude, contrairement à ce qui a été observé par Galvan et al. (Galvan et al. 2006). La lignée J20 n'a, à ce jour, pas été testée avec le test de dPAL, mais, dans notre modèle, il est probable que les lésions neurodégénératives induisent des déficits cognitifs précoces, avant même la présence de dépôts amyloïdes, et que cet impact soit déjà trop important pour pouvoir déceler l'effet de la MHC sur les fonctions cognitives 6 semaines après la lésion.

Cependant, d'autres éléments permettent de démontrer un impact de la MHC malgré les lésions neurodégénératives. En effet, à 6 semaines post-chirurgie, une diminution du niveau d'anxiété a été observée en présence de MHC. Bien que les données d'immunohistochimie soient préliminaires, il semblerait que la MHC se manifeste également à 12 mois post-chirurgie avec une augmentation des astrocytes activés au niveau cortical et surtout hippocampique par rapport aux souris sham. Ces différents éléments suggèrent, comme chez la souris WT, un effet de la MHC étendu dans le temps et dans l'espace par rapport à l'induction de la lésion.

L'étude des MHC dans des lignées de souris APP concerne essentiellement les modèles transgéniques d'AAC développant spontanément des MHC. En 2014, une étude intéressante a reproduit le modèle d'induction de MHC par un régime alimentaire particulier entraînant une hyperhomocystinémie chez la souris APP/PS1. Chez cette souris transgénique, indépendante d'un contexte d'AAC, la répartition des dépôts amyloïdes a été modifiée avec une diminution au niveau du parenchyme cérébral et une augmentation au niveau des parois vasculaires. Les MHC induites ont été plus nombreuses chez la souris APP/PS1 que chez la WT, accompagnée

de l'induction de métalloprotéinases (MMP2 et 9). Après 6 mois d'administration du régime alimentaire particulier, les souris APP/PS1 ont présenté une altération cognitive plus sévère que les souris WT soumises au même régime ou que les souris APP/PS1 sans régime particulier mettant en évidence un effet additif des pathologies cérébrovasculaire et amyloïde sur la cognition (Sudduth et al., 2014). Néanmoins, dans les travaux de Sudduth et al., les MHC étaient le reflet de l'atteinte cérébrovasculaire induite par l'hyperhomocystéinémie et il n'est pas possible de leur attribuer un effet propre dans un tel contexte.

Il est très difficile de pouvoir s'affranchir totalement de l'atteinte vasculaire amyloïde chez les souris APP. Il y a, parmi elles, des souris qui présentent de façon spontanée et plus ou moins précoce des dépôts amyloïdes vasculaires et qui constituent des modèles d'AAC (Jäkel et al., 2017). Cependant, chez les souris APP qui ne sont pas des modèles d'AAC, la présence de dépôts amyloïdes vasculaires tardifs n'est pas exclue. C'est le cas par exemple de la lignée J20 que nous avons utilisée pour cette étude. Cette lignée présente des dépôts amyloïdes importants au niveau cortical et surtout hippocampique à partir d'environ 6 mois de vie (Mucke et al. 2000) et on peut retrouver chez la souris J20 âgée (12 mois) une atteinte vasculaire (Tong et al. 2009). Cette atteinte vasculaire n'est toutefois pas présente dans les premiers temps du suivi.

Les études cliniques étudiant les MHC chez les patients atteints de MA se heurtent à des difficultés semblables. En effet, les MHC, marqueurs reconnus des pathologies vasculaires cérébrales, présentent de nombreuses associations avec la MA. La fréquence de pathologie hypertensive et d'AAC est élevée chez les patients atteints de MA (entre 80 et 95% des patients atteints de MA présentent une AAC à l'autopsie) (Cordonnier et al., 2011; Shams et al., 2016) et il semble exister une intrication complexe entre les pathologies cérébrovasculaires et les processus neurodégénératifs de la MA. Des études se sont intéressées à l'impact cognitif des MHC dans la MA, ne parvenant pas à démontrer leur effet du fait du faible nombre d'études, des variabilités méthodologiques sur la prise en compte du nombre de MHC ou sur les moyens d'évaluation des fonctions cognitives (Goos et al., 2009; Sepehry et al., 2016). Il est aussi possible que l'effet des MHC soit trop subtil ou minime par rapport au déficit cognitif lié à la MA elle-même et que le poids des lésions neurodégénératives soit donc trop important pour déceler l'impact des MHC (Amir A. Sepehry et al. 2016).

II. Effet de la modulation pharmacologique par atorvastatine

Dans cette étude, le traitement par atorvastatine a été introduit immédiatement après la chirurgie à la dose de 5 mg/kg/j incorporée dans l'alimentation quotidienne de façon à ne pas recourir à un gavage au long cours qui aurait été traumatisant pour les animaux. L'atorvastatine a été choisie pour ses propriétés lipophiles qui lui permettent d'atteindre le SNC (McFarland et al., 2014; Shitara et al., 2006). La posologie utilisée a été retenue en se basant sur des données expérimentales publiées dans la littérature (Zhang et al. 2013). La nourriture contenant l'atorvastatine était distribuée pour un ou deux jours permettant un contrôle régulier de la prise alimentaire. En dehors du suivi du poids des animaux, un dosage du cholestérol plasmatique a été réalisé afin d'obtenir une preuve indirecte de la prise du traitement. A 1,5 mois post-chirurgie, les groupes WT et APP traités semblent en effet présenter un taux de cholestérol plus bas que les groupes non traités. Cette différence n'est plus visible à 12 mois post-chirurgie. Des mécanismes de régulation positive de l'HMG-CoA réductase ont été observés chez des souris traitées sur une courte durée avec de fortes doses de statine lipophile (simvastatine) affectant la synthèse de cholestérol cérébral (Thelen 2005). De tels mécanismes pourraient être impliqués lors d'un traitement administré sur une longue période perturbant ainsi une action hypocholestérolémiant stable et durable de la statine (Barone et al., 2014). L'absence d'effet sur le cholestérol au long cours chez nos souris ne signifie donc pas que le traitement n'a pas été pris (ce qui est objectivé par ailleurs par la prise effective de nourriture journalière et la prise de poids), mais bien que ses effets ne sont pas forcément en lien avec l'effet hypocholestérolémiant de la statine.

Ce travail a mis en évidence un effet neuroprotecteur de l'atorvastatine chez les souris WT en améliorant les fonctions cognitives évaluées (mémoire de référence spatiale et mémoire visuospatiale). Cet effet est principalement notable à 1,5 mois post-chirurgie mais semble perdurer au cours du suivi longitudinal en maintenant le niveau de performance au test du labyrinthe de Barnes des souris traitées au même niveau que les souris du groupe sham et en prévenant le déclin observé dans le groupe avec MHC sans traitement. Les statines, en raison de leurs effets pléiotropes (décrits dans l'introduction IV, C, 2.) ont été étudiées dans diverses atteintes neurologiques. Leur utilisation serait bénéfique dans les accidents vasculaires cérébraux ischémiques en améliorant la reperfusion, en diminuant la sévérité et la mortalité post-ischémie (Hong et al., 2015). L'intérêt des statines dans les hémorragies cérébrales est plus controversée en raison d'un éventuel risque hémorragique. Une revue de

2016 a relevé que l'ensemble des données sur les statines suggèrent qu'elles n'entraînent pas d'augmentation de la fréquence et du nombre de MHC mais que des études supplémentaires seraient nécessaires pour définir des populations spécifiques de patients pour lesquels l'utilisation de statine pourrait augmenter l'incidence des MHC ou des hémorragies intracérébrales (Van Matre et al., 2016). Cette même revue indique que la littérature disponible ne soutient pas la théorie selon laquelle les statines augmenteraient la survenue des hémorragies intracérébrales (HIC) (Van Matre et al. 2016). Il n'y a pas d'études précliniques dans des modèles de MHC. Celles dont on dispose concernent le bénéfice potentiel des statines dans des modèles d'hémorragie intracérébrale. Une étude réalisée sur un modèle d'HIC par injection de sang autologue chez le rat a montré que l'administration de simvastatine (2 mg/Kg) avait entraîné une résorption accélérée de l'hématome cérébral. Le mécanisme proposé impliquerait l'activation par la simvastatine des récepteurs PPAR- γ ce qui entraînerait l'augmentation de l'expression du récepteur membranaire CD36 présent au niveau des cellules microgliales et des macrophages. Ceci favoriserait une polarisation microgliale de type M2 (neuroprotectrice) permettant de faciliter la phagocytose des érythrocytes (Wang et al., 2018). Dans un autre modèle d'HIC induite par injection de collagénase chez le rat, l'administration d'atorvastatine à 2, 5 ou 10mg/kg a conduit à une diminution du contenu hémisphérique en eau, une diminution du TNF- α (cytokine pro-inflammatoire majeure) dans le plasma et le tissu entourant l'hématome ainsi que de l'infiltration microgliale. Une diminution des déficits neurologiques post-HIC a aussi été observée et enfin, une augmentation du niveau d'IL-10 (qui inhibe la production des cytokines inflammatoires) dans le plasma et le tissu entourant l'hématome. Dans cette étude, le rôle neuroprotecteur de l'atorvastatine réside dans sa capacité à inhiber la réponse inflammatoire (Ewen et al. 2013). Un autre modèle d'HIC chez des rats traités par atorvastatine ou simvastatine a montré, chez les animaux traités, une diminution du volume de l'hématome, une amélioration du déficit neurologique et une diminution de la perte tissulaire associée à une augmentation de la neurogénèse (Karki et al. 2009). Par divers mécanismes, notamment anti-inflammatoires, les statines présentent vraisemblablement un intérêt dans les hémorragies intracérébrales. Dans le cas des MHC, il est vraisemblable que des réactions cellulaires et tissulaires soient communes avec les hémorragies plus massives. Ainsi, une étude récente réalisée chez la souris s'est intéressée à la réponse inflammatoire faisant suite à l'induction d'une MHC unique par irradiation laser. Cette réaction était caractérisée par l'infiltration de leucocytes, la migration et la prolifération précoce de cellules microgliales et une activation astrocytaire légèrement retardée. Cette réponse inflammatoire a persisté au

moins deux semaines et impactait le microenvironnement cérébral adjacent (Ahn et al, 2018). On peut supposer, d'après les travaux sur les HIC, que l'action anti-inflammatoire des statines pourrait être intéressante dans le cadre des MHC. Dans notre modèle, et dans l'attente des résultats immunohistochimiques spécifiques qui vont être menés, l'action bénéfique de l'atorvastatine observée au temps précoce du suivi pourrait ainsi être en partie expliquée par un effet anti-inflammatoire.

Chez les souris APP, le traitement par atorvastatine a montré un effet précoce à 1,5 mois post-chirurgie. La prise de traitement s'est en effet opposée à l'effet anxiolytique observé chez les animaux avec la MHC, ramenant le niveau d'anxiété à celui des animaux Sham. Pour autant, on ne peut retenir un effet anxiogène des statines, une étude pré-clinique ayant montré un effet anxiolytique de la simvastatine administrée (10 mg/Kg/j) pendant 4 semaines à des rats (Wang et al., 2009). Sur la cognition, aucun effet du traitement n'a pu être mis en évidence. En revanche, les résultats préliminaires d'immunohistochimie semblent montrer un effet de l'atorvastatine à 12 mois post-chirurgie sur l'activation astrocytaire, en particulier au niveau cortical, et sur les dépôts amyloïdes, diminués dans le cortex et l'hippocampe.

De nombreuses études précliniques se sont penchées sur l'effet des statines dans des lignées de souris APP. Dans une lignée modélisant l'AAC, la lignée transgénique APP23, un traitement par atorvastatine (10 mg/kg/j) incorporé dans l'alimentation a été administré, selon le groupe de souris, à partir de 8, 12 ou 16 mois de vie jusqu'à 24 mois afin d'évaluer la présence de MHC par IRM (T2*). Même si l'impact sur la prévention des MHC n'a pu être démontré en fonction de la durée de traitement, le risque hémorragique attribué aux statines ne l'a pas été non plus. Les auteurs ont, en partie, expliqué leurs résultats par la grande variabilité du nombre de MHC présentes chez les souris APP23 à 24 mois et les effectifs trop faibles, mais renaient plutôt un effet positif de la statine dans la diminution des MHC (Reuter et al. 2016). On pourrait aussi s'interroger sur l'âge auquel l'atorvastatine a été introduite par rapport à l'évolution de l'AAC dans ce modèle. En effet, dans la lignée APP23, l'apparition des dépôts amyloïdes vasculaires a lieu entre 9 et 12 mois de vie (Jäkel et al., 2017). Il est possible que l'initiation du traitement à 8 mois de vie ne soit pas suffisamment en amont des processus physiopathologiques engagés. Dans notre modèle, le traitement par statine débute dès l'induction de la MHC, à 2.5 mois de vie, soit bien avant que les lésions neurodégénératives ne soient constituées (Wright et al. 2013). Dans une étude réalisée chez la souris APP de la lignée J20 (Tong et al. 2009), un traitement par simvastatine (20 mg/kg/j) de 8 semaines instauré chez des souris âgées de 10 mois, a permis d'améliorer à 12 mois, la

réactivité vasculaire et le flux sanguin cérébral. Dans le parenchyme cérébral, le stress oxydant et l'inflammation ont également été diminués chez les souris traitées. Chez les souris APP, la microglie et les astrocytes activés augmentent et se retrouvent au cœur et autour des plaques amyloïdes respectivement. Le traitement par simvastatine a permis, dans cette étude, de diminuer la surface et l'intensité de marquage au GFAP des astrocytes activés au niveau du cortex. La quantité de peptide A β soluble a également diminuée chez les souris traitées mais pas les plaques matures constituées au niveau du cortex et de l'hippocampe. Chez ces souris âgées, les 8 semaines de traitement par simvastatine instauré à 10 mois de vie n'ont pas permis de normalisation sur le plan cognitif. Les auteurs suggèrent que ces résultats apportent plusieurs éléments de compréhension. Tout d'abord, les neurites dystrophiques associés aux plaques amyloïdes résulteraient en partie, d'un stress oxydant et d'une inflammation locale induits par les astrocytes et les cellules microgliales activées et qu'un traitement par statine pourrait préserver la structure neuronale. Par ailleurs, comme leur période de traitement par simvastatine trop courte ou à une dose insuffisamment élevée ne permet pas d'améliorer les fonctions cognitives, cela suggère qu'un traitement à une posologie plus importante et initié plus précocement pourrait être nécessaire pour avoir un effet cognitif bénéfique et être plus efficace sur l'ensemble du processus amyloïdogénique (Tong et al. 2009). Une autre étude intéressante a été réalisée en 2012 sur des souris APP de la lignée Tg2576 (Kurata et al. 2012). Deux statines ont été testées chez ces souris, l'atorvastatine (30 mg/kg/j) et la pitavastatine (3 mg/kg/j). Le traitement a été initié à 5 mois de vie (en amont de la formation des dépôts amyloïdes) par gavage oral pour une période de 5 à 15 mois selon les groupes. Une évaluation cognitive et des marquages immunohistochimiques ont été réalisés après 5, 10 et 15 mois de traitement. Cette étude s'est notamment intéressée à l'unité neurovasculaire comprenant l'endothélium, les neurones et les cellules non neuronales comme les astrocytes en tant qu'unité fonctionnelle. Les résultats de cette étude ont montré une amélioration de la mémoire (évaluée avec le RAM) à 15 et 20 mois de vie soit après 10 et 15 mois de traitement sans différence du cholestérol plasmatique entre les groupes traités et non traités. La surface occupée par les plaques amyloïdes était plus faible dans les groupes APP traités par rapport au groupe APP non traité. L'unité neurovasculaire a été étudiée grâce à un marqueur spécifique des cellules endothéliales, au collagène de type IV (constituant essentiel de la matrice extracellulaire) présent entre les cellules endothéliales et les pieds astrocytaires, connectant et stabilisant la structure, et aux astrocytes activés. La structure fondamentale de la membrane basale de l'unité neurovasculaire, altérée à 20 mois chez les souris APP non traitées, a été préservée grâce au traitement par statine. Une diminution des astrocytes activés

entourant les plaques amyloïdes ainsi que des neurones positifs au marquage des MMP-9 (métalloprotéinases) a aussi été constatée chez les souris traitées. Les MMP-9 participent au maintien de l'unité neurovasculaire mais elles peuvent favoriser son altération en cas d'activation excessive. Les auteurs de cette étude suggèrent que l'activation des MMP-9, présente chez les souris APP, entraîne une altération de l'intégrité de l'unité neurovasculaire, limitée grâce aux statines par leurs effets sur la prolifération astrogliale et l'activation des MMP-9 neuronales. De plus, les pieds astrocytaires participent à la régulation locale du flux sanguin cérébral et à la coordination de l'activité neuronale. L'altération de l'unité neurovasculaire causerait ainsi une perte de ces fonctions astrocytaires (Kurata et al. 2012).

Les résultats obtenus dans notre étude chez la souris APP, avec une possible diminution des dépôts amyloïdes et des astrocytes activés au niveau du cortex et de l'hippocampe et une absence d'amélioration cognitive des souris traitées par atorvastatine, semblent cohérents avec ces différentes observations. Ces résultats peuvent être expliqués par les propriétés anti-inflammatoires des statines et leur capacité à augmenter la clairance et diminuer la production de peptide A β (Shinohara et al. 2010). Concernant l'impossibilité de montrer une amélioration sur le plan cognitif malgré une initiation précoce, en amont des dépôts amyloïdes, il est possible que la posologie utilisée ou la durée du traitement soient insuffisantes. En effet, les résultats des études précliniques évoquées semblent montrer le bénéfice d'un traitement initié le plus précocement par rapport à la pathologie, à une posologie supérieure et sur une durée plus longue.

Il est intéressant de noter que les observations cliniques sur l'utilisation des statines et le risque de démence et de MA semblent aller dans le même sens. Une revue systématique de la littérature (études observationnelles et essais contrôlés randomisés) est arrivée à la conclusion qu'initiales à un âge déjà avancé, les statines ne semblent pas prévenir un déclin cognitif ou une démence dans les années suivant l'initiation mais n'exclue pas un effet bénéfique sur la cognition en cas d'initiation plus précoce ou d'un traitement de longue durée (Power et al., 2015). Des études observationnelles ont montré une association entre la prise précoce de statines (définie par une prise de statine avant l'instauration du traitement par inhibiteur de l'Acétylcholine Estérase) et une progression ralentie de la MA chez des patients atteints de MA légère à modérée (Lin et al. 2015) ainsi qu'une tendance à un déclin cognitif diminué chez des patients TCL (Smith et al., 2017). Les observations précliniques et cliniques semblent suggérer un intérêt précoce voire préventif des statines dans ces contextes physiopathologiques.

III. Forces et limites de cette étude

Ce travail a permis de démontrer l'effet propre d'une MHC sur la cognition et un impact en interaction avec des lésions neurodégénératives de type amyloïde.. La MHC semble avoir des effets précoces et à long terme, affectant la zone lésée mais aussi les régions cérébrales environnantes, l'hippocampe notamment.

On peut relever certaines forces de cette étude, avec tout d'abord le modèle lui-même. Pour notre problématique, il était important d'obtenir un modèle expérimental présentant des lésions suffisamment petites ($< 100 \mu\text{m}$) pour mimer des microhémorragies, mais avec la contrainte qu'elles restent visibles à l'IRM en séquence T2* afin de s'assurer de leur présence, de leur taille et de leur localisation. La séquence T2* utilisée au cours de cette étude est la même que celle utilisée en clinique pour détecter les microhémorragies. La dose de collagénase fournissant le meilleur compromis entre taille de la lésion et détection à l'IRM ($0,8\mu\text{UI}/\mu\text{L}$) conduit à un volume lésionnel d'environ $0,03 \text{ mm}^3$, visible à 24h à l'IRM (50 à $100\mu\text{m}$ de diamètre). En proportion, cette lésion qui correspond à une charge hémorragique de 0,006% par rapport au volume du cerveau de souris est à mettre en regard avec les microsaignements mesurés en clinique (environ 0,005% du volume total du cerveau) (Cordonnier et al., 2007). Parmi les modèles précliniques de MHC, une revue récente a relevé des diamètres allant de $25 \mu\text{m}$ à $300 \mu\text{m}$, la majorité des microhémorragies se situant autour de $100\mu\text{m}$ (Shih et al., 2018). Chez l'homme, il est très difficile de mesurer un impact fonctionnel des MHC notamment parce que la localisation et le moment d'apparition des MHC n'est pas connu ni prédictible. De plus, ces MHC coexistent souvent avec d'autres microlésions ou d'autres processus pathologiques ce qui ne permet pas de distinguer leur contribution spécifique aux dysfonctions cérébrales. Les modèles expérimentaux permettant de reproduire des MHC dans un environnement plus contrôlé sont donc intéressants pour essayer d'avancer sur ce sujet (Shih et al. 2018). Notre modèle de MHC présente une taille de lésion hémorragique cohérente vis-à-vis des données clinique et des autres modèles précliniques. L'induction de la MHC est reproductible. Un impact fonctionnel ainsi qu'une sensibilité à une modulation pharmacologique ont été observés. Il s'agit donc vraisemblablement d'un bon outil translationnel pour l'étude des conséquences tissulaires et fonctionnelles des MHC.

L'aspect multimodal de cette étude comprenant des évaluations fonctionnelles cognitives, une exploration du métabolisme *in vivo* et de la volumétrie de certaines structures cérébrales par des techniques d'imagerie médicale ainsi que les données d'immunohistochimie, constitue également un avantage dans le cadre d'une approche translationnelle. Les données de volumétrie des régions corticales et hippocampiques obtenues à 6 semaines, 6 et 12 mois post-chirurgie permettent d'ailleurs de démontrer l'intérêt d'un groupe sham ayant subi l'acte chirurgical et l'injection d'un volume équivalent par rapport aux souris chez lesquelles la MHC a été induite. En effet, à 6 semaines post-chirurgie, dans tous les groupes de souris WT et APP, les cortex et les hippocampes ipsilatéraux ont un volume supérieur aux structures contralatérales. Puis, dès 6 mois post-chirurgie chez la souris WT et à 12 mois post-chirurgie chez les souris WT et APP, on observe une diminution des volumes des structures corticales et hippocampiques ipsilatérales par rapport aux structures contralatérales. Cet effet concerne tous les groupes de souris et on peut en déduire qu'il est vraisemblablement dû à la chirurgie. En clinique, en dehors des pathologies neurodégénératives, une atrophie cérébrale peut être observée dans différentes situations comme après une hémorragie intracérébrale (Wu et al. 2010), après un traumatisme crânien (Harris et al., 2018) ou encore après une neurochirurgie (Cauley et al., 2010). En préclinique, une étude s'est intéressée aux dommages tissulaires engendrés par le simple passage d'une aiguille de 23 gauge introduite par chirurgie stéréotaxique à travers le cortex jusqu'à l'hippocampe (4,5 mm de profondeur) chez des rats âgés de 3 mois. Les auteurs ont observé une réponse différente selon la localisation : le long du trajet de l'aiguille, le tissu présente une altération mécanique, une hémorragie, une perte de neurones et de synapses, une invasion et une prolifération microgliale et astrocytaire et la formation de dépôts extracellulaires marqués positivement avec des anticorps dirigés contre les peptides A β et les protéines tau hyperphosphorylées. Toutes ces caractéristiques étaient encore présentes 30 jours après l'induction de la lésion (Purushothuman et al., 2013). Dans le tissu entourant la lésion, allant jusqu'à 1 mm de distance par rapport à la lésion, aucune altération mécanique, hémorragie ou mort cellulaire n'ont été constatés. En revanche, des effets principalement intracellulaires et plus transitoires ont été observés. Parmi ces effets, des marqueurs de dommages affectant les membranes cellulaires et l'ADN ont permis de mettre en évidence un stress cellulaire aigu mais non létal dans le tissu alentour présent jusqu'à 7 jours après la lésion. En réponse au stress, une régulation positive de l'APP et du peptide A β cellulaires, une hyperphosphorylation des protéines Tau intracellulaires et une régulation positive de facteurs neuroprotecteur (neuroglobine) et de croissance (Fibroblast growth factor, FGF-2) ont été observés. Dans le cas de leur modèle de lésion, les auteurs ont interprété

l'augmentation transitoire (jusqu'à 14 jours après la lésion) de l'expression de l'APP et du peptide A β et la phosphorylation de la protéine Tau comme des mécanismes neuroprotecteurs dans la mesure où les cellules ont survécu. Le FGF-2 qui induit la prolifération et la migration des astrocytes a été associé à des processus de réparation et de protection dans des modèles lésionnels du système nerveux central. Il serait également impliqué dans la régulation de la fonction astrocytaire et dans la différenciation en astrocyte activé suite à une agression (Fahmy et al., 2010). L'expression du FGF-2 et de la neuroglobine a été augmentée principalement dans les cellules gliales, avec une diminution après le 7^{ème} jour pour la neuroglobine et maintenue à un niveau élevé pour le FGF-2 jusqu'à 30 jours après la lésion. Cependant, les auteurs ont soulevé la question de l'interaction entre ces mécanismes protecteurs et la fonction du réseau neuronal ayant survécu à proximité de l'agression. En effet, le réseau neuronal pourrait être impacté et fonctionnellement altéré suite à la mise en place de ces mécanismes protecteurs (Purushothuman et al., 2015).

Ces données confirment qu'un acte chirurgical peut avoir des conséquences au moins jusqu'à un mois après l'induction de la lésion sur les tissus environnants et qu'il n'est pas exclu qu'un effet persiste encore plusieurs mois après. Cela conforte la pertinence de notre groupe sham et assure que les effets cognitifs observés sont bien dus à un effet propre de la MHC, indépendant de la chirurgie.

Au cours de ce travail, un suivi longitudinal sur 12 mois a été réalisé, ce qui est rarement décrit dans les études précliniques du fait de la difficulté de mise en œuvre d'un tel protocole. Ce suivi a permis d'observer, de façon prospective, l'évolution des différents groupes et de l'impact de la MHC au cours du temps sur la même cohorte de souris. Au cours de ce suivi longitudinal, la batterie d'évaluation neurocomportementale a été répétée à chaque temps d'évaluation. Les tests choisis lors de la construction de ce projet comprenaient, pour le suivi longitudinal, une l'évaluation de l'activité locomotrice, du niveau d'anxiété, et de la mémoire de référence spatiale. Les tests non cognitifs sont importants dans une batterie de tests. Ils permettent de s'assurer d'une interprétation qui ne serait pas faussée par des déficits moteurs ou des troubles anxieux qui pourraient interférer sur les capacités de l'animal lors d'un test cognitif (Shepherd et al., 2016). Par exemple, lors du test de la piscine de Morris, un entraînement préalable, dans lequel la plateforme est visible et porte un repère, est réalisé afin de s'assurer des capacités sensorimotrices et motivationnelles des animaux. Cette étape permet également de s'assurer que les animaux apprennent l'aspect procédural de la tâche (nager pour retrouver la plateforme) (Foster et al., 2012) Le test du labyrinthe de Barnes

évaluant la mémoire de référence spatiale a été initialement choisi en prenant en compte la lignée APP. Idéalement, les tests cognitifs utilisés dans les études précliniques sur les modèles reproduisant la MA devraient permettre d'évaluer les mêmes domaines cognitifs que ceux altérés chez les patients atteints de MA et explorés en clinique (Shepherd et al. 2016). La mémoire épisodique et la mémoire sémantique sont parmi les premières à être altérées de façon notable chez les patients Alzheimer (Weintraub et al., 2012). La mémoire sémantique serait proche du système d'encodage spatial utilisé par les rongeurs lorsque l'on teste l'apprentissage et la mémoire spatiale allocentrique (Buzsaki et al., 2013; Vorhees et al., 2014). L'hippocampe est une structure particulièrement vulnérable dès les stades précoces de la MA et, à ce titre, de nombreuses études précliniques cherchent à évaluer une mémoire dépendante de l'hippocampe, ce qui est le cas de la mémoire de référence spatiale (Puzzo et al., 2014). Pour l'évaluation de la mémoire de référence spatiale, bien que la piscine de Morris soit considérée comme le gold-standard (Shepherd et al., 2016; Vorhees et al., 2014), le labyrinthe de Barnes, réalisé sur un plateau sec, est considéré comme moins stressant pour les souris qui peuvent avoir tendance à se laisser flotter ou à se déplacer par thigmotactisme. De plus, la boîte d'échappement noire favorise le comportement des souris à trouver et se réfugier dans cet environnement sombre. En revanche, la contrepartie est que le stimulus aversif (lumière intense) peut ne pas fournir une motivation suffisante et favoriser des comportements d'exploration plutôt que d'échappement (Sharma et al., 2010). Pour cette raison, les paramètres d'apprentissage primaires (erreurs et latences) qui reflètent la première rencontre avec le trou cible et non l'entrée dans la cachette (paramètres dits « totaux » dans ce cas) pourraient être utilisés pour préciser le type de comportement des animaux. On pourrait ainsi regarder la différence entre paramètres totaux et primaires, pour évaluer la propension à poursuivre l'exploration après avoir vu le trou cible.

Au cours du suivi, un effet «répétition du test» a été observé chez les souris WT et APP lors des phases d'acquisition. En effet, au fur et à mesure des répétitions, la partie procédurale de la tâche étant acquise (parcourir le labyrinthe pour trouver la cachette), le nombre d'erreurs totales ou les latences totales étaient d'emblée à un niveau plus bas dès le premier jour d'acquisition que des souris naïves pour ce test. Il est à noter que pour les souris APP, cette mémoire procédurale est relativement préservée, ce qui est cohérent avec l'observation clinique montrant des aspects implicites et automatiques d'apprentissage et de mémoire encore préservés chez les patients Alzheimer (Kessels et al., 2011). Au cours du temps, les animaux ont vraisemblablement adopté la stratégie leur permettant de rejoindre la cachette le

plus facilement en ayant recours à des stratégies de recherche différentes : soit en série qui assurent de trouver la cachette ou faisant appel aux repères spatiaux. Le labyrinthe de Barnes peut stimuler des stratégies de recherche en série (Sharma et al. 2010). Ce type de comportement en partie lié au test lui-même et à la répétition de la tâche peut constituer une limite qu'il faut prendre en considération dans l'interprétation du test qui repose sur une mémoire spatiale. Ceci pourrait être quantifié par une étude spécifique du type de stratégie de recherche mis en œuvre (aléatoire, en série c'est-à-dire visitant les trous les uns à la suite des autres ou spatiale impliquant l'utilisation des repères spatiaux) (Rosenfeld et al., 2014) et de son évolution au cours de temps. Les observations faites lors des tests de rétention chez les souris WT sham de notre étude montrent que malgré une diminution significative au cours du temps, le pourcentage de temps passé dans le quadrant cible reste toujours supérieur au hasard semblant indiquer un recours à la mémoire spatiale. Pourtant, certains auteurs ayant travaillé sur le test de la piscine de Morris, considèrent que pour s'assurer que l'on évalue bien la formation d'une carte cognitive et la fonction hippocampique, il est nécessaire de faire une analyse de la stratégie de recherche. Ces auteurs ont en effet montré que le recours à une stratégie de recherche spatiale était la donnée la plus prédictive vis-à-vis de la mémoire spatiale et qu'en absence d'étude des stratégies de recherche, une mesure de la préférence des différents quadrants (et non du quadrant cible seul) doit être établie et analysée pour s'assurer que les souris forment une carte cognitive allocentrique pour retrouver la boîte d'échappement (Rogers et al., 2017). De ce point de vue, notre étude est pour l'instant incomplète, mais l'étude des stratégies de recherche est en cours. Le choix d'un autre test (test du dPAL) qui évalue aussi la fonction hippocampique (Kim et al., 2015) conforte l'hypothèse d'une atteinte cognitive liée à la MHC impliquant l'hippocampe dans notre travail.

Le test du dPAL a été choisi pour sa forte valence translationnelle par rapport à la clinique permettant de déceler un déclin cognitif précoce chez les patients atteints de MA (Blackwell et al. 2004) et sa capacité à mettre en évidence, par sa difficulté, des troubles cognitifs plus subtils. Il a permis, chez les souris WT, de confirmer une dysfonction hippocampique dans les premiers mois post-chirurgie. Concernant les souris APP, comme pour le test du labyrinthe de Barnes, il n'a pas été possible de démontrer un impact cognitif de la MHC. Les souris APP de la lignée J20 présentent des altérations cognitives précoces (Webster et al., 2014; Wright et al., 2013), et, dès le premier temps d'évaluation, une altération des mémoires de référence spatiale et visuospatiale par rapport aux souris WT. Les altérations cognitives dues à l'expression du transgène ont probablement été prépondérantes

vis-à-vis de l'impact cognitif de la MHC. De plus, pour le test du dPAL, d'autres complications ont été rencontrées. Une mortalité très importante des souris APP dès les premiers jours suivant l'instauration de la restriction alimentaire a conduit à une diminution du critère de poids à atteindre, visant 95% du poids initial plutôt que 85% (Horner et al. 2013). Les souris APP sont parvenues à passer les premières phases d'entraînement mais une grande majorité de souris, tous groupes APP confondus, a présenté des difficultés importantes dès la dernière phase de conditionnement, la phase du Punish incorrect training. Ainsi, environ 70 % des souris n'atteignaient pas les critères de l'étape de punish même après 10 jours de conditionnement spécifique. De plus, lors du test du dPAL, les souris APP atteignaient difficilement le critère de 36 essais convertis par sessions. Le pourcentage de réponses correctes montre d'importantes difficultés d'apprentissage de l'association objet-localisation. Cependant, du fait des difficultés évoquées précédemment, l'interprétation du pourcentage de réponses correctes est extrêmement délicate. Ce résultat est-il dû à un conditionnement insuffisant mais nécessairement limité dans le temps à cause de la progression de la pathologie ou bien résulte-t-il d'une dysfonction hippocampique, déjà marquée avant l'acquisition, que les souris APP n'ont pas pu compenser par d'autres stratégies (Kim et al. 2015)? Une piste serait peut-être d'envisager de modifier les critères à atteindre ou les paramètres du test (nombre d'essais à réaliser, durée d'une session, intervalle inter-essai) pour mieux l'adapter aux souris APP comme certains travaux l'ont montré chez le rat (Bussey et al. 2008). La motivation des animaux pourrait également être testée afin de discriminer entre une incapacité à apprendre l'association objet-localisation et un manque de motivation limitant la participation au test. L'effet de l'exposition quotidienne à une restriction alimentaire et au paradigme du touchscreen a été étudié chez des souris WT C57Bl6 et a montré une augmentation transitoire des métabolites fécaux de la corticostérone suivie d'une adaptation à ces nouvelles conditions. Les conditions stressantes peuvent ainsi contribuer à la mise en place de processus adaptatifs bénéfiques. Cependant, l'adaptation peut ne pas être efficace et entraîner des désordres comportementaux. Les changements neuroendocriniens sont à considérer dans les mesures où ils peuvent interférer dans les processus d'apprentissage et de mémoire (Mallien et al. 2016). Il est possible que les souris APP se soient moins bien adaptées à cette situation de test. Enfin, afin d'écartier la possibilité d'éventuels troubles de la vision qui peuvent survenir chez les souris APP et qui pourraient participer aux difficultés rencontrées, des yeux ont été prélevés pour effectuer une analyse anatomo-pathologique.

IV. Perspectives

Le modèle expérimental mis au point et évalué sur le plan fonctionnel au cours de ce travail a permis de montrer qu'une MHC induite dans le cortex pariéto-frontal de souris WT a un impact cognitif propre sur les mémoires de référence spatiale et visuospatiale, toutes deux faisant appel à l'hippocampe. Ce modèle présente un intérêt translationnel certain notamment dans l'exploration des mécanismes qui sous-tendent cet impact cognitif et qui ne sont à ce jour pas élucidés. Certains auteurs évoquent une perturbation, par les MHC, de circuits neuronaux stratégiques et suggèrent qu'avec une augmentation du nombre de MHC, l'atteinte cognitive est plus générale, reflétant un effet cumulatif des MHC distribués dans le cerveau (Werring et al. 2004). Parmi les perspectives de cette étude, la caractérisation des mécanismes moléculaires et cellulaires induits par la MHC, ainsi que par la modulation pharmacologique par l'atorvastatine à court et moyen terme permettra de compléter ce travail et fait l'objet d'une thèse d'Université déjà en cours. Rosidi et al. ont montré que dans le cas des MHC, le saignement est vite limité par la coagulation au niveau de la paroi du vaisseau lésé. Un phénomène de compression due aux érythrocytes arrivés dans le parenchyme, causant une ischémie de la zone entourant la lésion, est peu probable. La MHC n'induit pas de dégénération neuronale directe et les dendrites sont très peu endommagées mais cependant la possibilité d'altération plus subtile des dendrites affectant le turnover des épines dendritiques ou leur perte n'est pas exclue (Rosidi et al. 2011). Un processus inflammatoire impliquant l'activation et la prolifération de cellules microgliales et astrocytaires se met en place rapidement et peut perdurer plusieurs jours voire plusieurs semaines. Ce processus inflammatoire est retrouvé dans plusieurs études (Ahn et al. 2018; He et al. 2016; Rosidi et al. 2011). Ahn et al. ont proposé plusieurs mécanismes par lesquels l'inflammation, observée suite à l'induction de la MHC, pourrait affecter la fonction neuronale. En condition saine, la microglie et les astrocytes joueraient un rôle dans le remodelage des circuits synaptiques. Ce processus pourrait être altéré en cas de réponse inflammatoire à une agression. De plus, la microglie et les astrocytes activés sécrètent un certain nombre de facteurs (facteurs cytotoxiques, facteurs de croissance, cytokines) capables de potentialiser la réponse inflammatoire et par suite d'interférer avec la fonction neuronale en perturbant le microenvironnement (Ahn et al. 2018). Aussi, la MHC entraîne des dommages secondaires liés à la libération de produits toxiques issus des érythrocytes extravasés. Une surcharge en fer, dérivé de la dégradation de l'hème, produit via la réaction de Fenton, des radicaux libres

qui peuvent perturber la BHE. L'excès de fer peut aussi s'accumuler dans les cellules microgliales qui deviennent alors réactives (He et al. 2016). Ainsi, plusieurs pistes d'exploration seront étudiées : les modifications morphologiques au niveau de la zone lésée et de son environnement proche (densité neuronale et synaptique), le rôle de la neuroinflammation avec un intérêt particulier pour la microglie activée avec ses sous-types pro et anti-inflammatoires et pour les astrocytes activés, l'intégrité de la BHE et de l'unité neurovasculaire. La plasticité cérébrale peut également être étudiée par l'exploration de la potentialisation à long terme sur tranche et le western blot des protéines AKT et GSK3 β ainsi que de leurs formes phosphorylées.

Concernant les effets pléiotropes de l'atorvastatine, la plasticité synaptique, la neurogénèse, la fonction endothéliale et la modulation des sécrétases pourront être étudiés dans ce contexte de modulation pharmacologique. Son action sur les dépôts amyloïdes devra être précisée avec par exemple un marquage des plaques constituées à la thioflavine S pour compléter le marquage du peptide A β total.

Au plan fonctionnel, les fonctions exécutives étant souvent retrouvées altérées chez les patients présentant des MHC (Akoudad et al. 2016), il pourrait être intéressant de compléter notre étude comportementale en condition saine par des tests explorant ces fonctions. Le touchscreen permet grâce à différents paradigmes de les évaluer en se basant sur les mêmes étapes d'entraînement que le dPAL. Ces paradigmes mettent en jeu des processus d'extinction, d'apprentissage inverse reflétant la flexibilité, d'attention et d'impulsivité notamment avec le test du 5-Choice Serial Reaction Time (5-CSRT) (Mar et al. 2013).

Enfin, les résultats obtenus chez la souris femelle avec le même modèle de MHC ont révélé un impact qui diffère de la souris mâle et qui justifie d'étudier l'influence du genre sur l'impact de la MHC et du traitement pharmacologique.

Ce modèle expérimental a permis de démontrer un effet propre de la MHC en dehors de toute pathologie cérébrovasculaire sous-jacente (amyloïde ou hypertensive). En clinique, les MHC sont souvent associés aux pathologies cérébrovasculaires dont elles sont considérées comme des biomarqueurs et leurs effets respectifs pourraient être additifs. Il est possible, que dans un contexte pathologique comme l'AAC ou l'hypertension, les MHC causent des dommages plus sévères sur les neurones voisins (Rosidi et al. 2011). L'exposition chroniques aux facteurs de risque vasculaires (hypertension, diabète, obésité) peut contribuer à une dysfonction endothéliale, un épaississement des parois vasculaires, une hypoperfusion et un

stress oxydant chroniques (Kalaria 2016) et l'AAC peut contribuer à l'altération vasculaire via des mécanismes directs. Une forte proportion de démence à un âge avancé pourrait être attribuée aux facteurs de risques vasculaires qui sont des facteurs modifiables pouvant constituer une cible de choix pour intervenir sur le risque de démence. Un point crucial serait de pouvoir intervenir dans la fenêtre de temps optimale pour pouvoir prévenir ou retarder l'apparition d'une démence. Des interventions pharmacologiques, comme le contrôle de l'hypertension, instauré chez l'adulte jeune pourrait par exemple diminuer l'incidence de démence (Tariq et al, 2018). Une détection précoce des individus à risque grâce à des biomarqueurs adaptés et pertinents associés à des évaluations cognitives permettrait d'agir de façon préventive et individualisée sur cette population cible (Tariq et al., 2018). Les statines semblent avoir leur place dans ce type d'approche. Un travail récent ayant fait l'objet d'une thèse d'Université (Yao Chen), a d'ailleurs montré, en clinique, que le traitement par statine est associé à un recul, d'environ 3 ans, de l'âge des premiers signes de la MA.

Ainsi, le modèle expérimental de MHC pourrait par la suite être enrichi par l'exposition à des facteurs de risque vasculaires (hypertension, syndrome métabolique, diabète) pour étudier un éventuel effet additif ou synergique et permettre aussi de tester de nouvelles interventions pharmacologiques ciblant ces facteurs de risques comme les inhibiteurs calciques (Valenzuela et al., 2012), les antidiabétiques ou les statines.

V. CONCLUSION

Nos résultats soulignent l'intérêt de disposer de modèles expérimentaux reproductibles et étudiés de façon multimodale pour mieux comprendre le rôle des MHC, ces petites lésions longtemps considérées silencieuses et qui se révèlent finalement à l'origine d'un déclin cognitif, mais également d'une interaction probable avec les lésions neurodégénératives. Nous avons mis en évidence la possibilité de limiter cet impact par une modulation pharmacologique par atorvastatine, ce qui encourage à étudier, toujours grâce à notre modèle, d'autres pistes thérapeutiques qui pourraient à terme être proposées en clinique. Nos résultats viennent étoffer les données disponibles dans la littérature sur la caractérisation de l'impact d'une MHC et d'un traitement par statine sur la cognition. Plusieurs points méritent d'être complétés, au regard de ces travaux et des travaux de Yao Chen, réalisés en parallèle chez la souris femelle : les mécanismes précis doivent être analysés pour mieux caractériser les événements physiopathologiques à l'origine des conséquences de ces petites lésions

vasculaires. L'influence du sexe sur l'impact de la MHC ainsi que la modulation par atorvastatine doivent également être étudiées de près, ainsi que le poids de certains facteurs de risque vasculaire.

**RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES**

- Ahn, Sung Ji, Josef Anrather, Nozomi Nishimura, and Chris B. Schaffer. 2018. “Diverse Inflammatory Response After Cerebral Microbleeds Includes Coordinated Microglial Migration and Proliferation.” *Stroke* 49(7):1719–26.
- Akoudad, Saloua, Frank J. Wolters, Anand Viswanathan, Renée F. de Bruijn, Aad van der Lugt, Albert Hofman, Peter J. Koudstaal, M. Arfan Ikram, and Meike W. Vernooij. 2016. “Association of Cerebral Microbleeds With Cognitive Decline and Dementia.” *JAMA Neurology* 73(8):934.
- Andorfer, Cathy, Yvonne Kress, Marisol Espinoza, Rohan De Silva, Kerry L. Tucker, Yves Alain Barde, Karen Duff, and Peter Davies. 2003. “Hyperphosphorylation and Aggregation of Tau in Mice Expressing Normal Human Tau Isoforms.” *Journal of Neurochemistry* 86(3):582–90.
- Anstey, Kaarin J., Darren M. Lipnicki, and Lee-Fay Low. 2008. “Cholesterol as a Risk Factor for Dementia and Cognitive Decline: A Systematic Review of Prospective Studies With Meta-Analysis.” *The American Journal of Geriatric Psychiatry* 16(5):343–54.
- Antunes, M. and G. Biala. 2012. “The Novel Object Recognition Memory: Neurobiology, Test Procedure, and Its Modifications.” *Cognitive Processing* 13(2):93–110.
- Astur, Robert S., Laughlin B. Taylor, Adam N. Mamelak, Linda Philpott, and Robert J. Sutherland. 2002. “Humans with Hippocampus Damage Display Severe Spatial Memory Impairments in a Virtual Morris Water Task.” *Behavioural Brain Research* 132(1):77–84.
- Baddeley, Alan. 2010. “Working Memory.” *Current Biology : CB* 20(4):R136-40.
- Ballard, Clive, Serge Gauthier, Anne Corbett, Carol Brayne, Dag Aarsland, and Emma Jones. 2011. “Alzheimer’s Disease.” *The Lancet* 377(9770):1019–31.
- Barnaure, I., M. L. Montandon, C. Rodriguez, F. Herrmann, K. O. Lövblad, P. Giannakopoulos, and S. Haller. 2017. “Clinicoradiologic Correlations of Cerebral Microbleeds in Advanced Age.” *American Journal of Neuroradiology* 38(1):39–45.
- Barnett, Jennifer H., Andrew D. Blackwell, Barbara J. Sahakian, and Trevor W. Robbins. 2016. “The Paired Associates Learning (PAL) Test: 30 Years of CANTAB Translational Neuroscience from Laboratory to Bedside in Dementia Research Jennifer.” *Curr Topics Behav Neurosci* 28:449–74.
- Barone, Eugenio, Giovanna Cenini, Fabio Di Domenico, Sarah Martin, Rukhsana Sultana, Cesare Mancuso, Michael Paul Murphy, Elizabeth Head, and D. Allan Butterfield. 2011. “Long-Term High-Dose Atorvastatin Decreases Brain Oxidative and Nitrosative Stress in a Preclinical Model of Alzheimer Disease: A Novel Mechanism of Action.”

- Pharmacological Research* 63(3):172–80.
- Barone, Eugenio, Fabio Di Domenico, and D. Allan Butterfield. 2014. “Statins More than Cholesterol Lowering Agents in Alzheimer Disease: Their Pleiotropic Functions as Potential Therapeutic Targets.” *Biochemical Pharmacology* 88(4):605–16.
- Barr, Alasdair M., Sarah A. MacLaurin, Svetlana Semenova, Kenneth N. Fish, and Athina Markou. 2007. “Altered Performance of Reelin-Receptor ApoER2 Deficient Mice on Spatial Tasks Using the Barnes Maze.” *Behavioral Neuroscience* 121(5):1101–5.
- Basselerie, Hubert, Luc Bracoud, Eva Zeestraten, Eva Bouguen, Vera Kiyasova, Maria Pueyo, Christophe Cognard, Hervé Dumas, Raluca Gramada, Pierre Jean Ousset, Bruno Vellas, and Fabrice Bonneville. 2017. “Incident Cerebral Microbleeds Detected by Susceptibility Weight-Imaging Help to Identify Patients with Mild Cognitive Impairment Progressing to Alzheimer’s Disease.” *Journal of Alzheimer’s Disease* 60(1):253–62.
- Belarbi, Karim, Timothy Jopson, David Tweedie, Carla Arellano, Weiming Luo, Nigel H. Greig, and Susanna Rosi. 2012. “TNF- α Protein Synthesis Inhibitor Restores Neuronal Function and Reverses Cognitive Deficits Induced by Chronic Neuroinflammation.” *Journal of Neuroinflammation* 9:1–13.
- Benito-León, Julián, Elan D. Louis, Saturio Vega, and Félix Bermejo-Pareja. 2010. “Statins and Cognitive Functioning in the Elderly: A Population-Based Study.” *Journal of Alzheimer’s Disease* 21(1):95–102.
- Bergeron S. & Chen Y., Florent Auger, Julie Deguil, Nicolas Durieux, Emilie Skrobala, Romain Barus, Camille Potey, Charlotte Cordonnier, Florence Pasquier, Laura Ravasi, Régis Bordet, and Sophie Gautier. 2018. “Role of Cortical Microbleeds in Cognitive Impairment: In Vivo Behavioral and Imaging Characterization of a Novel Murine Model.” *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 0271678X1775276.
- Bettermann, Kerstin, Alice M. Arnold, Jeff Williamson, Stephen Rapp, Kaycee Sink, James F. Toole, Michelle C. Carlson, Sevil Yasar, Steven Dekosky, and Gregory L. Burke. 2012. “Statins, Risk of Dementia, and Cognitive Function: Secondary Analysis of the Ginkgo Evaluation of Memory Study.” *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases* 21(6):436–44.
- Biffi, Alessandro and Steven M. Greenberg. 2011. “Cerebral Amyloid Angiopathy: A Systematic Review.” *Journal of Clinical Neurology (Seoul, Korea)* 7(1):1–9.
- Binder, Sonja, Ekrem Dere, and Armin Zlomuzica. 2015. “A Critical Appraisal of the What-Where-When Episodic-like Memory Test in Rodents: Achievements, Caveats and Future Directions.” *Progress in Neurobiology* 130:71–85.

- Bizon, Jennifer L., Thomas C. Foster, Gene E. Alexander, and Elizabeth L. Glisky. 2012. “Characterizing Cognitive Aging of Working Memory and Executive Function in Animal Models.” *Frontiers in Aging Neuroscience* 4(SEP):1–14.
- Björkhem, I., M. Heverin, V. Leoni, S. Meaney, and U. Diczfalusy. 2006. “Oxysterols and Alzheimer’s Disease.” 114:43–49.
- Blackwell, Andrew D., Barbara J. Sahakian, Robyn Vesey, James M. Semple, Trevor W. Robbins, and John R. Hodges. 2004. “Detecting Dementia: Novel Neuropsychological Markers of Preclinical Alzheimer’s Disease.” *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders* 17(1–2):42–48.
- Brown, M. S. and J. L. Goldstein. 1986. “A Receptor-Mediated Pathway for Cholesterol Homeostasis Author (s): Michael S . Brown and Joseph L . Goldstein Published by : American Association for the Advancement of Science Stable URL : [Http://Www.Jstor.Org/Stable/1697034 .](http://www.jstor.org/stable/1697034)” *Science* 232(4746):34–47.
- Budson, Andrew E. and Bruce H. Price. 2005. “Memory Dysfunction.” *The New England Journal of Medicine* 352(7):692–99.
- Bussey, Timothy J., Tina L. Padain, Elizabeth A. Skillings, Boyer D. Winters, A. Jennifer Morton, and Lisa M. Saksida. 2008. “The Touchscreen Cognitive Testing Method for Rodents: How to Get the Best out of Your Rat.” *Learning and Memory* 15(7):516–23.
- Buzsaki, G. and E. Moser. 2013. “Memory, Navigation and Theta Rhythm in the Hippocampal- Entorhinal System.” *Nat Neurosci.* 16(2):130–38.
- Cacace, Rita, Kristel Slegers, and Christine Van Broeckhoven. 2016. “Molecular Genetics of Early-Onset Alzheimer’s Disease Revisited.” *Alzheimer’s and Dementia* 12(6):733–48.
- Carmo, Sonia Do and A. Claudio Cuello. 2013. “Modeling Alzheimer ’ s Disease in Transgenic Rats.” 1:1–11.
- Cauley, Kieth A., W. Waheed, M. Salmela, and C. G. Filippi. 2010. “MR Imaging of Psychosurgery: Rostral Atrophy Following Stereotactic Subcaudate Tractotomy.” *British Journal of Radiology* 83(995):239–42.
- Chang, Rudy, Juan Castillo, Alexander C. Zambon, Tatiana B. Krasieva, Mark J. Fisher, and Rachita K. Sumbria. 2018. “Brain Endothelial Erythrophagocytosis and Hemoglobin Transmigration Across Brain Endothelium: Implications for Pathogenesis of Cerebral Microbleeds.” *Frontiers in Cellular Neuroscience* 12(September):1–11.
- Chen, Jieli, Zheng Gang Zhang, Yi Li, Ying Wang, Lei Wang, Hao Jiang, Chenling Zhang, Mei Lu, Mark Katakowski, Carolyn S. Feldkamp, and Michael Chopp. 2003. “Statins Induce Angiogenesis, Neurogenesis, and Synaptogenesis after Stroke.” *Annals of*

- Neurology* 53(6):743–51.
- Chu, Che-Sheng, Ping-Tao Tseng, Brendon Stubbs, Tien-Yu Chen, Chia-Hung Tang, Dian-Jeng Li, Wei-Cheng Yang, Yen-Wen Chen, Ching-Kuan Wu, Nicola Veronese, Andre F. Carvalho, Brisa S. Fernandes, Nathan Herrmann, and Pao-Yen Lin. 2018. “Use of Statins and the Risk of Dementia and Mild Cognitive Impairment: A Systematic Review and Meta-Analysis.” *Scientific Reports* 8(1):5804.
- Chung, Chih Ping, Kun Hsien Chou, Wei Ta Chen, Li Kuo Liu, Wei Ju Lee, Liang Kung Chen, Ching Po Lin, and Pei Ning Wang. 2016. “Strictly Lobar Cerebral Microbleeds Are Associated with Cognitive Impairment.” *Stroke* 47(10):2497–2502.
- Clarke, Rachael M., Florence O’Connell, Anthony Lyons, and Marina A. Lynch. 2007. “The HMG-CoA Reductase Inhibitor, Atorvastatin, Attenuates the Effects of Acute Administration of Amyloid-B1-42 in the Rat Hippocampus in Vivo.” *Neuropharmacology* 52(1):136–45.
- Cogné, M., M. Taillade, B. N’Kaoua, A. Tarruella, E. Klinger, F. Larrue, H. Sauzéron, P. A. Joseph, and E. Sorita. 2017. “The Contribution of Virtual Reality to the Diagnosis of Spatial Navigation Disorders and to the Study of the Role of Navigational Aids: A Systematic Literature Review.” *Annals of Physical and Rehabilitation Medicine* 60(3):164–76.
- Collins, Rory, Jane Armitage, Sarah Parish, Peter Sleight, and Richard Peto. 2002. “MRC/BHF Heart Protection Study of Cholesterol Lowering with Simvastatin in 20 536 High-Risk Individuals: A Randomised Placebo-Controlled Trial.” *Lancet* 360(9326):7–22.
- Cordonnier, C., W. M. Van Der Flier, J. D. Sluimer, and D. Leys. 2006. “Prevalence and Severity of Microbleeds In.”
- Cordonnier, Charlotte, Rustam Al-Shahi Salman, and Joanna Wardlaw. 2007. “Spontaneous Brain Microbleeds: Systematic Review, Subgroup Analyses and Standards for Study Design and Reporting.” *Brain* 130(8):1988–2003.
- Cordonnier, Charlotte and Wiesje M. Van Der Flier. 2011. “Brain Microbleeds and Alzheimer’s Disease: Innocent Observation or Key Player?” *Brain* 134(2):335–44.
- Coupe, Pierrick, Pierre Yger, Sylvain Prima, Pierre Hellier, Charles Kervrann, and Christian Barillot. 2008. “An Optimized Blockwise Nonlocal Means Denoising Filter for 3-D Magnetic Resonance Images.” *IEEE Transactions on Medical Imaging* 27(4):425–41.
- Coyle, Joseph T., Donald L. Price, and Mahlon R. DeLong. 1983. “Alzheimer ’ s Disease : A Disorder of Cortical Cholinergic Innervation.” *Science* 219(4589):1184–90.

- Croisile, B., S. Auriacombe, F. Etcharry-Bouyx, and M. Vercelletto. 2012. “Les Nouvelles Recommandations 2011 Du National Institute on Aging et de l’Alzheimer’s Association Sur Le Diagnostic de La Maladie d’Alzheimer : Stades Précliniques, Mild Cognitive Impairment et Démence.” *Revue Neurologique* 168(6–7):471–82.
- Crystal, Jonathon D. 2010. “Episodic-like Memory in Animals.” *Behavioural Brain Research* 215(2):235–43.
- Cummings, Jeffrey L., Travis Morstorf, and Kate Zhong. 2014. “Alzheimer ’ s Disease Drug-Development Pipeline : Few Candidates , Frequent Failures.” 1–7.
- Davis, Judianne, Feng Xu, Rashid Deane, Galina Romanov, Mary Lou Previti, Kelly Zeigler, Berislav V. Zlokovic, and William E. Van Nostrand. 2004. “Early-Onset and Robust Cerebral Microvascular Accumulation of Amyloid β -Protein in Transgenic Mice Expressing Low Levels of a Vasculotropic Dutch/Iowa Mutant Form of Amyloid β -Protein Precursor.” *Journal of Biological Chemistry* 279(19):20296–306.
- Dere, Ekrem, Joseph P. Huston, and Maria A. De Souza Silva. 2005. “Episodic-like Memory in Mice: Simultaneous Assessment of Object, Place and Temporal Order Memory.” *Brain Research Protocols* 16(1–3):10–19.
- Dhenain, Marc. 2013. “Stratégie de Recherche Translationnelle Sur La Maladie d’Alzheimer : Modèles Animaux et Biomarqueurs.” (1):346–353.
- Dierksen, Gregory A., Maureen E. Skehan, Muhammad A. Khan, Jed Jeng, R. N. Kavee, Nandigam, John A. Becker, Ashok Kumar, Krista L. Neal, Rebecca A. Betensky, Matthew P. Frosch, Jonathan Rosand, Keith A. Johnson, Anand Viswanathan, David H. Salat, and Steven M. Greenberg. 2010. “Spatial Relation between Microbleeds and Amyloid Deposits in Amyloid Angiopathy.” *Annals of Neurology* 68(4):545–48.
- Ding, Jie, Sigurdur Sigurdsson, Melissa Garcia, Caroline L. Phillips, Gudny Eiriksdottir, Vilmundur Gudnason, Mark A. Van Buchem, and Lenore Launer. 2015. “Risk Factors Associated With Incident Cerebral Microbleeds According to Location in Older People: The Age, Gene/ Environment Susceptibility (AGES)-Reykjavik Study.” *JAMA Neurology* 72(6):682–88.
- Ding, Jie, Sigurour Sigurosson, Pálmi V. Jónsson, Gudny Eiriksdottir, Osorio Meirelles, Olafur Kjartansson, Oscar L. Lopez, Mark A. Van Buchem, Vilmundur Gudnason, and Lenore J. Launer. 2017. “Space and Location of Cerebral Microbleeds, Cognitive Decline, and Dementia in the Community.” *Neurology* 88(22):2089–97.
- Direk, Nese, Heidi Saavedra Perez, Saloua Akoudad, Benjamin F. J. Verhaaren, Wiros J. Niessen, Albert Hofman, Meike W. Vernooij, M. Arfan Ikram, and Henning Tiemeier.

2016. “Markers of Cerebral Small Vessel Disease and Severity of Depression in the General Population.” *Psychiatry Research - Neuroimaging* 253:1–6.
- Drummond, Eleanor and Thomas Wisniewski. 2017. “Alzheimer’s Disease: Experimental Models and Reality.” *Acta Neuropathol.* 133(2):155–75.
- Dudchenko, Paul A. 2004. “An Overview of the Tasks Used to Test Working Memory in Rodents.” *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 28(7):699–709.
- Dudchenko, Paul A. and Michelle Davidson. 2002. “Rats Use a Sense of Direction to Alternate on T-Mazes Located in Adjacent Rooms.” *Animal Cognition* 5(2):115–18.
- Eacott, M. J. 2004. “Integrated Memory for Object, Place, and Context in Rats: A Possible Model of Episodic-Like Memory?” *Journal of Neuroscience* 24(8):1948–53.
- Eacott, Madeline J. and Alexander Easton. 2010. “Episodic Memory in Animals: Remembering Which Occasion.” *Neuropsychologia* 48(8):2273–80.
- Ebert, U. and W. Kirch. 1998. “Scopolamine Model of Dementia: Electroencephalogram Findings and Cognitive Performance.” *European Journal of Clinical Investigation* 28(11):944–49.
- Ekdahl, C. T., J. H. Claasen, S. Bonde, Z. Kokaia, and O. Lindvall. 2003. “Inflammation Is Detrimental for Neurogenesis in Adult Brain.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100(23):13632–37.
- Endres, Matthias. 2005. “Statins and Stroke.” *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 25(9):1093–1110.
- Ennaceur, A. 2010. “One-Trial Object Recognition in Rats and Mice: Methodological and Theoretical Issues.” *Behavioural Brain Research* 215(2):244–54.
- Ennaceur, A., S. Michalikova, A. Bradford, and S. Ahmed. 2005. “Detailed Analysis of the Behavior of Lister and Wistar Rats in Anxiety, Object Recognition and Object Location Tasks.” *Behavioural Brain Research* 159(2):247–66.
- Esquerda-Canals, Gisela, Laia Montoliu-Gaya, Jofre Güell-Bosch, and Sandra Villegas. 2017. “Mouse Models of Alzheimer’s Disease.” *Journal of Alzheimer’s Disease* 57(4):1171–83.
- Etchamendy, Nicole, Kyoko Konishi, G. Bruce Pike, Aline Marighetto, and Véronique D. Bohbot. 2012. “Evidence for a Virtual Human Analog of a Rodent Relational Memory Task: A Study of Aging and fMRI in Young Adults.” *Hippocampus* 22(4):869–80.
- Eustache, F. and B. Desgranges. 2017. “Mémoire et Ses Troubles.” 1–15.
- Ewen, Tu, Liu Qiuting, Tang Chaogang, Tang Tao, Wu Jun, Tan Liming, and Xiang Guanghong. 2013. “Neuroprotective Effect of Atorvastatin Involves Suppression of

- TNF- α and Upregulation of IL-10 in a Rat Model of Intracerebral Hemorrhage.” *Cell Biochemistry and Biophysics* 66(2):337–46.
- Fahmy, Gehan H. and Marie Z. Moftah. 2010. “FGF-2 in Astroglial Cells During Vertebrate Spinal Cord Recovery.” *Frontiers in Cellular Neuroscience* 4(November):1–9.
- Fazekas, Franz and R. Kleinert. 1999. “Histopathologic Analysis of Foci of Signal Loss on Gradient-Echo T2*-Weighted MR Images in Patients with Spontaneous Intracerebral Hemorrhage: Evidence Of.” *Am J Neuroradiol* 20(April):637–42.
- Feldman, H. H., R. S. Doody, M. Kivipelto, D. L. Sparks, D. D. Waters, R. W. Jones, E. Schwam, R. Schindler, J. Hey-Hadavi, D. a DeMicco, a Breazna, and LEADe Investigators On behalf of the. 2010. “Randomized Controlled Trial of Atorvastatin in Mild to Moderate Alzheimer Disease.” *Neurology* 74(C):956–64.
- Finch, Caleb E. and Sara Shams. 2016. “Apolipoprotein E and Sex Bias in Cerebrovascular Aging of Men and Mice.” *Trends in Neurosciences* 39(9):625–37.
- Fisher, Mark. 2014. “Cerebral Microbleeds Where Are We Now ?” 3–4.
- Foster, Thomas C., R. A. DeFazio, and Jennifer L. Bizon. 2012. “Characterizing Cognitive Aging of Spatial and Contextual Memory in Animal Models.” *Frontiers in Aging Neuroscience* 4(SEP):1–18.
- Frielingsdorf, Helena, Leon J. Thal, and Donald P. Pizzo. 2006. “The Septohippocampal Cholinergic System and Spatial Working Memory in the Morris Water Maze.” *Behavioural Brain Research* 168(1):37–46.
- Galvan, V., O. F. Gorostiza, S. Banwait, M. Ataie, A. V. Logvinova, S. Sitaraman, E. Carlson, S. A. Sagi, N. Chevallier, K. Jin, D. A. Greenberg, and D. E. Bredesen. 2006. “Reversal of Alzheimer’s-like Pathology and Behavior in Human APP Transgenic Mice by Mutation of Asp664.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(18):7130–35.
- Games, D., D. Adams, R. Alessandrini, R. Barbour, P. Berthelette, C. Blackwell, T. Carr, J. Clemens, T. Donaldson, and F. Gillespie. 1995. “Alzheimer-Type Neuropathology in Transgenic Mice Overexpressing V717F Beta-Amyloid Precursor Protein.” *Nature* 373(6514):523–27.
- Geldmacher, David S. 2003. “Visuospatial Dysfunction in the Neurodegenerative Diseases.” 428–36.
- Goos, Jeroen D. C., M. I. Kester, Frederik Barkhof, Martin Klein, Marinus A. Blankenstein, Philip Scheltens, and Wiesje M. Van Der Flier. 2009. “Patients with Alzheimer Disease with Multiple Microbleeds: Relation with Cerebrospinal Fluid Biomarkers and

- Cognition.” *Stroke* 40(11):3455–60.
- Greenberg, SM, RNK Nandigam, P. Delgado, RA Betensky, J. Rosand, A. Viswanathan, MP Frosch, and EE Smith. 2009. “Microbleeds versus Macrobleeds: Evidence for Distinct Entities.” *Stroke* 40(7):2382–86.
- Greenberg, Steven M., Meike W. Vernooij, Charlotte Cordonnier, Rustam Al-shahi Salman, Frcp Edin, Steven Warach, J. Lenore, Mark a Van Buchem, and Monique M. B. Breteler. 2009. “Cerebral Microbleeds:A Field Guide to Their Detection and Interpretation.” *Lancet Neurol* 8(2):165–74.
- Gurol, M. Edip, Gregory Dierksen, Rebecca Betensky, Christopher Gidicsin, Amy Halpin, Alex Becker, Jeremy Carmasin, Alison Ayres, Kristin Schwab, Anand Viswanathan, David Salat, Jonathan Rosand, Keith A. Johnson, and Steven M. Greenberg. 2012. “Predicting Sites of New Hemorrhage with Amyloid Imaging in Cerebral Amyloid Angiopathy.” *Neurology* 79(4):320–26.
- Haag, M. D. M., A. Hofman, P. J. Koudstaal, B. H. C. Stricker, and M. M. B. Breteler. 2009. “Statins Are Associated with a Reduced Risk of Alzheimer Disease Regardless of Lipophilicity. The Rotterdam Study.” *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 80(1):13–17.
- Haddar, D. 2004. “L’imagerie de Susceptibilité Magnétique : Théorie et Applications.” *J Radiol* 1901–8.
- Hajjar, Ihab, Jeannie Schumpert, Victor Hirth, Darryl Wieland, and G. Paul Eleazer. 2002. “The Impact of the Use of Statins on the Prevalence of Dementia and the Progression of Cognitive Impairment.” *Journal of Gerontology Medical Sciences* 57(7):414–18.
- Haller, Sven. 2010. “Cerebral Microhemorrhage and Iron Deposition in Mild Cognitive Impairment.” *Radiology* 257(3).
- Haller, Sven, Meike W. Vernooij, Joost P. A. Kuijter, Elna-Marie Larsson, Hans Rolf Jäger, and Frederik Barkhof. 2018. “Cerebral Microbleeds: Imaging and Clinical Significance Haller et Al.” *Radiology* 287(1—April).
- Hannesson, D. K. 2004. “Interaction between Perirhinal and Medial Prefrontal Cortex Is Required for Temporal Order But Not Recognition Memory for Objects in Rats.” *Journal of Neuroscience* 24(19):4596–4604.
- Harris, J. A., N. Devidze, B. Halabisky, I. Lo, M. T. Thwin, G. Q. Yu, D. E. Bredesen, E. Masliah, and L. Mucke. 2010. “Many Neuronal and Behavioral Impairments in Transgenic Mouse Models of Alzheimer’s Disease Are Independent of Caspase Cleavage of the Amyloid Precursor Protein.” *Journal of Neuroscience* 30(1):372–81.

- Harris, Taylor C., Rijk de Rooij, and Ellen Kuhl. 2018. “The Shrinking Brain: Cerebral Atrophy Following Traumatic Brain Injury.” *Annals of Biomedical Engineering* 1–19.
- Hartman, Richard, Tim Lekic, Hugo Rojas, Jiping Tang, and John H. Zhang. 2009. “Assessing Functional Outcomes Following Intracerebral Hemorrhage in Rats.” *Brain Research* 1280:148–57.
- He, Xiao Fei, Yue Lan, Qun Zhang, Dong Xu Liu, Qinmei Wang, Feng Ying Liang, Jin Sheng Zeng, Guang Qing Xu, and Zhong Pei. 2016. “Deferoxamine Inhibits Microglial Activation, Attenuates Blood-Brain Barrier Disruption, Rescues Dendritic Damage, and Improves Spatial Memory in a Mouse Model of Microhemorrhages.” *Journal of Neurochemistry* 436–47.
- Heringa, Sophie M., Yael D. Reijmer, Alexander Leemans, Huiberdina L. Koek, L. Jaap Kappelle, and Geert Jan Biessels. 2014. “Multiple Microbleeds Are Related to Cerebral Network Disruptions in Patients with Early Alzheimer’s Disease.” *Journal of Alzheimer’s Disease* 38(1):211–21.
- Holcomb, Leigh A., Marcia N. Gordon, Paul Jantzen, Karen Hsiao, Karen Duff, and Dave Morgan. 1999. “Behavioral Changes in Transgenic Mice Expressing Both Amyloid Precursor Protein and Presenilin-1 Mutations: Lack of Association with Amyloid Deposits.” *Behavior Genetics* 29(3):177–85.
- Hong, Keun-Sik and Ji Sung Lee. 2015. “Statins in Acute Ischemic Stroke: A Systematic Review.” *Journal of Stroke* 17(3):282–301.
- Horner, Alexa E., Christopher J. Heath, M. Hvoslef-Eide, BA Kent, CH Kim, SR Nilsson, J. Alsiö, CA Oomen, A. Holmes, Lisa M. Saksida, and Timothy J. Bussey. 2013. “The Touchscreen Operant Platform for Testing Learning and Memory in Rats and Mice.” *Nature Protocols* 8(10):1961–84.
- Hua, Ya, Timothy Schallert, Richard F. Keep, Jimin Wu, Julian T. Hoff, and Guohua Xi. 2002. “Behavioral Tests after Intracerebral Hemorrhage in the Rat.” *Stroke* 33(10):2478–84.
- Huhle, G., C. Abletshauser, N. Mayer, G. Weidinger, J. Harenberg, and D. L. Heene. 1999. “Reduction of Platelet Activity Patients by a HMG-CoA-Reductase Inhibitor.” 95:229–34.
- Iida, Shinichiro, Gary L. Baumbach, Julie L. Lavoie, Frank M. Faraci, Curt D. Sigmund, and Donald D. Heistad. 2005. “Spontaneous Stroke in a Genetic Model of Hypertension in Mice.” *Stroke* 36(6):1253–58.
- Jack, Clifford R., David S. Knopman, William J. Jagust, Ronald C. Petersen, Michael W.

- Weiner, Paul S. Aisen, Leslie M. Shaw, Prashanthi Vemuri, Heather J. Wiste, Stephen D. Weigand, Timothy G. Lesnick, Vernon S. Pankratz, Michael C. Donohue, and John Q. Trojanowski. 2013. “Tracking Pathophysiological Processes in Alzheimer’s Disease: An Updated Hypothetical Model of Dynamic Biomarkers.” *The Lancet Neurology* 12(2):207–16.
- Jäkel, Lieke, William E. Van Nostrand, James A. R. Nicoll, David J. Werring, and Marcel M. Verbeek. 2017a. “Animal Models of Cerebral Amyloid Angiopathy.” *Clinical Science* 131(19):2469–88.
- Jäkel, Lieke, William E. Van Nostrand, James A. R. Nicoll, David J. Werring, and Marcel M. Verbeek. 2017b. “Animal Models of Cerebral Amyloid Angiopathy.” *Clinical Science* 131(19):2469–88.
- James, Michael Lucas, David S. Warner, and Daniel T. Laskowitz. 2008. “Preclinical Models of Intracerebral Hemorrhage: A Translational Perspective.” *Neurocritical Care* 9(1):139–52.
- Jasińska, Magdalena, Jacek Owczarek, and Daria Orszulak-Michalak. 2007. “Statins: A New Insight into Their Mechanisms of Action and Consequent Pleiotropic Effects.” *Pharmacological Reports* 59(5):483–99.
- Jheng, Sheng Siang and Ming Chyi Pai. 2009. “Cognitive Map in Patients with Mild Alzheimer’s Disease: A Computer-Generated Arena Study.” *Behavioural Brain Research* 200(1):42–47.
- Jick, H., G. L. Zornberg, S. S. Jick, S. Seshadri, and D. A. Drachman. 2000. “Statins and the Risk of Dementia.” *Lancet* 356(9242):1627–31.
- JO. 2013. “Décret No 2013-118 Du 1er Février 2013 Relatif à La Protection Des Animaux Utilisés à Des Fins Scientifiques.”
- Johnson-Anuna, Leslie N., Gunter P. Eckert, Jan H. Keller, Urule Igbavboa, Cornelia Franke, Thomas Fechner, Manfred Schubert-zsilavec, Michael Karas, Walter E. Mu, and W. Gibson Wood. 2005. “Chronic Administration of Statins Alters Multiple Gene Expression Patterns in Mouse Cerebral Cortex.” *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 312(2):786–93.
- Junkkila, Jenny, Sakari Oja, Matti Laine, and Mira Karrasch. 2012. “Applicability of the CANTAB-PAL Computerized Memory Test in Identifying Amnesic Mild Cognitive Impairment and Alzheimer’s Disease.” *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders* 34(2):83–89.
- Kalaria, Raj N. 2016. “Neuropathological Diagnosis of Vascular Cognitive Impairment and

- Vascular Dementia with Implications for Alzheimer's Disease." *Acta Neuropathologica* 131(5):659–85.
- Kandiah, Nagaendran and Howard H. Feldman. 2009. "Therapeutic Potential of Statins in Alzheimer's Disease." *Journal of the Neurological Sciences* 283(1–2):230–34.
- Karki, K., R. A. Knight, Y. Han, D. Yang, Z. Jianfeng, K. Ledbetter, M. Chopp, and D. Seyfried. 2009. "Simvastatin and Atorvastatin Improve Neurological Outcome after Experimental Intracerebral Hemorrhage." *NIH Public Access* 40(10):3384–89.
- Karl, Tim, Surabhi Bhatia, David Cheng, Woojin Scott Kim, and Brett Garner. 2012. "Cognitive Phenotyping of Amyloid Precursor Protein Transgenic J20 Mice." *Behavioural Brain Research* 228(2):392–97.
- Karran, Eric, Marc Mercken, and Bart De Strooper. 2011. "The Amyloid Cascade Hypothesis for Alzheimer's Disease: An Appraisal for the Development of Therapeutics." *Nature Reviews Drug Discovery* 10(9):698–712.
- Kaufer, Daniel I. 2015. "Neurobehavioral Assessment." *Continuum* 21(3):597–612.
- Kessels, Roy P. C., Madieke Remmerswaal, and Barbara A. Wilson. 2011. "Assessment of Nondeclarative Learning in Severe Alzheimer Dementia: The Implicit Memory Test (IMT)." *Alzheimer Disease and Associated Disorders* 25(2):179–83.
- Kim, Chi Hun, Christopher J. Heath, Brianne A. Kent, Timothy J. Bussey, and Lisa M. Saksida. 2015. "The Role of the Dorsal Hippocampus in Two Versions of the Touchscreen Automated Paired Associates Learning (PAL) Task for Mice." *Psychopharmacology* 232(21–22):3899–3910.
- Koennecke, Hans-christian. 2006. "Cerebral Microbleeds on MRI." *Neurology* 66:165–71.
- Kojro, E., G. Gimpl, S. Lammich, W. Marz, and F. Fahrenholz. 2001. "Low Cholesterol Stimulates the Nonamyloidogenic Pathway by Its Effect on the -Secretase ADAM 10." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98(10):5815–20.
- Kurata, Tomoko, Hiromi Kawai, Kazunori Miyazaki, Miki Kozuki, Nobutoshi Morimoto, Yasuyuki Ohta, Yoshio Ikeda, and Koji Abe. 2012. "Statins Have Therapeutic Potential for the Treatment of Alzheimer's Disease, Likely via Protection of the Neurovascular Unit in the AD Brain." *Journal of the Neurological Sciences* 322(1–2):59–63.
- Kurata, Tomoko, Kazunori Miyazaki, Miki Kozuki, Nobutoshi Morimoto, Yasuyuki Ohta, Yoshio Ikeda, and Koji Abe. 2012. "Atorvastatin and Pitavastatin Reduce Senile Plaques and Inflammatory Responses in a Mouse Model of Alzheimer's Disease." *Neurological Research* 34(6):601–10.
- Kurata, Tomoko, Kazunori Miyazaki, Nobutoshi Morimoto, Hiromi Kawai, Yasuyuki Ohta,

- Yoshio Ikeda, and Koji Abe. 2013. “Atorvastatin and Pitavastatin Reduce Oxidative Stress and Improve IR/LDL-R Signals in Alzheimer’s Disease.” *Neurological Research* 35(2):193–205.
- Kwa, V. I., C. L. Franke, B. Verbeeten, and J. Stam. 1998. “Silent Intracerebral Microhemorrhages in Patients with Ischemic Stroke. Amsterdam Vascular Medicine Group.” *Annals of Neurology* 44(3):372–77.
- Laczó, Jan, Ross Andel, Kamil Vlček, Václav Macoška, Martin Vyhnálek, Martin Tolar, Martin Bojar, and Jakub Hort. 2011. “Spatial Navigation and APOE in Amnesic Mild Cognitive Impairment.” *Neurodegenerative Diseases* 8(4):169–77.
- LaFerla, Frank M., Kim N. Green, and Salvatore Oddo. 2007. “Intracellular Amyloid- β in Alzheimer’s Disease.” *Nature Reviews Neuroscience* 8(7):499–509.
- Lasnon, Charline, Audrey Emmanuelle Dugue, Mélanie Briand, Cécile Blanc-Fournier, Soizic Dutoit, Marie hélène Louis, and Nicolas Aide. 2015. “NEMA NU 4-Optimized Reconstructions for Therapy Assessment in Cancer Research with the Inveon Small Animal PET/CT System.” *Molecular Imaging and Biology* 17(3):403–12.
- Lee, Jin Soo, Doo Soon Im, Young Sil An, Ji Man Hong, Byoung Joo Gwag, and In Soo Joo. 2011. “Chronic Cerebral Hypoperfusion in a Mouse Model of Alzheimers Disease: An Additional Contributing Factor of Cognitive Impairment.” *Neuroscience Letters* 489(2):84–88.
- Lee, Siyoung, Jisung Kim, Sang Gwon Seo, Bo Ryoung Choi, Jung Soo Han, Ki Won Lee, and Jiyoun Kim. 2014. “Sulforaphane Alleviates Scopolamine-Induced Memory Impairment in Mice.” *Pharmacological Research* 85:23–32.
- Leeuwis, Anna E., Niels D. Prins, Astrid M. Hooghiemstra, Marije R. Benedictus, Philip Scheltens, Frederik Barkhof, and Wiesje M. van der Flier. 2018. “Microbleeds Are Associated with Depressive Symptoms in Alzheimer’s Disease.” *Alzheimer’s and Dementia: Diagnosis, Assessment and Disease Monitoring* 10:112–20.
- Lewis, Jada, Eileen McGowan, Julia Rockwood, Heather Melrose, Parimala Nacharaju, Marjon Van Slegtenhorst, Katrina Gwinn-Hardy, M. P. Murphy, Matt Baker, Xin Yu, Karen Duff, John Hardy, Anthony Corral, Wen Lang Lin, Shu Hui Yen, Dennis W. Dickson, Peter Davies, and Mike Hutton. 2000. “Neurofibrillary Tangles, Amyotrophy and Progressive Motor Disturbance in Mice Expressing Mutant (P301L)Tau Protein.” *Nature Genetics* 25(4):402–5.
- Li, G., E. B. Larson, J. A. Sonnen, J. B. Shofer, E. C. Petrie, A. Schantz, E. R. Peskind, M. A. Raskind, J. C. S. Breitner, and T. J. Montine. 2007. “Statin Therapy Is Associated with

- Reduced Neuropathologic Changes of Alzheimer Disease.” *Neurology* 69(5):878–85.
- Li, Xuanting, Junliang Yuan, Lei Yang, Wei Qin, Shuna Yang, Yue Li, Huimin Fan, and Wenli Hu. 2017. “The Significant Effects of Cerebral Microbleeds on Cognitive Dysfunction : An Updated Meta- Analysis.” 1–14.
- Lin, Feng Cheng, Yun Shiuan Chuang, Hui Min Hsieh, Tzu Chi Lee, Kuei Fen Chiu, Ching Kuan Liu, and Ming Tsang Wu. 2015. “Early Statin Use and the Progression of Alzheimer Disease: A Total Population-Based Case-Control Study.” *Medicine (United States)* 94(47):e2143.
- Lu, Dunyue, Changsheng Qu, Anton Goussev, Hao Jiang, Chang Lu, Timothy Schallert, Asim Mahmood, Jieli Chen, Yi Li, and Michael Chopp. 2007. “Statins Increase Neurogenesis in the Dentate Gyrus, Reduce Delayed Neuronal Death in the Hippocampal CA3 Region, and Improve Spatial Learning in Rat after Traumatic Brain Injury.” 24(7):1132–46.
- M Sahebzamani, Frances. 2014. “Examination of the FDA Warning for Statins and Cognitive Dysfunction.” *Journal of Pharmacovigilance* 02(04).
- Ma, Da, Manuel J. Cardoso, Marc Modat, Nick Powell, Jack Wells, Holly Holmes, Frances Wiseman, Victor Tybulewicz, Elizabeth Fisher, Mark F. Lythgoe, and Sébastien Ourselin. 2014. “Automatic Structural Parcellation of Mouse Brain MRI Using Multi-Atlas Label Fusion.” *PLoS ONE* 9(1).
- Ma, Qingyi, Nikan Khatibi, Hank Chen, Jiping Tang, and John H. Zhang. 2011. “History of Preclinical Models of Intracerebral Hemorrhage.” *Acta Neurochirurgica. Supplement* 111:231–36.
- MacLellan, Crystal L., Kristopher D. Langdon, Kayla P. Churchill, Shirley Granter-Button, and Dale Corbett. 2009. “Assessing Cognitive Function after Intracerebral Hemorrhage in Rats.” *Behavioural Brain Research* 198(2):321–28.
- Mallien, Anne Stephanie, Rupert Palme, Juliet Richetto, Chiara Muzzillo, Sophie Helene Richter, Miriam Annika Vogt, Dragos Inta, Marco Andrea Riva, Barbara Vollmayr, and Peter Gass. 2016. “Daily Exposure to a Touchscreen-Paradigm and Associated Food Restriction Evokes an Increase in Adrenocortical and Neural Activity in Mice.” *Hormones and Behavior* 81:97–105.
- Manaenko, Anatol, Hank Chen, John H. Zhang, and Jiping Tang. 2011. “Comparison of Different Preclinical Models of Intracerebral Hemorrhage.” *Acta Neurochirurgica. Supplement* 111:9–14.
- Mans, R. A., L. L. McMahon, and L. Li. 2012. “Simvastatin-Mediated Enhancement of Long-

- Term Potentiation Is Driven by Farnesyl-Pyrophosphate Depletion and Inhibition of Farnesylation.” *Neuroscience* 202:1–9.
- Mar, Adam C., Alexa E. Horner, Simon Nilsson, J. Alsjö, B. Kent, C. Kim, A. Holmes, L. Saksida, and T. Bussey. 2013. “The Touchscreen Operant Platform for Assessing Executive Function in Rats and Mice.” 8(10):1985–2005.
- Martinez-Ramirez, Sergi, Steven M. Greenberg, and Anand Viswanathan. 2014. “Cerebral Microbleeds: Overview and Implications in Cognitive Impairment.” *Alzheimer’s Research & Therapy* 6(3):33.
- Masse, I., R. Bordet, D. Deplanque, A. Al Khedr, F. Richard, C. Libersa, and Florence Pasquier. 2005. “Lipid Lowering Agents Are Associated with a Slower Cognitive Decline in Alzheimer’s Disease.” *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 76(12):1624–29.
- Masuda, Tadashi, Mina Maki, Koichi Hara, Takao Yasuhara, Noriyuki Matsukawa, Seongjin Yu, Eunkyung Cate Bae, Naoki Tajiri, Sonia H. Chheda, Marianna Aurora Solomita, Nathan Weinbren, Yuji Kaneko, Sergei A. Kirov, David C. Hess, Hideki Hida, and Cesar V. Borlongan. 2010. “Peri-Hemorrhagic Degeneration Accompanies Stereotaxic Collagenase-Mediated Cortical Hemorrhage in Mouse.” *Brain Research* 1355:228–39.
- Van Matre, Edward T., Deb S. Sherman, and Tyree H. Kiser. 2016. “Management of Intracerebral Hemorrhage – Use of Statins.” *Vascular Health and Risk Management* 12:153–61.
- McAuley, Grant, Matthew Schrag, Samuel Barnes, Andre Obenaus, April Dickson, and Wolff Kirsch. 2012. “In Vivo Iron Quantification in Collagenase-Induced Microbleeds in Rat Brain.” *Magnetic Resonance in Medicine* 67(3):711–17.
- McFarland, Amelia J., Shailendra Anoopkumar-Dukie, Devinder S. Arora, Gary D. Grant, Catherine M. McDermott, Anthony V. Perkins, and Andrew K. Davey. 2014. “Molecular Mechanisms Underlying the Effects of Statins in the Central Nervous System.” *International Journal of Molecular Sciences* 15(11):20607–37.
- McGuinness, B., O. J. Hare, D. Craig, R. Bullock, R. Malouf, and P. Passmore. 2016. “Statins for the Treatment of Dementia (Review).” *Cochrane Database of Systematic Reviews* (1).
- Mendoza-Oliva, Aydé, Angélica Zepeda, and Clorinda Arias. 2014. “The Complex Actions of Statins in Brain and Their Relevance for Alzheimer’s Disease Treatment: An Analytical Review.” *Current Alzheimer Research* 11(9):817–33.
- Miwa, Kaori, Makiko Tanaka, Shuhei Okazaki, Shigetaka Furukado, Manabu Sakaguchi, and

- Kazuo Kitagawa. 2011. “Relations of Blood Inflammatory Marker Levels with Cerebral Microbleeds.” *Stroke* 42(11):3202–6.
- Moffat, Scott D. and Susan M. Resnick. 2002. “Effects of Age on Virtual Environment Place Navigation and Allocentric Cognitive Mapping.” *Behavioral Neuroscience* 116(5):851–59.
- van der Most, Peter J., Amalia M. Dolga, Ingrid M. Nijholt, Paul G. M. Luiten, and Ulrich L. M. Eisel. 2009. “Statins: Mechanisms of Neuroprotection.” *Progress in Neurobiology* 88(1):64–75.
- Mucke, Lennart, Eliezer Masliah, Gui-qiu Yu, Margaret Mallory, Edward M. Rockenstein, Gwen Tatsuno, Kang Hu, Dora Kholodenko, Kelly Johnson-wood, and Lisa Mcconlogue. 2000. “High-Level Neuronal Expression of A^β 1 – 42 in Wild-Type Human Amyloid Protein Precursor Transgenic Mice : Synaptotoxicity without Plaque Formation.” 20(11):4050–58.
- Nakamura, T., G. Xi, Y. Hua, T. Schallert, J. T. Hoff, and R. F. Keep. 2004. “Intracerebral Hemorrhage in Mice: Model Characterization and Application for Genetically Modified Mice.” *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 24(5):487–494.
- Nandigam, R. N. K., A. Viswanathan, P. Delgado, M. E. Skehan, E. E. Smith, J. Rosand, S. M. Greenberg, and B. C. Dickerson. 2009. “MR Imaging Detection of Cerebral Microbleeds: Effect of Susceptibility-Weighted Imaging, Section Thickness, and Field Strength.” *American Journal of Neuroradiology* 30(2):338–43.
- Nedelska, Z., R. Andel, J. Laczko, K. Vlcek, D. Horinek, J. Lisy, K. Sheardova, J. Bures, and J. Hort. 2012. “Spatial Navigation Impairment Is Proportional to Right Hippocampal Volume.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(7):2590–94.
- Neha, Rupinder K. Sodhi, Amteshwar S. Jaggi, and Nirmal Singh. 2014. “Animal Models of Dementia and Cognitive Dysfunction.” *Life Sciences* 109(2):73–86.
- Niemi, Mikko. 2007. “Role of OATP Transporters in the Disposition of Drugs.” *Pharmacogenomics* 8(7):787–802.
- Noorbakhsh-Sabet, Nariman, Varun Chandi Pulakanti, and Ramin Zand. 2017. “Uncommon Causes of Cerebral Microbleeds.” *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases* 26(10):2043–49.
- Nunomura, A., G. Perry, G. Aliev, K. Hirai, A. Takeda, E. K. Balraj, P. K. Jones, H. Ghanbari, T. Wataya, S. Shimohama, S. Chiba, C. S. Atwood, R. B. Petersen, and M. A. Smith. 2018. “Oxidative Damage Is the Earliest Event in Alzheimer Disease.”

- 60(8):759–67.
- Oakley, H., S. L. Cole, S. Logan, E. Maus, P. Shao, J. Craft, A. Guillozet-Bongaarts, M. Ohno, J. Disterhoft, L. Van Eldik, R. Berry, and R. Vassar. 2006. “Intraneuronal Beta-Amyloid Aggregates, Neurodegeneration, and Neuron Loss in Transgenic Mice with Five Familial Alzheimer’s Disease Mutations: Potential Factors in Amyloid Plaque Formation.” *Journal of Neuroscience* 26(40):10129–40.
- Oddo, Salvatore, Antonella Caccamo, Jason D. Shepherd, M. Paul Murphy, Todd E. Golde, Rakez Kaye, Raju Metherate, Mark P. Mattson, Yama Akbari, and Frank M. LaFerla. 2003. “Triple-Transgenic Model of Alzheimer’s Disease with Plaques and Tangles: Intracellular A β and Synaptic Dysfunction.” *Neuron* 39(3):409–21.
- Opper, C., C. Clement, H. Schwarz, J. Krappe, A. Steinmetz, J. Schneider, and W. Wesemann. 1995. “Increased Number of High Sensitive Platelets in Hypercholesterolemia, Cardiovascular Diseases, and after Incubation with Cholesterol.” *Atherosclerosis* 113(2):211–17.
- Ostrowski, Stephen M., Brandy L. Wilkinson, Todd E. Golde, and Gary Landreth. 2007. “Statins Reduce Amyloid- β Production through Inhibition of Protein Isoprenylation.” *Journal of Biological Chemistry* 282(37):26832–44.
- Ott, Brian R., Lori A. Daiello, Issa J. Dahabreh, Beth A. Springate, Kimberly Bixby, Manjari Murali, and Thomas A. Trikalinos. 2015. “Do Statins Impair Cognition? A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials.” *Journal of General Internal Medicine* 30(3):348–58.
- Ouk, Thavarak, Camille Potey, Maud Laprais, Sophie Gautier, Rémi Hanf, Raphaël Darteil, Bart Staels, Patrick Duriez, and Régis Bordet. 2014. “PPAR α Is Involved in the Multitargeted Effects of a Pretreatment with Atorvastatin in Experimental Stroke.” *Fundamental and Clinical Pharmacology* 28(3):294–302.
- Pantoni, Leonardo. 2010. “Cerebral Small Vessel Disease: From Pathogenesis and Clinical Characteristics to Therapeutic Challenges.” *The Lancet Neurology* 9(7):689–701.
- Paradise, Matt, Adam Seruga, John D. Crawford, Joga Chaganti, Anbupalam Thalamuthu, Nicole A. Kochan, Henry Brodaty, Wei Wen, and Perminder S. Sachdev. 2018. “The Relationship of Cerebral Microbleeds to Cognition and Incident Dementia in Non-Demented Older Individuals.” *Brain Imaging and Behavior* 1–12.
- Pause, Bettina M., Armin Zlomuzica, Kiyoka Kinugawa, Jean Mariani, Reinhard Pietrowsky, and Ekrem Dere. 2013. “Perspectives on Episodic-Like and Episodic Memory.” *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 7(April):1–12.

- Pettersen, J. A., G. Sathiyamoorthy, F. Q. Gao, G. Szilagyi, N. K. Nadkarni, P. St George-Hyslop, E. Rogaeva, and S. E. Black. 2008. “Microbleed Topography, Leukoaraiosis, and Cognition in Probable Alzheimer Disease from the Sunnybrook Dementia Study.” *Arch Neurol* 65(6):790–95.
- Piermartiri, Tetsadê C. B., Cláudia P. Figueiredo, Daniel Rial, Filipe S. Duarte, Sarah C. Bezerra, Gianni Mancini, Andreza F. de Bem, Rui D. S. Prediger, and Carla I. Tasca. 2010. “Atorvastatin Prevents Hippocampal Cell Death, Neuroinflammation and Oxidative Stress Following Amyloid-B1-40administration in Mice: Evidence for Dissociation between Cognitive Deficits and Neuronal Damage.” *Experimental Neurology* 226(2):274–84.
- Poels, Mariëlle M. F., M. Arfan Ikram, Aad Van Der Lugt, Albert Hofman, Gabriel P. Krestin, Monique M. B. Breteler, and Meike W. Vernooij. 2011. “Incidence of Cerebral Microbleeds in the General Population: The Rotterdam Scan Study.” *Stroke* 42(3):656–61.
- Poels, Mariëlle M. F., Meike W. Vernooij, M. Arfan Ikram, Albert Hofman, Gabriel P. Krestin, Aad Van Der Lugt, and Monique Breteler. 2010. “Prevalence and Risk Factors of Cerebral Microbleeds: An Update of the Rotterdam Scan Study.” *Stroke* 41(10 SUPPL. 1).
- Pooler, Amy M., Shijun C. Xi, and Richard J. Wurtman. 2006. “The 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Co-Enzyme A Reductase Inhibitor Pravastatin Enhances Neurite Outgrowth in Hippocampal Neurons.” *Journal of Neurochemistry* 97(3):716–23.
- Power, Melinda C., Jennifer Weuve, A. Richey Sharrett, Deborah Blacker, and Rebecca F. Gottesman. 2015. “Statins, Cognition, and Dementia-Systematic Review and Methodological Commentary.” *Nature Reviews Neurology* 11(4):220–29.
- Purushothuman, Sivaraman, Lauren Marotte, Sally Stowe, Daniel M. Johnstone, and Jonathan Stone. 2013. “The Response of Cerebral Cortex to Haemorrhagic Damage: Experimental Evidence from a Penetrating Injury Model.” *PLoS ONE* 8(3).
- Purushothuman, Sivaraman and Jonathan Stone. 2015. “The Reaction of Cerebral Cortex to a Nearby Lesion: Damage, Survival, Self-Protection.” *Brain Research* 1601:52–63.
- Puzzo, Daniela, Walter Gulisano, Agostino Palmeri, and Ottavio Arancio. 2015. “Rodent Models for Alzheimer’s Disease Drug Discovery Daniela.” *Expert Opinion on Drug Discovery* 10(7):703–11.
- Puzzo, Daniela, Linda Lee, Agostino Palmeri, Giorgio Calabrese, and Ottavio Arancio. 2014. “Behavioral Assays with Mouse Models of Alzheimer’s Disease: Practical

- Considerations and Guidelines.” *Biochemical Pharmacology* 88(4):450–67.
- Quental, Natalia Bezerra Mota, Sonia Maria Dozzi Brucki, and Orlando Francisco Amodeo Bueno. 2009. “Visuospatial Function in Early Alzheimer’s Disease.” *Dementia & Neuropsychologia* 3(3):234–40.
- Rabelo, Ana GB, Camila VL Teixeira, Thamires NC Magalhães, Ana Flávia MK Carletti-Cassani, Augusto CS Amato Filho, Helena PG Joaquim, Leda L. Talib, Orestes Forlenza, Patrícia AO Ribeiro, Rodrigo Secolin, Iscia Lopes-Cendes, Fernando Cendes, and Marcio LF Balthazar. 2017. “Is Cerebral Microbleed Prevalence Relevant as a Biomarker in Amnesic Mild Cognitive Impairment and Mild Alzheimer’s Disease?” *The Neuroradiology Journal* 197140091772046.
- Ramanan, Vijay K., Scott A. Przybelski, Jonathan Graff-Radford, Anna M. Castillo, Val J. Lowe, Michelle M. Mielke, Rosebud O. Roberts, Robert I. Reid, David S. Knopman, Clifford R. Jack, Ronald C. Petersen, and Prashanthi Vemuri. 2018. “Statins and Brain Health: Alzheimer’s Disease and Cerebrovascular Disease Biomarkers in Older Adults.” *Journal of Alzheimer’s Disease* 65:1–8.
- Rea, Thomas D., John C. Breitner, Bruce M. Psaty, Annette L. Fitzpatrick, Oscar L. Lopez, Anne B. Newman, William R. Hazzard, Peter P. Zandi, Gregory L. Burke, Constantine G. Lyketsos, Charles Bernick, and Lewis H. Kuller. 2005. “Statin Use and the Risk of Incident Dementia.” *Archives of Neurology* 62(7):1047.
- De Reuck, J. L. 2012. “The Significance of Small Cerebral Bleeds in Neurodegenerative Dementia Syndromes.” *Aging Dis* 3(4):307–12.
- Reuter, Björn, Alexander Venus, Saskia Grudzenski, Patrick Heiler, Lothar Schad, Matthias Staufenbiel, Michael G. Hennerici, and Marc Fatar. 2016. “Statin Therapy and the Development of Cerebral Amyloid Angiopathy—A Rodent in Vivo Approach.” *International Journal of Molecular Sciences* 17(1).
- Robin, Nicholas C., Zsuzsa Agoston, Travis L. Biechele, Richard G. James, Jason D. Berndt, and Randall T. Moon. 2014. “Simvastatin Promotes Adult Hippocampal Neurogenesis by Enhancing Wnt/ β -Catenin Signaling.” *Stem Cell Reports* 2(1):9–17.
- Rockwood, Kenneth, Susan Kirkland, David B. Hogan, Chris MacKnight, Heather Merry, René Verreault, Christina Wolfson, and Ian McDowell. 2002. “Use of Lipid-Lowering Agents, Indication Bias, and the Risk of Dementia in Community-Dwelling Elderly People.” *Archives of Neurology* 59(2):223–27.
- Rogers, Jake, Leonid Churilov, Anthony J. Hannan, and Thibault Renoir. 2017. “Search Strategy Selection in the Morris Water Maze Indicates Allocentric Map Formation

- during Learning That Underpins Spatial Memory Formation.” *Neurobiology of Learning and Memory* 139:37–49.
- Romero, José R., Alexa Beiser, Jayandra J. Himali, Ashkan Shoamanesh, Charles DeCarli, and Sudha Seshadri. 2017. “Cerebral Microbleeds and Risk of Incident Dementia: The Framingham Heart Study.” *Neurobiology of Aging* 54:94–99.
- Romero, José Rafael, Sarah R. Preis, Alexa Beiser, Charles Decarli, Anand Viswanathan, Sergi Martinez-Ramirez, Carlos S. Kase, Philip A. Wolf, and Sudha Seshadri. 2014. “Risk Factors, Stroke Prevention Treatments, and Prevalence of Cerebral Microbleeds in the Framingham Heart Study.” *Stroke* 45(5):1492–94.
- Roob, Gudrun, Anita Lechner, Reinhold Schmidt, Erich Flooh, Hans Peter Hartung, and Franz Fazekas. 2000. “Frequency and Location of Microbleeds in Patients with Primary Intracerebral Hemorrhage.” *Stroke* 31(11):2665–69.
- Rosenberg, Gary A., Mario Kornfeld, Edward Estrada, Robert O. Kelley, Lance A. Liotta, and William G. Stetler-Stevenson. 1992. “TIMP-2 Reduces Proteolytic Opening of Blood-Brain Barrier by Type IV Collagenase.” *Brain Research* 576(2):203–7.
- Rosenfeld, Cheryl S. and Sherry A. Ferguson. 2014. “Barnes Maze Testing Strategies with Small and Large Rodent Models.” *Journal of Visualized Experiments* (84):1–15.
- Rosidi, Nathanael L., Joan Zhou, Sanket Pattanaik, Peng Wang, Weiyang Jin, Morgan Brophy, William L. Olbricht, Nozomi Nishimura, and Chris B. Schaffer. 2011. “Cortical Microhemorrhages Cause Local Inflammation but Do Not Trigger Widespread Dendrite Degeneration.” *PLoS ONE* 6(10).
- Rynkowski, Michal A., Grace H. Kim, Ricardo J. Komotar, Marc L. Otten, Andrew F. Ducruet, Brad E. Zacharia, Christopher P. Kellner, David K. Hahn, Maxwell B. Merkow, Matthew C. Garrett, Robert M. Starke, Byung Moon Cho, Sergei A. Sosunov, and Sander E. Connolly. 2008. “A Mouse Model of Intracerebral Hemorrhage Using Autologous Blood Infusion.” *Nature Protocols* 3(1):122–28.
- Salimi, Shirin, Muireann Irish, David Foxe, John R. Hodges, Olivier Piguet, and James R. Burrell. 2018. “Can Visuospatial Measures Improve the Diagnosis of Alzheimer’s Disease?” *Alzheimer’s and Dementia: Diagnosis, Assessment and Disease Monitoring* 10:66–74.
- Sano, M., K. L. Bell, D. Galasko, J. E. Galvin, R. G. Thomas, C. H. Van Dyck, and P. S. Aisen. 2011. “A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial of Simvastatin to Treat Alzheimer Disease.” *Neurology* 77(6):556–63.
- Schultz, Bob G., Denise K. Patten, and Daniel J. Berlau. 2018. “The Role of Statins in Both

- Cognitive Impairment and Protection against Dementia: A Tale of Two Mechanisms.” *Translational Neurodegeneration* 7(1):1–11.
- Selkoe, Dennis J. 2006. “Toward a Comprehensive Theory for Alzheimer’s Disease. Hypothesis: Alzheimer’s Disease Is Caused by the Cerebral Accumulation and Cytotoxicity of Amyloid β -Protein.” *Annals of the New York Academy of Sciences* 924(1):17–25.
- Selkoe, Dennis J. and John Hardy. 2016. “The Amyloid Hypothesis of Alzheimer’s Disease at 25 Years.” *EMBO Molecular Medicine* 8(6):595–608.
- Sepehry, A. A., D. Lang, G. Y. Hsiung, and A. Rauscher. 2016. “Prevalence of Brain Microbleeds in Alzheimer Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis on the Influence of Neuroimaging Techniques.” *American Journal of Neuroradiology* 37(2):215–22.
- Sepehry, Amir A., Alexander Rauscher, Ging-Yuek Hsiung, and Donna J. Lang. 2016. “Microbleeds in Alzheimer’s Disease: A Neuropsychological Overview and Meta-Analysis.” *Canadian Journal of Neurological Sciences / Journal Canadien Des Sciences Neurologiques* 43(06):753–59.
- Shams, S., J. Martola, T. Granberg, X. Li, M. Shams, S. M. Fereshtehnejad, L. Cavallin, P. Aspelin, M. Kristoffersen-Wiberg, and L. O. Wahlund. 2015. “Cerebral Microbleeds: Different Prevalence, Topography, and Risk Factors Depending on Dementia Diagnosis—the Karolinska Imaging Dementia Study.” *American Journal of Neuroradiology* 36(4):661–66.
- Shams, Sara, J. Martola, L. Cavallin, T. Granberg, M. Shams, P. Aspelin, L. O. Wahlund, and M. Kristoffersen-Wiberg. 2015. “SWI or T2*: Which MRI Sequence to Use in the Detection of Cerebral Microbleeds? The Karolinska Imaging Dementia Study.” *American Journal of Neuroradiology* 36(6):1089–95.
- Shams, Sara and Lars-Olof Wahlund. 2016. “Cerebral Microbleeds as a Biomarker in Alzheimer’s Disease? A Review in the Field.” *Biomarkers in Medicine* 10(1):9–18.
- Sharma, Sunita, Sharlene Rakoczy, and Holly Brown-Borg. 2010. “Assessment of Spatial Memory in Mice.” *Life Sciences* 87(17–18):521–36.
- Shepherd, A., S. Tyebji, A. J. Hannan, and E. L. Burrows. 2016. “Translational Assays for Assessment of Cognition in Rodent Models of Alzheimer’s Disease and Dementia.” *Journal of Molecular Neuroscience* 60(3):371–82.
- Shepherd, James, Gerard J. Blauw, Michael B. Murphy, Edward L. E. M. Bollen, Brendan M. Buckley, Stuart M. Cobbe, Ian Ford, Allan Gaw, Michael Hyland, J. Wouter Jukema,

- Adriaan M. Kamper, Peter W. Macfarlane, A. Edo Meinders, John Norrie, Chris J. Packard, Ivan J. Perry, David J. Stott, Brian J. Sweeney, Cillian Twomey, and Rudi G. J. Westendorp. 2002. “Pravastatin in Elderly Individuals at Risk of Vascular Disease (PROSPER): A Randomised Controlled Trial.” *Lancet* 360(9346):1623–30.
- Sherman, Kathleen A. and Eitan Friedman. 1990. “Pre- and Post-Synaptic Cholinergic Dysfunction in Aged Rodent Brain Regions: New Findings and an Interpretative Review.” *International Journal of Developmental Neuroscience* 8(6):689–708.
- Sherrill, K. R., U. M. Erdem, R. S. Ross, T. I. Brown, M. E. Hasselmo, and C. E. Stern. 2013. “Hippocampus and Retrosplenial Cortex Combine Path Integration Signals for Successful Navigation.” *Journal of Neuroscience* 33(49):19304–13.
- Shih, Andy Y., Hyacinth I. Hyacinth, David A. Hartmann, and Susanne J. van Veluw. 2018. “Rodent Models of Cerebral Microinfarct and Microhemorrhage.” *Stroke* 49(3):803–10.
- Shinohara, Mitsuru, Naoyuki Sato, Hitomi Kurinami, Daisuke Takeuchi, Shuko Takeda, Munehisa Shimamura, Toshihide Yamashita, Yasuo Uchiyama, Hiromi Rakugi, and Ryuichi Morishita. 2010. “Reduction of Brain β -Amyloid ($A\beta$) by Fluvastatin, a Hydroxymethylglutaryl-CoA Reductase Inhibitor, through Increase in Degradation of Amyloid Precursor Protein C-Terminal Fragments (APP-CTFs) and $A\beta$ Clearance.” *Journal of Biological Chemistry* 285(29):22091–102.
- Shitara, Yoshihisa and Yuichi Sugiyama. 2006. “Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Alterations of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A (HMG-CoA) Reductase Inhibitors: Drug-Drug Interactions and Interindividual Differences in Transporter and Metabolic Enzyme Functions.” *Pharmacology and Therapeutics* 112(1):71–105.
- Shoamanesh, A., C. S. Kwok, and O. Benavente. 2011. “Cerebral Microbleeds: Histopathological Correlation of Neuroimaging.” *Cerebrovascular Diseases* 32(6):528–34.
- Shoamanesh, Ashkan, Sarah R. Preis, Alexa S. Beiser, Ramachandran S. Vasan, Emelia J. Benjamin, Carlos S. Kase, Philip A. Wolf, Charles DeCarli, Jose R. Romero, and Sudha Seshadri. 2015. “Inflammatory Biomarkers, Cerebral Microbleeds, and Small Vessel Disease: Framingham Heart Study.” *Neurology* 84(8):825–32.
- Shoji, Hiroataka, Keizo Takao, Satoko Hattori, and Tsuyoshi Miyakawa. 2016. “Age-Related Changes in Behavior in C57BL/6J Mice from Young Adulthood to Middle Age.” *Molecular Brain* 9(1):1–18.
- Sirtori, Cesare R. 2014. “The Pharmacology of Statins.” *Pharmacological Research* 88:3–11.
- Smith, Kyle B., Paul Kang, and Marwan N. Sabbagh. 2017. “The Effect of Statins on Rate of

- Cognitive Decline in Mild Cognitive Impairment.” *Alzheimer’s and Dementia: Translational Research and Clinical Interventions* 3(2):149–56.
- Sparks, D., R. Kryscio, M. Sabbagh, D. Connor, L. Sparks, and C. Liebsack. 2008. “Reduced Risk of Incident AD with Elective Statin Use in a Clinical Trial Cohort.” *Current Alzheimer Research* 5(4):416–21.
- Sparks, D. Larry, Marwan N. Sabbagh, Donald J. Connor, Jean Lopez, Lenore J. Launer, Patrick Browne, Dawn Wasser, Sherry Johnson-Traver, Jeff Lochhead, and Chuck Ziolkowski. 2005. “Atorvastatin for the Treatment of Mild to Moderate Alzheimer Disease.” *Archives of Neurology* 62(5):753.
- Spieker, Elena A., Robert S. Astur, Jeffrey T. West, Jacqueline A. Griego, and Laura M. Rowland. 2012. “Spatial Memory Deficits in a Virtual Reality Eight-Arm Radial Maze in Schizophrenia.” *Schizophrenia Research* 135(1–3):84–89.
- Squire, Larry R. 2004. “Memory Systems of the Brain: A Brief History and Current Perspective.” *Neurobiology of Learning and Memory* 82(3):171–77.
- Strekalova, Tatyana, Rainer Spanagel, Dusan Bartsch, Fritz A. Henn, and Peter Gass. 2004. “Stress-Induced Anhedonia in Mice Is Associated with Deficits in Forced Swimming and Exploration.” *Neuropsychopharmacology* 29(11):2007–17.
- Sudduth, Tiffany L., David K. Powell, Charles D. Smith, Abigail Greenstein, and Donna M. Wilcock. 2013. “Induction of Hyperhomocysteinemia Models Vascular Dementia by Induction of Cerebral Microhemorrhages and Neuroinflammation.” *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 33(5):708–15.
- Sudduth, Tiffany L., Erica M. Weekman, Holly M. Brothers, Kaitlyn Braun, and Donna M. Wilcock. 2014. “ β -Amyloid Deposition Is Shifted to the Vasculature and Memory Impairment Is Exacerbated When Hyperhomocysteinemia Is Induced in APP/PS1 Transgenic Mice.” *Alzheimer’s Research and Therapy* 6(3):1–11.
- Sumbria, R., M. Grigoryan, V. Vasilevko, T. Krasieva, M. Scadeng, A. Dvornikova, A. Paganini-Hill, R. Kim, D. Cribbs, and M. Fisher. 2016. “A Murine Model of Inflammation-Induced Cerebral Microbleeds.” *Journal of Neuroinflammation* 13(1):218.
- Sunyer, Berta, Sudarshan Patil, Harald Höger, and Gert Lubec. 2007. “Barnes Maze, a Useful Task to Assess Spatial Reference Memory in the Mice.” *Protocol Exchange*.
- Sweeney, Melanie D., Abhay P. Sagare, and Berislav V. Zlokovic. 2018. “Blood-Brain Barrier Breakdown in Alzheimer Disease and Other Neurodegenerative Disorders.” *Nature Reviews Neurology* 14(3):133–50.

- Swiger, Kristopher J., Raoul J. Manalac, Roger S. Blumenthal, Michael J. Blaha, and Seth S. Martin. 2013. “Statins and Cognition: A Systematic Review and Meta-Analysis of Short- and Long-Term Cognitive Effects.” *Mayo Clinic Proceedings* 88(11):1213–21.
- Taillade, Mathieu, Bernard N’Kaoua, Prashan Arvind Pala, and Hélène Sauz eon. 2014. “Cognition Spatiale et Vieillessement : Les Nouveaux  clairages Offerts Par Les  tudes Utilisant La Réalité Virtuelle Spatial Cognition and Aging: New Insights Provided by Virtual Reality-Based Studies.” *Rev Neuropsychol* 6(1):36–47.
- Takeda, Toshio. 1999. “Senescence-Accelerated Mouse (SAM): A Biogerontological Resource in Aging Research.” *Neurobiology of Aging* 20(2):105–10.
- Takemoto, Masao and James K. Liao. 2001. “Pleiotropic Effects of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase Inhibitors.” *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1712–19.
- Talpos, J. C., B. D. Winters, R. Dias, L. M. Saksida, and T. J. Bussey. 2009. “A Novel Touchscreen-Automated Paired-Associate Learning (PAL) Task Sensitive to Pharmacological Manipulation of the Hippocampus: A Translational Rodent Model of Cognitive Impairments in Neurodegenerative Disease.” *Psychopharmacology* 205(1):157–68.
- Tariq, Sana and Philip A. Barber. 2018. “Dementia Risk and Prevention by Targeting Modifiable Vascular Risk Factors.” *Journal of Neurochemistry* 144(5):565–81.
- Tarumi, Takashi, Muhammad Ayaz Khan, Jie Liu, Benjamin M. Tseng, Rosemary Parker, Jonathan Riley, Cynthia Tinajero, and Rong Zhang. 2014. “Cerebral Hemodynamics in Normal Aging: Central Artery Stiffness, Wave Reflection, and Pressure Pulsatility.” *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 34(6):971–78.
- Tellechea, P., N. Pujol, P. Esteve-Belloch, B. Echeveste, M. R. García-Eulate, J. Arbizu, and M. Riverol. 2017. “Early- and Late-Onset Alzheimer Disease: Are They the Same Entity?” *Neurolog a (English Edition)*.
- Thelen, K. M. 2005. “Brain Cholesterol Synthesis in Mice Is Affected by High Dose of Simvastatin but Not of Pravastatin.” *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 316(3):1146–52.
- Toledano, A. and M. I. Alvarez. 2004. “Lesions and Dysfunctions of the Nucleus Basalis as Alzheimer’s Disease Models: General and Critical Overview and Analysis of the Long-Term Changes in Several Excitotoxic Models.” *Curr Alzheimer Res* 1(3):189–214.
- Tomiyama, T., S. Matsuyama, H. Iso, T. Umeda, H. Takuma, K. Ohnishi, K. Ishibashi, R. Teraoka, N. Sakama, T. Yamashita, K. Nishitsuji, K. Ito, H. Shimada, M. P. Lambert, W.

- L. Klein, and H. Mori. 2010. “A Mouse Model of Amyloid Oligomers: Their Contribution to Synaptic Alteration, Abnormal Tau Phosphorylation, Glial Activation, and Neuronal Loss In Vivo.” *Journal of Neuroscience* 30(14):4845–56.
- Tong, Xin Kang, Nektaria Nicolakakis, Priscilla Fernandes, Brice Ongali, Jonathan Brouillette, Rémi Quirion, and Edith Hamel. 2009. “Simvastatin Improves Cerebrovascular Function and Counters Soluble Amyloid-Beta, Inflammation and Oxidative Stress in Aged APP Mice.” *Neurobiology of Disease* 35(3):406–14.
- Troen, A. M., M. Shea-Budgell, B. Shukitt-Hale, D. E. Smith, J. Selhub, and I. H. Rosenberg. 2008. “B-Vitamin Deficiency Causes Hyperhomocysteinemia and Vascular Cognitive Impairment in Mice.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(34):12474–79.
- Trompet, Stella, Peter Van Vliet, Anton J. M. De Craen, Jelle Jolles, Brendan M. Buckley, Michael B. Murphy, Ian Ford, Peter W. MacFarlane, Naveed Sattar, Chris J. Packard, David J. Stott, Jim Shepherd, Eduard L. E. M. Bollen, Gerard J. Blauw, J. Wouter Jukema, and Rudi G. J. Westendorp. 2010. “Pravastatin and Cognitive Function in the Elderly. Results of the PROSPER Study.” *Journal of Neurology* 257(1):85–90.
- Tulving, E. 1972a. “Episodic and Semantic Memory.” *Organization of Memory* 1:381–403.
- Tulving, E. 1972b. “Episodic and Semantic Memory.” *Organization of Memory* 1:381–403.
- Tulving, E. and H. J. Markowitsch. 1998. “Episodic and Declarative Memory: Role of the Hippocampus.” *Hippocampus* 8(3):198–204.
- Tustison, N., B. Avants, P. Cook, Y. Zheng, A. Egan, P. Yushkevich, and J. Gee. 2011. “N4ITK: Improved N3 Bias Correction Nicholas.” *IEEE Transactions on Medical Imaging* 29(6):1310–20.
- Ungvari, Zoltan, Stefano Tarantini, Angelia C. Kirkpatrick, Anna Csiszar, and Calin I. Prodan. 2017. “Cerebral Microhemorrhages: Mechanisms, Consequences, and Prevention.” *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 312(6):H1128–43.
- Valenzuela, M., M. Esler, K. Ritchie, and H. Brodaty. 2012. “Antihypertensives for Combating Dementia A Perspective on Candidate Molecular Mechanisms and Population-Based Prevention.” *Translational Psychiatry* 2(4):e107-10.
- Van Dam, Debby and Peter Paul De Deyn. 2011. “Animal Models in the Drug Discovery Pipeline for Alzheimer’s Disease.” *British Journal of Pharmacology* 164(4):1285–1300.
- van der Staay, F. Josef. 2006. “Animal Models of Behavioral Dysfunctions: Basic Concepts and Classifications, and an Evaluation Strategy.” *Brain Research Reviews* 52(1):131–59.

- van der Staay, F. Josef, Saskia S. Arndt, and Rebecca E. Nordquist. 2009. "Evaluation of Animal Models of Neurobehavioral Disorders." *Behavioral and Brain Functions* 5:1–23.
- Van Der Vlies, Annelies E., Jeroen D. C. Goos, Frederik Barkhof, Philip Scheltens, and Wiesje M. Van Der Flier. 2012. "Microbleeds Do Not Affect Rate of Cognitive Decline in Alzheimer Disease." *Neurology* 79(8):763–69.
- Viola, Kirsten L. and William L. Klein. 2015. "Amyloid β Oligomers in Alzheimer's Disease Pathogenesis, Treatment, and Diagnosis." *Acta Neuropathologica* 129(2):183–206.
- Vorhees, Charles V. and Michael T. Williams. 2014. "Assessing Spatial Learning and Memory in Rodents." *ILAR Journal* 55(2):310–32.
- Wagstaff, Leslie R., Melinda W. Mitton, Beth McLendon Arvik, and P. Murali Doraiswamy. 2003. "Statin-Associated Memory Loss: Analysis of 60 Case Reports and Review of the Literature." *Pharmacotherapy* 23(7):871–80.
- Wahrle, Suzanne, Pritam Das, Andrew C. Nyborg, Chris McLendon, Mikio Shoji, Takeshi Kawarabayashi, Linda H. Younkin, Steven G. Younkin, and Todd E. Golde. 2002. "Cholesterol-Dependent γ -Secretase Activity in Buoyant Cholesterol-Rich Membrane Microdomains." *Neurobiology of Disease* 9(1):11–23.
- Wakisaka, Yoshinobu, Yi Chu, Jordan D. Miller, Gary A. Rosenberg, and Donald D. Heistad. 2010. "Spontaneous Intracerebral Hemorrhage during Acute and Chronic Hypertension in Mice." *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 30(1):56–69.
- Walf, A. and C. Frye. 2007. "The Use of the Elevated plus Maze as an Assay of Anxiety-Related Behavior in Rodents." *Nature Protocols* 2:322–28.
- Wang, Qing, Ayse Zengin, Chao Deng, Yun Li, Kelly A. Newell, Guo Yuan Yang, Ying Lu, Einar P. Wilder-Smith, Heng Zhao, and Xu Feng Huang. 2009. "High Dose of Simvastatin Induces Hyperlocomotive and Anxiolytic-like Activities: The Association with the up-Regulation of NMDA Receptor Binding in the Rat Brain." *Experimental Neurology* 216(1):132–38.
- Wang, Yuelong, Qianwei Chen, Qiang Tan, Zhou Feng, Zhenlin He, Jun Tang, Hua Feng, Gang Zhu, and Zhi Chen. 2018. "Simvastatin Accelerates Hematoma Resolution after Intracerebral Hemorrhage in a PPAR γ -Dependent Manner." *Neuropharmacology* 128:244–54.
- Webster, Scott J., Adam D. Bachstetter, Peter T. Nelson, Frederick A. Schmitt, and Linda J. Van Eldik. 2014. "Using Mice to Model Alzheimer's Dementia: An Overview of the Clinical Disease and the Preclinical Behavioral Changes in 10 Mouse Models." *Frontiers in Genetics* 5(APR):1–23.

- Weintraub, Sandra, Alissa H. Wicklund, and David P. Salmon. 2012. “The Neuropsychological Profile of Alzheimer Disease.” *Cold Spring Harb Perspect Med* 1–18.
- Weitz-Schmidt, Gabriele, Karl Welzenbach, Volker Brinkmann, Tetsji Kamata, Joerg Kallen, Christian Bruns, Sylvain Cottens, Yoshikazu Takada, and Ulrich Hommel. 2001. “Statins Selectively Inhibit Leukocyte Function Antigen-1 by Binding to a Novel Regulatory Integrin Site.” *Nature Medicine* 7(6):687–92.
- Werring, David J., Duncan W. Frazer, Lucy J. Coward, Nick A. Losseff, Hilary Watt, Lisa Cipolotti, Martin M. Brown, and H. Rolf Jäger. 2004. “Cognitive Dysfunction in Patients with Cerebral Microbleeds on T2*-Weighted Gradient-Echo MRI.” *Brain* 127(10):2265–75.
- Winblad, B., K. Palmer, M. Kivipelto, V. Jelic, L. Fratiglioni, L. O. Wahlund, A. Nordberg, L. Bäckman, M. Albert, O. Almkvist, H. Arai, H. Basun, K. Blennow, M. de Leon, C. DeCarli, T. Erkinjuntti, E. Giacobini, C. Graff, J. Hardy, C. Jack, A. Jorm, K. Ritchie, C. van Duijn, P. Visser, and R. C. Petersen. 2004. “Mild Cognitive Impairment - beyond Controversies, towards a Consensus: Report of the International Working Group on Mild Cognitive Impairment.” *J Intern Med* 256(3):240–46.
- Wolf, Andrea, Björn Bauer, Erin L. Abner, Tal Ashkenazy-Frolinger, and Anika M. S. Hartz. 2016. “A Comprehensive Behavioral Test Battery to Assess Learning and Memory in 129S6/ Tg2576 Mice.” *PLoS ONE* 11(1):1–23.
- Wolozin, B., W. Kellman, P. Russeau, G. G. Celesia, and G. Siegel. 2000. “Decreased Prevalence of Alzheimer Disease Associated with 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase Inhibitors [In Process Citation].” *Arch Neurol* 57(10):1439–43.
- Wong, William B., Vincent W. Lin, Denise Boudreau, and Emily Beth Devine. 2013. “Statins in the Prevention of Dementia and Alzheimer’s Disease: A Meta-Analysis of Observational Studies and an Assessment of Confounding.” *Pharmacoepidemiology and Drug Safety* 22:345–58.
- Wright, Amanda L., Raphael Zinn, Barbara Hohensinn, Lyndsey M. Konen, Sarah B. Beynon, Richard P. Tan, Ian A. Clark, Andrea Abdipranoto, and Bryce Vissel. 2013. “Neuroinflammation and Neuronal Loss Precede A β Plaque Deposition in the HAPP-J20 Mouse Model of Alzheimer’s Disease.” *PLoS ONE* 8(4).
- Wu, Hongtao, Dunyue Lu, Hao Jiang, Ye Xiong, Changsheng Qu, Bo Li, Asim Mahmood, Dong Zhou, and Michael Chopp. 2008. “Simvastatin-Mediated Upregulation of VEGF and BDNF, Activation of the PI3K/Akt Pathway, and Increase of Neurogenesis Are

- Associated with Therapeutic Improvement after Traumatic Brain Injury.” *Journal of Neurotrauma* 25(2):130–39.
- Wu, J., S. Yang, Y. Hua, W. Liu, R. F. Keep, and G. Xi. 2010. “Minocycline Attenuates Brain Edema, Brain Atrophy and Neurological Deficits After Intracerebral Hemorrhage.” *Brain Edema XIV, Acta Neurochirurgica Supplementum* 106:147–50.
- Yakushiji, Y., M. Nishiyama, S. Yakushiji, T. Hirotsu, A. Uchino, J. Nakajima, M. Eriguchi, Y. Nanri, M. Hara, E. Horikawa, and Y. Kuroda. 2008. “Brain Microbleeds and Global Cognitive Function in Adults Without Neurological Disorder.” *Stroke* 39(12):3323–28.
- Yakushiji, Yusuke, Tomoyuki Noguchi, Megumi Hara, Masashi Nishihara, Makoto Eriguchi, Yusuke Nanri, Masanori Nishiyama, Tatsumi Hirotsu, Junko Nakajima, Yasuo Kuroda, and Hideo Hara. 2012. “Distributional Impact of Brain Microbleeds on Global Cognitive Function in Adults without Neurological Disorder.” *Stroke* 43(7):1800–1805.
- Yates, Paul A., Victor L. Villemagne, Kathryn A. Ellis, Patricia M. Desmond, Colin L. Masters, and Christopher C. Rowe. 2014. “Cerebral Microbleeds: A Review of Clinical, Genetic, and Neuroimaging Associations.” *Frontiers in Neurology* 4 JAN(January):1–13.
- Yoshiyama, Yasumasa, Makoto Higuchi, Bin Zhang, Shu Ming Huang, Nobuhisa Iwata, Takaomi C. C. Saido, Jun Maeda, Tetsuya Suhara, John Q. Trojanowski, and Virginia M. Y. Lee. 2007. “Synapse Loss and Microglial Activation Precede Tangles in a P301S Tauopathy Mouse Model.” *Neuron* 53(3):337–51.
- Zandi, P. P., D. L. Sparks, A. S. Khachaturian, J. Tschanz, M. Norton, M. Steinberg, K. A. Welsh-Bohmer, and J. C. Breitner. 2005. “Do Statins Reduce Risk of Incident Dementia and Alzheimer Disease? The Cache County Study.” *Arch Gen Psychiatry* 62(2):217–24.
- Zhang, Y., Y. Fan, M. Wang, D. Wang, and X. Li. 2013. “Atorvastatin Attenuates the Production of IL-1Β, IL-6, and TNF-Α in the Hippocampus of an Amyloid Β1-42-Induced Rat Model of Alzheimer&Rsquo;s Disease.” *Clinical Interventions in Aging* 103.
- Zhao, Lingzhi, Michal Arbel-Ornath, Xueying Wang, Rebecca A. Betensky, Steven M. Greenberg, Matthew P. Frosch, and Brian J. Bacskai. 2015. “Matrix Metalloproteinase 9-Mediated Intracerebral Hemorrhage Induced by Cerebral Amyloid Angiopathy.” *Neurobiology of Aging* 36(11):2963–71.
- Zheng, Hui and Edward H. Koo. 2006. “The Amyloid Precursor Protein: Beyond Amyloid.” *Molecular Neurodegeneration* 1(1):1–12.

RÉSUMÉ :

En imagerie par résonance magnétique (IRM), les MHC apparaissent comme des petites lésions arrondies et en hyposignal correspondant à des dépôts d'hemosidérine. La prévalence des MHC dans la population générale est d'environ 15,3%. Considérées comme des marqueurs des pathologies cérébrovasculaires, les MHC sont plus fréquentes chez les personnes atteintes de troubles cognitifs ou de démence avec une prévalence de 23% chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer (MA). Plusieurs études cliniques montrent un effet des MHC sur les fonctions cognitives dans la population générale. Elles pourraient jouer un rôle important dans la physiopathologie de la MA en créant un lien entre les hypothèses amyloïdes et vasculaires mais leur impact cognitif dans ce contexte reste encore indéterminé.

Un nouveau modèle murin de microhémorragie corticale (MHC) a été développé afin d'étudier l'impact fonctionnel d'une lésion corticale avec une approche multimodale : i) sur des souris sauvages (WT) sans aucune pathologie sous-jacente, ii) sur les souris de la lignée J20 exprimant le précurseur de la protéine amyloïde humaine muté (APP). L'effet d'une modulation pharmacologique par atorvastatine a également été étudié.

La MHC a été induite par injection stéréotaxique de collagénase (0,8 $\mu\text{UI}/\mu\text{L}$) chez des souris WT et APP âgées de 10 semaines. Une IRM a été réalisée à 24 heures (séquence T2*) pour visualiser le saignement. Les souris ont été réparties en groupes sham, MHC et MHC avec traitement. L'atorvastatine a été administrée via l'alimentation quotidienne à la posologie de 5mg/kg/j et initiée après la chirurgie. Le suivi était constitué d'une évaluation neurocomportementale (activité locomotrice spontanée, niveau d'anxiété, mémoire de travail, mémoire de référence spatiale et mémoire visuospatiale), et des mesures paracliniques (IRM 7 Tesla, tomographie à émission de positons, immunohistochimie) réalisées à différents temps allant de 1,5 à 12 mois post-chirurgie.

Une cohorte de souris WT et APP a été suivie de façon longitudinale sur 12 mois post-chirurgie. Une première évaluation des souris WT à 6 semaines post-chirurgie a démontré un impact de la MHC sur l'anxiété et les mémoires de référence spatiale et visuospatiale. L'amélioration des performances chez les souris traitées a montré la sensibilité du modèle à une modulation pharmacologique par statine. Aux temps d'évaluation à 1,5, 3, 6, 9 et 12 mois, chez les souris WT, le groupe avec MHC a montré un niveau d'anxiété diminué et une altération de la mémoire de référence spatiale à 1,5 mois retrouvée à 9 et 12 mois. Cette étude n'a pas permis de conclure à un effet précipitant ou aggravant de la MHC chez la souris APP. Le traitement par atorvastatine a montré un effet positif sur la cognition chez les souris WT. A 12 mois, une diminution des volumes hippocampiques ipsilatéraux a été observée chez tous les groupes sans exception. Aucun effet de la MHC ou du traitement n'a été constaté sur le métabolisme cérébral.

En clinique, une hypothèse propose que les MHC pourraient, par leur présence, entraîner des troubles cognitifs. L'autre les présente comme le reflet des atteintes cérébrovasculaires, elles-mêmes responsables des altérations cognitives. Cette étude a permis de démontrer qu'une MHC isolée peut altérer les fonctions cognitives chez les souris WT, en dehors de toute pathologie sous-jacente. Chez les souris APP, le poids des lésions neurodégénératives ne permet pas de mettre en évidence l'effet de la MHC. L'atorvastatine semble avoir un effet neuroprotecteur.