

UNIVERSITE DE LILLE-NORD DE FRANCE

Faculté de médecine

Année 2019

N° _____

THESE

POUR L'OBTENTION DU GRADE DE

DOCTEUR de L'UNIVERSITE de LILLE-NORD DE FRANCE

Sciences de la vie et de la santé

Présentée par

Maud Pétrault

**Influence des facteurs de risque vasculaire sur l'apparition et la toxicité des
microhémorragies cérébrales**

Directeur de Thèse : Vincent Bérézowski

Co-Directeur de Thèse : Thavarak Ouk

Soutenue le 10 juillet 2019

JURY

Pr. Isabelle Margail

Rapporteur

Dr. Silvy Laporte

Rapporteur

Pr. Charlotte Cordonnier-Président du jury

Examineur

Pr. Carine Ali

Examineur

Pr. Vincent Bérézowski

Directeur de thèse

Dr. Thavarak Ouk

Co-Directeur de thèse

A mes parents qui, j'en suis sûre, doivent être fiers et heureux de là-haut

Ce travail fut pour moi une véritable aventure. Une thèse est loin d'être un travail solitaire, je tiens donc à remercier toutes les personnes qui m'ont accompagné tout au long de cette expédition.

Merci au **Professeur Isabelle Margail** et au **Docteur Silvy Laporte** pour l'ensemble des conseils avisés que vous m'avez apportés lors des comités de suivi de thèse, ainsi que pour votre présence dans ce jury en tant que rapporteur. Veuillez agréer toute ma gratitude et mes sincères remerciements.

Merci au **Professeur Carine Ali** d'avoir accepté d'examiner et de juger ce travail. Soyez assurée de mon estime et de mon plus grand respect pour avoir accompli cette lourde tâche.

Merci au **Professeur Charlotte Cordonnier** de m'avoir fait l'honneur de participer à ce jury. Merci pour tous nos « Bloody Friday » et pour tous ces échanges qui m'ont aidée à grandir et à avancer.

Vincent, Thavarak,

Quelle chance se fut pour moi d'être encadrée par vous 2 ! En plus d'être de véritables sources de savoirs, vous avez été pour moi un soutien indéfectible, une oreille attentive, une boule antistress mais aussi quelquefois un défouloir... Vous avez toujours été présents et vous avez su me mettre en confiance dans les moments difficiles. Merci d'avoir cru en moi et de m'avoir amenée jusqu'au bout.

Régis,

Quand tu m'as proposé de faire une thèse, je me suis dit : aurais-je l'*Hippocampe* assez développé pour me rappeler de tout ? Même avec un traitement de fond à l'*Eudaimonia*, je me suis sentie comme le Christ à *Golgotha*, je n'étais pas vraiment sereine... Mais, même sans *Talions aiguilles*, on peut aller au bout de ses envies. Merci pour ta confiance et ton soutien.

Michèle,

Pas toujours facile de travailler en face de moi.. ! Je t'ai sans cesse sollicitée pour une traduction en anglais, une expression en français, une petite chanson par ci, une petite blague par là...tu as toujours été là pour me répondre et partager des moments si précieux. Merci pour ta présence, ta disponibilité, tes fous rires et ton soutien sans faille.

Je tiens à remercier également l'ensemble des membres de l'Unité, plus particulièrement mon bon **Flo** pour son aide en IRM, **David** qui était là malgré le fait que ce travail porte sur le vaisseau, **Cédrick** dont l'aide quotidienne et sa bonne humeur m'ont beaucoup aidés et bien sûr nos secrétaires de choc, Marion, Jackie, Elodie et Bérangère.

Je termine bien sûr ces remerciements par mon cher et tendre **Olivier** qui a su me supporter, m'épauler, me remonter le moral avec une patience infinie et un amour indéfectible, sans oublier son aide précieuse pour les stats et Photoshop ! Pas toujours facile d'avoir une « jeune » étudiante à la maison ! Un dernier petit clin d'œil à mes deux amours, **Tristan** et **Morgan**, qui ont su me changer les idées, me recentrer sur le principal et m'apporter tout l'amour dont une mère peut rêver...

AVANT PROPOS

SITUATION ACTUELLE

- **Depuis Sept 2011** : Assistant Ingénieur de Recherche et de Formation, titulaire (U1171, LILLE)

FORMATION

- **1993** : Brevet des collèges (DIJON)
- **1997** : Bac Scientifique, option Mathématiques (mention AB ; DIJON)
- **2000** : DUT de Biologie Appliquée (DIJON)-Capacité de prélèvement sanguin
- **2001** : DU Sciences du Médicaments (mention TB ; LILLE)
- **2003** : Expérimentation animale-ex niveau 2 (LYON)
- **2007** : Expérimentation animale-ex niveau 1 (DIJON)
- **2008** : Formation Assistant de Prévention (LILLE)
- **2009** : Diplôme EPHE (Ecole Pratique des Hautes Etudes, mention TB, LILLE)
- **2012** : AUEC de Chirurgie Expérimentale (LILLE)
- **2014** : Sauveteur Secouriste du Travail (SST ; LILLE)
- **Depuis septembre 2016** : Doctorat en Sciences de la vie et de la santé

EXPERIENCES PROFESSIONNELLES

- **Été 2000** : Technicienne de Laboratoire (Laboratoire d'Analyses Médicales Lautissier, Nuits-Saint-Georges)
- **Été 2001** : Technicienne de Laboratoire (Laboratoire d'Analyses Médicales Vogiel, Dijon)
- **Sept 2001-Avril 2002** : Technicienne de Recherche et de Formation, contrat privé (SERVIER- EA1046, LILLE)
- **Avril 2002-Sept 2007** : Technicienne de Recherche et de Formation, contractuelle (EA1046, LILLE)
- **Sept 2007-Sept 2011** : Technicienne de Recherche et de Formation, titulaire (EA1046, LILLE)
- **Depuis Sept 2011** : Assistant Ingénieur de Recherche et de Formation, titulaire (U1171, LILLE)

EXPERIENCES PROFESSIONNELLES

- **Depuis 2007** : Enseignement de 7h de travaux dirigés en Pharmacologie (IUT A de Biologie Appliquée, LILLE)
- **Depuis 2010** : Enseignement de 12h de travaux pratiques (AUEC de chirurgie appliquée, LILLE)
- **Depuis 2013** : Expert ITRF- Participation à des jurys de concours nationaux
- **Depuis 2015** : Enseignement de 30h de travaux pratiques (L2, Faculté d'Artois, LENS)
- **Depuis 2017** : Enseignement de 10h de travaux pratiques (Ex-niveaux 1 et 2, LILLE)

PUBLICATIONS DE THESE

- **Maud Pétrault**, Barbara Casolla, Thavarak Ouk, Charlotte Cordonnier, Vincent Bérézowski. « Cerebral microbleed: beyond the microscope ». *International Journal of Stroke*. Février 2019.
- **Maud Pétrault**, Thavarak Ouk, Olivier Pétrault, Michèle Bastide, Régis Bordet, Vincent Bérézowski. « Safety of oral anticoagulants on experimental brain microbleeding and cognition ». Soumis dans *Neuropharmacology*.
- Olivier Pétrault*, **Maud Pétrault***, Thavarak Ouk, Régis Bordet, Vincent Bérézowski, Michèle Bastide. « Weight gain links cerebrovascular dysfunction to cognitive impairment in middle-aged mice ». Soumis dans *Neurobiology of diseases*.

COMMUNICATIONS ORALES DE THESE

- **Juin 2016** : « Cinétique du déclin cognitif chez des souris atteintes de syndrome métabolique ». Communication orale lors de la Journée annuelle de la Société Cerveau et Maladies Cérébrovasculaires. Obtention du prix de la meilleure communication orale (flash-talk)-PARIS
- **Décembre 2016** : « Influence of direct oral anticoagulants on the onset and extent of brain microhemorrhages in mouse » - Présentation orale en anglais (flash-talk) et poster modéré lors du symposium FHU-Vascog. Obtention du prix de la meilleure communication orale-LILLE
- **Mars 2017** : « Impact des anticoagulants oraux directs sur le poids microhémorragique cérébral chez la souris » - Présentation orale lors de la Journée annuelle de la Société Cerveau et Maladies Cérébrovasculaires-PARIS

- **Juillet 2018** : « Microbleeds and cognition : approches expérimentales ». Présentation orale lors de la journée du LICEND-LILLE
- **Septembre 2018** : « Silent cerebral microbleeds induce a long term cognitive decline in the healthy mouse : Influence of oral anticoagulants ». Communication orale en anglais lors du congrès de l'ICAA (International Cerebral Amyloid Angiopathy)-LILLE
- **Novembre 2018** : « Conséquences cognitives et tissulaires des microhémorragies cérébrales disséminées : Influence des anticoagulants oraux ». Communication orale lors de la journée FHU-Vascog-LILLE
- **Mars 2019** : « Impact of metabolic disorders on the microhemorrhagic burden in the mouse brain ». Communication orale lors de la Journée annuelle de la Société Cerveau et Maladies Cérébrovasculaires-LILLE

COMMUNICATIONS AFFICHEES DE THESE

- **Avril 2016** : « Neither nefopam nor acetaminophen can be used as post-operative analgesics in a murine model of ischemic stroke » - Poster présenté au congrès de la Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique-NANCY
- **Octobre 2016** : « Influence of direct oral anticoagulants on the onset and extent of brain microhemorrhages in mouse » - Poster présenté au congrès VAS-COG-AMSTERDAM
- **Novembre 2016** : « Influence of direct oral anticoagulants on the onset and extent of brain microhemorrhages in mouse » - Poster présenté lors de la journée thématique SFR DN2M “The new technologies at the service of Neurosciences”-LILLE
- **Mai 2017** : « Direct oral anticoagulants modulate the microhemorrhage burden in the mouse brain » - Poster présenté au congrès ESOC-PRAGUE
- **Mai 2018** : « Specific cognitive impairment in mouse after long-term high fat diet » - Poster présenté au congrès ESOC-GÖTEBORG
- **Octobre 2018** : « Silent cerebral microbleeds induce a long term cognitive decline in the healthy mouse : Influence of oral anticoagulants ». Poster modéré lors du congrès Neurorepair-DRESDE

LISTE DES ABBREVIATIONS

- ACM : Artère Cérébrale Moyenne
- AHA : American Heart Association
- AOD : Anticoagulants Oraux Directs
- AVK : Anti-Vitamine K
- APP : Amyloid- β Precursor Protein
- AVC : Accident Vasculaire Cérébral
- AUC : Area Under Curve
- BHE : Barrière Hémato-Encéphalique
- BCAS : Sténose Bilatérale de l'artère carotide
- CAA : Cerebral Amyloid Angiopathy
- CADASIL : Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy
- CCh : Carbachol
- CCP : Concentré de Complexes Prothrombotiques
- CD : Cyclodextrines
- CD163 : Cluster of Differentiation 163
- CMB : Cellule de la Membrane Basale
- CML : Cellule Musculaire Lisse
- CROMIS : Clinical Relevance Of Microbleeds In Stroke
- EEG : Electroencéphalogramme
- EMG : Electromyogramme
- FA : Fibrillation Auriculaire
- FDG : FluoDésoxyGlucose
- FT : Facteur Tissulaire
- GFAP: Glial Fibrillary Acidic Protein
- HCP1 : Heme Carrier Protein-1
- HE : Hématoxyline-Eosine
- HFD : High Fat Diet
- HHcy : Hyperhomocystéinémie
- HIC : Hémorragie Intracérébrale
- HTT : protéine Huntingtine
- IC : IntraCarotidienne

- IDF : Fédération Internationale du Diabète
- IL6 : Interleukine 6
- IMC : Indice de Masse Corporelle
- INR : International Normalized Ratio
- IP : Iodure de Propidium
- IRM : Imagerie par Résonance Magnétique
- IV : IntraVeineuse
- LCR : Liquide CéphaloRachidien
- L-NAME : N(ω)-nitro-L-Arginine Methyl Ester
- LSB : Lésions de la Substance Blanche
- MA : Maladie d'Alzheimer
- MH : Maladie de Huntington
- MHC : Microhémorragie Cérébrale
- MMP : Métalloprotéinases
- MMSE : Mini Mental State Examination
- MP : Maladie de Parkinson
- NADPH : Nicotamine Adenine Dinucleotide Phosphate Hydrogenase
- ND : Normal Diet
- NIH : National Institute of Health
- NOR : Novel Object Recognition
- NOS : Nitric Oxyde Synthase
- OGTT : Oral Glucose Tolerance Test
- OMS : Organisation Mondiale de la Santé
- OxLDL : Oxidized Low Density Lipoprotein
- PAI-1 : Plasminogen Activator Inhibitor-1
- PAR-1 : Protease Activated Receptor-1
- PFA : Paraformaldehyde
- Phe : Phényléphrine
- RAME- β -CD: Randomly-Methylated- β -Cyclodextrines
- ROS : Reactive Oxygen Species
- SHRSP : Spontaneously Hypertensive Rats-Stroke Prone
- SMet : Syndrome Métabolique
- SRAA: Système Rénine Angiotensine Aldostérone
- TDP 43 : TAR DNA-binding protein 43

- TEP : Tomographie par Emission de Positons
- TNF α : Tumor Necrosis Factor α
- tPA : tissue Plasminogen Activator
- TQ : Temps de Quick
- TTC : Chlorure de triphényltétrazolium
- VCID : Vascular Cognitive Impairment/Dementia

LISTE DES FIGURES

- **Figure 1** : Principaux facteurs responsables du développement d'un déclin cognitif chez l'Homme
- **Figure 2** : Projection du nombre de personnes atteintes de démence dans les prochaines décennies (en millions)
- **Figure 3** : Classifications des démences chez l'Homme
- **Figure 4** : Représentation des atteintes anatomiques cérébrales de la maladie d'Alzheimer
- **Figure 5** : Photos des deux marqueurs histologiques de la maladie d'Alzheimer
- **Figure 6** : Aperçu des facteurs conduisant à une démence dans la maladie de Parkinson
- **Figure 7** : Evolution clinique de la maladie de Huntington
- **Figure 8** : Les facteurs cardiovasculaires idéaux pour une bonne santé
- **Figure 9** : Corrélation entre les risques cardiovasculaires présents en milieu de vie et le risque de démence
- **Figure 10** : Présentation schématique des mécanismes physiopathologiques impliqués dans la mise en place d'un syndrome métabolique
- **Figure 11** : Schéma général du rôle de l'inflammation et du stress oxydant dans la physiopathologie de l'athérosclérose dans un syndrome métabolique
- **Figure 12** : Principaux mécanismes impliqués dans le déclin cognitif vasculaire (VCID)
- **Figure 13** : Dépôts d'amyloïde- β dans la membrane basale des parois artérielles leptoméningées
- **Figure 14** : Déclin cognitif dans l'angiopathie cérébrale amyloïde
- **Figure 15** : Lésions artérielles caractéristiques de CADASIL
- **Figure 16** : Evolution naturelle des principales manifestations cliniques du CADASIL
- **Figure 17** : Principaux mécanismes impliqués dans le déclin cognitif post-AVC
- **Figure 18** : Trajectoires cognitives dans l'AVC
- **Figure 19** : Localisation des infarctus ou modifications tissulaires associées au développement d'une démence post-AVC
- **Figure 20** : Observations pathologiques associées à un déclin cognitif vasculaire
- **Figure 21** : Effet médiateur de la réserve cognitive sur la fonction cognitive

- **Figure 22** : IRM et coupes histologiques du tissu cérébral présentant des microhémorragies
- **Figure 23** : Distribution spatiale des microhémorragies cérébrales (flèches blanches) et maladies associées
- **Figure 24** : Exemples de détection histologique de microhémorragies cérébrales
- **Figure 25** : Prévalence des microhémorragies cérébrales dans différentes catégories de personnes en fonction de leur état général
- **Figure 26** : Estimations Kaplan-Meyer sur le taux de récurrence des hémorragies intracérébrales
- **Figure 27** : Estimations entre le score moyen (appelé ici z-score) dans le domaine cognitif global ou spécifique et la présence ou le nombre de plusieurs microhémorragies cérébrales dispersées dans l'ensemble du cerveau
- **Figure 28** : Nuage de points démontrant l'association entre le nombre total de microhémorragies cérébrales par patient et les scores MMSE chez les patients atteints de la MA
- **Figure 29** : Structure et fonction de l'arbre vasculaire
- **Figure 30** : Résumé des causes potentielles de la survenue des microhémorragies cérébrales
- **Figure 31** : Résumé des conséquences potentielles de la survenue des microhémorragies cérébrales
- **Figure 32** : Microhémorragies obtenues dans des modèles animaux
- **Figure 33** : Modes d'action des différents anticoagulants oraux au niveau de la cascade de coagulation
- **Figure 34** : Pathogénèse de l'hémorragie intracérébrale spontanée et associée à un traitement anticoagulant
- **Figure 35** : Courbes de survie comparant la mortalité à 90 jours des patients après une hémorragie intracérébrale associée à la prise d'anticoagulants oraux directs ou d'anti-vitamine K
- **Figure 36** : Association entre présence de facteurs de risque métaboliques et présence de microhémorragies cérébrales
- **Figure 37** : Formule chimique (a) et forme toroïdale (b) d'une molécule de β -cyclodextrines
- **Figure 38** : Liaison à l'équilibre d'un médicament avec une cyclodextrine pour former un complexe d'inclusion

- **Figure 39** : Effets des cyclodextrines sur la barrière-hémato-encéphalique *in vitro*
- **Figure 40** : Différents scores hémorragiques cérébraux
- **Figure 41** : Exemple de marquage positif (à gauche) ou négatif (à droite) à la coloration de Perl's au niveau du tissu cérébral.
- **Figure 42** : Exemple de marquage d'hématies intactes (à gauche) ou lysées (à droite) après réaction avec le DAB, indiquant un saignement plus ou moins récent
- **Figure 43** : Test moteur (A. actimétrie) et tests cognitifs (B. NOR et C. alternance spontanée) réalisés chez les souris pour l'évaluation fonctionnelle des microhémorragies cérébrales
- **Figure 44** : Tests complémentaires évaluant l'anxiété (A. Elevated Plus Maze ; B. Light and Dark Box) et l'anhédonie (C. Test du sucrose) réalisés chez les souris pour l'évaluation fonctionnelle des microhémorragies cérébrales
- **Figure 45** : Protocoles expérimentaux réalisés pour l'étude de l'influence des anticoagulants oraux à court terme (A) et à long terme (B)
- **Figure 46** : Protocole expérimental visant à caractériser la mise en place de désordres métaboliques chez la souris et leur impact au niveau vasculaire et comportemental
- **Figure 47** : Mesure de la glycémie chez la souris après prélèvement sanguin à la veine caudale
- **Figure 48** : Mise en évidence de la stéatose hépatique par la coloration à l'huile rouge
- **Figure 49** : Déroulé des différents tests comportementaux effectués à chaque temps d'évaluation de l'impact d'un régime enrichi chez la souris
- **Figure 50** : Labyrinthe de Barnes chez la souris
- **Figure 51** : Mesure du débit sanguin cérébral chez la souris à l'aide d'un laser Doppler
- **Figure 52** : Principe de l'artériographe d'Halpern
- **Figure 53** : Etude de tranches cérébrales au niveau du cortex préfrontal et de l'hippocampe de souris
- **Figure 54** : Principaux résultats obtenus au cours de l'étude à court terme de l'impact des anticoagulants oraux lors de la survenue de microhémorragies cérébrales
- **Figure 55** : Principaux résultats obtenus au cours de l'étude à long terme de l'impact des anticoagulants oraux lors de la survenue de microhémorragies cérébrales
- **Figure 56** : Résumé graphique de l'ensemble de l'étude sur l'impact des anticoagulants oraux sur le poids microhémorragique cérébral de la souris à court et à long terme

- **Figure 57** : Principaux résultats obtenus au cours de la caractérisation des troubles métaboliques induits chez la souris
- **Figure 58** : Principaux résultats obtenus lors de l'évaluation comportementale des troubles métaboliques induits chez la souris
- **Figure 59** : Principaux résultats obtenus lors de l'évaluation vasculaire des troubles métaboliques induits chez la souris
- **Figure 60** : Résumé graphique de l'ensemble de l'étude sur l'impact des troubles métaboliques sur la fonction cognitive et vasculaire à long terme
- **Figure 61** : Courbes de survie des animaux sous régime témoin ou enrichi en gras après survenue de microhémorragies cérébrales à 3 mois
- **Figure 62** : Nombre de microhémorragies cérébrales (MHC) (A) et profils microhémorragiques (B) obtenus chez les animaux sous régime témoin (ND) ou enrichi en gras (HFD) après 3 mois de régime
- **Figure 63** : Impact locomoteur de la survenue de microhémorragies cérébrales à 3 mois de régime (effet aigu)
- **Figure 64** : Impact cognitif de la survenue de microhémorragies cérébrales à 3 mois de régime (effet aigu)
- **Figure 65** : Nombre de microhémorragies cérébrales (MHC) (A) et profils microhémorragiques (B) obtenus chez les animaux sous régime témoins (ND) ou enrichi en gras (HFD), avec des CD injectées à 3 mois de régime et sacrifiées après 12 mois
- **Figure 66** : Comparaison du nombre de microhémorragies cérébrales obtenu après injection de CD à 3 mois de régime entre les groupes sous régime témoin (ND-MHC) et enrichi (HFD-MHC) après 3 mois ou 12 mois de régime
- **Figure 67** : Evolution des profils microhémorragiques obtenus après la survenue de microhémorragies cérébrales à 3 mois entre les groupes sous régime témoin (ND-MHC) et enrichi (HFD-MHC) après 3 mois ou 12 mois de régime
- **Figure 68** : Impact locomoteur à long terme de la survenue de microhémorragies cérébrales à 3 mois de régime
- **Figure 69** : Impact cognitif à long terme de la survenue de microhémorragies cérébrales à 3 mois de régime
- **Figure 70** : A. Nombre de microhémorragies cérébrales (MHC) et B. Profils microhémorragiques obtenus chez les animaux sous régime témoin (ND) ou enrichi en gras (HFD), après induction de microhémorragies cérébrales à 12 mois de régime

- **Figure 71** : Impact locomoteur de la survenue de microhémorragies cérébrales à 12 mois de régime (effet aigu)
- **Figure 72** : Impact cognitif de la survenue de microhémorragies cérébrales à 12 mois de régime (effet aigu)
- **Figure 73** : Impact des microhémorragies cérébrales sur la fonction motrice des souris dans le test de l'actimétrie
- **Figure 74** : Impact des microhémorragies cérébrales sur la mémoire de travail et la mémoire de reconnaissance visuelle des souris
- **Figure 75** : Impact des microhémorragies cérébrales dans des tests d'anxiété et d'anhédonie
- **Figure 76** : Visualisation des microhémorragies cérébrales à différents temps après induction et par différentes colorations histologiques
- **Figure 77** : Visualisation des neurones en dégénérescence autour des microhémorragies par la coloration au fluorojade
- **Figure 78** : Activation astrocytaire autour des microhémorragies cérébrales
- **Figure 79** : Co-marquage thrombine-collagène IV autour des microhémorragies cérébrales
- **Figure 80** : Co-marquage tPA-PAI-1 autour des microhémorragies cérébrales
- **Figure 81** : Exemples d'images obtenues après acquisition IRM de cerveaux *in vivo* d'une souris témoin ou d'une souris avec microhémorragies cérébrales (MHC)
- **Figure 82** : Exemples d'images obtenues après acquisition IRM de cerveaux *ex-vivo* d'une souris témoin ou d'une souris avec microhémorragies cérébrales (MHC)

LISTE DES TABLEAUX

- **Tableau 1** : Critères de Boston modifiés pour le diagnostic de la CAA
- **Tableau 2** : Facteurs de risques de démence post-AVC
- **Tableau 3** : Biomarqueurs et prédicteurs de démence post-AVC
- **Tableau 4** : Critères recommandés pour l'identification des microhémorragies cérébrales
- **Tableau 5** : Résumé des modèles animaux de microhémorragies cérébrales
- **Tableau 6** : Principales caractéristiques des anticoagulants oraux
- **Tableau 7** : Effets d'un régime riche en fructose ou en sucrose sur les composants d'un syndrome métabolique
- **Tableau 8** : Effets d'un régime riche gras sur les composants d'un syndrome métabolique
- **Tableau 9** : Cyclodextrines naturelles et leurs dérivés couramment utilisés dans les produits pharmaceutiques
- **Tableau 10** : Tests de doses et de voies d'administration des cyclodextrines chez la souris
- **Tableau 11** : Cinétique d'apparition des microhémorragies cérébrales après injection de cyclodextrines
- **Tableau 12** : Tableau résumant les différents anticorps utilisés

RESUME

Les microhémorragies cérébrales (MHC) sont caractérisées par une rupture des petits vaisseaux intracérébraux, conduisant à des épanchements sanguins d'un diamètre inférieur à 5 mm chez l'Homme, et considérées sans gravité. Malgré leur dimension microscopique et leur caractère silencieux, elles sont de plus en plus prises en compte par les cliniciens car elles peuvent représenter une fragilité vasculaire et refléter la sévérité d'une pathologie neurovasculaire sous-jacente. Leur toxicité pour le tissu cérébral est souvent spéculée mais n'a jamais été démontrée, laissant planer le doute à propos de leur impact potentiel sur l'apparition ou la précipitation d'un déclin cognitif. De plus, il est difficile de connaître les effets propres des MHC car elles sont souvent associées à une pathologie dont les caractéristiques viennent influencer les effets observés. C'est dans ce contexte que nous avons développé une nouvelle méthode d'induction de MHC disséminées chez la souris saine. En plus de l'étude de l'impact de ces lésions au niveau histologique et comportemental à court et à long terme, nous avons évalué l'influence de facteurs de risque vasculaires (par un traitement anticoagulant oral) et métaboliques (par le biais d'une alimentation riche en gras) sur leur sévérité. Nos investigations ont permis de montrer que la présence de MHC disséminées dans un contexte sain est responsable de l'apparition progressive d'une altération de la mémoire de reconnaissance visuelle chez la souris. L'ajout d'un traitement anticoagulant oral augmente la sévérité des lésions mais qui restent cependant silencieuses à court terme, hormis pour la warfarine responsable de transformations hémorragiques mortelles. De même, la présence de troubles métaboliques n'a que peu d'impact sur la gravité des poids microhémorragiques observés. Dans les deux cas, la présence de MHC ne provoque pas de précipitation ou d'aggravation du déclin cognitif induit à long terme. Ainsi, les facteurs de risque vasculaires et métaboliques ne semblent pas avoir d'influence directe sur la toxicité induite par les MHC dans un contexte d'altération cognitive non neurodégénérative.

Mots-clés : Microhémorragies cérébrales, déclin cognitif, anticoagulants oraux, troubles du métabolisme, souris.

ABSTRACT

Cerebral microhemorrhages (CMH) are characterized by the rupture of small intracerebral vessels, leading to blood effusions with a diameter of less than 5 mm in Humans, and considered as asymptomatic. Despite their microscopic size and their silent nature, they are increasingly taken into account by clinicians because they can reflect a vascular fragility and the severity of underlying neurovascular diseases. Their toxicity to the brain tissue is often speculated but has never been demonstrated, raising doubt about their potential impact on the onset or on the evolution of cognitive decline. Moreover, it is difficult to know the specific effects of CMH because they are often associated with a pathology whose characteristics influence the results observed. In this context, we have developed a new method of induction of disseminated CMH in healthy mice. In addition to investigate the histological and behavioral impact of these lesions in the short and in the long term, we assessed the influence of vascular risk factors (through oral anticoagulant treatments) and metabolic disorders (through a high fat diet) on their severity. Our investigations demonstrate that the presence of disseminated CMH in a healthy context induce a progressive impairment of visual recognition memory in mice. The addition of an oral anticoagulant treatment increases the severity of the lesions but they remain silent in the short term, except for the warfarin which provokes fatal hemorrhagic transformations. Similarly, the presence of metabolic disorders has little impact on the severity of microhemorrhagic burdens. In any case, the presence of CMH does not precipitate or aggravate the long-term cognitive decline. Thus, vascular and metabolic risk factors do not appear to have a direct influence on CMH-induced toxicity in a context of non-neurodegenerative cognitive impairment.

Keywords: Cerebral microhemorrhages, cognitive decline, oral anticoagulants, metabolic disorders, mice.

TABLE DES MATIERES

| | |
|---|-----------|
| INTRODUCTION..... | 1 |
| 1. DECLIN COGNITIF ET DEMENCE | 4 |
| 1.1. Définitions et classifications | 4 |
| 1.2. Contributions neurodégénératives au déclin cognitif..... | 6 |
| 1.2.1. La maladie d'Alzheimer | 7 |
| 1.2.2. La maladie de Parkinson..... | 9 |
| 1.2.3. La maladie de Huntington | 11 |
| 1.3. Contributions métaboliques au déclin cognitif..... | 13 |
| 1.3.1. Syndrome métabolique : définitions, prévalence | 14 |
| 1.3.2. Physiopathologie du syndrome métabolique | 15 |
| 1.4. Contributions vasculaires au déclin cognitif..... | 18 |
| 1.4.1. Maladies constitutives..... | 19 |
| 1.4.2. Accidents vasculaires cérébraux | 23 |
| 1.4.3. Microlésions | 29 |
| 2. LES MICROHEMORRAGIES CEREBRALES | 32 |
| 2.1. Détection en imagerie | 32 |
| 2.2. Histologie..... | 34 |
| 2.3. Prévalence et significations cliniques | 35 |
| 2.4. Possibles mécanismes d'apparition des MHC..... | 39 |
| 2.5. Possibles conséquences des MHC..... | 42 |
| 2.6. Modèles expérimentaux de MHC..... | 45 |
| 2.6.1. Microhémorragies induites directement..... | 45 |
| 2.6.2. Microhémorragies induites par une pathologie..... | 46 |
| 2.7. Microhémorragies cérébrales et anticoagulants oraux..... | 49 |
| 2.7.1. Classes d'anticoagulants oraux..... | 49 |
| 2.7.2. Microhémorragies, anticoagulants et risque d'hémorragie intracérébrale | 51 |
| 2.8. Microhémorragies cérébrales et perturbations métaboliques..... | 54 |
| 2.8.1. Modèles expérimentaux de syndrome métabolique..... | 54 |
| 2.8.2. Survenue de microhémorragies cérébrales au décours de perturbations métaboliques | 58 |
| CEREBRAL MICROBLEEDS : BEYOND THE MACROSCOPE..... | 61 |
| PRESENTATION DU TRAVAIL | 63 |
| MATERIELS ET METHODES..... | 67 |
| 1. METHODE D'INDUCTION DE MICROHEMORRAGIES CEREBRALES DISSEMINÉES CHEZ LA SOURIS | 69 |
| 1.1. Les cyclodextrines..... | 69 |
| 1.2. Mise au point des doses, voies d'injection des CD et cinétique d'apparition des MHC..... | 72 |
| 1.3. Détermination du poids microhémorragique..... | 73 |

| | |
|--|------------|
| 1.4. Etudes histologiques des microhémorragies cérébrales..... | 74 |
| 1.4.1. Traitement du cerveau et coupes sériées..... | 74 |
| 1.4.1. Coloration à l'hémotoxyline-éosine | 74 |
| 1.4.2. Coloration de Perl's..... | 74 |
| 1.4.3. Marquage des hématies au DAB..... | 75 |
| 1.5. Détection des neurones en dégénérescence par le fluorojade B..... | 76 |
| 1.6. Détection des microhémorragies cérébrales par IRM | 76 |
| 1.6.1. Acquisition..... | 76 |
| 1.6.2. Post-traitement : Obtention des cartes de susceptibilité et T2* | 77 |
| 1.7. Immunohistochimie autour des microhémorragies cérébrales..... | 77 |
| 2. EVALUATIONS COMPORTEMENTALES | 79 |
| 2.1. Actimétrie..... | 80 |
| 2.2. Novel Object Recognition (NOR) | 80 |
| 2.3. Alternance spontanée | 80 |
| 2.4. Tests d'anxiété et d'anhédonie | 81 |
| 2.4.1. Labyrinthe en croix surélevé (Elevated plus maze) | 81 |
| 2.4.2. Light and dark box (LDB)..... | 81 |
| 2.4.3. Test au sucrose (test d'anhédonie) | 82 |
| 3. ETUDE DES MICROHEMORRAGIES CEREBRALES A LONG TERME | 84 |
| 3.1. Groupes d'animaux | 84 |
| 3.2. Protocole expérimental | 84 |
| 4. MODULATION DES MICROHEMORRAGIES CEREBRALES PAR LES ANTICOAGULANTS ORAUX DIRECTS | 85 |
| 4.1. Posologies..... | 85 |
| 4.2. Dosages des activités plasmatiques..... | 85 |
| 4.3. Protocoles expérimentaux..... | 87 |
| 5. INFLUENCE DE PERTURBATIONS METABOLIQUES SUR LES MICROHEMORRAGIES CEREBRALES | 88 |
| 5.1. Modèle murin de perturbations métaboliques | 88 |
| 5.2. Etude n°1 : caractérisation du modèle murin et étude cognitive et vasculaire..... | 88 |
| 5.2.1. Caractérisation des désordres métaboliques..... | 89 |
| 5.2.2. Etude des conséquences comportementales et vasculaires..... | 90 |
| 5.3. Etude n°2 : Microhémorragies cérébrales et perturbations métaboliques..... | 96 |
| RESULTATS | 97 |
| PARTIE 1 : SAFETY OF ORAL ANTICOAGULANTS ON EXPERIMENTAL BRAIN MICROBLEEDING AND COGNITION | 99 |
| PARTIE 2 : WEIGHT GAIN LINKS CEREBROVASCULAR DYSFUNCTION TO COGNITIVE IMPAIRMENT IN MIDDLE-AGED MICE..... | 104 |
| PARTIE 3 : IMPACT DES DESORDRES METABOLIQUES SUR LE POIDS MICROHEMORRAGIQUE CEREBRAL CHEZ LA SOURIS | 109 |

| | |
|---|------------|
| 1. PROTOCOLE A : INDUCTION DES MICROHEMORRAGIES A 3 MOIS DE REGIME ENRICHI | 109 |
| 1.1. Courbes de survie | 109 |
| 1.2. Impact sur le poids microhémorragique cérébral à 3 mois (effet aigu)..... | 110 |
| 1.3. Impact sur le comportement à 3 mois (effet aigu)..... | 110 |
| 1.3.1. Impact locomoteur | 110 |
| 1.3.2. Impact cognitif..... | 111 |
| 1.4. Evolution des microhémorragies après 12 mois de régime | 112 |
| 1.4.1. Poids microhémorragique à 12 mois..... | 112 |
| 1.4.2. Comparaison des profils entre 3 et 12 mois | 113 |
| 1.5. Impact sur le comportement durant les 12 mois de régime | 115 |
| 1.5.1. Evaluation locomotrice..... | 115 |
| 1.5.2. Evaluation cognitive..... | 116 |
| 2. PROTOCOLE B : INDUCTION DES MICROHEMORRAGIES A 12 MOIS DE REGIME ENRICHI | 118 |
| 2.1. Mortalité..... | 118 |
| 2.2. Impact sur le poids microhémorragique cérébral | 118 |
| 2.3. Evaluations comportementales..... | 119 |
| 2.3.1. Impact locomoteur | 119 |
| 2.3.2. Impact cognitif..... | 120 |
| PARTIE 4 : ETUDE DES MICROHEMORRAGIES SEULES A LONG TERME | 121 |
| 1. IMPACT FONCTIONNEL DES MICROHEMORRAGIES | 121 |
| 1.1. Impact moteur | 121 |
| 1.2. Impact cognitif..... | 122 |
| 1.3. Impact sur le comportement anxieux et la motivation..... | 122 |
| 2. EVALUATIONS HISTOLOGIQUES ET IMMUNOHISTOCHIMIQUES DES MICRO-HEMORRAGIES | 124 |
| 2.1. Evaluations histologiques | 124 |
| 2.1.1. Colorations | 124 |
| 2.1.2. Neurons en dégénérescence avec le fluorojade..... | 126 |
| 2.2. Evaluations immunohistochimiques..... | 126 |
| 2.2.1. Activation astrocytaire GFAP | 126 |
| 2.2.2. Co-marquage thrombine-collagène IV et tPA-PAI-1 | 127 |
| 3. DETECTION DES MICROHEMORRAGIES PAR IRM | 130 |
| DISCUSSION ET PERSPECTIVES..... | 132 |
| REFERENCES | 154 |

Introduction

Le déclin cognitif représente un enjeu majeur de santé publique puisqu'il devient source de problèmes sociétaux et médico-économiques importants et prévisibles dans les prochaines décennies. L'augmentation de la prévalence des troubles cognitifs, en relation avec l'allongement de l'espérance de vie des populations, n'est pas seulement liée à la maladie d'Alzheimer et à d'autres maladies neurodégénératives, mais aussi à des maladies cérébrovasculaires. Les causes du déclin cognitif sont nombreuses, comme en témoigne une littérature abondante, puisqu'elle tente d'établir des liens entre désordres du tissu cérébral, maladies sous-jacentes et troubles cognitifs. Il est admis aujourd'hui que considérer les troubles cognitifs par leur seule origine neurodégénérative est très réducteur puisque d'autres facteurs semblent contribuer à leur émergence ou à leur progression (Figure 1). Parmi ces facteurs, on peut citer les désordres vasculaires et métaboliques qui pourraient induire des troubles cognitifs soit directement par des lésions cérébrales (AVC, micro-infarctus, micro-hémorragies, anomalies de la substance blanche), soit indirectement par leurs interactions avec les processus neurodégénératifs. Au regard de cette complexité, il semble important de détecter au plus tôt les dysfonctionnements qui seraient les prémices d'un déclin cognitif, afin de pouvoir intervenir sans délai dans sa prise en charge des patients à risque, et ainsi limiter et ralentir la perte d'autonomie et la dépendance.

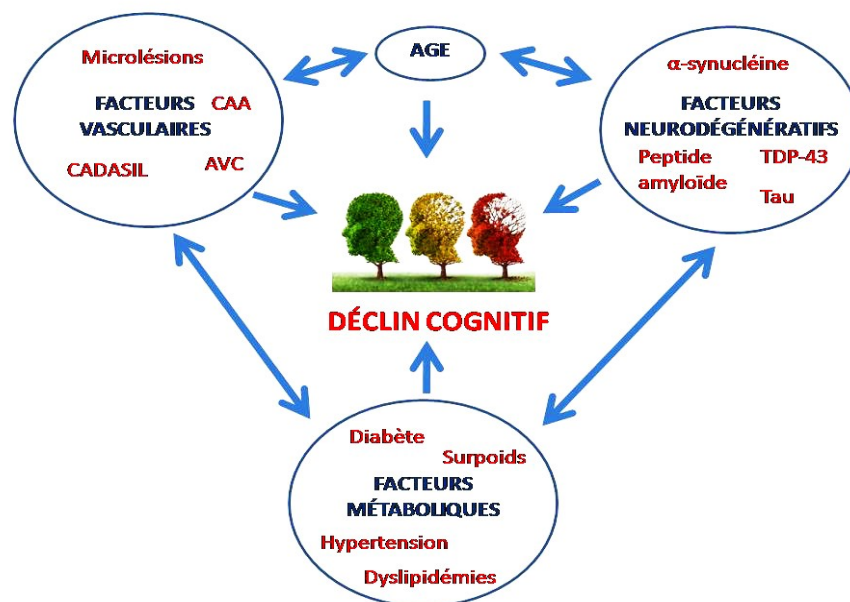


Figure 1 : Principaux facteurs responsables du développement d'un déclin cognitif chez l'Homme. AVC : Accident Vasculaire Cérébral. CAA : Cerebral Amyloid Angiopathy. TDP-43 : TAR DNA-binding protein 43. CADASIL : Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy.

1. Déclin cognitif et démence

1.1. Définitions et classifications

Le déclin cognitif est défini comme étant une perte des fonctions cognitives liées à l'âge. Initialement lent et progressif, il peut être accéléré par divers facteurs liés au style de vie et à la présence de certaines maladies, et mener à la démence, qui provoque une perte d'autonomie dans les activités de la vie quotidienne et des changements de comportements. La démence est définie comme une altération globale, durable et organique des facultés mentales d'un individu entravant son autonomie dans la vie quotidienne en dehors de toute altération de la vigilance. Elle est reconnue comme étant le plus grand défi mondial pour la santé publique et les soins sociaux au 21^{ème} siècle, sa prévalence ne cessant d'augmenter avec l'allongement de la durée de vie (Livingston et al., 2017). A l'échelle mondiale, environ 47 millions de personnes vivaient avec une démence en 2015, et ce nombre devrait tripler d'ici à 2050 (Figure 2). Le coût global associé à ce déclin a été estimé à 818 milliards de dollars en 2015, dont 85% sont liés à la prise en charge familiale et sociale plutôt qu'aux soins médicaux. Cette tendance pourrait s'inverser à l'avenir avec le développement de nouvelles thérapies et la mise en place de mesures de prévention de santé publique (traitements des facteurs de risque). Cette démence s'installe généralement après 65 ans et se caractérise par une diminution des performances dans la plupart des fonctions cognitives. Le symptôme le plus précoce de la démence est la difficulté à se souvenir d'évènements récents. Par la suite, un large éventail d'autres symptômes peut apparaître, tels que la désorientation, les sautes d'humeur, la confusion et les pertes de mémoire plus importantes (Winblad et al., 2016). Il est également reconnu que le vieillissement cognitif est associé à une diminution des capacités exécutives, c'est-à-dire dans la mise en œuvre de processus contrôlés. Ces mécanismes de contrôle regroupent un grand nombre de processus distincts tels que l'initiation de comportements, la planification de l'action, la génération d'hypothèses, l'inhibition de réponses prédominantes, la flexibilité cognitive, le jugement et la prise de décision...(Collette and Salmon, 2014). Le recours à la neuroimagerie cérébrale et à la génétique comportementale, en complément des approches cognitives et neuropsychologiques devrait amener à mieux cerner les processus multiples amenant à ces diminutions de capacités exécutives liées à l'âge.

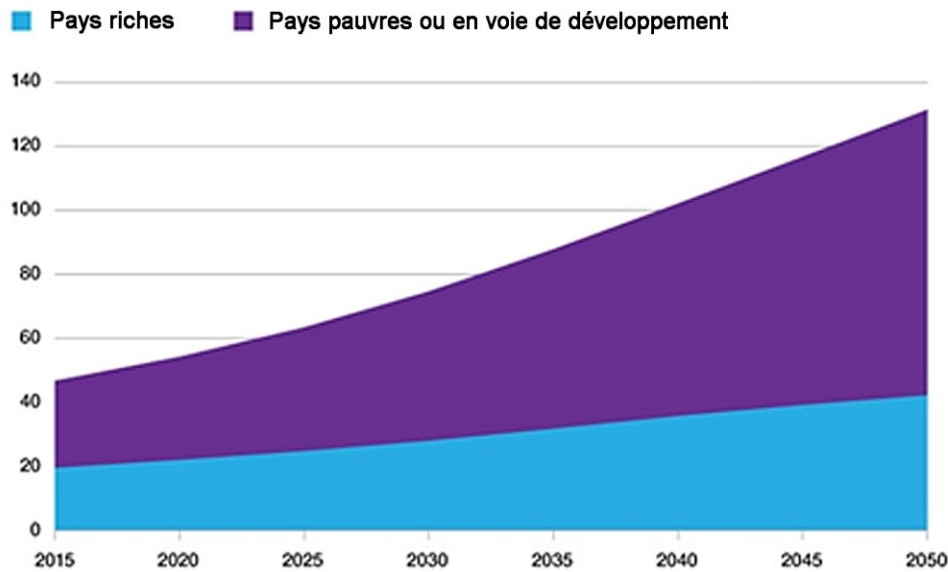


Figure 2 : Projection du nombre de personnes atteintes de démence dans les prochaines décennies (en millions). D'après *Alzheimer Disease International, 2015*.

Les démences peuvent être classées en plusieurs catégories selon les critères pris en compte dans le diagnostic (Figure 3). Ainsi, il existe plusieurs classifications :

- anatomique : fondée sur la zone cérébrale touchée : démence corticale (maladie d'Alzheimer), démence fronto-temporale (qui peut être corticale et/ou lobaire), démences sous-corticales (démences liées à la maladie de Parkinson, à la maladie de Huntington, démences vasculaires), démences cortico-sous corticales (démence à corps de Lewy).
- biologique : fondée soit sur la nature dégénérative (qui touche le tissu cérébral : maladie d'Alzheimer, démences liées à la maladie de Parkinson...) ou non dégénérative (démences vasculaires, neurochirurgicale...) de la démence, soit sur le dépôt protéique impliqué dans le processus pathologique (peptide amyloïde, protéine Tau, alpha-synucléine...).
- clinique : fondée sur l'identification des signes cliniques d'un syndrome démentiel (atteinte d'une ou plusieurs fonctions cognitives, retentissement social et professionnel). Cette évaluation se fait à l'aide de tests de mémoire plus ou moins poussés (Mini Mental State, test de l'horloge...), complétés par des outils biologiques et d'imagerie.

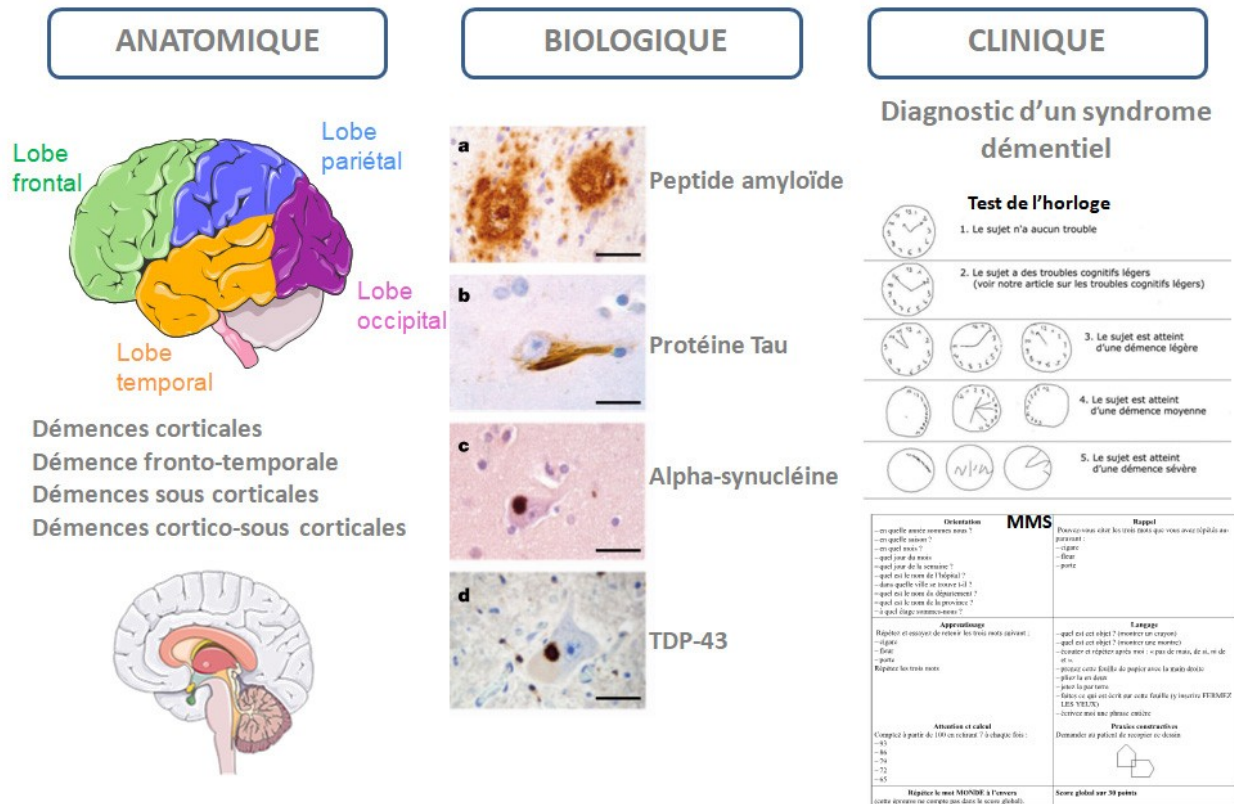


Figure 3 : Classifications des démences chez l'Homme. D'après Folstein et al., 1975; Jucker and Walker, 2013; Lechowski et al., 2004.

1.2. Contributions neurodégénératives au déclin cognitif

Les maladies neurodégénératives sont un groupe d'affections organiques dans lesquelles des protéines mal repliées s'agrègent et s'accumulent intracellulairement ou extracellulairement dans le cerveau, provoquant diverses maladies qui conduisent au final à une perte de fonction d'une partie du cerveau (Sonawane and Chinnathambi, 2018). La zone du cerveau affectée, la protéine pathogène impliquée et le phénotype diffèrent. On distingue également les maladies touchant le système nerveux central de celles touchant le système nerveux périphérique, ainsi que celles d'origine génétique. En raison de l'augmentation de l'espérance de vie, elles affectent de plus en plus de personnes et deviennent un véritable enjeu de santé publique. C'est pourquoi de nombreuses équipes de recherche tentent de comprendre les mécanismes impliqués, notamment dans la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson et la maladie de Huntington qui sont les 3 maladies neurodégénératives les plus répandues.

1.2.1. La maladie d'Alzheimer

Bien que le concept de démence existe depuis longtemps, ce n'est qu'au début du siècle dernier que le syndrome clinique et les modifications neurodégénératives associées ont été découverts. En 1907, Alois Alzheimer décrit avec soin les symptômes d'une femme de 51 ans, Auguste Deter, qui était pris en charge à l'asile de Francfort (voir citation ci-dessous). La description d'Alzheimer de ces symptômes est presque certainement la première caractérisation neuropsychologique de la maladie (Bondi et al., 2017).

"Sa mémoire est sérieusement altérée. Si des objets lui sont montrés, elle les nomme correctement, mais presque immédiatement après, elle a tout oublié. Lors de la lecture d'un test, elle passe d'une ligne à l'autre ou lit en épelant les mots individuellement ou en les rendant insignifiants par sa prononciation. En écriture, elle répète plusieurs fois des syllabes, omet les autres et tombe rapidement en panne. En parlant, elle utilise des «gap-fills (textes à trous)» et quelques expressions paraphrasées («lait-verseur» au lieu de tasse); Parfois, il est évident qu'elle ne peut pas continuer. En clair, elle ne comprend pas certaines questions. Elle ne se souvient pas de l'utilisation de certains objets." Alois Alzheimer, 1911

La maladie d'Alzheimer (MA) est le type le plus commun de démence puisqu'elle représente la majorité des cas dans la population âgée. Selon le rapport de l'Alzheimer's Disease International, la MA constitue la première cause de démence dans le monde (60 à 70% des cas) et en 2015, un nouveau cas était diagnostiqué toutes les 3 secondes. Les premiers symptômes sont des troubles de la mémoire, en particulier dans les domaines épisodiques et sémantiques, ainsi que des troubles au niveau du langage et des fonctions exécutives. Les patients atteints de MA présentent ensuite une perte significative de la réalisation de leurs tâches quotidiennes, avec cessation ou perturbation de la capacité à effectuer des activités complexes et plus tard des tâches plus simples. Actuellement, le diagnostic de la MA est fondé sur la cognition et l'impact relatif des déficiences sur les activités quotidiennes (Risacher and Saykin, 2013). De même, les méthodes de neuroimagerie sont des outils importants pour évaluer et surveiller les changements pathologiques du cerveau associés à la progression de la maladie. En effet, la MA est caractérisée par une perte progressive des synapses et des neurones, reflétée par une atrophie au niveau du cortex temporo-pariétal et du cortex frontal mais aussi de l'hippocampe (Figure 4).

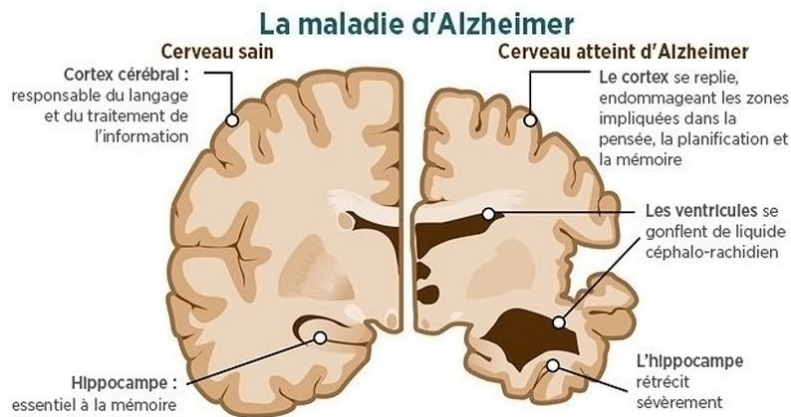


Figure 4 : Représentation des atteintes anatomiques cérébrales de la maladie d'Alzheimer. Image issue de *santepusmag.com*.

Cette perte s'accompagne en parallèle de la présence concomitante de deux types de lésions tissulaires : des dépôts intraneuronaux de protéines Tau hyperphosphorylées (Dégénérescence Neurofibrillaire ou DNF) et des dépôts extracellulaires de peptides amyloïdes A β 1-42 (plaques amyloïdes ou plaques séniles) (Hugo and Ganguli, 2014) (Figure 5).

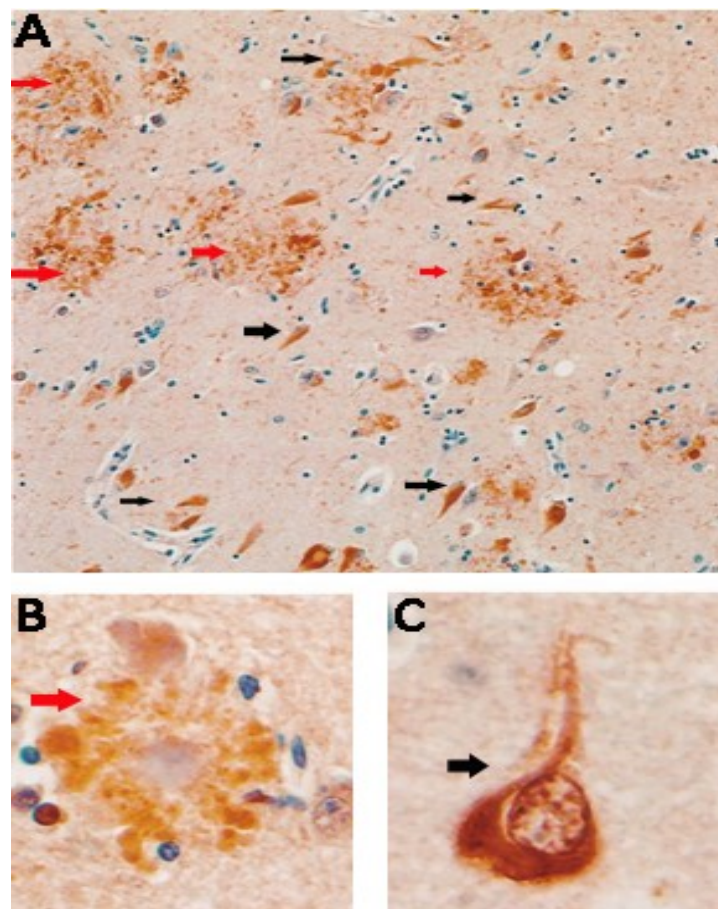


Figure 5 : Photos des deux marqueurs histologiques de la maladie d'Alzheimer. (A) : Dépôts extracellulaires de peptides amyloïdes (flèches rouges, agrandissement X33 ; agrandissement X200 en B) et des dégénérescences neurofibrillaires (flèches noires, agrandissement X200 en C). D'après *Chu et al., 2000*.

En plus des preuves histopathologiques *in vivo*, plusieurs groupes ont récemment démontré les mécanismes biochimiques de la propagation d'A β et de Tau au niveau du tissu cérébral, dont les interactions font penser à une propagation semblable à celle du prion (propagation d'une anomalie de proche en proche) (Nussbaum et al., 2013).

Ces 20 dernières années ont vu le développement de l'identification de marqueurs biologiques *in vivo* de la MA. Plusieurs chercheurs ont affiné la mesure de détection des niveaux d'A β et de Tau dans le liquide céphalorachidien, reflétant l'atteinte neurodégénérative des patients (Mendes et al., 2018). Des composés radioactifs ont également été développés, comme le composé B de Pittsburgh (C11-PIB) capable de se lier à l'A β et de révéler la charge amyloïde dans le cerveau (Mathis et al., 2003). Des agents de liaison à la protéine Tau sont également en cours de développement (Brosch et al., 2017). De même, des mesures de neuroimagerie de l'atrophie de l'hippocampe, du cortex et du cerveau entier ont été développées et appliquées pour détecter des changements neurodégénératifs précoces associés à la MA (Frisoni et al., 2010). D'autres méthodologies avancées de neuroimagerie structurale et fonctionnelle ont été utilisées pour détecter des changements neuropathologiques associés à la maladie et tenter d'en déduire des méthodes de classification de sévérité de la MA (Rathore et al., 2017). Tous ces biomarqueurs ont considérablement augmenté la précision de détection de la MA avant même d'avoir posé le diagnostic et visent à améliorer la capacité à différencier la MA d'autres maladies neurodégénératives avec démence associée.

1.2.2. La maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson (MP) est la 2^{ème} maladie la plus fréquemment associée aux altérations neurodégénératives. Elle touche 3 à 4% des individus de plus de 65 ans, ce qui représente près de 10 millions de personnes dans le monde (Yang et al., 2016). Les événements déclencheurs de cette maladie restent encore incertains, mais de nombreux investigateurs suggèrent une combinaison de facteurs génétiques et environnementaux (Olanow and Brundin, 2013). La MP est symptomatiquement définie par une réduction du nombre de neurones dopaminergiques au niveau de la substance noire et par la présence de corps de Lewy, caractérisés par l'accumulation de protéines α -synucléine (Dickson, 2018). La dégénérescence des neurones dopaminergiques entraîne un déséquilibre entre les neurotransmetteurs excitateurs (acétylcholine) et inhibiteurs (dopamine) dans les régions cérébrales concernées. Les symptômes de cette maladie comprennent des troubles moteurs et non moteurs, tels que la bradykinésie, la rigidité musculaire, des tremblements au repos, une instabilité posturale, une lenteur ou une absence de mouvements volontaires ainsi que des

symptômes neuropsychiatriques (Khodadadian et al., 2018). La MP est une maladie progressive, qui s'étale sur 10 ans ou plus. La démence est un signe tardif de la maladie, et touche plus de 60% des patients après 10 ans de maladie et 85% de ceux après 20 ans. Les symptômes de stade tardif comme la démence et les chutes sont d'ailleurs généralement la raison d'admission aux soins de longue durée et d'une mortalité élevée (Coelho and Ferreira, 2012). Le début, le profil et la vitesse du déclin cognitif varient grandement chez les patients parkinsoniens. L'identification et la prédiction de ce déclin dans cette population sont donc cruciales pour les chercheurs et les cliniciens. Comparés aux symptômes moteurs, les mécanismes sous-jacents au déclin cognitif de la MP sont peu connus, et plusieurs questions clés demeurent non résolues : le déclin cognitif est-il le résultat d'une atteinte plus sévère et généralisée de la pathophysiologie de la MP ? Certains mécanismes liés à la MP sont-ils particulièrement impliqués dans ce déclin cognitif ? La perte cognitive est-elle liée à l'implication régionale ou à des mécanismes spécifiques ? En plus des études post-mortem, des études *in vivo* (cliniques, électrophysiologiques, génétiques ou d'imagerie) ont toutes contribué à une meilleure compréhension (Aarsland et al., 2017). Ainsi, plusieurs mécanismes sont progressivement relevés : en plus de la toxicité de l' α -synucléine, les contributions potentielles d'autres maladies, les perturbations mitochondriales, l'inflammation et les facteurs génétiques sont actuellement étudiés (Figure 6). De même, un certain nombre de biomarqueurs d'imagerie (volumétries, connectivités, perfusions, radiotraceurs...), d'électrophysiologie (EEG-EMG) et humoraux (α -synucléine, A β 42 dans le LCR) ont été associés à une déficience cognitive chez les patients parkinsoniens (Aarsland et al., 2017).

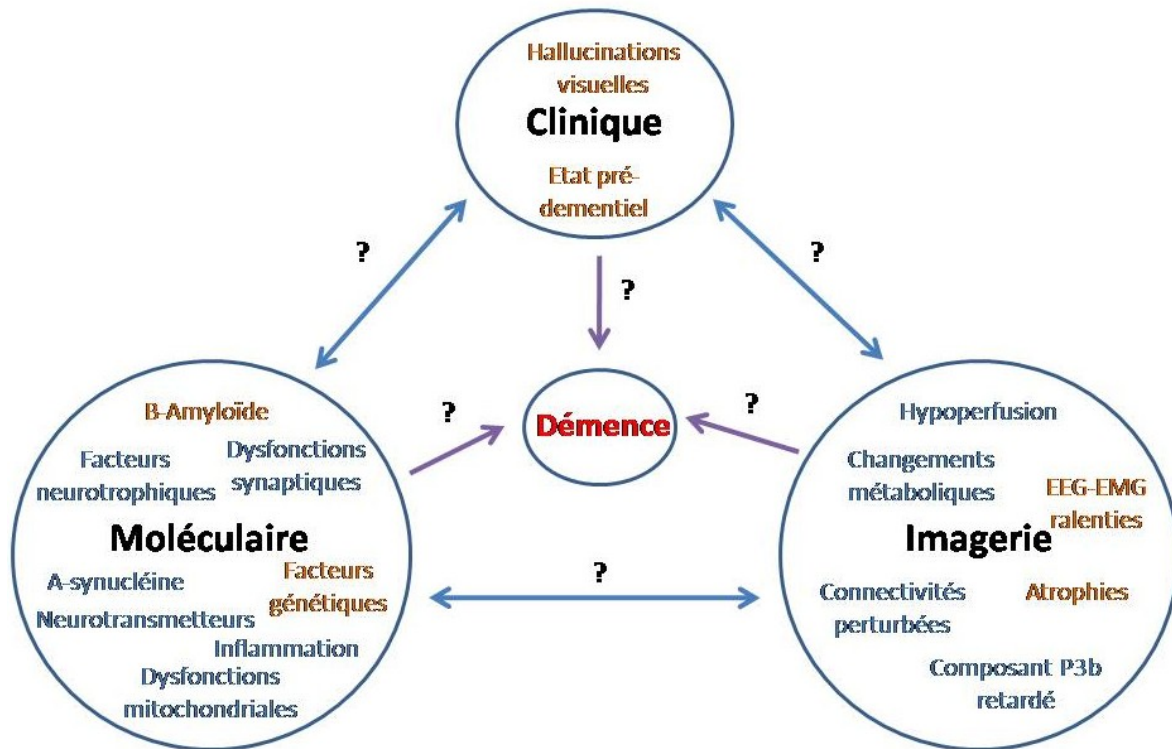


Figure 6 : Aperçu des facteurs conduisant à une démence dans la maladie de Parkinson. Les 3 catégories de facteurs sont représentées ici : clinique, moléculaire et imagerie. Les facteurs issus d'études longitudinales sont représentés en marron, ceux issus d'études transversales en bleu. Les interactions entre les différentes catégories (flèches bidirectionnelles) ainsi que les facteurs temporels entre les catégories et l'apparition de la démence (flèches unidirectionnelles) demeurent inconnus. *Adapté de Aarsland et al., 2018.*

1.2.3. La maladie de Huntington

La maladie de Huntington (MH) est décrite pour la première fois par Georges Huntington en 1872. C'est le trouble neurodégénératif génétique le plus courant, avec une incidence de 10/100000 individus européens (Rangel-Barajas and Rebec, 2018). Cette maladie monogénétique autosomale dominante est causée par un trinuéclotide (CAG) qui se répète au niveau du gène codant pour la protéine huntingtine (HTT) essentielle au développement du cerveau. Le CAG étendu code une longue séquence de poly-glutamine dans laquelle des agrégats HTT mutants se forment et perturbent de multiples fonctions cellulaires. Des déficits sont observés au niveau du métabolisme énergétique des muscles squelettiques (Lodi et al., 2000), de la sensibilité à l'insuline (Lalić et al., 2008), au niveau cardiovasculaire et endocrinien (Aziz et al., 2010; Cutler et al., 2017). Cependant, les symptômes les plus impactant restent ceux liés au système nerveux central. En effet, la dégénérescence striatale et la dysfonction corticostriatale sont considérées comme les principales caractéristiques pathologiques de la maladie dont les symptômes apparaissent majoritairement dans 3 domaines : moteur, cognitif et psychiatrique (Figure 7). D'ailleurs, l'extension des répétitions

CAG prédit l'apparition et la sévérité de ces symptômes cliniques (Rangel-Barajas and Rebec, 2017). La caractéristique motrice la plus commune de la maladie est le manque de coordination et les troubles de la marche, suivis d'une phase de mouvements involontaires regroupés sous le terme de « chorée » (Bates et al., 2015). Le déclin cognitif est associé à un déséquilibre de la transmission dopaminergique et à une dysfonction neuronale cortico-fronto-striatale (Hägkvist et al., 2017). Ce déclin commence aux premiers stades de la maladie et précède généralement les signes moteurs. Il débute par un manque de flexibilité durant les tâches exécutives et dans les prises de décisions. Les problèmes d'organisation, de synchronisation et de planification surviennent ensuite tout au long de la maladie, jusqu'à aboutir à une démence (Clemensson et al., 2017). Les symptômes psychiatriques sont étroitement associés à la dysfonction fronto-lobaire, et se manifestent par un manque d'attention, une irritabilité, une impulsivité et des sautes d'humeur. Dans certains cas, une dépression et une apathie peuvent également survenir (van Duijn et al., 2014).

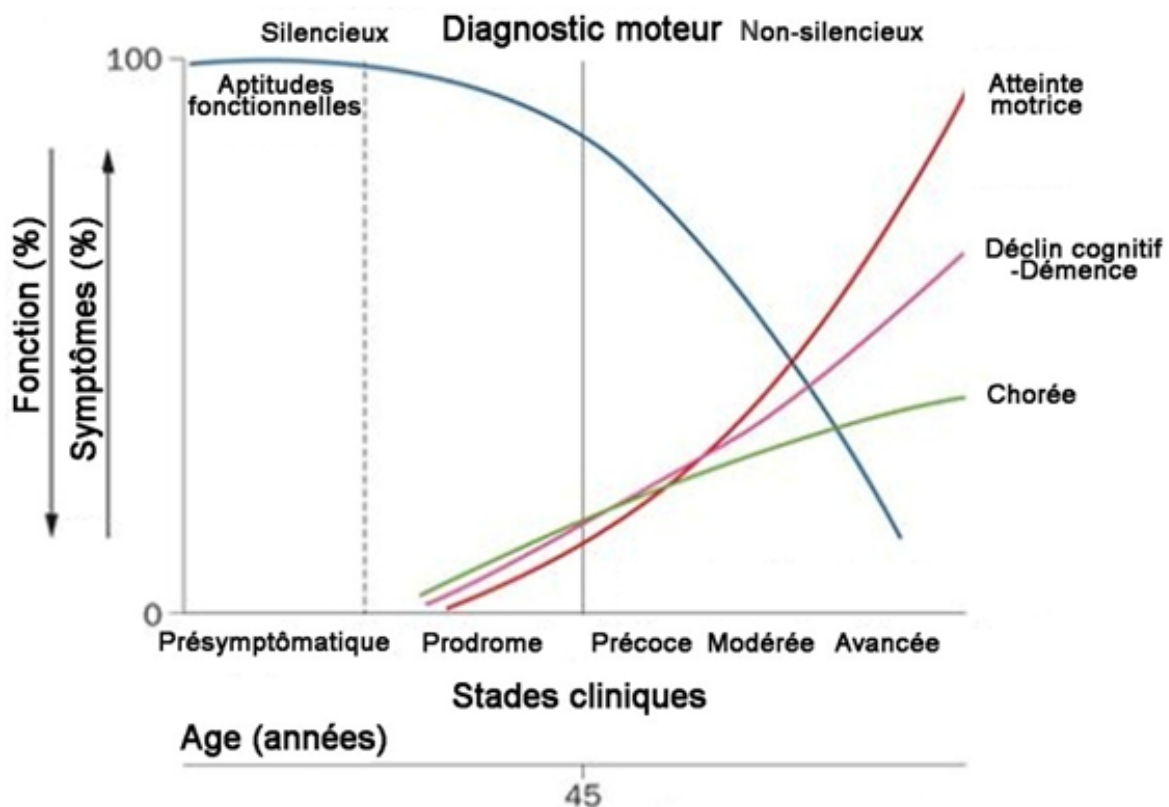


Figure 7 : Evolution clinique de la maladie de Huntington. Pendant la période « présymptomatique », aucun symptôme n'est présent. Puis survient la phase « prodromale » où des symptômes subtils se mettent en place, jusqu'à la période « non-silencieuse » caractérisée par une lente progression des difficultés motrices et cognitives. La « chorée » est souvent prédominante au début puis stagne jusqu'à même diminuer plus tard. Les déficits moteurs (mouvements anormaux, bradykinésie et rigidité) progressent régulièrement. *Adapté de Bates et al., 2015.*

1.3. Contributions métaboliques au déclin cognitif

En 2015, Gardener et ses collaborateurs ont rédigé une revue démontrant les liens importants entre les facteurs de risque cérébrovasculaire et la santé du cerveau. En 2010, l'American Heart Association (AHA) s'est fixée pour objectif d'améliorer la santé cardiovasculaire et de réduire la mortalité des américains de 20% en 10 ans. Pour cela, ils ont défini les 7 items idéaux permettant de limiter les risques cardiovasculaires dans la population (Figure 8).

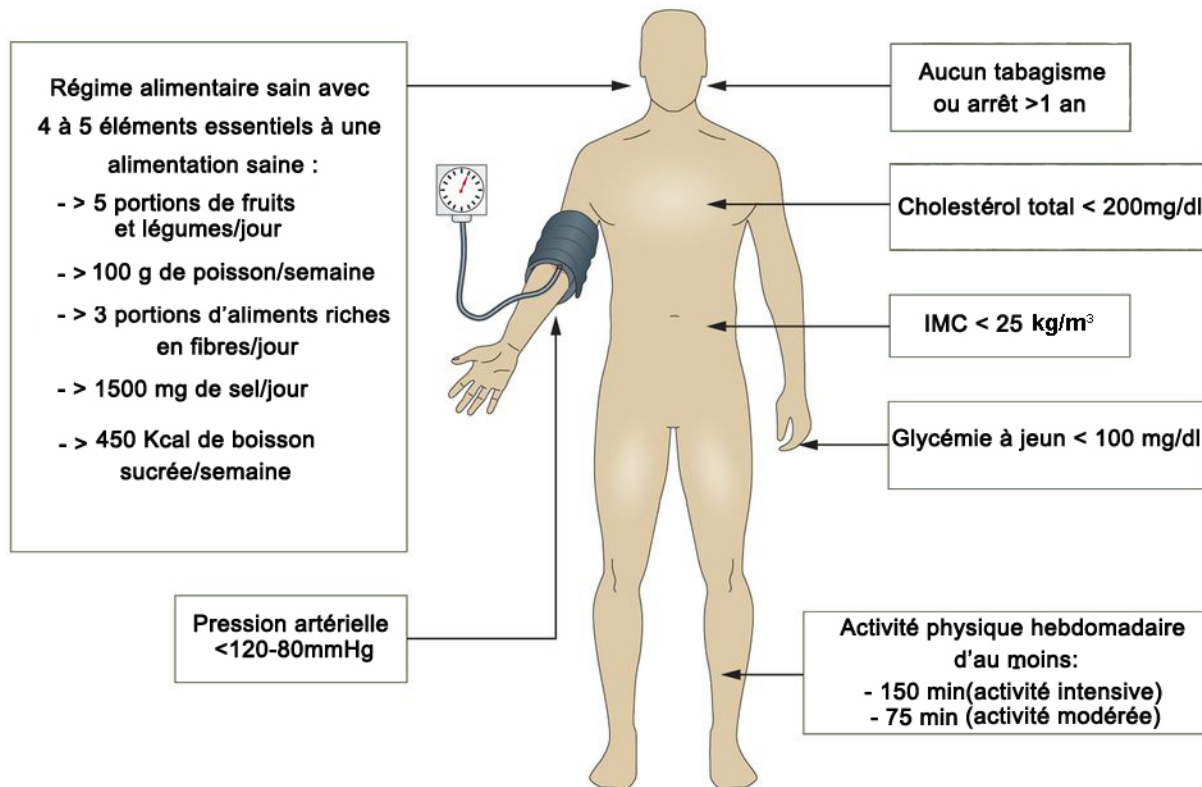


Figure 8 : Les facteurs cardiovasculaires idéaux pour une bonne santé. Adapté de Gardener et al., 2015.

A partir de ces limites et de différentes données épidémiologiques prenant en compte la diversité raciale et ethnique de la population, les auteurs ont mis en évidence un large éventail de facteurs de risque de maladies vasculaires et de mortalité : le diabète et la résistance à l'insuline, le syndrome métabolique, l'obésité, l'hypertension, l'inflammation, l'infection mais aussi le sommeil, les migraines, le tabagisme, les taux élevés d'adiponectine, les hépatites chroniques et l'athérosclérose carotidienne (Gardener et al., 2015). De plus, il est maintenant suspecté que la présence de certains de ces facteurs en milieu de vie est associée à un risque plus important de développer un déclin cognitif et une démence. Ainsi, l'hypertension et une obésité présentes en milieu de vie semblent être associées à une

détérioration des performances des fonctions exécutives, le diabète et le tabagisme à une atrophie cérébrale et hippocampique (Debette et al., 2011). De plus, la co-occurrence de plusieurs de ces facteurs de risque cardiovasculaire à la quarantaine est suspectée de prédire une démence tardive. De cette façon, il est possible de corrélérer le nombre de facteurs de risque présents chez les patients avec les risques de démence de manière dose-dépendante, comme observé chez Whitmer et collaborateurs en 2005 (Figure 9). Nombre de ces facteurs étant reconnu comme étant des facteurs de risque modifiables, les efforts de santé publique peuvent viser à promouvoir des modes de vie plus sains, notamment autour de l'âge de 40 ans, afin d'améliorer l'état de santé général de la population vieillissante.

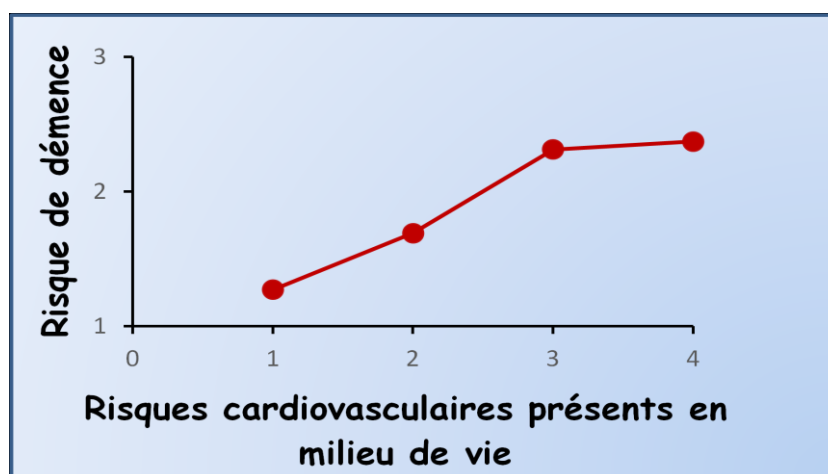


Figure 9 : Corrélation entre les risques cardiovasculaires présents en milieu de vie et le risque de démence.
Adapté de Whitmer et al., 2005.

1.3.1. Syndrome métabolique : définitions, prévalence

Le syndrome métabolique (SMet) est défini comme une constellation de facteurs physiologiques, biochimiques et métaboliques interconnectés qui augmentent le risque de maladies cardiovasculaires et de mortalité toutes causes confondues. Il comprend les dyslipidémies, l'hypertension, l'intolérance au glucose, l'état pro-inflammatoire et l'état pro-thrombotique (Kaur, 2014). Il y a eu plusieurs définitions du SMet, mais les critères les plus utilisés proviennent actuellement de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), du groupe européen pour l'étude de l'insulinorésistance (EGIR), de l'association américaine des endocrinologues cliniciens (AACE) et de la fédération internationale du diabète (IDF). Bien que chaque définition possède des caractéristiques communes, il existe des paramètres différents qui entraînent des difficultés en matière d'applicabilité, d'uniformité et de valeur prédictive positive. Il est cependant reconnu que le SMet peut être caractérisé par la présence

simultanée d'au moins 3 états pathologiques (Tsuneyama et al., 2017). Il représente un problème majeur de santé publique dans le monde entier en raison de sa prévalence croissante. En effet, celle-ci varie de 10 à 84% selon l'âge, le sexe, la race et la définition du SMet (Kaur, 2014). Par exemple, selon les données de l'enquête nationale d'examen de santé et de nutrition des Etats-Unis (National Health and Nutrition Examination Survey), 35% des plus de 18 ans et 50% des plus de 60 ans avaient reçu un diagnostic de SMet en 2015 (30.3% chez les hommes et 35.6% chez les femmes).

1.3.2. Physiopathologie du syndrome métabolique

La physiopathologie du SMet est complexe puisqu'elle résulte d'une interaction complexe entre facteurs génétiques et environnementaux. La résistance à l'insuline, l'adiposité viscérale, la dyslipidémie athérogène, le dysfonctionnement endothélial, la susceptibilité génétique, l'hypertension artérielle, l'état d'hypercoagulabilité et le stress chronique sont parmi les facteurs qui constituent ce syndrome (Figure 10).

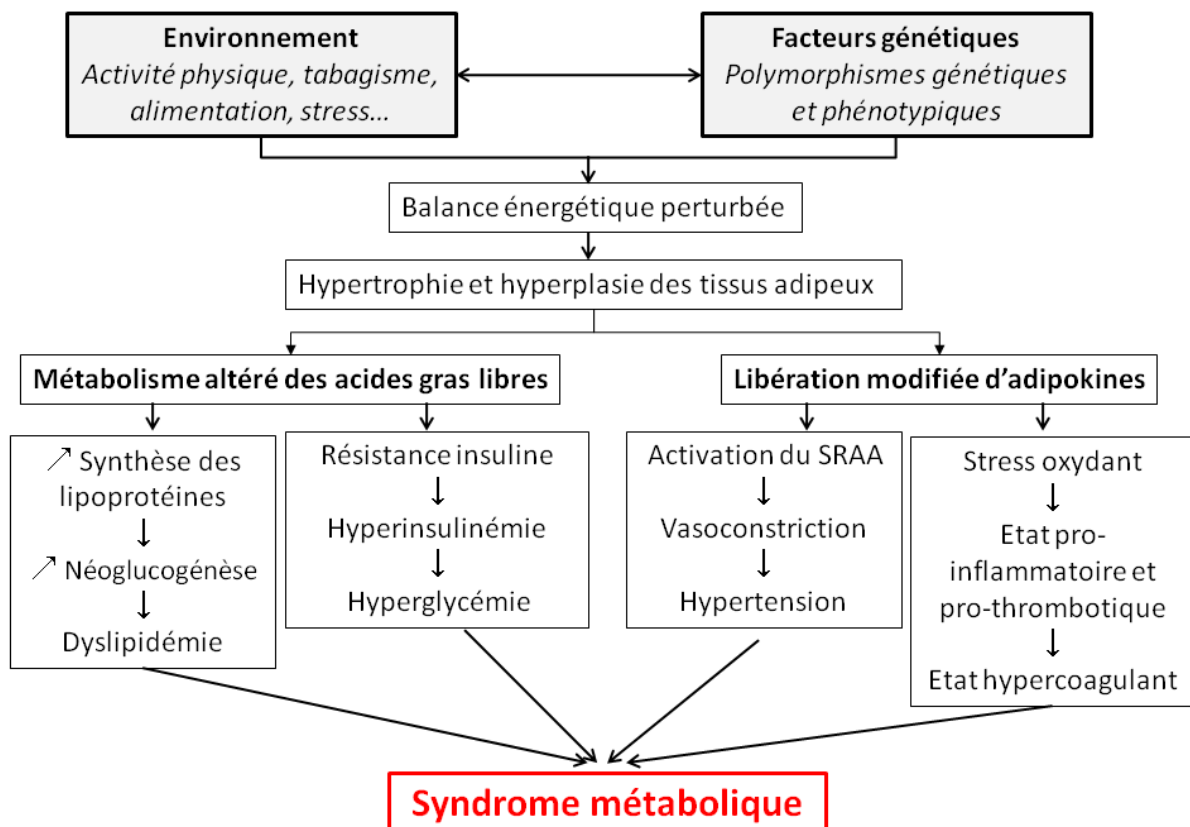


Figure 10 : Présentation schématique des mécanismes physiopathologiques impliqués dans la mise en place d'un syndrome métabolique. SRAA : Système Rénine-Angiotensine Aldostérone. Adapté de Kaur, 2014.

L'hypothèse la plus largement acceptée pour la physiopathologie sous-jacente du SMet est celle de la résistance à l'insuline. Cette hormone sécrétée par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas agit *via* son récepteur situé principalement au niveau du foie, du muscle squelettique et du tissu adipeux. Ainsi, en plus de l'évidence que la réactivité réduite à des niveaux normaux d'insuline est précurseur du développement du diabète de type 2, la résistance à l'insuline dans le muscle squelettique entraîne une réduction de la synthèse de glycogène et du transport de glucose, et un ralentissement de ses voies de signalisation dans le foie. De même, l'accumulation d'acides gras libres dans les muscles squelettiques peut inhiber l'absorption du glucose insuline-dépendant. Dans le foie, ils favorisent l'augmentation de la production de glucose, de triglycérides et de lipoprotéines, fortement athérogènes (McCracken et al., 2018).

Les mécanismes inflammatoires et oxydants sont également largement impliqués dans le développement d'un SMet. En effet, en plus du risque considérablement accru de diabète de type 2 et de maladie cardiovasculaire athéromateuse, le SMet est reconnu pour être pro-inflammatoire et pro-thrombotique, le tissu adipeux occupant une place centrale dans sa physiopathologie. En effet, les adipocytes subissant une hypertrophie et une hyperplasie en réponse à un excès nutritionnel peuvent conduire les cellules à dépasser leur approvisionnement en sang et ainsi induire une hypoxie et une nécrose cellulaire. Celle-ci est alors responsable d'une infiltration des macrophages et d'une production d'adipocytokines, incluant les médiateurs pro-inflammatoires IL-6 et le TNF- α , ainsi que le médiateur pro-thrombotique PAI-1 (Figure 11).

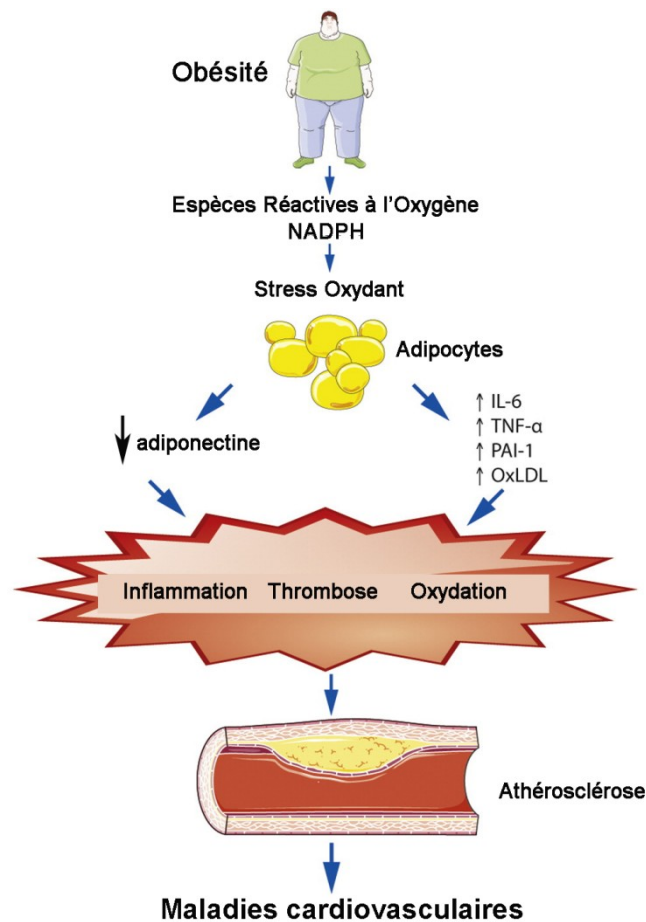


Figure 11 : Schéma général du rôle de l'inflammation et du stress oxydant dans la physiopathologie de l'athérosclérose dans un syndrome métabolique. NADPH : Nicotinamine Adénine Dinucléotide Phosphate. PAI-1 : Plasminogène Activateur Inhibiteur-1. OxLDL : Oxydé Low Density Lipoprotéine. IL-6 : Interleukine-6. TNF- α : Tumeur Necrosis Factor- α . *Adapté de Mc Cracken et al., 2018.*

L'identification clinique et la prise en charge des patients atteints de SMet sont cruciales pour entamer des efforts visant à mettre en œuvre des traitements de manière adéquate afin de réduire le risque de maladies ultérieures. Les approches préventives comprennent des changements de mode de vie, incluant principalement une perte de poids, de l'exercice et une modification du régime alimentaire, mais aussi des traitements pharmacologiques pour réduire des facteurs de risque spécifiques (Daugherty and Raz, 2017). La prise en charge clinique du SMet est difficile car il n'existe pas de méthode reconnue pour prévenir ou améliorer l'ensemble du SMet. Ainsi, la plupart des médecins traite plutôt chaque composant du SMet séparément, en mettant un accent particulier sur les composants qui se prêtent facilement au traitement médicamenteux. En fait, il est plus rapide et efficace de prescrire un médicament pour abaisser la pression artérielle, la glycémie ou les triglycérides plutôt que de lancer une stratégie à long terme pour changer le mode de vie des gens (faire plus d'exercice,

mieux manger...) dans l'espoir qu'ils maigrissent et diminuent leur pression artérielle ou leur glycémie (Kaur, 2014).

1.4. Contributions vasculaires au déclin cognitif

En 2014, le « National Institute of Health » (NIH) aux Etats-Unis a reconnu le « Vascular Cognitive Impairment/Dementia » ou VCID comme étant un domaine d'étude à part entière recouvrant de multiples diagnostics cliniques des maladies cérébro- et cardio-vasculaires, des Accidents Vasculaires Cérébraux (AVC), de démence et de la MA. Le VCID peut être largement causé par un flux sanguin altéré vers le cerveau, mais peut être associé ou non à un AVC. Le concept du VCID peut être représenté comme l'unité neurovasculaire vieillissante, supportant peu les perturbations biologiques dues à la pathologie vasculaire, à la MA, aux variations métaboliques et aux réponses immunitaires (Murphy et al., 2016). Les divers processus impliqués peuvent aussi être reliés entre eux, amenant le terme de démence vasculaire comme étant lié à des processus multifactoriels, à l'âge, à la génétique, à l'éducation et à d'autres mécanismes pathologiques comme la fibrillation auriculaire ou le diabète sucré (Kalaria et al., 2016). Des travaux récents ont également mis en évidence le rôle des microlésions (micro-infarctus, microhémorragies, lésions de la substance blanche...) dans la VCID, qui entraîneraient elles aussi une perte de connectivité structurelle et fonctionnelle (Dichgans Martin and Leys Didier, 2017) (Figure 12).

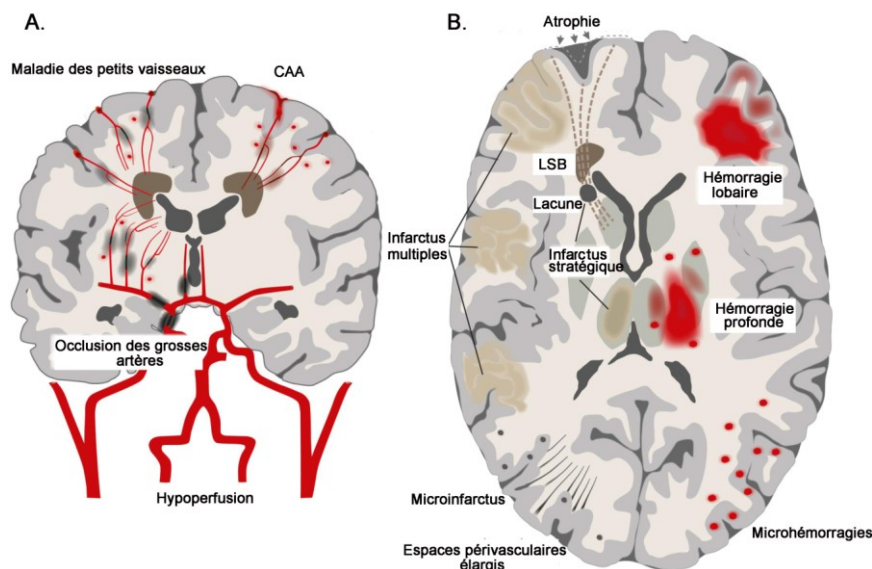


Figure 12 : Principaux mécanismes impliqués dans le déclin cognitif vasculaire (VCID). A. Causes vasculaires. B. Lésions cérébrales parenchymateuses associées au déficit cognitif vasculaire. LSB : Lésions de la Substance Blanche. CAA : Cerebral Amyloid Angiopathy. *Adapté de Dichgans et Leys, 2017.*

1.4.1. Maladies constitutives

L'angiopathie cérébrale amyloïde ou CAA a été décrite pour la 1^{ère} fois par Oppenheim en 1909 et est caractérisée par des dépôts de protéines β -amyloïde dans les vaisseaux leptoméningés (Sharma et al., 2018). La CAA survient principalement sous forme sporadique chez les personnes âgées, alors que des formes familiales rares surviennent chez des patients plus jeunes et conduisent généralement à des manifestations cliniques plus sévères. Cette maladie est maintenant reconnue comme étant une cause importante d'hémorragie intracérébrale (HIC) chez les personnes âgées, représentant jusqu'à 1/5 des HIC spontanées dans ce groupe démographique. Cependant, la CAA a de nombreuses autres caractéristiques cliniques et radiologiques permettant de poser son diagnostic (Biffi and Greenberg, 2011) (Tableau 1).

| Classification | Critères modifiés de Boston |
|--|--|
| CAA certaine | Examen post-mortem complet démontrant : <ul style="list-style-type: none"> • Hémorragie lobaire, corticale ou cortico-sous-corticale • CAA sévère avec vasculopathie • Absence d'autres lésions diagnostiquées |
| Probable CAA avec pathologie sous-jacente | Données cliniques et tissus pathologiques (après évacuation de l'hématome et biopsie corticale) démontrant : <ul style="list-style-type: none"> • Hémorragie lobaire, corticale ou cortico-sous-corticale • CAA modérée • Absence d'autres lésions diagnostiquées |
| Probable CAA | Données cliniques et neuroimagerie démontrant : <ul style="list-style-type: none"> • Multiples hémorragies limitées aux régions lobaires, corticales ou cortico-sous-corticales (hémorragies cérébelleuses autorisées) • Unique hémorragie lobaire, corticale ou sous-corticale accompagnée d'une sidérose corticale superficielle focale ou disséminée • Age \geq 55 ans • Absence d'autres causes d'hémorragie ou de sidérose corticale superficielle |
| Possible CAA | Données cliniques et neuroimagerie démontrant : <ul style="list-style-type: none"> • Unique hémorragie lobaire, corticale ou sous-corticale • Sidérose corticale superficielle focale ou disséminée • Age \geq 55 ans • Absence d'autres causes d'hémorragie ou de sidérose corticale superficielle |

Tableau 1 : Critères de Boston modifiés pour le diagnostic de la CAA. Adapté de Sharma et al., 2018.

L'amyloïde- β retrouvé dans les vaisseaux est principalement présent sous sa forme hydrosoluble à 40 acides-aminés, ce qui contraste avec le taux important de la forme soluble

de 42 acides aminés présente dans les plaques séniles des patients atteints de la MA. L'hypothèse la plus répandue pour expliquer les dépôts de l'amyloïde- β à l'intérieur des vaisseaux repose sur un défaut d'élimination de ces protéines le long du drainage vasculaire, associé à un défaut de clairance du système nerveux central au niveau du liquide interstitiel et à une production d'amyloïde- β par les neurones (Carare et al., 2013) (Figure 13).

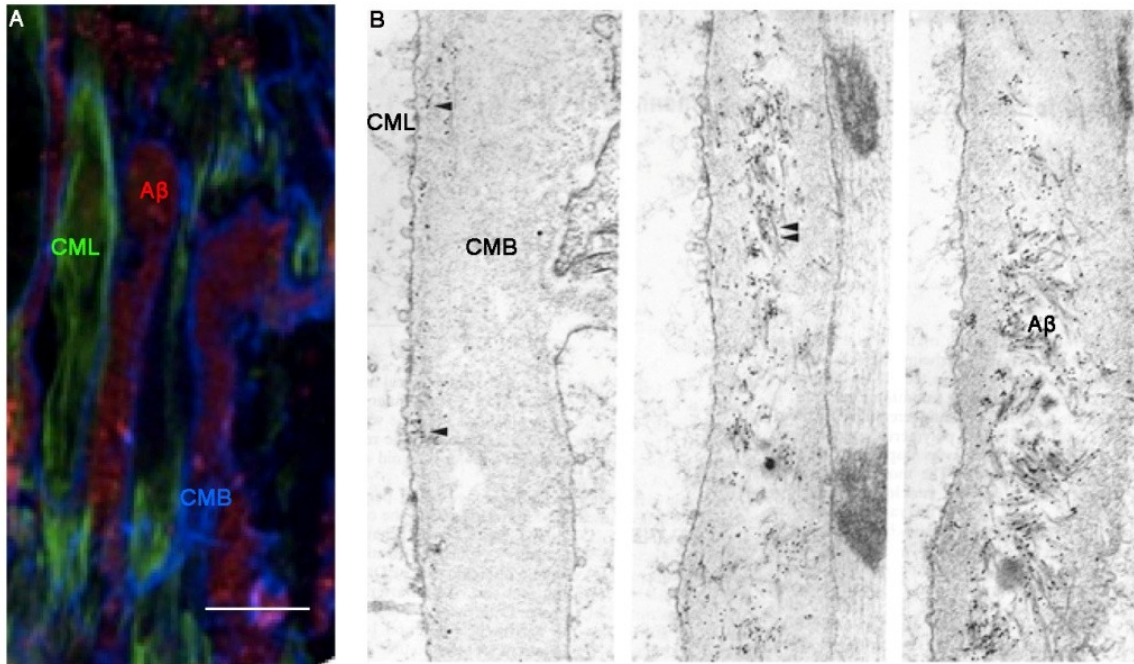


Figure 13 : Dépôts d'amyloïde- β dans la membrane basale des parois artérielles leptoméningées (Anomalie d'élimination de la protéine dans la CAA). **A.** Image en microscopie confocale montrant les cellules musculaires lisses (CML, en vert) associées aux cellules de la membrane basale (CMB, en bleu) englobant les dépôts d'amyloïde- β ($A\beta$, en rouge). Echelle : 10 μ m. **B.** Images en microscopie électronique : accumulation progressive d'amyloïde- β dans la paroi d'une artère leptoméningée. *A gauche* : les immunomarquages de fibrilles minuscules d'amyloïde- β (petites granules noires-pointes de flèches) sont disposés en rangée au niveau de la membrane des CML. *Au centre et à droite* : les fibrilles d'amyloïde- β sont bien définies, disposées au hasard (doubles pointes de flèches) et se sont accumulées dans la membrane basale entre les CML. Les dommages engendrés à la base de la CMB sont liés à l'accumulation et à la polymérisation de fibrilles d'amyloïde- β . Adapté de Carare et al., 2013.

Dans les premiers stades de la maladie, les dépôts d'amyloïde- β sont limités à la membrane basale, entraînant un épaissement des vaisseaux concernés. Avec la progression de la maladie, la membrane devient saturée de dépôts. Ceux-ci atteignent alors les cellules musculaires lisses, entraînant un épaissement de la paroi vasculaire et provoquant une perte de la réactivité vasculaire normale (Sharma et al., 2018). En raison des effets cytotoxiques de l'amyloïde- β , il s'en suit une dégénérescence ultérieure et une perte au niveau du muscle lisse, entraînant un amincissement et une fragilité de la paroi du vaisseau, suspectée par la suite de la survenue de lésions hémorragiques (Zipfel et al., 2009). De plus, il est important de

distinguer la CAA de la MA, malgré une forte association de symptômes. En effet, il peut y avoir jusqu'à plus de 90% des patients Alzheimer diagnostiqués également pour une CAA, mais seulement 25% des patients avec une CAA sont aussi atteints de la MA (Ellis et al., 1996).

Ces cinq dernières années, de nombreuses recherches ont démontré que la CAA montre diverses manifestations cliniques, liées à la présence de différentes lésions cérébrales (microinfarctus, microhémorragies, lésions de la substance blanche...). La CAA est ainsi associée à une atrophie cérébrale et à un déclin cognitif, et ce en l'absence d'AVC symptomatique (Case et al., 2016). Ces symptômes pourraient résulter de l'un ou d'une association des trois mécanismes suivants : 1/ les effets de la destruction tissulaire induite par les HIC, 2/ les effets d'une maladie associée telle que la MA, 3/ les effets d'autres mécanismes pathologiques non liés aux HIC ou à la MA (Figure 14).

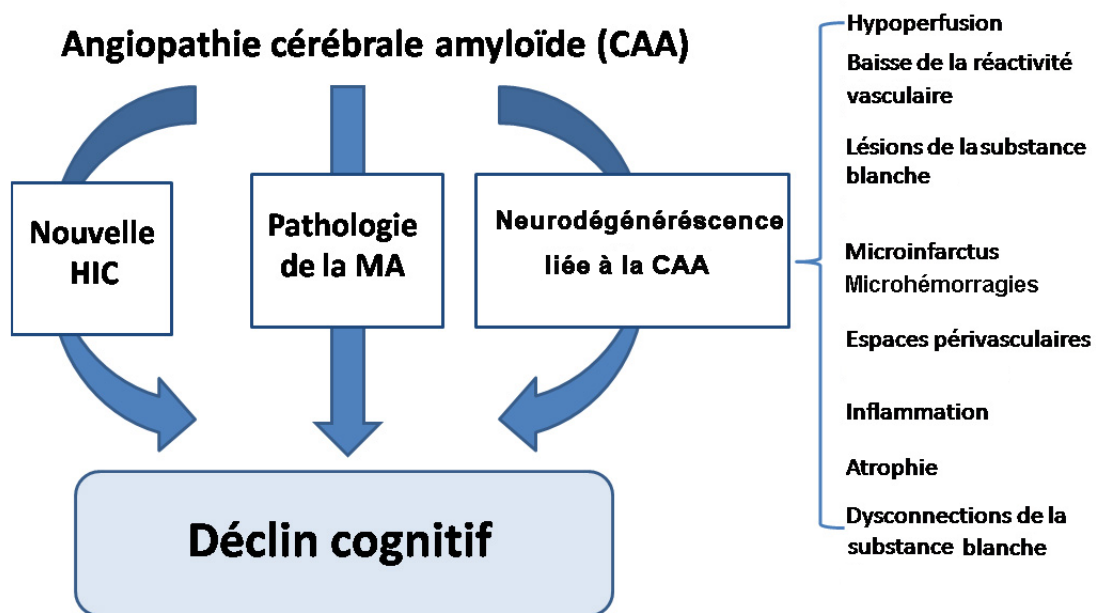


Figure 14 : Déclin cognitif dans l'angiopathie cérébrale amyloïde. HIC : Hémorragie IntraCérébrale. MA : Maladie d'Alzheimer. *Adapté de Smith, 2018.*

Une autre maladie vasculaire constitutive concernée par la mise en place d'un déclin cognitif est le CADASIL ou « Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy ». Cette maladie génétique est la cause monogénique la plus fréquente de la maladie cérébrovasculaire progressive de l'adulte. Le gène sous-jacent responsable de la maladie est le *NOTCH3* qui code pour un récepteur transmembranaire

trouvé dans les cellules musculaires lisses artérielles cérébrales et systémiques. Plus de 200 mutations dans le gène *NOTCH3* ont été associées au CADASIL, la majorité étant des mutations faux-sens au niveau des résidus de cystéines, entraînant une perturbation de la structure et de la fonction des protéines (Liao et al., 2015). Les investigations microscopiques et structurelles montrent une artériopathie spécifique affectant principalement les petites artères pénétrantes et leptoméningées. Cette artériopathie est caractérisée par un épaississement de la paroi artérielle, conduisant à une sténose de la lumière vasculaire accompagnée de la présence de granules non amyloïdes (Figure 15).

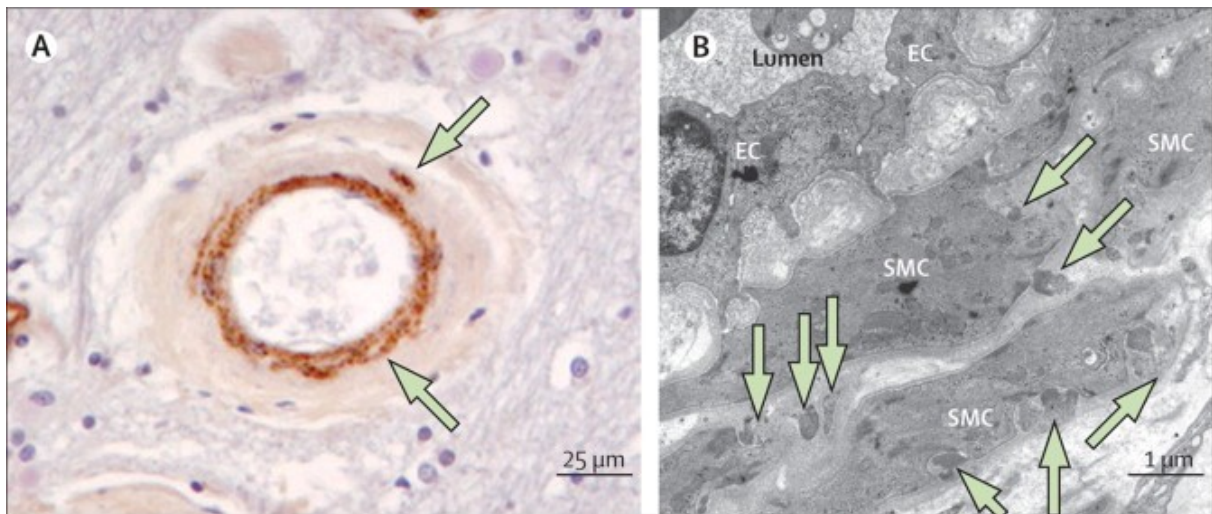


Figure 15 : Lésions artérielles caractéristiques de CADASIL (Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy). A. Coupe d'une petite artère de la substance blanche cérébrale marquée avec un anticorps anti-NOTCH3. Noter l'épaississement de la paroi du vaisseau, la dégénérescence des cellules musculaires lisses (SMC) et les agrégats de NOTCH3 autour des cellules musculaires lisses résiduelles (flèches). B. Image en microscopie électronique d'une artère dermique montrant des cellules musculaires lisses irrégulières et de nombreux dépôts granulaires (flèches) situés dans la membrane basale des cellules musculaires lisses. *Adapté de Chabriat et al., 2009.*

Bien que la présentation clinique du CADASIL varie considérablement entre et au sein des familles, cette maladie est essentiellement caractérisée par 5 symptômes principaux : la migraine (avec ou sans aura), les événements ischémiques sous-corticaux, les troubles de l'humeur, l'apathie et les troubles cognitifs. Ces symptômes varient en fréquence avec l'âge et la durée de la maladie (Chabriat et al., 2009). Le profil temporel des manifestations cliniques est résumé dans la figure 16. Bien que chacun des symptômes principaux puisse apparaître isolément, ils se produisent successivement. La migraine avec aura commence vers 30 ans, les événements ischémiques et les troubles de l'humeur entre 40 et 60 ans, et la démence entre 50 et 60 ans. Les patients ont des difficultés à marcher aux alentours de 60 ans et ont une

espérance de vie d'environ 65 ans pour les hommes et 71 ans pour les femmes (Chabriat et al., 2009).

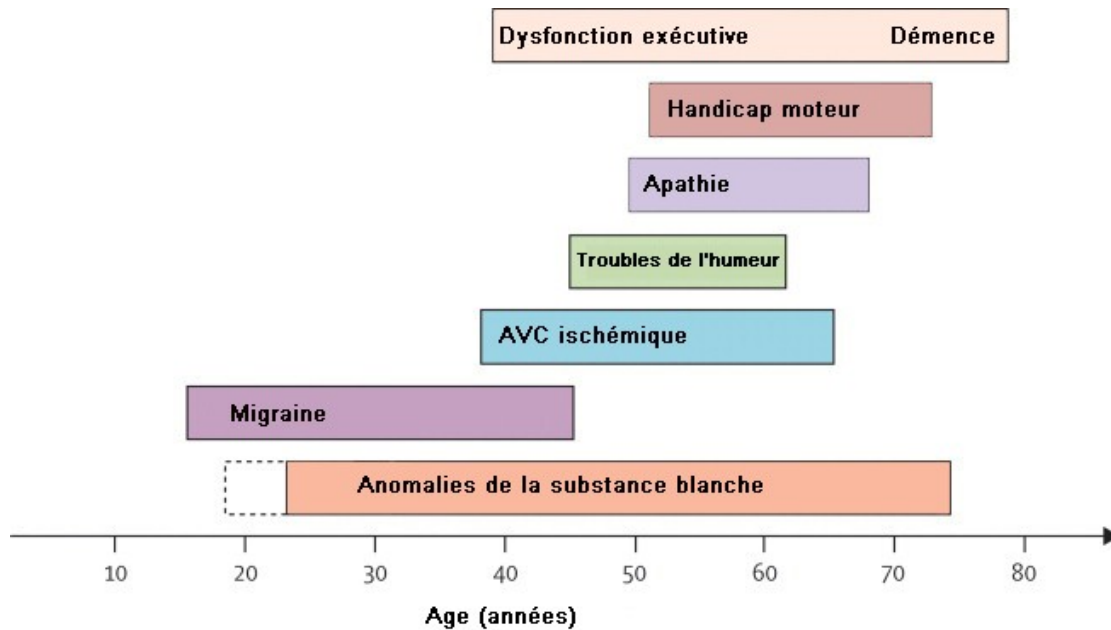


Figure 16 : Evolution naturelle des principales manifestations cliniques du CADASIL. L'âge exact du début et des premières anomalies en IRM reste incertain (lignes pointillées). La fréquence des anomalies de substance blanche augmente progressivement et devient constante à environ 35 ans chez tous les patients. *Adapté de Chabriat et al, 2009.*

Le déclin cognitif est la 2^{ème} manifestation clinique la plus fréquente dans le CADASIL. Les signes les plus précoces dans la plupart des cas sont des altérations de la fonction exécutive et de la vitesse de traitement de l'information. Le déclin cognitif devient plus important avec le vieillissement, avec des altérations progressives des activités de tous les jours, de la mémoire verbale ou visuelle, du langage et du raisonnement. Les déficits cognitifs sont initialement attribués à la région sous-corticale, mais récemment il a été démontré que le cortex cérébral peut aussi être affecté, soit par des mécanismes directs (microlésions) ou par dégénérescence secondaire (Duering et al., 2012).

1.4.2. Accidents vasculaires cérébraux

Les mécanismes physiopathologiques induits par une hypoperfusion cérébrale sont maintenant reconnus comme étant des inducteurs directs et indirects de perturbations cognitives. De même, la réduction de la perfusion cérébrale est corrélée avec la sévérité de la démence, et prédit également que les personnes ayant une déficience cognitive légère progresseront pour développer une démence (Chao et al., 2010). Ces événements peuvent être

lésionnels, tel que l'AVC, issus d'une altération voire d'une rupture de la paroi vasculaire, mais ils peuvent aussi être plus silencieux et multiples.

L'AVC est caractérisé par un dysfonctionnement du cerveau suite à des perturbations du flux sanguin cérébral. Il est la 2^{ème} cause de décès et la 1^{ère} cause de handicap chez les adultes dans le monde (Strong et al., 2007). Il peut être de nature ischémique (environ 85%) ou de nature hémorragique (environ 15%). Suite à de nombreuses études et à une amélioration de la prise en charge des patients, la mortalité induite par cette maladie tend maintenant à diminuer, avec un taux de mortalité de 40.6/100 000 habitants en Amérique, soit 3 fois moins que dans les années 1950. Les chercheurs s'intéressent donc maintenant de plus en plus aux handicaps dont souffrent les victimes. Chaque année, 15 millions de personnes dans le monde sont atteints, dont environ 30% souffrent d'un handicap résiduel (Sun et al., 2014). Hormis l'impact moteur qui est prédominant dans cette maladie, il est bien admis que les AVC induisent un déclin cognitif, qui peut-être à la fois dû aux lésions provoquées, mais aussi à la pathogénèse de la MA (Figure 17). En effet, une étude clinique récente a suggéré que la pathogénèse de la MA contribue à environ 30% des cas de démences après AVC (Jellinger, 2007).

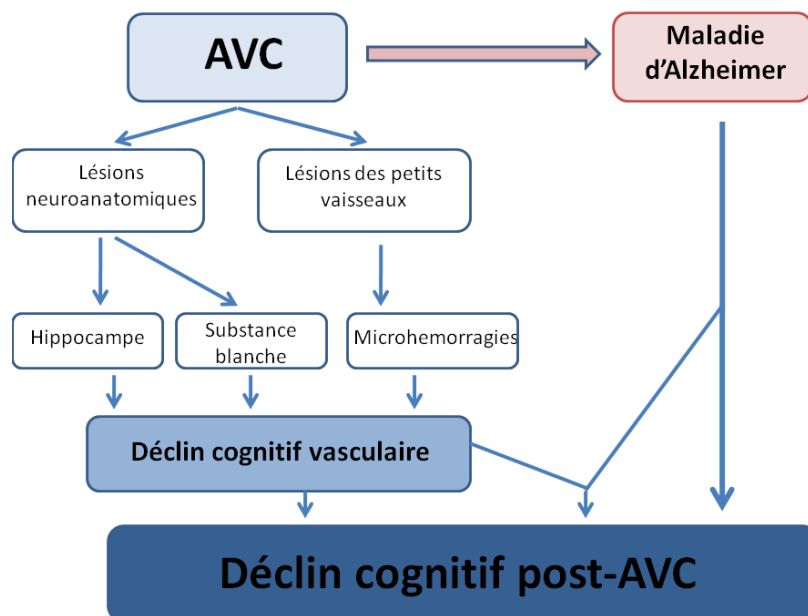


Figure 17 : Principaux mécanismes impliqués dans le déclin cognitif post-AVC. AVC : Accident Vasculaire Cérébral. *Adapté de Sun et al., 2014.*

L'une des questions qui ressort des différentes études sur la relation entre l'AVC et la survenue d'une démence est de savoir si l'évènement ischémique est la cause de cette

détérioration cognitive ou s'il y contribue. En effet, les données de prévalence ont démontré qu'un patient sur dix avait déjà une démence (diagnostiquée ou non) au moment de la survenue de l'accident vasculaire, un sur dix allait développer une démence après le premier AVC et un sur trois après un second évènement ou plus (Brainin et al., 2015). De même, le développement du déclin cognitif post-AVC dépend également d'autres facteurs incluant la localisation et le volume de la lésion, le degré de mort tissulaire associée ou toute autre présence de pathologie cérébrale. L'influence directe de facteurs génétiques reste encore floue. Ainsi, contrairement à la vue traditionnelle de la « trajectoire cognitive » post-AVC fondée sur un modèle quasiment prédictif du déclin cognitif induit, il est maintenant reconnu que les « trajectoires cognitives » sont plus complexes, avec divers degrés de déclin cognitif pré-AVC et post-AVC, nécessitant ainsi plusieurs approches pour l'évaluation à différents temps (Figure 18).

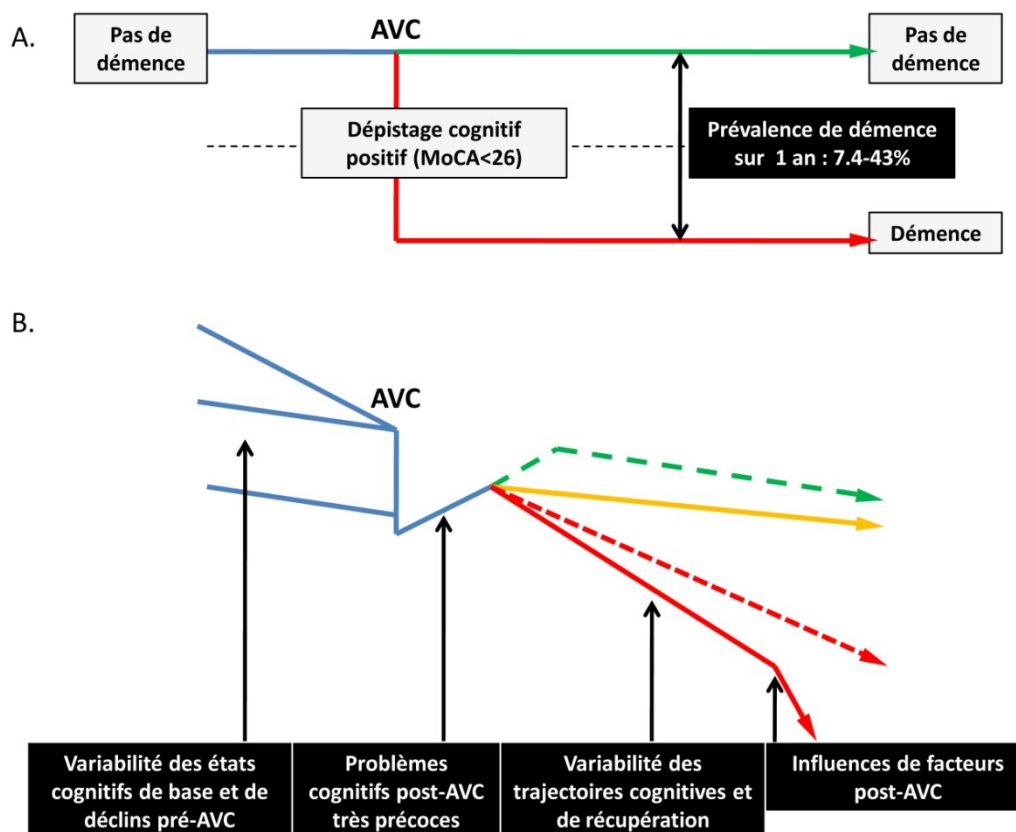


Figure 18 : Trajectoires cognitives dans l'AVC. A. Vue traditionnelle du déclin cognitif post-AVC. B. Le « monde réel » avec une variabilité dans les déclins cognitifs pré-AVC et dans les trajectoires post-AVC. AVC : Accident Vasculaire Cérébral. MoCA : Montreal Cognitive Assessment. *Adapté de Mijajlović et al., 2017.*

En ce qui concerne le type d'AVC concerné, les patients ayant subi un AVC de type ischémique ont généralement un taux de survie plus élevé que ceux ayant eu un AVC

hémorragique, ce qui explique pourquoi les AVC ischémiques entraînent plus fréquemment une morbidité psychiatrique que les AVC hémorragiques. De même, des études prospectives récentes suggèrent que la survenue d'un AVC peut démasquer ou déclencher d'autres pathologies variées, y compris celles liées aux atteintes des petits vaisseaux, les infarctus multiples et les microhémorragies (Figure 19).

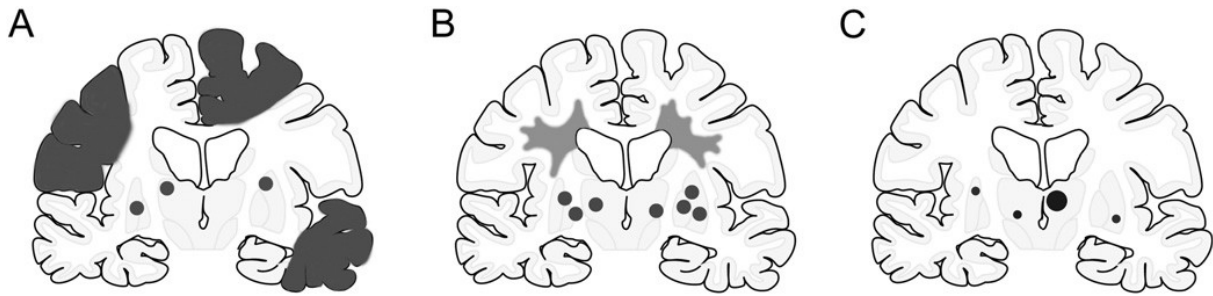


Figure 19 : Localisation des infarctus ou modifications tissulaires associées au développement d'une démence post-AVC. A. Sous-type 1 résultant de l'occlusion de gros vaisseaux (arthéromboembolie). **B.** Sous-type 2 impliquant habituellement des descriptions d'athérosclérose, d'angiopathie hypertensive, amyloïde ou du collagène. **C.** Sous-type 3 causé par des infarctus dans des zones dites « stratégiques » comme le thalamus ou l'hippocampe. *Adapté de Kalaria et al, 2016.*

Des analyses multiples de données internationales sur les facteurs influençant la démence post-AVC ont défini ces facteurs de risque comme étant des facteurs démographiques, des facteurs pré- et post-AVC, des facteurs d'index d'AVC (précisant la nature de l'AVC) et enfin des facteurs présents en neuroimagerie (Tableau 2).

| | |
|----------------------------------|---|
| Facteurs démographiques | <ul style="list-style-type: none"> - Age (au-dessus de 65 ans) - Faible niveau d'éducation - Sexe féminin - Origine non-caucasienne |
| Facteurs pré-AVC | <ul style="list-style-type: none"> - Altération physique - Déclin cognitif |
| Facteurs d'index d'AVC | <ul style="list-style-type: none"> - AVC hémorragique - AVC supratentorial - AVC hémisphérique dominant |
| Facteurs post-AVC | <ul style="list-style-type: none"> - Infection - Delirium - Attaques précoces |
| Facteurs en neuroimagerie | <ul style="list-style-type: none"> - Maladie cérébrale des petits vaisseaux - Atrophie corticale - Atrophie du lobe medio-temporal |

Tableau 2 : Facteurs de risques de démence post-AVC. AVC : Accident Vasculaire Cérébral. *Adapté de Mijajlovic et al., 2017.*

La recherche de biomarqueurs de démence post-AVC est maintenant au centre des recherches cliniques et pré-cliniques afin de tenter de détecter au plus tôt l'apparition de cette pathologie. Ces biomarqueurs incluent des mesures en imagerie, des analyses du métabolisme, de la génétique et des médiateurs inflammatoires (Tableau 3).

| | |
|-----------------------------------|--|
| Facteurs génétiques | <ul style="list-style-type: none"> - Gènes impliqués dans la pathologie amyloïde (apolipoprotéine E, APP, préséniline..) - Gènes polymorphiques (SNPs) : plusieurs cas sont retrouvés au niveau du système rénine-angiotensine, sur le chromosome X, à proximité du récepteur aux androgènes, au niveau du gène de la NOS endothéliale |
| Marqueurs au niveau du LCR | <ul style="list-style-type: none"> - Peptide Aβ-42 et protéine Tau - Métalloprotéinases (MMP-9, MMP-2) - α1-antitrypsine, PAI-1, apolipoprotéine-H |
| Marqueurs sériques | <ul style="list-style-type: none"> - Enzyme β-sécrétase - Homocystéine - Vitamine B12-Vitamine B9 |
| Médiateurs inflammatoires | <ul style="list-style-type: none"> - Vitesse de sédimentation - Protéine C réactive - Interleukine 6 et 12 |
| MicroARN périphériques | <ul style="list-style-type: none"> - miR-93, miR-146a, miR-31 sérique |
| Neuroimagerie | <ul style="list-style-type: none"> - Présence/absence d'hémorragie cérébrale - Atrophie cérébrale - Présence/absence de lésions de la substance blanche, de lacunes, de microhémorragies, de microinfarctus - TEP-FDG |

Tableau 3 : Biomarqueurs et prédictors de démence post-AVC. APP : Amyloid Precursor Protein. NOS : Nitric Oxide Synthase. LCR : Liquide Céphalo-Rachidien. PAI-1 : Plasminogen Activator Inhibitor 1. miR : microRNA. TEP-FDG : Tomographie par Emission de Positons-FluoroDésoxyGlucose. *Adapté de Mijajlovic et al., 2017.*

1.4.3. Microlésions

En plus du déclin cognitif post-AVC, des études en neuroimagerie et neuroanatomie ont identifié des plus petites lésions vasculaires ou parenchymateuses pouvant être associées à un déclin cognitif. Parmi elles, nous pouvons citer la présence de multiples microinfarctus, qui sont de petites lésions ischémiques non visibles à l'œil nu (généralement <1mm) mais détectées au microscope au cours de l'examen histopathologique (Figure 20-G). Il est admis que la présence d'un ou 2 microinfarctus détectés lors de l'examen histopathologique révèle en réalité la présence d'une centaine de lésions dans tout le cerveau (Westover et al., 2013). Quantifier ces microinfarctus *in vivo* reste un défi : ils sont véritablement détectés en IRM ultra-haute champ à 7T, mais peuvent occasionnellement être vus sur des IRM 3T conventionnels. Ces lésions peuvent être retrouvées au niveau cortical et sous-cortical et sont particulièrement fréquentes chez les patients atteints d'un déclin cognitif et chez les personnes âgées (Brundel et al., 2012). De même, la présence de microhémorragies et de sidérose superficielle est également associée au développement d'un déclin cognitif chez les patients. Les microhémorragies, dont nous allons parler plus spécifiquement dans le chapitre suivant, sont des lésions arrondies bien définies en imagerie et dont le diamètre n'excède pas les 5 mm chez l'Homme (Figure 20-F). Ces lésions sont retrouvées dans 10 à 15% des cerveaux de personnes âgées, mais à plus de 80% chez les patients atteints de démence vasculaire (Won Seo et al., 2007). La sidérose superficielle corticale, quant à elle, représente des dépôts linéaires de produits de dégradation du sang dans l'espace sous-arachnoïdien, les leptoméniges et les couches corticales superficielles, et est intimement liée à la CAA. La prévalence de cette lésion chez les sujets âgés non atteints de démence est d'environ 0.5% alors que la fréquence chez les patients recrutés dans les centres de mémoire est beaucoup plus élevée, allant de 2 à 6% (Zonneveld et al., 2014).

D'autres lésions sont également associées au déclin cognitif chez les patients. On retrouve ainsi la perte légère des tissus microstructuraux qui peut se mesurer dans tout le cerveau ou dans des régions sélectionnées grâce à des méthodes d'imagerie en tenseur de diffusion, et qui reste l'un des facteurs qui corrèle le mieux avec le déclin cognitif fonctionnel (Tuladhar et al., 2016). Nous pouvons également citer les lésions de la substance blanche et les lacunes, détectables en IRM et qui se présentent pour la première sous la forme d'hyperintensités de la substance blanche et pour la seconde de petites cavités dont le signal est identique à celui du liquide céphalo-rachidien (Figure 20-A-D). Dans la population générale, leur taux de prévalence augmente respectivement de 50% à 95% entre 45 et 80 ans (de Leeuw et al.,

2001). Pathologiquement, les lésions de la substance blanche représentent des degrés variables de perte axonale, de démyélinisation et de gliose. Ces lésions ont elles aussi été associées à un déclin cognitif et à une démence (Wright et al., 2008).

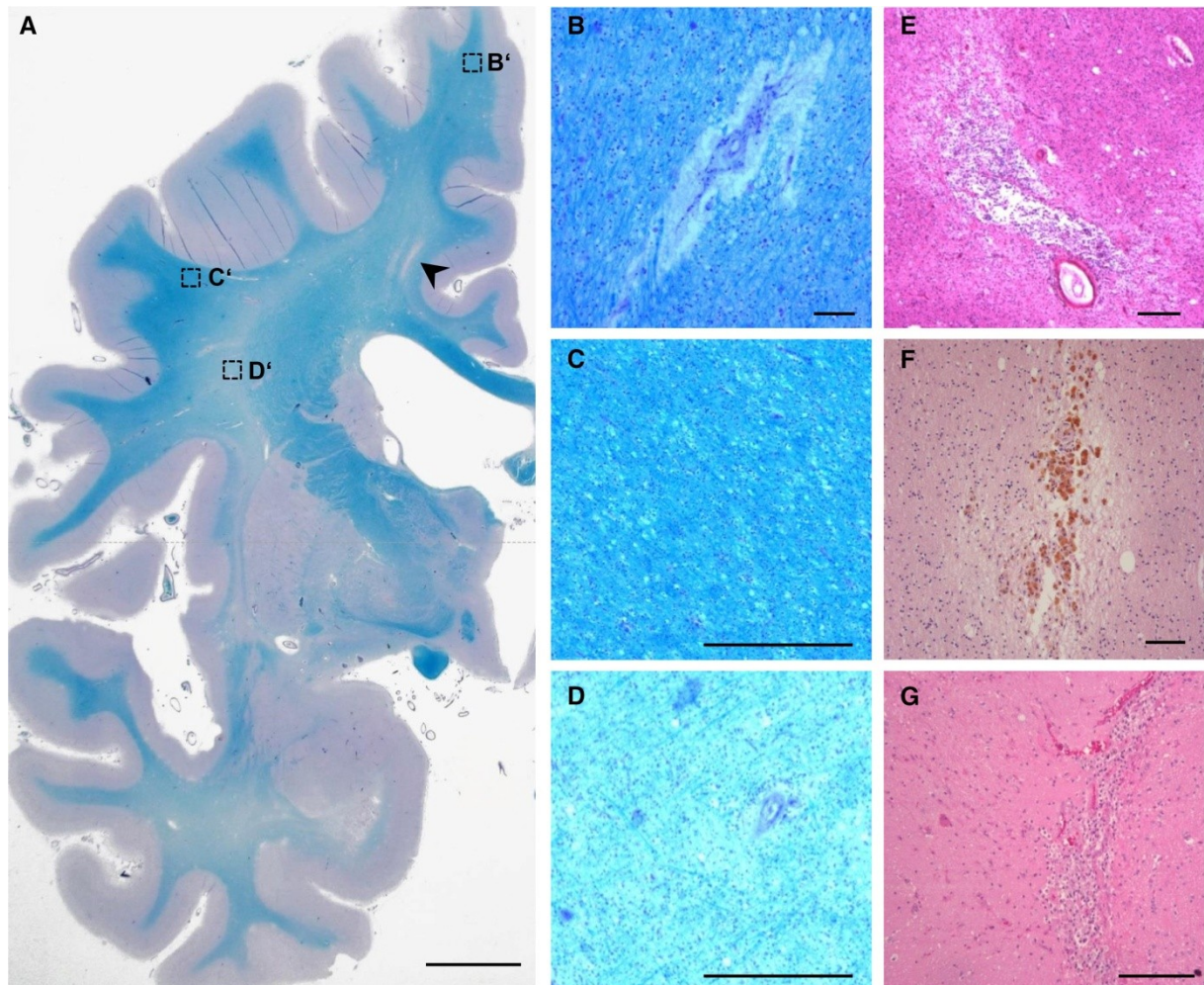


Figure 20 : Observations pathologiques associées à un déclin cognitif vasculaire. A. Hémisphère d'un patient atteint d'une maladie des petits vaisseaux et d'une raréfaction importante de la substance blanche (coloration Luxol Fast Blue, échelle : 1 cm). La flèche noire pointe un infarctus lacunaire. Les cases B, C et D correspondent à des grossissements plus importants. B. Espace périvasculaire élargi (échelle : 200 µm). C. Légère raréfaction de la substance blanche (échelle : 500 µm). D. Raréfaction marquée de la substance blanche (échelle : 500 µm). E. Infarctus lacunaire (coloration à l'hématoxyline éosine, échelle : 500 µm). F. Microhémorragie avec macrophages chargés d'hémosidérine (coloration à l'hématoxyline éosine, échelle : 200 µm). G. Microinfarctus (coloration à l'hématoxyline éosine, échelle : 200 µm). *Adapté de Dichgans et Leys, 2017.*

Face à ces différents types de lésions neuroanatomiques et au manque de traitements efficaces pour lutter contre la démence, les recherches se concentrent de plus en plus sur l'identification de facteurs susceptibles de retarder l'apparition de troubles cognitifs. Un de ces facteurs

repose sur le concept de « réserve cognitive », une construction théorique utilisée pour décrire les différences individuelles au déclin cognitif dû au vieillissement ou à une pathologie cérébrale. Ce concept est né de l'observation qu'il peut y avoir des contradictions entre les lésions neuroanatomiques présentes et le degré de déficience cognitive ou fonctionnelle observé chez les individus (Pettigrew and Soldan, 2019). Il postule ainsi que les expériences de vie, combinées ou en interaction avec des facteurs génétiques, permettent aux processus cognitifs d'être résilients en influençant l'efficacité, la capacité ou la flexibilité des réseaux neuronaux, permettant aux individus de mieux faire face aux maladies cérébrales ou au vieillissement. Ces expériences comprennent le niveau d'étude et le niveau professionnel, les capacités cognitives générales et la participation à des activités stimulantes sur les plans cognitif, social et physique (Figure 21). Certains de ces facteurs étant « modifiables » (activité cognitive et sociale, activité physique, alimentation saine et consommation régulière d'alcool), certaines études soutiennent la possibilité de renforcer les réserves cognitives tout au long de la vie en encourageant la participation à des activités cognitives, sociales et physiques, ainsi qu'à un régime alimentaire sain (Clare et al., 2017).

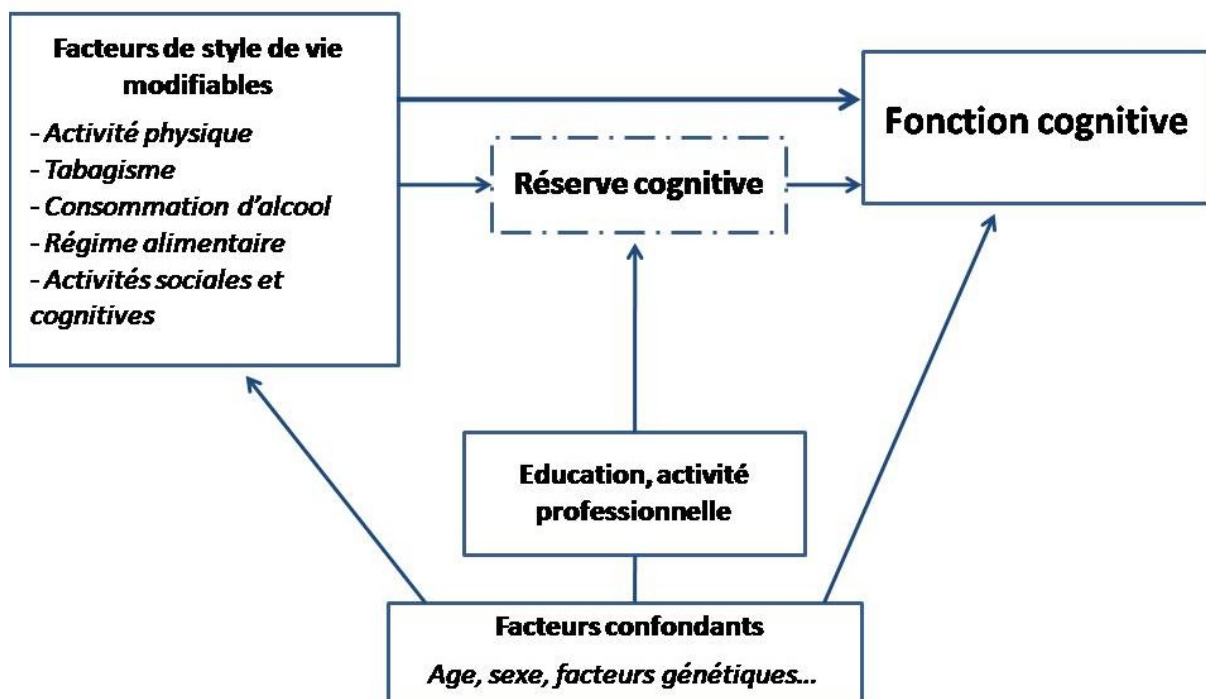


Figure 21 : Effet médiateur de la réserve cognitive sur la fonction cognitive. *Adapté de Clare et al., 2017*

2. Les microhémorragies cérébrales

2.1. Détection en imagerie

Les microhémorragies cérébrales (MHC) sont définies comme de petits épanchements sanguins issus de la rupture de microvaisseaux cérébraux et d'un diamètre inférieur à 5 mm chez l'Homme. Ces petites lésions arrondies ont d'abord été définies en radiologie comme apparaissant en hyposignal en IRM sur des séquences pondérées en T2* en écho de gradient et correspondant à des dépôts focaux d'hemosidérine autour de l'unité vasculaire impliquée (Greenberg et al., 2009) (Figure 22). Ces dépôts de fer ont souvent été phagocytés par des macrophages (on parle alors de sidérophages), qui leurs confèrent des propriétés paramagnétiques dont les effets de susceptibilité sont responsables de cette perte de signal.

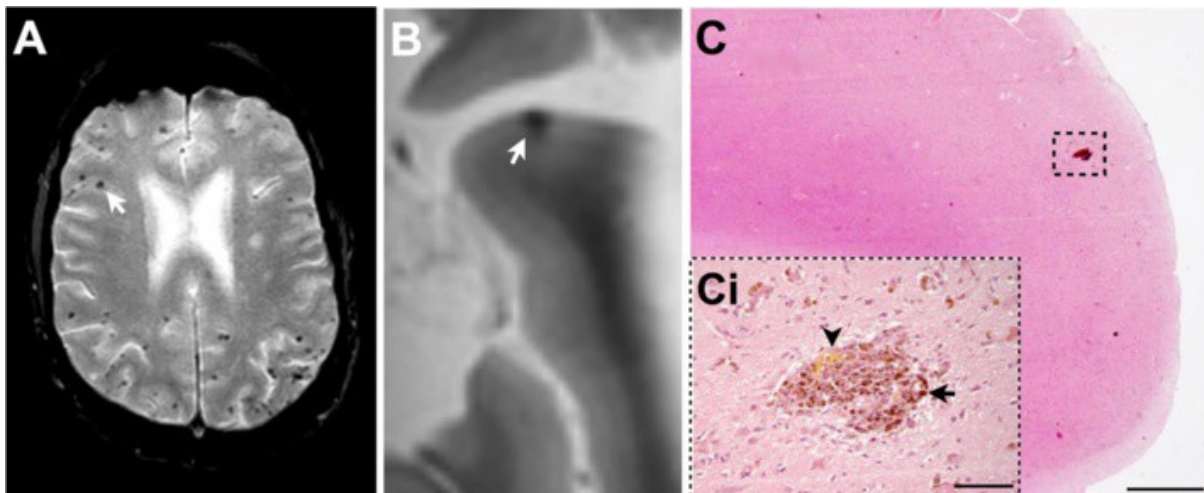


Figure 22 : IRM et coupes histologiques du tissu cérébral présentant des microhémorragies. A. Caractéristique radiologique des microhémorragies, petites lésions ovoïdes hypointenses et bien délimitées. **B.** IRM 7T sur cerveau post-mortem d'une microhémorragie. **C.** Coupe histologique d'une microhémorragie corticale (barre d'échelle : 1000 μ m). **Ci.** Agrandissement de cette lésion, avec mise en évidence des dépôts d'hemosidérine en marron et d'hématoïdine en jaune (barre d'échelle : 100 μ m). *Adapté de McAleese et al., 2016.*

En raison de l'utilisation croissante de techniques d'imagerie utilisant des champs magnétiques élevés, des séquences plus précises, plus adaptées et maintenant tridimensionnelles, les MHC sont de plus en plus détectées au cours des IRM cérébrales. Cependant, en routine, même en utilisant des séquences optimisées sur des IRM 1,5 ou 3T, seulement environ 50% de MHC seraient détectés. De plus, certaines lésions détectées à l'IRM peuvent être en réalité de faux-positifs et correspondent à des petits foyers de

calcifications, de microdissections ou de micro-anévrismes. Ainsi, une fois une potentielle MHC détectée, sa classification exige une connaissance précise des corrélations pathologiques et de ses « imitateurs » potentiels (Greenberg et al., 2009; Haller et al., 2018) (Tableau 4).

| |
|--|
| Lésions noires en T2* (IRM) |
| Lésions rondes et ovoïdes (plutôt que linéaires) |
| « Blooming effect » en T2* (IRM) |
| Pas d'hyperintensité du signal en séquence T1 ou T2 pondérée |
| Au moins la moitié de la lésion entourée de parenchyme cérébral |
| Distinct des autres « imitateurs » potentiels tels que le fer, les dépôts de calcium, les os ou les écoulements des vaisseaux |
| Antécédents cliniques excluant les lésions axonales traumatiques |

Tableau 4 : Critères recommandés pour l'identification des microhémorragies cérébrales. *Adapté de Greenberg et al., 2009.*

Ces lésions peuvent ainsi être retrouvées de manière accidentelle, en dehors de tout contexte de pathologie, mais aussi dans le cadre d'une maladie bien spécifique, telle que la CAA. De plus, la distribution spatiale des MHC rentre dans le diagnostic clinique de la pathologie. L'emplacement superficiel ou lobaire, supratentorial ou infratentorial, est important pour l'interprétation des MHC ainsi que pour leurs implications cliniques. Ainsi, il est maintenant bien admis que les maladies des petits vaisseaux comme la CAA sont plutôt associées à des MHC lobaires, alors que les MHC plus profondes sont plus le signe de pathologies hypertensives (Greenberg et al., 2009; McAleese et al., 2016) (Figure 23).

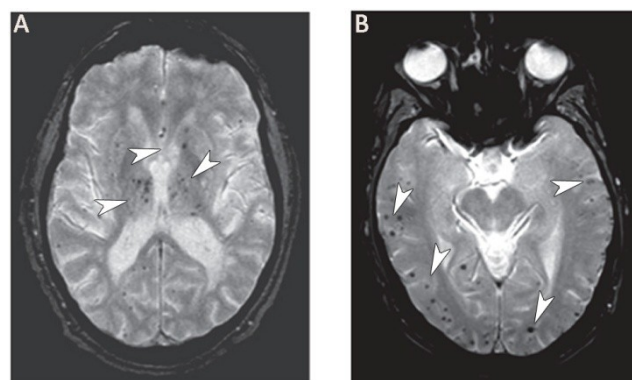


Figure 23 : Distribution spatiale des microhémorragies cérébrales (flèches blanches) et maladies associées. **A.** Microhémorragies profondes caractéristiques d'une maladie hypertensive. **B.** Microhémorragies lobaires répondant aux critères d'une CAA probable. *Adapté de Greenberg et al., 2009.*

2.2. Histologie

D'un point de vue histologique, les MHC sont associées à des dépôts focaux de produits de dégradation du sang riche en fer, responsable de leur détection en IRM. Cependant, l'exacte histopathologie des MHC reste mal comprise, et peu d'études ont associé les caractéristiques histologiques aux images issues de l'IRM. La présence de produits de dégradation du sang implique que les MHC observées à l'IRM soient caractéristiques de processus hémorragiques, mais il est maintenant suggéré que ces lésions soient également le reflet d'une transformation hémorragique survenue à la suite d'un accident ischémique primaire (van Veluw et al., 2016b). Les différents traitements et colorations des coupes de cerveaux en post-mortem permettent de différencier ces typologies mais aussi d'identifier les lésions plus anciennes des plus récentes, même s'il reste difficile d'évaluer la chronologie des événements (van Veluw et al., 2016b, 2017). Ainsi, la présence d'érythrocytes intacts ou partiellement lysés semble être le reflet de MHC récentes. L'absence d'érythrocytes et une détection positive de fer liée à des sidérophages (hemosidérine) sont le reflet de MHC moins récentes. Enfin, la détection d'hématoïdine (issue de la dégradation de l'hème), une perte ou un œdème tissulaire, la présence d'astrocytes et d'une légère gliose laissent plus à penser à des lésions plus anciennes. Ces différentes études permettent de mettre l'accent sur le processus dynamique et hétérogène de la formation des MHC (Figure 24). Ainsi, malgré le fait que les MHC aient une imagerie bien définie et caractéristique, leur histopathologie sous-jacente reste hétérogène, aussi bien en matières de stade de la lésion qu'en matières de nature de lésion.

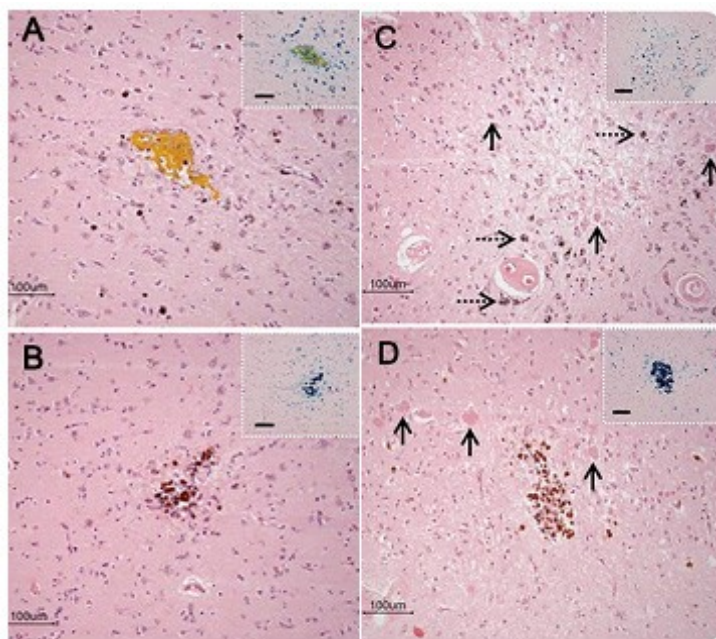


Figure 24 : Exemples de détection histologique de microhémorragies cérébrales. A. Accumulation de sidérophages (contenant de l'hemosidérine, dépôts bruns) et d'hématoïdine (substance jaune). B. Accumulation de sidérophages uniquement (marquage brun) et positivité au fer (encart en haut à droite, marquage bleu). C. Microhémorragie montrant une zone avec une perte tissulaire prononcée, accompagnée par la présence d'astrocytes (flèches noires) et de quelques sidérophages dispersés (points bruns, flèches pointillées). D. Microhémorragies montrant une accumulation focale de sidérophages (points bruns), de quelques astrocytes (flèches noires) et une

microhémorragies montrant une accumulation focale de sidérophages (points bruns), de quelques astrocytes (flèches noires) et une

légère perte de tissu, plus évocatrice d'une ancienne hémorragie. Pour chaque image, la section adjacente montrait également une positivité au fer (encart en haut à droite, marquage bleu). *Adapté de Van Veluw et al., 2016.*

2.3. Prévalence et significations cliniques

Les MHC ont longtemps été considérées comme étant des lésions silencieuses liées au vieillissement général normal et que l'on peut retrouver dans la population générale. En effet, des études de populations incluant des individus en bonne santé montrent une prévalence des MHC variant de 3 à 27%. Cette variabilité s'explique par une démographie hétérogène et des différences méthodologiques dans les acquisitions IRM et les post-traitements (Boyano et al., 2016). Cette prévalence augmente significativement auprès des personnes âgées et peut varier de 24 à 56% selon les études. Malgré leur importance clinique, la pathogénèse et les mécanismes responsables de cette augmentation liée à l'âge ne sont pas encore connus, et il n'existe pas encore de traitements disponibles pour leur prévention (Ungvari et al., 2017). Cependant, plusieurs études ont permis de révéler la présence de MHC au cours de pathologies cérébrales avec des prévalences non négligeables dans certains événements ischémiques et hémorragiques (Cordonnier et al., 2007) (Figure 25).

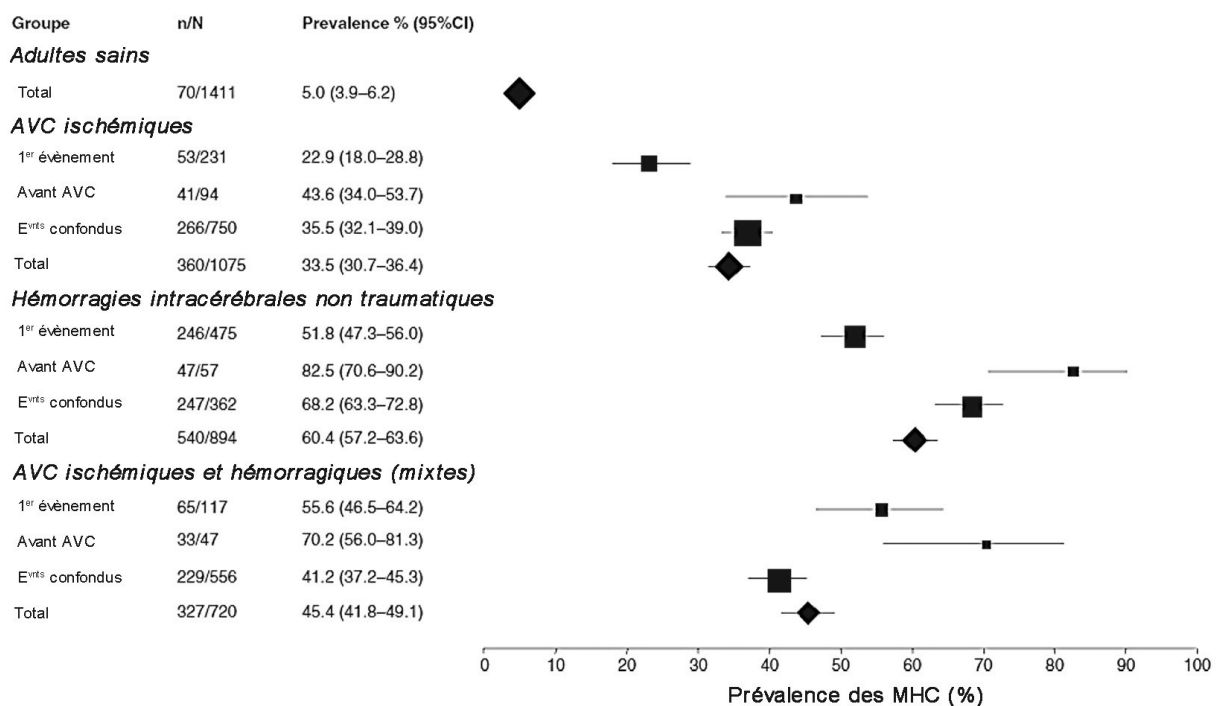


Figure 25 : Prévalence des microhémorragies cérébrales dans différentes catégories de personnes en fonction de leur état général. Les différentes pathologies sont représentées par des carrés ou des losanges dont la taille est proportionnelle à la taille de l'étude. Les barres d'erreurs représentent des intervalles de confiance de 95%. *Adapté de Cordonnier et al., 2007.*

Face à ces constatations, il est maintenant admis que les MHC ont une valeur diagnostique probable, en tant que biomarqueur de la gravité de la maladie cérébrovasculaire sous-jacente. Les MHC peuvent refléter un état neuropathologique vasculaire et ainsi être associées à un risque de développer une hémorragie cérébrale (Gorelick and Farooq, 2016). Dès 2004, Greenberg et ses collaborateurs ont proposé une valeur prédictive de la présence de MHC (de base ou après un premier événement hémorragique) sur la récurrence d'une nouvelle HIC (Figure 26).

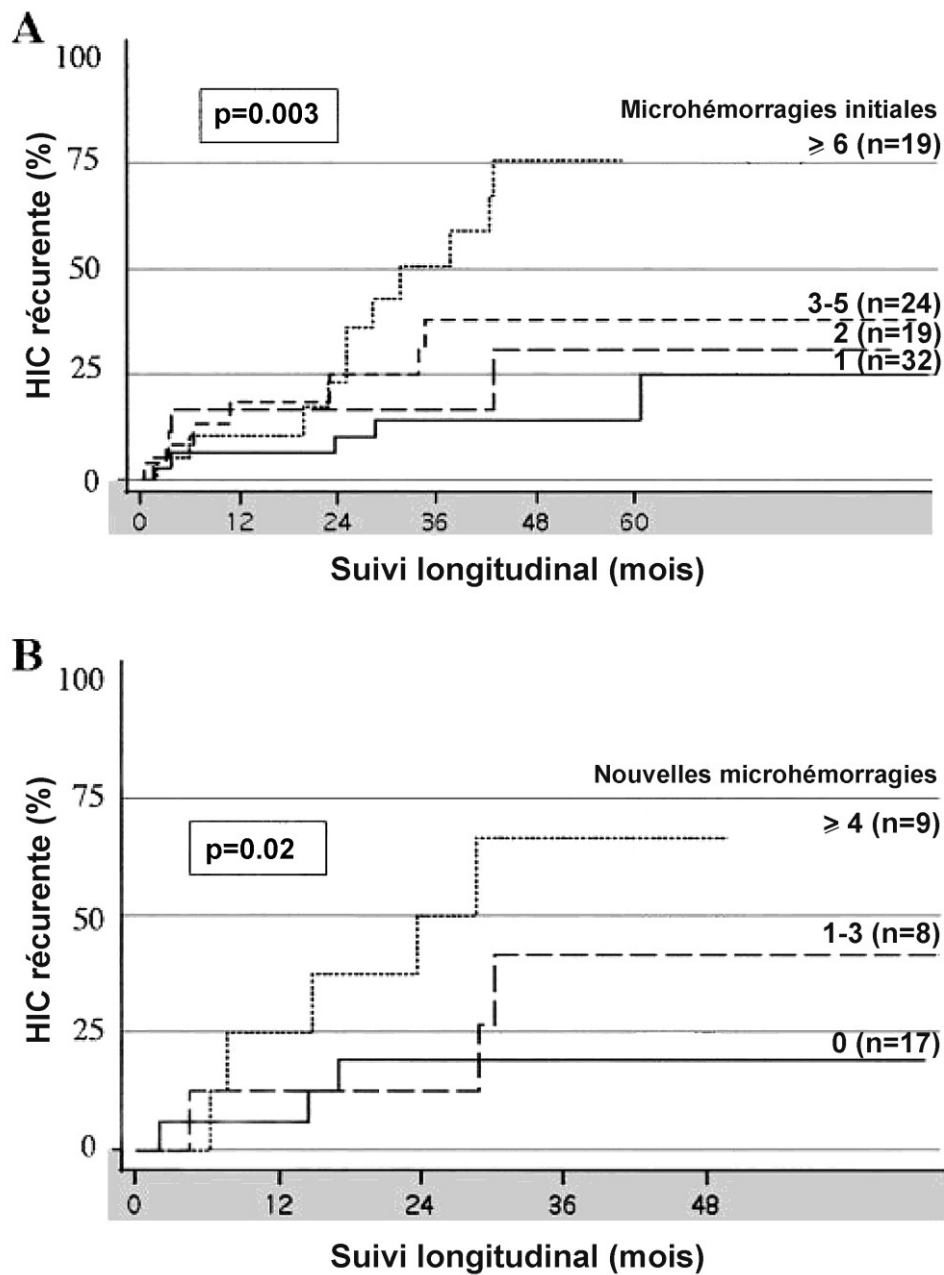


Figure 26 : Estimations Kaplan-Meier sur le taux de récurrence des hémorragies intracérébrales. **A.** Nombre de microhémorragies détectées sur IRM de base. **B.** Nombre de nouvelles microhémorragies. *Adapté de Greenberg et al., 2004.*

De même, les MHC étant fréquemment retrouvées chez les personnes atteintes d'artériopathies hypertensives (MHC profondes) ou de CAA (MHC lobaires), la rupture des petits vaisseaux affectés par ces deux pathologies semble être responsable de la majorité des HIC (>75%) chez les personnes âgées, classées comme HIC spontanées (Charidimou et al., 2012). De même, dans une récente étude clinique incluant des patients après un épisode ischémique ou hémorragique, des patients avec des pertes cognitives, des patients très âgés et des individus sains, il a été démontré que la présence de MHC était associée à un risque accru d'AVC (avec un risque encore plus élevé pour les HIC), de mort et de démence (Charidimou et al., 2018).

Enfin, de récentes études se sont penchées sur les liens possibles entre la présence de MHC et un déficit cognitif, et les conclusions restent complexes et parfois contradictoires. Cependant, la majorité des études retrouve une association entre MHC et déclin cognitif, notamment au niveau de la fonction exécutive, mais aussi de la mémoire visuospatiale (Li et al., 2017; Paradise et al., 2018) (Figure 27).

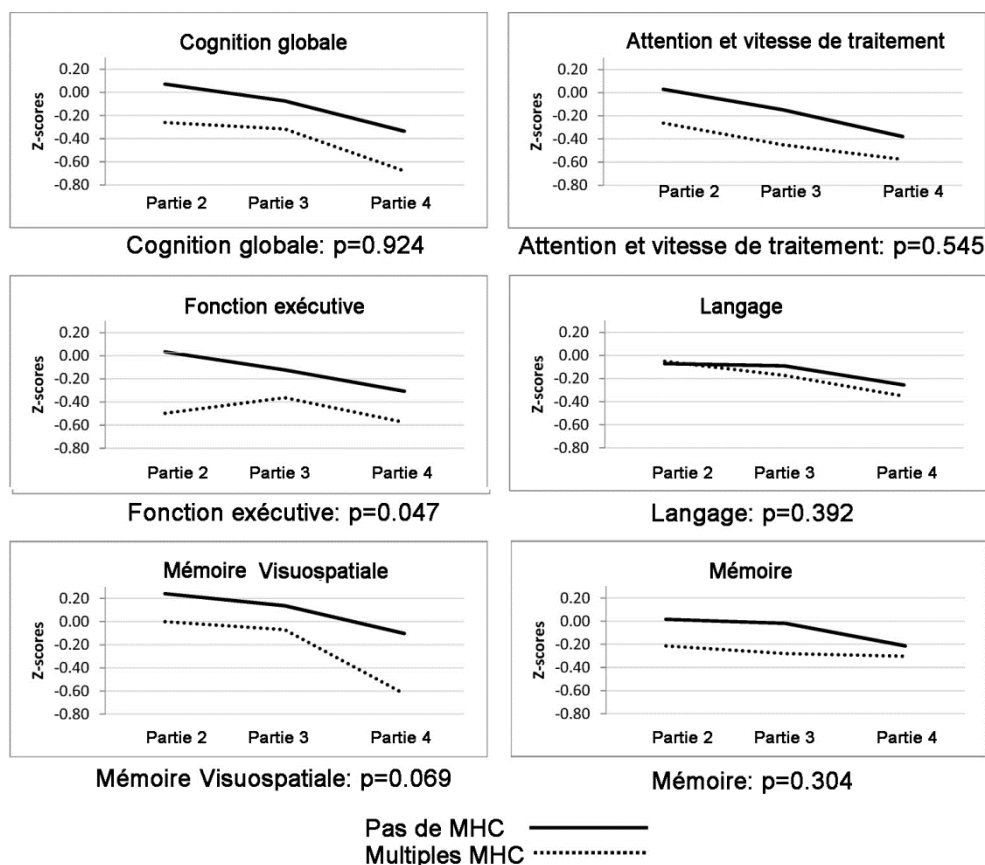


Figure 27: Estimations entre le score moyen (appelé ici z-score) dans le domaine cognitif global ou spécifique et la présence ou le nombre de plusieurs microhémorragies cérébrales dispersées dans l'ensemble du cerveau (divisé en 3 parties, 2-3-4). Les résultats ont été ajustés selon l'âge, le sexe et le niveau d'éducation. Adapté de Paradise et al., 2018.

Cet impact a été observé chez les individus sains, mais aussi chez les patients atteints d'une maladie neurodégénérative. C'est le cas dans le CADASIL où il a été démontré que la présence de MHC était associée à un déclin cognitif global, plus particulièrement au niveau de la fonction exécutive et des processus mnésiques (Liem et al., 2009). De même, chez les patients atteints de la MA, malgré une littérature assez hétérogène et probablement due à des différences techniques en imagerie, il a été démontré une relation entre la présence de multiples MHC et une déficience plus prononcée dans un certain nombre de domaines cognitifs (Goos et al., 2009) (Figure 28). Cette association ne semble pas être expliquée par un stade plus avancé de la maladie, ni par une atrophie hippocampique plus marquée.

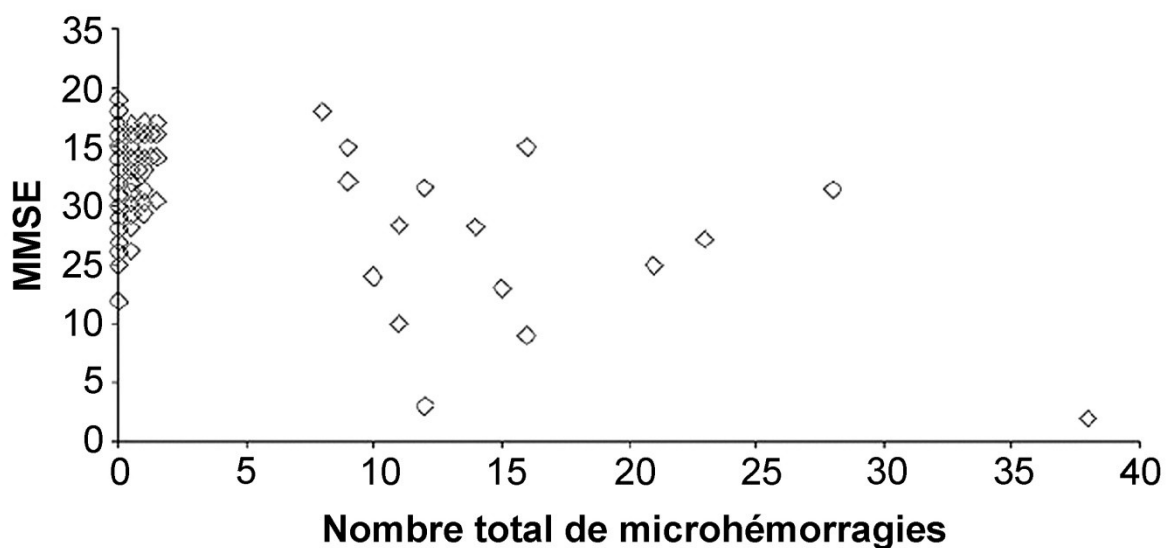


Figure 28 : Nuage de points démontrant l'association entre le nombre total de microhémorragies cérébrales par patient et les scores MMSE (Mini Mental State Examination) chez les patients atteints de la MA. Il existe une corrélation négative entre ces 2 facteurs (Spearman $r = -0.47$; $p < 0.05$). Adapté de Goos et al., 2009.

La localisation des MHC au niveau cérébral semble être également un facteur important pour les conséquences cognitives. En effet, chez les individus atteints de perturbations des fonctions exécutives, il s'avère que les MHC sont le plus souvent localisées dans les lobes frontaux et les ganglions de la base, zones classiquement et neuroanatomiquement impliquées dans ces processus cognitifs. Ces résultats suggèrent que les MHC pourraient avoir un effet négatif sur la cognition indépendamment d'autres lésions vasculaires co-occurentes, et qu'il pourrait y avoir une corrélation anatomique entre la distribution des MHC et les domaines

cognitifs affectés, suggérant un impact direct des MHC sur le tissu en tant que mécanisme pathogène (Martinez-Ramirez et al., 2014).

2.4. Possibles mécanismes d'apparition des MHC

De part la nature même des MHC, étudier les mécanismes physiopathologiques de ces lésions relève du challenge scientifique. Jusqu'à récemment, l'histopathologie des MHC était rarement étudiée chez l'Homme en raison de l'accès limité à des cerveaux post-mortem. De même, l'interprétation des données pathologiques pouvait être décevante en raison des biais dus aux traitements *ex-vivo* des échantillons. En dépit de ces limitations, des études récentes ont soulevé des questions intéressantes sur les potentiels mécanismes biologiques associés à l'apparition des MHC. Dans certaines études, les MHC révélées par IRM ont été comparées à des analyses histologiques post-mortem (De Reuck et al., 2012; van Veluw et al., 2016b). Les auteurs ont ainsi observé des réponses histologiques différentes, telles que des épanchements focaux d'érythrocytes intacts, des transformations hémorragiques de micro-infarctus ou des morphologies vasculaires anormales. Ces différentes histologies ne permettent pas de retracer l'ordre des événements et pointent sur la nécessité de mieux comprendre l'histoire naturelle des MHC (van Veluw et al., 2016a). A cet égard, il est nécessaire de mieux comprendre les aspects de biologie vasculaire comme par exemple de savoir si la taille de la MHC reflète le type et le diamètre du segment vasculaire endommagé. Cela permettrait de démêler les mécanismes physiopathologiques spécifiques aux différentes étiologies (Charidimou et al., 2012). Nous pouvons prendre l'exemple des artérioles pré-capillaires qui, faisant suite aux artères intra-parenchymateuses et précédant le lit capillaire, font face à de grandes contraintes de cisaillement (« shear-stress ») car elles diminuent le flux sanguin à la moitié de la pression artérielle (De Silva and Faraci, 2016) (Figure 29).

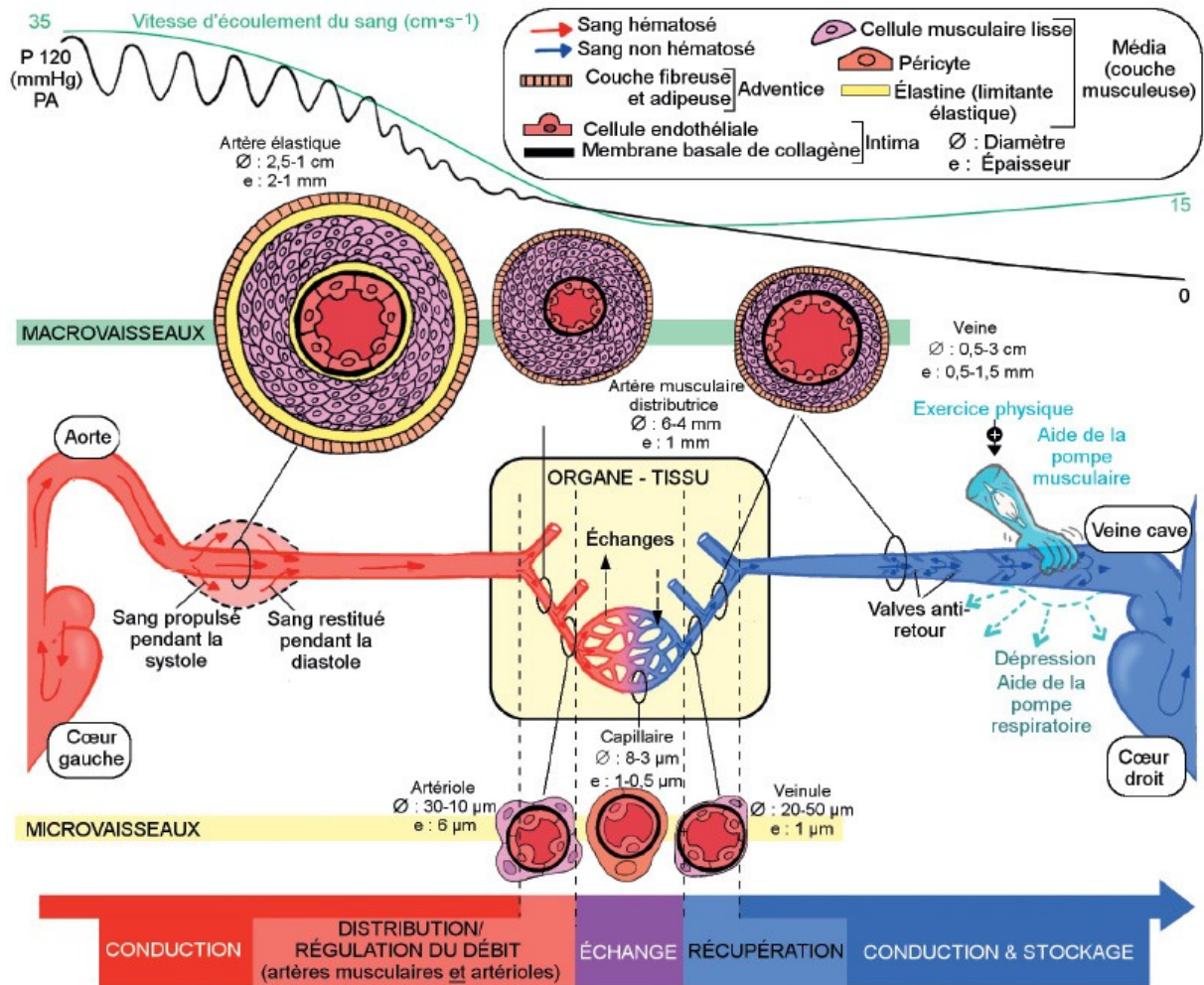


Figure 29 : Structure et fonction de l'arbre vasculaire. D'après Canu MH « Physiologie humaine », Edition Dunod, 2016.

Une rupture de ces artérioles peut ainsi conduire à de petits saignements qui peuvent avoir des conséquences non négligeables, notamment chez les personnes âgées et hypertendues dont les fonctions autorégulatrices sont altérées (Toth et al., 2017). De même, les capillaires ayant un diamètre plus petit, une paroi plus mince et un nombre de ramifications plus élevé, leur rupture pourrait se réaliser en de multiples points, et entraîner de multiples saignements microscopiques à cause de perturbations locales dans l'homéostasie des tissus cérébraux (Mishra et al., 2014).

Un des problèmes rencontrés dans les études sur la physiopathologie des MHC réside dans la présence de paramètres capables d'expliquer ou d'influencer la rupture vasculaire. Ces paramètres incluent les risques vasculaires (âge, hypertension...) et les maladies cérébrales sous-jacentes (ischémie cérébrale, démence, angiopathie amyloïde...). Si l'on prend l'exemple de la CAA, des travaux expérimentaux se sont penchés sur les liens entre les dépôts

de peptide amyloïde autour des vaisseaux cérébraux et leurs conséquences sur l'unité neurovasculaire. Ces dépôts seraient ainsi responsables d'une nécrose fibrinoïde et d'une désorganisation cellulaire menant à la rupture de la paroi des vaisseaux cérébraux (Thal et al., 2008). Cependant, cette hypothèse a été récemment mise à mal par l'observation de MHC au niveau de cerveaux humains sans présence de dépôts amyloïdes autour des vaisseaux incriminés (van Veluw et al., 2017). D'autres études ont tenté de dérouler les mécanismes potentiels impliqués dans la survenue de MHC. Parmi eux, plusieurs hypothèses ont été mises en avant : d'une part l'implication du stress oxydant (via la NADPH oxydase) avec la production de radicaux libres ou l'activation de métalloprotéinases (MMP-9) (Han et al., 2015; Zhao et al., 2015), d'autre part la mise en place d'une inflammation aiguë ou chronique initiée par l'activation de la microglie (Ahn et al., 2018; Rosidi et al., 2011). Ces mécanismes ont bien été décrits dans les accidents vasculaires cérébraux mais leur contribution à l'apparition des MHC reste encore à démontrer.

La lente induction d'une fragilité cérébrale semble être une caractéristique essentielle du processus de saignement. Selon le segment vasculaire affecté, les MHC induites peuvent être variables en taille et en nombre, avec des conséquences différentes au sein du parenchyme cérébral. L'ensemble des mécanismes potentiellement impliqués dans la survenue de ces MHC est résumé dans la figure 30.

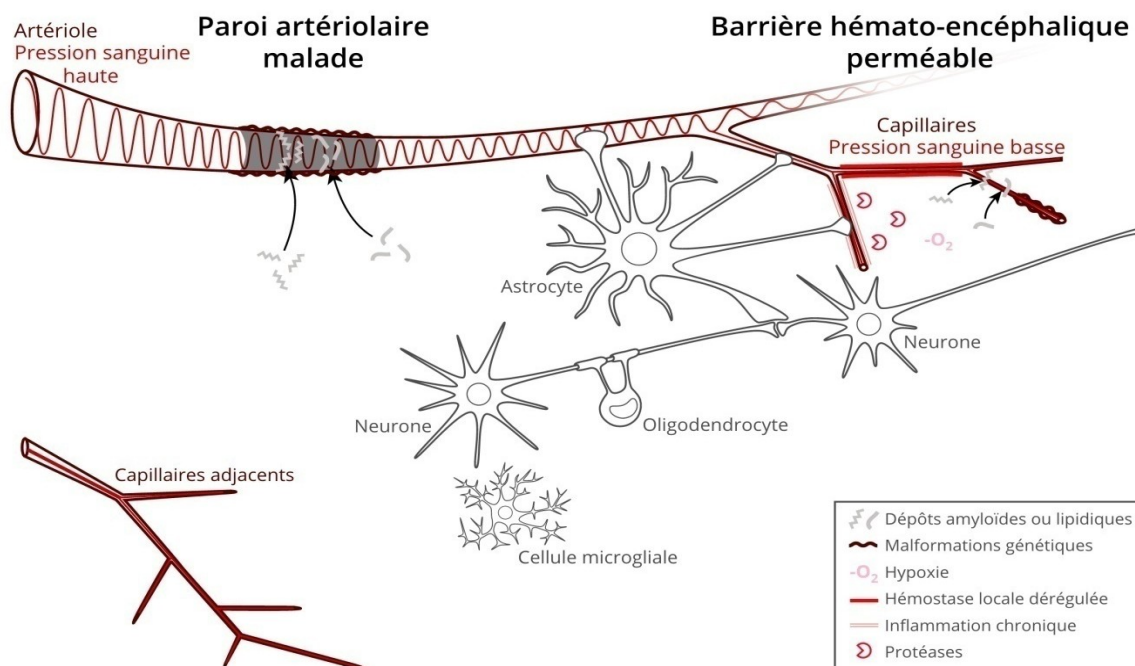


Figure 30 : Résumé des causes potentielles de la survenue des microhémorragies cérébrales. Issue de Pétrault et al., 2019.

2.5. Possibles conséquences des MHC

Contrairement aux HIC, le sang issu d'un micro-saignement a tendance à coaguler rapidement et à ne pas s'étendre dans le parenchyme cérébral. Le tissu cérébral environnant constitue un environnement pro-thrombotique, avec des taux élevés de Facteur Tissulaire, accompagnés d'une faible expression vasculaire des inhibiteurs de la coagulation comme la thrombomoduline, le récepteur endothélial de la protéine C, l'antithrombine III et l'héparane sulfate (Fisher, 2013). De même, cet environnement pro-thrombotique serait renforcé par la régulation négative de la fibrinolyse au niveau capillaire par une expression réduite du tPA (tissue Plasminogen Activator) en faveur de son inhibiteur PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1) (Yang et al., 2011). Pourtant, l'étude de cette régulation hémostatique particulière au niveau des microvaisseaux cérébraux dans la survenue de microlésions reste encore inexplorée.

Bien que les MHC aient longtemps été observées comme des lésions silencieuses, elles sont maintenant considérées comme ayant une influence potentielle sur les résultats fonctionnels à long terme, y compris au niveau de la cognition (Akoudad et al., 2016; Viswanathan et al., 2006). En effet, les MHC pourraient déclencher des cascades biologiques toxiques ayant des conséquences à long terme sur le parenchyme cérébral, mais à ce jour les approches histologiques conventionnelles semblent incapables de déterminer ni l'histoire naturelle ni la toxicité cérébrale de ces microlésions. Cependant, la littérature consacrée aux HIC a fourni les hypothèses de recherches autour des MHC. Elles reposeraient sur 2 types de dommages : les dommages « primaires » qui incluent les conséquences mécaniques de l'entrée de sang dans le parenchyme cérébral et qui finissent par détruire le tissu environnant, et les dommages secondaires induits par les produits de dégradation des érythrocytes (Mracsko and Veltkamp, 2014).

Une seule étude a pour l'instant suggéré que les effets mécaniques d'une HIC ne se produisent pas lors d'une MHC. La rupture *in vivo* d'une artériole cérébrale, induite par des impulsions laser répétées, n'a pas écrasé les dendrites neuronales voisines ni les capillaires adjacents (Rosidi et al., 2011). La même étude a démontré que la rupture d'un capillaire cérébral provoquait un épanchement plasmatique rapide et étalé au niveau du parenchyme cérébral, bien au-delà des limites du sang coagulé. On peut donc ainsi supposer que les composants plasmatiques pourraient exercer une neurotoxicité non négligeable, notamment quand le poids microhémorragique est important.

D'autres dommages secondaires potentiels sont reconnus comme la lyse des érythrocytes et de l'hémoglobine qui sont responsables de la production d'espèces réactives de l'oxygène, ou ROS, *via* la réaction de Fenton (Dixon and Stockwell, 2014). Le stress oxydant qui en résulte, consiste en un ensemble de perturbations structurelles et fonctionnelles des lipides et des protéines cellulaires, pouvant conduire à une mort neuronale immédiate ou retardée. De même, la bilirubine est un produit de dégradation de l'hème pouvant avoir une action neurotoxique mais son mécanisme d'action reste encore mal compris (Brites, 2012). Parmi les protéines plasmatiques, la thrombine peut exercer une toxicité sur les neurones et les astrocytes *via* l'activation du récepteur PAR-1 (Protease Activated Receptor-1) dont la surexpression est associée à une neurotoxicité et à une activation microgliale (Radulovic et al., 2016). La thrombine peut également avoir des effets délétères *via* le système du complément et *via* l'activation d'enzymes protéolytiques qui dégradent l'interstitium et la matrice extracellulaire (Babu et al., 2012; Ridder et al., 2016). Quant au fibrinogène (et sa version polymérisée la fibrine), il peut pénétrer dans le parenchyme cérébral et limiter la réparation des tissus (Baeten and Akassoglou, 2011). Toutes ces molécules dérivées du sang conserveraient un statut neuro-inflammatoire pouvant contribuer à la mort des cellules cérébrales (Figure 31).

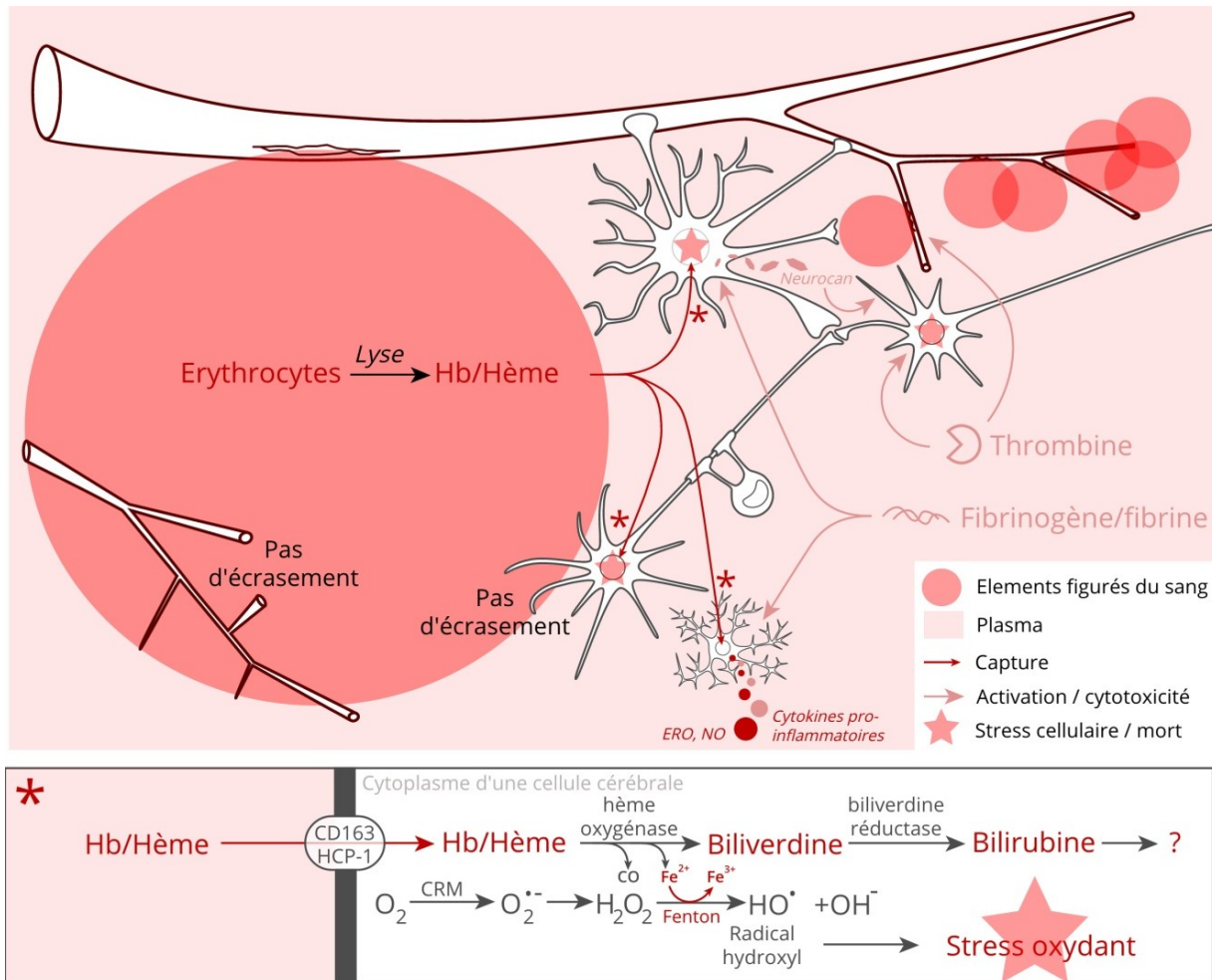


Figure 31 : Résumé des conséquences potentielles de la survenue des microhémorragies cérébrales. Hb : Hémoglobine. HCP-1 : Heme Carrier Protein-1. CD163 : Cluster of Differentiation 163. O₂ : Dioxygène. H₂O₂ : Peroxyde d'Hydrogène. OH[•] : Radical Hydroxyle. ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène. NO : Monoxyde d'azote. CRM : Chaîne Respiratoire Mitochondriale. *Issue de Pétrault et al., 2019.*

2.6. Modèles expérimentaux de MHC

Les scientifiques ont été confrontés à 3 questions majeures dans le développement de modèles expérimentaux de MHC :

- comment rompre un ou plusieurs microvaisseaux sans toucher des macrovaisseaux adjacents ?
- comment induire des lésions non-symptomatiques par des méthodes les moins invasives possibles ?
- comment induire une ou plusieurs MHC dans des zones cérébrales bien précises ?

2.6.1. Microhémorragies induites directement

A ce jour, les modèles animaux de microlésions disponibles sont issus des modèles d'HIC. Ces lésions sont la plupart du temps induites par une injection stéréotaxique ciblant une zone cérébrale particulière. Il est ainsi possible d'injecter de la collagénase, enzyme qui provoque un saignement par la digestion enzymatique de la membrane basale des vaisseaux sanguins (Lauer et al., 2011). Des modèles injectant du sang autologue (Okauchi et al., 2009; Rynkowski et al., 2008), des érythrocytes lysés ou des produits de la lyse des érythrocytes tels que l'hémoglobine ou la bilirubine sont également utilisés (Gao et al., 2014). Du chlorure de fer peut aussi être injecté pour reproduire les conséquences de l'entrée de sang dans le cerveau (Huang et al., 2002). Les principaux avantages de ces modèles résident dans le fait qu'il est possible de cibler les régions d'intérêt et d'évaluer l'impact de la lésion sur la structure et la fonction de la zone cérébrale étudiée, ainsi que son extension au tissu cérébral environnant. Cependant, ces méthodes restent invasives et les lésions obtenues ressemblent plus à des macrohémorragies qu'à des MHC. Dans une étude récente, l'injection d'une faible concentration de collagénase a permis l'induction d'une hémorragie de taille réduite comparée à un hématome symptomatique, lésion correspondant à la totalité du poids microhémorragique cérébral estimé chez l'Homme (Bergeron et al., 2018). Rosidi et ses collègues ont par ailleurs montré l'absence d'effet immédiat de la rupture d'un microvaisseau cérébral en utilisant une technique optique de précision chez la souris. Une MHC authentique, de l'ordre de 100µm de diamètre, a été induite par des impulsions laser concentrées sur le bord extérieur de la lumière d'une artériole unique pénétrante (Rosidi et al., 2011). Néanmoins, cette procédure reste techniquement difficile, nécessite du matériel spécifique et

l'induction d'une seule MHC exclut la recherche des effets de plusieurs lésions définissant le poids microhémorragique cérébral (Stemer et al., 2010).

Enfin, en plus du fait que la plupart de ces modèles n'induisent pas de véritables MHC, les études n'ont pas évalué les effets fonctionnels de ces lésions à long terme.

2.6.2. Microhémorragies induites par une pathologie

La présence de MHC est observée dans le cerveau de rongeurs dans différents modèles pathologiques (inflammatoires ou neurodégénératifs). Le lien entre l'inflammation systémique et la pathogénèse des MHC a récemment été mis en avant (Miwa et al., 2011). Plusieurs MHC ont été retrouvées de manière disséminée (cervelet, cortex, striatum) dans le cerveau de souris après l'injection du lipopolysaccharide pro-inflammatoire (Liu et al., 2014; Sumbria et al., 2016). D'autres modèles de MHC ont également été mis au point chez des animaux hypertendus tels que les rats SHRSP (Spontaneously Hypertensive Rat-Stroke-Prone) ou des souris R^+/A^+ (exprimant les gènes Rénine et Angiotensine) auxquels sont souvent associés un régime riche en sel et/ou des traitements au L-NAME (inhibiteur de le NOS endothéliale et neuronale) (Iida et al., 2005; Schreiber et al., 2012). Enfin, il existe d'autres modèles de MHC se reposant sur l'induction d'une hyperhomocystéinémie, facteur de risque reconnu pour les AVC et la MA. Pour cela, les animaux sont soumis à une alimentation déficiente en folate, vitamines B6 et B12 et enrichie en méthionine, et développent spontanément des MHC dans les 4 à 6 mois qui suivent (Sudduth et al., 2013).

Dans un contexte neurodégénératif, des MHC ont été observées dans des modèles murins transgéniques de MA, comme la souris Tg2576 qui surexprime le gène humain codant pour la protéine précurseur du peptide amyloïde. Les MHC obtenues sont de tailles variées (de 5 à 240 μ m de diamètre) et toujours situées à proximité des formes fibrillaires de dépôts amyloïdes dans les régions du cortex et de l'hippocampe (Lo et al., 2016). Fait intéressant, les auteurs ont réussi à distinguer les MHC provenant des capillaires de ceux provenant des artérioles et des veinules. Cette découverte ouvre des perspectives sur les causes des altérations microvasculaires dans le cadre de maladies cérébrales sous-jacentes ou de risques vasculaires telle que l'hypertension (Toth et al., 2015). D'autres modèles de souris génétiques sont aussi développés, comme les modèles de souris APP23, APP/PS1, tgSwDI, qui vont développer spontanément des MHC à des temps et à des localisations variables en fonction des caractéristiques spécifiques à chacun.

Un résumé des modèles existant ainsi que des images de lésions obtenues sont présentés dans le tableau 5 et la figure 32 ci-dessous.

| Modèle | Type | Localisation cérébrale | Taille de la lésion | Nombre de lésions | Age de l'animal |
|---|----------|---|-----------------------|------------------------|--|
| Induction au laser | Induit | Cortex | ≈ 100µm de diamètre | 1 MHC par rupture | Tout âge |
| APP 23 | Spontané | Cortex, thalamus | ≈50-300µm de diamètre | ≈15-30 MHC par cerveau | 20-28 mois |
| BCAS (TgSwDI) | Spontané | Thalamus | Non précisée | Très peu de MHC | 6 mois |
| BCAS (C57Bl/6) | Spontané | Thalamus | ≈ 150µm de diamètre | Multiplés MHC | 4-8 mois |
| eNOS^{+/-} | Spontané | Cortex | ≈25µm de diamètre | Multiplés MHC | 18 mois |
| Notch 3 (R170C) | Spontané | Cortex | ≈25µm de diamètre | Non précisé | 20-22 mois |
| SHRSP | Spontané | Cortex, hippocampe, ganglion basal, corps calleux | ≈50-150µm de diamètre | Multiplés MHC | 8-12 mois |
| R⁺/A⁺ (Combiné avec L-NAME et nourriture très salée) | Spontané | Tronc cérébral, cervelet, ganglion basal | ≈50-150µm de diamètre | Multiplés MHC | Début vers 11 mois + 6 mois de traitement |
| Tg2576 (Combiné avec AngII et L-NAME) | Spontané | Cortex et hippocampe | <100µm de diamètre | Multiplés MHC | Début vers 15 mois + 1 semaine de traitement |
| HHcy (C57Bl/6) | Spontané | Cortex et hippocampe | ≈100µm de diamètre | 2-3 MHC/coupe | Début vers 7 mois + 4 mois de traitement |
| HHcy (APP/PS1) | Spontané | Cortex et hippocampe | ≈100µm de diamètre | ≈4 MHC/coupe | Début vers 12 mois + 6 mois de traitement |

Tableau 5 : Résumé des modèles animaux de microhémorragies cérébrales. MHC : Microhémorragie cérébrale ; BCAS : Sténose Bilatérale de l'Artère Carotide ; SHRSP : Spontaneously Hypertensive Rat Stroke-Prone ; R⁺/A⁺ : Expression des gènes Rénine-Angiotensine ; AngII : Angiotensine II ; HHcy : Hyperhomocysteinémie. APP : Amyloid Precursor Protein. PS1 : Présélinine 1. eNOS : Nitrique Oxyde Synthase endotheliale. L-NAME N(ω)-nitro-L-arginine methyl ester. *Adapté de Shih et al., 2018.*

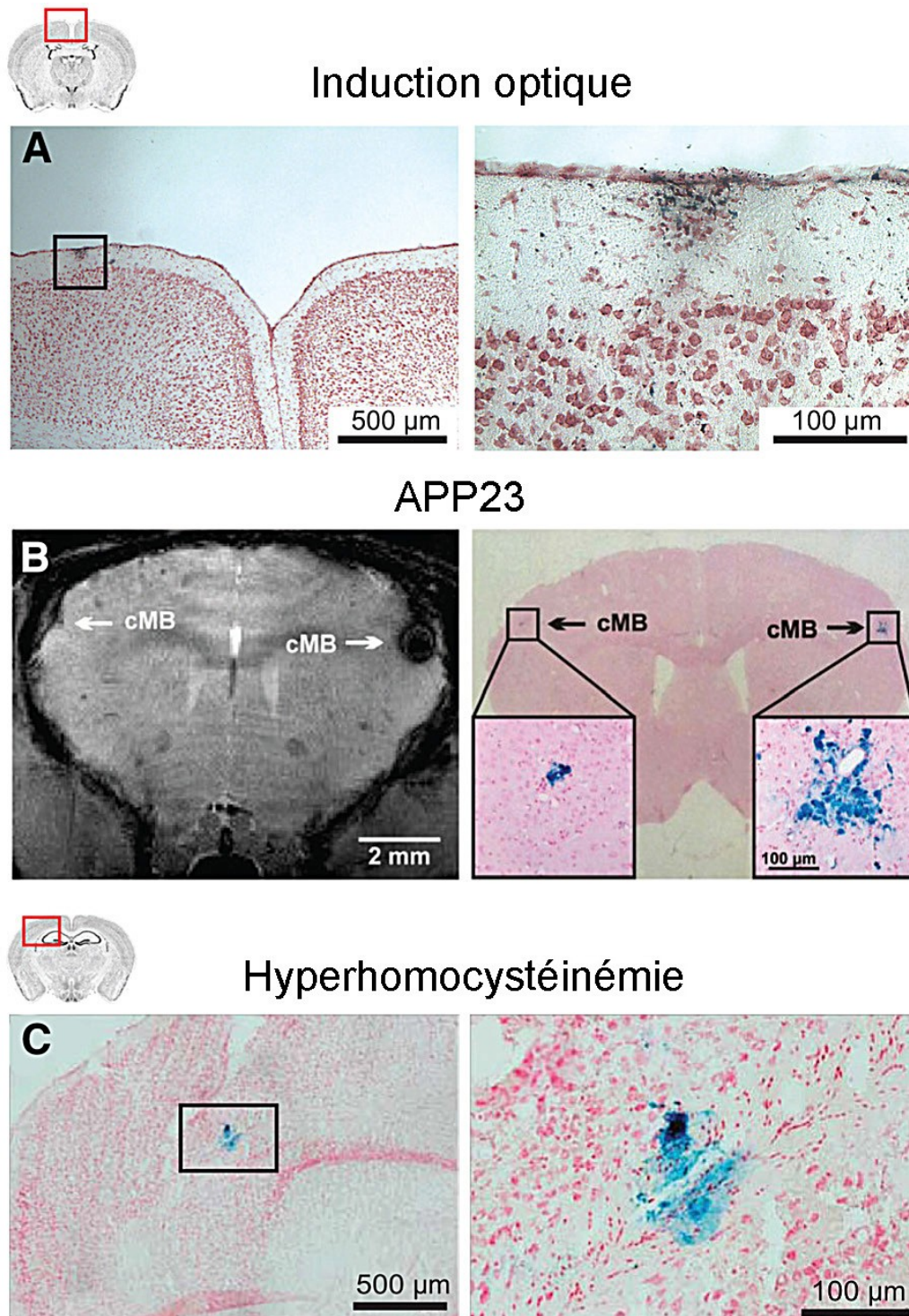


Figure 32 : Microhémorragies obtenues dans des modèles animaux. A. Microhémorragie corticale observée sur des coupes de cerveaux colorées au bleu de Prusse après rupture optiquement induite d'une artériole corticale pénétrante. B. Microhémorragies (cMB) détectées par pondération T2* en IRM (à gauche) et microhémorragies correspondantes détectées au bleu de Prusse (à droite) chez une souris APP23. C. Microhémorragie détectée au bleu de Prusse chez une souris soumise à un régime alimentaire induisant une hyperhomocystéinémie. *Adapté de Shih et al., 2018*

2.7. Microhémorragies cérébrales et anticoagulants oraux

2.7.1. Classes d'anticoagulants oraux

Il existe 2 classes d'anticoagulants oraux : les antivitamines K (AVK) et les anticoagulants oraux directs (AOD). Ils ont une action directe ou indirecte au niveau de la cascade de coagulation (Figure 33).

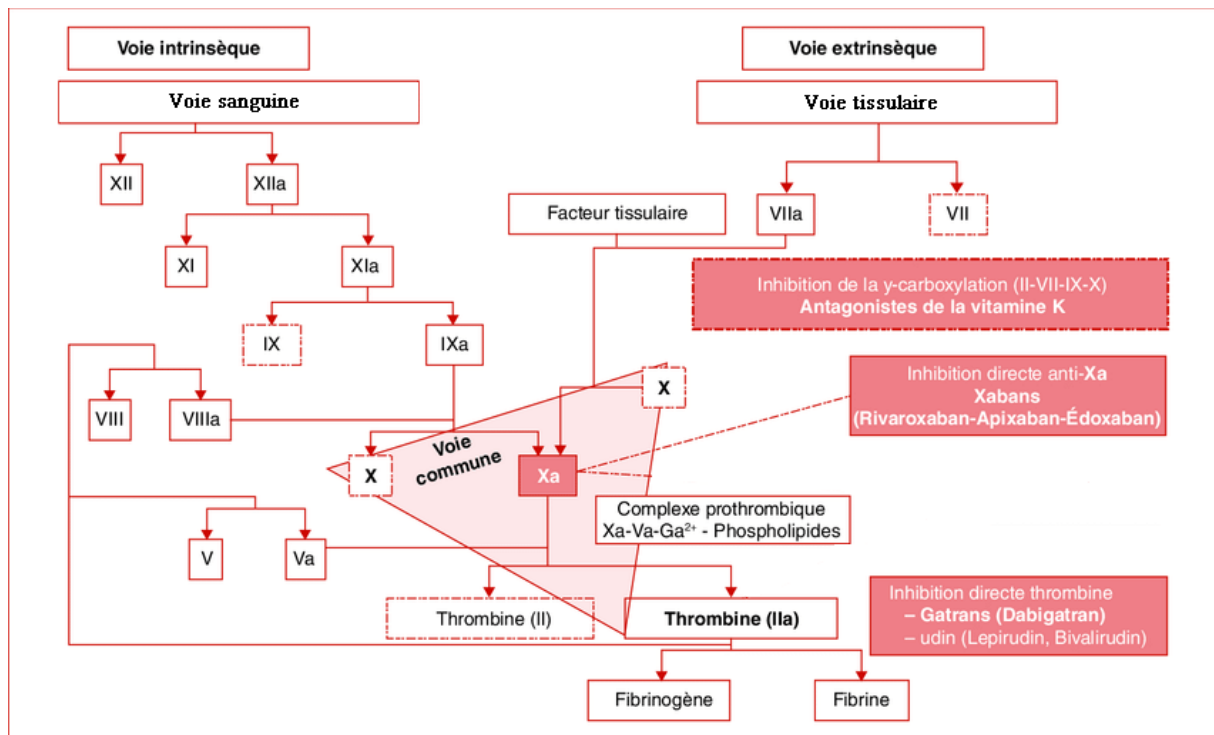


Figure 33 : Modes d'action des différents anticoagulants oraux au niveau de la cascade de coagulation.
 D'après Salem et al., 2015.

Les AVK sont indiqués dans la prévention des accidents thrombo-emboliques, notamment en cas de fibrillation auriculaire valvulaire ou non-valvulaire. On distingue 2 classes d'AVK : les dérivés coumariniques, l'acénocoumarol et la warfarine, et les dérivés de l'indanedione avec la fluindione. De manière singulière, la prescription de fluindione est très majoritaire en France (près de 70% des patients sous AVK). La warfarine est globalement l'AVK le plus prescrit dans le monde.

Les AOD sont actuellement prescrits dans la prévention des accidents thrombo-emboliques en cas de fibrillation auriculaire non-valvulaire, lorsque celle-ci est associée à au moins un des facteurs de risque thrombo-emboliques (antécédents d'AVC, d'accident ischémique transitoire ou d'embolie systémique ; fraction d'éjection ventriculaire gauche <40% ;

insuffisance cardiaque symptomatique de classe \geq II ; âge \geq 65 ans ; diabète, coronopathie ou hypertension artérielle). On distingue 2 mécanismes d'action différents : les inhibiteurs directs du facteur Xa (apixaban, rivaroxaban) et les inhibiteurs directs de la thrombine (facteur IIa, dabigatran). Tous ont été comparés à la warfarine et ont obtenu un avis favorable au remboursement.

Les principales caractéristiques de ces anticoagulants oraux sont résumées dans le tableau 6.

| AVK | AOD |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> ● 2 classes : -Dérivés coumariniques : acénocoumarone, warfarine - Dérivés de l'indanedione : fluindione | <ul style="list-style-type: none"> ● 2 classes : - Inhibiteurs directs du facteur Xa : rivaroxaban, apixaban - Inhibiteur direct de la thrombine (IIa) : dabigatran |
| <ul style="list-style-type: none"> ● Efficacité démontrée et usage ancien | <ul style="list-style-type: none"> ● Efficacité démontrée et usage plus récent que les AVK |
| <ul style="list-style-type: none"> ● Nombreuses interactions médicamenteuses et alimentaires | <ul style="list-style-type: none"> ● Interactions médicamenteuses moins nombreuses qu'avec les AVK |
| <ul style="list-style-type: none"> ● Mesure du degré d'anticoagulation par le dosage de l'INR (<i>International Normalized Ratio</i>) | <ul style="list-style-type: none"> ● Aucun moyen de mesurer le degré d'anticoagulation. Les tests d'hémostases courants ne reflètent pas le niveau d'anticoagulation. |
| <ul style="list-style-type: none"> ● Ajustement de la dose basée sur l'INR cible | <ul style="list-style-type: none"> ● Dose fixe |
| <ul style="list-style-type: none"> ● Agent d'antagonisation de l'effet anticoagulant : vitamine K et concentrés de complexes prothrombotiques (CCP) | <ul style="list-style-type: none"> ● Agent de neutralisation de l'effet anticoagulant : - idarucizumab spécifique du dabigatran - aucun pour les inhibiteurs directs du facteur Xa* |

Tableau 6 : Principales caractéristiques des anticoagulants oraux.*L'antidote anti-Xa Andexanet est en cours d'autorisation de mise sur le marché. *Adapté de la Haute Autorité de Santé, 2018.*

2.7.2. Microhémorragies, anticoagulants et risque d'hémorragie intracérébrale

Au cours de la dernière décennie, l'utilisation croissante d'anticoagulants oraux pour prévenir les accidents cardio-emboliques d'origine cardiaque chez les personnes âgées a été associée à une multiplication par 5 de l'incidence des HIC (Charidimou et al., 2012). Cette situation est souvent retrouvée dans le cadre de la fibrillation auriculaire (FA), trouble du rythme cardiaque le plus courant. Sa prévalence et son incidence augmentent en raison du vieillissement de la population. Si elle est non traitée, la FA augmente de 5 fois le risque d'AVC ischémique, ce qui en fait la principale complication de la FA (Lip et al., 2012). La prévention de l'AVC est donc l'objectif thérapeutique majeur de la FA, pour laquelle l'anticoagulation orale réduit le risque de plus de 65%. Ce bénéfice doit être balancé avec le risque accru de l'HIC, qui représente la complication la plus redoutée du traitement anticoagulant, puisqu'elle peut induire la mort ou une invalidité grave pour presque 75% des patients atteints (Fang et al., 2007).

Les risques liés aux facteurs individuels du patient sont également à prendre en compte dans la survenue d'une HIC associée à un anticoagulant oral. Dans ce contexte, il est possible d'envisager que le risque de faire une HIC est augmenté par les troubles des petits vaisseaux cérébraux liés à l'âge. L'utilisation d'anticoagulants *en soi* ne devrait pas provoquer d'HIC si les vaisseaux cérébraux sont intacts, mais la présence d'une microangiopathie qui fragilise les petits vaisseaux constitue un facteur causal ou aggravant plausible pour une telle hémorragie (Charidimou et al., 2012). Les mécanismes d'une HIC associée à un traitement anticoagulant sont complexes et impliquent une interaction dynamique entre les maladies sous-jacentes sujettes aux hémorragies (comme la CAA), les facteurs génétiques et les facteurs de risque cardiovasculaires (Figure 34).

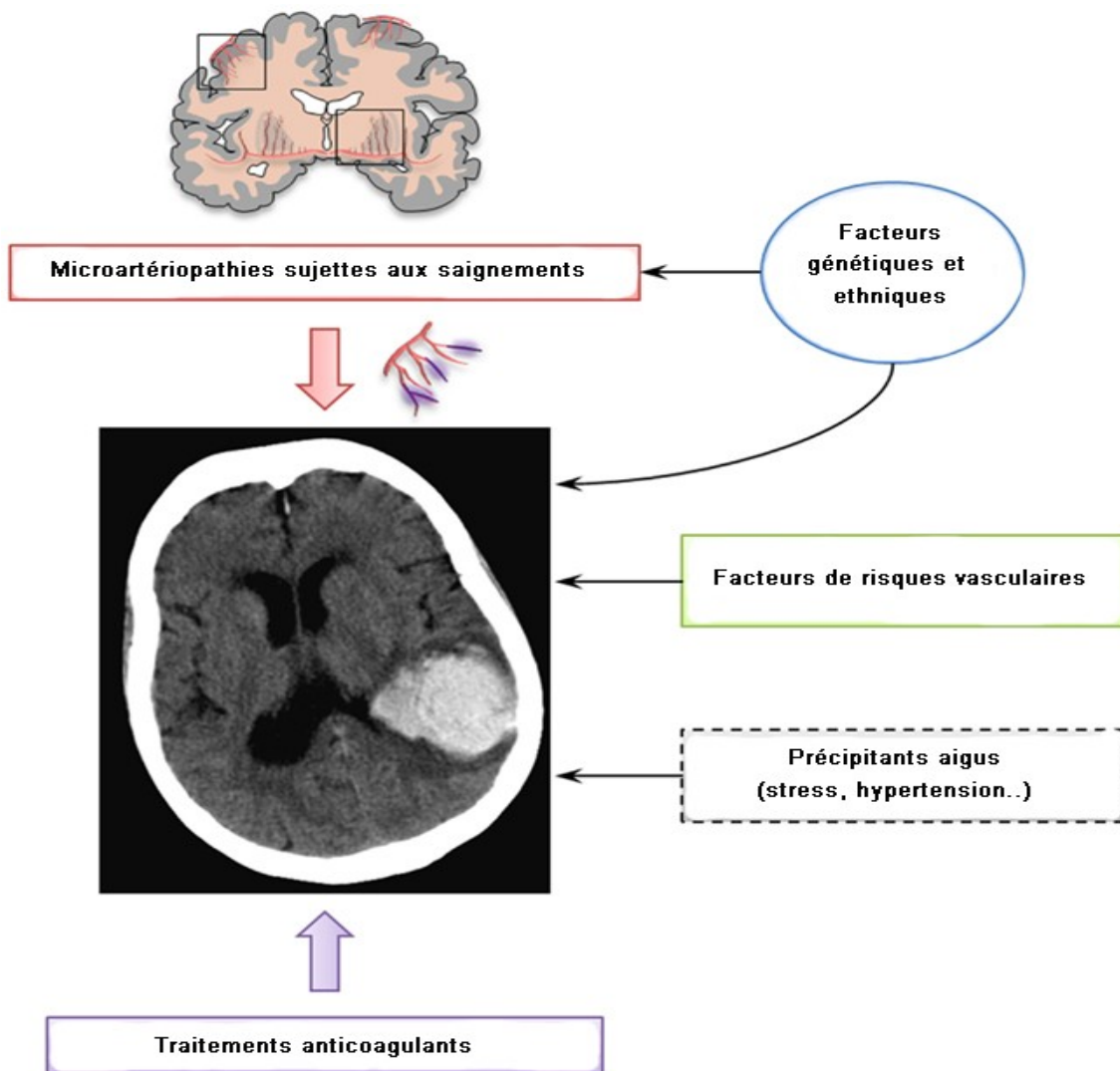


Figure 34 : Pathogénèse de l'hémorragie intracérébrale spontanée et associée à un traitement anticoagulant. Cette interaction dynamique est modifiée à divers niveaux par des facteurs génétiques et ethniques et des facteurs de risques vasculaires. Des facteurs déclencheurs aigus, par exemple une augmentation soudaine de la pression artérielle ou un traumatisme mineur, peuvent provoquer la rupture de ces vaisseaux anormalement fragiles. *Adapté de Charidimou et al, 2012.*

Si l'on regarde les études évaluant les différences entre AOD et AVK dans la survenue d'une HIC chez les patients, il en ressort que malgré des hétérogénéités dans les analyses et les résultats, les 2 classes d'anticoagulants donnent des résultats similaires, que ce soit en matière de mortalité à court et à long terme (Figure 35), de récupération fonctionnelle, de volume d'hémorragie et d'expansion de l'hématome induit (Wilson et al., 2017).

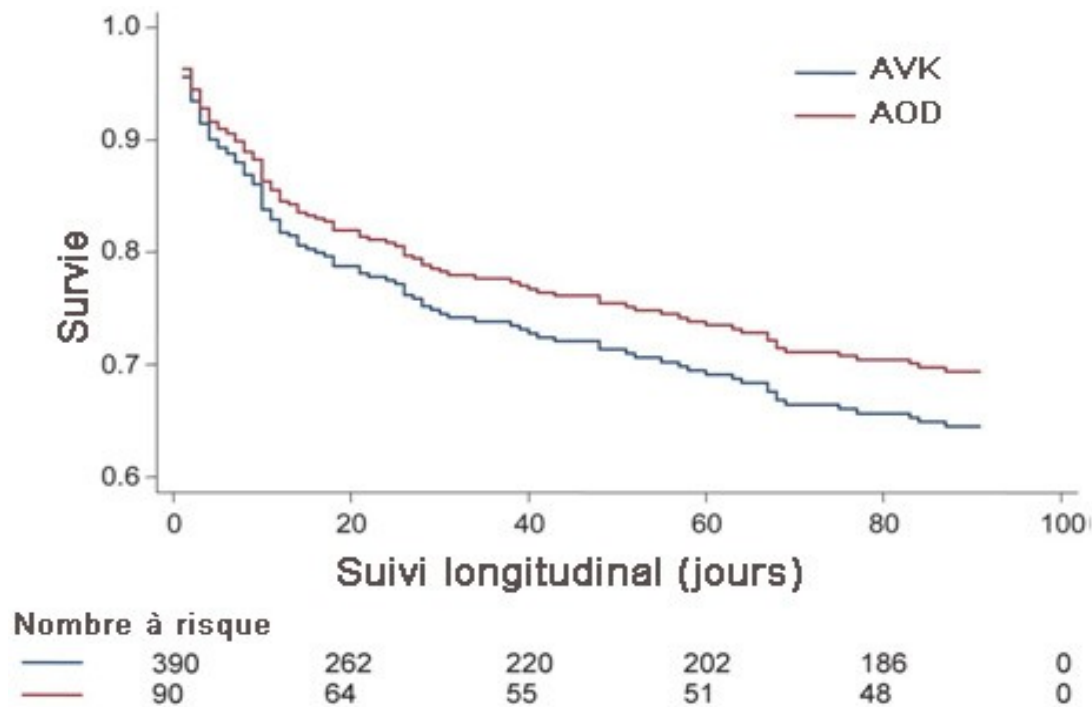


Figure 35 : Courbes de survie comparant la mortalité à 90 jours des patients après une hémorragie intracérébrale associée à la prise d'anticoagulants oraux directs ou d'anti-vitamine K. Courbe rouge : AOD : anticoagulant oraux direct ; courbe bleue : AVK : anti-vitamine K. Aucune différence significative n'a été retrouvée entre les 2 courbes (p=0.79). Adapté de Wilson et al., 2017.

Les mécanismes potentiels par lesquels les MHC peuvent être liés aux HIC associées aux anticoagulants dépendent des postulats suivants (Charidimou et al., 2012) :

- Les MHC reflètent des zones de saignement des petits vaisseaux cérébraux
- Les MHC sont couramment observées dans les populations susceptibles d'être exposées à des anticoagulants
- Les MHC se développent de manière dynamique dans le temps chez de nombreux patients
- Les MHC sont généralement entourés de facteurs hémostatiques ou par un tissu environnant limitant leur développement et l'apparition de symptômes cliniques évidents
- En présence d'anticoagulation, certaines MHC ne sont plus limitées par ces facteurs environnants et peuvent évoluer en HIC symptomatique grave

Ces relations font maintenant l'objet de plusieurs études cliniques et pré-cliniques qui tentent d'éclaircir les liens entre ces différents phénomènes, études reposant sur des comparaisons

cas-témoins/cas-tests, sur des études prospectives ou sur des examens systématiques et méta-analyses. Le dernier exemple en date repose sur l'étude CROMIS-2 (Clinical Relevance Of Microbleeds In Stroke-2) qui vise à établir la valeur des MHC (ainsi que d'autres marqueurs d'imagerie) et des facteurs génétiques dans la prédiction des HIC associées aux anticoagulants. Les dernières publications émanant de cette étude concluent sur le fait que l'inclusion d'un biomarqueur de neuroimagerie telles que les MHC améliore la prédiction des scores de risque cliniques d'HIC et pourrait aider les cliniciens à mieux identifier les patients à haut risque de HIC et à prendre des décisions mieux adaptées en matière d'anticoagulation (Wilson et al., 2018a). Mais il est important de prendre en compte le fait qu'il existe une hétérogénéité substantielle parmi les sujets présentant des MHC. Les facteurs contribuant à cette hétérogénéité incluent les différences entre les populations (asiatique vs occidentale), les méthodes d'acquisition en imagerie (pouvant affecter de manière significative la détection des MHC), le nombre de MHC par patient (plus il y en a, plus le risque de faire une HIC est importante), ainsi que les facteurs de risque plus courants tels que l'âge ou l'hypertension. Actuellement, en l'absence d'études centrées sur l'anticoagulation en présence de MHC, les modèles d'analyse décisionnelle tentent de fournir un cadre pour comprendre la décision de « point de basculement » c'est-à-dire le seuil auquel les risques du traitement anticoagulant sont supérieurs à ses avantages (Smith et al., 2017). Pour le moment, les études se penchant sur l'intérêt d'un anticoagulant oral par rapport à un autre ne montrent pas de consensus commun et la décision du traitement se fait au cas par cas et selon la pathologie et l'histoire du patient. Cependant, les AOD semblent être associés à un risque moins élevé de développer une HIC et pourraient ainsi être une solution alternative chez les patients particulièrement exposés à une future HIC sur la base du nombre et de la localisation de leurs MHC (Smith et al., 2017).

2.8. Microhémorragies cérébrales et perturbations métaboliques

2.8.1. Modèles expérimentaux de syndrome métabolique

En raison de sa nature multifactorielle, le choix d'un modèle expérimental adéquat qui représente la physiopathologie du SMet chez l'Homme peut être difficile. Les rats et les souris (rats Sprague-Dawley, rats Wistar et souris C57Bl/6 en majorité) sont les modèles les plus couramment utilisés dans l'étude du SMet. Parmi les différentes approches employées

pour induire ces perturbations chez les rongeurs, on peut citer le régime alimentaire, la modification génétique et les médicaments.

De nombreuses approches alimentaires capables d'induire le SMet ont été rapportées. Elles incluent l'utilisation d'un seul type de régime ou la combinaison de plusieurs, tels que des régimes riches en fructose, en sucrose ou en graisses (Tableaux 7 et 8) (Wong et al., 2016). Le fructose, ou sucre des fruits, est de plus en plus retrouvé dans l'alimentation comme exhausteur de goût et sa consommation est devenue excessive avec les boissons artificielles et les aliments sucrés. Il provoque une accumulation de triglycérides et de cholestérol (due à ses propriétés lipogéniques), suivie d'une résistance à l'insuline et d'une intolérance au glucose (Jürgens et al., 2005). Chez l'animal, une faible dose de fructose dans l'eau de boisson (10%) suffit à induire un SMet (Tableau 7). Le sucrose, ou sucre de table, est composé d'une molécule de glucose et d'une molécule de fructose. Quand il est consommé, il est alors scindé en ses 2 constituants par l'enzyme sucrase qui sont ensuite repris par leurs mécanismes de transport spécifiques. Le fructose est ainsi le principal ingrédient actif dans le développement du SMet chez les animaux après consommation de sucrose (Wong et al., 2016).

La graisse est le macronutriment le plus dense en calories. Une étude de 2007 de l'équipe de Mendoza a très bien couvert la littérature sur la densité énergétique des aliments et la conclusion est claire : « la densité énergétique alimentaire est un facteur prédictif indépendant de l'obésité, de niveaux d'insuline élevés et de syndrome métabolique chez les adultes américains » (Mendoza et al., 2007). De nombreuses recherches expérimentales ont utilisé des régimes riches en graisse qui varient de 20 à 60% de l'énergie totale. La source du composant gras peut être soit d'origine végétale (huile de maïs, de carthame...) soit d'origine animale (suif, saindoux de bœuf...). Ces régimes ont largement été utilisés pour induire l'obésité chez les animaux, mais ils favorisent également l'hyperglycémie, la résistance à l'insuline, la dyslipidémie et l'augmentation des acides gras libres dans le sang, soit indépendamment soit simultanément (Tableau 8) (Wong et al., 2016).

| Type de régime | Durée du traitement | Souche | Composants du SMet | | | |
|---|---------------------|-----------------------|--------------------|---------------|--------------|--------------|
| | | | Obésité | Hyperglycémie | Hypertension | Dyslipidémie |
| Croquettes riches en fructose | 3 semaines | Rats Wistar ♂ | - | √ | √ | - |
| Croquettes + boisson riches en fructose | 8 semaines | Rats Sprague-Dawley ♂ | - | - | √ | √ |
| Croquettes riches en fructose | 8 semaines | Rats Wistar ♂ | - | √ | - | √ |
| Boisson riche en fructose | 12 semaines | Rats Wistar ♂ | √ | √ | √ | √ |
| Croquettes riches en fructose | 8 semaines | Rats Sprague-Dawley ♂ | √ | √ | - | √ |
| Boisson riche en fructose | 10 semaines | Souris NMRI ♂ | √ | - | - | - |
| Croquettes riches en sucrose | 7 semaines | Rats SHRSP ♂ | - | √ | √ | - |
| Boisson riche en sucrose | 21 semaines | Rats Wistar ♂ | √ | - | √ | √ |
| Boisson riche en sucrose | 10 semaines | Rats Sprague-Dawley ♂ | - | √ | - | √ |
| Croquettes riches en sucrose | 2 semaines | Rats Sprague-Dawley ♂ | - | - | √ | √ |

Tableau 7 : Effets d'un régime riche en fructose ou en sucrose sur les composants d'un syndrome métabolique. Rats SHRSP : Spontaneously Hypertensive Rat Stroke-Prone. Adapté de Wong et al., 2016.

| Type de régime | Durée du traitement | Souche | Composants du SMet | | | |
|---------------------------------|---------------------|------------------------------------|--------------------|---------------|--------------|--------------|
| | | | Obésité | Hyperglycémie | Hypertension | Dyslipidémie |
| Croquettes riches en gras (32%) | 10 semaines | Rats Sprague-Dawley ♂ | √ | - | √ | √ |
| Croquettes riches en gras (45%) | 24 semaines | Rats Sprague-Dawley ♂ | √ | √ | - | √ |
| Croquettes riches en gras (60%) | 8 semaines | Souris C57bl/6J ♂ | √ | √ | - | √ |
| Croquettes riches en gras (60%) | 20 semaines | Souris C57bl/6J ♂ et ♀ | √ | √ | - | √ |
| Croquettes riches en gras (60%) | 16 semaines | Souris C57bl/6J ♂ | √ | √ | - | √ |
| Croquettes riches en gras (20%) | 40 semaines | Souris C57bl/6J ♂ | - | - | - | √ |
| Croquettes riches en gras (60%) | 24 semaines | Souris C57bl/6J ♀ | √ | - | - | - |
| Croquettes riches en gras (24%) | 24 semaines | Rats Sprague-Dawley ♂ | √ | √ | - | - |
| Croquettes riches en gras (40%) | 13 semaines | Souris hyperlipidémique (Ldlr -/-) | - | √ | - | √ |
| Croquettes riches en gras (60%) | 12 semaines | Souris C57bl/6N Tac ♀ | √ | √ | - | √ |
| Croquettes riches en gras (60%) | 4 semaines | Souris C57bl/6J ♂ | √ | - | - | √ |
| Croquettes riches en gras (50%) | 10 semaines | Rats Wistar ♂ | √ | √ | √ | √ |

Tableau 8 : Effets d'un régime riche en gras sur les composants d'un syndrome métabolique. Ldlr : Récepteur au LDL. Adapté de Wong et al., 2016.

En plus des modèles de SMet induits par le régime alimentaire, des modèles d'animaux génétiquement modifiés sont utilisés pour étudier la pathogénèse du SMet. Ces modèles permettent de gagner du temps car la durée de développement du SMet est considérablement raccourcie par rapport à celle induite par le régime. La plupart des modèles animaux développés reposent sur la mutation du gène de la leptine ou de son récepteur (Wong et al., 2016). La leptine est une hormone « anti-obésité » qui est sécrétée par les adipocytes matures proportionnellement à la taille des dépôts graisseux. La leptine circulante est absorbée dans l'hypothalamus pour diminuer l'appétit et la consommation de nourriture et augmenter la dépense énergétique *via* plusieurs voies de signalisation (Ahima and Flier, 2000). La survenue de l'obésité dans ces modèles est essentiellement due aux anomalies de la signalisation de la leptine, entraînant une hyperphagie, un appétit non contrôlé et une dépense énergétique réduite (Wang et al., 2014). Parmi tous les modèles développés, les rats ZF (*Zuccher Fatty*), ZDF (*Zuccher Diabetic Fatty*), DS/obèses (DahlS.Z- $Lepr^{fa}/Lepr^{fa}$), les rats Koletsky et les souris POUND (C57BL/6NCr1- $Lepr^{db-lb}/Cr1$) sont les modèles les plus appropriés de SMet car ils représentent le plus les conditions d'un syndrome métabolique. Cependant, malgré le fait que ces modèles génétiques aident à élucider les mécanismes moléculaires plausibles impliqués dans le développement de certains états pathologiques, les mutations de la leptine ou de son récepteur se produisent rarement chez l'Homme, ce qui implique qu'elles ne reflètent pas l'état pathologique de l'Homme dans la vie réelle.

Il existe enfin des modèles animaux de SMet reposant sur des régimes enrichis avec certains médicaments pouvant influencer le développement de perturbations métaboliques. Nous pouvons citer des régimes à base de glucocorticoïdes dont on utilise les effets indésirables comme le gain de poids, l'intolérance au glucose, l'altération de l'homéostasie calcique, l'ostéoporose... (Ferris and Kahn, 2012). D'autres modèles utilisent des médicaments anti-psychotiques, reposant principalement sur la prise de poids, le développement d'un diabète et de dyslipidémies (Davey et al., 2013).

2.8.2. Survenue de microhémorragies cérébrales au décours de perturbations métaboliques

Le SMet étant caractérisé comme un ensemble complexe de facteurs de risques vasculaires, il est associé à une augmentation de la mortalité cardiovasculaire et fortement corrélé à la survenue et à la récurrence d'AVC. En plus de l'accident symptomatique, il est également

associé à la prévalence d'autres lésions cérébrales silencieuses, y compris les microinfarctus et les lésions de la substance blanche (Bokura et al., 2008). Cependant, il y a peu de données sur les relations potentielles entre le SMet et l'incidence de MHC. Compte tenu de leur nature vasculaire, on peut supposer qu'une plus grande incidence des MHC serait liée à une mauvaise santé vasculaire, et que l'augmentation des indicateurs de risques vasculaires prédirait alors la prévalence des MHC. Par exemple, les MHC sont plus fréquentes chez les porteurs de l'allèle $\epsilon 4$ de l'apolipoprotéine E, associée à une clairance diminuée du cholestérol et à un risque accru de MA (Maxwell et al., 2011). De même, l'hypertension artérielle ou une pression systolique élevée (Liu et al., 2012; Poels et al., 2011), ainsi qu'une glycémie à jeun élevée (Viswanathan et al., 2006) augmentent le risque de développer des MHC. En revanche, les données autour de MHC et cholestérol restent encore mitigées, notamment face aux résultats discordants retrouvés avec les statines (Amarenco and Labreuche, 2009; Hackam et al., 2011). Ainsi, chacun de ces indicateurs de risque des MHC est un constituant du SMet. Le déclin progressif et cumulatif de la santé vasculaire est courant au cours du vieillissement et le risque de SMet augmente après 50 ans (Grundy et al., 2006). L'augmentation du nombre de MHC avec l'âge pourrait donc être le reflet du déclin de la santé cardiovasculaire. Récemment, plusieurs études longitudinales sur des patients ont confirmé que les composants liés à l'âge et au SMet constituaient l'un des facteurs de prédiction les plus puissants de l'incidence des MHC, même si les mécanismes sous-jacents restent indéterminés (Daugherty and Raz, 2017; Greenberg et al., 2009; Yates et al., 2014) (Figure 36-A). D'autres études associent également le nombre de MHC retrouvées chez les patients à leur taux de graisse viscérale et à l'obésité, et ce indépendamment de l'âge ou de l'hypertension (Mitaki et al., 2018) (Figure 36-B). La sécrétion par les adipocytes de facteurs pro-inflammatoires (IL-6, protéine C-réactive), de métalloprotéinases et d'adipocytokines, fragilisant ainsi l'endothélium vasculaire, fait partie des mécanismes envisagés (Kwon et al., 2016; Mitaki et al., 2018).

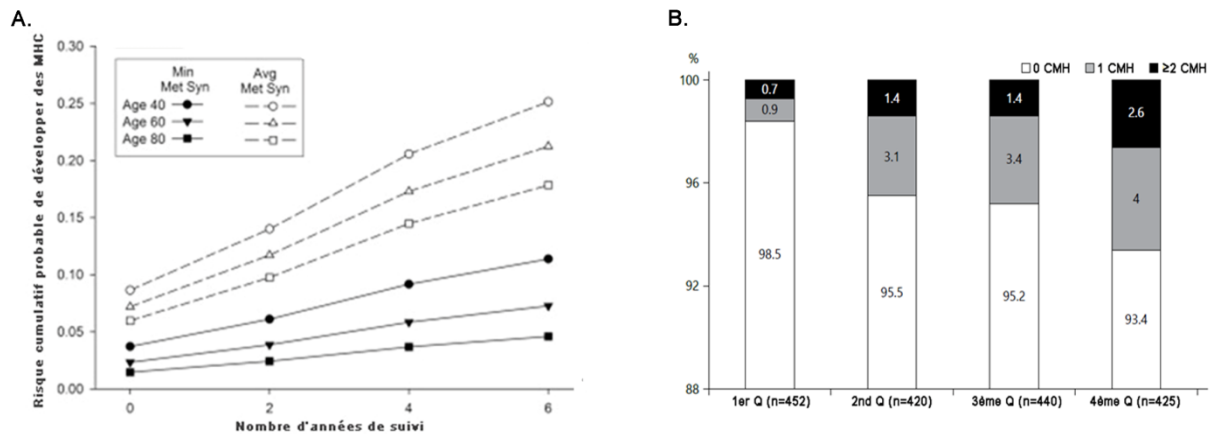


Figure 36 : Association entre présence de facteurs de risque métaboliques et présence de microhémorragies cérébrales. A. Probabilité de risque cumulatif de développer des microhémorragies cérébrales sur 6 ans, distinguée par l'âge et par la présence de facteurs de risque métaboliques. Courbes pleines : courbes liées au vieillissement normal ; courbes en pointillées : courbes liées à l'âge avec présence de perturbations métaboliques. *Adapté de Daugherty et Raz., 2017.* B. Relations dose-réponse entre les quartiles croissants du ratio Tissu adipeux viscéral/Tissu adipeux sous-cutané et le nombre de microhémorragies cérébrales. $p=0.001$ par test d'association. 1^{er} Q : ratio ≤ 0.48 , 2nd Q : ratio : 0.49-0.71, 3^{ème} Q : ratio : 0.71-1.03, 4^{ème} Q : ratio ≥ 1.04 . *Adapté de Kwon et al., 2016.*

Bien que l'association entre le développement d'un SMet et la présence de MHC soit maintenant évaluée dans certaines études cliniques, très peu de choses sont connues sur l'impact de ces lésions à plus long terme. La présence de MHC va-t-elle accélérer le développement d'un déclin cognitif induit par les perturbations métaboliques ou juste jouer un rôle de reflet de la sévérité de la pathologie associée ? Leurs effets propres vont-ils rester silencieux face aux processus délétères des maladies associées, ou vont-ils au contraire s'ajouter aux mécanismes physiopathologiques et ainsi aggraver ces maladies ? Nous avons tenté, au cours de cette thèse, d'avoir des premiers éléments de réponse sur les effets de la survenue de MHC en présence de perturbations métaboliques chez la souris.

Article de revue :

Cerebral microbleeds : beyond the microscope

Une partie des généralités exposées dans cette partie a fait l'objet d'un article de revue publiée cette année dans « International Journal of Stroke » dont je suis 1^{er} auteur.

Présentation du travail

Malgré leur dimension microscopique et leur caractère silencieux, les MHC sont de plus en plus prises en compte par les cliniciens dans leur diagnostic et leurs décisions. En effet, elles peuvent représenter une fragilité vasculaire sous-jacente et refléter la sévérité de la maladie neurovasculaire chez le patient. De plus, elles peuvent être prédictives d'un accident vasculaire plus important et d'un développement plus précoce d'un déclin cognitif. Cependant, il reste difficile de connaître les effets propres des MHC car elles sont le plus souvent associées à une maladie sous-jacente dont les caractéristiques viennent influencer les résultats observés. Leur contribution au développement d'un déclin cognitif semble moins évidente que pour d'autres lésions comme les AVC, les microinfarctus ou encore la sidérose superficielle. C'est pour répondre à cette question que nous avons choisi de développer une méthode d'induction de MHC chez la souris saine, sans maladie sous-jacente. De même, comme les MHC sont souvent retrouvées en nombre et réparties de manière disséminée dans le cerveau, nous avons cherché à provoquer des MHC dans l'ensemble du parenchyme cérébral par le biais du territoire vasculaire sylvien.

Ainsi, ce projet de thèse s'est divisé en 3 axes principaux :

- Induire chez la souris des MHC disséminées dans le but d'étudier leur impact au niveau tissulaire et moléculaire mais aussi au niveau fonctionnel par le biais de tests comportementaux. Cette méthode innovante repose sur l'utilisation de cyclodextrines (CD) qui sont des oligosaccharides cycliques issus du clivage de l'amylose et qui ont la particularité d'avoir leurs surfaces hautement hydrophiles, alors que le centre de leur cavité est hydrophobe. Les CD n'exercent pas de toxicité chimique, mais à forte dose, certaines d'entre elles déplètent le cholestérol membranaire des cellules endothéliales et altèrent les barrières biologiques comme la barrière hémato-encéphalique (BHE). C'est cette caractéristique que nous exploitons afin d'induire des MHC au niveau de la BHE. Ces CD injectées par la voie carotidienne vont donc éroder les membranes cellulaires endothéliales en plusieurs jours pour obtenir des MHC disséminées à peine visibles à l'œil nu.

- Moduler pharmacologiquement, à l'aide des anticoagulants oraux directs (AOD), l'apparition ou la gravité de ces MHC induites, et évaluer l'impact de ces traitements à long terme. Les AOD ont été comparés à un anti-vitamine K (la warfarine) utilisé couramment en clinique humaine et dont la tendance à provoquer une HIC est maintenant bien connue. Nous avons réalisé une étude à court terme visant à évaluer le risque pour ces anticoagulants oraux

de transformer les MHC en HIC, ainsi qu'une étude à long terme permettant d'évaluer l'impact fonctionnel et cognitif des poids microhémorragiques induits.

- Tester l'influence des MHC dans un contexte pathologique non dégénératif pour que l'on puisse potentiellement mettre en évidence un effet additif ou précipitant des MHC. Pour cela, nous avons développé un modèle de perturbations métaboliques provoquées par une alimentation riche en gras, qui induit un déclin cognitif léger en milieu de vie. Ce modèle a fait l'objet d'une caractérisation métabolique, vasculaire et comportementale à laquelle j'ai participé dès le début de ma thèse. Elle a permis de mettre en évidence un déclin cognitif « vasculaire » et non dégénératif puisqu'il induit des dysfonctionnements au niveau des vaisseaux cérébraux sans altération du tissu cérébral. Nous avons évalué l'effet de la survenue de MHC lors de la mise en place des perturbations métaboliques (début de régime enrichi, pas de déclin cognitif) ou en milieu de vie quand les désordres vasculaires et cognitifs sont installés depuis 6 mois.

Matériels et Méthodes

1. Méthode d'induction de microhémorragies cérébrales disséminées chez la souris

1.1. Les cyclodextrines

Les cyclodextrines (CD) sont un groupe de produits naturels structurellement apparentés. Elles sont formées lors de la digestion bactérienne de la cellulose, et possèdent une cavité centrale lipophile et une surface extérieure hydrophile (Jambhekar and Breen, 2016) (Figure 37).

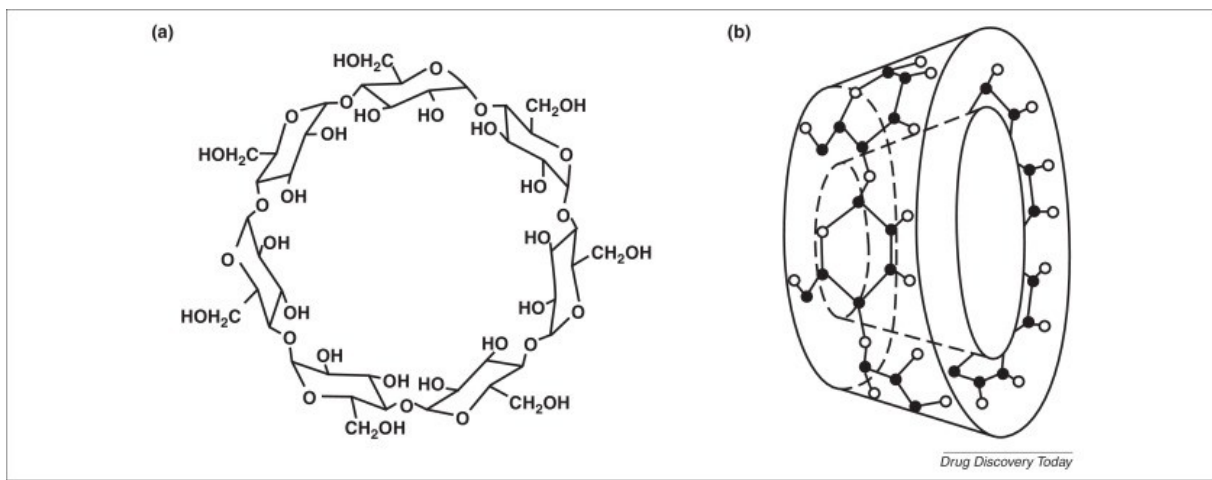
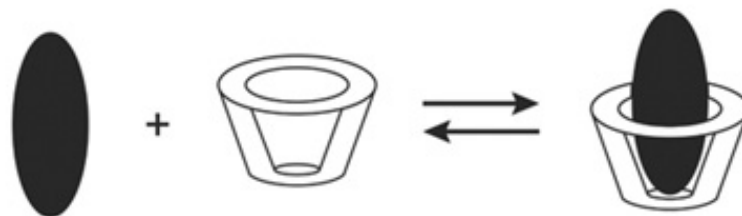


Figure 37 : Formule chimique (a) et forme toroïdale (b) d'une molécule de β -cyclodextrines. Adapté de Jambhekar and Breen, 2016.

Les CD naturelles les plus courantes sont les α -CD, β -CD et δ -CD, comprenant 6, 7 ou 8 unités de glucopyranose. En raison de leurs formes et de leurs structures moléculaires, les CD présentent une capacité unique à piéger une molécule hôte dans leur cavité, et à agir en tant que conteneur moléculaire (Figure 38).



Médicament Cyclodextrine 1:1 Complexe

Figure 38 : Liaison à l'équilibre d'un médicament avec une cyclodextrine pour former un complexe d'inclusion. Adapté de Stella and He, 2008.

Ces complexes d'inclusion formés ont d'ailleurs de nombreuses applications dans les formulations pharmaceutiques (Loftsson, 2002) (Tableau 9).

| Type de CD | Poids moléculaire | Solubilité dans l'eau (mg/ml) | Exemple de médicament associé | Voie d'administration | Marché |
|--------------------|-------------------|-------------------------------|--------------------------------|-----------------------|--------|
| α -CD | 972 | 145 | Cefotiam hexetil hydrochloride | Oral | Japon |
| β -CD | 1135 | 18.5 | Oméprazole | Oral | Europe |
| HP- β -CD | 1400 | >600 | Cisapride | Rectal | Europe |
| RAME- β -CD- | 1312 | >500 | 17b-Estradiol | Nasal | Europe |
| HP- δ -CD | 1576 | >500 | Diclofenac sodium | Oculaire | Europe |

Tableau 9 : Cyclodextrines naturelles et leurs dérivés couramment utilisés dans les produits pharmaceutiques. HP : HydroxyPropyliques. RAME : Randomly-Methylated. *Adapté Jambhekar and Breen, 2016.*

Les CD sont à la fois grandes (de 1000 à 2000 Da) et hydrophiles, avec un grand nombre de donneurs et d'accepteurs d'hydrogène. Par conséquent, elles ne peuvent pas être absorbées par le tractus gastro-intestinal sous leur forme intacte et sont considérées non toxiques à des doses faibles à modérées. Les CD naturelles, en particulier les β -CD, ont une solubilité aqueuse limitée et par conséquent il en va de même pour les complexes formés avec les CD. Cette faible solubilité dans l'eau est attribuée à la présence de liaisons hydrogène intermoléculaires relativement fortes (Jambhekar and Breen, 2016). C'est pourquoi plusieurs chercheurs ont développé des dérivés de CD présentant une inclusion supérieure et une innocuité maximale *in vivo* pour diverses utilisations biomédicales. Ces dérivés comprennent les dérivés hydroxypropyliques (HP) des β - et δ -CD, les Randomly-Methylated- β -CD (RAME- β -CD), les SulfoButylEther (SBE)- β -CD...(Tableau 9). Bien que les CD naturelles présentent une solubilité aqueuse plus faible que celle de leurs dérivés, celle-ci est souvent suffisante pour prévenir le taux de dissolution limité à l'absorption d'un médicament par la voie gastro-intestinale (Stella and He, 2008). Les CD modifiées ne pénètrent pas facilement les membranes biologiques en raison de leur faible propriété lipophile. Il a d'ailleurs été démontré que seules des quantités négligeables de CD et de complexes médicaments-CD sont capables de pénétrer à travers les membranes lipophiles telles que la muqueuse gastro-intestinale, la BHE ou la peau (Shityakov et al., 2016). Cette faible absorption intestinale confère au CD une faible toxicité quand elles sont administrées par voie orale. De même,

d'autres études réalisées chez l'animal ont montré une faible toxicité pour certaines CD (δ -CD) après une administration intraveineuse (Munro et al., 2004).

Dans le cadre de notre étude, nous nous sommes intéressés particulièrement aux propriétés d'interaction des CD avec le cholestérol membranaire. En effet, il a été démontré que l'exposition de CD sur des cultures de cellules tissulaires entraîne une déplétion rapide du cholestérol membranaire grâce à leur cavité hydrophobe capable d'extraire le cholestérol des membranes cellulaires (Christian et al., 1997). Cet aspect a été évalué par Monnaert en 2004 qui a étudié la toxicité et la perméabilité endothéliale induites par les CD au niveau de la BHE. Ces études fondées sur des expériences de perméabilité du sucrose, sur le relargage de cholestérol et de lipides membranaires et sur des marquages immunohistochimiques, ont permis de classer les CD de la plus toxique (les α -CD) à la moins toxique (les δ -CD) pour la BHE (Figure 39). Notre étude a utilisé des RAME- β -CD qui, bien qu'elles ne passent pas la BHE, libèrent le cholestérol et les phospholipides de la membrane cellulaire, endommageant ainsi l'endothélium de la BHE (Monnaert et al., 2004).

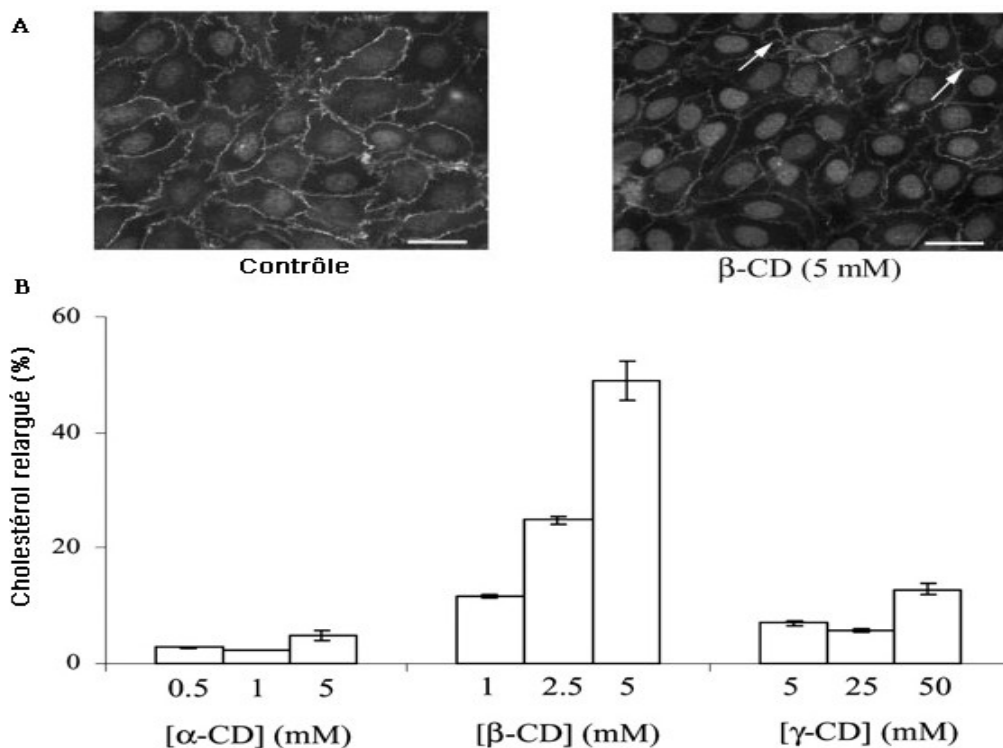


Figure 39 : Effets des cyclodextrines sur la barrière-hémato-encéphalique *in vitro*. **A.** Immunomarquage de l'occludine permettant la mise en évidence de la membrane cellulaire. Les conditions contrôle (à gauche) montrent une membrane intacte entre les cellules tandis que les conditions sous β -CD montrent des points de rupture (à droite, flèches blanches). Barre : 25 μ m. **B.** Libération de cholestérol des membranes des cellules endothéliales après 2h d'incubation en présence de diverses concentrations de cyclodextrines (α , β et δ). Les résultats sont exprimés en pourcentage de cholestérol libéré par rapport au témoin. *Adapté de Monnaert et al., 2014.*

1.2. Mise au point des doses, voies d'injection des CD et cinétique d'apparition des MHC

La méthode a été développée chez la souris C57Bl/6j âgée de 12 semaines de vie et ayant un poids aux alentours de 28-30g. Le choix de cette espèce et de cet âge a été déterminé dans la perspective d'appliquer cette méthode aux modèles expérimentaux du laboratoire.

La dose a initialement été fixée à partir des essais effectués au laboratoire LBHE (Lens) où une dose de $[7,5 \text{ mM}]_{\text{finale}} \Leftrightarrow 9,82 \text{ mg/ml}$ a été nécessaire pour obtenir une ouverture de la BHE. Si l'on se réfère au volume sanguin total de la souris (2 ml), cette dose correspond à une injection de l'ordre de 200 mg/ml ($9,82 \times 20 = 196,4 \text{ mg/ml}$). Cette dose restera notre dose de référence dans nos études effet-dose.

Les différentes quantités et voies d'administration testées et les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 10 suivant (n=1 à 2 par groupe):

| Voie d'administration | Concentration testée | Volume injecté | Résultats obtenus |
|-----------------------|----------------------|------------------------------------|---|
| IV (veine pénienne) | 200mg/ml | 100 μl | 100% de mortalité à 48h |
| IV (veine pénienne) | 200mg/ml | 200 μl | 100% de mortalité à 24h |
| IV (veine pénienne) | 200mg/ml | 400 μl | 100% de mortalité à 30 min |
| IV (veine pénienne) | 400mg/ml | 200 μl | 100% de mortalité à 5 min |
| IC (carotide) | 10 mg/ml | 50 μl | aucune mortalité-pas de pétéchies à 7 jours |
| IC (carotide) | 100mg/ml | 50 μl | aucune mortalité-pas de pétéchies à 7 jours |
| IC (carotide) | 200mg/ml | 50 μl | aucune mortalité-présence de pétéchies à 7 jours |
| IC (carotide) | 200 mg/ml | 100 μl | 100% de mortalité à 30 min |
| IC (carotide) | 400 mg/ml | 50 μl | aucune mortalité-présence de pétéchies et d'une zone d'ischémie à 24h |
| IC (carotide) | 400 mg/ml | 100 μl | 100% de mortalité à 50 min |
| IC (carotide) | 800 mg/ml | 50 μl | 100% de mortalité à 30 min |

Tableau 10 : Tests de doses et de voies d'administration des cyclodextrines chez la souris. IV : Intraveineuse. IC : Intra-carotidienne.

Au vu des résultats et de la forte mortalité obtenue chez les souris dont les CD ont été injectées par voie intraveineuse (IV), la voie intra-carotidienne (IC) a donc été retenue. Les différentes doses testées permettent de focaliser notre méthode sur l'injection IC d'une dose de 50 μl de CD à 200 mg/kg (0,3g/kg).

Par la suite, il a été nécessaire de réaliser une cinétique afin de trouver le meilleur temps pour obtenir ces MHC. Les différents temps testés et les résultats obtenus sont résumés dans le tableau suivant (n=2 à 5 par groupe):

| Voie d'administration | Concentration testée | Volume injecté | Temps de sacrifice | Résultats obtenus |
|-----------------------|----------------------|----------------|--------------------|-------------------|
| IC | 200 mg/ml | 50 μ l | 24h | rares pétéchies |
| IC | 200 mg/ml | 50 μ l | 72h | 2-5 pétéchies |
| IC | 200 mg/ml | 50 μ l | 7j | 15-30 pétéchies |
| IC | 200 mg/ml | 50 μ l | 10j | 15-30 pétéchies |

Tableau 11 : Cinétique d'apparition des microhémorragies cérébrales après injection de cyclodextrines.

Au vu des résultats, du peu de pétéchies obtenues à 24h et 72h et de la stabilité du nombre de pétéchies entre 7j et 10j, nous nous sommes arrêtés au temps 7 jours post-injection pour évaluer le nombre de MHC.

1.3. Détermination du poids microhémorragique

Sept jours après l'injection, les souris sont sacrifiées avec une surdose de pentobarbital (200 mg/kg par voie intrapéritonéale). Les cerveaux sont ensuite rapidement retirés de la boîte crânienne puis plongés dans une solution d'isopentane où ils sont congelés à -20°C . Ils sont par la suite coupés sur un cryostat en tranches coronales de 20 μm . Les MHC sont alors comptées sur chaque tranche de cerveau et caractérisées selon leur taille, comme décrit précédemment par Haddad et ses collaborateurs (Haddad et al., 2008). Ainsi, les MHC visibles à l'œil nu et présentes uniquement sur une coupe sont définies comme des MHC de score 1. Lorsqu'elles étaient visibles sur 2 coupes consécutives, elles sont définies comme étant de score 2. Lorsqu'elles sont plus grandes et retrouvées sur plus de 2 coupes, les MHC sont définies comme étant de score 3. Enfin, les hématomes sont définis comme étant de score 4 (Figure 40). Le score hémorragique total est calculé comme la somme de toutes les MHC et représente le poids microhémorragique cérébral de chaque animal.

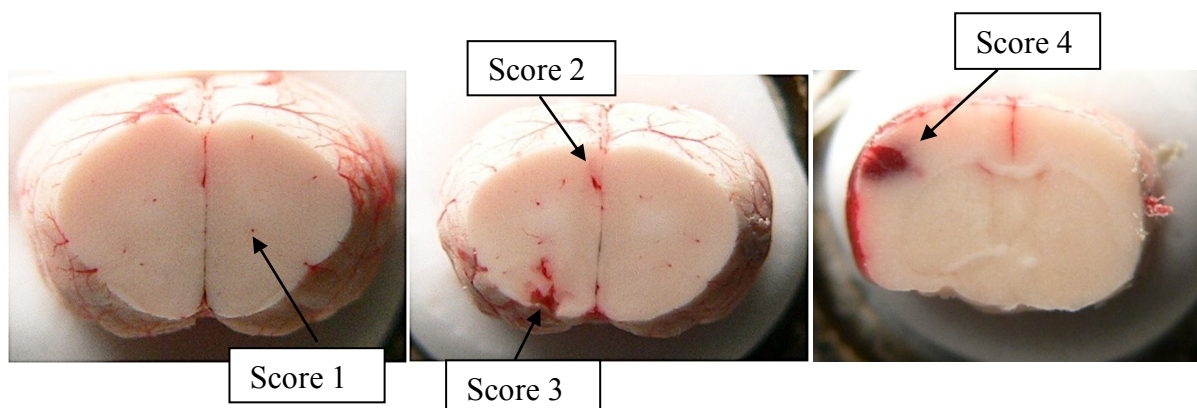


Figure 40 : Différents scores hémorragiques cérébraux.

1.4. Etudes histologiques des microhémorragies cérébrales

1.4.1. Traitement du cerveau et coupes sériées

Afin de pouvoir détecter les MHC au niveau du tissu cérébral, il est indispensable de traiter le cerveau de telle façon que le tissu soit le moins abimé possible. Pour cela, les animaux sont sacrifiés par injection létale de pentobarbital (200 mg/kg par voie intrapéritonéale). Puis, ils sont rincés de leur sang par perfusion intracardiaque de sérum physiologique à 4°C pendant 5 minutes. Enfin, les cerveaux sont prélevés puis plongés dans une solution de méthacarn (60% méthanol-30% chloroforme-10% acide acétique) à 4°C pendant 24h. Par la suite, les prélèvements sont déshydratés par des bains successifs d'alcool 95° et 100°, puis enrobés dans de la paraffine liquide à 60°C. Les cerveaux sont ensuite coupés sur un cryotome en tranches de 5 µm et conservés jusqu'à utilisation.

1.4.1. Coloration à l'hématoxyline-éosine

La coloration à l'hématoxyline-éosine (HE) est une coloration classiquement utilisée en histologie et en histopathologie. C'est une coloration bichromatique qui se compose d'un colorant nucléaire, l'hématoxyline, qui colore les noyaux en bleu/violet, et d'un colorant cytoplasmique, l'éosine, qui colore le cytoplasme en rose/rouge. Le protocole classiquement utilisé est le suivant : déparaffinage des lames, 3 rinçages (3x5 minutes) dans du PBS 1X pH 7.4, incubation dans une solution d'hématoxyline 0.1% (5 minutes), rinçage sous l'eau courante (5 minutes), incubation dans une solution d'éosine 0.5% (5 minutes), déshydratation des lames et montage sur lamelles. Nous utilisons cette coloration pour évaluer l'atteinte tissulaire autour des MHC.

1.4.2. Coloration de Perl's

La coloration de Perl's permet de révéler les complexes insolubles contenant du fer, comme par exemple l'hémosidérine. En milieu acide, le fer inorganique forme avec le ferrocyanure de potassium, un complexe coloré en bleu vert. Il existe plusieurs protocoles dans la littérature et nous les avons adaptés avec des concentrations fortes et des temps d'incubation longs, afin d'augmenter le seuil de sensibilité et de mettre en évidence de petits dépôts de fer. Le protocole retenu est le suivant : déparaffinage des lames, 3 rinçages (3x5 minutes) dans du PBS 1X pH 7.4, incubation dans une solution de ferrocyanide 20% (fraichement préparée) et 10% HCl (4 heures sous agitation), 3 rinçages (3x5 minutes) dans du PBS 1X pH 7.4, contre-coloration à l'hématoxyline-éosine (5 minutes hématoxyline-5 minutes éosine), déshydratation des lames et montage sur lamelles.

Cette coloration permet de mettre en évidence la présence d'épanchements sanguins constitués au sein du tissu cérébral. Ainsi, une réaction positive ou négative (présence de bleu ou non dans la lésion) permet de déterminer respectivement si ce saignement est « ancien » ou récent (Figure 41). Cependant, les réactions négatives peuvent aussi témoigner de la clairance d'une MHC par les macrophages (sidérophages), et donc d'une MHC potentiellement plus ancienne que celles qui sont positives pour la coloration (van Veluw et al., 2016a).

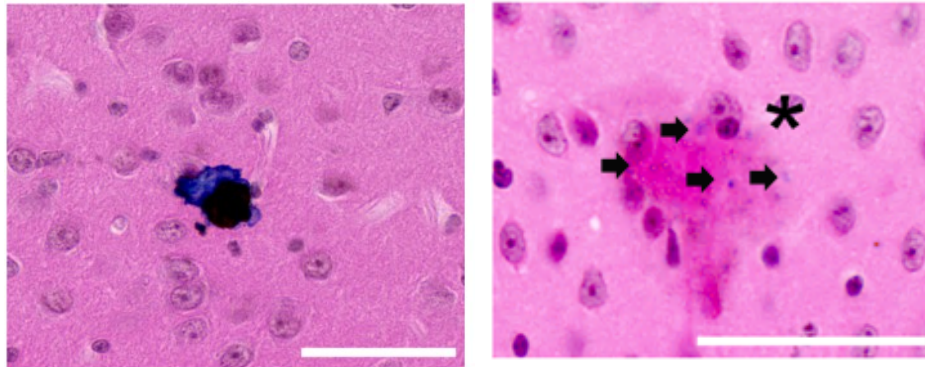


Figure 41 : Exemple de marquage positif (à gauche) ou négatif (à droite) à la coloration de Perl's au niveau du tissu cérébral (barre : 50 μ m). Seules de très légères traces bleues suggèrent une coloration du Fer (flèches noires).

1.4.3. Marquage des hématies au DAB

Cette méthode de détection des microhémorragies par la mise en évidence des hématies au sein du tissu cérébral a été développée par Toth et al en 2015. Cette technique se base sur la réaction du DAB (diaminobenzidine) qui précipite en brun foncé lorsqu'il subit une réaction avec les peroxydases présentes dans les globules rouges et permettant donc une détection précise des cellules sanguines extravasées dans le parenchyme cérébral. Le protocole est donc le suivant : déparaffinage des lames, 3 rinçages (3x5 minutes) dans du PBS 1X pH 7.4, incubation dans une solution d'hémalun (5 minutes), rinçage sous l'eau courante (5 minutes), incubation dans une solution de DAB (40 mg/mL) fraîchement préparée (15 minutes), rinçage sous l'eau courante (5 minutes), déshydratation des lames et montage sur lamelles.

Comme pour la coloration de Perl's, il est possible de détecter par cette technique si un saignement est plus ou moins récent. En effet, la présence d'hématies intactes est plutôt le signe d'hémorragies aiguës, alors que celle d'hématies lysées reflète plutôt un saignement sub-aigu avec des degrés de maturité plus ou moins grand (Figure 42).

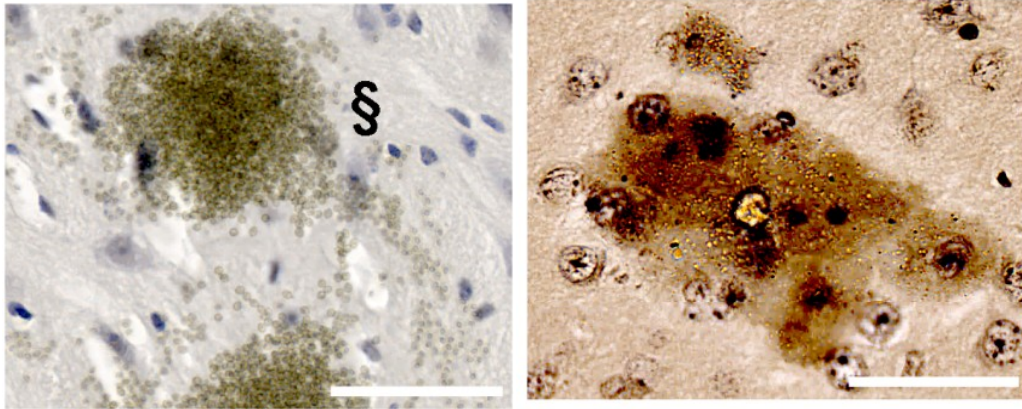


Figure 42 : Exemple de marquage d'hématies intactes (à gauche) ou lysées (à droite) après réaction avec le DAB, indiquant un saignement plus ou moins récent (barre : 50 μ m).

1.5. Détection des neurones en dégénérescence par le fluorojade B

Le fluorojade B est un fluorochrome connu pour détecter les neurones en dégénérescence. Son mode d'action n'est pas encore totalement caractérisé. Des pistes de travail privilégient une affinité particulière pour des polyamides qui seraient associées à une dégénérescence cellulaire telles que la putrescine, la cadavérine, la spermadine ou l'histamine (Schmued et al., 2000). Nous avons ainsi évalué l'état des neurones autour des MHC par cette coloration. Le protocole retenu est le suivant : immersion des coupes dans de l'éthanol 80%-NaOH 1% (5 minutes), incubation dans une solution d'éthanol 70% (2 minutes), rinçage à l'eau distillée (2 minutes), incubation dans une solution de permanganate de potassium 0.06% (15 minutes), rinçage à l'eau distillée (2 minutes), incubation dans une solution de fluorojade B 0.0004% (30 minutes), rinçage à l'eau distillée (3x2 minutes), séchage des lames à l'étuve 37°C (30 minutes) et montage des lames.

1.6. Détection des microhémorragies cérébrales par IRM

1.6.1. Acquisition

L'imagerie cérébrale des souris a été effectuée sur une IRM 7T (Biospec 70/20, Bruker, Biospec, Ettlingen, Allemagne), à l'aide d'une antenne volumique d'émission (72 mm) et d'une antenne de réception à température ambiante dédiée au cerveau de souris. Les acquisitions IRM ont été réalisées sous isoflurane, avec une induction par inhalation continue de 3% d'isoflurane à un débit de 1 ml d'air par minute puis maintien de l'animal durant la totalité de l'acquisition avec une concentration de 1 à 1,5% à 0,5 ml/min en fonction de la

fréquence respiratoire. Durant l'acquisition, la saturation en oxygène et la fréquence respiratoire sont surveillées *via* respectivement le positionnement d'un capteur sur la patte arrière de l'animal et d'un capteur de pression positionné sous l'abdomen de l'animal. Le maintien de la température corporelle est assuré par le positionnement d'une couverture chauffante sur le dos de l'animal.

Afin d'optimiser la détection des MHC chez nos souris, la plateforme IRM a travaillé une séquence spécifique de susceptibilité 3D MGE (Multi-Gradient Echo ; TR / TEs = 250 / 4 ; 10 ; 16 ; 22 ms ; champs de vue : 15,5 x 20 x 13 mm; matrice 119 x 154 x 100, résolution spatiale isotropique de 130 μm ; Nex = 10 durée 1h40). Cette séquence couvre l'intégralité du cerveau pour accéder aux valeurs de T2* et de susceptibilité magnétique (QSM : Quantitative Susceptibility Map), ce qui permet de détecter la présence de fer dans le tissu. L'acquisition 3D MGE a été systématiquement précédée d'une homogénéisation du champ magnétique par un shim de premier et second ordre. Cette séquence nécessite un post-traitement particulier qui a été réalisé par nos ingénieurs de la plateforme IRM.

1.6.2. Post-traitement : Obtention des cartes de susceptibilité et T2*

Le post-traitement QSM a été effectué sous Matlab à l'aide d'algorithmes développés par l'Université de Cornell (Wang and Liu, 2015). Tout d'abord, les images de phase sont « dépliées », puis une carte de champ magnétique est calculée. Afin d'obtenir une carte de champ local du cerveau, un masque du cerveau est nécessaire. Celui-ci est extrait des images de magnitude à partir d'une segmentation multi-atlas (Ma et al., 2014). L'élimination des perturbations de champ magnétique liées à l'environnement du cerveau est effectuée avec la méthode PDF (Projection onto Dipole Fields). Les cartes des variations de champ sont converties en cartes de variations de susceptibilité avec l'algorithme MEDI (Morphological-Enabled Dipole Inversion). Pour obtenir les cartes de T2*, l'inhomogénéité des images de magnitude est lissée avec l'algorithme N4ITK (Tustison et al., 2010). Puis les cartes T2* sont construites avec la tool box NiftyFit (Melbourne et al., 2016). Ces différents post-traitements permettent de détecter, de localiser et de quantifier la présence de fer libéré lors de la survenue de MHC au sein du tissu cérébral.

1.7. Immunohistochimie autour des microhémorragies cérébrales

Plusieurs approches immunohistochimiques ont été réalisées afin de mettre en évidence un impact potentiel des MHC sur le parenchyme. Dans un premier temps, nous avons voulu mettre en évidence une nécrose ou une souffrance cellulaire autour des MHC, notamment *via*

l'utilisation d'IP (iodure de propidium) ou encore de TTC (chlorure de triphényltétrazolium). Ces différentes techniques sont restées sans succès. En plus des approches histologiques, nous avons donc envisagé de détecter la présence de protéines sanguines produites par les mécanismes hémostatiques et potentiellement neurotoxiques au niveau des microvaisseaux cérébraux adjacents à la lésion. Pour cela, nous avons utilisé des techniques immunohistochimiques de simple et double marquage, et nous avons tenté d'observer la présence de thrombine, mais aussi du couple tPA (tissue Plasminogen Activator) et PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1), en parallèle d'un marquage des vaisseaux cérébraux par le biais du collagène de type IV. Enfin une évaluation de l'activation des astrocytes a été réalisée à l'aide d'un anticorps dirigé contre la GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein).

Toutes ces études immunohistochimiques ont été faites sur des coupes de 20 μ m et sur la base d'un protocole général adapté en fonction des différents anticorps utilisés (Tableau 12).

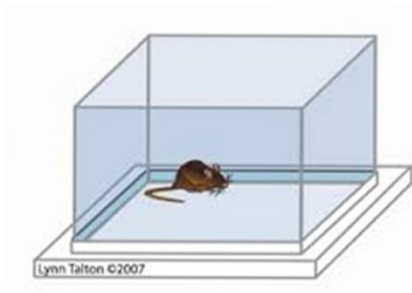
| Anticorps anti- | Référence | Espèce productrice | Dilution anticorps primaire | Dilution anticorps secondaire |
|---------------------|-----------------|--------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| Thrombine | Abcam-AB92621 | Lapin | 1/100 | 1/400 |
| Collagène-IV | Millipore-AB769 | Chèvre | 1/100 | 1/400 |
| PAI-1 | Abcam-AB28207 | Lapin | 1/400 | 1/400 |
| tPA | Abcam-AB28374 | Lapin | 1/400 | 1/400 |
| GFAP | Abcam-AB804 | Lapin | 1/200 | 1/400 |

Tableau 12 : Tableau résumant les différents anticorps utilisés. PAI-1: Plasminogen Activator Inhibitor-1. tPA : tissue Plasminogen Activator. GFAP: Glial Fibrillary Acidic Protein.

2. Evaluations comportementales

En considérant les zones cérébrales irriguées par le lit vasculaire sylvien et sur les tests validés au laboratoire, notre étude de l'effet fonctionnel des MHC a été réalisée par 3 tests comportementaux, moteurs et cognitifs (Figure 43). Ces tests ont été complétés dans certains cas par des tests d'anxiété et d'anhédonie afin d'évaluer des effets « psychologiques » potentiels des MHC.

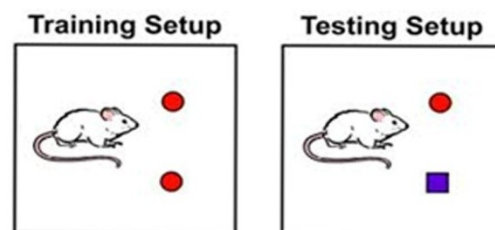
A: Actimétrie



Paramètres:

distance parcourue (cm)
resting time (temps d'inactivité en sec)
nombre de rearing (redressements)

B. Novel Object Recognition (NOR)



A: ancien objet B: nouvel objet T: temps d'exploration

Index: $(TB - TA) / (TB + TA)$

C. Alternance spontanée



Index: $\frac{\text{nombre d'alternances}}{\text{nombre de visites totales} - 2} \times 100$

Figure 43 : Test moteur (A. actimétrie) et tests cognitifs (B. NOR et C. alternance spontanée) réalisés chez les souris pour l'évaluation fonctionnelle des microhémorragies cérébrales.

2.1. Actimétrie

Ce test permet d'évaluer la locomotion spontanée des animaux. Ceux-ci sont disposés dans une enceinte de plexiglas de dimensions 45 x 45 x 35 cm, cerclée de deux rangées de capteurs à infrarouges d'une épaisseur de 1 cm. La première rangée de capteurs permet de mesurer tous les mouvements de motricité horizontale (locomotion), la deuxième rangée de capteurs (situés à 8 cm de hauteur) permet d'évaluer le nombre de fois où l'animal s'est redressé (*rearing*). Chaque test dure 10 minutes au cours desquelles les souris sont libres d'explorer le compartiment. Les différentes variables retenues sont la distance parcourue (en cm), la durée d'immobilité (en sec) et le nombre de redressements.

2.2. Novel Object Recognition (NOR)

Le NOR ou test de reconnaissance d'objet s'appuie sur la tendance naturelle des rongeurs à explorer préférentiellement un nouvel objet par rapport à un objet familier. Il permet d'évaluer la mémoire de reconnaissance visuelle. Après des périodes d'habituation à l'arène et aux objets, le test se déroule en 2 phases séparées d'une heure : une phase d'acquisition (15 minutes) où les souris explorent librement l'enceinte où ont été placés deux objets identiques A, et une phase de test (5 minutes) où les animaux explorent librement les deux objets différents A et B. Le temps d'exploration des deux objets est mesuré dans chaque phase. Pendant la phase d'acquisition, les animaux doivent explorer les objets au moins 20 secondes pour être inclus dans le protocole. Concernant la phase de test, les temps d'exploration de l'objet familier A (TA) et de l'objet nouveau B (TB) permettent de calculer un index d'exploration du nouvel objet de la manière suivante : $(TB - TA)/(TB + TA)$ (Antunes and Biala, 2012).

2.3. Alternance spontanée

Le test d'alternance spontanée permet d'évaluer la mémoire de travail qui consiste à retenir à court terme une information et de l'utiliser immédiatement pour exprimer un comportement approprié à la situation. Il s'appuie sur la tendance naturelle des rongeurs à explorer un nouvel environnement. Ce test se déroule dans un labyrinthe en forme de Y de dimensions 30 x 8 x 15 cm avec des bras identiques séparés d'un angle de 120°. Les trois bras sont notés A, B et C et les animaux sont laissés libres d'explorer les trois bras durant une période de 8 minutes. Le nombre de visites dans chaque bras ainsi que le nombre d'alternances est noté. Une alternance spontanée est définie comme trois entrées successives dans les trois bras du labyrinthe (ABC/BCA/ACB...). Les souris réalisant moins de 20 visites sont exclues du test. A partir de

cette succession de visites est calculé un score d'alternance selon la formule suivante (Hidaka et al., 2008) :

$$\frac{\text{Nombre d'alternances} \times 100}{\text{Nombre total de visites} - 2}$$

2.4. Tests d'anxiété et d'anhédonie

2.4.1. Labyrinthe en croix surélevé (*Elevated plus maze*)

Il s'agit d'un test simple et validé pour l'étude du comportement anxieux chez le rongeur. Il repose sur le conflit créé chez l'animal entre une tendance naturelle à explorer les environnements inconnus et l'anxiété générée par les espaces ouverts et les hauteurs (Walf and Frye, 2007). Il consiste à placer la souris au centre d'une croix constituant un labyrinthe surélevé à 50 cm du sol. Ce labyrinthe possède quatre bras dont deux sont fermés par des murs de 14,5 cm de haut et deux ouverts (Figure 44-A). Chacun des bras du labyrinthe a une longueur de 36,5 cm et une largeur de 6 cm. La souris aura donc la possibilité d'explorer l'un ou l'autre type de bras. La luminosité au dessus des bras ouverts est contrôlée et ne doit pas dépasser 200 Lux. La souris est laissée dans le labyrinthe pendant 10 minutes. Elle est ensuite remise dans sa cage puis le labyrinthe est nettoyé à l'éthanol avant d'y mettre la souris suivante. L'installation est munie de capteurs infrarouges reliés à une camera connectée au logiciel ETHOVISION préconfiguré pour la détection des mouvements de l'animal et la mesure des paramètres d'intérêt. Les paramètres les plus robustes qui ont été retenus pour la détection du comportement anxieux des animaux sont le pourcentage de temps passé dans les bras ouverts par rapport au temps total de l'expérience, ainsi que la fréquence d'entrées dans ces bras par rapport aux nombres d'entrées totales.

2.4.2. *Light and dark box (LDB)*

Le test Light/Dark box, qui rejoint celui de l'Elevated Plus Maze, repose sur le conflit chez la souris entre son aversion innée pour les espaces ouverts et trop lumineux et son comportement exploratoire l'incitant à découvrir de nouveaux milieux. Il s'agit d'un test qui évalue le comportement anxieux de l'animal et sa tendance à la prise de risque (Bourin and Hascoët, 2003). L'installation est une boîte de 42 x 21 x 25 cm constituée de deux compartiments. Le premier compartiment clair ou Light Box est une boîte cubique blanche, occupant les $\frac{2}{3}$ de la surface de boîte, éclairée à 400 Lux. Le second compartiment sombre ou Dark Box est un cube noir fermé et occupant le $\frac{1}{3}$ de la surface restante. Les deux compartiments sont reliés par une fente large de 4 cm et haute de 3 cm par laquelle la souris peut passer de l'un à l'autre

(Figure 44-B). L'animal est déposé dans le compartiment clair, et explore les 2 compartiments librement pendant 10 minutes avant d'être remis dans sa cage. L'installation est connectée au logiciel ETHOVISION qui est préconfiguré pour calculer les paramètres d'intérêt. Les paramètres les plus robustes qui ont été retenus pour la détection du comportement anxieux des animaux sont le pourcentage de temps passé dans le compartiment clair par rapport au temps total, ainsi que la fréquence de sorties vers le compartiment lumineux.

2.4.3. Test au sucrose (test d'anhédonie)

Ce dernier test vise à explorer chez l'animal une diminution de la recherche et de la sensation de plaisir c'est-à-dire une anhédonie. Ce comportement est surtout retrouvé chez les individus dépressifs et il est pertinent à rechercher car anxiété et dépression sont souvent comorbides en clinique (Strekalova et al., 2004). Le test est réalisé en 24 heures. Il nécessite la préparation d'une solution de sucrose à 1% dans de l'eau courante. Le premier jour, les souris sont placées dans des cages individuelles, sans nourriture mais avec deux biberons chacun étant rempli de 100 mL d'eau du robinet ou de la solution de sucrose (Figure 44-C). Préalablement au démarrage du test, tous les biberons et les souris sont pesés. Après 24h, les souris sont retirées des cages puis pesées et les biberons d'eau et de sucre également. Pour évaluer la préférence des souris pour la solution de sucrose, le ratio d'anhédonie suivant a été calculé comme étant le volume de sucrose consommé / (volume total de sucrose + eau). Un ratio plus élevé indique une plus grande préférence de la souris pour la solution de sucrose sur l'eau signe d'une absence d'anhédonie.

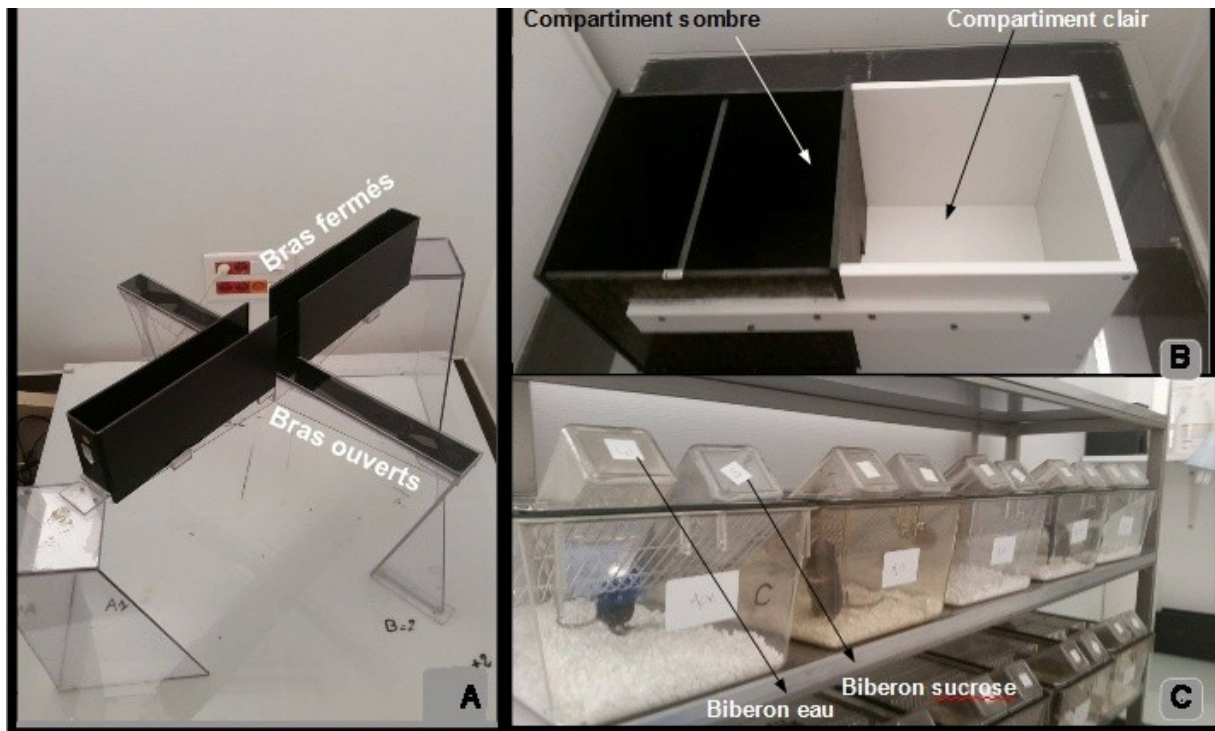


Figure 44 : Tests complémentaires évaluant l'anxiété (A. Elevated Plus Maze ; B. Light and Dark Box) et l'anhédonie (C. Test au sucrose) réalisés chez les souris pour l'évaluation fonctionnelle des microhémorragies cérébrales.

3. Etude des microhémorragies cérébrales à long terme

Une fois la méthode d'induction des MHC mise en place, nous avons souhaité voir l'évolution de ces MHC avec le temps, d'abord sur le plan fonctionnel, puis sur le plan histologique et mécanistique.

3.1. Groupes d'animaux

Pour étudier l'évolution des MHC et leur impact à long terme, nous avons utilisé des souris C57Bl6/J assez jeunes (12-15 semaines de vie) afin de limiter la mortalité potentielle due à l'âge. Les animaux sont de sexe mâle afin de s'affranchir de l'influence des hormones femelles sur les résultats. Nous avons constitué deux groupes d'animaux répartis en plusieurs sessions : des animaux injectés avec des CD (groupe MHC) comparés à des animaux injectés avec du sérum physiologique (groupe PHY).

3.2. Protocole expérimental

Quatre sessions de 10 animaux ont été utilisées pour cette étude, avec comme but principal d'étudier l'impact fonctionnel des MHC, mais aussi de mettre en évidence l'évolution des lésions et les différents mécanismes physiopathologiques potentiellement impliqués (inflammation, perturbations de l'hémostase locale...).

Ainsi à chaque temps d'étude post-induction, après 7 jours, 3-6-9 et 12 mois, des souris de chaque condition (PHY ou MHC) ont subi une série de tests comportementaux (moteur, cognitif et anxiété) puis ont été sacrifiées pour réaliser des études histologiques et immunohistochimiques selon les protocoles décrits précédemment.

4. Modulation des microhémorragies cérébrales par les anticoagulants oraux directs

4.1. Posologies

S'appuyant sur notre hypothèse que la survenue ou la sévérité des MHC pourrait être due, entre autre, à une perturbation du système de régulation homéostatique cérébral, nous avons évalué l'impact d'un traitement anticoagulant sur la survenue et la taille de ces lésions. Pour cela, nous avons testé trois anticoagulants oraux directs (AOD), soit avec une activité anti-Xa (apixaban, rivaroxaban), soit avec une activité anti-IIa (dabigatran), en comparaison avec le traitement anticoagulant oral de référence anti-vitamine K (AVK, warfarine) et un groupe véhicule (sérum physiologique).

Les doses et les fréquences d'administration de ces différents traitements ont été déterminées à partir d'études réalisées chez l'animal (Kono et al., 2014; Sun et al., 2013) mais aussi à partir des prises journalières en médecine de ville. Les groupes formés ont donc été les suivants :

- groupe Véhicule (Veh) : sérum physiologique (1x/jour)
- groupe Warfarine (War) : 0.2 mg/kg (1x/jour)
- groupe Apixaban (Api) : 2.5 mg/kg (2x/jour)
- groupe Rivaroxaban 1X (Riv1) : 2 mg/kg (1x/jour)
- groupe Rivaroxaban 2X (Riv2) : 2 mg/kg (2x/jour)
- groupe Dabigatran (Dab) : 10 mg/kg (2x/jour)

Notons une petite particularité concernant le rivaroxaban : il est prescrit la plupart du temps une fois par jour, mais il peut, dans certains cas comme lors d'une thrombose veineuse, être donné deux fois par jour. Au vu de ce constat, nous avons décidé de faire deux groupes de souris traitées au rivaroxaban, avec une posologie à une ou deux fois par jour (Riv1 et Riv2). Ceci nous a permis également de tester l'effet de deux prises par jour vs une prise par jour.

4.2. Dosages des activités plasmatiques

Afin de vérifier l'efficacité et la posologie des traitements administrés, nous avons effectué des prélèvements plasmatiques à différents temps et déterminé la cinétique d'activité des anticoagulants oraux. Pour cela, plusieurs protocoles expérimentaux ont été définis en fonction de la molécule d'intérêt et de son mécanisme d'action :

- *Dosage de la cinétique avec le Temps de Quick (TQ) pour le groupe Warfarine (0.2 mg/kg/j) et Véhicule (sérum physiologique)* (prélèvements effectués à 1h du gavage, 1 gavage par jour), avec 2 groupes en parallèle :
 - Groupe A : prélèvements à J3-J7 et J10
 - Groupe B : prélèvements à J5 et J9

Le TQ est un test de première intention qui permet d'explorer la voie extrinsèque de la coagulation (facteurs II, V, VII et X et le fibrinogène). Ce test est classiquement utilisé pour mesurer l'effet anticoagulant d'un AVK.

- *Dosage de l'activité anti-Xa ou anti-IIa pour les groupes AOD avec effet-dose* (Prélèvements effectués à 1h-6h (avant 2^{ème} gavage s'il y a) et à 24h du gavage après un traitement de 9 jours)
 - Groupe Apixaban : 3 doses testées : 1.25 mg/kg, 2.5 mg/kg, 5 mg/kg (2 gavages par jour)
 - Groupe Rivaroxaban : 3 doses testées : 1 mg/kg, 2 mg/kg, 4 mg/kg (1 gavage par jour)
 - Groupe Dabigatran : 3 doses testées : 10 mg/kg, 20 mg/kg, 50 mg/kg (2 gavages par jour)
 - Groupe Véhicule (sérum physiologique-1gavage par jour)

Pour évaluer l'effet anticoagulant de ces AOD, nous avons préféré une mesure de l'activité plasmatique des molécules. En effet, il apparait que la mesure de l'effet anticoagulant des AOD par les tests classiques tels que le TQ n'est pas efficace pour refléter l'efficacité de ces traitements (Adcock and Gosselin, 2015). Nous avons donc utilisé des tests plus spécifiques :

- pour le dosage de l'activité anti-Xa, nous avons utilisé un kit spécifique (Hyphen Heparin®) qui repose sur une méthode chromogénique dont le principe se base sur l'inhibition du facteur Xa (FXa) par des complexes de rivaroxaban (ou d'apixaban) :
 - $[riva] + FXa \text{ excès connu} \Rightarrow [Riva-FXa] + FXa \text{ résiduel}$
 - $FXa \text{ résiduel} + \text{substrat chromogène} \Rightarrow \text{coloration visible à } 405 \text{ nm}$
 - L'intensité de la coloration induite est inversement proportionnelle à quantité d'anti-Xa (expression en ng/ml).
- pour le dosage de l'activité anti-IIa, nous avons utilisé un autre kit spécifique (Hemoclot® Thrombin Inhibitors) qui repose sur la mesure d'un temps de coagulation par inhibition d'une quantité constante et définie de thrombine. Il utilise une courbe de calibration (expression en ng/ml).

4.3. Protocoles expérimentaux

Afin d'évaluer l'influence des AOD sur les MHC, nous avons réalisé deux protocoles différents (Figure 45) :

- un protocole à court terme qui vise à tester si la présence d'un traitement anticoagulant oral lors de la survenue de MHC peut transformer ces lésions en hémorragie plus conséquente, et ainsi avoir un impact fonctionnel chez les animaux. Pour cela, les animaux ont été traités pendant 10 jours, 3 jours avant l'injection de CD et 7 jours après. Les souris ont été traitées par gavage selon les posologies déterminées, et à la suite des 10 jours de protocole, elles ont subi des tests comportementaux avant d'être sacrifiées afin d'évaluer leur score microhémorragique cérébral.
- un protocole à long terme qui vise à évaluer l'impact des MHC, augmentées au non par un traitement anticoagulant oral, à long terme. Pour cela, le même protocole que celui appliqué à court terme a été réalisé, avec les mêmes groupes et les mêmes posologies, puis le traitement a été arrêté et les souris ont été évaluées tous les 3 mois par des tests comportementaux jusqu'à 12 mois où elles ont été sacrifiées et leur score microhémorragique déterminé.

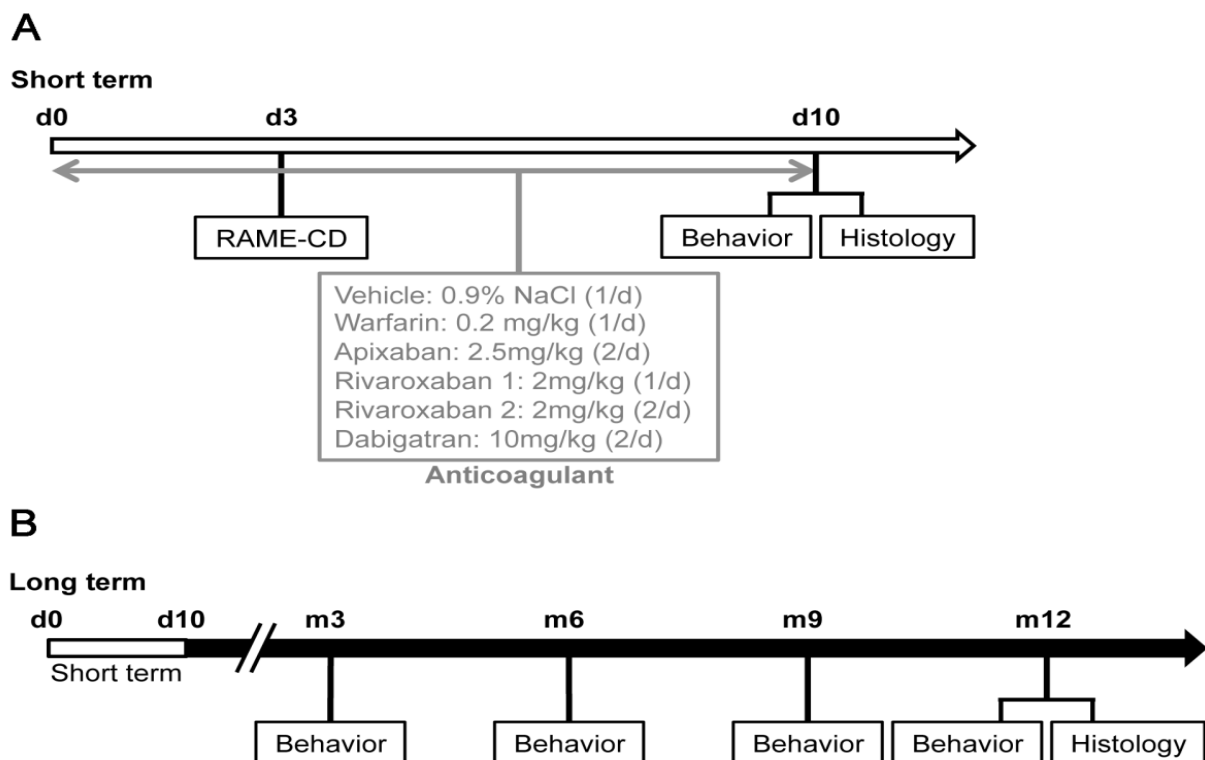


Figure 45 : Protocoles expérimentaux réalisés pour l'étude de l'influence des anticoagulants oraux à court terme (A) et à long terme (B).

5. Influence de perturbations métaboliques sur les microhémorragies cérébrales

5.1. Modèle murin de perturbations métaboliques

Nous avons développé au laboratoire un modèle murin de perturbations métaboliques reposant sur l'alimentation de souris C57Bl6/j par un régime enrichi en gras. Pour cela, des souris âgées de 8 semaines vont être soumises soit à un régime standard (diète normale A04-3% de lipides), soit à un régime enrichi en gras (diète 235HF-Safe, Augy, France) contenant 39.7% de lipides (32.4% de saindoux et 7.3% d'huile de maïs). Tous les animaux avaient accès *ad libitum* à l'eau et à la nourriture tout au long de l'étude.

5.2. Etude n°1 : caractérisation du modèle murin et étude cognitive et vasculaire

Dans un premier temps, nous avons caractérisé ce modèle murin de perturbations métaboliques. Ce travail, auquel j'ai participé au travers des expériences de caractérisation du SMet (suivi des animaux, prises de sang, OGTT, stéatose...), des évaluations comportementales et des mesures du débit sanguin cérébral (laser doppler), a fait l'objet d'un article soumis dans *Neurobiology of Disease* cette année et dont je suis en co-1^{er} auteur.

Pour cela, nous avons suivi 12 cohortes de souris (n=216) réparties en diète normale (*Normal Diet* ND, n=109) ou enrichie (*High Fat Diet* HFD, n=100), avec 7 souris mortes prématurément. Ces animaux ont été suivis sur une période de 12 mois avec pour but de caractériser la mise en place de désordres métaboliques, mais aussi d'étudier leur impact au niveau comportemental et vasculaire (Figure 46).

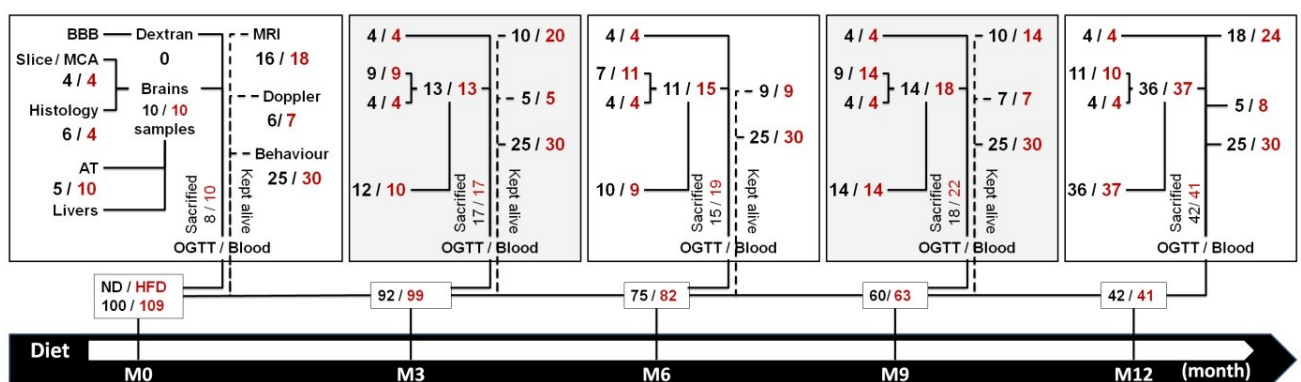


Figure 46 : Protocole expérimental visant à caractériser la mise en place de désordres métaboliques chez la souris et leur impact au niveau vasculaire et comportemental.

5.2.1. Caractérisation des désordres métaboliques

Dosages sanguins des triglycérides et du cholestérol

Aux différents points d'intérêt du protocole (0-3-6-9 et 12 mois de régime), les souris ont été anesthésiées à l'isoflurane (2%) afin de collecter du sang par un prélèvement rétro-orbital. Les taux de cholestérol total, de cholestérol non-HDL, de cholestérol HDL et de triglycérides plasmatiques ont ensuite été déterminés à l'aide de kits de dosage colorimétriques dédiés (ThermoFisher Scientific, Illkirch, France). Ces dosages ont été réalisés par l'équipe du professeur Anne Muhr-Tailleux (U1101) dans le cadre d'une collaboration.

Test de tolérance au glucose par voie orale (OGTT)

Après une nuit passée à jeun, la glycémie a été mesurée à l'aide d'un glucomètre (Accu-Chek® Performa, Roche Diagnostic, Mannheim, Allemagne). Pour cela, une goutte de sang a été récupérée au niveau de la veine caudale (Figure 47). Après cette mesure, les animaux ont été gavés avec une solution de glucose à la dose de 2 g/kg. Puis, la glycémie a été mesurée à 10, 20, 30, 60, 90 et 120 minutes. Afin de mieux appréhender les différences entre les groupes et les temps d'étude, des aires sous la courbe (AUC) ont ensuite été calculées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 5, (GraphPad Software Inc., La Jolla CA, USA).



Figure 47 : Mesure de la glycémie chez la souris après prélèvement sanguin à la veine caudale.

Poids du tissu adipeux viscéral

Après le sacrifice des animaux, les tissus adipeux péri-rénal, péri-gonadique et péri-inguinal ont été prélevés et pesés. La somme des tissus adipeux péri-gonadique et péri-rénal représente le tissu adipeux viscéral, le tissu péri-inguinal étant considéré comme une graisse témoin de la graisse sous-cutanée chez l'Homme.

Stéatose

Après le sacrifice des animaux, le foie a été prélevé et des biopsies ont été réalisées. Après une fixation du tissu dans une solution de paraformaldehyde (PFA) à 4% pendant 24h, les biopsies ont ensuite été déshydratées dans une solution de sucrose à 30%, enrobées dans une matrice adaptée (OCT®) puis congelées à -80°C. Les foies ont alors été coupés en tranches de 8 µm sur un cryostat et montés sur lame. La coloration de l'huile rouge (Oil Red O, ORO) a alors été réalisée afin de mettre en évidence les lipides neutres. Pour cela, les lames ont été immergées pendant 15 minutes dans une solution d'huile rouge à 0,5%, contre-colorées à l'hématoxyline pendant 5 minutes puis rincées à l'eau courante pendant 10 minutes. Par la suite, les coupes ont été observées sous microscope (DMR Leica DMLB, Allemagne) et photographiées à plusieurs niveaux. La densité optique de la coloration a ensuite été calculée à l'aide du logiciel ImageJ (Figure 48).

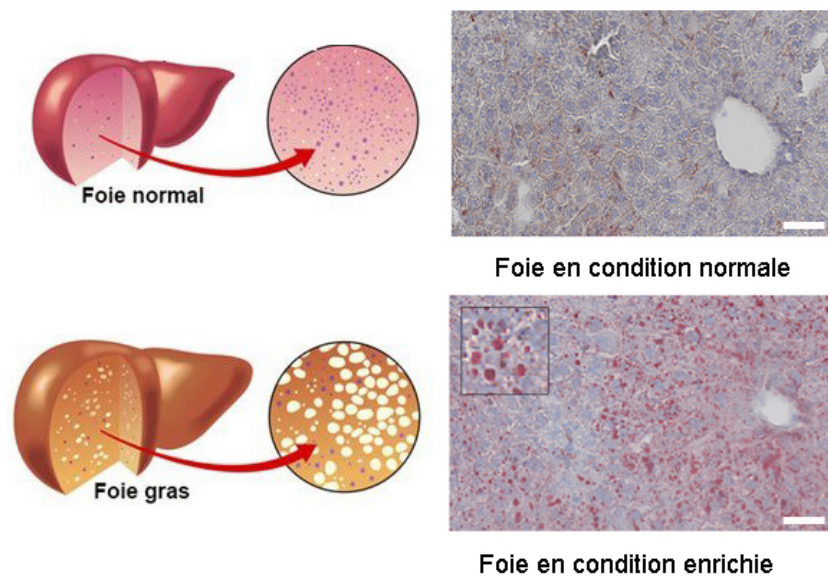


Figure 48 : Mise en évidence de la stéatose hépatique par la coloration à l'huile rouge. Barre : 50 µm

5.2.2. Etude des conséquences comportementales et vasculaires

Evaluations comportementales

Aux différents points d'intérêt du protocole (0-3-6-9 et 12 mois de régime), les souris ont été soumises à différents tests comportementaux moteurs (actimétrie) et cognitifs (alternance spontanée, NOR, Barnes). Les tests ont été réalisés toujours dans le même ordre selon le protocole décrit sur la figure 49.

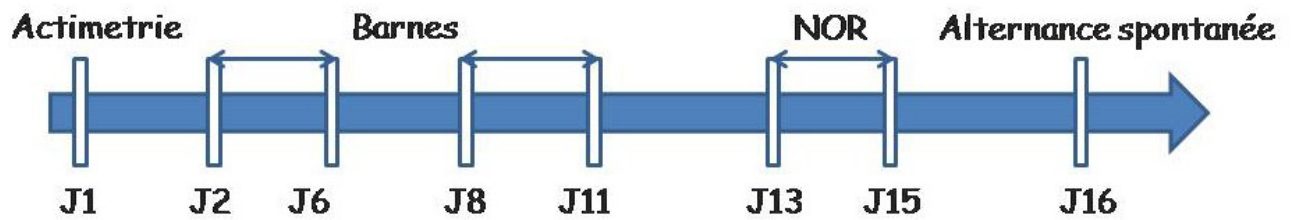


Figure 49 : Déroulé des différents tests comportementaux effectués à chaque temps d'évaluation de l'impact d'un régime enrichi chez la souris.

Les autres tests comportementaux ayant été décrits précédemment, je vais juste ici détailler le test du labyrinthe de Barnes qui permet d'évaluer la mémoire spatiale (semaine 1) et la flexibilité (semaine 2) chez la souris. Le protocole retenu au laboratoire est inspiré de celui décrit par Sunyer et collaborateurs en 2007 (Sunyer et al., 2007). Le matériel consiste en une plateforme blanche circulaire en PVC d'un diamètre de 122 cm et positionné à 80 cm au-dessus du sol. Quarante trous d'un diamètre de 5 cm sont disposés à intervalles réguliers à 4 cm de l'extrémité du cercle. Des repères spatiaux sont représentés sur les murs entourant le Barnes et ne sont pas déplacés ni modifiés tout le long de l'expérience. Une lumière aversive de 800 Lux éclairant le Barnes est utilisée afin de motiver les souris à trouver une cachette noire (22.9 x 5.3 x 8.6 cm) localisée en-dessous de l'un des trous. La plateforme circulaire est virtuellement divisée en 4 quadrants, incluant le cadran dit « cible » où se trouve la cachette et le cadran dit « opposé » situé à l'opposé du cadran cible. Le trou d'échappement où se trouve la cachette est assigné de manière randomisée à chaque souris tout le long de l'expérience (Figure 50).

Semaine 1 : Durant la phase d'acquisition (4 essais par jour avec 15 minutes entre chaque essai), la souris est placée au centre du labyrinthe à l'intérieur d'un cylindre opaque pendant 10 secondes. Puis la souris explore librement le labyrinthe et recherche la cachette jusqu'à un maximum de 3 minutes. Une fois que la souris est entrée dans la cachette, elle y est laissée pendant 1 minute afin de lui laisser le temps d'observer les repères spatiaux autour d'elle. Le 5^{ème} jour (jour du test), le labyrinthe est retourné de 45°C et la cachette retirée. La souris est laissée librement sur le Barnes pendant 90 secondes. Une caméra vidéo et un ordinateur muni du logiciel Ethovision XT 11.5 (Noldus) sont utilisés pour suivre et analyser les déplacements de l'animal au cours des différentes sessions. Le nombre d'erreurs totales (le nombre de trous visités avant que la souris n'entre dans le trou cible) est noté comme indice d'apprentissage pendant la phase d'acquisition. La mémoire de référence spatiale est évaluée en tant que temps

passé dans le quadrant cible (c'est-à-dire le quadrant centré sur le trou cible) et dans le quadrant opposé le jour du test.

Semaine 2: Après deux jours de repos, les souris subissent une 2^{ème} semaine de tests visant cette fois-ci à évaluer leur flexibilité. Les 3 premiers jours d'acquisition se déroulent de la même façon que celle décrite précédemment, mais l'emplacement de la boîte d'échappement pour chaque souris a été décalé de 180 °. Chacun des trois jours d'apprentissage comprend quatre essais. Le jour du test, le temps passé par la souris dans le quadrant cible et dans le quadrant opposé est mesuré pour évaluer la flexibilité cognitive.

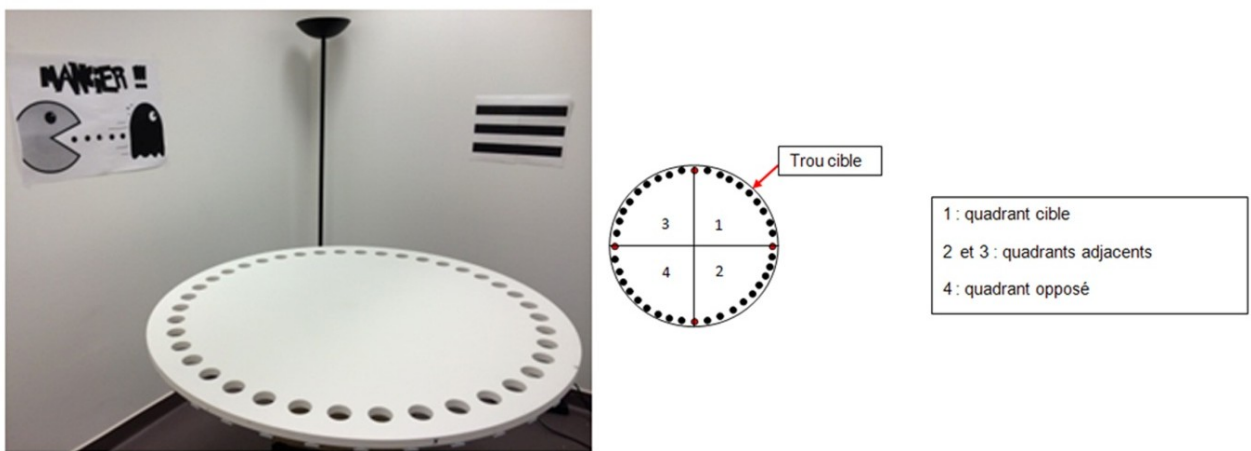


Figure 50 : Labyrinthe de Barnes chez la souris.

Acquisition et traitement IRM *in vivo*

Toutes les expériences ont été effectuées sur l'IRM 7T (Bruker, Ettlingen) disponible au sein de la plateforme d'imagerie du vivant de notre établissement. Les animaux ont d'abord été anesthésiés avec de l'isoflurane, puis placés dans la machine avec contrôle de la respiration et de la température corporelle en continu. Des images anatomiques ont ensuite été acquises à l'aide d'une séquence adaptée (séquence d'impulsions RARE à temps d'échantillonnage rapide, de TE_33 ms, de matrice_256_256, de FOV_2 cm_2 cm) sur l'ensemble du cerveau sur 20 tranches de 0,5 mm. Par la suite, une séquence de perfusion a été appliquée afin de mettre en évidence la perfusion cérébrale. Le principe de la quantification de la perfusion artérielle est fondé sur la différence entre les spins statiques de fond (signal magnétique global du cerveau) et les spins non statiques de sang magnétiquement « marqués » (inversion de spin

en amont). Le signal de récupération spécifique du sang dans les spins caractérise la vitesse d'approvisionnement en sang et peut être utilisé pour quantifier la perfusion cérébrale.

Evaluations vasculaires

Détermination du débit sanguin cérébral par laser-Doppler

Après anesthésie à l'isoflurane (2%), les souris ont été placées dans un cadre stéréotaxique (David Kopf Instruments). La température a été maintenue à 37°C à l'aide d'un tapis chauffant thermostatique (Panlab, Bioseb, Vitrolles, France). Le cuir chevelu a ensuite été écarté afin de mettre en évidence la boîte crânienne de l'animal. Une sonde laser Doppler (Perimed, Système Periflux[®], Stockholm, Suède) a été placée au-dessus du territoire gauche de l'artère cérébrale moyenne (ACM) (-0,1 à 1,10 mm rostrocaudal et 2-3 mm latéral à bregma) et laissée en place pendant deux minutes afin de mesurer le débit sanguin cérébral moyen de cette artère (Figure 51).

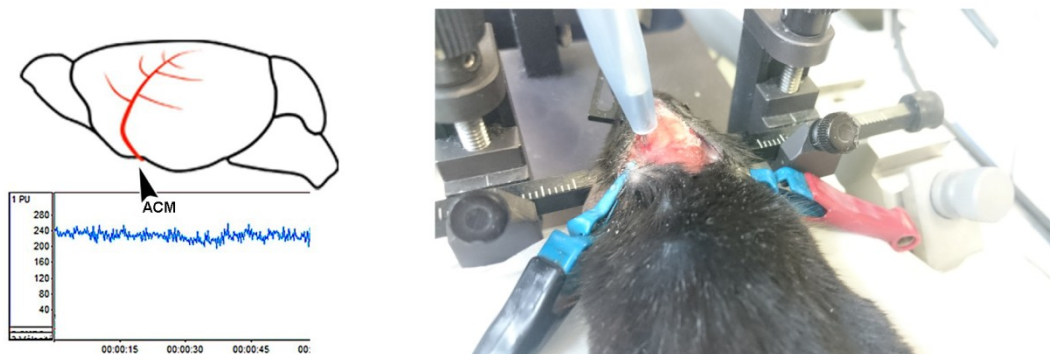


Figure 51 : Mesure du débit sanguin cérébral chez la souris à l'aide d'un laser Doppler. ACM : Artère Cérébrale Moyenne.

Analyse ex-vivo de la réactivité de l'artère cérébrale moyenne

L'analyse a été réalisée avec un artériographe d'Halpern (modèle CH/2/A, Living System Instrumentation). Deux canules de verre d'un diamètre d'environ 125 µm permettent de disposer une artère de petit calibre de 100 à 300 µm de diamètre. La canule proximale est connectée à un capteur de pression (P2) reliée à un contrôleur de flux qui se compose d'une micro-pompe péristaltique (P270, Instech) et d'une interface de contrôle de pression (Pressure Servo Control, Living System Instrumentation). La canule distale est fermée afin d'effectuer

l'analyse en l'absence de flux. Le système maintient la pression intraluminale constante. Après le montage de l'ACM, l'artériographe est disposé sur un microscope à focale inversée (Leica DMIL) équipé d'une caméra vidéo (Sony MPT-M308CE) reliée à une interface d'analyse de contraste (Video Dimension Analyser, modèle V94). Après étalonnage du système vidéo au moyen d'une cellule de Thomas gravée par tranches de 25 et 50 μm , le diamètre intraluminal et les épaisseurs droite et gauche de l'artère sont enregistrés sur cassette numérique (Biologic DTR 1205). Au circuit de perfusion intraluminale vient s'ajouter un second circuit permettant la perfusion de solution de Krebs maintenue à 37 °C dans la cuve de l'artériographe (Figure 52).

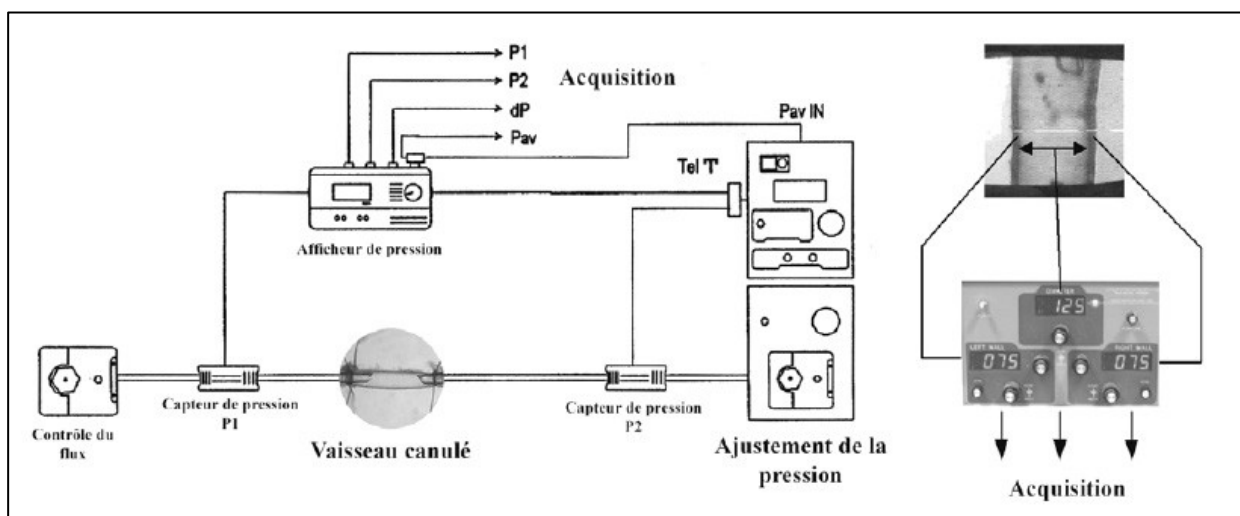


Figure 52 : Principe de l'artériographe d'Halpern.

La contraction maximale de l'artère a été testée avec de la phényléphrine (Phe) $3 \cdot 10^{-5}$ M. Pour évaluer la vasodilatation dépendante de l'endothélium, la réponse de dilatation maximale au carbachol (analogue stable de l'acétylcholine ; CCh) 10^{-4} M a été déterminée après précontraction avec de Phe $3 \cdot 10^{-5}$ M. Les résultats sont exprimés en % de contraction maximale en utilisant l'équation suivante : % de contraction maximale = $(\text{diamètre basal} - \text{diamètre Phe}) / (\text{diamètre basal}) \times 100$. Pour la vasodilatation dépendante de l'endothélium, les résultats sont exprimés en % d'augmentation par rapport au diamètre de l'artère précontractée en utilisant l'équation suivante : % de dilatation maximale = $(\text{diamètre CCh} - \text{diamètre Phe}) / (\text{diamètre basal} - \text{diamètre Phe}) \times 100$.

Analyse ex-vivo de tranches cérébrales

Après sacrifice des animaux, le cerveau a été retiré de la boîte crânienne et placé dans une chambre contenant une solution glacée de aCSF (en mM: 124 NaCl, 3,5 KCl, 2 MgSO₄ 1,25 NaH₂PO₄, 2CaCl₂, 26 NaHCO₃, 11 glucose, pH 7,4) alimentée en continu avec du carbogène (95% de O₂ - 5% de CO₂). Des tranches corticales et hippocampiques coronales ($\approx 300 \mu\text{m}$) ont été découpées sur un vibratome (World Precision Instruments, Stevenage, Royaume-Uni), puis déposées sur un tamis immergé dans une chambre de remplie de aCSF à température ambiante et alimentée en continu par les bulles de carbogène. Après 60 minutes, les tranches de cerveau ont été transférées dans une chambre de perfusion (Warner Instruments) et les vaisseaux sanguins ont été visualisés à l'aide d'un microscope vertical Leica DMLFS équipé d'un contraste interférentiel différentiel (DIC) et d'une caméra (COHU, Pieper GmbH, Düsseldorf, Allemagne ; Figure 53). Des vaisseaux présentant des structures rappelant les myocytes vasculaires, ayant un diamètre luminal discernable de $7 \pm 3 \mu\text{m}$ et pouvant être contrôlés pour leur intégrité sur une longueur de 100-150 μm ont été sélectionnés. Les études de vasoréactivité ont été réalisées à l'aide des mêmes molécules que celles utilisées au niveau de l'ACM, c'est-à-dire la Phe (3.10^{-5} M) pour l'évaluation de la contraction maximale et le CCh (10^{-4} M) pour évaluer la vasodilatation dépendante de l'endothélium. Les images de réponses vasculaires ont été acquises avec un logiciel d'image (Magix Video Terratec Edition[®], Berlin, Allemagne).

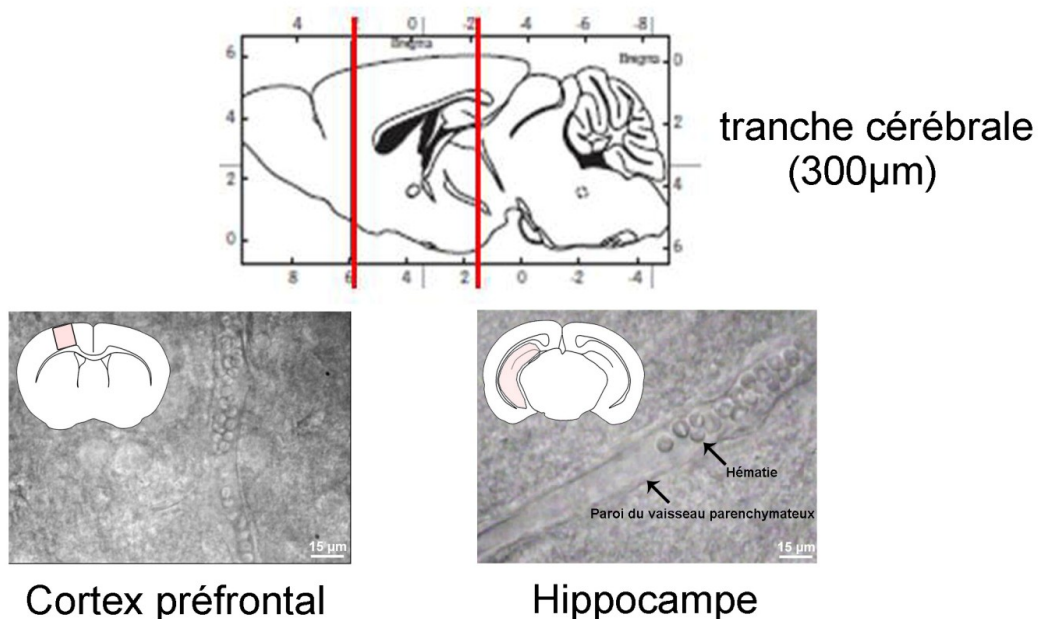


Figure 53 : Etude de tranches cérébrales au niveau du cortex préfrontal et de l'hippocampe de souris

5.3. Etude n°2 : Microhémorragies cérébrales et perturbations métaboliques

A partir de ce modèle de perturbations métaboliques développé chez la souris, nous avons voulu étudier l'influence de la présence de ces troubles sur l'étendue des MHC, mais également l'influence des MHC sur le déclin cognitif induit par un SMet. Dans ce contexte, plusieurs groupes d'animaux ont été réalisés (ND : *Normal Diet*, HFD : *High Fat Diet*) :

| Protocole | A | | B | |
|-------------------------------------|-------------------------------------|-----|--------------------------|-----|
| Impact du régime HFD | début de SM, pas de déclin cognitif | | déclin cognitif confirmé | |
| Régime | ND | HFD | ND | HFD |
| Age d'induction des MHC | 3 mois | | 12 mois | |
| Evaluations comportementales | 3-6-9-12 mois | | 12 mois | |

Les évaluations comportementales ont été les mêmes que celles utilisées lors de l'étude du syndrome métabolique seul (mise à part le test du labyrinthe de Barnes), c'est-à-dire le test de l'actimétrie pour la locomotion spontanée, et les tests de l'alternance spontanée et du NOR pour la cognition. Nous avons comparé le comportement des animaux avec lésions aux animaux ND ou HFD de la cohorte princeps.

Après 3 mois ou 12 mois de régime, les animaux ont été sacrifiés pour évaluer le score microhémorragique cérébral. De même, certains prélèvements ont été conservés pour réaliser des études histochimiques et immunohistochimiques.

Cinq groupes de 15 souris (7 ND -8 HFD) ont été utilisés pour le protocole A et trois séries de 15 souris pour le protocole B.

Résultats

Partie 1 : Safety of oral anticoagulants on experimental brain microbleeding and cognition

Les travaux réalisés sur la modulation des MHC par les anticoagulants oraux nous ont permis de rédiger un article soumis dans *Neuropharmacology* cette année et dont je suis 1^{er} auteur. Quatre anticoagulants oraux, un AVK (warfarine) et trois AOD (apixaban, rivaroxaban et dabigatran) ont été administrés par gavage au décours de la survenue de MHC induites par notre méthode d'induction par injection intracarotidienne de CD. Après avoir vérifié l'activité anticoagulante de nos différents traitements chez la souris, une évaluation comportementale puis histologique des poids microhémorragiques obtenus ont été réalisés à la fin de 10 jours de traitement (protocole « court terme »). En parallèle, d'autres souris ont subi le même protocole puis ont été évaluées au niveau fonctionnel tous les 3 mois jusqu'à 12 mois où les animaux ont été sacrifiés pour évaluer le poids microhémorragique cérébral à long terme (protocole « long terme »).

Les principaux résultats sont les suivants (les figures présentées sont composées à partir des figures de l'article pour illustrer les résultats principaux) :

- A court terme, seule la warfarine provoque des transformations hémorragiques, responsable d'une mortalité élevée. Les AOD augmentent le poids microhémorragique cérébral, principalement par une augmentation de la taille des MHC. Cependant, malgré cette augmentation, les évaluations comportementales ne montrent aucun impact moteur ou cognitif : les MHC restent silencieuses à court terme (Figure 54).

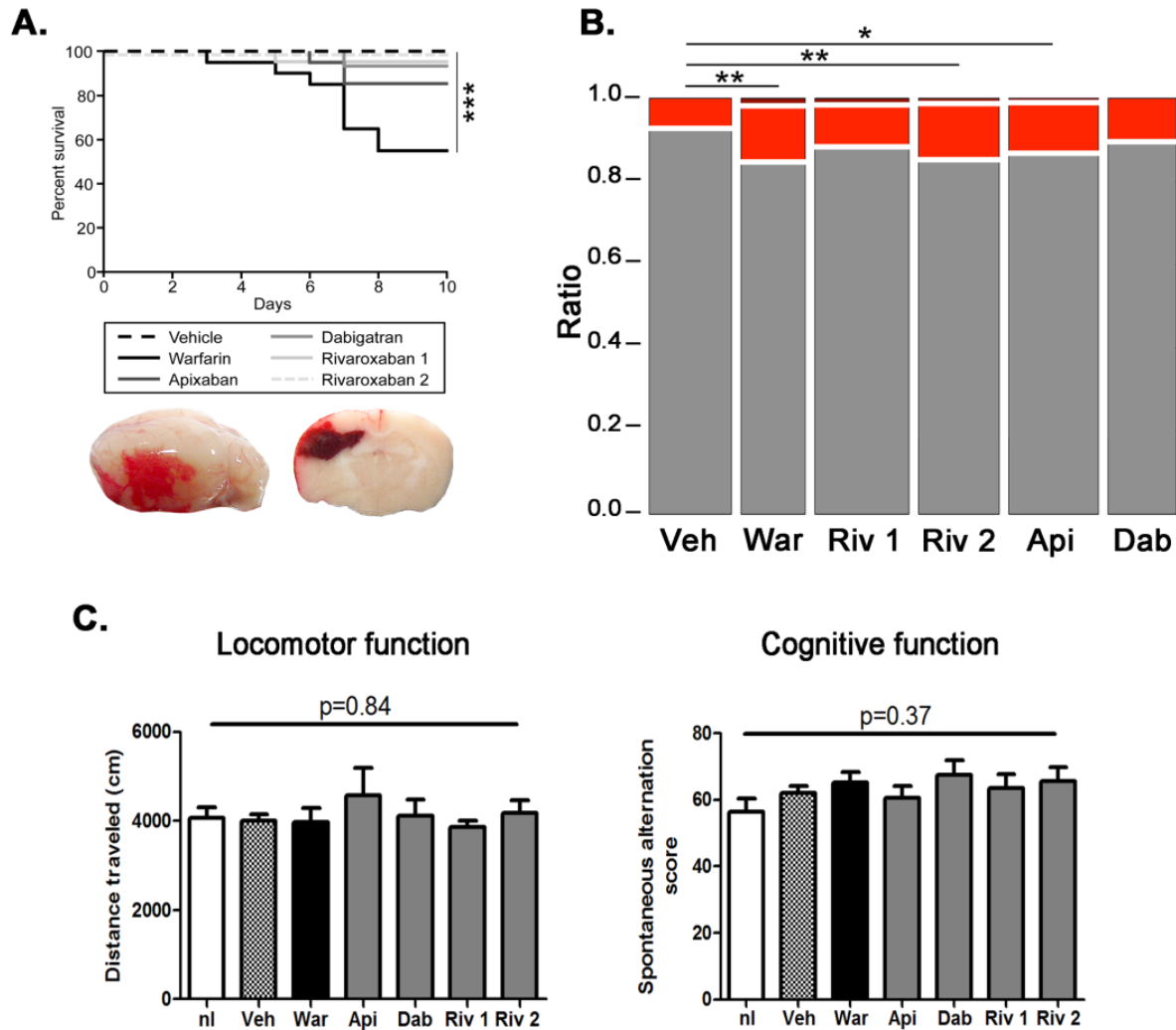


Figure 54 : Principaux résultats obtenus au cours de l'étude à court terme de l'impact des anticoagulants oraux lors de la survenue de microhémorragies cérébrales. A. Courbes de mortalité obtenues dans chaque groupe, avec un exemple de transformation hémorragique obtenue sous warfarine, *** : Mantel-Cox Test, $p < 0.001$. **B.** Profils microhémorragiques obtenus dans chaque groupe d'animaux, Pearson's Chi-squared test, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$. **C.** Absence d'impact locomoteur et cognitif à court terme pour chaque groupe de souris. $n = 8-15$ /groupe.

- A long terme, il n'y a pas d'évolution spontanée ni de transformation hémorragique des lésions, le nombre et la répartition des MHC restant sensiblement le même dans chaque groupe entre 10 jours et 12 mois. Au niveau comportemental, nous obtenons un déclin progressif de la mémoire de reconnaissance visuelle chez les souris avec MHC par rapport aux animaux sans lésion. En revanche, l'administration d'un traitement anticoagulant à court terme n'entraîne pas une précipitation de ce déclin quand le traitement est arrêté (Figure 55).

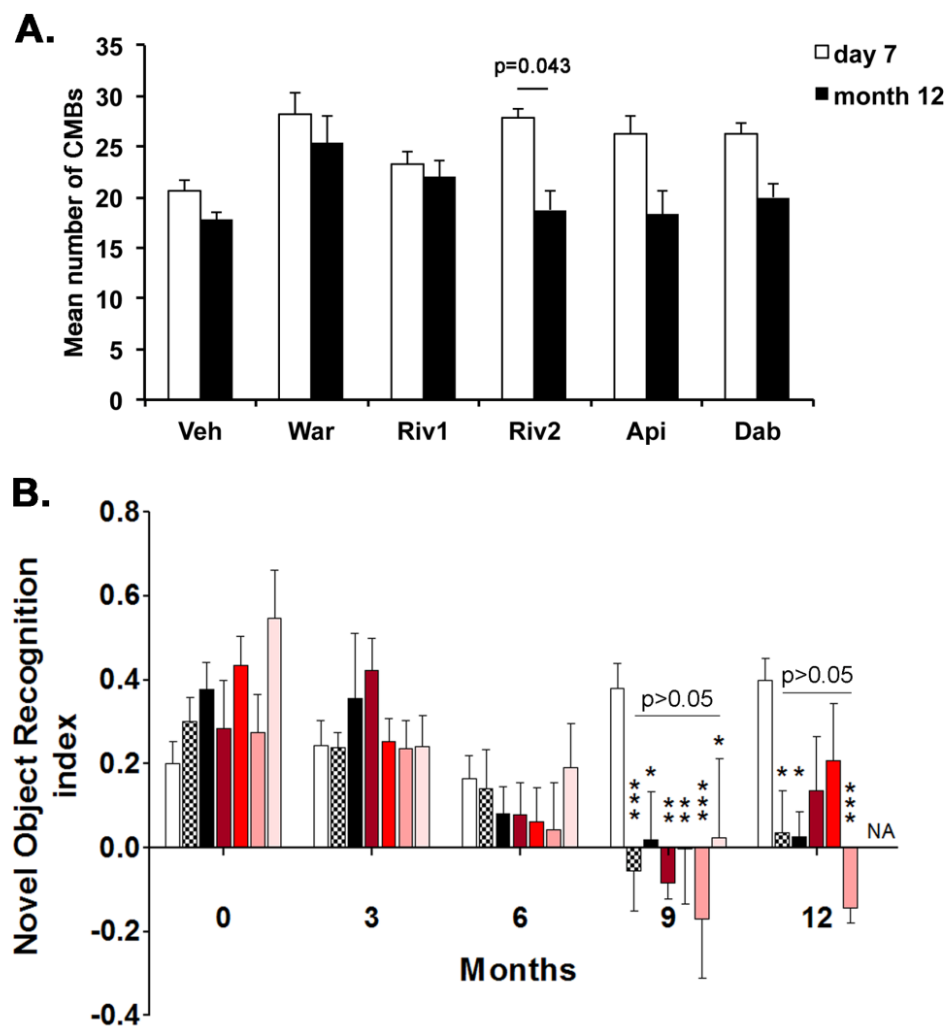


Figure 55 : Principaux résultats obtenus au cours de l'étude à long terme de l'impact des anticoagulants oraux lors de la survenue de microhémorragies cérébrales. **A.** Absence d'évolution et de transformation hémorragique des MHC à long terme, ANOVA 1 facteur, $p < 0.05$. **B.** Altération progressive de la mémoire de reconnaissance visuelle chez les animaux avec MHC, qui n'est pas précipitée chez les animaux ayant subi un traitement anticoagulant oral à court terme, ANOVA 2 facteurs, $*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$. $n = 3-12$ /groupe.

L'ensemble des résultats obtenus dans cette étude est résumé dans la figure ci-dessous :

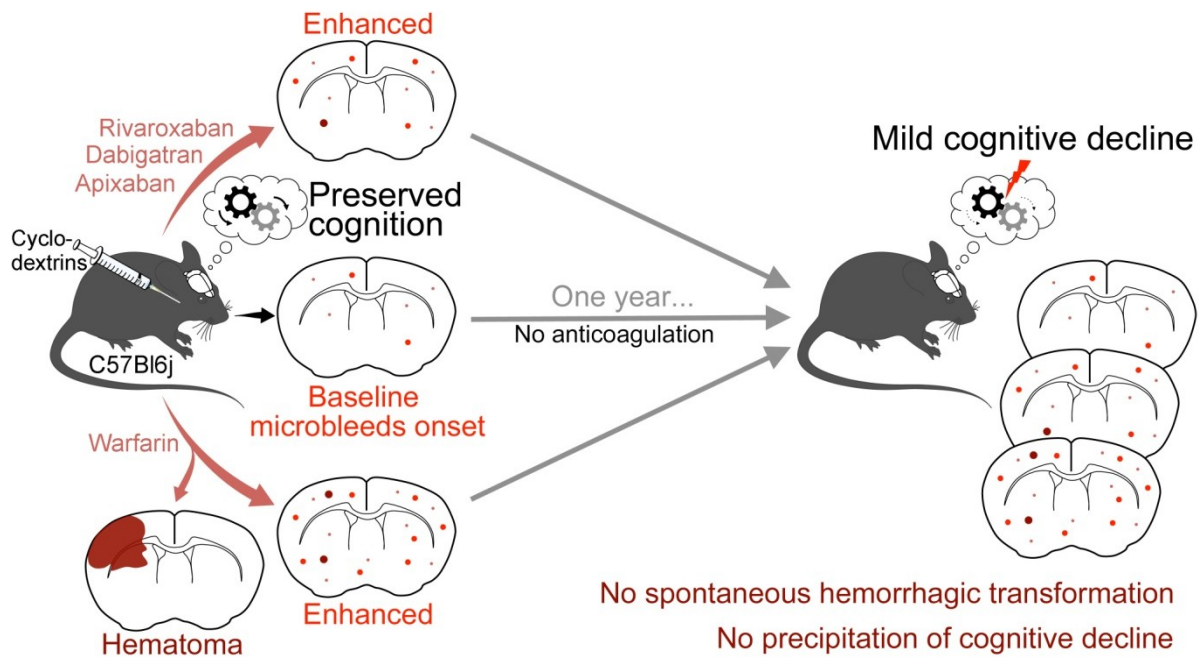


Figure 56 : Résumé graphique de l'ensemble de l'étude sur l'impact des anticoagulants oraux sur le poids microhémorragique cérébral de la souris à court et à long terme.

Partie 2 : Weight gain links cerebrovascular dysfunction to cognitive impairment in middle-aged mice

Les travaux réalisés au laboratoire pour développer un modèle de souris atteintes de perturbations métaboliques et pour explorer son impact au niveau vasculaire et comportemental ont permis de rédiger un article soumis dans *Neurobiology of disease* cette année et dont je suis co-1^{ère} auteur. Fondé sur le suivi et la caractérisation d'une cohorte de 216 animaux, nous avons pu mettre en évidence les principaux résultats suivants (les figures présentées sont composées à partir des figures de l'article pour illustrer les résultats principaux) :

- les perturbations métaboliques se mettent en place à partir de 3 mois, mais les réponses obtenues sont hétérogènes, même au sein du groupe contrôle. Des catégories de poids ont alors été déterminées afin de mieux caractériser les résultats obtenus (Figure 57).

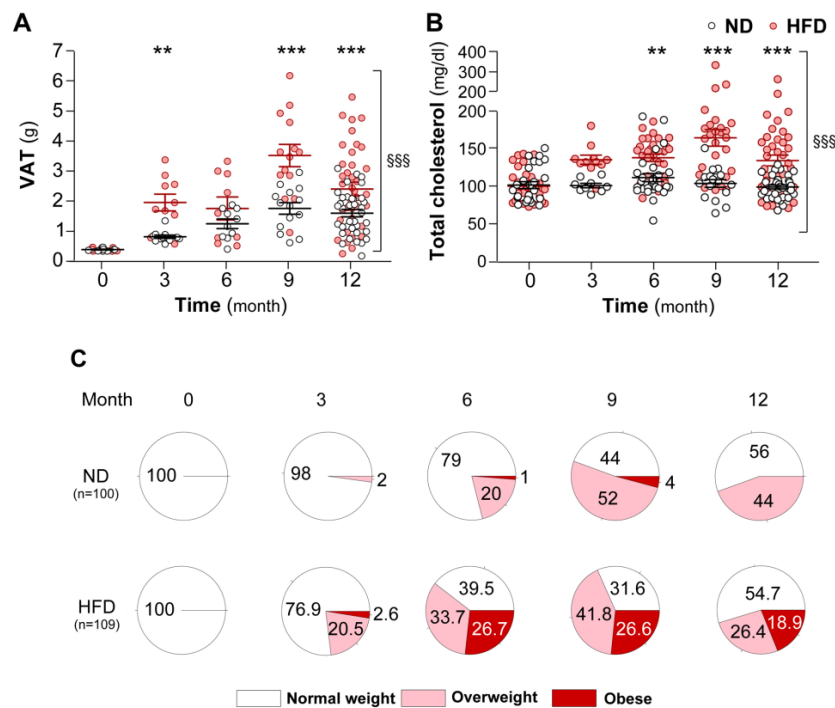


Figure 57 : Principaux résultats obtenus au cours de la caractérisation des troubles métaboliques induits chez la souris. A. Augmentation du tissu adipeux viscéral (VAT) en fonction du temps et de la diète, ANOVA 2 facteurs, ** p<0.01, ***p<0.001. B. Augmentation du cholestérol plasmatique total en fonction du temps et de la diète, ANOVA 2 facteurs, **p<0.01 ; ***p<0.001. C. Catégorisation des souris en fonction de leur poids. ND : Normal Diet. HFD : High Fat Diet.

- les études comportementales ont révélé une altération progressive de la mémoire de reconnaissance visuelle et de la flexibilité chez les animaux sous régime enrichi. De même, si l'on regarde les catégories de poids, ce déclin est d'autant plus marqué que le poids de la souris est important (Figure 58).

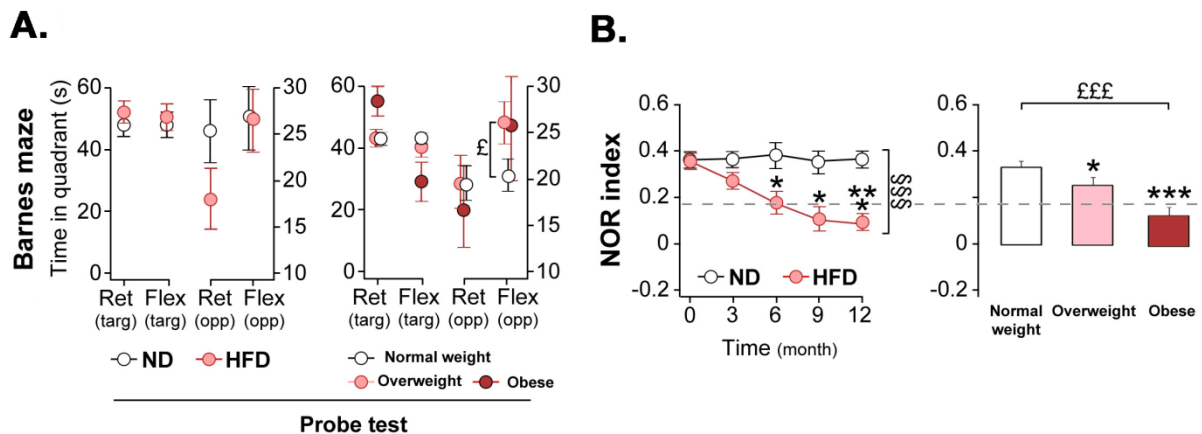


Figure 58 : Principaux résultats obtenus lors de l'évaluation comportementale des troubles métaboliques induits chez la souris. **A.** Evaluation de la mémoire spatiale et de la flexibilité grâce au test du labyrinthe de Barnes à 9 mois de régime enrichi ou en fonction des catégories de poids, Ret : *Retrieval task*, Flex : *Flexibility task*, Targ : *Target* : cadran cible. Opp : *Opposite* : cadran opposé. ANOVA 1 facteur £: $p < 0.05$. **B.** Altération progressive des performances dans le NOR en fonction du temps et de la diète, ANOVA 2 facteurs, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ou en fonction des catégories de poids, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, £££: $p < 0.01$. ND : *Normal Diet*. HFD : *High Fat Diet*

- la prise de poids est également associée à une dysfonction de la paroi vasculaire, à une dérégulation du débit sanguin cérébral et à une perte de perfusion tissulaire au niveau hippocampique. Cependant, aucune lésion cérébrale (microhémorragies, microinfarctus) n'a été observée (Figure 59).

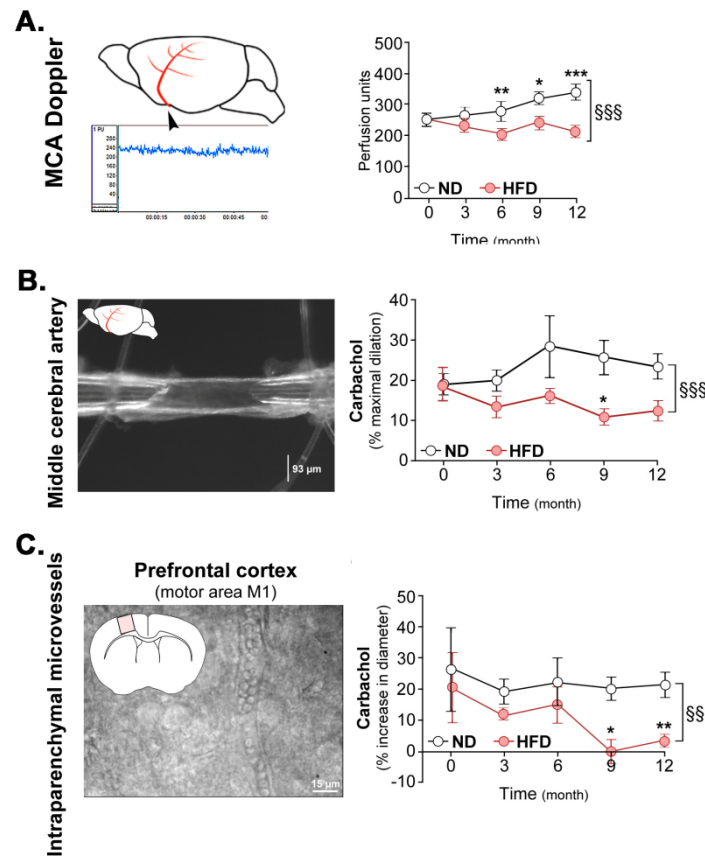


Figure 59 : Principaux résultats obtenus lors de l'évaluation vasculaire des troubles métaboliques induits chez la souris. A. Altération du débit sanguin cérébral visualisée par la technique du laser doppler au niveau de l'artère cérébrale moyenne (MCA) en fonction du temps et de la diète. ANOVA 2 facteurs * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, £££: $p < 0.001$. **B.** Altération de la relaxation endothélium-dépendante de l'artère cérébrale moyenne en fonction du temps et de la diète. ANOVA 2 facteurs * $p < 0.05$, £££: $p < 0.001$. **C.** Altération de la relaxation endothélium-dépendante des microvaisseaux intraparenchymateux en fonction du temps et de la diète. ANOVA 2 facteurs * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, £££: $p < 0.001$. ND: *Normal Diet*. HFD: *High Fat Diet*

- l'exploration statistique de ces résultats montre un déclin synchrone entre les déficiences cognitives et vasculaires. Cette collecte de données nous permet ainsi de proposer un modèle de prédiction statistique des troubles cognitifs, utilisant une combinaison entre la prise de poids et d'autres paramètres métaboliques et vasculaires pour le diagnostic des déficits neurologiques précoces.

L'ensemble des résultats obtenus dans cette étude est résumé dans la figure ci-dessous :

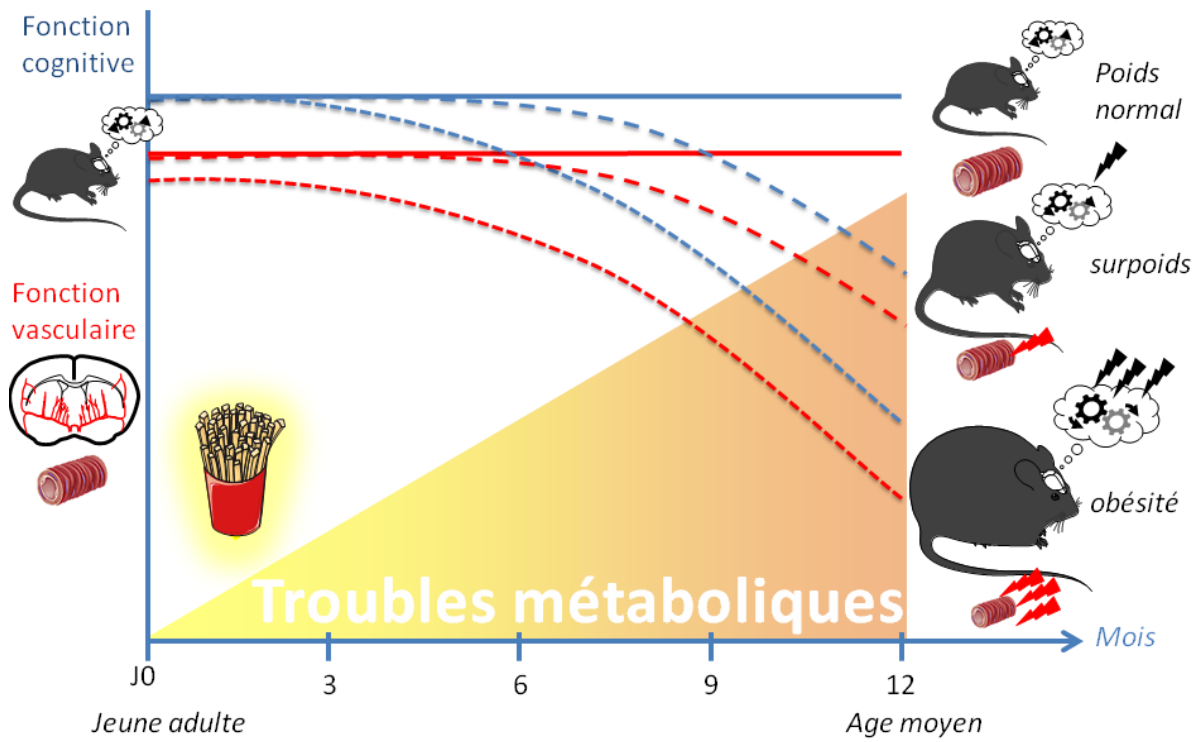


Figure 60 : Résumé graphique de l'ensemble de l'étude sur l'impact des troubles métaboliques sur la fonction cognitive et vasculaire à long terme.

Partie 3 : Impact des désordres métaboliques sur le poids microhémorragique cérébral chez la souris

A partir du modèle de perturbations métaboliques que nous avons développé chez la souris, nous avons étudié l'impact de la survenue de MHC dans un contexte de troubles métaboliques. Pour cela, nous avons effectué deux études distinctes : la première (protocole A) où l'induction de MHC a été réalisée à 3 mois de régime enrichi, où les troubles métaboliques sont tout juste installés ; la deuxième (protocole B), où les MHC ont été induites à 12 mois de régime enrichi, à l'âge moyen des souris et où les troubles vasculaires, cognitifs et métaboliques sont bien établis.

1. Protocole A : Induction des microhémorragies à 3 mois de régime enrichi

1.1. Courbes de survie

L'induction de MHC à 3 mois de régime n'induit pas une mortalité plus importante chez les animaux sous régime enrichi par rapport aux animaux témoins (Figure 61).

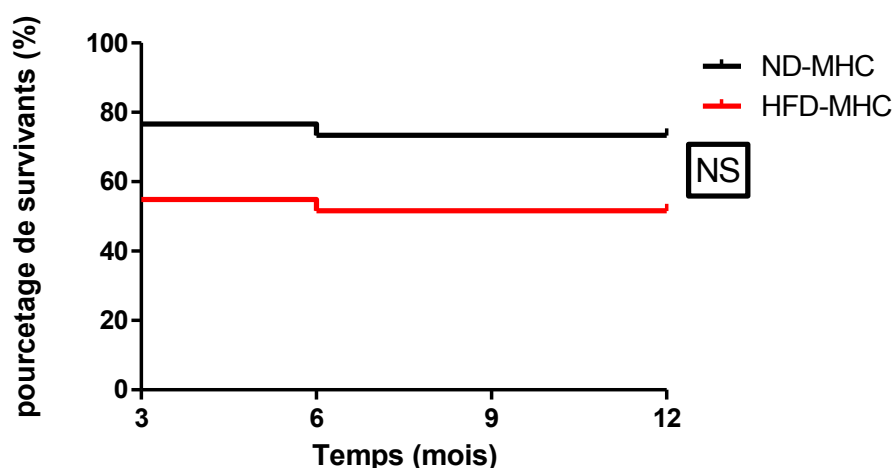


Figure 61 : Courbes de survie des animaux sous régime témoin ou enrichi en gras après survenue de microhémorragies cérébrales à 3 mois. n=35 ND -40 HFD. Test de Mantel-Cox : p=0,08.

1.2. Impact sur le poids microhémorragique cérébral à 3 mois (effet aigu)

Le nombre de MHC observées sur l'ensemble du cerveau n'est pas différent entre les animaux témoins (ND) et les animaux sous régime enrichi (HFD) après 3 mois (Figure 62-A). De même, les profils microhémorragiques ne semblent pas différents entre les deux groupes testés après 3 mois de régime (Figure 62-B).

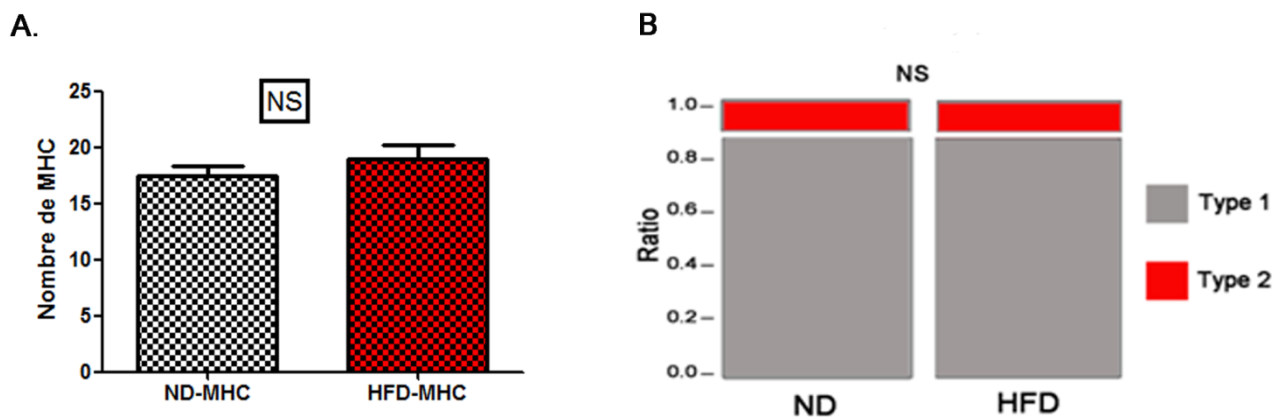


Figure 62 : Nombre de microhémorragies cérébrales (MHC) (A) et profils microhémorragiques (B) obtenus chez les animaux sous régime témoin (ND) ou enrichi en gras (HFD) après 3 mois de régime. Le ratio correspond au % de chaque type de microhémorragies. $n=7-8/\text{groupe}$. A : ANOVA 1 facteur, NS: $p=0,926$; B : Pearson's Chi-squared test, NS: $p=0,686$.

L'ensemble de ces résultats suggère que les désordres métaboliques présents à 3 mois de régime n'ont pas d'impact sur la survenue des MHC, que ce soit sur le nombre de lésions que sur le profil de CMH de tailles différentes.

1.3. Impact sur le comportement à 3 mois (effet aigu)

Les résultats présentés ci-dessous nous montrent les effets comportementaux de la survenue de MHC à 3 mois de régime et dont l'évaluation a été faite après les 7 jours nécessaires à l'apparition des lésions. Nous parlerons donc ici de l'effet aigu des MHC après 3 mois de régime.

1.3.1. Impact locomoteur

L'évaluation locomotrice a été réalisée grâce au test de l'actimétrie. Globalement, aucun impact locomoteur n'a été observé à ce stade du protocole, que ce soit en matière de distance parcourue (Figure 63-A) qu'en matière de temps d'inactivité (Figure 63-B). Nous retrouvons en revanche une augmentation significative du nombre de redressements chez les souris HFD-

MHC (Figure 63-C). Cet effet parallèle des MHC se rapprochant de l'état d'anxiété des animaux nécessite des études plus approfondies pour être confirmé.

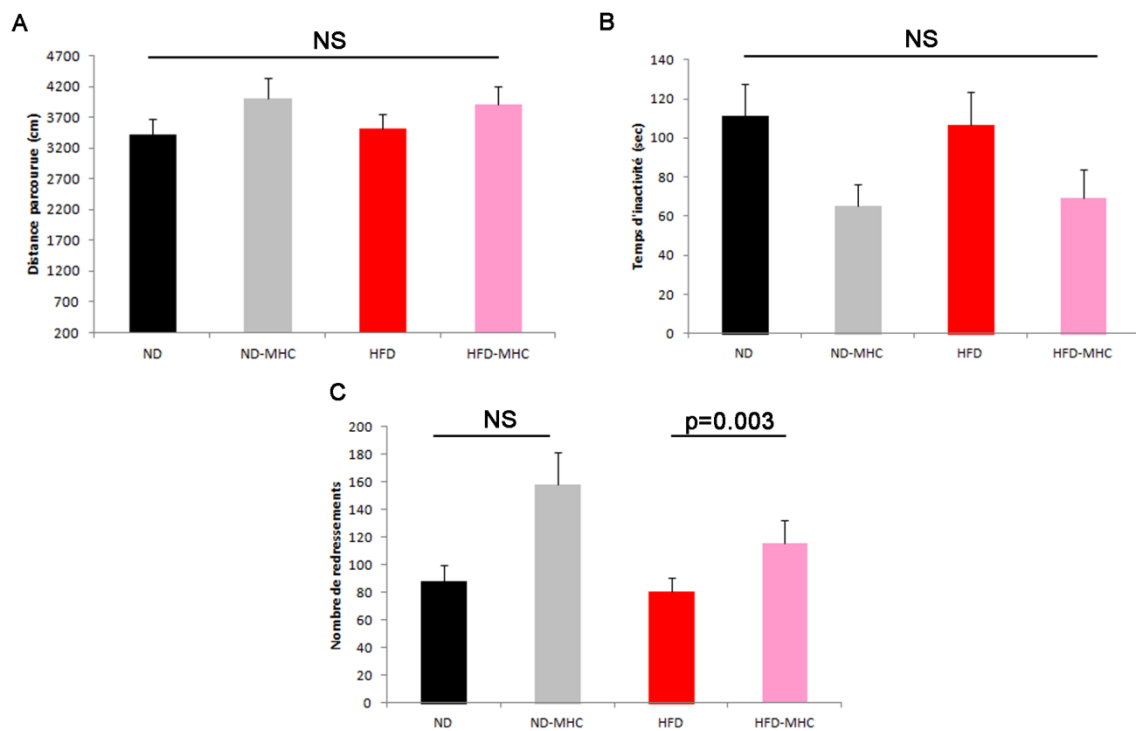


Figure 63 : Impact locomoteur de la survenue de microhémorragies cérébrales à 3 mois de régime (effet aigu). **A.** Distance parcourue (en cm), ANOVA 1 facteur, NS : $p=0,709$. **B.** Temps d'inactivité (en sec), ANOVA 1 facteur, NS : $p=0,805$. **C.** Nombre de redressements, ANOVA 1 facteur, NS : $p=0,292$. ND : *Normal Diet*. HFD : *High Fat Diet*. ND-MHC : *Normal Diet+microhémorragies cérébrales*. HFD-MHC : *High Fat Diet+microhémorragies cérébrales*. $n=7-20$ /groupe.

1.3.2. Impact cognitif

A propos du test du NOR, nous avons modifié les paramètres définissant l'index du test. En effet, nous avons été confrontés à une forte variabilité des résultats obtenus chez les souris sous régime gras avec MHC. Cette variabilité s'explique notamment par l'hétérogénéité de la réponse des animaux au régime, phénomène déjà constaté lors de notre étude princeps. Mais ici, faute de souris ($n=3-12$ /condition), il ne nous a pas été possible de catégoriser les réponses en fonction du poids. Nous avons donc décidé de normaliser l'index du NOR pour parler en pourcentage de performance par rapport aux souris témoins. Ainsi, nous avons pris les valeurs moyennes retrouvées dans notre groupe de souris témoin (ND-PHY) et nous avons rajouté l'écart-type afin de ne pas avoir de performances dépassant les 100%. Par la suite, chaque index obtenu a été normalisé par rapport à celle des souris témoins, puis multiplié par 100.

Ainsi, nous parlerons en % de fonction plutôt qu'en index de discrimination. Ce nouveau calcul nous a permis de réaliser des statistiques correctes et interprétables.

La survenue de MHC après 3 mois de régime ne semble avoir aucun impact cognitif, que ce soit sur la mémoire de travail (Figure 64-A) que sur la mémoire de reconnaissance visuelle (Figure 64-B).

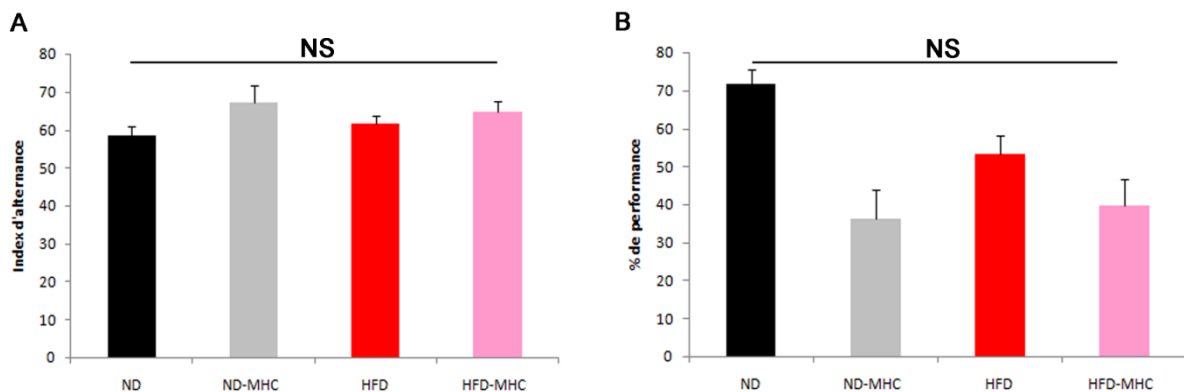


Figure 64 : Impact cognitif de la survenue de microhémorragies cérébrales à 3 mois de régime (effet aigu). A. Résultats obtenus dans le test de l'alternance spontanée, ANOVA 1 facteur, NS : $p=0,393$. B. Résultats obtenus dans le test du *Novel Object Recognition*, ANOVA 1 facteur, NS : $p=0,07$. ND : *Normal Diet*. HFD : *High Fat Diet*. ND-MHC : *Normal Diet*+microhémorragies cérébrales. HFD-MHC : *High Fat Diet*+microhémorragies cérébrales. $n=7-20$ /groupe.

L'ensemble de ces résultats nous montre que la survenue de MHC après 3 mois de régime enrichi reste asymptotique à la phase aiguë, aussi bien au niveau moteur que cognitif.

1.4. Evolution des microhémorragies après 12 mois de régime

Cette partie de l'étude a pour but d'évaluer l'évolution des MHC chez des animaux sous diète enrichie ou sous diète normale. Les lésions ont ainsi été induites à 3 mois de régime, puis les animaux ont été laissés en vie et évalués au niveau comportemental tous les 3 mois jusqu'à 12 mois où ils ont été sacrifiés et leur poids microhémorragique évalué. Les résultats obtenus sont décrits ci-dessous.

1.4.1. Poids microhémorragique à 12 mois

Le nombre de MHC observées chez les animaux injectés avec des CD à 3 mois de régime mais sacrifiés à 12 mois n'est pas différent entre les animaux témoins (ND) et les animaux

sous régime enrichi (HFD) (Figure 65-A). De la même façon, les profils microhémorragiques entre ces animaux ne semblent pas différents (Figure 65-B).

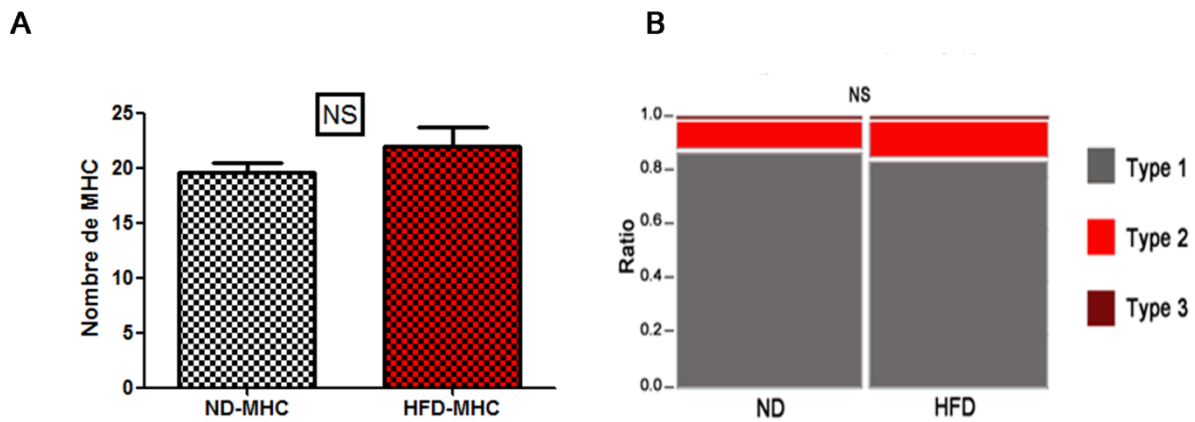


Figure 65 : Nombre de microhémorragies cérébrales (MHC) (A) et profils microhémorragiques (B) obtenus chez les animaux sous régime témoins (ND) ou enrichi en gras (HFD), avec des CD injectées à 3 mois de régime et sacrifiées après 12 mois.. Le ratio correspond au % de chaque type de microhémorragies. n=6-8/groupe. A : ANOVA 1 facteur, NS: p=0,772 ; B : Pearson's Chi-squared test, NS: p=0,084.

L'ensemble de ces résultats suggère que l'évolution des lésions n'est pas modifiée par la présence de troubles métaboliques induits par de la nourriture enrichie. La quantité et la gravité de ces lésions restent identiques quel que soit le groupe concerné.

1.4.2. Comparaison des profils entre 3 et 12 mois

Nous avons comparé le nombre de MHC et les profils microhémorragiques obtenus chez les animaux sous régime enrichi ou non, après une injection de CD à 3 mois et sacrifiés soit directement après les tests comportementaux (on parlera alors de poids microhémorragique à la phase aiguë) soit après 12 mois de régime (on parlera alors de poids microhémorragique à long terme).

Le nombre de microhémorragies observées à la phase aiguë de la survenue des MHC n'est pas significativement différent de celui obtenu chez les animaux à long terme, et ce quel que soit le régime alimentaire (Figure 66).

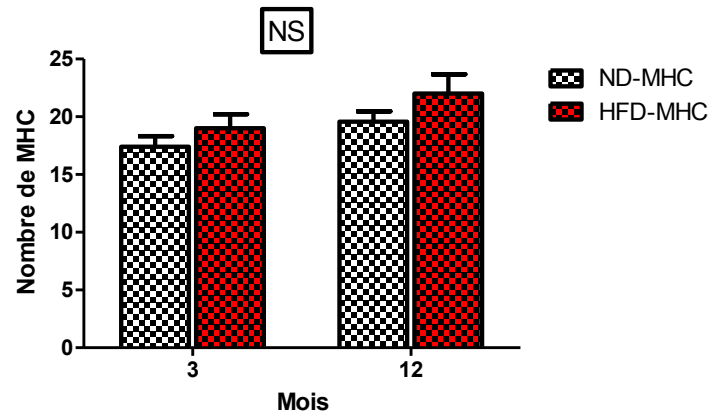


Figure 66 : Comparaison du nombre de microhémorragies cérébrales obtenu après injection de CD à 3 mois de régime entre les groupes sous régime témoin (ND-MHC) et enrichi (HFD-MHC) après 3 mois ou 12 mois de régime. $n=6-8/\text{groupe}$. ANOVA 1 facteur, NS: $p=0,298$.

De la même manière, le profil microhémorragique observé chez les animaux à 3 mois ou à 12 mois de régime n'évolue pas différemment selon le type de régime alimentaire donné aux animaux. Aucune différence significative n'est notée entre les groupes, quel que soit le temps ou le régime (Figure 67).

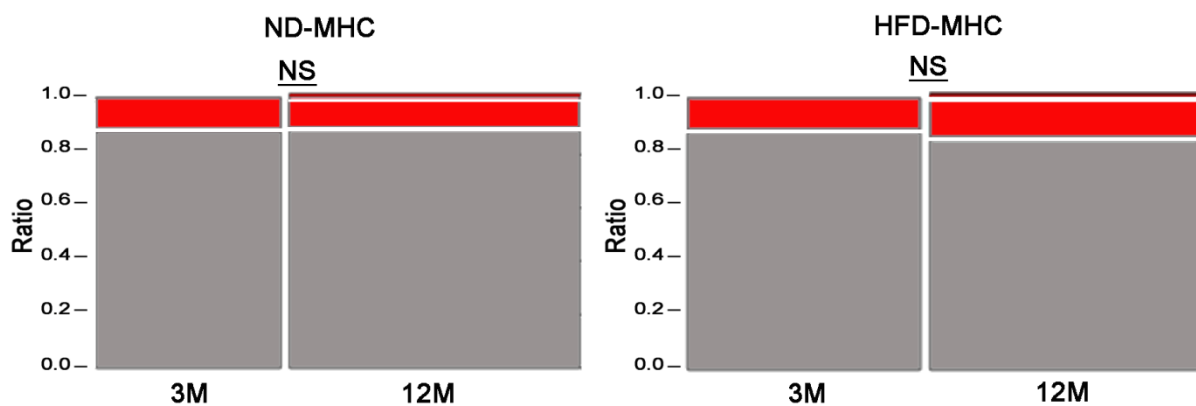


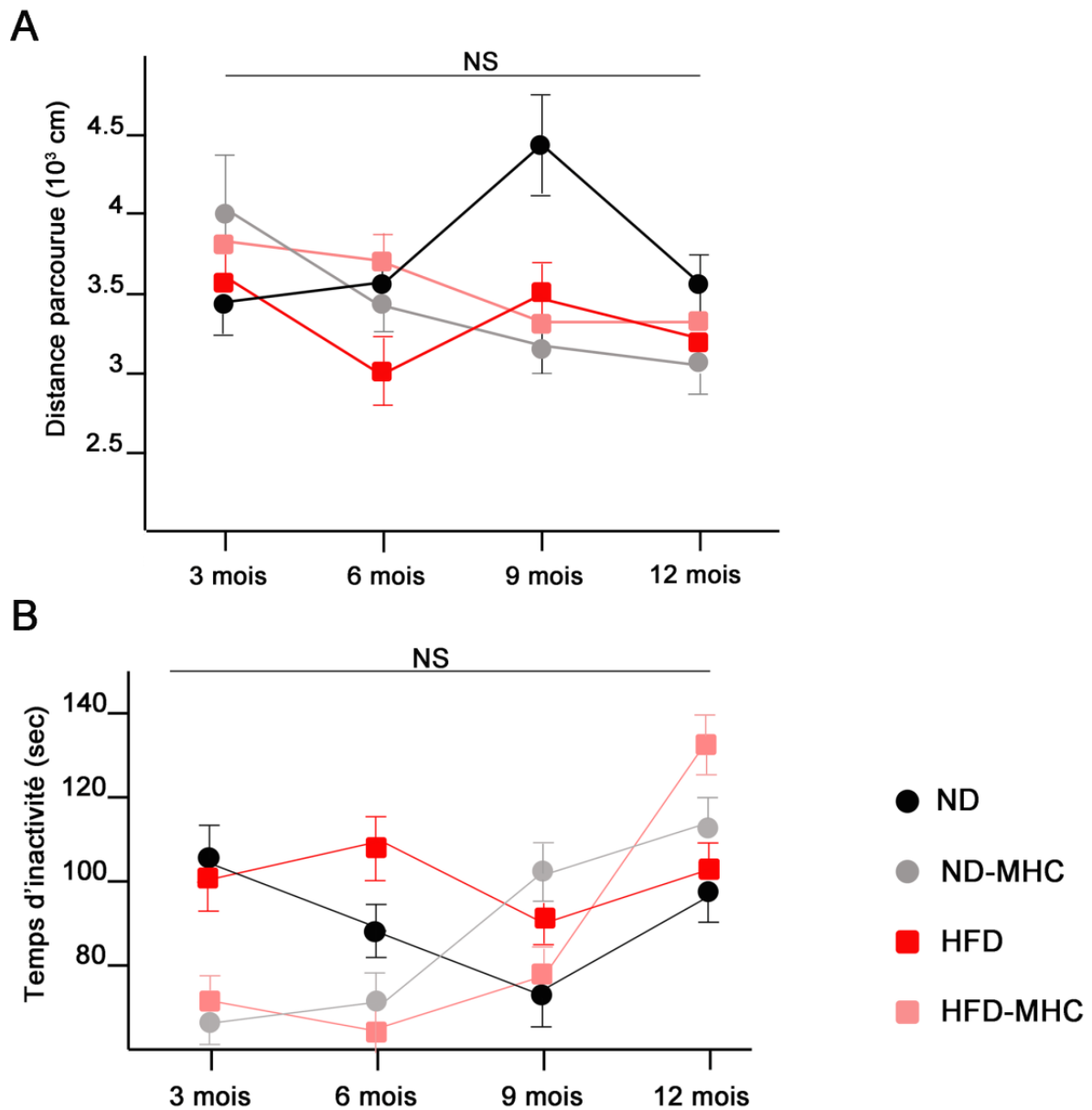
Figure 67 : Evolution des profils microhémorragiques obtenus après la survenue de microhémorragies cérébrales à 3 mois entre les groupes sous régime témoin (ND-MHC) et enrichi (HFD-MHC) après 3 mois ou 12 mois de régime. Le ratio correspond au % de chaque type de microhémorragies. $n=6-8/\text{groupe}$.

L'ensemble de ces résultats suggère que la présence de troubles métaboliques induits par un régime enrichi en gras n'interfère pas avec l'évolution des MHC, leur nombre ou leur taille restant identiques quel que soit le régime alimentaire donné.

1.5. Impact sur le comportement durant les 12 mois de régime

1.5.1. Evaluation locomotrice

Nous avons souhaité évaluer l'impact locomoteur de la présence de MHC à 3 mois de régime sur le comportement locomoteur jusqu'à 12 mois de régime. Cette étude, faite par le test de l'actimétrie, ne montre pas d'effet de la présence de MHC en matière de distance parcourue (Figure 68-A) ou de temps d'inactivité (Figure 68-B). En revanche, nous retrouvons encore une fois un effet de la présence de MHC sur le nombre de redressements, effet retrouvé chez les animaux ND ou HFD. Ce résultat parallèle se rapprochant de l'état d'anxiété des animaux, nécessite d'être approfondi.



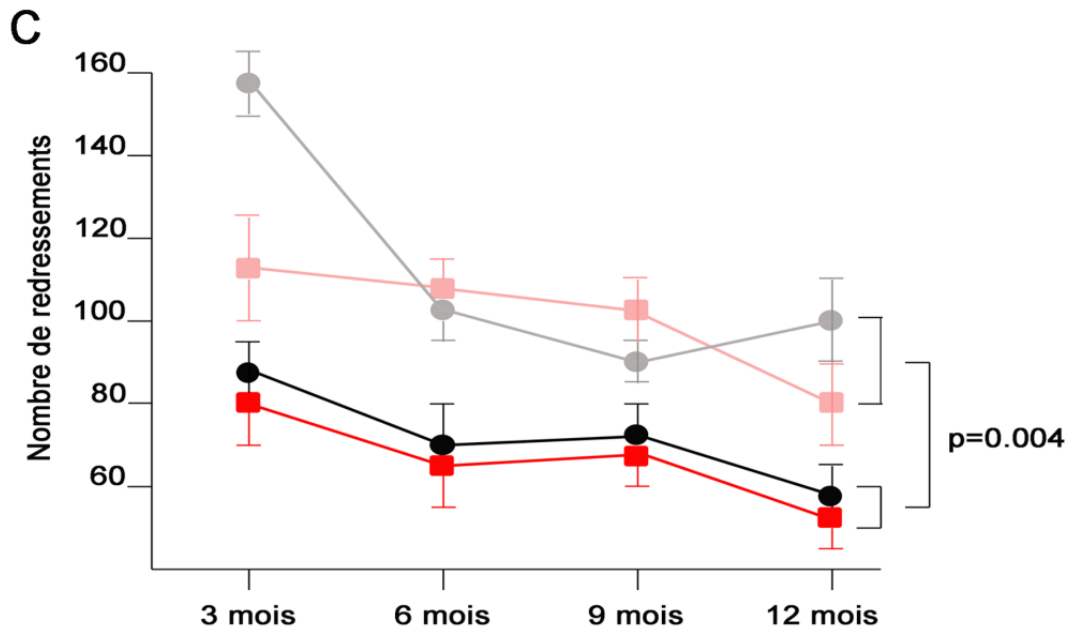
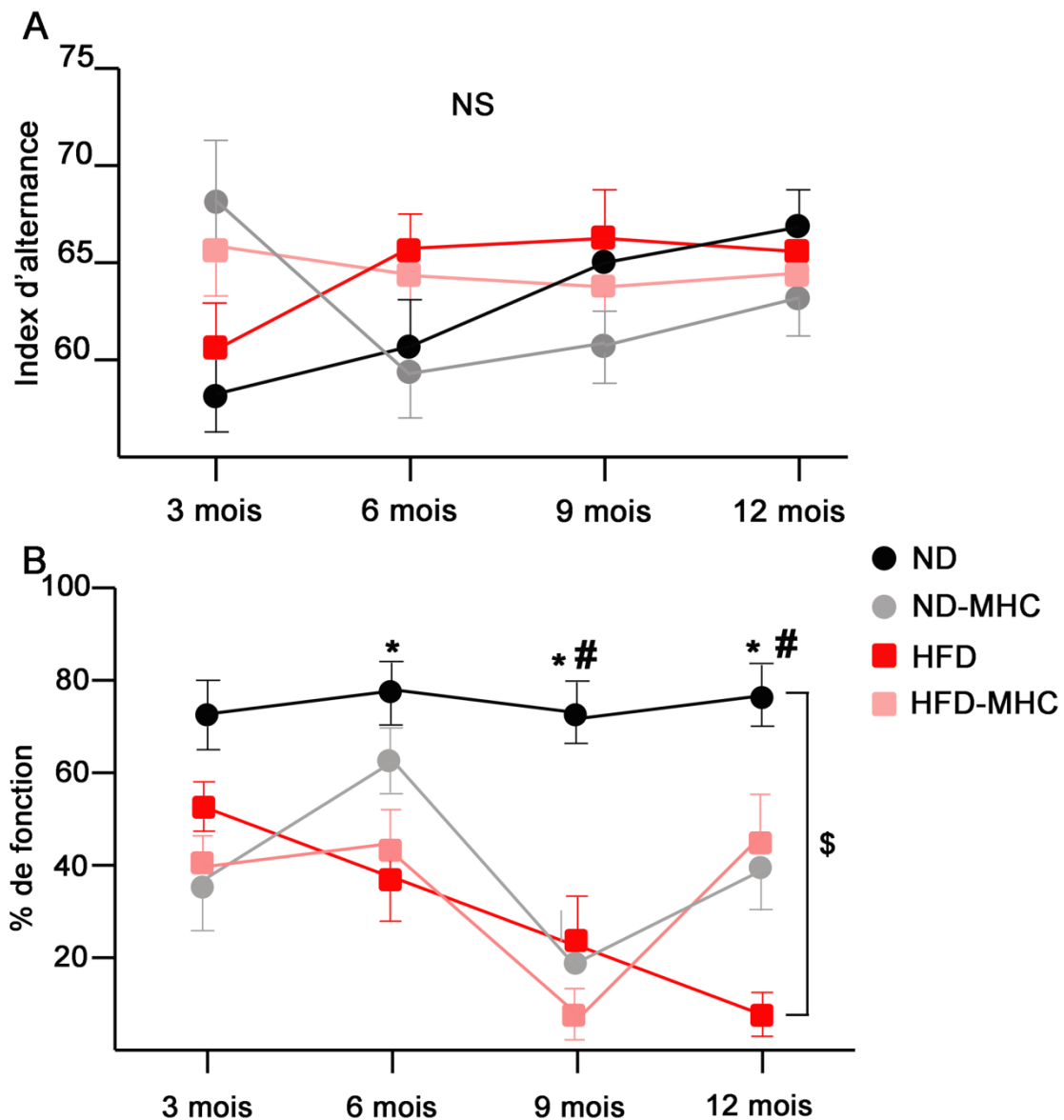


Figure 68 : Impact locomoteur à long terme de la survenue de microhémorragies cérébrales à 3 mois de régime. A. Distance parcourue (en cm), ANOVA 2 facteurs, NS : $p=0,08$. B. Temps d'inactivité (en sec), ANOVA 2 facteurs, NS : $p=0,671$. C. Nombre de redressements. ND : *Normal Diet*. HFD : *High Fat Diet*. ND-MHC : *Normal Diet+microhémorragies cérébrales*. HFD-MHC : *High Fat Diet+microhémorragies cérébrales*. $n=7-20$ /groupe.

1.5.2. Evaluation cognitive

L'étude à long terme ne montre pas de troubles au niveau de la mémoire de travail suite au test de l'alternance spontanée (Figure 69-A). Concernant la mémoire de reconnaissance visuelle évaluée par le test du NOR (Figure 69-B), nous retrouvons l'effet du régime seul, avec un déclin progressif de cette mémoire chez les souris HFD, devenant significatif à partir de 6 mois. Nous retrouvons également l'impact cognitif de la présence de MHC seules (groupe ND-MHC), avec un déclin significatif à partir de 9 mois. En revanche, la présence de MHC accompagnées de troubles métaboliques (groupe HFD-MHC) ne précipite pas le déclin cognitif induit par le régime enrichi.



6 mois: ND * $p < 0.05$ vs HFD

9 mois: ND * $p < 0.05$ vs HFD et ND-MHC; # $p < 0.01$ vs HFD-MHC

12 mois: ND *** $p < 0.001$ vs HFD; # $p < 0.01$ vs ND-MHC

§: effet-temps: $p < 0.001$

Figure 69 : Impact cognitif à long terme de la survenue de microhémorragies cérébrales à 3 mois de régime. A. Résultats obtenus dans le test de l'alternance spontanée, ANOVA 2 facteurs, NS : $p = 0,302$. B. Résultats obtenus dans le test du *Novel Object Recognition*. ND : *Normal Diet*. HFD : *High Fat Diet*. ND-MHC : *Normal Diet*+microhémorragies cérébrales. HFD-MHC : *High Fat Diet*+microhémorragies cérébrales. $n = 7-20$ /groupe.

2. Protocole B : induction des microhémorragies à 12 mois de régime enrichi

2.1. Mortalité

La mortalité observée lors de l'induction des MHC après 12 mois n'est pas différente entre les deux groupes (ND-MHC : 36.4%, HFD-MHC : 37.5%). Cette mortalité semble donc être due à l'âge des souris (15 mois de vie) plutôt qu'à leur régime alimentaire ou à l'induction des MHC.

2.2. Impact sur le poids microhémorragique cérébral

Contrairement aux scores microhémorragiques observés chez les animaux dont l'induction de MHC a été réalisée à 3 mois de régime, la survenue de lésions après 12 mois de régime enrichi en gras provoque un nombre significativement plus important de MHC par rapport aux animaux sous régime normal (Figure 70-A). En revanche, quand on regarde les profils microhémorragiques, qui prennent en compte la taille et la proportion des lésions observées, nous ne retrouvons pas de différence significative entre les souris sous diète enrichie et celles sous diète normale (Figure 70-B).

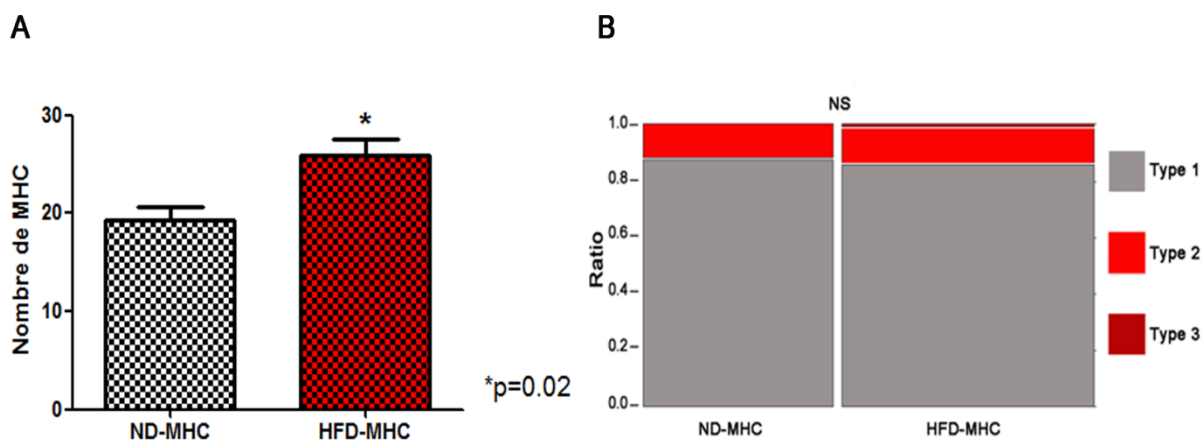


Figure 70 : A. Nombre de microhémorragies cérébrales (MHC) et B. Profils microhémorragiques obtenus chez les animaux sous régime témoin (ND) ou enrichi en gras (HFD), après induction de microhémorragies cérébrales à 12 mois de régime. Le ratio correspond au % de chaque type de microhémorragies. n=6-8/groupe. B : Pearson's Chi-squared test, NS : p=0,452.

L'ensemble de ces résultats nous montre que, contrairement à l'induction de MHC au début de l'installation de troubles métaboliques (à 3 mois de régime), la survenue de MHC à la fin

du protocole à 12 mois, quand les désordres métaboliques, cognitifs et vasculaires sont bien installés, provoque une augmentation significative du nombre de lésions par rapport aux animaux sous régime témoin, mais que cette augmentation n'entraîne pas de modification notable de la gravité des profils microhémorragiques obtenus. En revanche, cette augmentation ne s'accompagne pas d'une mortalité plus élevée chez les souris HFD-MHC.

2.3. Evaluations comportementales

Les résultats présentés ci-dessous nous montrent les effets comportementaux de la survenue de MHC à 12 mois de régime et dont l'évaluation a été faite après les 7 jours nécessaires à l'apparition des lésions. Nous parlerons donc ici de l'effet aigu des MHC après 12 mois de régime

2.3.1. Impact locomoteur

L'évaluation locomotrice a été réalisée grâce au test de l'actimétrie. Un impact significatif de la présence de MHC chez les souris sous régime enrichi (HFD-MHC) a été observé aussi bien en matière de distance parcourue (Figure 71-A) qu'en matière de temps d'inactivité (Figure 71-B). En revanche aucune modification n'a été obtenue concernant le nombre de redressements (Figure 71-C).

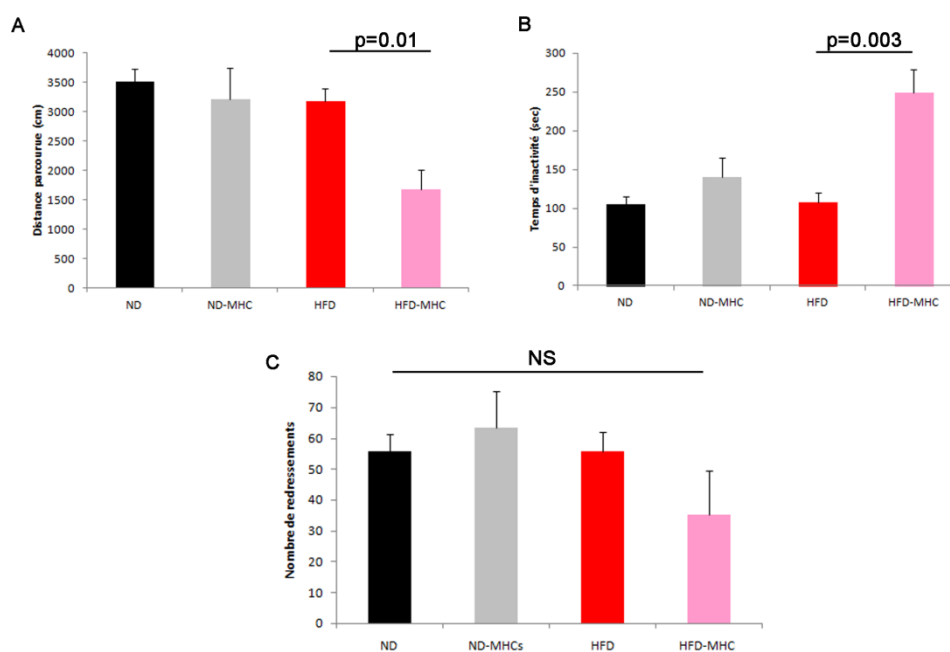


Figure 71 : Impact locomoteur de la survenue de microhémorragies cérébrales à 12 mois de régime (effet aigu). **A.** Distance parcourue (en cm). **B.** Temps d'inactivité (en sec). **C.** Nombre de redressements, ANOVA 1 facteur, NS : $p=0,123$. ND : *Normal Diet*. HFD : *High Fat Diet*. ND-MHC : *Normal Diet+microhémorragies cérébrales*. HFD-MHC : *High Fat Diet+microhémorragies cérébrales*. $n=7-20$ /groupe.

Ce résultat suggère que la survenue de MHC après 12 mois de régime enrichi induit des lésions qui deviennent symptomatiques.

2.3.2. Impact cognitif

La survenue de MHC après 12 mois de régime n'induit aucune perturbation de la mémoire de travail (Figure 72-A). De même, la présence de MHC ne modifie pas significativement les performances dans le test du NOR, quel que soit le régime donné aux animaux. En revanche, nous retrouvons l'effet des 12 mois de régime enrichi sur la mémoire de reconnaissance visuelle, avec une différence significative des performances des souris HFD et HFD-MHC comparés à celle du groupe témoin (ND) (Figure 72-B). Il faut cependant rester prudent à propos des résultats obtenus dans le groupe HFD-MHC car, étant donné la baisse significative des performances motrices des animaux concernés, seuls 2 animaux ont été en mesure de réaliser le test du NOR. Ces résultats nécessitent donc d'être complétés.

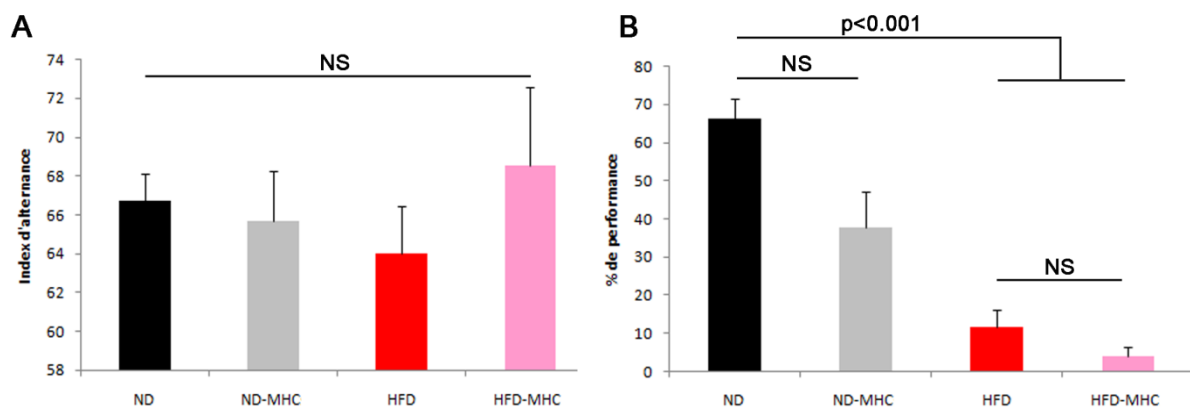


Figure 72 : Impact cognitif de la survenue de microhémorragies cérébrales à 12 mois de régime (effet aigu).
A. Résultats obtenus dans le test de l'alternance spontanée, ANOVA 1 facteur, NS : $p=0,325$. **B.** Résultats obtenus dans le test du *Novel Object Recognition*. ND : *Normal Diet*. HFD : *High Fat Diet*. ND-MHC : *Normal Diet+microhémorragies cérébrales*. HFD-MHC : *High Fat Diet+microhémorragies cérébrales*. $n=2-15$ /groupe.

Partie 4 : Etude des microhémorragies seules à long terme

1. Impact fonctionnel des microhémorragies

1.1. Impact moteur

Grâce au test de l'actimétrie, il nous a été possible d'évaluer la locomotion spontanée de nos animaux et ainsi de pouvoir mettre en évidence un impact potentiel des MHC sur la fonction motrice à long terme. Pour rappel, nous avons constitué deux groupes d'animaux, injectés soit avec du sérum physiologique (groupe témoin, PHY) soit avec des CD (groupe MHC). Nous avons suivi ces deux groupes sur les 12 mois qui ont suivi les injections avec une évaluation comportementale tous les 3 mois.

Concernant le test de l'actimétrie, les paramètres retenus ont été les suivants : distance parcourue (cm), temps d'inactivité (sec) et nombre de redressements. Ce dernier paramètre étant plutôt le reflet de l'état de curiosité et d'exploration de l'animal, nous le présenterons dans le paragraphe dédié à l'état d'anxiété. Les résultats obtenus sont résumés dans les graphiques ci-dessous :

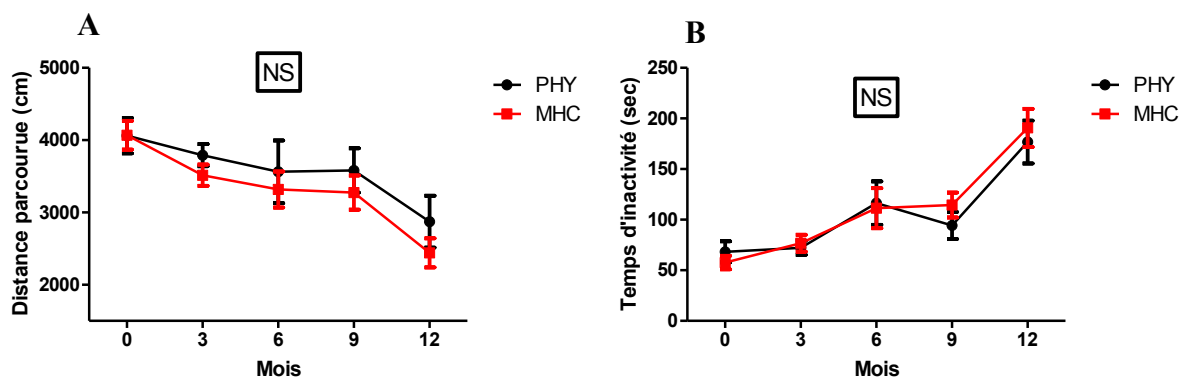


Figure 73 : Impact des microhémorragies cérébrales sur la fonction motrice des souris dans le test de l'actimétrie. **A.** Distance parcourue (en cm), ANOVA 2 facteurs, NS : $p=0,971$. **B.** Temps d'inactivité (en sec), ANOVA 2 facteurs, NS : $p=0,864$. PHY : Groupe témoin. MHC : Groupe avec lésions. $n=10-25$ /groupe.

Aucun impact de la présence de MHC n'est observé au niveau de la motricité spontanée des animaux, et cela se maintient avec le temps (Figure 73). Nous remarquons cependant que l'activité spontanée des souris diminue avec le temps, et ce quel que soit le groupe concerné. Cette baisse d'activité peut être imputée à l'âge vieillissant des animaux.

1.2. Impact cognitif

La mémoire de travail à court terme et la mémoire de reconnaissance visuelle ont été évaluées à long terme grâce aux tests de l'alternance spontanée et de la reconnaissance d'objet. Les résultats sont résumés dans les graphiques ci-dessous :

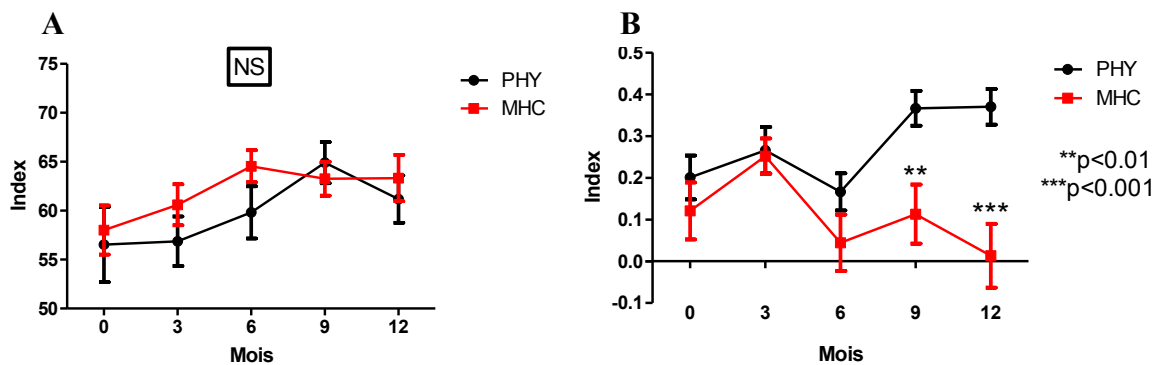


Figure 74 : Impact des microhémorragies cérébrales sur la mémoire de travail et la mémoire de reconnaissance visuelle des souris. A. Alternance spontanée ; ANOVA 2 facteurs, NS : p=0,642. B. *Novel Object Recognition*. PHY : Groupe témoin. MHC : Groupe avec lésions. n=10-25/groupe

Aucune modification de la mémoire de travail n'a été observée suite au test de l'alternance spontanée (Figure 74-A). En revanche, nous retrouvons un déclin progressif de la mémoire de reconnaissance visuelle, qui devient significatif à partir de 9 mois et s'accroît à 12 mois (Figure 74-B). La présence de MHC est donc capable d'induire à elle seule un déclin cognitif à long terme.

1.3. Impact sur le comportement anxieux et la motivation

Face au constat qu'un poids lésionnel vasculaire, comme l'AVC, pouvait contribuer à l'expression de troubles neuropsychiatriques, comme la dépression et un syndrome dysexécutif (caractérisé entre autre par un manque ou un excès des inhibitions), nous avons souhaité évaluer l'impact potentiel des MHC sur le comportement anxieux et la motivation chez nos animaux. En plus du test de l'actimétrie, nous avons utilisé des tests couramment

utilisés dans l'évaluation de l'anxiété chez l'animal. Les résultats sont résumés dans les graphiques ci-dessous :

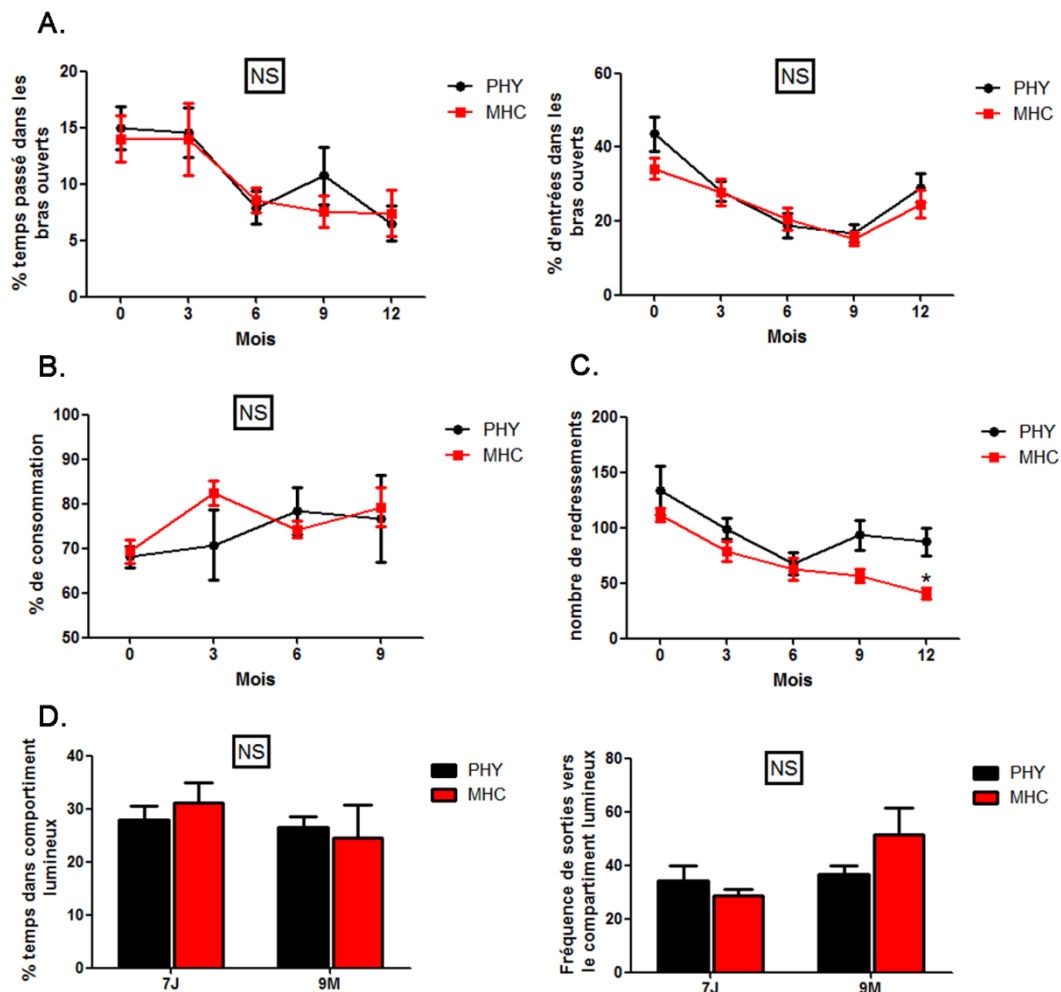


Figure 75 : Impact des microhémorragies cérébrales dans des tests d'anxiété et d'anhédonie. A. Labyrinthe en croix surélevé ; ANOVA 2 facteurs, % de temps passé : NS : p=819, % d'entrées : NS : p=512. B. Test du sucrose ; ANOVA 2 facteurs, NS : p=325. C. Nombre de redressements (test de l'actimétrie.). D. Light and Dark Box effectué à 7 jours et 9 mois post-injection. ANOVA 2 facteurs ; % de temps passé : NS : p=570, % de sorties : NS : p=154. n=3-25/groupe.

L'ensemble des tests réalisés ici ne montre pas d'effet majeur de la présence de MHC dans les phénomènes d'anxiété et d'anédonie (Figure 75). Et cela se maintient avec le temps. En effet, l'ensemble des paramètres reflétant une anxiété potentielle des animaux (le temps passé ou la fréquence d'entrées dans les bras ouverts ou les compartiments lumineux), un manque de motivation (nombre de redressements) ou une anhédonie (% d'eau sucrée consommée)

observés chez les animaux avec MHC ne sont pas différents de ceux mesurés chez les animaux témoins.

2. Evaluations histologiques et immunohistochimiques des micro-hémorragies

Nous avons souhaité étudier l'évolution des lésions microhémorragiques avec le temps et pour cela nous avons procédé à une étude longitudinale avec sacrifice des animaux à plusieurs temps après l'induction des lésions (7 jours, 3-6-9 et 12 mois). Ces travaux sont toujours en cours et les éléments présentés dans les sessions ci-dessous sont provisoires et nécessitent d'être complétés.

2.1. Evaluations histologiques

2.1.1. Colorations

Nous avons réalisé plusieurs types de colorations visant à mieux caractériser les MHC. Ainsi, à chaque temps, nous avons effectué la coloration à l'hématoxyline-éosine (HE) pour voir la qualité du tissu cérébral autour des lésions, la coloration de Perl's pour détecter le fer de l'hémosidérine lors de la survenue des MHC, et la coloration au DAB (diaminobenzidine) qui permet de voir les hématies (intactes ou lysées) libérées lors de la formation des MHC. Des exemples de lésions observées sont rassemblés dans la figure 76 ci-dessous.

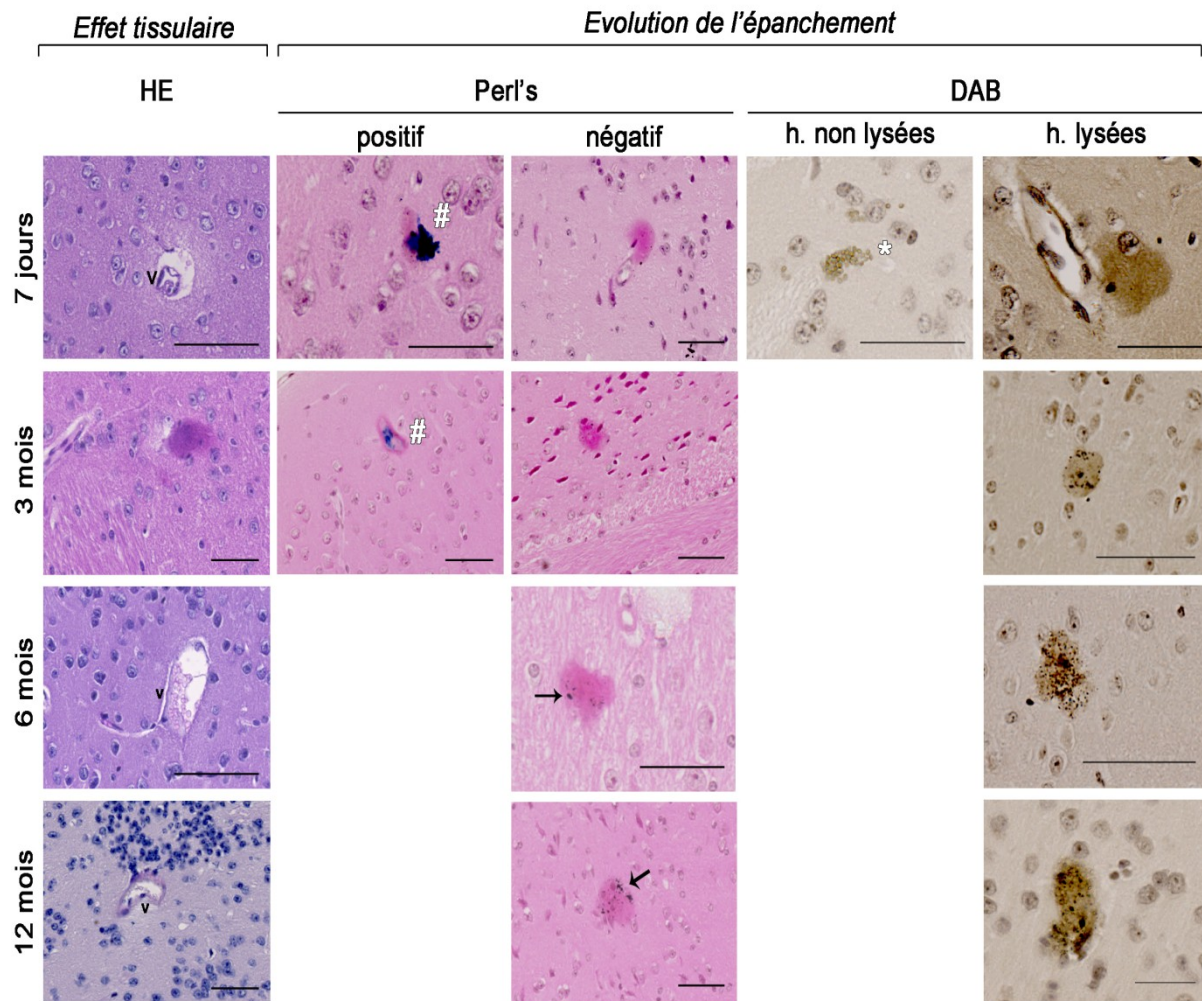


Figure 76 : Visualisation des microhémorragies cérébrales à différents temps après induction et par différentes colorations histologiques. HE : Hématoxyline-Eosine. DAB : Diaminobenzidine. * : Hématies non lysées. # : Coloration de Perl's positive. h : hématies. V : Vaisseau. Flèches noires : légères traces de bleu. Barre d'échelle : 20 µm.

L'observation des lames histologiques ne montre pas d'évolution notable des MHC que ce soit en taille, en nombre ou en morphologie. La coloration HE montre peu d'atteinte du tissu cérébral autour des lésions. Nous pouvons également remarquer que nous observons des hématies non lysées (coloration au DAB) qu'au temps 7 jours après l'induction des lésions. Ceci met en évidence la récente mise en place de ces lésions. De même, nous ne retrouvons des MHC positives à la coloration de Perl's (marquage compact bleu) qu'aux temps précoces de l'étude (7 jours et 3 mois), suggérant un métabolisme du fer libéré lors de la survenue des MHC. Il est tentant de spéculer que les colorations négatives, où seules quelques traces de

bleu de Prusse sont détectables, révéleraient alors des lésions plus anciennes, après le passage des sidérophages.

2.1.2. Neurones en dégénérescence avec le fluorojade

En plus des colorations histologiques, nous avons souhaité évaluer la neurodégénérescence autour des MHC par le biais de la coloration avec le fluorojade. Pour rappel, ce produit a une affinité particulière pour des polyamides associés à une dégénérescence cellulaire. Plusieurs essais ont été réalisés sur des cerveaux de souris à 7 jours de l'induction et quelques exemples sont représentés dans la figure 77 ci-dessous.

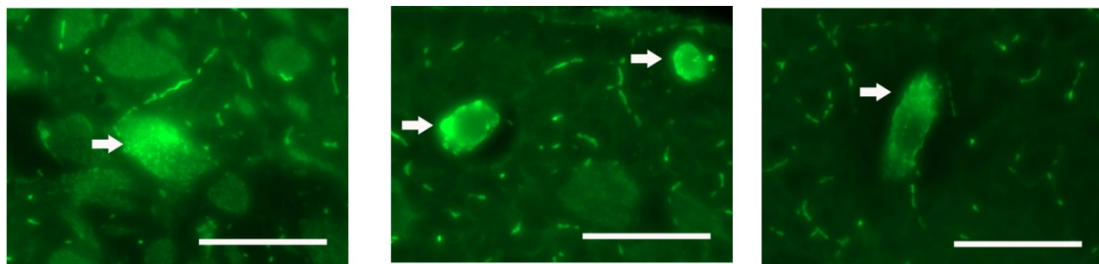


Figure 77 : Visualisation des neurones en dégénérescence autour des microhémorragies par la coloration au fluorojade. Barre d'échelle : 50 μ m.

Les observations réalisées ne semblent pas mettre en évidence une grande souffrance cellulaire autour des MHC. Quelques neurones semblent en dégénérescence (marquage vert plus présent) autour des lésions, mais cela reste minime. Nous n'avons pas approfondi ce marquage pour le moment, mais il serait intéressant de refaire ces expériences sur des lésions plus importantes (MHC de type 2 ou 3).

2.2. Evaluations immunohistochimiques

Les études immunohistochimiques n'ont pour l'instant été réalisées que dans des cerveaux de souris à 7 jours de l'induction des lésions. Une fois les techniques validées, nous compléterons ces approches sur des cerveaux de souris aux différents temps de l'étude (3-6-9 et 12 mois après l'injection).

2.2.1. Activation astrocytaire GFAP

Nous avons souhaité étudier les mécanismes inflammatoires induits par la survenue de MHC. Pour cela, nous avons évalué dans un premier temps l'activation astrocytaire autour des

lésions visualisée grâce à la GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein). Quelques exemples de marquages sont représentés dans la figure ci-dessous.

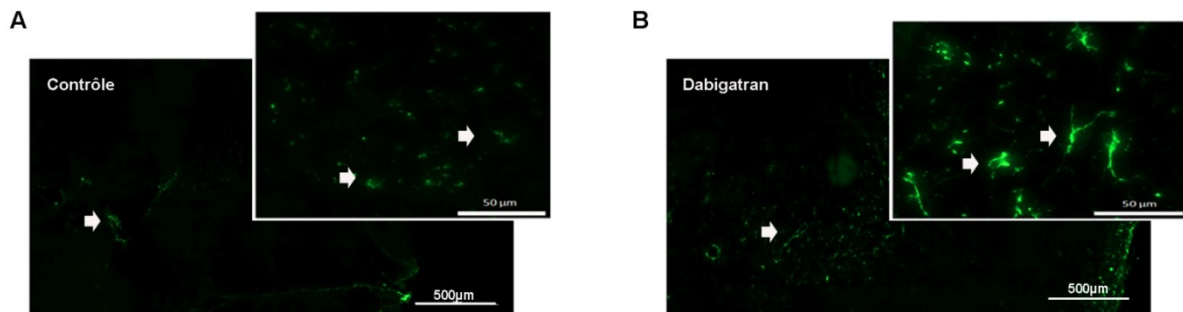


Figure 78 : Activation astrocytaire autour des microhémorragies cérébrales. Marquage vert mis en évidence par des flèches blanches. **A.** Observation chez des souris témoins (sans traitement). **B.** Observation chez des souris sous dabigatran.

L'observation de ce marquage nous montre une légère activation des astrocytes à proximité des lésions chez les souris témoins, c'est-à-dire des animaux avec MHC mais sans traitement particulier (Figure 78-A, flèches blanches). Cette activation semble être plus importante chez des animaux avec des lésions de taille plus importante, comme c'est le cas chez les souris traitées au dabigatran (Figure 78-B).

2.2.2. Co-marquage thrombine-collagène IV et tPA-PAI-1

Nous avons souhaité visualiser la présence tissulaire de molécules intervenant dans l'hémostase. Nous avons ainsi pu mettre en évidence la présence de thrombine autour des lésions, que nous avons co-marquée avec la collagénase IV qui permet de visualiser les vaisseaux cérébraux et donc potentiellement les MHC. Quelques exemples sont représentés dans la figure 79 ci-dessous.

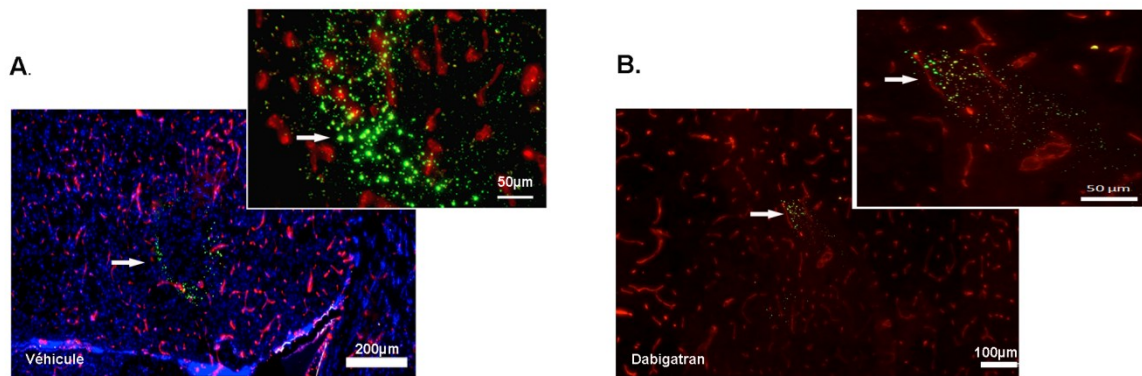


Figure 79 : Co-marquage thrombine-collagène IV autour des microhémorragies cérébrales. La présence de thrombine est mise en évidence par un marquage vert (flèches blanches). Le collagène IV est mis en évidence par un marquage rouge (vaisseaux cérébraux). **A.** Observation chez des souris véhicule (sans traitement). Un marquage des noyaux au DAPI (en bleu) est visible sur la plus grande image. **B.** Observation des marquages sur un cerveau de souris sous dabigatran.

Les expériences réalisées nous ont permis de visualiser la présence de thrombine répartie dans des zones restreintes qui pourraient être des MHC (en vert). Cette expression semble pouvoir être modulée étant donné que le marquage est moins présent dans le cerveau de souris traitées au dabigatran (qui est un inhibiteur direct de la thrombine) que dans les cerveaux de souris témoins. Ces expériences nécessitent d'être multipliées et quantifiées afin de pouvoir mettre un lien entre la présence de thrombine, la taille des lésions et les traitements pharmacologiques associés.

Nous avons également étudié le duo tPA-PAI-1 qui sont des acteurs principaux de la fibrinolyse. En effet, le tPA (Tissue Plasminogen Activator) est une enzyme impliquée dans la lyse du caillot de fibrine (induit par la thrombine). Le PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1) est un inhibiteur direct de tPA. En co-marquant les 2 protéines, nous souhaitons voir si la survenue de MHC augmenterait l'expression du tPA (dont les propriétés neurotoxiques sont connues), et/ou diminuerait le PAI-1 de manière réactionnelle. Cette partie de l'étude demeure incomplète. Des exemples de co-marquage tPA-PAI-1 sont représentés dans la figure 80 ci-dessous.

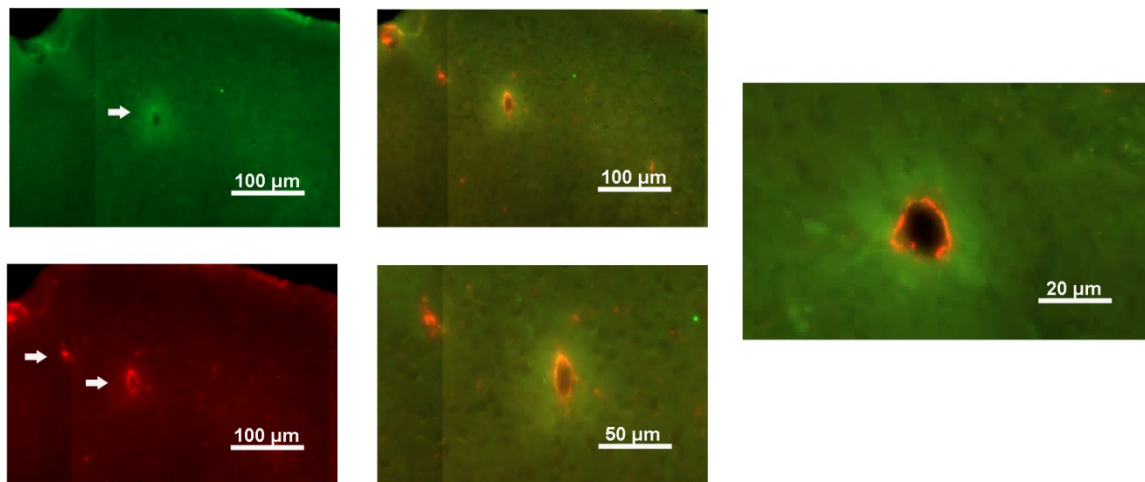


Figure 80 : Co-marquage tPA-PAI-1 autour des microhémorragies cérébrales. La présence de tPA est mise en évidence par un marquage rouge. Le PAI-1 est mis en évidence par un marquage vert.

La présence de tPA (en rouge) semble bien marquée autour des microvaisseaux rompus de dimension proche d'une artériole pré-capillaire. Le marquage de PAI-1 (en vert) semble situé au même endroit mais un halo entourant la lésion interroge sur la spécificité du marquage, qui reste à optimiser. Le co-marquage reste aussi à établir par microscopie confocale.

Les molécules de l'hémostase pro-coagulantes comme la thrombine ou fibrinolytiques comme le tPA semblent donc être présents lors de la survenue de MHC. Des mécanismes neurotoxiques pourraient être initiés. Des investigations fines et temporelles sont envisagées afin de mieux explorer cet aspect.

3. Détection des microhémorragies par IRM

Nous avons tenté de visualiser nos MHC par IRM en se fondant sur la présence de fer au niveau tissulaire grâce aux techniques de susceptibilité magnétique. Malheureusement, les MHC induites par notre méthode sont trop petites pour être détectées par IRM, dont la résolution ne permet pas de différencier les MHC des vaisseaux cérébraux des souris, comme représentés sur la figure 81 ci-dessous :

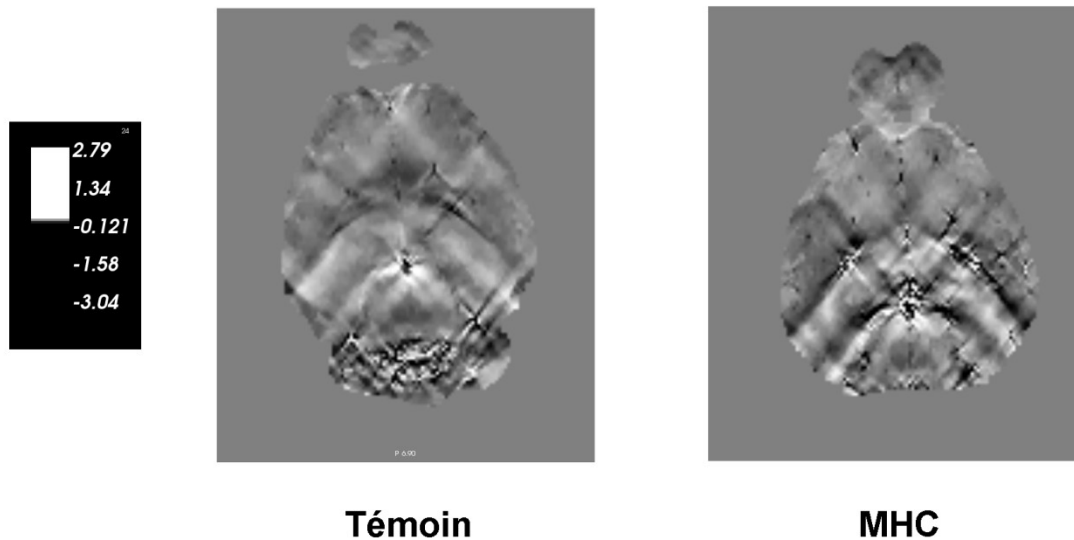


Figure 81 : Exemples d'images obtenues après acquisition IRM de cerveaux *in vivo* d'une souris témoin ou d'une souris avec microhémorragies cérébrales (MHC).

Nos dernières expériences ont été réalisées sur des cerveaux en *ex-vivo* (issus d'animaux qui ont été rincés de leur sang) afin de pouvoir limiter le signal émis par les vaisseaux et de pouvoir faire des acquisitions plus longues. Nous avons mis quelques exemples dans la figure 82 ci-dessous :

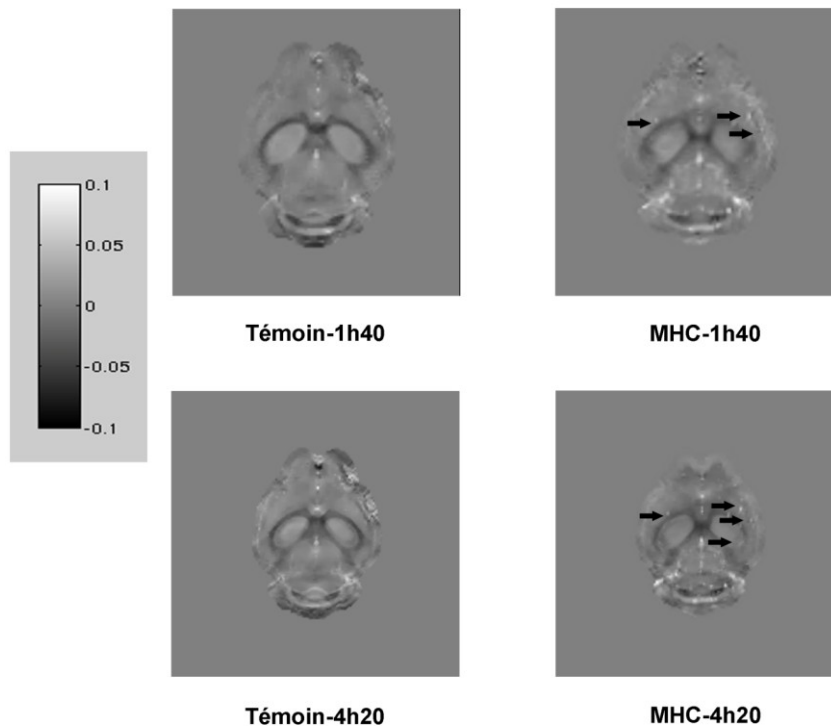


Figure 82 : Exemples d'images obtenues après acquisition IRM de cerveaux *ex-vivo* d'une souris témoin ou d'une souris avec microhémorragies cérébrales (MHC). Deux temps d'acquisitions ont été effectués : 1h40 (en haut) ou 4h20 (en bas). Les MHC sont mises en évidence par des flèches noires.

Les images issues de ces acquisitions sont de meilleures qualités que celles récupérées *in vivo*, surtout avec des temps d'acquisition plus long (4h20). La résolution étant meilleure et en l'absence de signal dû aux vaisseaux cérébraux, nous arrivons à détecter quelques MHC (mises en évidence par des flèches noires). Cependant, nous n'avons pas pu déterminer le volume des MHC, même en post-mortem, car elles restent trop petites. Nous souhaiterions maintenant réaliser des coupes histologiques de ces cerveaux afin de tenter de mettre en concordance les lésions observées en IRM et celles détectées au niveau tissulaire.

Ces résultats confirment la complexité à détecter nos MHC par IRM dans nos conditions. Les lésions induites sont trop petites pour être visibles sur notre IRM 7T et restent difficiles à discerner des vaisseaux cérébraux. En conséquence, il nous est pour l'instant impossible de déterminer un poids microhémorragique cérébral global des souris, ce qui nous aurait permis de faire une comparaison avec ce qui est retrouvé chez l'Homme. De même, nous ne pouvons pas étudier l'évolution des lésions chez un même animal. Des études IRM plus poussées (connectome notamment) sont envisagées pour la suite.

Discussion et perspectives

Afin d'étudier les effets propres des MHC, nous avons développé une nouvelle méthode d'induction de MHC disséminées chez la souris saine. En plus de l'étude de l'impact de ces lésions au niveau histologique et comportemental à court et à long terme, nous avons évalué l'influence de facteurs de risque vasculaires (par un traitement anticoagulant oral) et métaboliques (par le biais d'une alimentation riche en gras) sur leur sévérité. Nos investigations ont permis de montrer que la présence de MHC disséminées dans un contexte sain est responsable de l'apparition progressive d'une altération de la mémoire de reconnaissance visuelle chez la souris. L'ajout d'un traitement anticoagulant oral augmente la sévérité des lésions mais celles-ci restent silencieuses à court terme, hormis pour la warfarine qui est responsable de transformations hémorragiques mortelles. De même, la présence de troubles métaboliques n'a que peu d'impact sur la gravité des poids microhémorragiques observés. Dans tous les cas, la présence de MHC ne provoque pas de précipitation ou d'aggravation du déclin cognitif induit à long terme. Ainsi, les facteurs de risque vasculaires et métaboliques ne semblent pas avoir d'influence directe sur la toxicité induite par les MHC dans un contexte d'altération cognitive non neurodégénérative.

1/ Intérêt de notre nouvelle méthode d'induction de MHC chez la souris

Au vu de la littérature et de l'intérêt grandissant autour des MHC, il paraît important de mettre au point des méthodes d'étude expérimentale se rapprochant au mieux des constatations et des questionnements cliniques. Le développement de méthodes expérimentales reste difficile, d'autant plus quand il est réalisé chez la souris, dont la petite taille des organes rajoute un obstacle à leur réalisation. Concernant les MHC, la principale difficulté réside dans le fait de parvenir à ne léser que des microvaisseaux dans des zones d'intérêt précises tout en restant le moins invasif possible (Pétrault et al., 2019). Ainsi, jusqu'à présent, les méthodes pré-cliniques actuelles reposent soit sur des inductions directes de MHC nécessitant des appareils spécifiques (cadre de stéréotaxie, laser) et restant invasives (Bergeron et al., 2018; Rosidi et al., 2011), soit sur des apparitions spontanées au décours d'un processus pathologique dans des souris génétiquement modifiées (souris APP, tgSwDI...) (Lo et al., 2016; Shih et al., 2018), ou encore par l'introduction de facteurs favorisant leur apparition (inflammation, hypertension...) (Schreiber et al., 2012; Sudduth et al., 2013; Sumbria et al., 2016). Toutes ces méthodes ont engendré des modèles pré-cliniques qui ont permis de commencer à comprendre les mécanismes physiopathologiques impliqués. Cependant, les méthodes d'induction directe n'induisent qu'une seule MHC ce qui, hormis l'avantage de pouvoir cibler une zone cérébrale et de pouvoir étudier précisément le tissu

adjacent, ne paraît pas pertinent au vu de la réalité clinique, où les MHC s'observent le plus souvent à plusieurs. De même, les modèles « pathologiques » permettent d'étudier les MHC dans un contexte de maladie sous-jacente et il est donc difficile de savoir si ces lésions ont un effet propre ou seulement à travers le processus pathologique existant au moment de leur apparition. C'est dans ce contexte que nous avons développé notre méthode d'induction de MHC disséminées chez la souris saine. Cette notion de multiples MHC disséminées est d'autant plus importante que le nombre de MHC et leur emplacement cortical ou sous-cortical sont maintenant considérés comme un indice pertinent reflétant l'atteinte vasculaire et cognitive des patients dans les études cliniques (Ding et al., 2017; Liu, 2014; Paradise et al., 2018; Vernooij et al., 2008). Nous avons choisi de renoncer à localiser les CMH dans une aire fonctionnelle précise malgré le risque que cela puisse représenter un obstacle pour toutes les études pharmacologiques, histologiques et fonctionnelles. En effet, cela se rapproche des conditions cliniques où la localisation des MHC n'est pas si précise (on parle simplement de région cérébrale corticale ou thalamique), et l'on ne précise pas la branche vasculaire atteinte, contrairement aux AVC ischémiques où il est possible de connaître précisément le segment de l'ACM touché (M1 vs M2) (Salahuddin et al., 2018; Sheth et al., 2015). C'est à l'heure actuelle le seul modèle de charge microhémorragique cérébrale permettant d'évaluer l'impact de plusieurs MHC chez la souris saine. Les lésions induites sont responsables d'un poids microhémorragique cérébral pouvant varier en taille et en nombre selon des conditions pharmacologiques ou pathologiques, comme nous avons pu le démontrer dans nos deux études parallèles utilisant soit un traitement pharmacologique avec des anticoagulants oraux, soit la mise en place de troubles métaboliques par un régime enrichi en gras.

2/ Etude des MHC seules

Après avoir déterminé la dose et la cinétique d'apparition de nos MHC, nous avons souhaité évaluer leur impact au niveau comportemental et tissulaire. Le premier résultat important a été que la survenue de MHC reste silencieuse à court terme, ce qui concorde avec la constatation clinique. En revanche, ces lésions induisent un déclin progressif de la mémoire de reconnaissance visuelle, évaluée par le test du NOR. Ce résultat est d'autant plus important qu'il existe peu d'études montrant un impact des MHC seules, en dehors de tout contexte pathologique. D'autres membres de notre laboratoire ont également montré cet effet dans un autre modèle de MHC induite par une injection de collagénase au niveau cortical chez la souris (Bergeron et al., 2018). Ce modèle repose sur l'induction d'une seule MHC dont la taille correspond à l'ensemble du poids microhémorragique cérébral estimé chez l'humain

(0.006% du volume cérébral total). Dans ce contexte, les expérimentateurs démontrent un impact cognitif de la mémoire spatiale (évaluée par le test du labyrinthe de Barnes et le Touchscreen) à 1,5 mois après la survenue de la lésion. Notre méthode induisant des MHC de plus petites tailles et au niveau cortical et sous-cortical, les mécanismes impliqués sont certainement différents et cela peut expliquer une mise en place plus longue et progressive de ce déclin cognitif. Dans notre étude, nous avons décidé d'évaluer principalement la mémoire de reconnaissance visuelle par le test du NOR et la mémoire de travail à court terme par le test de l'alternance spontanée. Le choix de ces tests a été déterminé en fonction des zones cérébrales potentiellement touchées par les lésions, mais aussi par ce qui se fait couramment au laboratoire et dans les études pré-cliniques. Cette altération de la mémoire de reconnaissance visuelle n'est pas anodine puisqu'elle a été rapportée comme étant l'une des premières mémoires impactées chez les patients atteints d'un déclin cognitif léger (Barbeau et al., 2004; Valenti et al., 2017a). Enfin, il serait intéressant de compléter ces résultats par une évaluation neuropsychologique avec des tests d'anxiété, de motivation et de cognition sociale. En effet, au niveau clinique, ces tests semblent pouvoir détecter des symptômes pouvant refléter des atteintes précoces chez les patients avant même l'apparition de troubles cognitifs (Gulpers et al., 2016; Kassem et al., 2017). Nous avons ainsi commencé à évaluer l'effet de la présence de MHC sur le comportement anxieux de nos animaux. Cette réflexion est partie non seulement de la constatation que nos souris lésées semblaient plus agitées dans leur cage que les souris témoins, mais aussi sur la littérature qui montre des associations entre la présence accrue de lésions microvasculaires et de l'agitation, de l'apathie et de la dépression à plus long terme (Direk et al., 2016; van Agtmaal et al., 2017; Xu et al., 2017). Dans nos conditions, nous n'avons pas retrouvé d'effet de la présence de MHC sur les différents tests d'anxiété et de motivation. Nous retrouvons uniquement un léger effet au niveau du nombre de redressements visualisés dans le test de l'actimétrie qui tend à diminuer avec le temps. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces résultats : (i) soit nos souris avec MHC ne sont effectivement pas plus anxieuses ou stressées que les souris saines, démontrant ainsi que les lésions induites ne sont pas responsables de troubles neuropsychiatriques dans notre modèle, et que l'agitation observée serait alors due aux conditions de stabulation de nos animaux ; (ii) soit nos tests ne sont pas assez sensibles pour pouvoir détecter de syndrome anxieux chez nos animaux, et il serait nécessaire de les compléter par d'autres tests de dépression et d'anxiété (nage forcée, tail suspension test...) ; (iii) soit nos tests sont réalisés encore trop tôt et il serait donc nécessaire de continuer ces investigations à plus long terme. Cette dernière hypothèse peut être supportée par certaines études cliniques avec un suivi à long terme qui définissent

les atteintes neuropsychiatriques post-AVC comme des troubles chroniques, avec un schéma rémittent-récurrent dont les effets peuvent apparaître dans les 5 ans (Douven et al., 2016; Hackett et al., 2014; Xu et al., 2017). Ainsi, cette partie comportementale nous a permis de mettre en évidence l'effet cognitif de la survenue de MHC seules, sans contexte de maladie sous-jacente. Cette perturbation cognitive touche la mémoire de reconnaissance visuelle de manière significative 9 mois après l'induction des lésions, et ne s'accompagne pas de troubles neuropsychologiques.

De nombreux mécanismes peuvent être potentiellement impliqués dans la physiopathologie des MHC. Notre première approche a consisté à évaluer l'impact tissulaire de la présence de MHC et d'étudier leur évolution avec le temps par des approches histologiques. Ces investigations sont d'ailleurs toujours en cours. La coloration classique à l'HE n'a montré aucune nécrose tissulaire autour des lésions. Cet aspect est confirmé par la coloration au fluorojade, connue pour détecter les neurones en dégénérescence (Schmued and Hopkins, 2000). Cette absence d'effet nécrotique immédiat au niveau des cellules entourant les lésions a d'ailleurs déjà été rapportée dans une autre étude pré-clinique dans laquelle il a été démontré que malgré une légère compression du tissu environnant au moment de la rupture du microvaisseau, aucune dégénérescence structurelle des axes dendritiques n'a été observée (Rosidi et al., 2011). Cependant, comme évoqué dans cette étude, un maintien structural des cellules n'empêche pas une modification de la fonction neuronale sous l'action potentielle des produits issus du sang. La coloration au DAB a, dans un premier temps, permis de mettre en évidence une absence de synchronisation dans la mise en place des lésions (ce qui reste en accord avec la mise en place du poids microhémorragique cérébral en 7 jours selon notre méthode). En effet, nous retrouvons à la phase aiguë de la survenue de MHC (c'est-à-dire uniquement après 7 jours) des hématies non lysées, signe de l'apparition récente d'une lésion. Les hématies une fois libérées des vaisseaux vont rapidement se mettre à gonfler suite à la formation de pores au niveau de leur membrane, modifiant ainsi leur perméabilité cellulaire et conduisant à des altérations morphologiques puis à une lyse cellulaire (Cao et al., 2016; Wilms et al., 2000). En revanche, nous ne retrouvons pas d'hématies intactes dans les cerveaux d'animaux sacrifiés plus tardivement (après 7 jours), suggérant l'absence de développement de nouvelles MHC. Cet aspect n'est cependant pas confirmé par la coloration de Perl's qui permet de visualiser le fer présent au sein du tissu. En effet, nous retrouvons des lésions positives (dépôts bleus) ou négatives à cette coloration, signes respectifs d'une MHC « mature » ou sub-aiguë (van Veluw et al., 2016a). La proportion plus grande de ces dernières

à 12 mois est en contradiction avec l'analyse neuropathologique classique, qui aurait davantage penché pour de nombreuses lésions positives au Perl's à long terme. La prise en charge du fer libéré lors de la lyse des hématies est cependant un phénomène proposé dans la littérature pour expliquer la maturation des lésions. En effet, après la lyse des hématies, le fer va dans un premier temps être contenu dans l'hémoglobine avant d'être libéré et capté par la microglie et les macrophages environnants. Ceux-ci participent alors au retrait du sang dans le parenchyme et convertissent le fer hémique libéré lors de la lyse des hématies en hémossidérine (Wagner et al., 2003). Ainsi, la réaction positive ou négative à la coloration de Perl's peut montrer plusieurs étapes dans la résolution des MHC, dont la chronologie reste difficile à démontrer. Cette histologie hétérogène qui ne permet pas d'évaluer l'ordre chronologique des événements est également retrouvé en clinique humaine (van Veluw et al., 2016a). La libération de fer dans le parenchyme cérébral reste un élément important puisqu'il est impliqué dans de nombreux mécanismes délétères, notamment dans la formation d'espèces réactives de l'oxygène et ainsi d'un stress oxydant (Dixon and Stockwell, 2014; Xi et al., 2006). Il aurait été intéressant de compléter cette étude histologique par une analyse en IRM afin de faire le lien entre les lésions observées en imagerie et celles détectées en histologie. Malheureusement, il s'avère que les MHC induites par notre méthode ne sont pas visibles en IRM en raison de leur taille trop petite et de la trop faible résolution de notre IRM. En effet, il est très difficile de pouvoir différencier les MHC des vaisseaux cérébraux des souris avec une IRM 7T, même avec la séquence QSM spécifique à la détection du fer libéré lors de la survenue des lésions. Il nous a été impossible de calculer un volume lésionnel, ce qui aurait été intéressant pour évaluer le poids microhémorragique cérébral de chaque animal et son évolution dans le temps. Les études retrouvées dans la littérature utilisent soit des machines plus puissantes (9,4T), soit des techniques *ex-vivo* (Klohs et al., 2011; Lo et al., 2016). Ainsi, dans le futur, nous souhaiterions approfondir les expériences en imagerie notamment par de nouvelles méthodes évaluant le connectome chez la souris. Cette technique, considérée comme non applicable au cerveau de souris, vient tout juste d'être présentée à un congrès de radiologie à Strasbourg et semble être prometteuse. Nous comptons sur nos imageurs pour se rapprocher des équipes ayant développé le concept pour le ramener dans nos locaux et ainsi le développer sur notre modèle. Cela nous permettrait d'étudier plus en profondeur cette hypothèse selon laquelle les MHC seraient capables d'induire des troubles cognitifs en perturbant les connections entre les différentes régions cérébrales. En attendant le développement de ces nouvelles techniques, nous nous sommes focalisés sur des études histologiques et immunohistochimiques.

Ainsi, nous avons commencé à étudier la réaction tissulaire provoquée par la survenue des MHC par des évaluations immunohistochimiques. La neuroinflammation résultant de la formation des lésions est une des pistes que nous avons envisagées. Nous avons regardé dans un premier temps l'activation astrocytaire induite, mise en évidence par la GFAP. Les résultats obtenus montrent une légère activation astrocytaire autour des lésions, qui semble augmenter avec la taille des MHC, comme nous en avons montré un exemple avec le dabigatran. Nos travaux rejoignent ceux de Ahn et collaborateurs en 2018 qui ont étudié la réponse inflammatoire de plusieurs types cellulaires après l'induction d'une MHC par rupture de microvaisseaux par laser (Ahn et al., 2018). Les auteurs retrouvent une activation astrocytaire et microgliale autour de la lésion dans les heures qui suivent la survenue de la MHC. L'activation microgliale semble d'ailleurs être la réponse initiale à cette rupture, suivie par l'activation des astrocytes, sous-tendant l'idée que la microglie activée serait à l'origine de l'activation astrocytaire, *via* la libération de cytokines. Contrairement au phénotype A2 neuroprotecteur, régulant la sécrétion de facteurs neurotrophiques, les astrocytes activés dans le cerveau de nos souris pourraient être de phénotype A1, c'est-à-dire plutôt nocifs pour le tissu en régulant de nombreux gènes impliqués dans la cascade du complément et dont il a déjà été démontré qu'ils détruisaient les synapses (Liddel et al., 2017). Dans notre étude, il serait intéressant d'examiner ces différentes activations astrocytaires autour des MHC. En appliquant notre méthode dans des modèles neurodégénératifs, nous pourrions comparer ces activations et voir si l'on a plus d'astrocytes de phénotype A2 dans un cerveau sain ou de phénotype A1 dans un cerveau malade.

De même, nous avons vérifié la présence de thrombine autour de nos MHC. En effet, il a été démontré que cette enzyme finale de la coagulation était libérée lors d'une MHC due à une évacuation massive de plasma lors de la rupture d'un microvaisseau (Rosidi et al., 2011), et que sa présence pouvait être délétère pour le parenchyme cérébral (Yang et al., 2015). Les résultats obtenus en immunohistochimie montrent bien une libération notable de thrombine autour des MHC. Bien que nous n'ayons pas pu déterminer la quantité de thrombine présente à proximité des lésions, celle-ci semble pouvoir être modulée pharmacologiquement, notamment par le biais d'anticoagulants oraux directs. Cette étude nécessite d'être complétée par des investigations plus poussées des mécanismes délétères associés à la présence de thrombine, tels que l'inflammation ou la neurodégénérescence, mais aussi ceux médiés par ses récepteurs (Krenzlin et al., 2016; Xi et al., 2006). En effet, la signalisation de la thrombine est médiée au moins en partie par une famille de récepteurs couplés à protéines G : les PAR

(Protease Activated Receptor). Jusqu'à présent, quatre membres de la famille des PAR ont été identifiés : PAR1, PAR3 et PAR4 sont considérés comme des récepteurs à la thrombine alors que PAR2 est activé par des sérine protéases autre que la thrombine telle que la trypsine. PAR1, le premier à avoir été découvert, est le plus étudié de cette famille pour lequel le mécanisme d'activation a bien été établi (Coughlin, 2000; Wang and Reiser, 2003). De plus, PAR1 a été retrouvé à la surface des cellules microgliales murines, sous-tendant un lien possible entre la présence de thrombine et l'activation microgliale (Suo et al., 2002). De même, il a été démontré que la sur-activation de ce récepteur était liée à la rupture de vaisseaux, à la neurotoxicité et à l'activation microgliale (Radulovic et al., 2016). PAR1 semble donc être un régulateur crucial dans la cascade inflammatoire et neurotoxique induit par la thrombine : il constitue ainsi une cible thérapeutique intéressante dans de nombreuses pathologies (Suo et al., 2002). Nous avons également recherché la présence d'autres protéines de l'hémostase, cette fois de l'étape de la fibrinolyse, c'est-à-dire le couple tPA/PAI-1. En effet, la fibrinolyse est le processus physiologique de dissolution du caillot de fibrine qui termine la coagulation. Si elle est défaillante, il peut rester des débris de fibrine et de fibrinogène dont les effets sont délétères (inflammation, neurodégénérescence, inhibition des mécanismes de réparation) pour le cerveau (Bardehle et al., 2015). En co-marquant tPA et PAI-1, nous souhaitons voir si la survenue de MHC perturbait la fibrinolyse et l'équilibre hémostatique, ce qui pourrait alors participer à une fragilité qui aurait pour issue par exemple la survenue de saignements aggravés. Pour le moment, nous avons juste mis en évidence la présence de ces deux protéines autour des lésions, suggérant une réaction du tissu par une expression de ces facteurs hémostatiques lors de la rupture des microvaisseaux.

Ces différentes études immunohistochimiques nous donnent un premier aperçu des mécanismes potentiellement déclenchés dans le tissu lors de la survenue de MHC. Cependant, ces explorations possèdent des limites. En effet, pour évaluer tous ces mécanismes, il faut que nous trouvions un moyen de détecter nos lésions et de pouvoir les quantifier (notamment au niveau de leur taille) afin de pouvoir faire un lien avec les marquages obtenus. Nous avons utilisé le collagène IV qui marque les vaisseaux cérébraux, mais il s'avère que la visualisation des MHC reste encore difficile et il n'est pas évident d'en délimiter la taille. Ce problème est d'autant plus important que nous ne savons pas exactement où se trouvent les lésions. Il nous faut ainsi balayer le cerveau entier pour les trouver. Nous souhaitons également développer la quantification des marquages obtenus afin d'évaluer la réponse en fonction des traitements pharmacologiques associés. Des premiers essais ont été réalisés grâce à l'aide de nos

collaborateurs de la plateforme d'imagerie cellulaire présents au sein de notre bâtiment et grâce au logiciel ImageJ, mais cela nécessite d'être peaufiné.

Enfin, si l'on se penche sur l'impact délétère des MHC sur les performances cognitives, plusieurs mécanismes peuvent être suggérés. La neuroinflammation induite par les lésions fait partie des premiers processus envisagés. En effet, comme évoqué dans la littérature, la survenue de MHC semble induire une réponse inflammatoire qui peut durer plus d'une semaine *via* l'activation microgliale puis astrocytaire et la présence de macrophages et de monocytes (Ahn et al., 2018). Bien que les microsaignements ne provoquent pas de dégénérescence neuronale directe ni de perte de réactivité aux stimuli externes, cette réponse inflammatoire prolongée pourrait entraîner une perturbation chronique de la fonction cérébrale à l'origine de troubles cognitifs (Ahn et al., 2018; Cianchetti et al., 2013). D'autres études suggèrent que la présence de plusieurs MHC entrainerait une perturbation des réseaux structurels dans le cerveau, interférant ainsi avec les connexions dans les zones qui soutiennent les fonctions cérébrales (Heringa et al., 2014; Liu et al., 2018; Ungvari et al., 2017). Cette hypothèse ne pourra être vérifiée dans le cerveau des rongeurs lorsque la technique de tenseur de diffusion en IRM, permettant de visualiser l'orientation, l'intégrité et les connexions au niveau de la substance blanche cérébrale, sera applicable à la taille des cerveaux murins.

3/ Influence d'un traitement anticoagulant oral

La seconde partie de notre projet a consisté à évaluer l'effet d'un traitement anticoagulant sur la survenue de MHC chez la souris saine. En effet, les MHC étant maintenant considérées comme reflétant la sévérité des maladies neurovasculaires sous-jacentes, elles pourraient être un prédicteur spécifique et cliniquement utile de la survenue d'une hémorragie intracrânienne liée à un anticoagulant (Wilson et al., 2018b). Un traitement anticoagulant favoriserait-il une transformation hémorragique des MHC présentes ? Cette question semble difficile à étudier dans les études cliniques car l'intégrité du tissu cérébral et du système vasculaire pourrait influencer le nombre et la gravité des saignements de manière variable selon le contexte pathologique des patients. Cependant, le choix de l'anticoagulant à utiliser demeure une question critique, étant donné que les AVK comme la warfarine sont maintenant considérés comme des facteurs indépendants de prédiction d'une HIC (van Etten et al., 2014). Les AOD sont de plus en plus adoptés pour leur tolérance et leur efficacité mais leur utilisation chez les sujets à risque présentant des MHC n'est pas encore systématique (Barrett et al., 2017). Nous

avons donc cherché à déterminer si la survenue de MHC chez des souris sous anticoagulant oral pouvait induire des transformations hémorragiques. Nous avons comparé l'utilisation de plusieurs AOD différents (anti-Xa et anti-IIa) *versus* un AVK couramment utilisé, la warfarine. Nous avons dans un premier temps vérifié si les différents traitements administrés étaient efficaces chez la souris. De plus, contrairement à la warfarine, les tests d'hémostase habituels comme le temps de Quick ou de prothrombine ne reflètent pas le niveau d'anticoagulation et ne sont pas spécifiques lors de l'utilisation des AOD (Adcock and Gosselin, 2015). C'est pourquoi nous avons dosé directement l'activité anti-Xa ou anti-IIa pour les AOD, alors que nous avons vérifié l'efficacité de la warfarine par un test plus classique avec le temps de prothrombine. Les tests nous ont confirmé que les traitements anticoagulants administrés sont bien actifs chez nos animaux. De même, concernant les AOD, nous avons retrouvé l'effet rapide des AOD comparé à l'effet global de la warfarine sur l'ensemble des facteurs de la coagulation dépendant de la vitamine K (II, VII, IX, X). Nous avons pu déterminer les doses en fonction de la pratique médicale puis adaptée à la souris. Certaines doses ont également été retrouvées dans plusieurs publications (Kono et al., 2014; Sun et al., 2014). Notons une petite particularité concernant le rivaroxaban : il est prescrit la plupart du temps au rythme d'une fois par jour, mais il peut, dans certains cas particuliers, comme dans le traitement des thromboses veineuses profondes ou des syndromes coronariens aigus, être donné deux fois par jour. Au vu de ce constat, nous avons décidé de faire deux groupes de souris traitées au rivaroxaban, avec une posologie à une ou deux fois par jour. En plus de l'effet d'une double dose, nous avons pu aussi comparer ce groupe aux autres AOD qui ont tous une posologie à 2 fois/jour.

Le premier résultat important de notre étude est que, contrairement à la warfarine, la survenue de MHC sous AOD ne provoque pas de transformation hémorragique, diminuant ainsi la mortalité retrouvée chez les animaux sous AVK. Ce résultat est en accord avec ce que l'on peut retrouver dans la littérature, aussi bien dans des études expérimentales que dans des études cliniques. Par exemple, au niveau pré-clinique, Marinescu et collaborateurs (Marinescu et al., 2017) ont montré des résultats similaires dans un modèle murin de CAA présentant des MHC spontanées se transformant en HIC sous warfarine mais pas sous dabigatran. D'autres études retrouvent les mêmes conclusions dans d'autres modèles murins (Lauer et al., 2011; Sawada et al., 2017; Sun et al., 2013). Cela montre que l'effet aggravant de la warfarine passe bien par son action sur l'hémostase, et ne dépend pas du mécanisme menant à la rupture des vaisseaux. Au niveau clinique, cette question a fait l'objet d'études prospectives comme

CROMIS-II (Clinical Relevance of Microbleeds in Stroke) ou HERO (Intracerebral Hemorrhage due to Oral Anticoagulant). Globalement, ces études suggèrent la prise en compte des MHC en tant que biomarqueur de neuroimagerie pour améliorer la spécificité et la sensibilité dans l'identification de la pathologie associée. Cela pourrait ainsi aider les cliniciens dans leur décision sur la mise en place ou le maintien d'un traitement anticoagulant, mais le type d'anticoagulant (AVK ou AOD) ne semble pas affecter le risque d'HIC associé à la présence de MHC (Wilson et al., 2018b). En outre, aucune étude à ce jour n'a mesuré directement l'effet additif de l'anticoagulation sur le risque de développer une HIC chez les patients avec MHC (Charidimou et al., 2017). Il reste cependant admis que, malgré une efficacité similaire dans la prévention des AVC, les AOD sont associés à une réduction significative de toutes les causes de mortalité en lien avec la warfarine (Ruff et al., 2014). Dans notre étude, tous les anticoagulants oraux augmentent le nombre de MHC chez nos souris mais à des degrés variables. Cette augmentation ne semble pas varier avec le temps puisque l'on retrouve un nombre de MHC similaire entre le temps de 7 jours et le temps de 12 mois. Cette absence d'augmentation spontanée du nombre de lésions est contraire à ce qui est observé en clinique. La prévalence des MHC est proche de 2% chez le sujet sain (Poels et al., 2011) et jusqu'à 50% par an chez les sujets atteints d'une pathologie cérébrovasculaire comme la CAA (Cordonnier et al., 2007, 2006; Wilson et al., 2018b). L'augmentation du nombre de MHC par les traitements anticoagulants oraux (de l'ordre de 30% à la phase aigüe) se rapproche donc des taux de prévalence que l'on peut observer dans certaines conditions pathologiques. Cette différence peut s'expliquer par le fait que nos expériences ont été réalisées sur des souris saines à l'âge moyen dont la structure et la fonction hémostatique du système vasculaire cérébral peuvent être suffisamment robuste et ne pas induire la survenue de nouvelles MHC. De même, et cela fait partie des limites de notre étude, la quantification des poids microhémorragiques cérébraux ne pouvant être faite que lors de la coupe de cerveaux, le nombre de MHC visualisées à court et à long terme ont été réalisées sur des souris différentes, limitant ainsi l'interprétation définitive sur l'évolution des lésions.

Cette augmentation du poids microhémorragique cérébral ne s'accompagne pas d'une précipitation du déclin cognitif induit par les MHC. Il est tentant de spéculer que cela est dû à l'arrêt des traitements anticoagulants, bien que, chez des patients traités, la survenue de MHC augmente les risques de HIC malgré l'arrêt du traitement (Wilson et al., 2015). L'absence de précipitation des troubles cognitifs chez les souris ayant subi un traitement anticoagulant et une augmentation de leur poids microhémorragique cérébral est donc en faveur de la mise en

place d'un traitement oral anticoagulant chez les patients, même s'ils sont à risque de développer des MHC. En revanche, une fois les MHC détectées, suite à une plainte cognitive par exemple, la poursuite du traitement chez les patients présentant un grand nombre de MHC reste encore débattue mais la balance bénéfico-risque recommande de poursuivre l'anticoagulation chez ces patients (Smith et al., 2017). Il faudra cependant veiller aux doses et aux suivis biologiques des patients afin de limiter le risque de transformation hémorragique. Comme nous n'avons pas testé de condition de maintien de l'anticoagulation, du fait de la mortalité des animaux dont le traitement a été arrêté, notre étude ne va pas dans le sens de la clinique. Il est possible que le poids microhémorragique, bien que longtemps silencieux et non transformable en HIC sous AOD, est finalement élevé. Et l'on ne peut exclure une contribution à une fragilité qui pourrait expliquer la mortalité progressive de nos animaux au long cours, même en l'absence d'HIC spontanées. Enfin, notre étude ayant été réalisée dans un contexte non pathologique, il semble nécessaire que les MHC soient associées à une pathologie neurodégénérative pour pouvoir précipiter une altération cognitive, comme retrouvé dans les études cliniques (Goos et al., 2010; Liem et al., 2009; Moulin et al., 2016).

Enfin, ces résultats interrogent sur le remplacement des AVK par les AOD. En effet, à l'heure actuelle, rien n'est encore figé et de nombreuses interrogations demeurent sur le choix d'un traitement anticoagulant oral chez certains patients. En effet, il est maintenant admis que les AOD possèdent de nombreux avantages par rapport à la warfarine pour beaucoup de patients : ils ne nécessitent pas de surveillance de routine et la dose reste stable. Dans la plupart des indications, cette nouvelle classe thérapeutique a montré une efficacité équivalente voire supérieure aux AVK, avec une relative sécurité d'emploi et une faible variabilité interindividuelle associée à une marge thérapeutique plus large, facilitant ainsi leur utilisation (Delavenne et al., 2014; Smith et al., 2017). Cependant, la warfarine peut rester une option intéressante dans les cas compliqués car il peut être rapidement inversé. En effet, jusqu'à récemment les antidotes pour les AOD impliquaient l'utilisation d'agents non ciblés avec des résultats cliniques imprévisibles. D'autres agents plus spécifiques sont depuis arrivés sur le marché, réduisant ainsi les risques à leur utilisation (Barrett et al., 2017). L'utilisation concomitante d'autres médicaments peuvent aussi contre-indiquer l'utilisation des AOD. Par exemple, l'utilisation des antimycotiques et du ritonavir, inhibiteur de la protéase du VIH, entraîne une augmentation des taux plasmatiques de rivaroxaban et d'apixaban en raison de l'inhibition des systèmes du cytochrome P450 et de la glycoprotéine P (Di Minno et al., 2017). Mais le problème reste entier avec la warfarine qui possède, elle aussi, de nombreuses

interactions et de nombreuses sources de variabilité, telles que l'âge, le poids, l'environnement ou encore l'alimentation. Cette question du remplacement des AVK par les AOD est donc encore loin d'être résolue, et des applications au cas par cas, en fonction de la pathologie et de l'histoire personnelle du patient reste sans doute la meilleure des méthodes pour déterminer le traitement anticoagulant le mieux adapté.

4/ Influence des troubles métaboliques

Notre mode de vie sédentaire, combiné à une alimentation trop énergétique conduit à des troubles métaboliques à l'âge moyen susceptibles de favoriser une démence tardive et une dépendance (Hassing et al., 2010). Nous avons ainsi évalué les conséquences de la présence de troubles métaboliques sur la fonction vasculaire et cognitive, mais aussi sur la survenue de MHC. Pour cela, nous avons développé au laboratoire un modèle murin de troubles métaboliques qui reposent sur une alimentation riche en graisse et sur la sédentarité. Cette première partie des travaux a abouti à la rédaction d'un article dont je suis co-1^{er} auteur et qui est en reviewing dans le journal « *Neurobiology of disease* ». La seconde partie de l'étude consistait à induire des MHC dans ce contexte de troubles métaboliques.

Notre modèle repose sur l'utilisation de souris saines soumises à un régime riche en gras à hauteur de 40% et sur la sédentarité de nos animaux en cage. Ces caractéristiques permettent d'être au plus proche d'une prise de poids « naturelle » étroitement liée au mode de vie d'une population jeune jusqu'à l'âge moyen. En effet, nous avons souhaité mimer le style de vie dit « occidentalisé » incluant souvent une inactivité physique associée à une alimentation riche en gras, ce qui entraîne un déséquilibre entre les apports et les dépenses énergétiques. De même, face à l'hétérogénéité des réponses au régime gras observées chez nos souris non génétiquement modifiées (Wong et al., 2016), nous avons suivi une cohorte de 216 animaux. Cette réponse hétérogène présente néanmoins l'avantage de refléter la variabilité des réponses au régime gras que l'on peut retrouver chez l'Homme (Blundell et al., 2005). L'alimentation à base de 40% de graisses (régime HFD) a été choisie afin d'obtenir une réponse lente et progressive de la mise en place de troubles métaboliques, contrairement à d'autres modèles murins reposant sur des régimes riches en gras mais en plus forte proportion (jusqu'à 60% de gras), des régimes riches en fructose ou en glucose, et des régimes alliant un excès de gras et de sucre (Buettner et al., 2007; Panchal and Brown, 2011; Wong et al., 2016). La mise en place de troubles métaboliques pouvant être la conséquence de diverses conditions, chaque modèle a son importance et sa pertinence clinique. Notre régime HFD amène la mise en place

de troubles métaboliques dès 3 mois de régime, avec une prise de poids augmentée qui s'accompagne d'un dépôt de graisse viscérale, d'une intolérance au glucose, d'une hypercholestérolémie et d'une stéatose hépatique. Tous ces paramètres sont classiquement associés à un régime riche en gras (Buettner et al., 2007). Un fait intéressant est que nous retrouvons une prise de poids importante chez certains des animaux sous régime normal, avec 20% de souris obèses à 6 mois, confirmant l'impact non négligeable de la sédentarité dans le développement d'un surpoids (Lautenschlager et al., 2008). C'est sur cet aspect que nous avons décidé de catégoriser les animaux en fonction de leur poids et non plus en fonction de leur régime alimentaire afin de tenter de faire des corrélations entre les dysfonctionnements observés et la prise de poids. Cette façon d'interpréter les résultats permet également de prendre en compte l'hétérogénéité de prise de poids des animaux qui ont tous un accès *ad libitum* à l'eau et à l'alimentation. Elle nous a permis de sélectionner le meilleur paramètre métabolique, le tissu adipeux viscéral, en corrélation avec le poids et ainsi de mieux définir les associations entre perturbations métaboliques, fonctions cognitives et fonctions vasculaires.

Concernant l'évaluation fonctionnelle de l'impact de troubles métaboliques chez nos souris, le HFD à long terme ne réduit pas les capacités d'apprentissage, la mémoire spatiale ou la mémoire de travail. D'autres études pré-cliniques ont montré un impact d'une alimentation enrichie en gras sur la mémoire de travail, mais les conditions ne sont pas tout à fait les mêmes, avec notamment un début de mise sous régime plus précoce (5 semaines au lieu de 8 dans nos expériences). La période précoce entre le sevrage et l'âge adulte étant particulièrement vulnérable aux effets néfastes d'une alimentation grasse, cela pourrait expliquer les divergences obtenues (Boitard et al., 2012; Wang et al., 2017). En revanche, notre régime alimentaire induit une altération progressive de la mémoire de reconnaissance visuelle qui devient drastiquement diminuée en fin de protocole à 12 mois. Mais plus que le régime en lui-même, la catégorisation des souris en fonction de leur poids a permis de mettre en évidence une altération de la flexibilité (évaluée lors de la deuxième semaine du test de Barnes) chez les souris obèses et en surpoids. De même, l'altération de la mémoire de reconnaissance visuelle est d'autant plus importante que la souris est en surpoids. Cela s'accompagne d'une baisse des performances motrices chez les souris obèses. Ainsi, au vu de ces différentes dysfonctions fonctionnelles, nous pouvons dire que globalement notre modèle présente les signes d'un déclin cognitif léger associé à un gain de poids chez les souris à l'âge moyen (Webster et al., 2014). Ce résultat se rapproche de ce qui est observé en clinique

humaine où sont retrouvés les liens entre la prise de poids à l'âge moyen et la baisse des performances cognitives, notamment dans les zones cérébrales impliquées dans les fonctions exécutives complexes (cortex préfrontal et périrhinal) (Barker and Warburton, 2011; Hassing et al., 2010; Whitmer et al., 2005). Une étude clinique de 2007 a également mis en évidence un lien entre un indice de masse corporelle élevé (calculé en divisant le poids par la taille au carré et reflétant la corpulence d'un patient) et une faible performance aux tests cognitifs (Gunstad et al., 2007). L'étiologie de ces troubles reste encore incertaine, mais de plus en plus de travaux suggèrent que l'altération cérébrovasculaire contribue au développement de troubles cognitifs (Duncombe et al., 2017; Toth et al., 2017). Au niveau vasculaire, des dysfonctions ont été observées dans les petites artères parenchymateuses situées dans les zones d'intérêt associées à nos paradigmes comportementaux (cortex préfrontal, cortex périrhinal, hippocampe). Cependant, les perturbations ne sont pas identiques d'une zone à l'autre et certaines réponses sont plus altérées chez les souris obèses comparées aux autres conditions. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces différences de réponse d'une zone à l'autre : l'étendue de la tortuosité vasculaire (Chesnutt and Han, 2011), l'augmentation de la paroi artérielle (Tümer et al., 2014) ou encore la modification de la structure et de la composition des artères piales (Kang et al., 2016). Toutes ces modifications vasculaires liées à l'âge peuvent aussi être impactées par la prise de poids et la présence de troubles métaboliques chez nos souris. Ces résultats sont complétés avec l'étude de la réactivité de l'ACM dont la présence de troubles métaboliques induit une perte de capacité d'adaptation de cette artère aux changements de résistance vasculaire. Cependant, ces différentes dysfonctions vasculaires ne s'accompagnent pas d'une réduction de la perfusion cérébrale basale (visualisée par IRM), ni de lésions parenchymateuses (microhémorragies, microinfarctus), suggérant précisément un couplage neurovasculaire moins efficace lors d'une stimulation. Ces perturbations pourraient réduire les performances cognitives à l'âge moyen lors de sollicitations importantes, mais aussi rendre les zones cérébrales impliquées plus vulnérables à un déclin cognitif tardif lié à l'âge ou à une pathologie. Ce concept est retrouvé dans certaines études cliniques suggérant un impact des troubles métaboliques, plus particulièrement de l'obésité, sur les performances cognitives à long terme notamment *via* une baisse du flux sanguin cérébral et une dysfonction vasculaire (Dahl et al., 2010; Tesauro and Cardillo, 2011; Willeumier et al., 2011). Les patients concernés étant souvent sous médication (traitement hypocholestérolémiant, hypolipémiant ou antidiabétique), nous souhaitons compléter ce travail par d'autres études plus mécanistiques et pharmacologiques. Dans un premier temps, il serait intéressant d'étudier le couplage neurovasculaire par des approches

électrophysiologiques ou électriques. Par exemple, nous souhaiterions valider le test de stimulation des vibrisses sur le flux sanguin cérébral. En effet, la stimulation des vibrisses provoque une activation neuronale dans une région cérébrale correspondante (Barrel cortex) qui nécessite une augmentation du flux sanguin pour approvisionner les neurones activés. Cette réponse reflète donc un couplage neurovasculaire. Cette étude a déjà été réalisée dans un modèle de rats nourris avec une diète enrichie pendant 8 semaines, chez lesquels une perte de cette adaptation vasculaire a été observée (Li et al., 2013). Nous aspirons donc à réaliser ces expériences dans notre modèle afin de renforcer notre hypothèse de perturbations du couplage neurovasculaire. De même, nous souhaitons compléter notre approche électrophysiologique sur tranche de cerveaux par une approche pharmacologique nous permettant d'explorer les voies GABAergiques (neurotransmissions inhibitrices) et glutamatergiques (neurotransmissions excitatrices). En effet, un déséquilibre entre ces deux voies de transmission pourrait être impliqué dans la baisse des performances cognitives liées à l'âge *via* une modification de la plasticité synaptique. Le but de ces expériences sera ainsi de tenter d'identifier des marqueurs électrophysiologiques d'un déclin cognitif et ainsi de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques. Enfin, nous souhaitons moduler les désordres cognitifs et vasculaires induits par le régime enrichi par différentes approches : (i) arrêter la nourriture enrichie après les 12 mois de régime afin de voir si les troubles provoqués sont réversibles ; (ii) associer notre régime enrichi à des traitements pharmacologiques (metformine) ou nutraceutiques (curcumin) afin de pouvoir évaluer leurs bénéfices potentiels sur les fonctions cognitives et vasculaires.

En parallèle de ce travail, nous avons voulu tester l'influence des MHC dans ce contexte de déclin cognitif vasculaire non dégénératif qui induit des dysfonctionnements au niveau des vaisseaux cérébraux sans altération du tissu cérébral. En partant des résultats discutés plus haut, nous avons choisi d'induire des MHC soit à 3 mois de régime enrichi où les troubles métaboliques sont tout juste installés, ou alors en toute fin de protocole à 12 mois de régime où les troubles métaboliques, vasculaires et cognitifs altèrent progressivement le cerveau et ses vaisseaux depuis 9 mois. Au niveau lésionnel, la survenue de MHC à 3 mois de HFD ne modifie pas le poids microhémorragique cérébral, que ce soit le nombre de lésions ou le profil microhémorragique. Cela s'accompagne d'une absence d'impact au niveau fonctionnel et cognitif, renforçant encore une fois l'idée que nous sommes en présence de lésions silencieuses. En revanche, lorsque les lésions sont induites après 12 mois de régime, le nombre de MHC provoquées est significativement plus important chez les souris sous régime

gras par rapport à celle sous diète normale. Cependant, cette augmentation du nombre de lésions ne s'accompagne pas d'une modification significative du profil microhémorragique, suggérant une absence de risque de saignement plus sévère. L'augmentation du nombre d'évènements à 12 mois chez les souris HFD suggère la mise en place d'une fragilité vasculaire induite par la présence de troubles métaboliques. Cette fragilité ne semble pas être structurale car aucune lésion ni altération de la perméabilité vasculaire n'ont été observées chez les souris HFD lors de l'étude princeps. Cet aspect nous permet plutôt d'envisager une altération diffuse de l'endothélium vasculaire, comme retrouvée dans nos investigations autour de la fonction vasculaire et dans certaines études expérimentales (Li et al., 2013; Medeiros et al., 2017). L'augmentation de la sévérité des lésions induites sous HFD s'accompagne d'une diminution des performances au niveau locomoteur, signifiant ainsi que les MHC deviennent alors symptomatiques. Au niveau des tests cognitifs, nous ne retrouvons aucun effet ni du régime ni des MHC au niveau de la mémoire de travail. En revanche, nous retrouvons l'effet délétère du régime enrichi sur la mémoire de reconnaissance visuelle, mais cela ne semble pas être aggravé par la présence de MHC. Il faut cependant rester prudent sur ces résultats car les souris HFD avec MHC étant diminuées physiquement, uniquement deux souris ont été en mesure de réaliser la phase du test du NOR. Il est donc indispensable de répéter ces expériences et de compléter les groupes pour confirmer les résultats obtenus. Nous pouvons constater un léger effet de la survenue de MHC chez les souris sous diète normale dont les performances tendent à diminuer (mais sans significativité) par rapport aux souris sans lésions. C'est la première fois que nous retrouvons un effet aigu de nos MHC et cela peut sans doute être attribué à l'âge des souris et à l'importante charge microhémorragique induite par notre méthode. Ainsi, l'état du cerveau (influencé par l'âge ou l'alimentation) semble contribuer au pouvoir symptomatique potentiel des MHC. Enfin, il est intéressant de noter que la mortalité induite par l'induction des MHC à 12 mois n'est pas différente entre les souris ND et celles HFD (de l'ordre de 37%). Cette mortalité est assez importante mais classique au vu de l'âge des souris (15 mois), ce qui leur confère une fragilité supplémentaire à l'anesthésie et aux lésions induites. Cependant, la présence de troubles métaboliques ne semble pas rajouter un risque supplémentaire.

Enfin, comme l'absence d'effet aigu à 3 mois pouvait masquer l'induction d'une fragilité aux effets plus tardifs, nous avons voulu évaluer l'impact potentiel d'un régime HFD sur l'évolution des lésions induites. Pour cela, nous avons provoqué des MHC chez nos souris à 3 mois de régime, et nous les avons suivies jusqu'à 12 mois où elles ont été sacrifiées pour

estimer les poids microhémorragiques à long terme. Au niveau lésionnel, nous n'avons pas trouvé de différences entre nos deux groupes d'animaux, que ce soit sur le nombre de MHC que sur les profils microhémorragiques. La présence d'un régime enrichi ne semble donc pas influencer sur l'évolution des lésions (aucune transformation hémorragique ni augmentation de la taille des lésions) ni induire de MHC supplémentaires. Nous pourrions penser que la fragilité vasculaire induite par les troubles métaboliques aurait pu modifier de manière délétère le poids microhémorragique cérébral, comme il a déjà été suggéré dans l'HIC (Guo et al., 2016; Park et al., 2013). Nous pouvons supposer que cela puisse être dû à la taille de nos lésions qui restent microscopiques et dont la présence de troubles métaboliques n'a pas d'effet structural suffisant pour faire évoluer de manière significative les MHC vers des hémorragies plus conséquentes. De plus, il est admis que le SMet est plutôt pro-thrombotique, notamment *via* les adipocytes et une surexpression du PAI-1 plasmatique (McCracken et al., 2018) : cela peut également expliquer l'absence d'extension des saignements provoqués. Au niveau comportemental, la présence de MHC n'impacte pas les performances locomotrices quel que soit le groupe de souris concerné. Notons cependant un léger effet au niveau du nombre de redressements qui cette fois-ci augmente chez les animaux avec MHC. Ce résultat évaluant l'état d'anxiété et la curiosité des animaux reste annexe et nécessite des études plus approfondies (tests d'anxiété et d'anhédonie), en prenant en compte l'impact des désordres métaboliques et du diabète qui sont suspectés d'induire des troubles dépressifs chez les patients (Butnorienė et al., 2018, 2014; Zanoveli et al., 2016). Au niveau cognitif, nous n'observons aucune modification de la mémoire de travail à court terme, quel que soit le groupe concerné. En revanche, nous retrouvons l'effet délétère de la présence de MHC sur la mémoire de reconnaissance visuelle dont l'impact devient significatif à partir de 9 mois de régime. Nous retrouvons également l'effet de la présence de troubles métaboliques qui vient diminuer les performances de la mémoire de reconnaissance visuelle dès 6 mois de régime enrichi. En revanche, nous n'observons pas de précipitation ou d'aggravation de ce déclin chez les souris cumulant les 2 conditions (HFD-MHC). Nous pouvons ainsi supposer que les processus impliqués dans le déclin observé par les MHC et par le HFD passent par les mêmes mécanismes physiopathologiques. Ces mécanismes peuvent être liés à l'altération du couplage neurovasculaire, soit par une altération directe des cellules endothéliales vasculaires soit par une interruption de la propagation rétrograde du couplage neurovasculaire. En effet, il est maintenant admis que le couplage neurovasculaire ne repose pas uniquement sur un processus unidimensionnel impliquant la signalisation neurones-astrocytes-vaisseaux mais plus sur un processus multidimensionnel dans lequel des médiateurs libérés de multiples

cellules engagent des voies de signalisation et des systèmes effecteurs distincts dans l'ensemble du réseau cérébro-vasculaire et d'une manière très orchestrée (Iadecola, 2017). Dans ce contexte, les cellules endothéliales sont particulièrement impliquées dans la propagation rétrograde des réponses vasomotrices aux activités induites par les signaux neurovasculaires. L'induction des MHC ou de troubles métaboliques pourraient donc venir interférer cette propagation et limiter ainsi les réponses vasculaires ce qui, à terme, pourrait impacter les performances cognitives (Iadecola, 2017; Mogi and Horiuchi, 2011). Nous tenterons d'étudier ces différents mécanismes dans la suite de cette étude par le biais de techniques de vasomotricité couplées à des modulations pharmacologiques qui permettent d'étudier plus spécifiquement chaque voie de signalisation. Enfin, la neuroinflammation peut faire partie des mécanismes communs aux deux pathologies. En effet, tout comme les MHC, les troubles métaboliques sont connus pour provoquer une réaction inflammatoire, notamment *via* l'activation des astrocytes et de la microglie et la libération de cytokines (van Dijk et al., 2015; Van Dyken and Lacoste, 2018). Ces mécanismes étant déjà activés par la présence de troubles métaboliques, la survenue de MHC ne viendrait donc pas précipiter ou aggraver les processus inflammatoires induits. Par des techniques immunohistochimiques, nous essaierons ainsi d'étudier les mécanismes inflammatoires induits autour des lésions et par le HFD afin de comprendre la temporalité et l'intensité des évènements induits.

Cette étude évaluant l'impact de la survenue de MHC dans un contexte de troubles métaboliques possède de nombreuses limites qu'il va falloir résoudre avant de la soumettre pour publication. Tout d'abord, il est indispensable de compléter les différents groupes afin d'augmenter les effectifs et ainsi de confirmer les résultats obtenus. Comme dans notre étude princeps, nous sommes confrontés à une grande hétérogénéité des réponses des souris au régime alimentaire, ce qui se répercute sur les résultats obtenus. Mais ici, en raison de l'effectif trop faible, nous n'avons pas pu catégoriser les animaux en fonction de leur poids, ce qui a limité nos interprétations. Enfin, il serait intéressant de rajouter de nouveaux tests comportementaux dans nos investigations, notamment pour évaluer l'état d'anxiété des animaux qui reste toujours un facteur pouvant influencer les résultats, mais aussi avec d'autres tests cognitifs tels que l'évitement passif ou le labyrinthe de Barnes, ce qui nous permettrait d'être plus sensible et de détecter d'autres effets des MHC (notamment au niveau de la flexibilité). En effet, les troubles métaboliques impactent fortement la mémoire de reconnaissance visuelle et il semble difficile d'y trouver un effet aggravant. Cela fait

également partie des limites du test du NOR et c'est pourquoi il semble nécessaire de le compléter par d'autres tests comportementaux plus sensibles.

Au regard de la question de l'« Influence des facteurs de risque vasculaire sur la toxicité des microhémorragies cérébrales » qui a fait l'objet de cette thèse, et des résultats que nous avons fournis, il serait tentant de répondre qu'il n'y a pas d'influence directe de ces facteurs de risque dans nos conditions. En effet, au niveau lésionnel, la présence d'un facteur de risque vasculaire hémostatique, représenté ici par un traitement anticoagulant oral, n'a pas d'impact majeur sur le poids microhémorragique cérébral, hormis pour la warfarine et encore uniquement à la phase aiguë car les survivants évoluent de la même manière. De même pour l'impact des facteurs de risque vasculaire métaboliques dont les conséquences sur les lésions n'ont lieu qu'en toute fin de régime, avec une augmentation du nombre de MHC mais sans modification notable des profils microhémorragiques obtenus. Enfin, la présence de MHC ne vient pas précipiter ou aggraver un déclin cognitif induit par ces facteurs de risques, influençant que peu les résultats obtenus. Au final, comme ces expériences ont été réalisées dans un contexte d'altération cognitive vasculaire et non dégénérative, il semblerait qu'il faille un cerveau altéré par un processus dégénératif tissulaire ou vasculaire pour qu'un ensemble de microhémorragies puisse précipiter un déclin cognitif. Il serait alors intéressant d'évaluer cette hypothèse dans un modèle de CAA ou post-AVC, où il y aurait une atteinte structurale des vaisseaux (Held et al., 2017; Hu Xiaoming et al., 2017; Valenti et al., 2017b). Cela nous permettrait peut-être de faire la différence avec les effets que nous avons retrouvés dans un cerveau sain et ainsi de trouver ce qui, dans un cerveau atteint de CAA par exemple rend les MHC aggravantes pour le patient. Bien que cela risque de provoquer davantage de morts prématurées et de limiter un suivi au long cours, il serait également intéressant d'appliquer cette méthode chez des souris femelles et chez des animaux plus âgés afin d'être au plus proche de la clinique humaine. Il est cependant important que les désordres cognitifs ne soient pas trop importants ou précipités afin de pouvoir mettre en évidence l'impact de ces lésions. Cela aidera à une meilleure compréhension des mécanismes impliqués autour de ces MHC au cours de la physiopathologie de la maladie associée.

Références

- Aarsland, D., Creese, B., Politis, M., Chaudhuri, K.R., ffytche, D.H., Weintraub, D., Ballard, C., 2017. Cognitive decline in Parkinson disease. *Nature Reviews Neurology* 13, 217–231.
- Adcock, D.M., Gosselin, R., 2015. Direct Oral Anticoagulants (DOACs) in the Laboratory: 2015 Review. *Thrombosis Research* 136, 7–12.
- Ahima, R.S., Flier, J.S., 2000. Leptin. *Annu. Rev. Physiol.* 62, 413–437.
- Ahn, S.J., Anrather, J., Nishimura, N., Schaffer, C.B., 2018. Diverse Inflammatory Response After Cerebral Microbleeds Includes Coordinated Microglial Migration and Proliferation. *Stroke* STROKEAHA.117.020461.
- Akoudad, S., Wolters, F.J., Viswanathan, A., de Bruijn, R.F., van der Lugt, A., Hofman, A., Koudstaal, P.J., Ikram, M.A., Vernooij, M.W., 2016. Association of Cerebral Microbleeds With Cognitive Decline and Dementia. *JAMA Neurology* 73, 934.
- Amarenco, P., Labreuche, J., 2009. Lipid management in the prevention of stroke: review and updated meta-analysis of statins for stroke prevention. *The Lancet Neurology* 8, 453–463.
- Antunes, M., Biala, G., 2012. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cogn Process* 13, 93–110.
- Aziz, N.A., Pijl, H., Frölich, M., Snel, M., Streefland, T.C.M., Roelfsema, F., Roos, R.A.C., 2010. Systemic energy homeostasis in Huntington's disease patients. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 81, 1233–1237.
- Babu, R., Bagley, J.H., Di, C., Friedman, A.H., Adamson, C., 2012. Thrombin and hemin as central factors in the mechanisms of intracerebral hemorrhage-induced secondary brain injury and as potential targets for intervention. *Neurosurgical Focus* 32, E8.
- Baeten, K.M., Akassoglou, K., 2011. Extracellular Matrix and Matrix Receptors in Blood-Brain Barrier Formation and Stroke. *Dev Neurobiol* 71, 1018–1039.
- Barbeau, E., Didic, M., Tramon, E., Felician, O., Joubert, S., Sontheimer, A., Ceccaldi, M., Poncet, M., 2004. Evaluation of visual recognition memory in MCI patients. *Neurology* 62, 1317–1322.
- Bardehle, S., Rafalski, V.A., Akassoglou, K., 2015. Breaking boundaries—coagulation and fibrinolysis at the neurovascular interface. *Front Cell Neurosci* 9.
- Barker, G.R.I., Warburton, E.C., 2011. When is the hippocampus involved in recognition memory? *J. Neurosci.* 31, 10721–10731.
- Barrett, A., Moore, M., Ferrins, P., Thornton, P., Murphy, P., Quinn, J., 2017. From a direct oral anticoagulant to warfarin: reasons why patients switch. *Ir J Med Sci* 1–3.
- Bates, G.P., Dorsey, R., Gusella, J.F., Hayden, M.R., Kay, C., Leavitt, B.R., Nance, M., Ross, C.A., Scahill, R.I., Wetzel, R., Wild, E.J., Tabrizi, S.J., 2015. Huntington disease. *Nature Reviews Disease Primers* 1, 15005.
- Bergeron, S., Chen, Y., Auger, F., Deguil, J., Durieux, N., Skrobala, E., Barus, R., Potey, C., Cordonnier, C., Pasquier, F., Ravasi, L., Bordet, R., Gautier, S., 2018. Role of cortical microbleeds in cognitive impairment: In vivo behavioral and imaging characterization of a novel murine model. *J Cereb Blood Flow Metab* 0271678X17752765.
- Biffi, A., Greenberg, S.M., 2011. Cerebral Amyloid Angiopathy: A Systematic Review. *J Clin Neurol* 7, 1–9.
- Blundell, J.E., Stubbs, R.J., Golding, C., Croden, F., Alam, R., Whybrow, S., Le Noury, J., Lawton, C.L., 2005. Resistance and susceptibility to weight gain: Individual variability in response to a high-fat diet. *Physiology & Behavior, Purdue University Ingestive Behavior Research Center Symposium. Dietary Influences on Obesity: Environment, Behavior and Biology* 86, 614–622.

- Boitard, C., Etchamendy, N., Sauvant, J., Aubert, A., Tronel, S., Marighetto, A., Layé, S., Ferreira, G., 2012. Juvenile, but not adult exposure to high-fat diet impairs relational memory and hippocampal neurogenesis in mice. *Hippocampus* 22, 2095–2100.
- Bokura, H., Yamaguchi, S., Iijima, K., Nagai, A., Oguro, H., 2008. Metabolic syndrome is associated with silent ischemic brain lesions. *Stroke* 39, 1607–1609.
- Bondi, M.W., Edmonds, E.C., Salmon, D.P., 2017. Alzheimer's Disease: Past, Present, and Future. *J Int Neuropsychol Soc* 23, 818–831.
- Bourin, M., Hascoët, M., 2003. The mouse light/dark box test. *European Journal of Pharmacology, Animal Models of Anxiety Disorders* 463, 55–65.
- Boyano, I., Bravo, N., Miranda, J., Gil-Gregorio, P., Olazarán, J., 2016. Brain microbleeds: Epidemiology and clinical implications. *Neurologia*.
- Brainin, M., Tuomilehto, J., Heiss, W.-D., Bornstein, N.M., Bath, P.M.W., Teuschl, Y., Richard, E., Guekht, A., Quinn, T., Post Stroke Cognition Study Group, 2015. Post-stroke cognitive decline: an update and perspectives for clinical research. *Eur. J. Neurol.* 22, 229–238, e13-16.
- Brites, D., 2012. The Evolving Landscape of Neurotoxicity by Unconjugated Bilirubin: Role of Glial Cells and Inflammation. *Front. Pharmacol.* 3.
- Brosch, J.R., Farlow, M.R., Risacher, S.L., Apostolova, L.G., 2017. Tau Imaging in Alzheimer's Disease Diagnosis and Clinical Trials. *Neurotherapeutics* 14, 62–68.
- Brundel, M., de Bresser, J., van Dillen, J.J., Kappelle, L.J., Biessels, G.J., 2012. Cerebral microinfarcts: a systematic review of neuropathological studies. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 32, 425–436.
- Buettner, R., Schölmerich, J., Bollheimer, L.C., 2007. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity (Silver Spring)* 15, 798–808.
- Butnoriene, J., Bunevicius, A., Norkus, A., Bunevicius, R., 2014. Depression but not anxiety is associated with metabolic syndrome in primary care based community sample. *Psychoneuroendocrinology* 40, 269–276.
- Butnoriene, J., Steibliene, V., Saudargiene, A., Bunevicius, A., 2018. Does presence of metabolic syndrome impact anxiety and depressive disorder screening results in middle aged and elderly individuals? A population based study. *BMC Psychiatry* 18.
- Cao, S., Zheng, M., Hua, Y., Chen, G., Keep, R.F., Xi, G., 2016. Hematoma Changes During Clot Resolution After Experimental Intracerebral Hemorrhage. *Stroke* 47, 1626–1631.
- Carare, R.O., Hawkes, C.A., Jeffrey, M., Kalara, R.N., Weller, R.O., n.d. Review: Cerebral amyloid angiopathy, prion angiopathy, CADASIL and the spectrum of protein elimination failure angiopathies (PEFA) in neurodegenerative disease with a focus on therapy. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 39, 593–611.
- Case, N.F., Charlton, A., Zwiers, A., Batool, S., McCreary, C.R., Hogan, D.B., Ismail, Z., Zerna, C., Coutts, S.B., Frayne, R., Goodyear, B., Haffenden, A., Smith, E.E., 2016. Cerebral Amyloid Angiopathy Is Associated With Executive Dysfunction and Mild Cognitive Impairment. *Stroke* 47, 2010–2016.
- Chabriat, H., Joutel, A., Dichgans, M., Tournier-Lasserre, E., Bousser, M.-G., 2009. CADASIL. *The Lancet Neurology* 8, 643–653.
- Chao, L.L., Buckley, S.T., Kornak, J., Schuff, N., Madison, C., Yaffe, K., Miller, B.L., Kramer, J.H., Weiner, M.W., 2010. ASL Perfusion MRI Predicts Cognitive Decline and Conversion From MCI to Dementia. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 24, 19–27.
- Charidimou, A., Imaizumi, T., Moulin, S., Biffi, A., Samarasekera, N., Yakushiji, Y., Peeters, A., Vandermeeren, Y., Laloux, P., Baron, J.-C., Hernandez-Guillamon, M., Montaner, J., Casolla, B., Gregoire, S.M., Kang, D.-W., Kim, J.S., Naka, H., Smith, E.E., Viswanathan, A., Jäger, H.R., Salman, R.A.-S., Greenberg, S.M., Cordonnier, C.,

- Werring, D.J., 2017. Brain hemorrhage recurrence, small vessel disease type, and cerebral microbleeds: A meta-analysis. *Neurology* 89, 820–829.
- Charidimou, A., Shakeshaft, C., Werring, D.J., 2012. Cerebral microbleeds on magnetic resonance imaging and anticoagulant-associated intracerebral hemorrhage risk. *Front. Neur.* 3, 133.
- Charidimou, A., Shams, S., Romero, J.R., Ding, J., Veltkamp, R., Horstmann, S., Eiriksdottir, G., van Buchem, M.A., Gudnason, V., Himali, J.J., Gurol, M.E., Viswanathan, A., Imaizumi, T., Vernooij, M.W., Seshadri, S., Greenberg, S.M., Benavente, O.R., Launer, L.J., Shoamanesh, A., for The International META-MICROBLEEDS Initiative, 2018. Clinical significance of cerebral microbleeds on MRI: A comprehensive meta-analysis of risk of intracerebral hemorrhage, ischemic stroke, mortality, and dementia in cohort studies (v1). *International Journal of Stroke* 174749301775193.
- Chesnutt, J.K.W., Han, H.-C., 2011. Tortuosity triggers platelet activation and thrombus formation in microvessels. *J Biomech Eng* 133, 121004.
- Christian, A.E., Haynes, M.P., Phillips, M.C., Rothblat, G.H., 1997. Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. *J. Lipid Res.* 38, 2264–2272.
- Chu, C.T., Caruso, J.L., Cummings, T.J., Ervin, J., Rosenberg, C., Hulette, C.M., 2000. Ubiquitin immunohistochemistry as a diagnostic aid for community pathologists evaluating patients who have dementia. *Mod. Pathol.* 13, 420–426.
- Cianchetti, F.A., Kim, D.H., Dimiduk, S., Nishimura, N., Schaffer, C.B., 2013. Stimulus-Evoked Calcium Transients in Somatosensory Cortex Are Temporarily Inhibited by a Nearby Microhemorrhage. *PLoS ONE* 8, e65663.
- Clare, L., Wu, Y.-T., Teale, J.C., MacLeod, C., Matthews, F., Brayne, C., Woods, B., CFAS-Wales study team, 2017. Potentially modifiable lifestyle factors, cognitive reserve, and cognitive function in later life: A cross-sectional study. *PLoS Med.* 14, e1002259.
- Clemensson, E.K.H., Clemensson, L.E., Fabry, B., Riess, O., Nguyen, H.P., 2017. Further investigation of phenotypes and confounding factors of progressive ratio performance and feeding behavior in the BACHD rat model of Huntington disease. *PLoS One* 12.
- Coelho, M., Ferreira, J.J., 2012. Late-stage Parkinson disease. *Nature Reviews Neurology* 8, 435–442.
- Collette, F., Salmon, E., n.d. Les effets du vieillissement normal et pathologique sur la cognition. *Rev Med Liège* 5.
- Cordonnier, C., Al-Shahi Salman, R., Wardlaw, J., 2007. Spontaneous brain microbleeds: systematic review, subgroup analyses and standards for study design and reporting. *Brain* 130, 1988–2003.
- Cordonnier, C., van der Flier, W.M., Sluimer, J.D., Leys, D., Barkhof, F., Scheltens, P., 2006. Prevalence and severity of microbleeds in a memory clinic setting. *Neurology* 66, 1356–1360.
- Coughlin, S.R., 2000. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature* 407, 258.
- Cutler, T.S., Park, S., Loh, D.H., Jordan, M.C., Yokota, T., Roos, K.P., Ghiani, C.A., Colwell, C.S., 2017. Neurocardiovascular deficits in the Q175 mouse model of Huntington's disease. *Physiol Rep* 5.
- Dahl, A., Hassing, L.B., Fransson, E., Berg, S., Gatz, M., Reynolds, C.A., Pedersen, N.L., 2010. Being Overweight in Midlife Is Associated With Lower Cognitive Ability and Steeper Cognitive Decline in Late Life. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 65A, 57–62.
- Daugherty, A.M., Raz, N., 2017. Incident risk and progression of cerebral microbleeds in healthy adults: a multi-occasion longitudinal study. *Neurobiology of Aging* 59, 22–29.
- Davey, K.J., Cotter, P.D., O'Sullivan, O., Crispie, F., Dinan, T.G., Cryan, J.F., O'Mahony, S.M., 2013. Antipsychotics and the gut microbiome: olanzapine-induced metabolic

- dysfunction is attenuated by antibiotic administration in the rat. *Transl Psychiatry* 3, e309.
- de Leeuw, F.E., de Groot, J.C., Achten, E., Oudkerk, M., Ramos, L.M., Heijboer, R., Hofman, A., Jolles, J., van Gijn, J., Breteler, M.M., 2001. Prevalence of cerebral white matter lesions in elderly people: a population based magnetic resonance imaging study. The Rotterdam Scan Study. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 70, 9–14.
- De Reuck, J., Deramecourt, V., Cordonnier, C., Auger, F., Durieux, N., Bordet, R., Maurage, C.A., Leys, D., Pasquier, F., 2012. Detection of microbleeds in post-mortem brains of patients with frontotemporal lobar degeneration: a 7.0-Tesla magnetic resonance imaging study with neuropathological correlates. *Eur. J. Neurol.* 19, 1355–1360.
- De Silva, T.M., Faraci, F.M., 2016. Microvascular Dysfunction and Cognitive Impairment. *Cellular and Molecular Neurobiology* 36, 241–258.
- Debette, S., Seshadri, S., Beiser, A., Au, R., Himali, J.J., Palumbo, C., Wolf, P.A., DeCarli, C., 2011. Midlife vascular risk factor exposure accelerates structural brain aging and cognitive decline 8.
- Delavenne, X., Laporte, S., Mismetti, P., 2014. [New oral anticoagulants: pharmacological data to know for clinical practice]. *Rev Med Suisse* 10, 319–324.
- Di Minno, A., Frigerio, B., Spadarella, G., Ravani, A., Sansaro, D., Amato, M., Kitzmiller, J.P., Pepi, M., Tremoli, E., Baldassarre, D., 2017. Old and new oral anticoagulants: Food, herbal medicines and drug interactions. *Blood Reviews* 31, 193–203.
- Dichgans Martin, Leys Didier, 2017. Vascular Cognitive Impairment. *Circulation Research* 120, 573–591.
- Dickson, D.W., 2018. Neuropathology of Parkinson disease. *Parkinsonism & Related Disorders* 46, S30–S33.
- Ding, J., Sigurðsson, S., Jónsson, P.V., Eiriksdottir, G., Meirelles, O., Kjartansson, O., Lopez, O.L., van Buchem, M.A., Gudnason, V., Launer, L.J., 2017. Space and location of cerebral microbleeds, cognitive decline, and dementia in the community. *Neurology* 88, 2089–2097.
- Direk, N., Perez, H.S., Akoudad, S., Verhaaren, B.F.J., Niessen, W.J., Hofman, A., Vernooij, M.W., Ikram, M.A., Tiemeier, H., 2016. Markers of cerebral small vessel disease and severity of depression in the general population. *Psychiatry Research: Neuroimaging* 253, 1–6.
- Dixon, S.J., Stockwell, B.R., 2014. The role of iron and reactive oxygen species in cell death. *Nature Chemical Biology* 10, 9–17.
- Douven, E., Schievink, S.H.J., Verhey, F.R.J., van Oostenbrugge, R.J., Aalten, P., Staals, J., Köhler, S., 2016. The Cognition and Affect after Stroke - a Prospective Evaluation of Risks (CASPER) study: rationale and design. *BMC Neurology* 16, 65.
- Duering, M., Righart, R., Csanadi, E., Jouvent, E., Hervé, D., Chabriat, H., Dichgans, M., 2012. Incident subcortical infarcts induce focal thinning in connected cortical regions. *Neurology* 79, 2025–2028.
- Duncombe, J., Kitamura, A., Hase, Y., Ihara, M., Kalaria, R.N., Horsburgh, K., 2017. Chronic cerebral hypoperfusion: a key mechanism leading to vascular cognitive impairment and dementia. Closing the translational gap between rodent models and human vascular cognitive impairment and dementia. *Clinical Science* 131, 2451–2468.
- Ellis, R.J., Olichney, J.M., Thal, L.J., Mirra, S.S., Morris, J.C., Beekly, D., Heyman, A., 1996. Cerebral amyloid angiopathy in the brains of patients with Alzheimer's disease: the CERAD experience, Part XV. *Neurology* 46, 1592–1596.
- Fang, M.C., Go, A.S., Chang, Y., Hylek, E.M., Henault, L.E., Jensvold, N.G., Singer, D.E., 2007. Death and Disability from Warfarin-Associated Intracranial and Extracranial Hemorrhages. *The American Journal of Medicine* 120, 700–705.

- Ferris, H.A., Kahn, C.R., 2012. New mechanisms of glucocorticoid-induced insulin resistance: make no bones about it. *J Clin Invest* 122, 3854–3857.
- Fisher, M.J., 2013. Brain Regulation of Thrombosis and Hemostasis From Theory to Practice. *Stroke* 44, 3275–3285.
- Folstein, M.F., Folstein, S.E., McHugh, P.R., 1975. “Mini-mental state”. A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* 12, 189–198.
- Frisoni, G.B., Fox, N.C., Jack, C.R., Scheltens, P., Thompson, P.M., 2010. The clinical use of structural MRI in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* 6, 67–77.
- Gao, C., Du, H., Hua, Y., Keep, R.F., Strahle, J., Xi, G., 2014. Role of Red Blood Cell Lysis and Iron in Hydrocephalus after Intraventricular Hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab* 34, 1070–1075.
- Gardener, H., Wright, C.B., Rundek, T., Sacco, R.L., 2015. Brain health and shared risk factors for dementia and stroke. *Nature Reviews Neurology* 11, 651–657.
- Goos, J.D.C., Henneman, W.J.P., Sluimer, J.D., Vrenken, H., Sluimer, I.C., Barkhof, F., Blankenstein, M.A., Scheltens, P.H., van der Flier, W.M., 2010. Incidence of cerebral microbleeds: A longitudinal study in a memory clinic population. *Neurology* 74, 1954–1960.
- Goos, J.D.C., Kester, M.I., Barkhof, F., Klein, M., Blankenstein, M.A., Scheltens, P., van der Flier, W.M., 2009. Patients With Alzheimer Disease With Multiple Microbleeds: Relation With Cerebrospinal Fluid Biomarkers and Cognition. *Stroke* 40, 3455–3460.
- Gorelick, P.B., Farrowq, M.U., 2016. Cerebral Microbleeds, Cognition, and Therapeutic Implications. *JAMA Neurology* 73, 908.
- Greenberg, S.M., Eng, J.A., Ning, M., Smith, E.E., Rosand, J., 2004. Hemorrhage Burden Predicts Recurrent Intracerebral Hemorrhage After Lobar Hemorrhage. *Stroke* 35, 1415–1420.
- Greenberg, S.M., Vernooij, M.W., Cordonnier, C., Viswanathan, A., Salman, R.A.-S., Warach, S., Launer, L.J., Van Buchem, M.A., Breteler, M.M.B., 2009. Cerebral Microbleeds: A Field Guide to their Detection and Interpretation. *Lancet Neurol* 8, 165–174.
- Grundy, S.M., Cleeman, J.I., Daniels, S.R., Donato, K.A., Eckel, R.H., Franklin, B.A., Gordon, D.J., Krauss, R.M., Savage, P.J., Smith, S.C., Spertus, J.A., Costa, F., 2006. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute scientific statement. *Curr. Opin. Cardiol.* 21, 1–6.
- Gulpers, B., Ramakers, I., Hamel, R., Köhler, S., Oude Voshaar, R., Verhey, F., 2016. Anxiety as a Predictor for Cognitive Decline and Dementia: A Systematic Review and Meta-Analysis. *The American Journal of Geriatric Psychiatry* 24, 823–842.
- Gunstad, J., Paul, R.H., Cohen, R.A., Tate, D.F., Spitznagel, M.B., Gordon, E., 2007. Elevated body mass index is associated with executive dysfunction in otherwise healthy adults. *Compr Psychiatry* 48, 57–61.
- Guo, X., Li, H., Zhang, Z., Li, S., Zhang, L., Zhang, J., Han, G., 2016. Hyperglycemia and Mortality Risk in Patients with Primary Intracerebral Hemorrhage: A Meta-Analysis. *Molecular Neurobiology* 53, 2269–2275.
- Hackam, D.G., Woodward, M., Newby, L.K., Bhatt, D.L., Shao, M., Smith, E.E., Donner, A., Mamdani, M., Douketis, J.D., Arima, H., Chalmers, J., MacMahon, S., Tirschwell, D.L., Psaty, B.M., Bushnell, C.D., Aguilar, M.I., Capampangan, D.J., Werring, D.J., Rango, P.D., Viswanathan, A., Danchin, N., Cheng, C.-L., Yang, Y.-H.K., Verdell, B.M., Lai, M.-S., Kennedy, J., Uchiyama, S., Yamaguchi, T., Ikeda, Y., Mrkobrada, M., n.d. Statins and Intracerebral Hemorrhage 10.

- Hackett, M.L., Köhler, S., O'Brien, J.T., Mead, G.E., 2014. Neuropsychiatric outcomes of stroke. *The Lancet Neurology* 13, 525–534.
- Haddad, M., Beray-Berthet, V., Coqueran, B., Palmier, B., Szabo, C., Plotkine, M., Margail, I., 2008. Reduction of hemorrhagic transformation by PJ34, a poly(ADP-ribose)polymerase inhibitor, after permanent focal cerebral ischemia in mice. *European Journal of Pharmacology* 588, 52–57.
- Häggkvist, J., Tóth, M., Tari, L., Varnäs, K., Svedberg, M., Forsberg, A., Nag, S., Dominguez, C., Munoz-Sanjuan, I., Bard, J., Wityak, J., Varrone, A., Halldin, C., Mrzljak, L., 2017. Longitudinal Small-Animal PET Imaging of the zQ175 Mouse Model of Huntington Disease Shows In Vivo Changes of Molecular Targets in the Striatum and Cerebral Cortex. *J Nucl Med* 58, 617–622.
- Haller, S., Vernooij, M.W., Kuijter, J.P.A., Larsson, E.-M., Jäger, H.R., Barkhof, F., 2018. Cerebral Microbleeds: Imaging and Clinical Significance. *Radiology* 287, 11–28.
- Han, B.H., Zhou, M., Johnson, A.W., Singh, I., Liao, F., Vellimana, A.K., Nelson, J.W., Milner, E., Cirrito, J.R., Basak, J., Yoo, M., Dietrich, H.H., Holtzman, D.M., Zipfel, G.J., 2015. Contribution of reactive oxygen species to cerebral amyloid angiopathy, vasomotor dysfunction, and microhemorrhage in aged Tg2576 mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, E881–E890.
- Hassing, L.B., Dahl, A.K., Pedersen, N.L., Johansson, B., 2010. Overweight in midlife is related to lower cognitive function 30 years later: a prospective study with longitudinal assessments. *Dement Geriatr Cogn Disord* 29, 543–552.
- Held, F., Morris, A.W.J., Pirici, D., Niklass, S., Sharp, M.M.G., Garz, C., Assmann, A., Heinze, H.-J., Schreiber, F., Carare, R.O., Schreiber, S., 2017. Vascular basement membrane alterations and β -amyloid accumulations in an animal model of cerebral small vessel disease. *Clinical Science* 131, 1001–1013.
- Heringa, S.M., Reijmer, Y.D., Leemans, A., Koek, H.L., Kappelle, L.J., Biessels, G.J., Utrecht Vascular Cognitive Impairment (VCI) Study Group, 2014. Multiple microbleeds are related to cerebral network disruptions in patients with early Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 38, 211–221.
- Hidaka, N., Suemaru, K., Li, B., Araki, H., 2008. Effects of Repeated Electroconvulsive Seizures on Spontaneous Alternation Behavior and Locomotor Activity in Rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 31, 1928–1932.
- Hu Xiaoming, De Silva T. Michael, Chen Jun, Faraci Frank M., 2017. Cerebral Vascular Disease and Neurovascular Injury in Ischemic Stroke. *Circulation Research* 120, 449–471.
- Huang, F.-P., Xi, G., Keep, R.F., Hua, Y., Nemoianu, A., Hoff, J.T., 2002. Brain edema after experimental intracerebral hemorrhage: role of hemoglobin degradation products. *J. Neurosurg.* 96, 287–293.
- Hugo, J., Ganguli, M., 2014. Dementia and cognitive impairment: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Clin. Geriatr. Med.* 30, 421–442.
- Iadecola, C., 2017. The Neurovascular Unit Coming of Age: A Journey through Neurovascular Coupling in Health and Disease. *Neuron* 96, 17–42.
- Iida, S., Baumbach, G.L., Lavoie, J.L., Faraci, F.M., Sigmund, C.D., Heistad, D.D., 2005. Spontaneous Stroke in a Genetic Model of Hypertension in Mice. *Stroke* 36, 1253–1258.
- Jambhekar, S.S., Breen, P., 2016. Cyclodextrins in pharmaceutical formulations I: structure and physicochemical properties, formation of complexes, and types of complex. *Drug Discovery Today* 21, 356–362.
- Jellinger, K.A., 2007. The enigma of mixed dementia. *Alzheimer's & Dementia* 3, 40–53.

- Jucker, M., Walker, L.C., 2013. Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nature* 501, 45–51.
- Jürgens, H., Haass, W., Castañeda, T.R., Schürmann, A., Koebnick, C., Dombrowski, F., Otto, B., Nawrocki, A.R., Scherer, P.E., Spranger, J., Ristow, M., Joost, H.-G., Havel, P.J., Tschöp, M.H., 2005. Consuming Fructose-sweetened Beverages Increases Body Adiposity in Mice. *Obesity Research* 13, 1146–1156.
- Kalaria, R.N., Akinyemi, R., Ihara, M., 2016. Stroke injury, cognitive impairment and vascular dementia. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, Vascular contributions to cognitive impairment and dementia (VCID)* 1862, 915–925.
- Kang, H.-M., Sohn, I., Jung, J., Jeong, J.-W., Park, C., 2016. Age-related changes in pial arterial structure and blood flow in mice. *Neurobiol. Aging* 37, 161–170.
- Kassem, A.M., Ganguli, M., Yaffe, K., Hanlon, J.T., Lopez, O.L., Wilson, J.W., Cauley, J.A., 2017. Anxiety Symptoms and Risk of Cognitive Decline in Older Community-Dwelling Men. *Int Psychogeriatr* 29, 1137–1145.
- Kaur, J., 2014. A Comprehensive Review on Metabolic Syndrome [WWW Document]. *Cardiology Research and Practice*. <https://doi.org/10.1155/2014/943162>
- Khodadadian, A., Hemmati-Dinarvand, M., Kalantary-Charvadeh, A., Ghobadi, A., Mazaheri, M., 2018. Candidate biomarkers for Parkinson's disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 104, 699–704.
- Klohs, J., Deistung, A., Schweser, F., Grandjean, J., Dominietto, M., Waschkies, C., Nitsch, R.M., Knuesel, I., Reichenbach, J.R., Rudin, M., 2011. Detection of cerebral microbleeds with quantitative susceptibility mapping in the ArcAbeta mouse model of cerebral amyloidosis. *J Cereb Blood Flow Metab* 31, 2282–2292.
- Kono, S., Yamashita, T., Deguchi, K., Omote, Y., Yunoki, T., Sato, K., Kurata, T., Hishikawa, N., Abe, K., 2014. Rivaroxaban and Apixaban Reduce Hemorrhagic Transformation After Thrombolysis by Protection of Neurovascular Unit in Rat. *Stroke* 45, 2404–2410.
- Krenzlin, H., Lorenz, V., Danckwardt, S., Kempfski, O., Alessandri, B., 2016. The Importance of Thrombin in Cerebral Injury and Disease. *Int J Mol Sci* 17.
- Kwon, H.-M., Park, J.-H., Park, J.H., Jeong, H.-Y., Lim, J.-S., Jeong, H.-G., Shin, D.W., Yun, J.M., Lee, H., 2016. Visceral Fat Is an Independent Predictor of Cerebral Microbleeds in Neurologically Healthy People. *CED* 42, 90–96.
- Lalić, N.M., Marić, J., Svetel, M., Jotić, A., Stefanova, E., Lalić, K., Dragasević, N., Milicić, T., Lukić, L., Kostić, V.S., 2008. Glucose homeostasis in Huntington disease: abnormalities in insulin sensitivity and early-phase insulin secretion. *Arch. Neurol.* 65, 476–480.
- Lauer, A., Cianchetti, F.A., Cott, E.M.V., Schlunk, F., Schulz, E., Pfeilschifter, W., Steinmetz, H., Schaffer, C.B., Lo, E.H., Foerch, C., 2011. Anticoagulation With the Oral Direct Thrombin Inhibitor Dabigatran Does Not Enlarge Hematoma Volume in Experimental Intracerebral Hemorrhage Clinical Perspective. *Circulation* 124, 1654–1662.
- Lautenschlager, N.T., Cox, K.L., Flicker, L., Foster, J.K., van Bockxmeer, F.M., Xiao, J., Greenop, K.R., Almeida, O.P., 2008. Effect of physical activity on cognitive function in older adults at risk for Alzheimer disease: a randomized trial. *JAMA* 300, 1027–1037.
- Lechowski, L., Forette, B., Teillet, L., 2004. [Diagnosis of dementia]. *Rev Med Interne* 25, 363–375.
- Li, W., Prakash, R., Chawla, D., Du, W., Didion, S.P., Filosa, J.A., Zhang, Q., Brann, D.W., Lima, V.V., Tostes, R.C., Ergul, A., 2013. Early effects of high-fat diet on

- neurovascular function and focal ischemic brain injury. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 304, R1001-1008.
- Li, X., Yuan, J., Yang, L., Qin, W., Yang, S., Li, Y., Fan, H., Hu, W., 2017. The significant effects of cerebral microbleeds on cognitive dysfunction: An updated meta-analysis. *PLOS ONE* 12, e0185145.
- Liao, Y.-C., Hsiao, C.-T., Fuh, J.-L., Chern, C.-M., Lee, W.-J., Guo, Y.-C., Wang, S.-J., Lee, I.-H., Liu, Y.-T., Wang, Y.-F., Chang, F.-C., Chang, M.-H., Soong, B.-W., Lee, Y.-C., 2015. Characterization of CADASIL among the Han Chinese in Taiwan: Distinct Genotypic and Phenotypic Profiles. *PLOS ONE* 10, e0136501.
- Liddelov, S.A., Guttenplan, K.A., Clarke, L.E., Bennett, F.C., Bohlen, C.J., Schirmer, L., Bennett, M.L., Münch, A.E., Chung, W.-S., Peterson, T.C., Wilton, D.K., Frouin, A., Napier, B.A., Panicker, N., Kumar, M., Buckwalter, M.S., Rowitch, D.H., Dawson, V.L., Dawson, T.M., Stevens, B., Barres, B.A., 2017. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature* 541, 481–487.
- Liem, M.K., Lesnik Oberstein, S. a. J., Haan, J., van der Neut, I.L., Ferrari, M.D., van Buchem, M.A., Middelkoop, H. a. M., van der Grond, J., 2009. MRI correlates of cognitive decline in CADASIL: a 7-year follow-up study. *Neurology* 72, 143–148.
- Lip, G.Y., Tse, H.F., Lane, D.A., 2012. Atrial fibrillation. *The Lancet* 379, 648–661. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61514-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61514-6)
- Liu, S., Grigoryan, M.M., Vasilevko, V., Sumbria, R.K., Paganini-Hill, A., Cribbs, D.H., Fisher, M.J., 2014. Comparative analysis of H&E and Prussian blue staining in a mouse model of cerebral microbleeds. *J. Histochem. Cytochem.* 62, 767–773.
- Liu, W., Liu, R., Sun, W., Peng, Q., Zhang, W., Xu, E., Cheng, Y., Ding, M., Li, Y., Hong, Z., Wu, J., Zeng, J., Yao, C., Huang, Y., CASISP Study Group, 2012. Different impacts of blood pressure variability on the progression of cerebral microbleeds and white matter lesions. *Stroke* 43, 2916–2922.
- Liu, X., 2014. A Meta-Analysis of Association between Cerebral Microbleeds and Cognitive Impairment. *Medical Science Monitor* 20, 2189–2198.
- Liu, Y., Dong, Y.-H., Lyu, P.-Y., Chen, W.-H., Li, R., 2018. Hypertension-Induced Cerebral Small Vessel Disease Leading to Cognitive Impairment. *Chin Med J (Engl)* 131, 615–619.
- Livingston, G., Sommerlad, A., Orgeta, V., Costafreda, S.G., Huntley, J., Ames, D., Ballard, C., Banerjee, S., Burns, A., Cohen-Mansfield, J., Cooper, C., Fox, N., Gitlin, L.N., Howard, R., Kales, H.C., Larson, E.B., Ritchie, K., Rockwood, K., Sampson, E.L., Samus, Q., Schneider, L.S., Selbæk, G., Teri, L., Mukadam, N., 2017. Dementia prevention, intervention, and care. *The Lancet* 390, 2673–2734.
- Lo, P., Crouzet, C., Vasilevko, V., Choi, B., 2016. Visualization of microbleeds with optical histology in mouse model of cerebral amyloid angiopathy. *Microvascular Research* 105, 109–113.
- Lodi, R., Schapira, A.H., Manners, D., Styles, P., Wood, N.W., Taylor, D.J., Warner, T.T., 2000. Abnormal in vivo skeletal muscle energy metabolism in Huntington's disease and dentatorubropallidoluysian atrophy. *Ann. Neurol.* 48, 72–76.
- Loftsson, T., 2002. Cyclodextrins and the Biopharmaceutics Classification System of Drugs. *Journal of Inclusion Phenomena* 44, 63–67.
- Ma, D., Cardoso, M.J., Modat, M., Powell, N., Wells, J., Holmes, H., Wiseman, F., Tybulewicz, V., Fisher, E., Lythgoe, M.F., Ourselin, S., 2014. Automatic Structural Parcellation of Mouse Brain MRI Using Multi-Atlas Label Fusion. *PLoS One* 9.
- Marinescu, M., Sun, L., Fatar, M., Neubauer, A., Schad, L., Ryn, J. van, Lehmann, L., Veltkamp, R., 2017. Cerebral Microbleeds in Murine Amyloid Angiopathy: Natural Course and Anticoagulant Effects. *Stroke* 48, 2248–2254.

- Martinez-Ramirez, S., Greenberg, S.M., Viswanathan, A., 2014. Cerebral microbleeds: overview and implications in cognitive impairment. *Alzheimer's Research & Therapy* 6, 33.
- Mathis, C.A., Wang, Y., Holt, D.P., Huang, G.-F., Debnath, M.L., Klunk, W.E., 2003. Synthesis and Evaluation of ¹¹C-Labeled 6-Substituted 2-Arylbenzothiazoles as Amyloid Imaging Agents. *J. Med. Chem.* 46, 2740–2754.
- Maxwell, S.S., Jackson, C.A., Paternoster, L., Cordonnier, C., Thijs, V., Al-Shahi Salman, R., Sudlow, C.L.M., 2011. Genetic associations with brain microbleeds: Systematic review and meta-analyses. *Neurology* 77, 158–167.
- McAleese, K.E., Alafuzoff, I., Charidimou, A., Reuck, J.D., Grinberg, L.T., Hainsworth, A.H., Hortobagyi, T., Ince, P., Jellinger, K., Gao, J., Kalaria, R.N., Kovacs, G.G., Kövari, E., Love, S., Popovic, M., Skrobot, O., Taipa, R., Thal, D.R., Werring, D., Wharton, S.B., Attems, J., 2016. Post-mortem assessment in vascular dementia: advances and aspirations. *BMC Medicine* 14.
- McCracken, E., Monaghan, M., Sreenivasan, S., 2018. Pathophysiology of the metabolic syndrome. *Clinics in Dermatology* 36, 14–20.
- Medeiros, R.F., Gaique, T.G., Bento-Bernardes, T., Kindlovits, R., Gomes, T.M.B., Motta, N.A.V., Brito, F.C., Fernandes-Santos, C., Oliveira, K.J., Nóbrega, A.C.L., 2017. Arginine and aerobic training prevent endothelial and metabolic alterations in rats at high risk for the development of the metabolic syndrome. *British Journal of Nutrition* 118, 1–10.
- Melbourne, A., Toussaint, N., Owen, D., Simpson, I., Anthopoulos, T., De Vita, E., Atkinson, D., Ourselin, S., 2016. NiftyFit: a Software Package for Multi-parametric Model-Fitting of 4D Magnetic Resonance Imaging Data. *Neuroinformatics* 14, 319–337.
- Mendes, A., Bertrand, A., Lamari, F., Colliot, O., Routier, A., Godefroy, O., Etcharry-Bouyx, F., Moreaud, O., Pasquier, F., Couratier, P., Bennys, K., Vercelletto, M., Martinaud, O., Laurent, B., Pariente, J., Puel, M., Epelbaum, S., Belliard, S., Kaaouana, T., Fillon, L., Chupin, M., Dubois, B., Teichmann, M., Group, O. behalf of the P. “CAPP” S., 2018. Cerebral microbleeds and CSF Alzheimer biomarkers in primary progressive aphasia. *Neurology* 90, e1057–e1065.
- Mendoza, J.A., Drewnowski, A., Christakis, D.A., 2007. Dietary Energy Density Is Associated With Obesity and the Metabolic Syndrome in U.S. Adults. *Diabetes Care* 30, 974–979.
- Mijajlović, M.D., Pavlović, A., Brainin, M., Heiss, W.-D., Quinn, T.J., Ihle-Hansen, H.B., Hermann, D.M., Assayag, E.B., Richard, E., Thiel, A., Kliper, E., Shin, Y.-I., Kim, Y.-H., Choi, S., Jung, S., Lee, Y.-B., Sinanović, O., Levine, D.A., Schlesinger, I., Mead, G., Milošević, V., Leys, D., Hagberg, G., Ursin, M.H., Teuschl, Y., Prokopenko, S., Mozheyko, E., Bezdenezhnykh, A., Matz, K., Aleksić, V., Muresanu, D., Korczyn, A.D., Bornstein, N.M., 2017. Post-stroke dementia – a comprehensive review. *BMC Med* 15.
- Mishra, A., O'Farrell, F.M., Reynell, C., Hamilton, N.B., Hall, C.N., Attwell, D., 2014. Imaging pericytes and capillary diameter in brain slices and isolated retinæ. *Nature Protocols* 9, 323–336.
- Mitaki, S., Takayoshi, H., Nakagawa, T., Nagai, A., Oguro, H., Yamaguchi, S., 2018. Metabolic syndrome is associated with incidence of deep cerebral microbleeds. *PLOS ONE* 13, e0194182.
- Miwa, K., Tanaka, M., Okazaki, S., Furukado, S., Sakaguchi, M., Kitagawa, K., 2011. Relations of Blood Inflammatory Marker Levels With Cerebral Microbleeds. *Stroke* 42, 3202–3206.

- Mogi, M., Horiuchi, M., 2011. Neurovascular Coupling in Cognitive Impairment Associated With Diabetes Mellitus. *Circulation Journal* 75, 1042–1048.
- Monnaert, V., Tilloy, S., Bricout, H., Fenart, L., Cecchelli, R., Monflier, E., 2004. Behavior of α -, β -, and γ -Cyclodextrins and Their Derivatives on an in Vitro Model of Blood-Brain Barrier. *J Pharmacol Exp Ther* 310, 745–751.
- Moulin, S., Labreuche, J., Bombois, S., Rossi, C., Boulouis, G., Hénon, H., Duhamel, A., Leys, D., Cordonnier, C., 2016. Dementia risk after spontaneous intracerebral haemorrhage: a prospective cohort study. *The Lancet Neurology* 15, 820–829.
- Mracsko, E., Veltkamp, R., 2014. Neuroinflammation after intracerebral hemorrhage. *Front Cell Neurosci* 8.
- Munro, I.C., Newberne, P.M., Young, V.R., Bär, A., 2004. Safety assessment of γ -cyclodextrin. *Regulatory Toxicology and Pharmacology, Cyclodextrins* 39, 3–13.
- Murphy, M.P., Corriveau, R.A., Wilcock, D.M., 2016. Vascular contributions to cognitive impairment and dementia (VCID). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, Vascular contributions to cognitive impairment and dementia (VCID)* 1862, 857–859.
- Nussbaum, J.M., Seward, M.E., Bloom, G.S., 2013. Alzheimer disease. *Prion* 7, 14–19.
- Okauchi, M., Hua, Y., Keep, R.F., Morgenstern, L.B., Xi, G., 2009. Effects of Deferoxamine on Intracerebral Hemorrhage-Induced Brain Injury in Aged Rats. *Stroke* 40, 1858–1863.
- Olanow, C.W., Brundin, P., n.d. Parkinson's Disease and Alpha Synuclein: Is Parkinson's Disease a Prion-Like Disorder? *Movement Disorders* 28, 31–40.
- Panchal, S.K., Brown, L., 2011. Rodent models for metabolic syndrome research. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011, 351982.
- Paradise, M., Seruga, A., Crawford, J.D., Chaganti, J., Thalamuthu, A., Kochan, N.A., Brodaty, H., Wen, W., Sachdev, P.S., 2018. The relationship of cerebral microbleeds to cognition and incident dementia in non-demented older individuals. *Brain Imaging and Behavior* 1–12.
- Park, Y.K., Yi, H.-J., Lee, Y.J., Cho, H., Chun, H.-J., Oh, S.-J., 2013. The relationship between metabolic syndrome (MetS) and spontaneous intracerebral hemorrhage (ICH). *Neurological Sciences* 34, 1523–1528. h
- Pétrault, M., Casolla, B., Ouk, T., Cordonnier, C., Bérézowski, V., 2019. Cerebral microbleeds: Beyond the microscope. *Int J Stroke* 1747493019830594.
- Pettigrew, C., Soldan, A., 2019. Defining Cognitive Reserve and Implications for Cognitive Aging. *Current Neurology and Neuroscience Reports* 19.
- Poels, M.M.F., Ikram, M.A., van der Lugt, A., Hofman, A., Krestin, G.P., Breteler, M.M.B., Vernooij, M.W., 2011. Incidence of Cerebral Microbleeds in the General Population: The Rotterdam Scan Study. *Stroke* 42, 656–661.
- Radulovic, M., Yoon, H., Wu, J., Mustafa, K., Scarisbrick, I.A., 2016. Targeting the thrombin receptor modulates inflammation and astrogliosis to improve recovery after spinal cord injury. *Neurobiology of Disease* 93, 226–242.
- Rangel-Barajas, C., Rebec, G.V., n.d. Overview of Huntington's Disease Models: Neuropathological, Molecular, and Behavioral Differences. *Current Protocols in Neuroscience* 83, e47.
- Rathore, S., Habes, M., Ifikhar, M.A., Shacklett, A., Davatzikos, C., 2017. A review on neuroimaging-based classification studies and associated feature extraction methods for Alzheimer's disease and its prodromal stages. *Neuroimage* 155, 530–548.
- Ridder, G.G. de, Lundblad, R.L., Pizzo, S.V., 2016. Actions of thrombin in the interstitium. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 14, 40–47.

- Risacher, S.L., Saykin, A.J., 2013. Neuroimaging Biomarkers of Neurodegenerative Diseases and Dementia. *Semin Neurol* 33, 386–416.
- Rosidi, N.L., Zhou, J., Pattanaik, S., Wang, P., Jin, W., Brophy, M., Olbricht, W.L., Nishimura, N., Schaffer, C.B., 2011. Cortical Microhemorrhages Cause Local Inflammation but Do Not Trigger Widespread Dendrite Degeneration. *PLoS ONE* 6, e26612.
- Ruff, C.T., Giugliano, R.P., Braunwald, E., Hoffman, E.B., Deenadayalu, N., Ezekowitz, M.D., Camm, A.J., Weitz, J.I., Lewis, B.S., Parkhomenko, A., Yamashita, T., Antman, E.M., 2014. Comparison of the efficacy and safety of new oral anticoagulants with warfarin in patients with atrial fibrillation: a meta-analysis of randomised trials. *The Lancet* 383, 955–962.
- Rynkowski, M.A., Kim, G.H., Komotar, R.J., Otten, M.L., Ducruet, A.F., Zacharia, B.E., Kellner, C.P., Hahn, D.K., Merkow, M.B., Garrett, M.C., Starke, R.M., Cho, B.-M., Sosunov, S.A., Connolly, E.S., 2008. A mouse model of intracerebral hemorrhage using autologous blood infusion. *Nat Protoc* 3, 122–128.
- Salahuddin, H., Ramaiah, G., Slawski, D.E., Shawver, J., Buehler, M., Zaidi, S.F., Jumaa, M., 2018. Mechanical thrombectomy of M1 and M2 middle cerebral artery occlusions. *Journal of NeuroInterventional Surgery* 10, 330–334.
- Salem, J.-E., Sabouret, P., Funck-Brentano, C., Hulot, J.-S., 2015. Pharmacology and mechanisms of action of new oral anticoagulants. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 29, 10–20.
- Sawada, S., Ono, Y., Egashira, Y., Takagi, T., Tsuruma, K., Shimazawa, M., Hara*, T.I. and H., 2017. In Models of Intracerebral Hemorrhage, Rivaroxaban is Superior to Warfarin to Limit Blood Brain Barrier Disruption and Hematoma Expansion [WWW Document]. *Current Neurovascular Research*. URL <http://www.eurekaselect.com/148474/article>.
- Schmued, L.C., Hopkins, K.J., 2000. Fluoro-Jade B: a high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration. *Brain Research* 874, 123–130.
- Schreiber, S., Bueche, C.Z., Garz, C., Kropf, S., Angenstein, F., Goldschmidt, J., Neumann, J., Heinze, H.-J., Goertler, M., Reymann, K.G., Braun, H., 2012. The Pathologic Cascade of Cerebrovascular Lesions in SHRSP: Is Erythrocyte Accumulation an Early Phase? *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 32, 278–290.
- Sharma, R., Dearaugo, S., Infeld, B., O’Sullivan, R., Gerraty, R.P., n.d. Cerebral amyloid angiopathy: Review of clinico-radiological features and mimics. *Journal of Medical Imaging and Radiation Oncology* 0.
- Sheth, S.A., Yoo, B., Saver, J.L., Starkman, S., Ali, L.K., Kim, D., Gonzalez, N.R., Jahan, R., Tateshima, S., Duckwiler, G., Vinuela, F., Liebeskind, D.S., 2015. M2 occlusions as targets for endovascular therapy: comprehensive analysis of diffusion/perfusion MRI, angiography, and clinical outcomes. *Journal of NeuroInterventional Surgery* 7, 478–483.
- Shih, A.Y., Hyacinth, H.I., Hartmann, D.A., Veluw, S.J. van, 2018. Rodent Models of Cerebral Microinfarct and Microhemorrhage. *Stroke* STROKEAHA.117.016995.
- Shityakov, S., Salmas, R.E., Salvador, E., Roewer, N., Broscheit, J., Förster, C., 2016. Evaluation of the potential toxicity of unmodified and modified cyclodextrins on murine blood-brain barrier endothelial cells. *J Toxicol Sci* 41, 175–184.
- Smith, E.E., n.d. Cerebral amyloid angiopathy as a cause of neurodegeneration. *Journal of Neurochemistry* 144, 651–658.
- Smith, E.E., Saposnik, G., Biessels, G.J., Doubal, F.N., Fornage, M., Gorelick, P.B., Greenberg, S.M., Higashida, R.T., Kasner, S.E., Seshadri, S., American Heart Association Stroke Council; Council on Cardiovascular Radiology and Intervention;

- Council on Functional Genomics and Translational Biology; and Council on Hypertension, 2017. Prevention of Stroke in Patients With Silent Cerebrovascular Disease: A Scientific Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 48, e44–e71.
- Sonawane, S.K., Chinnathambi, S., 2018. Prion-Like Propagation of Post-Translationally Modified Tau in Alzheimer's Disease: A Hypothesis. *J Mol Neurosci* 1–11.
- Stella, V.J., He, Q., 2008. Cyclodextrins. *Toxicol Pathol* 36, 30–42.
- Stemer, A., Ouyang, B., Lee, V.H., Prabhakaran, S., 2010. Prevalence and Risk Factors for Multiple Simultaneous Intracerebral Hemorrhages. *CED* 30, 302–307.
- Strekalova, T., Spanagel, R., Bartsch, D., Henn, F.A., Gass, P., 2004. Stress-Induced Anhedonia in Mice is Associated with Deficits in Forced Swimming and Exploration. *Neuropsychopharmacology* 29, 2007–2017.
- Strong, K., Mathers, C., Bonita, R., 2007. Preventing stroke: saving lives around the world. *The Lancet Neurology* 6, 182–187.
- Sudduth, T.L., Powell, D.K., Smith, C.D., Greenstein, A., Wilcock, D.M., 2013. Induction of Hyperhomocysteinemia Models Vascular Dementia by Induction of Cerebral Microhemorrhages and Neuroinflammation. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 33, 708–715.
- Sumbria, R.K., Grigoryan, M.M., Vasilevko, V., Krasieva, T.B., Scadeng, M., Dvornikova, A.K., Paganini-Hill, A., Kim, R., Cribbs, D.H., Fisher, M.J., 2016. A murine model of inflammation-induced cerebral microbleeds. *Journal of Neuroinflammation* 13.
- Sun, J.-H., Tan, L., Yu, J.-T., 2014. Post-stroke cognitive impairment: epidemiology, mechanisms and management. *Ann Transl Med* 2.
- Sun, L., Zhou, W., Ploen, R., Zorn, M., Veltkamp, R., 2013. Anticoagulation with dabigatran does not increase secondary intracerebral haemorrhage after thrombolysis in experimental cerebral ischaemia: *Thrombosis and Haemostasis* 110, 153–161.
- Sunyer, B., Patil, S., Frischer, C., Höger, H., Selcher, J., Brannath, W., Lubec, G., 2007. Strain-dependent effects of SGS742 in the mouse. *Behav. Brain Res.* 181, 64–75.
- Suo, Z., Wu, M., Ameenuddin, S., Anderson, H.E., Zoloty, J.E., Citron, B.A., Andrade-Gordon, P., Festoff, B.W., 2002. Participation of protease-activated receptor-1 in thrombin-induced microglial activation. *Journal of Neurochemistry* 80, 655–666.
- Tesauro, M., Cardillo, C., 2011. Obesity, blood vessels and metabolic syndrome. *Acta Physiol (Oxf)* 203, 279–286.
- Thal, D.R., Griffin, W.S.T., Braak, H., 2008. Parenchymal and vascular A β -deposition and its effects on the degeneration of neurons and cognition in Alzheimer's disease. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 12, 1848–1862.
- Toth, P., Tarantini, S., Csiszar, A., Ungvari, Z., 2017. Functional vascular contributions to cognitive impairment and dementia: mechanisms and consequences of cerebral autoregulatory dysfunction, endothelial impairment, and neurovascular uncoupling in aging. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 312, H1–H20.
- Toth, P., Tarantini, S., Springo, Z., Tucsek, Z., Gautam, T., Giles, C.B., Wren, J.D., Koller, A., Sonntag, W.E., Csiszar, A., Ungvari, Z., 2015. Aging exacerbates hypertension-induced cerebral microhemorrhages in mice: role of resveratrol treatment in vasoprotection. *Aging Cell* 14, 400–408.
- Tsuneyama, K., Nishitsuji, K., Matsumoto, M., Kobayashi, T., Morimoto, Y., Tsunematsu, T., Ogawa, H., 2017. Animal models for analyzing metabolic syndrome-associated liver diseases. *Pathology International* 67, 539–546.
- Tuladhar, A.M., van Dijk, E., Zwiers, M.P., van Norden, A.G.W., de Laat, K.F., Shumskaya, E., Norris, D.G., de Leeuw, F.-E., 2016. Structural network connectivity and cognition in cerebral small vessel disease. *Hum Brain Mapp* 37, 300–310.

- Tümer, N., Toklu, H.Z., Muller-Delp, J.M., Oktay, Ş., Ghosh, P., Strang, K., Delp, M.D., Scarpace, P.J., 2014. The effects of aging on the functional and structural properties of the rat basilar artery. *Physiological Reports* 2, e12031.
- Tustison, N.J., Avants, B.B., Cook, P.A., Zheng, Y., Egan, A., Yushkevich, P.A., Gee, J.C., 2010. N4ITK: Improved N3 Bias Correction. *IEEE Trans Med Imaging* 29, 1310–1320.
- Ungvari, Z., Tarantini, S., Kirkpatrick, A.C., Csiszar, A., Prodan, C.I., 2017. Cerebral microhemorrhages: mechanisms, consequences, and prevention. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 312, H1128–H1143.
- Valenti, R., Charidimou, A., Xiong, L., Boulouis, G., Fotiadis, P., Ayres, A., Riley, G., Kuijf, H.J., Reijmer, Y.D., Pantoni, L., Gurol, M.E., Davidsdottir, S., Greenberg, S.M., Viswanathan, A., 2017a. Visuospatial Functioning in Cerebral Amyloid Angiopathy: A Pilot Study. *Journal of Alzheimer's Disease* 56, 1223–1227.
- Valenti, R., Reijmer, Y.D., Charidimou, A., Boulouis, G., Martinez, S.R., Xiong, L., Fotiadis, P., Jessel, M., Ayres, A., Riley, G., Pantoni, L., Gurol, M.E., Greenberg, S.M., Viswanathan, A., 2017b. Total small vessel disease burden and brain network efficiency in cerebral amyloid angiopathy. *Journal of the Neurological Sciences* 382, 10–12.
- van Agtmaal, M.J.M., Houben, A.J.H.M., Pouwer, F., Stehouwer, C.D.A., Schram, M.T., 2017. Association of Microvascular Dysfunction With Late-Life Depression. *JAMA Psychiatry* 74, 729–739.
- van Dijk, G., van Heijningen, S., Reijne, A.C., Nyakas, C., van der Zee, E.A., Eisel, U.L.M., 2015. Integrative neurobiology of metabolic diseases, neuroinflammation, and neurodegeneration. *Front Neurosci* 9, 173.
- van Duijn, E., Craufurd, D., Hubers, A.A.M., Giltay, E.J., Bonelli, R., Rickards, H., Anderson, K.E., van Walsem, M.R., van der Mast, R.C., Orth, M., Landwehrmeyer, G.B., the European Huntington's Disease Network Behavioural Phenotype Working Group, 2014. Neuropsychiatric symptoms in a European Huntington's disease cohort (REGISTRY). *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 85, 1411–1418.
- Van Dyken, P., Lacoste, B., 2018. Impact of Metabolic Syndrome on Neuroinflammation and the Blood–Brain Barrier. *Frontiers in Neuroscience* 12, 930.
- van Etten, E.S., Auriel, E., Haley, K.E., Ayres, A.M., Vashkevich, A., Schwab, K.M., Rosand, J., Viswanathan, A., Greenberg, S.M., Gurol, M.E., 2014. Incidence of Symptomatic Hemorrhage in Patients With Lobar Microbleeds. *Stroke* 45, 2280–2285.
- van Veluw, S.J., Biessels, G.J., Klijn, C.J.M., Rozemuller, A.J.M., 2016a. Heterogeneous histopathology of cortical microbleeds in cerebral amyloid angiopathy. *Neurology* 86, 867–871.
- van Veluw, S.J., Charidimou, A., van der Kouwe, A.J., Lauer, A., Reijmer, Y.D., Costantino, I., Gurol, M.E., Biessels, G.J., Frosch, M.P., Viswanathan, A., Greenberg, S.M., 2016b. Microbleed and microinfarct detection in amyloid angiopathy: a high-resolution MRI-histopathology study. *Brain* 139, 3151–3162.
- van Veluw, S.J., Shih, A.Y., Smith, E.E., Chen, C., Schneider, J.A., Wardlaw, J.M., Greenberg, S.M., Biessels, G.J., 2017. Detection, risk factors, and functional consequences of cerebral microinfarcts. *The Lancet Neurology* 16, 730–740.
- Vernooij, M.W., Ikram, M.A., Wielopolski, P.A., Krestin, G.P., Breteler, M.M.B., van der Lugt, A., 2008. Cerebral Microbleeds: Accelerated 3D T2*-weighted GRE MR Imaging versus Conventional 2D T2*-weighted GRE MR Imaging for Detection¹. *Radiology* 248, 272–277.
- Viswanathan, A., Guichard, J.-P., Gschwendtner, A., Buffon, F., Cumurcuic, R., Boutron, C., Vicaut, E., Holtmannspötter, M., Pachai, C., Bousser, M.-G., Dichgans, M., Chabriat,

- H., 2006. Blood pressure and haemoglobin A1c are associated with microhaemorrhage in CADASIL: a two-centre cohort study. *Brain* 129, 2375–2383.
- Wagner, K.R., Sharp, F.R., Ardizzone, T.D., Lu, A., Clark, J.F., 2003. Heme and Iron Metabolism: Role in Cerebral Hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab* 23, 629–652.
- Walf, A.A., Frye, C.A., 2007. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc* 2, 322–328.
- Wang, B., P., C.C., Pippin, J.J., 2014. Leptin- and Leptin Receptor-Deficient Rodent Models: Relevance for Human Type 2 Diabetes. *Curr Diabetes Rev* 10, 131–145.
- Wang, H., Reiser, G., 2003. Thrombin Signaling in the Brain: The Role of Protease-Activated Receptors. *Biological Chemistry* 384.
- Wang, Q., Liu, Y., Fu, Q., Xu, B., Zhang, Y., Kim, S., Tan, R., Barbagallo, F., West, T., Anderson, E., Wei, W., Abel, E.D., Xiang, Y.K., 2017. Inhibiting Insulin-Mediated β 2-Adrenergic Receptor Activation Prevents Diabetes-Associated Cardiac Dysfunction. *Circulation* 135, 73–88.
- Wang, Y., Liu, T., 2015. Quantitative susceptibility mapping (QSM): Decoding MRI data for a tissue magnetic biomarker. *Magn Reson Med* 73, 82–101.
- Webster, S.J., Bachstetter, A.D., Nelson, P.T., Schmitt, F.A., Van Eldik, L.J., 2014. Using mice to model Alzheimer's dementia: an overview of the clinical disease and the preclinical behavioral changes in 10 mouse models. *Front Genet* 5, 88.
- Westover, M.B., Bianchi, M.T., Yang, C., Schneider, J.A., Greenberg, S.M., 2013. Estimating cerebral microinfarct burden from autopsy samples. *Neurology* 80, 1365–1369.
- Whitmer, R.A., Sidney, S., Selby, J., Johnston, S.C., Yaffe, K., 2005a. Midlife cardiovascular risk factors and risk of dementia in late life. *Neurology* 64, 277–281.
- Whitmer, R.A., Sidney, S., Selby, J., Johnston, S.C., Yaffe, K., 2005b. Midlife cardiovascular risk factors and risk of dementia in late life. *Neurology* 64, 277–281.
- Willeumier, K.C., Taylor, D.V., Amen, D.G., 2011. Elevated BMI Is Associated With Decreased Blood Flow in the Prefrontal Cortex Using SPECT Imaging in Healthy Adults. *Obesity* 19, 1095–1097.
- Wilms, H., Delano, F.A., Schmid-Schönbein, G.W., 2000. Mechanisms of Parenchymal Cell Death In-Vivo after Microvascular Hemorrhage. *Microcirculation* 7, 1–11.
- Wilson, D., Ambler, G., Shakeshaft, C., Brown, M.M., Charidimou, A., Al-Shahi Salman, R., Lip, G.Y.H., Cohen, H., Banerjee, G., Houlden, H., White, M.J., Yousry, T.A., Harkness, K., Flossmann, E., Smyth, N., Shaw, L.J., Warburton, E., Muir, K.W., Jäger, H.R., Werring, D.J., 2018a. Cerebral microbleeds and intracranial haemorrhage risk in patients anticoagulated for atrial fibrillation after acute ischaemic stroke or transient ischaemic attack (CROMIS-2): a multicentre observational cohort study. *Lancet Neurol* 17, 539–547.
- Wilson, D., Duncan, Ambler, G., Shakeshaft, C., Brown, M.M., Charidimou, A., Al-Shahi Salman, R., Lip, G.Y.H., Cohen, H., Banerjee, G., Houlden, H., White, M.J., Yousry, T.A., Harkness, K., Flossmann, E., Smyth, N., Shaw, L.J., Warburton, E., Muir, K.W., Jäger, H.R., Werring, D.J., Aeron-Thomas, J., Aghoram, P., Amis, E., Anderton, P., Andole, S., Anwar, I., Bamford, J., Banaras, A., Barry, A., Bellfield, R., Benford, A., Bhalla, A., Bhargava, M., Bhaskaran, B., Bhupathiraju, N., Birns, J., Blight, A., Bowring, A., Brown, E., Bruce, D., Buck, A., Bunworth, K., Burger, I., Burgess, L., Burn, M., Burssens, E., Burton, M., Butler, N., Button, D., Carpenter, M., Chadha, D., Chatterjee, K., Choy, L., Cohen, D., Connell, L., Cooper, M., Corrigan, J., Cotterill, D., Courtauld, G., Crawford, S., Cullen, C., Dani, K., Daniel, A., Datta, P., Davis, M., Day, N., Doherty, M., Douglas, C., Dunne, K., Edwards, C., Eglinton, C., Elmarimi, A., Emsley, H., England, T., Epstein, D., Erande, R., Esiyi, B., Evans, R., Farren, P., Fitzell, P., Fletcher, G., Gallifent, R., Gascoyne, R., Giallombardo, E., Gregory, B.,

- Gunathilagan, G., Guyler, P., Hairsine, B., Haley, M., Hardwick, A., Hargroves, D., Harrington, F., Hedstrom, A., Holmes, C., Hussein, S., Ingram, T., Ispoglou, S., Iveson, L., Johnson, V., Justin, F., Kausar, S., Kee, K., Keeling, M., Khan, S., Kieliszkowska, A., Kingwell, H., Krishnamurthy, V., Kullane, S., Kumar, B., Leach, S., Leason, S., Lopez, P., Luder, R., Madigan, B., Maguire, S., Maguire, H., Mahawish, K., Makawa, L., Mamun, M., Manawadu, D., Mangion, D., Manoj, A., Mansoor, S., Marsden, T., Marsh, R., Mashate, S., McCormick, M., McGolick, C., McKee, M., Mckenzie, E., Meenakishundaram, S., Mellor, Z., Misra, A., Mistri, A., Mohd Nor, A., Mpelembue, M., Murphy, P., Nallasivam, A., Needle, A., Nguyen, V., O'Connell, J., O'Mahony, P., Okwera, J., Orefo, C., Owusu-Agyei, P., Parry, A., Parry-Jones, A., Pasco, K., Patterson, C., Peixoto, C., Perez, J., Persad, N., Porteous, M., Power, M., Price, C., Proschel, H., Puneekar, S., Putterill, J., Randall, M., Redjep, O., Rehman, H., Richards, E., Riddell, V., Roffe, C., Rogers, G., Rudd, A., Saastamoinen, K., Sajid, M., Sandhu, B., Schofield, C., Scott, J., Sekaran, L., Sharma, P., Sharma, J., Sharpe, S., Smith, M., Smith, A., Sprigg, N., Staals, J., Steele, A., Storey, G., Storey, K., Subramonian, S., Sword, J., Tallon, G., Tan, G., Tate, M., Teke, J., Temple, N., Thompson, T., Tysoe, S., Vahidasr, D., van der Kwaak, A., Veltkamp, R., Walstow, D., Watchurst, C., Watson, F., Waugh, D., Wilkinson, P., Wilson, David, Wilson-Owen, S., Wroath, B., Wynter, I., Young, E., 2018b. Cerebral microbleeds and intracranial haemorrhage risk in patients anticoagulated for atrial fibrillation after acute ischaemic stroke or transient ischaemic attack (CROMIS-2): a multicentre observational cohort study. *The Lancet Neurology* 17, 539–547.
- Wilson, D., Jäger, H.R., Werring, D.J., 2015. Anticoagulation for Atrial Fibrillation in Patients with Cerebral Microbleeds. *Current Atherosclerosis Reports* 17.
- Wilson, D., Seiffge, D.J., Traenka, C., 2017. Outcome of intracerebral hemorrhage associated with different oral anticoagulants 11.
- Winblad, B., Amouyel, P., Andrieu, S., Ballard, C., Brayne, C., Brodaty, H., Cedazo-Minguez, A., Dubois, B., Edvardsson, D., Feldman, H., Fratiglioni, L., Frisoni, G.B., Gauthier, S., Georges, J., Graff, C., Iqbal, K., Jessen, F., Johansson, G., Jönsson, L., Kivipelto, M., Knapp, M., Mangialasche, F., Melis, R., Nordberg, A., Rikkert, M.O., Qiu, C., Sakmar, T.P., Scheltens, P., Schneider, L.S., Sperling, R., Tjernberg, L.O., Waldemar, G., Wimo, A., Zetterberg, H., 2016. Defeating Alzheimer's disease and other dementias: a priority for European science and society. *The Lancet Neurology* 15, 455–532.
- Won Seo, S., Hwa Lee, B., Kim, E.-J., Chin, J., Sun Cho, Y., Yoon, U., Na, D.L., 2007. Clinical Significance of Microbleeds in Subcortical Vascular Dementia. *Stroke* 38, 1949–1951.
- Wong, S.K., Chin, K.-Y., Suhaimi, F.H., Fairus, A., Ima-Nirwana, S., 2016. Animal models of metabolic syndrome: a review. *Nutr Metab (Lond)* 13.
- Wright, C.B., Festa, J.R., Paik, M.C., Schmiedigen, A., Brown, T.R., Yoshita, M., DeCarli, C., Sacco, R., Stern, Y., 2008. White matter hyperintensities and subclinical infarction: associations with psychomotor speed and cognitive flexibility. *Stroke* 39, 800–805.
- Xi, G., Keep, R.F., Hoff, J.T., 2006. Mechanisms of brain injury after intracerebral haemorrhage. *The Lancet Neurology* 5, 53–63.
- Xu, X., Chan, Q.L., Hilal, S., Goh, W.K., Ikram, M.K., Wong, T.Y., Cheng, C.-Y., Chen, C.L.-H., Venketasubramanian, N., 2017. Cerebral microbleeds and neuropsychiatric symptoms in an elderly Asian cohort. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 88, 7–11.

- Yang, F., Liu, S., Wang, S.-J., Yu, C., Paganini-Hill, A., Fisher, M.J., 2011. Tissue Plasminogen Activator Expression and Barrier Properties of Human Brain Microvascular Endothelial Cells. *Cellular Physiology and Biochemistry* 28, 631–638.
- Yang, S.-Y., Chiu, M.-J., Lin, C.-H., Horng, H.-E., Yang, C.-C., Chieh, J.-J., Chen, H.-H., Liu, B.-H., 2016. Development of an ultra-high sensitive immunoassay with plasma biomarker for differentiating Parkinson disease dementia from Parkinson disease using antibody functionalized magnetic nanoparticles. *J Nanobiotechnology* 14.
- Yang, Y., Zhang, M., Kang, X., Jiang, C., Zhang, H., Wang, P., Li, J., 2015. Thrombin-induced microglial activation impairs hippocampal neurogenesis and spatial memory ability in mice. *Behav Brain Funct* 11.
- Yates, P.A., Villemagne, V.L., Ellis, K.A., Desmond, P.M., Masters, C.L., Rowe, C.C., 2014. Cerebral Microbleeds: A Review of Clinical, Genetic, and Neuroimaging Associations. *Front Neurol* 4.
- Zanoveli, J.M., Morais, H. de, Dias, I.C. da S., Schreiber, A.K., Cunha, C.P. de S. and J.M. da, 2016. Depression Associated with Diabetes: From Pathophysiology to Treatment [WWW Document]. *Current Diabetes Reviews*. URL <http://www.eurekaselect.com/131337/article>.
- Zhao, L., Arbel-Ornath, M., Wang, X., Betensky, R.A., Greenberg, S.M., Frosch, M.P., Bacskai, B.J., 2015. Matrix Metalloproteinase 9 mediated intracerebral hemorrhage induced by Cerebral amyloid angiopathy. *Neurobiol Aging* 36, 2963–2971.
- Zipfel, G.J., Han, H., Ford, A.L., Lee, J.-M., 2009. Cerebral Amyloid Angiopathy: Progressive Disruption of the Neurovascular Unit. *Stroke* 40, S16–S19.
- Zonneveld, H.I., Goos, J.D.C., Wattjes, M.P., Prins, N.D., Scheltens, P., van der Flier, W.M., Kuijter, J.P.A., Muller, M., Barkhof, F., 2014. Prevalence of cortical superficial siderosis in a memory clinic population. *Neurology* 82, 698–704.