

UNIVERSITÉ DE LILLE  
**FACULTÉ DE MÉDECINE HENRI WAREMBOURG**

Année : 2021

THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT  
DE DOCTEUR EN MÉDECINE

**Étude des liens entre méthylation globale de l'ADN et marqueurs de  
vieillesse cérébral en IRM**

Présentée et soutenue publiquement le 19 octobre 2021 à 16 heures  
au Pôle Formation

***par Thomas LECOURT***

---

**JURY**

**Président :**

**Monsieur le Professeur Jean-Pierre PRUVO**

**Assesseurs :**

**Monsieur le Professeur François PONTANA**

**Monsieur le Docteur Nicolas DEBRY**

**Directeur de thèse :**

**Monsieur le Docteur Grégory KUCHCINSKI**

---

## **Avertissement**

La Faculté n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèse : celles-ci sont propres a leurs auteurs.

## Liste des abréviations utilisées

AVC	Accident Vasculaire Cérébral
CADASIL	Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy
CG	Cytosine - Guanine
IMC	Indice de Masse Corporelle
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
MBP	Myelin Binding Protein
NBIA	Neurodegeneration with Brain Iron Accumulation
SEP	Sclérose en Plaque
TAVI	Transcatheter Aortic Valve Implantation
WMH	White Matter Hyperintensity

## Table des matières

<b>Résumé</b> .....	<b>12</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>14</b>
<b>I – Méthylation</b> .....	<b>14</b>
1 ) <i>Définition</i> .....	14
2 ) <i>Régulation</i> .....	15
3 ) <i>Défaut de régulation et exemples</i> .....	16
4 ) <i>Facteurs environnementaux</i> .....	17
5 ) <i>Méthylation et pathologies</i> .....	18
<b>II - Vieillessement cérébral</b> .....	<b>22</b>
1 ) <i>Microbleed</i> .....	22
2 ) <i>Atrophie</i> .....	23
3 ) <i>Leucopathie</i> .....	25
4 ) <i>Dépôts minéraux</i> .....	27
5 ) <i>Lacune</i> .....	30
6 ) <i>Age cérébral en IRM</i> .....	30
<b>III – Objectif</b> .....	<b>31</b>
<b>Matériel et méthode</b> .....	<b>32</b>
<b>I - Population de l'étude</b> .....	<b>32</b>
<b>II – Méthylation</b> .....	<b>33</b>
<b>III – IRM</b> .....	<b>34</b>
1 ) <i>Microbleed</i> .....	36
2 ) <i>Atrophie</i> .....	36
3 ) <i>Leucopathie</i> .....	37
4 ) <i>Dépôts minéraux</i> .....	39
5 ) <i>Séquelles ischémiques</i> .....	41

<b>IV - Analyse statistique</b> .....	<b>42</b>
<b>Résultats</b> .....	<b>44</b>
<b>I - Population</b> .....	<b>44</b>
<b>II - IRM</b> .....	<b>46</b>
<b>III - Corrélation</b> .....	<b>48</b>
1) <i>Critère principal</i> .....	48
2) <i>Potentiels facteurs de confusions</i> .....	51
<b>Discussion</b> .....	<b>54</b>
<b>Conclusion</b> .....	<b>59</b>
<b>Références bibliographiques</b> .....	<b>60</b>

## RESUME

**Introduction :** La méthylation de l'ADN est un procédé chimique réversible consistant en l'adjonction d'un groupement méthyl sur un nucléotide, influant ensuite la transcription et l'expression du gène concerné : c'est le phénomène de l'épigénétique.

Plusieurs études ont montré une diminution du degré de méthylation global avec le vieillissement (« epigenetic drift »). Parallèlement le vieillissement d'un individu se traduit en IRM cérébrale par une série de modifications : atrophie, leucopathie, microbleed, accumulation minérale au sein des noyaux gris centraux. L'objectif principal de l'étude est d'étudier le lien entre d'une part degré de méthylation, et d'autre part anomalies cérébrales dégénératives, afin de déterminer quelles refléteraient au mieux le phénomène du vieillissement.

**Matériel et Méthode :** Il s'agit d'une étude monocentrique incluant rétrospectivement des patients ayant été pris en charge pour un remplacement valvulaire aortique percutané (TAVI).

Ces patients ont bénéficié d'IRM péri-procédurales (appareil Siemens 1,5 T), avec des séquences diffusion, FLAIR et T2\*, ainsi que d'un dosage du niveau de méthylation global de l'ADN à partir de leucocytes périphériques sur des échantillons sanguins.

Le niveau de méthylation était ensuite comparé en fonction de la présence, l'absence ou l'intensité des marqueurs de vieillissement cérébral pré-établis.

Des analyses secondaires concernant des données cliniques pouvant être à l'origine de facteurs de confusion ont également été réalisées.

**Résultats :** Parmi les 97 patients inclus, le niveau de méthylation global était de 75,8 %. Il n'était pas modifié en présence de microbleed, d'une atrophie ou d'une leucopathie marquées, ni de lacunes. En revanche, il était significativement plus bas chez les patients présentant une séquelle ischémique corticale (73,13 % contre 76,29%).

De même, il existait une corrélation inverse faible avec la charge minérale des noyaux gris centraux : plus celle-ci augmentait, plus le niveau de méthylation diminuait (coefficient de Pearson de - 0,256 pour le putamen gauche par exemple).

**Conclusion :** Notre étude menée sur une cohorte de patients à haut risque cardiovasculaire confirme l'association entre pathologie ischémique cérébrale et hypométhylation. Elle ouvre des perspectives de recherche quant au rôle de la méthylation du fer dans l'homéostasie du fer intracérébral et son implication dans le vieillissement cérébral.

# INTRODUCTION

## I – METHYLATION

### 1 ) Définition (1)

Connue chez l'animal depuis les années 1950 (2) et identifiée chez l'homme dans les années 1980 (3) la méthylation de l'ADN est un procédé chimique réversible consistant en l'adjonction d'un groupement methyl (5m) sur un acide aminé constitutif de l'ADN, la cytosine, formant une molécule dite 5mC.

Chez l'adulte, on considère qu'environ 70-80% des dinucléotides CG sont méthylés, avec des variations inter tissulaires (notamment prédominance dans le système nerveux central).

Mais certains territoires dans des régions promotrices de gènes sont physiologiquement peu méthylés.

La méthylation va ensuite participer à la régulation de la transcription des gènes concernés et dont de leur expression (4) :

- soit en empêchant la liaison des protéines de transcription sur l'ADN méthylé.
- soit via la liaison d'enzymes dites « lectrices » directement sur le groupe methyl.

Typiquement, l'hyperméthylation d'îlots de dinucléotides C-G (zones promotrices de gènes) va en inhiber la transcription, tandis que l'hyperméthylation des gènes eux mêmes va favoriser leur transcription.

C'est le procédé de l'épigénétique.

## 2 ) Régulation (1)

Ce processus n'est pas figé, il peut varier sous l'action de plusieurs enzymes qui vont méthyler ou dé-méthyler des nucléotides.

- la famille enzymatique des Dnmts (« methyltransferase ») pour catalyser la liaison entre la cytosine et le groupe 5m (plus spécifiquement Dnmt3a et b sont responsables de la méthylation de novo et Dnmt1 de son maintien).

- plusieurs mécanismes chimiques et enzymatiques pour détacher le groupe 5m.

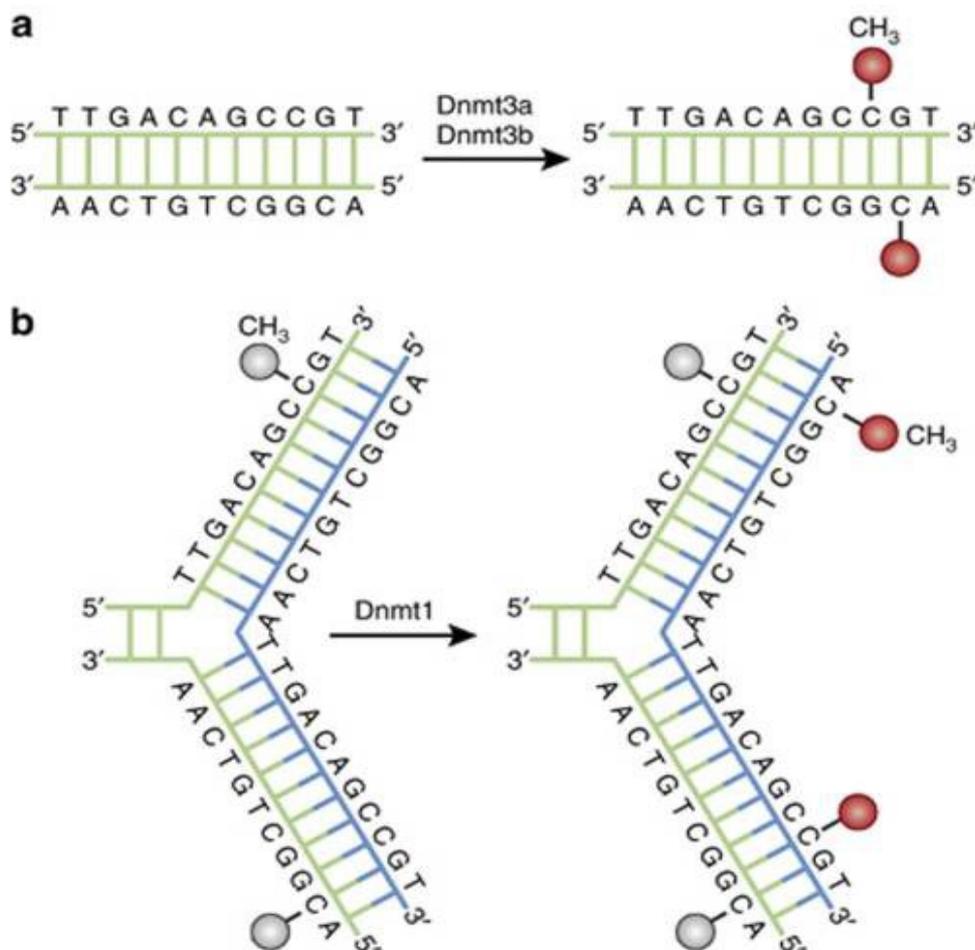


Illustration 1: LD Moore et al. DNA methylation and its basic function

### 3 ) Défaut de régulation et exemples

Cette régulation est importante car l'excès comme le défaut de méthylation de l'ADN sont délétères, notamment pour le développement neuronal.

#### **A - Hyperméthylation :**

En laboratoire, l'hyperméthylation non contrôlée (par défaut des enzymes clivantes) de l'ADN conduit à des morts fœtale chez les souris.

Le syndrome de l'X fragile est lié à l'hyperméthylation anormale du gène FMR1, ce qui inhibe sa transcription (5, 6 , 7)

#### **B- Hypométhylation :**

La mutation du gène codant pour Dnmt1 se traduit par une entité nommée neuropathie héréditaire sensorielle et autonome de type 1 (HSAN1), qui se traduit par une démence et une surdité.

Les mutations du gène MECP2 (codant pour une protéine se liant à l'ADN spécifiquement méthylé), touchant souvent le complexe reconnaissant le groupe 5m, réalisent un équivalent d'hypométhylation (génome méthylé mais absence de protéines « lectrices ») ; elles se traduisent par le syndrome de Rett : phase de développement normal, puis décélération globale du développement psychomoteur et perte des acquisitions cognitives et motrices (8,9,10)

#### **4 ) Facteurs environnementaux**

En plus de ces causes génétiques, la méthylation de l'ADN est également modifiée par certains facteurs environnementaux, notamment :

##### **A - Age**

C'est le plus connu. La méthylation globale de l'ADN augmente progressivement dans l'enfance, se stabilise au passage à l'âge adulte puis décroît progressivement avec le vieillissement, avec toutefois une augmentation de la variation inter-individuelle (**11, 12**) : on appelle ce phénomène l'«epigenetic drift ».

A l'inverse, dans certains sites spécifiques (majoritairement des îlots de CpG en région promotrice de gène, physiologiquement peu méthylés), la méthylation a plutôt tendance à augmenter avec l'âge. Ces sites (dits « clock -sites »), sont également moins sujets à la variation interindividuelle et pourrait permettre de calculer un âge biologique, parfois différent de l'âge chronologique (**13**).

Par exemple, une méta analyse de 2015 qui a revu plusieurs études a identifié 11 sites spécifiques, qui présentaient des résultats concordants sur au moins 4 études différentes : 8 dont la méthylation était augmentée, et correspondant à des îlots de CpG, et 3 où elle était abaissée, correspondant à des zones situées hors des îlots).

Ces « clock sites » peuvent également varier selon les tissus, certains pouvant refléter l'âge biologique d'un tissu donné mieux que certains autres, et réciproquement.

## **B - Toxiques**

Et notamment l'usage de **tabac (14)**, de **drogue (15)** ou **d'alcool (16, 17)**. Par exemple, la nicotine inhibe les enzymes Dnmt dans les neurones GABA-ergiques, entraînant une hypométhylation globale ; le mécanisme est similaire pour l'alcool, avec une atteinte préférentielle des enzymes Dnmt 3a et 3b.

**C - Conditions psychosociales difficiles (18)** (négligence infantile, pauvreté, stress maternel pré-natal, alcoolisme fœtal **(19)**) :

Une étude de 2018 a montré, chez des adolescents entre 16 et 18 ans, une association entre pauvreté et hypométhylation de la région promotrice du facteur neurotrophique issu du cerveau (*BDNF, Brain Derived Neurotrophic Factor*) ; en imagerie cela se matérialisait par une association entre hypométhylation de BDNF et un amincissement du cortex frontal, notamment fronto-orbitaire latéral.

## **D - Pollution :**

Plusieurs études ont retrouvé une hypométhylation globale de l'ADN chez des personnes respirant un air pollué **(20)**, ou exposées à une pollution sonore **(21)**, vraisemblablement en lien avec un mécanisme de réaction inflammatoire chronique.

## **5 ) Méthylation et pathologies**

D'autre part des altérations du profil de méthylation ont été retrouvées chez des patients souffrant de plusieurs pathologies, parmi lesquelles :

### **A – Accidents vasculaires cérébraux :**

Une méta analyse (22) conduite en octobre 2020 s'est intéressée à ce lien, et a compilé 20 études soit environ 7000 patients ;

En terme de méthylation globale du génome, 2 études ont retrouvé une association (mais non significative statistiquement) entre la baisse du degré de méthylation et une hausse de la prévalence d'événements ischémiques, notamment chez les sujets masculins (23, 24).

11 études se sont intéressées à la méthylation spécifique de certaines zones codant pour des gènes ou promotrices de gènes.

Ainsi 4 sites sont hypométhylés chez des patients présentant des événements ischémiques cérébraux : zones promotrices de *TNF- $\alpha$*  (Tumor Necrosis Factor), d'*ER $\alpha$*  (Oestrogen Receptor), de *MMP-2* (Métalloprotéase matricielle 2) et *MIR-223* (microRNA223).

A l'inverse, 7 sites sont hyperméthylés : zones promotrices de *APOE* (Apolipoprotéine E), de *TP53* (facteur de transcription p53), de *TM* (thrombomoduline), et de *CBS* (Cystathionine  $\beta$ -synthase) ; gènes de *MTHFR* (Méthylentetrahydrofolate reductase), de *ABCG1* (transporteurs ATP – binding cassette), et de *AHCY* (S-adenosylhomocysteine hydrolase).

### **B - Sclérose en plaque (25) :**

Des altérations du profil de méthylation spécifique de certaines zones ont été décrites chez des patients suivis pour SEP.

Par exemple, il existe une hypométhylation de la région promotrice de la *SHP-1* (tyrosine – phosphatase), une enzyme anti-inflammatoire (26).

De même, il existe une hypométhylation de la zone promotrice de la *PAD – 2* (peptidyl arginine deiminase 2), entraînant sa surexpression dans la substance blanche. Celle-ci va altérer la stabilité de la protéine basique de myéline (MBP), qui sera considérée comme un antigène par les lymphocytes T ; l'ensemble étant à l'origine d'une démyélinisation. ( 27)

### **C - Démences :**

Dans la maladie d'Alzheimer, il existe une accélération de l'hypométhylation globale physiologique liée à l'âge (28).

Plusieurs gènes et zones promotrices de gènes présentent elles aussi des variations focales de méthylation chez les patients suivis pour une maladie d'Alzheimer : une étude de 2017 en dénombre 31, impliqués notamment dans la protéine Tau, la protéine  $\beta$  – amyloïde, des apolipoprotéines (29).

Par exemple on retrouve une hyperméthylation focale, par exemple de la zone promotrice de l'Apolipoprotéine E-e4 dans la maladie d'Alzheimer « classique », à début tardif (>65 ans) (30) (mais aussi dans la démence à corps de Lewy (31) )

On retrouve également une hyperméthylation focale du gène ANK1 dans le cortex entorhinal sur des analyses post mortem de patients souffrant de maladie d'Alzheimer (mais aussi de maladie de Parkinson et de chorée de Huntington (32))

## ***D - Maladie psychiatriques***

Plusieurs études (33) ont constaté des variations du degré de méthylation globale dans plusieurs tissus périphériques (sang, salive,) chez des populations psychiatriques : hyperméthylation dans les troubles anxieux (34) ; hypométhylation dans la schizophrénie (35, 36 , 37), dans les troubles bipolaires (38), dans les syndrome dépressifs (39,40), l'anorexie (41).

Au niveau du tissu cérébral, sur lequel certaines études se sont portées spécifiquement, on observe plutôt une hyperméthylation, notamment dans les troubles bipolaires et la schizophrénie au niveau du cortex cingulaire (42).

Concernant la méthylation spécifique, on a mis en évidence une hypométhylation des gènes codant pour les récepteurs dopaminergiques chez les patients schizophrène ; cette hypométhylation se traduit vraisemblablement par une hausse de l'expression et de la transcription de ces récepteurs, participant à la pathologie. En effet l'hyper-activation dopaminergiques est un facteur physiopathologique connu de la pathologie schizophrénique (43)

## ***E - Cancers***

On observe des différences du méthylome entre cellules cancéreuses et cellules saines. Globalement les cellules cancéreuses sont hypométhylées (44, 45). En revanche, on met en évidence une hyperméthylation spécifique de certaines zones, souvent promotrices de gènes suppresseurs de tumeurs, réparateurs d'ADN ou responsables de l'adhérence cellulaire.

## **F - Athérosclérose**

Une étude de 2008 a montré que le niveau de méthylation globale de l'ADN était significativement plus élevé chez les patients porteurs d'une athérosclérose que chez les patients indemnes (46). Une autre étude in vitro a montré que l'inhibition de DNMT1 limitait la dysfonction endothéliale et l'athérosclérose (47)

## **II – Vieillessement cérébral (48)**

La neuro-dégénérescence se manifeste par plusieurs anomalies décelables en IRM

### **1 ) Microbleed**

Il s'agit de dépôts focaux d'hémosidérine (sans forcément de réel « saignement » préalable) au sein du parenchyme cérébral, sans origine traumatique ni retentissement clinique, mis en évidence sur les séquences de susceptibilité magnétique (T2\*, SWI, EPI...).

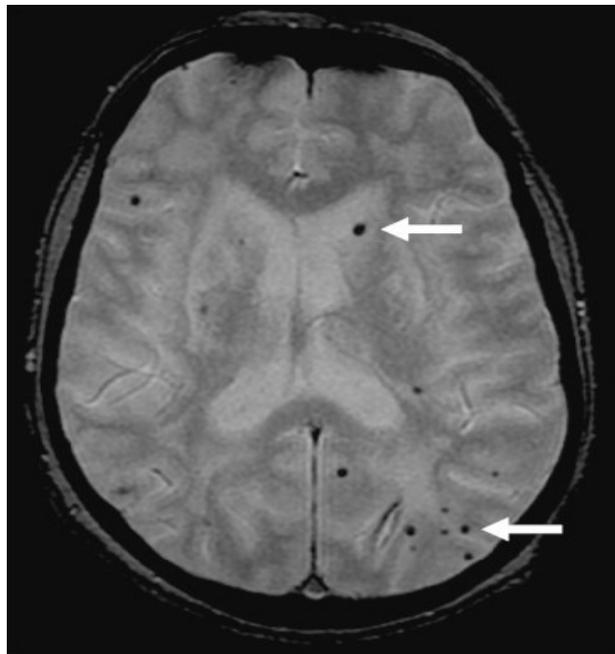
Dans un étude prospective de 2011, les facteurs favorisant l'apparition de nouveaux microbleed sont l'âge, l'hypertension artérielle, et la présence des l'inclusion d'autres microbleed (49).

En population générale, ils sont présents chez environ 5% des patients, mais paraissent être des marqueurs de risque vasculaire : on en retrouve chez un tiers des patients avec une ischémie cérébrale, et deux tiers des patients avec une hémorragie cérébrale (50).

Parallèlement, le nombre de microbleed semble être un facteur prédictif de récurrence d'hémorragie cérébrale chez les sujets âgés (49).

Les microbleed sont également plus fréquents chez les patients présentant une atteinte cérébrale vasculaire et notamment deux affections du sujet âgé (51):

- l'angiopathie amyloïde, où les microbleed sont lobaires, et associés à des stigmates d'hémorragie sous arachnoïdienne ou intraparenchymateuse ;
- l'hypertension artérielle (non contrôlée), où les microbleed sont profonds.



*Illustration 2: microbleed*

## **2 ) Atrophie**

Elle correspond à la diminution du volume du parenchyme cérébral, et est visualisée en négatif par l'élargissement des espaces sous arachnoïdiens (atrophie corticale) ou du système ventriculaire (atrophie sous corticale).

Elle débute vers 30-40 ans, avec un rythme d'environ 0,2 % par an, et s'accélère progressivement (après 70 ans, elle est de 0,5 %/an) (52).

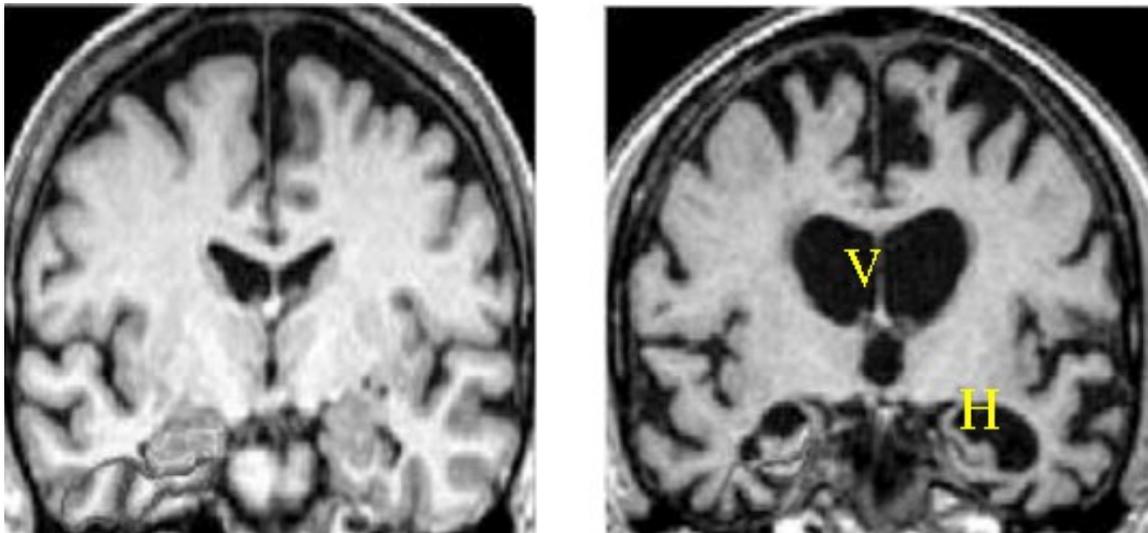
L'atrophie physiologique prédomine au cortex préfrontal et aux régions hippocampiques.

Elle est accélérée par la présence d'une maladie des petits vaisseaux (typiquement, une maladie de CADASIL (53)).

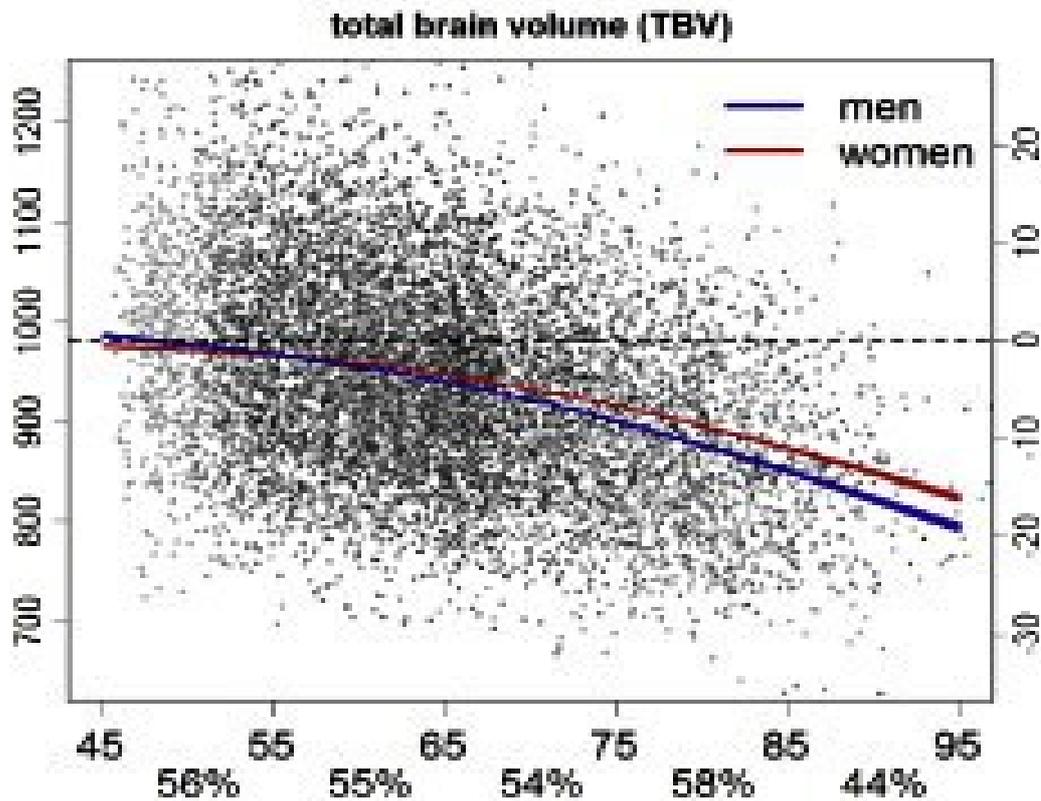
A l'inverse, il n'y a pas forcément d'association entre l'atrophie et la leucopathie.

Cliniquement, l'atrophie est fortement liée à l'intensité du déclin cognitif (54).

Ainsi, elle est accélérée dans la maladie d'Alzheimer, (- 1%/ an, et jusqu'à 4-5 %/ an pour les hippocampes).



*Illustration 3: Regional Atrophy Analysis of MRI for Early Detection of Alzheimer's Disease, Rowayda A. Sadek, 2013*



*Illustration 4: Trajectories of imaging markers in brain aging: the Rotterdam Study, Vinke et al. 2018*

### 3 ) Leucopathie

Pour un effort de standardisation, elle est dénommée dans la littérature WMH (*White Matter Hyperintensities*).

Elle se traduit par des hypersignaux T2 ou FLAIR de la substance blanche, et est souvent associée aux autres marqueurs de vieillissement cérébral.

La physiopathologie est mal connue, probablement du à la grande variété des anomalies retrouvées lors des analyse anatomopathologiques de cette leucopathie : démyélinisation, gliose, perte axonale, infarctus.

Épidémiologiquement, elle est extrêmement fréquente chez les sujets âgés, avec une prévalence variant entre 50 et 90 % selon les études, et une augmentation nette entre 60 et 90 ans (**55**).

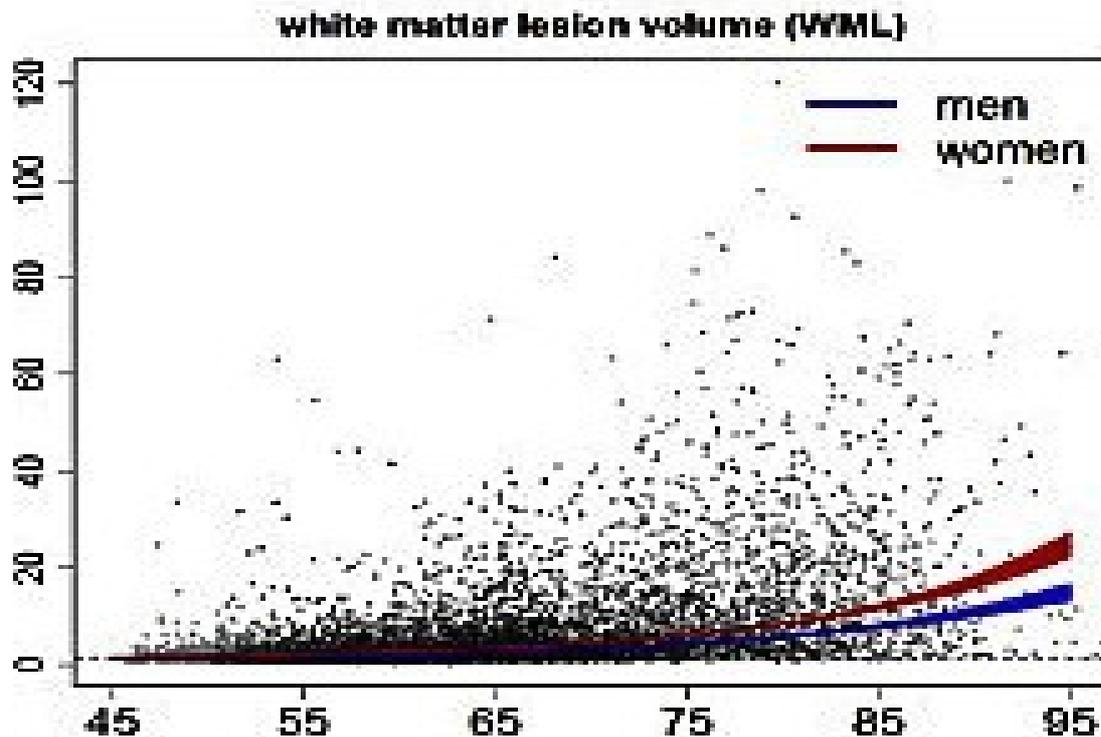
De même, sa sévérité augmente avec l'âge : des hypersignaux confluents de la substance blanche sont observés chez moins de 5 % des personnes de moins de 60 ans, contre 30-40 % des sujets de plus de 80 ans, dans des populations européennes ou asiatiques. Topographiquement, elle prédomine dans deux zones : la substance blanche péri-ventriculaire et celle des centres semi-ovales.

Selon plusieurs études, la leucopathie péri-ventriculaire est plus délétère que les autres types, ce qui pourrait être en lien avec des mécanismes physiopathologiques sous jacents différents.

Ainsi dans la maladie de CADASIL, les hypersignaux de la substance blanche péri-ventriculaire sont associés à des formes sévères de la maladie sur le plan cognitif, tandis que les hypersignaux limités aux régions temporales antérieures et frontales supérieures (pattern évocateur de la maladie) sont eux plutôt associés à des formes légères ou modérées (**56,57**).

Cliniquement, elle se manifeste précocement par un ralentissement cognitif (**58**), des troubles de l'attention, de la concentration (**59**) ; à un stade plus avancé, elle peut être liée à des troubles moteurs, des troubles de l'équilibre (**60,61**) .

C'est également un facteur de risque indépendant de développer une démence, même si elle ne peut être responsable seule d'un tableau démentiel (**62**).



*Illustration 5: Trajectories of imaging markers in brain aging: the Rotterdam Study, Vinke et al. 2018*

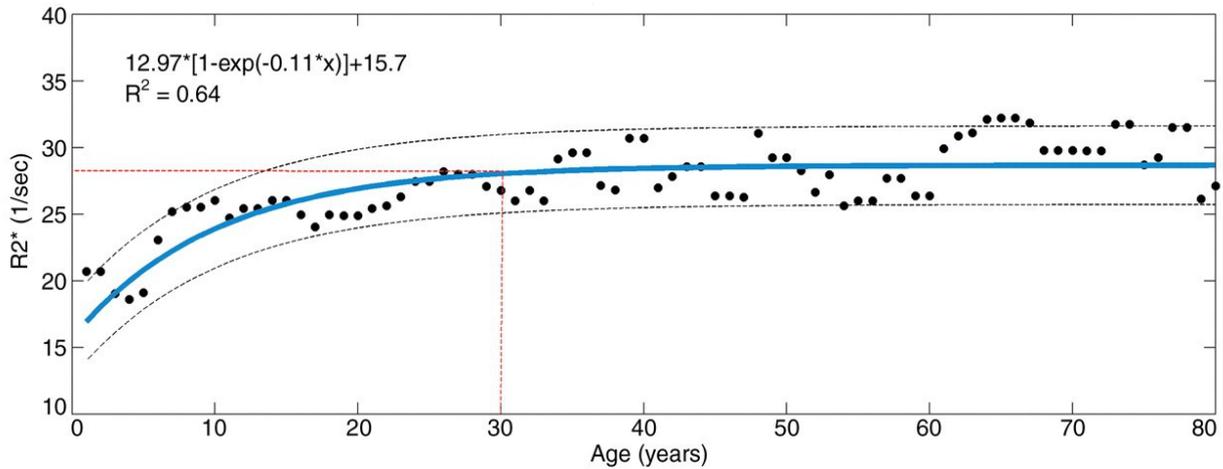
#### 4 ) Dépôts minéraux

La concentration en fer dans le cerveau augmente avec l'âge, en lien avec plusieurs facteurs notamment une perméabilité accrue de la barrière hémato-encéphalique (63). Quand elle excède les capacités des molécules chélatrices, le fer se dépose dans les tissus.

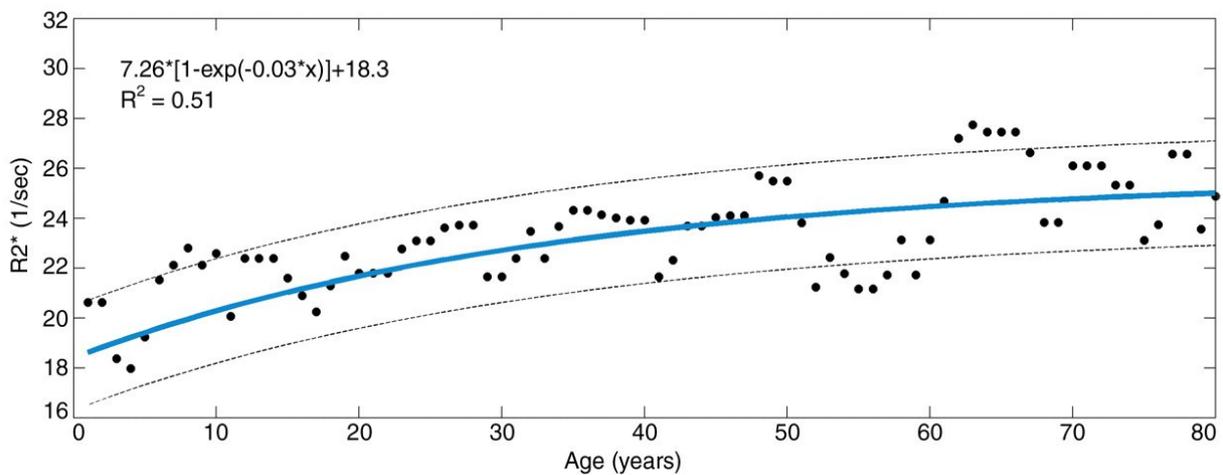
La répartition de cette accumulation est inégale : elle est préférentiellement située dans les noyaux gris centraux et le cervelet. A l'inverse, la protubérance ou la moelle sont peu affectées.

Au sein même des noyaux gris centraux, certains sont plus affectés que d'autres. Une étude de 2009 s'est intéressé à la variation de la charge minérale des différents noyaux gris centraux en fonction de l'âge (64).

Au final, la charge du pallidum augmentait rapidement, avant de se stabiliser vers 30 ans ; celle du putamen augmentait progressivement avec l'age, et devenait maximale dans la septième décade.



Évolution de la charge minérale dans le pallidum



Évolution de la charge minérale dans le putamen

Illustration 6 : Age-related Iron Deposition in Basal Ganglia, *Neuroradiology*, Aquino et al. 2009

Ainsi il existe donc une augmentation physiologique de la charge minérale cérébrale avec le vieillissement normal.

L'accumulation minérale intracellulaire est à l'origine d'un stress oxydatif, avec formation de radicaux libres, et peut être se traduire par des phénomènes inflammatoires, une apoptose neuronale, ou une ferroptose, un phénomène de mort neuronale non apoptotique.

On comprend donc qu'une accumulation minérale supérieure à celle du vieillissement physiologique puisse être impliquée dans des phénomènes neuro-dégénératifs pathologiques.

Par exemple, on retrouve de fortes concentrations de fer, cuivre et zinc dans les plaques amyloïdes chez les patients suivis pour une maladie d'Alzheimer (**65**).

Dans la maladie de Parkinson, plusieurs études ont montré une accumulation minérale dans la substance noire et les noyaux rouges, dont l'intensité est corrélée a la sévérité de la maladie (**66 - 69**).

Dans l'ataxie de Friedreich, le défaut de fonctionnement de la protéine mitochondriale frataxine entraîne entre autres une accumulation mitochondriale de fer, en particulier dans le noyau dentelé du cervelet (**70**)

## **5 ) Lacunes**

Il s'agit de lésion ischémiques focales cliniquement silencieuses, d'où leur nom d'infarctus « cachés ».

En IRM, elles se manifestent sous forme de cavités liquidiennes intraparenchymateuses de petite taille, avec une gliose peri-lésionnelle.

Elles sont particulièrement fréquentes chez les sujets âgés (**71,72**) ; leur prévalence est variables selon les études, mais augmente toujours avec l'age.

Les facteurs de risque sont les mêmes que pour les accidents ischémiques « classiques » : HTA, diabète, hypercholestérolémie au premier rang.

La présence de ces lacunes est un facteur de risque indépendant d'AVC ischémique et hémorragique (**73**).

Pour ce qui est du retentissement clinique, les études sont contrastées. Une étude sur cohorte de Rotterdam de 2003, confirmée par une seconde étude de 2009, trouvait un lien entre lacunes, notamment thalamique, et baisse des performances aux tests des fonctions exécutives (**74,75**).

Mais plus récemment en 2016 l'étude 3C ne retrouvait pas de lien entre la présence de lacunes et la survenue d'une démence malgré 10 ans de suivi (**76**).

## **6 ) Age cérébral et IRM**

En prenant en compte tout ces éléments, il semble intéressant d'évaluer l'age cérébral d'une personne, et sa concordance avec l'age biologique.

Une vaste étude de 2020 portant sur plus de 20 000 personnes a utilisé l'intelligence artificielle et un algorithme de deep learning pour estimer un âge cérébral à partir du volume cérébral en T1. Dans une analyse stratifiée chez les patients sains, celui-ci était fortement corrélé à l'âge physiologique.

De plus, l'affinage à certaines zones (hippocampe, amygdale, cortex insulaire, vermis), permettait d'augmenter la précision.

En revanche, sur l'ensemble de la population, les auteurs ont identifié d'importantes variations entre âge prédit et âge chronologique. En étudiant spécifiquement les patients discordants, on a mis en évidence 20 comorbidités significativement associées à une augmentation de l'âge prédit, notamment le diabète, l'hypertension artérielle et la sclérose en plaque.

### **III - OBJECTIF**

L'objectif de l'étude était de mettre en parallèle le niveau de méthylation de l'ADN et l'intensité des différents paramètres choisis pour témoigner du vieillissement cérébral en IRM.

En effet on constatait une association entre d'une part méthylation et vieillissement, et d'autre part vieillissement et anomalies morphologiques sur l'IRM cérébrale ; cette étude cherchait à identifier les paramètres IRM témoignant le mieux du vieillissement cérébral dans une population à haut risque cardiovasculaire.

## MATERIEL ET METHODE

### I – POPULATION

L'étude a porté sur des patients issus de la cohorte Methystroke entre 2012 et 2019, ayant bénéficié d'une IRM cérébrale en péri opératoire d'un remplacement valvulaire aortique percutané (TAVI).

Ainsi les patients adressés pour une procédure TAVI aux services de cardiologie et de chirurgie cardiaque de l'hôpital universitaire de Lille ont été analysés pour être inclus dans cette cohorte. Un consentement écrit a été obtenu conformément aux recommandations internationales pour la recherche clinique (Déclaration d'Helsinki), et après approbation du comité d'éthique médicale local.

La cohorte était composée de patients âgés d'au moins 70 ans, présentant un rétrécissement aortique serré symptomatique selon les recommandations écho - cardiographiques en pratique (Surface aortique  $<1\text{cm}^2$  ou  $0.6\text{ cm}^2/\text{m}^2$  et/ou un gradient moyen Trans valvulaire  $> 40\text{mmHg}$  et/ou une  $V_{\text{max}}$  aortique  $>4\text{m/s}$ ).

Il s'agissait de patients bénéficiant d'une couverture sociale en France, capables de recevoir une information et ayant donné leur consentement.

Nous avons exclu de ce travail les patients atteints d'un cancer évolutif, ayant un pacemaker, une contre-indication à l'IRM cérébrale, sous protection de justice, privés de liberté ou en situation d'urgence.

## II - METHYLATION

L'étude s'est intéressée à la méthylation globale du génome, par opposition à la méthylation spécifique de certaines zones.

Les analyses ont été réalisées sur des échantillons sanguins, en extrayant l'ADN des leucocytes périphériques.

La mesure de méthylation de cet ADN a été réalisée à l'aide du kit « Pyromark LINE-1™ » (Biotage, Suède) qui étudie des séquences répétées du rétrotransposon LINE-1.

Les séquences LINE-1 sont des répétitions de nucléotides, présentes à environ 1 million de copies sur le génome et représentant 15% de l'ADN total. A l'état physiologique, ces séquences sont hyperméthylées.

En effet, il existe une corrélation entre le degré de méthylation de LINE-1 et celui du génome entier (77).

La quantification de la méthylation sur un dinucléotide CG par pyroséquençage nécessitait au préalable une étape de « fixation » de l'état de méthylation. Pour cela l'ADN était bisulfité, ce qui transformait les cytosines non méthylées en uraciles, tandis que les cytosines méthylées restaient inchangées.

Cet ADN était ensuite amplifié par PCR par un système d'amorces spécifiques de la séquence d'intérêt. Les uracyles étaient alors transformés en thymines.

Cette première PCR était suivie de l'étape de pyroséquençage à proprement parler permettant de quantifier la proportion, sur une position donnée, du nucléotide C par rapport au nucléotide T. Le pyroséquençage consistait en l'addition de nucléotides selon un ordre déterminé par rapport à la séquence à analyser.

Lorsque le nucléotide complémentaire à la séquence du produit de PCR était incorporé, il y avait libération d'un pyrophosphate qui était transformé en ATP par la sulfurylase. La luciférase utilisait cet ATP pour émettre de la lumière en proportion directe du nucléotide incorporé sur la position donnée. Le ratio  $C/(C+T)$  correspond donc à la proportion de cytosine méthylée sur la position étudiée ( 78).

### III - IRM

Des IRM cérébrales 1,5 -Tesla (Siemens) ont été réalisées chez les patients, la veille de la procédure TAVI ou dans la semaine suivant la procédure TAVI.

Les séquences réalisées étaient :

- axiale diffusion (b0 et b1000) avec cartographie de l'ADC :
  - épaisseur de coupes : 3 mm
  - intervalle entre les coupes: 0 mm
  - champ d'acquisition : 230 x 230 mm
  - temps d'écho (TE) : 73 ms
  - temps de récupération (TR) : 10,2 ms
  - angle de bascule: 90 °

- axiale FLAIR
  - épaisseur de coupes : 4 mm
  - intervalle entre les coupes : 1mm
  - champ d'acquisition : 250 x 203 mm
  - TE : 89 ms
  - TR : 9 ms
  - temps d'inversion (TI) : 2,5 ms
  - angle de bascule : 150 °
  
- axiale T2\*
  - épaisseur de coupes : 4 mm
  - intervalle entre les coupes : 0,8 mm
  - champ d'acquisition : 275 x 241 mm
  - TE : 30 ms
  - TR : 1,2 ms
  - angle de bascule : 20°

Les anomalies cérébrales recherchées étaient :

### **1 ) Microbleeds**

Ils étaient définis en imagerie comme un hyposignal rond ou ovoïde en pondération T2\*avec artefact de blooming, non visible sur les autres séquences. Ces critères sont ceux qui permettaient la meilleure reproductibilité inter-observateurs (**79**)

Une attention particulière était portée pour les diagnostics différentiels : calcifications pallidales, structures vasculaires dans les espaces sous-arachnoïdiens,

On précisait ensuite leur nombre, leur topographie : supra ou infra tentoriels, superficiels ou profonds.

### **2 ) Atrophie cortico-sous corticale**

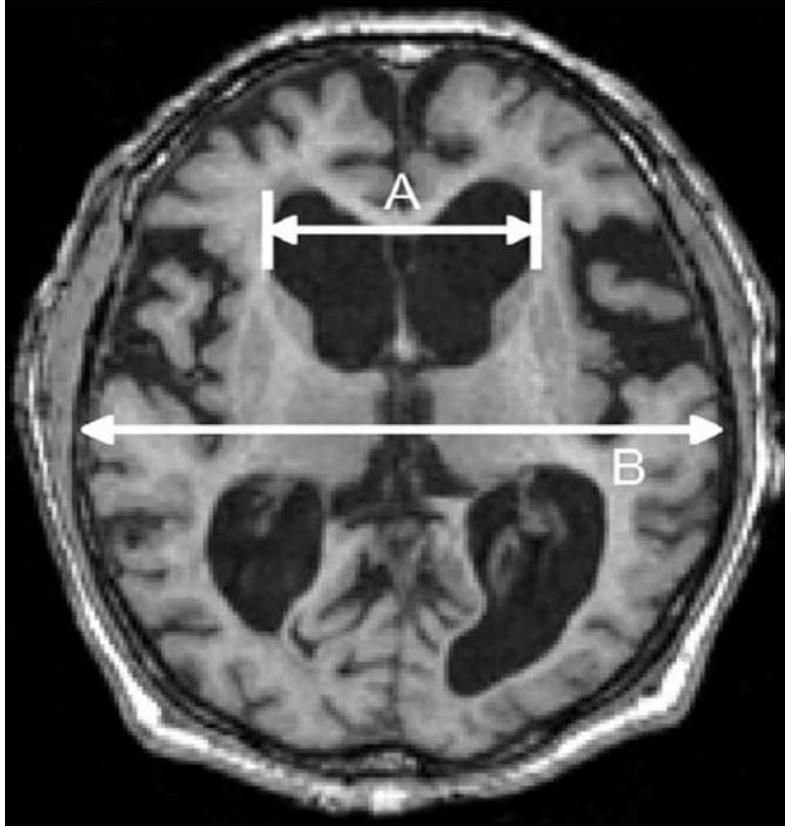
L'analyse s'est faite de deux manières distinctes.

Pour quantifier l'atrophie corticale, une échelle visuelle en 4 grades croissants (0, 1, 2, 3) a été utilisée. Un score de 0 indiquait une absence d'atrophie, un score de 3 une atrophie sévère.

Cette méthode est simple et présente une bonne reproductibilité intra-observateurs, mais une reproductibilité inter-observateurs moyenne (**80**).

Pour quantifier l'atrophie sous corticale, on a utilisé le score d'Evans.

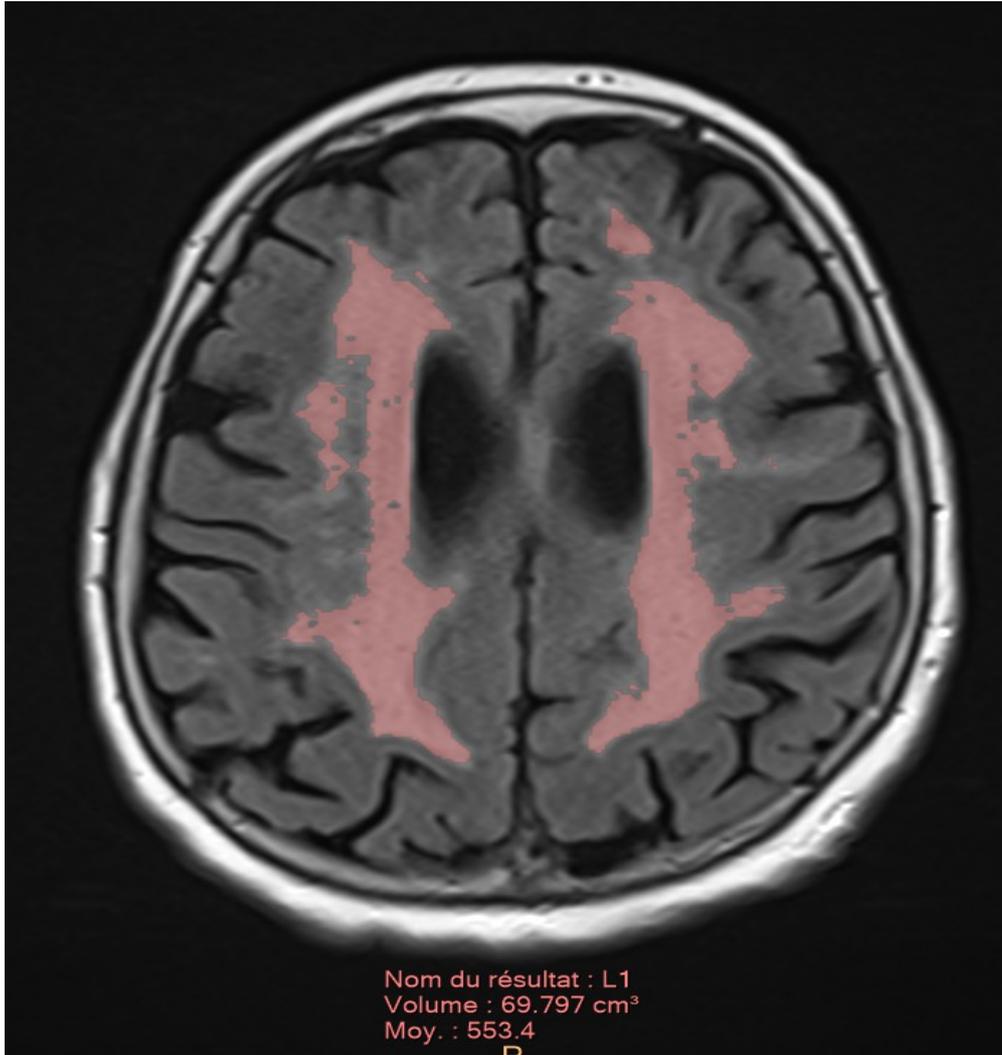
Celui ci correspond au rapport entre la distance entre les bords latéraux des deux cornes frontales des ventricules latéraux, et le diamètre transverse maximal du cerveau, entre les deux tables internes de la voûte.



*Illustration 8 : score d'Evans*

### **3 ) Leucopathie**

Elle correspondait aux hypersignaux FLAIR de la substance blanche (WMH); quantifiée de manière qualitative par le score de Fazekas (periventriculaire et profond), et quantitative par un contourage semi -automatique utilisant le logiciel TumorTracking (*IntelliSpace Portal, Philips Healthcare, Best, The Netherlands*).



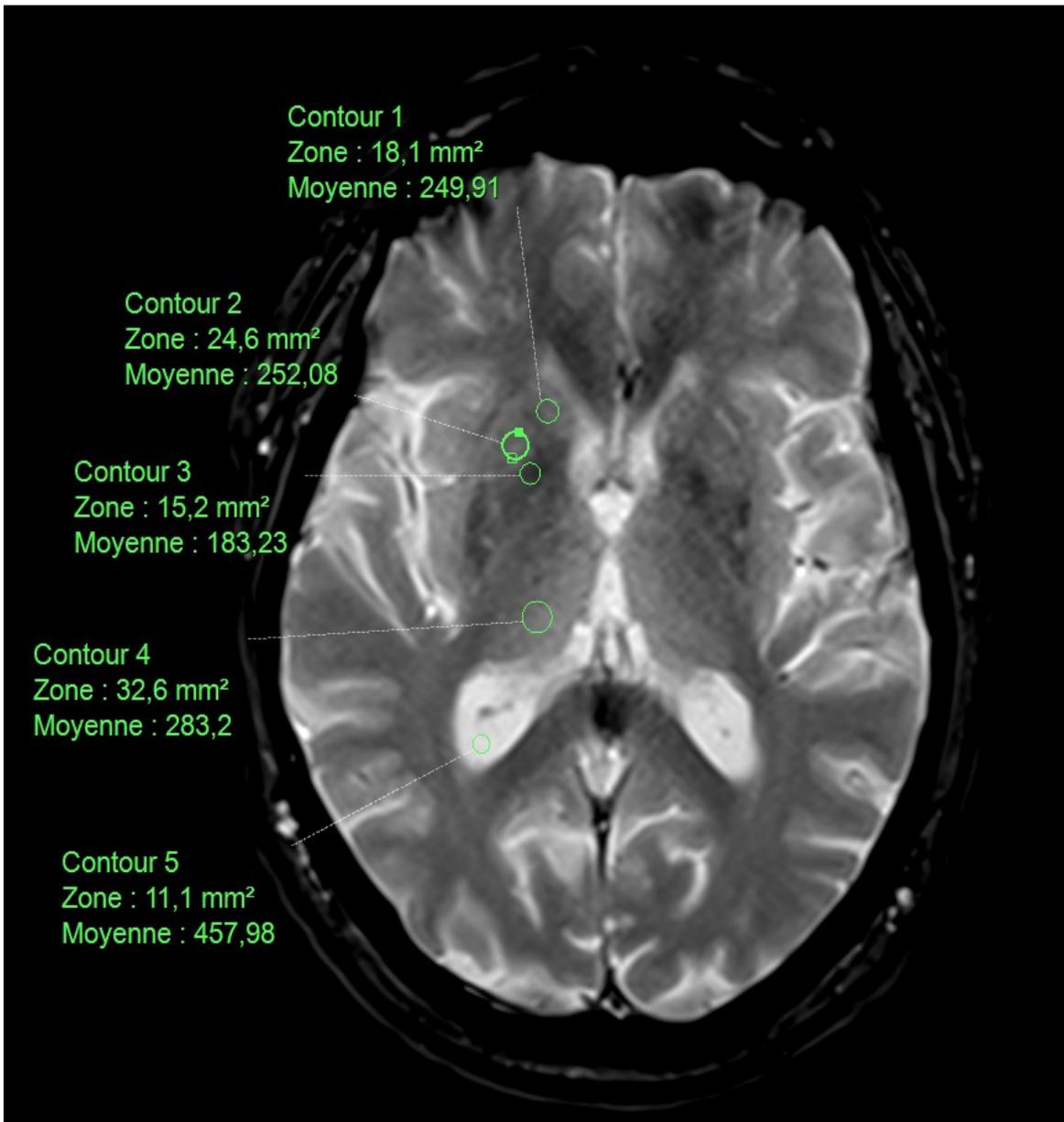
*Illustration 7 : Mesure du volume de leucopathie utilisant Tumor Tracking*

#### 4 ) Surcharge minérale des noyaux gris centraux

Elle était estimée sur les séquences T2\* en comparant la baisse de signal relative du noyau caudé, du putamen, du pallidum et du thalamus, comparativement à celui du liquide cérébro-spinal (81).

Score de charge minérale = signal T2\* (LCS) – signal T2\* (ROI).

Pour chaque structure l'intensité moyenne était mesurée au sein d'une ROI circulaire placée manuellement



*Illustration 9 :*

*Mesure de la charge minérale des noyaux gris centraux du coté droit*

*1 : tête du noyau caudé*

*2 : putamen*

*3 : pallidum*

*4 : thalamus*

*5 : LCS (référence)*

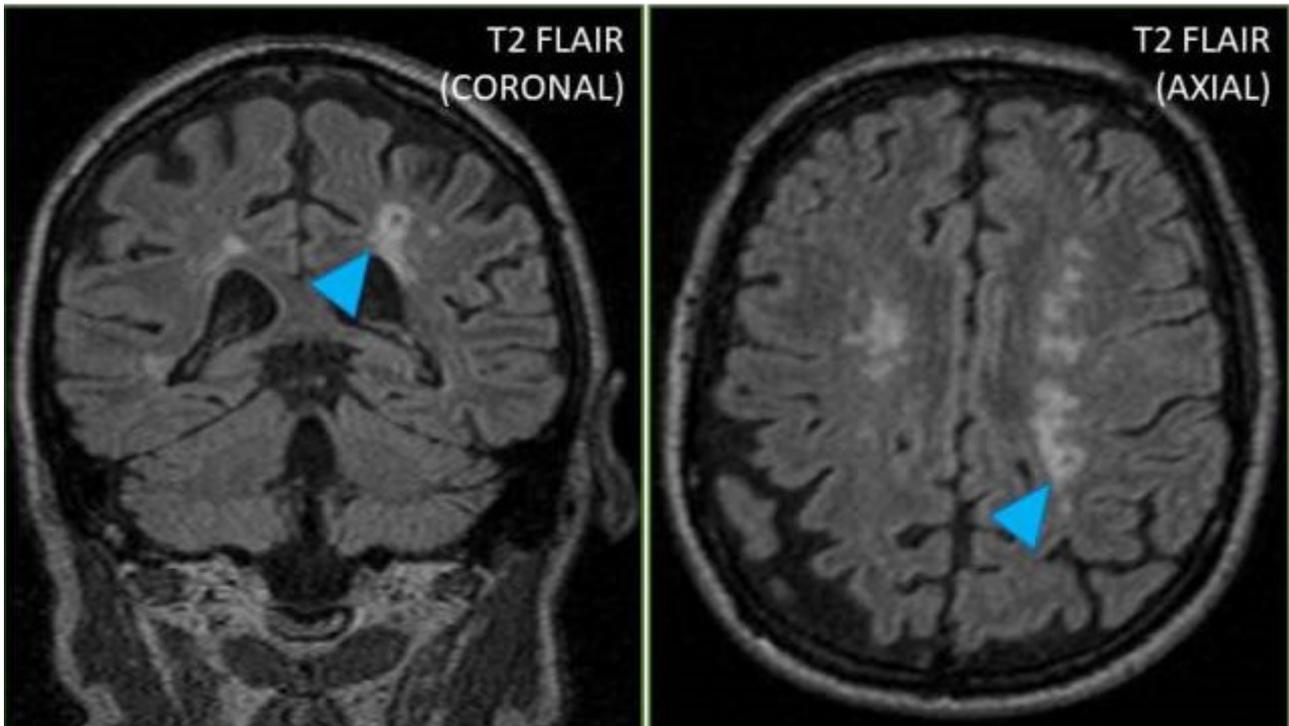
## 5 ) Séquelles ischémiques lacunaires ou corticales

Les lacunes correspondaient à des cavitations intraparenchymateuses de petites tailles (entre 3 et 15 mm le plus souvent), contenant du LCS, entourées d'une gliose périphérique en hypersignal FLAIR.

Une attention avait été portée aux diagnostics différentiels : en particulier hypersignaux FLAIR de la substance blanche profonde (sans cavitation), et dilatation focale des espaces perivasculaires de Virchow – Robin (absence de gliose périphérique, plus petite taille, aspect parfois linéaire) **(82)**

Les séquelles corticales prenaient la forme d'un hypersignal FLAIR cortico-sous cortical systématisé, éventuellement associé à une atrophie focale de la région touchée ou d'un élargissement passif du système ventriculaire en regard.

D'éventuelles lésions ischémiques récentes en hypersignal b1000 et restriction de la diffusion étaient comptabilisés lorsqu'elles étaient présentes sur l'IRM pré TAVI, mais pas lorsque la seule IRM disponible était post-procédure



*Illustration 10 : Lacune*

*(Das AS et al. Treatment Approaches to Lacunar Stroke. J Stroke Cerebrovasc Dis. 2019)*

#### **IV – ANALYSE STATISTIQUE**

Les variables qualitatives ont été décrites en terme de fréquence et de pourcentages.

Les variables quantitatives ont été décrites par la moyenne et l'écart type. La normalité des distributions a été vérifiée graphiquement et à l'aide du test de Shapiro-Wilk.

L'analyse univariée des variables qualitatives s'est faite par le test de Student, comparant pour chaque variable la moyenne et l'écart type du niveau de méthylation dans chaque groupe (porteur du facteur étudié / non porteur).

L'analyse univariée des variables qualitatives a fait appel au calcul du coefficient de corrélation de Pearson, pour étudier la covariance entre le degré de méthylation et l'intensité des différents paramètres.

Puis, une analyse multivariée a été effectuée par une régression linéaire, estimant l'association entre le degré de méthylation (variable expliquée) et la charge minérale du putamen gauche (variable explicative), ajustée sur la présence ou l'absence de séquelle ischémique corticale.

La région du putamen gauche a été sélectionnée car elle était celle présentant la corrélation la plus forte avec la variable expliquée.

Le niveau de significativité a été fixé à 5% ( $p = 0,05$ ). Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel SPSS version 26 (IBM corp., Armonk, NY, USA )

# RESULTATS

## I – Population

Les caractéristiques de base de la population sont présentées dans le **tableau 1**.

L'étude a porté sur 97 patients, avec un âge moyen de 81,6  $\pm$  6,4 ans, et une prédominance féminine (59 femmes pour 38 hommes, soit 60,8%).

On rappelle qu'en raison du recrutement de la cohorte, tous les patients étaient porteurs d'un rétrécissement aortique serré.

Ces patients étaient en surpoids (IMC moyen de 28), et présentaient fréquemment des comorbidités, notamment une hypertension artérielle (66 patients, soit 68 % des cas), une coronaropathie (40, soit 41,2 %), une insuffisance cardiaque (30, soit 30,9 %), une FA (30, soit 30,9 %), un diabète (26, soit 26,8 %), une insuffisance rénale (28, 28,9 %), une BPCO (16, 16,5 %) ou une AOMI (10, 10,3 %).

15 de ces patients avaient déjà bénéficié d'une chirurgie cardiaque (15,5 %)

L'ensemble de ces éléments entraînait un risque chirurgical intermédiaire : Euroscore logistique à 10,9 %,  $\pm$  7,5, et STS score à 2,8 %  $\pm$  1,2.

Les performances cognitives étaient quant à elles préservées, avec un score MMSE de 27,6  $\pm$  1,7.

La méthylation globale du génome a été mesurée à 75,8 %  $\pm$  4,1.

<b>Tableau 1</b>	
<i>Données démographiques</i>	
Ages en années, moy $\pm$ ET	81,6 +- 6,4
Sexe masculin, n (%)	38 (39,2)
IMC en kg/m <sup>2</sup> , moy $\pm$ ET	28 +- 6,6
<i>Antécédents</i>	
Fibrillation atriale, n (%)	30 (30,9)
BPCO, n (%)	16 (16,5)
AOMI, n (%)	10 (10,3)
Coronaropathie, n (%)	40 (41,2)
Antécédent de chirurgie cardiaque, n (%)	15 (15,5)
Insuffisance cardiaque, n (%)	30 (30,9)
HTA, n (%)	66 (68)
Diabète, n (%)	26 (26,8)
Insuffisance rénale, n (%)	28 (28,9)
<i>Risque chirurgical</i>	
Euroscore logistique en %, moy $\pm$ ET	10,9 +- 7,5
STS Score en %, moy $\pm$ ET	2,8 +- 1,2
Risque d'AVC selon STS score en %, moy $\pm$ ET	2,2 +-0,9
<i>Données biologique</i>	
Méthylation en %, moy +- ET	75,8 +- 4,1

## II – IRM

Les données de l'IRM sont présentées dans le **tableau 2**

Des microbleed ont été retrouvés chez 35 patients (36, 1%).

25 patients étaient porteurs de séquelles ischémiques lacunaires (25,8 %), et 13 de séquelles ischémiques corticales (13,4 %).

Les patients présentaient une atrophie cérébrale modérée, avec un score d'atrophie de 1,49 (+- 0,61), et un index d'Evans de 0,29 (+- 0,05).

Ils étaient porteurs d'une leucopathie d'allure vasculaire discrètement prédominante en periventriculaire (Score de Fazekas de 1,6 en periventriculaire et 1,2 en profond).

La surcharge minérale des noyaux gris centraux prédominait dans les pallidi, puis les putamens, les noyaux caudés et les thalamus.

**Tableau 2**

IRM

*Données quantitatives*

Score de Fazekas périventriculaire, moy +/- ET	1,64 ± 0,73
Score de Fazekas profond, moy +/- ET	1,19 ± 0,83
Volume de leucopathie (cm <sup>3</sup> ), moy +/- ET	13,42 ± 17
Score d'Evans, moy +/- ET	0,29 ± 0,05
Score d'atrophie, moy +/- ET	1,49 ± 0,61
Surcharge minérale du noyau caudé droit, moy +/- ET	396,71 ± 427, 50
Surcharge minérale du putamen droit, moy +/- ET	442,03 ± 486,81
Surcharge minérale du pallidum droit, moy +/- ET	515,85 ± 544,67
Surcharge minérale du thalamus droit, moy +/- ET	345,44 ± 368,98
Surcharge minérale du noyau caudé gauche, moy +/- ET	390,25 ± 422,56
Surcharge minérale du putamen gauche, moy +/- ET	418,21 ± 446,30
Surcharge minérale du pallidum gauche, moy +/- ET	496,54 ± 508,70
Surcharge minérale du thalamus gauche, moy +/- ET	343,46 ± 361,48

*Données qualitatives*

Microbleed > 0, n (%)	35 (36,1)
Lacune > 0, n (%)	25 (25,8)
Séquelle ischémique corticale > 0, n (%)	13 (13,4)

### III - Corrélation

#### 1 ) Critère de jugement principal

Il était composite, et portait sur des associations entre méthylation et anomalies cérébrales en IRM.

Les résultats sont présentés dans le **tableau 3**.

Il n'était pas mis en évidence de différence significative du niveau de méthylation de l'ADN selon que les patients sont particulièrement atrophiés .

Ainsi le niveau de méthylation était semblable chez les patients avec un score d'atrophie de 2 ou 3 (75,7 %), par rapport à ceux au score de 0 ou 1 (75,9 %,  $p = 0,8$ ).

De même, on n'observait pas de covariance entre le score d'Evans et le pourcentage de méthylation (coefficient de Pearson  $r$  de  $- 0,098$ ).

Par ailleurs il n'y avait pas non plus de différence significative en fonction de l'importance de la leucopathie, qu'elle soit périventriculaire ou profonde.

Les patients avec un score de Fazekas périventriculaire supérieur a 1 présentaient un niveau de méthylation de 75, 4 %, contre 76 % chez les autres ( $p=0,55$ ). Idem pour ceux avec un score de Fazekas profond supérieur à 1 : 75,4 % contre 76, 3 % chez les autres ( $p=0,28$ ).

Le volume de leucopathie quant à lui ne paraissait pas plus corrélé au niveau de méthylation : le coefficient de Pearson était de 0,003.

La présence de microbleed n'était pas non plus associée a une variation significative du niveau de méthylation : les patients porteurs d'au moins un microbleed avait un degré de méthylation de 76,9 %, contre 75,6 % chez ceux indemne ( $p = 0,29$ ) .

Les lacunes ischémiques n'étaient également pas corrélées au degré de méthylation : il était de 75,4 % chez les patients présentant des lacunes, de 76 % chez les autres ( $p = 0,51$ ).

En revanche, on mettait en évidence une différence significative du niveau de méthylation chez les patients porteurs de séquelles ischémiques corticales : ceux ci présentaient une hypométhylation globale, mesurée à 73,1 %, contre 76,3 % chez les patients sans séquelle ischémique ( $p = 0,009$ ).

Enfin, il semblait exister une corrélation négative faible entre la méthylation et la charge minérale des noyaux gris centraux.

En effet, le coefficient de Pearson était calculé à  $-0,24$  pour la charge minérale du noyau caudé droit, à  $-0,25$  pour celles du putamen, du pallidum et du thalamus droits, à  $-0,26$  pour celles du noyau caudé, du pallidum et du putamen gauche, et a  $-0,24$  pour celle du thalamus gauche.

L'analyse multivariée renforçait ces premiers résultats. Ses résultats sont présentés dans le **tableau 4**.

Elle consistait en l'analyse de la corrélation entre charge minérale du putamen gauche et degré de méthylation, en prenant également en compte la présence de séquelles ischémiques corticales.

Chez les patients porteurs de séquelles ischémiques corticales, la baisse de la méthylation avec l'augmentation de la charge minérale était statistiquement significative ( $p = 0,007, <0,05$ ).

<b>Tableau 3</b>			
<b>Facteurs de risque</b>			
<b>Méthylation (% ± ET)</b>			
<b>1- Qualitatifs</b>	Présence	Absence	p
Score d'atrophie >1	75,73 (± 4,39)	75,89 (± 3,83)	0.849
Score de Fazekas SB profonde >1	75,42 (± 4,23)	76,33 (± 3,91)	0.280
Score de Fazekas périventriculaire >1	75,44 (± 4,37)	76,00 (± 3,99)	0.547
Microbleeds > 0	76,91 (± 4,70)	75,58 (± 4,08)	0.289
Lacunes > 0	75,40 (± 5,00)	76,03 (± 3,73)	0.510
Séquelle > 0	73,13 (± 3,62)	76,29 (± 3,99)	0.009
<b>Corrélation</b>			
<b>2 - Quantitatifs</b>	Coefficient de Pearson	Sig	
Index d'Evans	- 0,098	0,341	
Charge minérale du noyau caudé droit	- 0,241	0,017	
Charge minérale du putamen droit	- 0,248	0,014	
Charge minérale du pallidum droit	- 0,248	0,014	
Charge minérale du thalamus droit	- 0,247	0,015	
Charge minérale du noyau caudé gauche	- 0,256	0,011	
Charge minérale du putamen gauche	- 0,262	0,01	
Charge minérale du pallidum gauche	- 0,262	0,01	
Charge minérale du thalamus gauche	- 0,243	0,016	
Volume de leucopathie	0,003	0,974	

<b>Tableau 4</b>		<b>Analyse multivariée</b>	
	<b>B</b>	<b>Intervalle de confiance de B</b>	<b>p</b>
Constante (méthylation), %	77,28	76,12 ; 78,40	0
Charge minérale du putamen gauche	- 0,002	-0,004 ; - 0,001	0,007
Séquelle ischémique corticale	- 3,11	- 5,371 ; - 0,848	0,008

## 2 ) Potentiels facteurs de confusion

Ces critères secondaires portaient sur l'analyse d'association entre l'état de méthylation et certaines caractéristiques extra-radiologiques du patient, recueillies au moment de l'inclusion dans l'étude.

Celles-ci pouvaient en effet représenter de potentiels facteurs de confusion.

Leur analyse est présentée dans le **Tableau 5**.

Ainsi le degré de méthylation ne variait pas significativement en fonction du sexe (75,8 % chez les hommes comme chez les femmes,  $p = 0,96$ ).

Il n'était pas modifié chez les patients aux antécédents de chirurgie cardiaque (75,7 % vs 75,9 % chez les patients sans antécédent,  $p = 0,85$ ).

La méthylation n'était pas non plus significativement associée aux pathologies ou comorbidités étudiées : fibrillation atriale (74,8 % vs. 76,3 % chez les patients indemnes,  $p=0,09$ ) ; bronchopneumopathie chronique obstructive (76,4 % vs 75,7 %,  $p=0,55$ ) ; artériopathie oblitérante des membres inférieurs (74,4 % vs 76 %,  $p=0,25$ ) ; coronaropathie (75,7 % vs. 76 %,  $p=0,72$ ) ; hypertension artérielle (76,2 % vs 75,1%,  $p=0,27$ ) ; insuffisance cardiaque (74,8 % vs 76,4 %,  $p=0,08$ ) ; diabète (75,1 % vs 76,1 %) ; insuffisance rénale (75,7 % vs 75,9 %,  $p=0,76$ ).

Concernant les données quantitatives, on ne mettait pas en évidence de corrélation entre degré de méthylation et l'âge des patients ( $r=0,1$ ) ni entre la méthylation et l'indice de masse corporelle ( $r=0,22$ ).

De même, on n'observait pas de modification des scores de risque chirurgicaux (Euroscore et STS score) avec la variation du niveau de méthylation ( $r$  respectivement de 0,143 et 0,023) ; le même constat était retrouvé pour le risque constant d'AVC ( $r$  de -0,077).

<b>Tableau 5</b>			
<b>Facteurs de confusion</b>			
	<b>Methylation (% ± ET)</b>		
<b>1 - Qualitatifs</b>	<i>Présence</i>	<i>Absence</i>	<i>p</i>
Sexe Masculin	75,84 (± 3,95)	75,80 (± 4,21)	0.964
FA	74,81 (± 4,01)	76,33 (± 4,10)	0.094
BPCO	76,42 (± 4,20)	75,73 (± 4,11)	0.545
AOMI	74,43 (± 6,32)	76,02 (± 3,79)	0.249
Coronaropathie	75,67 (± 3,88)	75,98 (± 4,31)	0.716
ATCD Chirurgie cardiaque	75,67 (± 2,97)	75,88 (± 4,31)	0.850
Insuffisance cardiaque	74,77 (± 3,57)	76,35 (± 4,27)	0.081
HTA	76,16 (± 3,96)	75,14 (± 4,43)	0.266
Diabète	75,12 (± 3,52)	76,14 (± 4,31)	0.288
Insuffisance Rénale	75,65 (± 3,88)	75,93 (± 4,23)	0.763
<b>Corrélation</b>			
<b>2 - Quantitatifs</b>	Coefficient de Pearson	Sig	
Age	0,1	0,911	
IMC	0,22	0,835	
Euroscore	0,143	0,169	
STS score	0,023	0,827	
Permanent stroke risk	- 0,77	0,466	

## DISCUSSION

Cette étude visait à étudier les liens entre marqueurs de vieillissement cérébral et méthylation du génome.

Parmi les marqueurs choisis, deux présentaient lors de l'analyse un lien statistiquement significatif avec une modification du degré de méthylation.

En premier lieu, les patients porteurs d'une séquelle ischémique corticale présentaient un niveau de méthylation significativement plus bas que les patients indemnes.

En second lieu, il existait une corrélation négative faible entre variation de méthylation et variation de la charge minérale des noyaux gris centraux.

Le premier résultat était intéressant car il concordait avec les données de la littérature, et notamment deux études (Baccarelli et al., Lin et al) qui trouvaient dans un cas une association entre baisse de la méthylation et augmentation de la prévalence d'événements ischémiques, dans l'autre cas une diminution de la méthylation globale de l'ADN chez les patients ayant des antécédents d'accidents ischémiques cérébraux ; ces deux études avaient fait intervenir un dosage du degré de méthylation en utilisant LINE-1, comme notre étude.

Pour expliquer cela, les auteurs proposaient que la baisse de la méthylation favorisait des mutations ou l'expression anormale de certains gènes, de la baisse de la méthylation. Ainsi, cela se traduirait par un remplacement accéléré de l'endothélium vasculaire par des tissus fibro-inflammatoires, propices au développement d'une athérosclérose. A noter cependant que la corrélation de la méthylation des tissus sanguins, et des tissus vasculaires n'est pas certaine et établie.

Un intérêt clinique de cette observation tient au caractère réversible des modifications épigénétiques, qui pourrait ouvrir de nouvelles opportunités dans la prise en charge pharmacologique ou environnementale des pathologies vasculaires, afin de prévenir la survenue d'événements ischémiques, notamment cérébraux.

La corrélation négative faible entre surcharge minérale des noyaux gris centraux et degré de méthylation était également intéressante.

Le vieillissement était en effet corrélé à l'augmentation de la charge minérale des noyaux gris centraux, tout comme il l'était avec la baisse du degré de méthylation globale.

Il existait toutefois d'autres causes d'accumulation minérale.

Par exemple le mésusage de l'alcool pouvait également être à l'origine d'une surcharge minérale hépatique et cérébrale : via la baisse de l'expression de l'hepcidine, l'hormone régulatrice de l'homéostasie du fer ; et via une absorption digestive augmentée (**83, 84 , 85**). La baisse de la concentration en vitamine B1 diminuerait également l'étanchéité de la barrière hémato encéphalique (**86**).

Un autre exemple était l'obésité. Une étude de 2014 montrait une augmentation de la charge minérale cérébrale (noyaux gris centraux et hippocampe) chez des patients obèses ou porteurs d'une insulino-résistance (87).

Ces deux éléments étaient de potentiels facteurs de confusion, même si on ne retrouvait dans nos analyses secondaires pas de corrélation entre le degré de méthylation et l'IMC.

Enfin, l'accumulation minérale cérébrale pouvait être d'origine génétique, s'inscrivant quand elle se traduisait cliniquement par une altération cognitives dans le cadre des NBIA (Neurodegeneration with Brain Iron Accumulation). Ces patients présentaient un tableau démentiel atypique précoce, avec en IRM une surcharge minérale des noyaux gris centraux.

De nombreuses mutations ont été décrites, les plus fréquentes étant la mutation de PANK2 (à l'origine de la *neurodégénérescence associée à la pantothenate – kinase*, « **PKAN** ») et la mutation de PLA2G6 (à l'origine de la *neurodégénérescence associée à la phospholipase A2*, « **PLAN** »).

Tous ces éléments faisaient qu'il était difficile de faire la part des choses concernant le lien entre le degré de méthylation et la charge minérale cérébrale.

Le niveau de méthylation participait-il à la régulation de l'expression des protéines responsables de l'homéostasie du fer ? Ou bien les deux étaient-ils les reflets de phénomènes pathologiques ou environnementaux sous-jacents ?

En revanche, certains autres de nos résultats étaient peu contributifs.

L'absence de corrélation entre âge et méthylation allait à l'encontre des données de la littérature ; elle pourrait s'expliquer par l'âge avancé de tous nos patients (âge moyen de 81,6 ans), entraînant une forte variation interindividuelle des degrés de méthylation. Il n'y avait probablement pas de patients inclus assez jeunes pour mettre en évidence la décroissance au long cours du pourcentage global de méthylation.

De même, l'absence d'association significative entre lacune ischémique et baisse de la méthylation était surprenante. Ces patients présentaient une discrète tendance à l'hypométhylation (0,4 point de pourcentage en moins), mais beaucoup moins marquée que pour les patients porteurs de séquelle ischémiques corticale (plus de 3 points de pourcentage en moins).

Cela pouvait suggérer une différence physiopathologique entre les mécanismes lésionnels à l'origine des accidents ischémiques profonds et corticaux.

Cette étude présentait plusieurs forces.

Tout d'abord son échantillon relativement vaste d'une centaine de personnes, permettant aux analyses en sous-groupe d'être pertinentes.

L'interprétation des IRM avait été faite en aveugle vis à vis du niveau de méthylation, par deux radiologues différents (un neuroradiologue senior et un junior).

Mais certaines faiblesses apparaissaient également.

La principale concernait la population de l'étude, par définition âgées et cardiopathies (les patients recrutés allaient tous bénéficier d'une procédure de remplacement valvulaire aortique dans le cadre d'un RAO), et donc éloignée dans ses caractéristiques de la population générale.

Ensuite la durée d'inclusion qui s'étalait entre 2012 et 2019, avec parfois des variations dans les paramètres des séquences IRM réalisées, à l'origine de potentiels biais de mesure.

## **CONCLUSION**

Notre étude menée sur une cohorte de patients à haut risque cardiovasculaire confirme l'association entre pathologie ischémique cérébrale et hypométhylation.

Elle ouvre des perspectives de recherche quant au rôle de la méthylation dans l'homéostasie du fer intracérébral et son implication dans le vieillissement cérébral.

## Références bibliographiques

1 - LD Moore et al. *DNA methylation and its basic function*, Neuropsychopharmacology 2013

2 - Avery OT, Macleod CM, McCarty M. *Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type lii*. J Exp Med 1944

3 - Holliday R, Pugh JE. *DNA modification mechanisms and gene activity during development*. Science 1975

4 - Compere SJ, Palmiter RD. *DNA methylation controls the inducibility of the mouse metallothionein-I gene lymphoid cells*. Cell 1981

5 - Verkerk AJ, Pieretti M, Sutcliffe JS, Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A et al. *Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome*. Cell

6 - Turner G, Webb T, Wake S, Robinson H. *Prevalence of fragile X syndrome*. Am J Med Genet 1996

7 - Kraan CM, Godler DE, Amor DJ. *Epigenetics of fragile X syndrome and fragile X-related disorders*. Dev Med Child Neurol. 2019

8 - Bienvenu T, Chelly J. *Molecular genetics of Rett syndrome: when DNA methylation goes unrecognized*. Nat Rev Genet. 2006

9 - Meehan RR, Lewis JD, McKay S, Kleiner EL, Bird AP. *Identification of a mammalian protein that binds specifically to DNA containing methylated CpGs*. Cell 1989

10 - Lewis JD, Meehan RR, Henzel WJ, Maurer-Fogy I, Jeppesen P, Klein F et al. *Purification, sequence, and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to methylated DNA*. Cell 1992

11 - Jung M, Pfeifer GP. *Aging and DNA methylation*. BMC Biol. 2015

12 - Jung SE, Shin KJ, Lee HY. *DNA methylation-based age prediction from various tissues and body fluids*. BMB Rep. 2017

13 - Jones MJ, Goodman SJ, Kobor MS. *DNA methylation and healthy human aging*. Aging Cell.

- 14 - Shenker NS, et al. *DNA methylation as a long-term biomarker of exposure to tobacco smoke*. Epidemiology. 2013
- 15 - Vaillancourt K, Ernst C, Mash D, Turecki G. *DNA Methylation Dynamics and Cocaine in the Brain: Progress and Prospects*. Genes. 2017
- 16 - Zhao et al. *Brain imaging-guided analysis reveals DNA methylation profiles correlated with insular surface area and alcohol use disorder*. Alcohol Clin Exp Res. 2019
- 17 - Philibert RA, Plume JM, Gibbons FX, Brody GH, Beach SR. *The impact of recent alcohol use on genome wide DNA methylation signatures*. Front Genet.
- 18 - J. Wigglesworth et al. *Brain-derived neurotrophic factor DNA methylation mediates the association between neighborhood disadvantage and adolescent brain structure*. Psychiatry Research: Neuroimaging 2019
- 19 - Cao-Lei L, et al. *DNA methylation signatures triggered by prenatal maternal stress exposure to a natural disaster: Project Ice Storm*. PLoSOne 2014
- 20 - De Nys S, Duca RC, Nawrot T, Hoet P, Van Meerbeek B, Van Landuyt KL, Godderis L. *Temporal variability of global DNA methylation and hydroxymethylation in buccal cells of healthy adults: Association with air pollution*. Environ Int. 2018
- 21 - Commodore A, Mukherjee N, Chung D, Svendsen E, Vena J, Pearce J, Roberts J, Arshad SH, Karmaus W. *Frequency of heavy vehicle traffic and association with DNA methylation at age 18 years in a subset of the Isle of Wight birth cohort*. Environ Epigenet. 2018
- 22 - Minyan Zeng, Juanying Zhen, Xiaodan Zheng, Hongyan Qiu, Xiaonan Xu, Jun Wu, Zhijian Lin and Jun Hu, *The Role of DNA Methylation in Ischemic Stroke: A Systematic Review*. Frontiers in Neurology. 2020
- 23 - Lin RT, Hsi E, Lin HF, Liao YC, Wang YS, Juo SH. *LINE-1 methylation is associated with an increased risk of ischemic stroke in men*. Curr Neurovasc Res. 2014
- 24 - Baccarelli A, Wright R, Bollati V, Litonjua A, Zanobetti A, Tarantini L, et al. *Ischemic heart disease and stroke in relation to blood DNA methylation*. Epidemiology. 2010
- 25 - Iridoy Zulet M, Pulido Fontes L, Ayuso Blanco T, Lacruz Bescos F, Mendioroz Iriarte M. *Epigenetic changes in neurology: DNA methylation in multiple sclerosis*. Neurologia. 2017

- 26 - C. Kumagai, B. Kalman, F.A. Middleton, T. Vyshkina, P.T. Massa. *Increased promoter methylation of the immune regulatory gene SHP-1 in leukocytes of multiple sclerosis subjects*. J Neuroimmunol, 2012
- 27 - F.G. Mastronardi, A. Noor, D.D. Wood, T. Paton, M.A. Moscarello. *Peptidyl argininedeiminase 2 CpG island in multiple sclerosis white matter is hypomethylated*. J Neurosci Res, 2007
- 28 - Mastroeni D, Grover A, Delvaux E et al. *Epigenetic changes in Alzheimer's disease: decrements in DNA methylation*. Neurobiol Aging 2010
- 29 - Qazi, Talal Jamil; Quan, Zhenzhen; Mir, Asif; Qing, Hong. *Epigenetics in Alzheimer's Disease: Perspective of DNA Methylation*. Molecular Neurobiology 2017
- 30 - Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ et al. *Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families*. Science 1993
- 31 - Tulloch J, Leong L, Chen S, Keene CD, Millard SP, Shutes-David A, Lopez OL, Kofler J, Kaye JA, Woltjer R, Nelson PT, Neltner JH, Jicha GA, Galasko D, Masliah E, Leverenz JB, Yu CE, Tsuang D. *APOE DNA methylation is altered in Lewy body dementia*. Alzheimers Dement. 2018
- 32 - A.R. Smith et al. *A cross-brain regions study of ANK1 DNA methylation in different neurodegenerative diseases*, Neurobiology of Aging 2019
- 33 - Liu C, Jiao C, Wang K, Yuan N. *DNA Methylation and Psychiatric Disorders*. Prog Mol Biol Transl Sci. 2018.
- 34 - Murphy TM, et al. *Anxiety is associated with higher levels of global DNA methylation and altered expression of epigenetic and interleukin-6 genes*. Psychiatr Genet. 2015
- 35 - Bönsch D, et al. *Methylation matters ? Decreased methylation status of genomic DNA in the blood of schizophrenic twins*. PsychiatryRes. 2012
- 36 - Melas PA, et al. *Epigenetic aberrations in leukocytes of patients with schizophrenia: association of global DNA methylation with antipsychotic drug treatment and disease onset*. FASEB J. 2012
- 37 - Shimabukuro M, et al. *Global hypomethylation of peripheral leukocyte DNA in male patients with schizophrenia: a potential link between epigenetics and schizophrenia*. J Psychiatr Res
- 38 - Huzayyin AA, et al. *Decreased global methylation in patients with bipolar disorder who respond to lithium*. IntJNeuropsychopharmacol. 2014
- 39 - Chiarella J et al. *DNA methylation differences in stress-related genes, functional connectivity and gray matter volume in depressed and healthy adolescents*. J Affect Disord. 2020

- 40 - Tseng PT, et al. *Age-associated decrease in global DNA methylation in patients with major depression*. *NeuropsychiatrDisTreat*. 2014
- 41 - Tremolizzo L, et al. *Decreased whole-blood global DNA methylation is related to serum hormones in anorexia nervosa adolescents*. *World J Biol Psychiatry*. 2014
- 42 - Xiao Y, et al. *The DNA methylome and transcriptome of different brain regions in schizophrenia and bipolar disorder*. *PLoSOne*. 2014
- 43 - Kordi-Tamandani DM, Sahranavard R, Torkamanzahi A. *Analysis of association between dopamine receptor genes' methylation and their expression profile with the risk of schizophrenia*. *PsychiatrGenet*. 2013
- 44 - Kulis M, Esteller M. *DNA methylation and cancer*. *Adv Genet*. 2010
- 45 - Koch A, Jet al. *Analysis of DNA methylation in cancer: location revisited*. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018
- 46 - Sharma P, Kumar J, Garg G, Kumar A, Patowary A, Karthikeyan G, et al. *Detection of altered global DNA methylation in coronary artery disease patients*. *DNA Cell Biol*. 2008
- 47 - Zhang YP, Huang YT, Huang TS, Pang W, Zhu JJ, Liu YF, Tang RZ, Zhao CR, Yao WJ, Li YS, Chien S, Zhou. *The Mammalian Target of Rapamycin and DNA methyltransferase 1 axis mediates vascular endothelial dysfunction in response to disturbed flow*. *J Sci Rep*. 2017
- 48 - Chabriat H, Jouvent E. *Imaging of the aging brain and development of MRI signal abnormalities*. *Rev Neurol*. 2020
- 49 - Greenberg SM, Eng JA, Ning M, Smith EE, Rosand J. *Hemorrhage burden predicts recurrent intracerebral hemorrhage after lobar hemorrhage*. *Stroke* 2004
- 50 - Cordonnier, Salman, Wardlaw, *Spontaneous brain microbleeds: systematic review, subgroup analyses and standards for study design and reporting*, *Brain*, 2007
- 51 - Charidimou A, Imaizumi T, Moulin S, Biffi A, Samarasekera N, Yakushiji Y, et al. *Brain hemorrhage recurrence, small vessel disease type, and cerebral microbleeds: a metaanalysis*. *Neurology* 2017
- 52 - Peters R. *Ageing and the brain* *Postgraduate Medical Journal* 2006
- 53 - Jouvent E, Viswanathan A, Mangin JF, O'Sullivan M, Guichard JP, Gschwendtner A, et al. *Brain atrophy is related to lacunar lesions and tissue microstructural changes in CADASIL*. *Stroke* 2007
- 54 - Jokinen H, Lipsanen J, Schmidt R, Fazekas F, Gouw AA, van der Flier WM, et al. *Brain atrophy accelerates cognitive decline in cerebral small vessel disease: the LADIS study*. *Neurology* 2012

- 55 - Kuller, Arnold, Longstreth, Manolio, O'Leary, Burke, Fried, Newman. *White matter grade and ventricular volume on brain MRI as markers of longevity in the cardiovascular health study*. Neurobiology of Aging,
- 56 - Duchesnay E, Hadj Selem F, De Guio F, Dubois M, Mangin JF, Duering M, et al. *Different types of white matter hyperintensities in CADASIL*. Front Neurol 2018;9:526.
- 57 - De Guio F, Vignaud A, Chabriat H, Jouvent E. *Different types of white matter hyperintensities in CADASIL: insights from 7- Tesla MRI*. J Cereb Blood Flow Metab 2017
- 58 - Jouvent E, Reyes S, De Guio F, Chabriat H. *Reaction time is a marker of early cognitive and behavioral alterations in pure cerebral small vessel disease*. J Alzheimers Dis
- 59 - Jokinen H, Kalska H, Ylikoski R, Madureira S, Verdelho A, van der Flier WM, et al. *Longitudinal cognitive decline in subcortical ischemic vascular disease – the LADIS Study*. Cerebrovasc Dis 2009
- 60 - Blahak C, Baezner H, Pantoni L, Poggesi A, Chabriat H, Erkinjuntti T, et al. *Deep frontal and periventricular age related white matter changes but not basal ganglia and infratentorial hyperintensities are associated with falls: cross sectional results from the LADIS study*. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2009
- 61 - Baezner H, Blahak C, Poggesi A, Pantoni L, Inzitari D, Chabriat H, et al. *Association of gait and balance disorders with age-related white matter changes: the LADIS study*. Neurology 2008;
- 62 - Benisty S, Reyes S, Godin O, Herve D, Zieren N, Jouvent E, et al. *White-matter lesions without lacunar infarcts in CADASIL*. J Alzheimers Dis 2012
- 63 - Ward RJ, Zucca FA, Duyn JH, Crichton RR, Zecca L. *The role of iron in brain ageing and neurodegenerative disorders*. Lancet Neurol. 2014
- 64 - Aquino et al, *Age-related Iron Deposition in Basal Ganglia*, Neuroradiology, 2009
- 65- Roberts BR, Ryan TM, Bush AI, Masters CL, Duce JA. *The role of metallobiology and amyloid- $\beta$  peptides in Alzheimer's disease*. J Neurochem. 2012
- 66 - Dexter DT, Wells FR, Agid F, et al. *Increased nigral iron content in postmortem parkinsonian brain*. Lancet. 1987
- 67 - Dexter DT, Wells FR, Lees AJ, et al. *Increased nigral iron content and alterations in other metal ions occurring in brain in Parkinson's disease*. J Neurochem. 1989
- 68 - Riederer P, Sofic E, Rausch WD, et al. *Transition metals, ferritin, glutathione, and ascorbic acid in parkinsonian brains*. J Neurochem. 1989
- 69 - Hirsch EC, Brandel JP, Galle P, Javoy-Agid F, Agid Y. *Iron and aluminum increase in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease: an X-ray microanalysis*. J Neurochem. 1991

- 70 - Waldvogel D, van Gelderen P, Hallett M. *Increased iron in the dentate nucleus of patients with Friedrich's ataxia*. Ann Neurol. 1999
- 71 - Longstreth WT, Dulberg C, Manolio TA, Lewis MR, Beauchamp NJ, O'Leary D, et al. *Incidence, manifestations, and predictors of brain infarcts defined by serial cranial magnetic resonance imaging in the elderly the cardiovascular health study*. Stroke 2002
- 72 - Black SE. *Vascular cognitive impairment: epidemiology, subtypes, diagnosis and management*. J R Coll Physicians Edinb 2011
- 73 - Folsom AR, Yatsuya H, Mosley Jr TH, Psaty BM, Longstreth WT. *Risk of intraparenchymal hemorrhage with magnetic resonance imaging-defined leukoaraiosis and brain infarcts*. Ann Neurol 2012
- 74 - Vermeer SE, Prins ND, den Heijer T, Hofman A, Koudstaal PJ, Breteler MM. *Silent brain infarcts and the risk of dementia and cognitive decline*. N Engl J Med 2003
- 75 - Benisty S, Gouw AA, Porcher R, Madureira S, Hernandez K, Poggesi A, et al. *Location of lacunar infarcts correlates with cognition in a sample of non-disabled subjects with age-related white-matter changes: the LADIS study*. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2009
- 76 - Kaffashian S, Soumare A, Zhu YC, Mazoyer B, Debette S, Tzourio C. *Long-term clinical impact of vascular brain lesions on magnetic resonance imaging in older adults in the population*. Stroke 2016
- 77 - Weisenberger DJ, Campan M, Long TI, Kim M, Woods C, Fiala E, et al. *Analysis of repetitive element DNA methylation by MethyLight*. Nucleic Acids Res. 2005
- 78 - Zawadki et al. *Tissue Factor Pathway Inhibitor-2 gene methylation is associated with low expression in carotid atherosclerotic plaques*. Atherosclerosis 204. 2009
- 79 - Cordonnier, Potter, Jackson, Doubal, Keir, Sudlow, Wardlaw, Salman. *Improving Interrater Agreement About Brain Microbleeds Development of the Brain Observer MicroBleed Scale (BOMBS)*. Stroke , 2009
- 80 - Pasquier, Leys, Weerts, Mourner-Vehier, Barkhof, Scheltens(1996). *Inter-and Intraobserver Reproducibility of Cerebral Atrophy Assessment on MRI Scans with Hemispheric Infarcts*. European Neurology 1996
- 81 - van Etten, van der Grond, Dumas, van den Bogaard, van Buchem, Wermer. (2015). *MRI Susceptibility Changes Suggestive of Iron Deposition in the Thalamus after Ischemic Stroke*. Cerebrovascular Diseases,
- 82 - Wardlaw , Smith EE, Biessels GJ, Cordonnier C, Fazekas F, et al *Standards for Reporting Vascular changes on neuroimaging (STRIVE v1)*. Neuroimaging standards for research into small vessel disease and its contribution to ageing and neurodegeneration. Lancet Neurol. 2013

- 83 - Whitfield JB, Zhu G, Heath AC, Powell LW, Martin NG. *Effects of alcohol consumption on indices of iron stores and of iron stores on alcohol intake markers*. Alcohol Clin Exp Res. 2001
- 84 - Grochowski C, Blicharska E, Baj J, et al. *Serum iron, magnesium, copper, and manganese levels in alcoholism: a systematic review*. Molecules. 2019;
- 85 - Duane P, Raja KB, Simpson RJ, Peters TJ. *Intestinal iron absorption in chronic alcoholics*. Alcohol Alcohol. 1992
- 86 - Listabarth S, König D, Vyssoki B, Hametner S. *Does thiamine protect the brain from iron overload and alcohol-related dementia ?*. Alzheimers Dement. 2020
- 87 - Blasco G, Puig J, Daunis-I-Estadella J, Molina X, Xifra G, Fernández-Aranda F, Pedraza S, Ricart W, Portero-Otín M, Fernández-Real JM. *Brain iron overload, insulin resistance, and cognitive performance in obese subjects: a preliminary MRI case-control study*. Diabetes Care. 2014

**AUTEUR : Lecourt**

**Thomas**

**Date de soutenance : 19 octobre 2021**

**Titre de la thèse : Étude des liens entre méthylation globale de l'ADN et marqueurs de vieillissement cérébral en IRM.**

**Thèse - Médecine - Lille 2021**

**Cadre de classement : DES de Radiologie et d'Imagerie Médicale**

**Mots-clés : IRM, Méthylation, Vieillissement cérébral**

**Introduction :** La méthylation de l'ADN est un procédé chimique réversible consistant en l'adjonction d'un groupement méthyl sur un nucléotide, influant ensuite la transcription et l'expression du gène concerné : c'est le phénomène de l'épigénétique.

Plusieurs études ont montré une diminution du degré de méthylation global avec le vieillissement (« epigenetic drift »). Parallèlement le vieillissement d'un individu se traduit en IRM cérébrale par une série de modifications : atrophie, leucopathie, microbleed, accumulation minérale des noyaux gris centraux. L'objectif principal de l'étude est d'étudier le lien entre d'une part degré de méthylation, et d'autre part anomalies cérébrales dégénératives, afin de déterminer quelles seraient les plus pertinentes.

**Matériel et Méthode :** Il s'agit d'une étude monocentrique incluant rétrospectivement des patients ayant été pris en charge pour un remplacement valvulaire aortique percutané (TAVI). Ces patients ont bénéficié d'IRM péri procédurales (appareil Siemens 1,5 T), avec des séquences diffusion, FLAIR et T2\*, ainsi que d'un dosage du niveau de méthylation global de l'ADN à partir de leucocytes périphériques sur des échantillons sanguins.

Le niveau de méthylation était ensuite comparé en fonction de la présence, l'absence ou l'intensité des marqueurs de vieillissement cérébral pré-établis.

Des analyses secondaires concernant des données cliniques pouvant être à l'origine de facteurs de confusion ont également été réalisées.

**Résultats :** Parmi les 97 patients inclus, le niveau de méthylation global était de 75,8 %. Il n'était pas modifié en présence de microbleed, d'une atrophie ou d'une leucopathie marquée, ni de lacunes. En revanche, il était significativement plus bas chez les patients présentant une séquelle ischémique corticale (73,13 % contre 76,29%). De plus, il existait une corrélation inverse faible avec la charge minérale des noyaux gris centraux : plus celle-ci augmentait, plus le niveau de méthylation diminuait (coefficient de Pearson de - 0,256 pour le putamen gauche par exemple).

**Conclusion :** Notre étude menée sur une cohorte de patients à haut risque cardiovasculaire confirme l'association entre pathologie ischémique cérébrale et hypométhylation.

Elle ouvre des perspectives de recherche quant au rôle de la méthylation du fer dans l'homéostasie du fer intracérébral et son implication dans le vieillissement cérébral.

**Composition du Jury :**

**Président :** Monsieur le Professeur Jean-Pierre PRUVO

**Assesseurs:** Monsieur le Professeur François PONTANA  
Monsieur le Docteur Nicolas DEBRY

**Directeur de thèse :** Monsieur le Docteur Grégory KUCHCINSKI

**Contact de l'auteur :**