



**HAL**  
open science

**Effet du sexe sur les mécanismes induits par une  
microhémorragie cérébrale et leurs conséquences  
cognitives dans un modèle murin et évaluation d'un  
traitement par atorvastatine**

Romain Barus

► **To cite this version:**

Romain Barus. Effet du sexe sur les mécanismes induits par une microhémorragie cérébrale et leurs conséquences cognitives dans un modèle murin et évaluation d'un traitement par atorvastatine. Médecine humaine et pathologie. Université de Lille, 2020. Français. NNT : 2020LILUS025 . tel-03244943

**HAL Id: tel-03244943**

**<https://theses.hal.science/tel-03244943>**

Submitted on 1 Jun 2021

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

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



**UNIVERSITE DE LILLE - DROIT ET SANTE**  
**ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTE**

Année : 2020

**THESE**  
**Présentée pour l'obtention du grade de**  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE**

**Spécialité : Pharmacologie**

**Effet du sexe sur les mécanismes induits par une microhémorragie cérébrale  
et leurs conséquences cognitives dans un modèle murin et évaluation d'un  
traitement par atorvastatine**

Soutenue publiquement le 29 octobre 2020

**Par Romain BARUS**

---

**JURY**

**Examineurs :**

**Madame le Professeur Nathalie KUBIS – Université de Paris**

**Monsieur le Professeur Luc ZIMMER – Université de Lyon I**

**Rapporteurs :**

**Monsieur le Professeur Yannick BEJOT – Université de Bourgogne**

**Madame le Professeur Isabelle MARGAILL – Université de Paris**

**Directeur de Thèse :**

**Madame le Docteur Sophie GAUTIER – Université de Lille**

---



Thèse réalisée au sein du laboratoire de recherche Inserm U1172 « Lille Neurosciences et Cognition » dans l'équipe du professeur Bordet « Troubles cognitifs dégénératifs et vasculaires »



## **Remerciements**

### **Monsieur le Professeur Yannick Béjot,**

Pour avoir accepté d'être rapporteur de ce travail, pour vos conseils avisés lors des comités de suivi individuel ainsi que pour l'intérêt que vous portez à cette thèse depuis ses débuts, je vous remercie et vous témoigne ma reconnaissance.

### **Madame le Professeur Isabelle Margail,**

Je tiens à vous exprimer mes sincères remerciements pour votre participation à ce jury de thèse en tant que rapporteur, ainsi que pour vos observations pertinentes durant les comités de suivi individuel et les journées de la société du cerveau et des maladies cérébrovasculaires auxquelles j'avais présenté une partie de ces travaux.

### **Madame le Professeur Nathalie Kubis,**

Vous me faites l'honneur d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse en examinant et jugeant ce travail. Soyez assurée de ma reconnaissance et de mes sincères remerciements.

### **Monsieur le Professeur Luc Zimmer,**

Pour votre participation à ce jury de thèse en tant qu'examineur et votre intérêt pour ce travail, je vous remercie grandement. Je garde également un excellent souvenir de notre collaboration durant les disputations de pharmacologie.

### **Madame le Docteur Sophie Gautier,**

Je te remercie d'avoir dirigé ce travail, après avoir déjà passé deux ans à encadrer mon mémoire de master et ma thèse de pharmacie. Tes conseils avisés, ton esprit de synthèse et ta grande capacité d'analyse ont été des éléments indispensables pour mener à bien ce projet de 3 ans.

## **Je tiens également à remercier,**

Le Professeur Régis Bordet, pour sa disponibilité, son écoute et sa capacité à nous faire saisir de nouvelles opportunités. Je tiens également à vous adresser toute ma reconnaissance pour votre bienveillance, pour votre confiance et vos conseils avisés.

Sandrine et Yaohua, qui m'ont si bien accueilli lors de mon master et m'ont motivé à poursuivre sur une thèse. Merci d'avoir contribué à ma formation durant ces 4 dernières années.

Tous mes collègues du laboratoire et des plateformes techniques qui ont su créer un environnement de travail chaleureux et convivial. Je tiens plus particulièrement à remercier mes collègues également en thèse aujourd'hui devenus des amis (Laura, Laurent et Hind).

Tous mes amis sans qui la vie serait moins belle : Anthony, Louis, Florent D, Manon, Anne-Sophie, Raphaël, Charlotte, Léa, Thomas, Mr Théo, Florent L, Erwan, Guillaume et Mathieu. Depuis les bancs de la fac jusqu'à ce jour ; entre deux bouquins de révisions ou deux séances de sport ; du travail aux vacances ; du Portugal au Vietnam ; de Toulouse à Lille ; de Lille à Calais ; je réalise la chance que j'ai d'être bien entouré.

Ma belle-famille, pour leur soutien, Hélène, André, Claire et Ivica.

Mes grands-parents et ma mamie, merci pour tout ce que vous m'avez transmis.

Ma mère, pour ton amour, ton soutien inconditionnel. Merci d'être là pour moi.

Mes frères, pour leurs encouragements et leurs présences. Matthias, si j'ai réalisé cette thèse c'est aussi grâce à toi, premier docteur de la famille. Pierrick, futur maître, continue de nous épater.

Judith, ma compagne de tous les jours et de toujours. Merci de m'avoir soutenu durant ces trois années de thèse. Je suis heureux et comblé de partager ta vie et de devenir parent à tes côtés.

Mon fils, à l'instant où j'écris ces mots tu es encore dans le ventre de ta mère. Je n'ai qu'une hâte, celle de te rencontrer.

Mon père, je sais que tu aurais été fier de ce travail.



## **Résumé**

Les microhémorragies cérébrales (MHC), petites lésions dont la prévalence augmente avec l'âge sont associées à un risque augmenté de troubles cognitifs. Les mécanismes par lesquels les MHC pourraient altérer les fonctions cognitives ainsi que l'effet du sexe sur les MHC ne sont pas bien élucidés. Le premier objectif de ce travail de thèse était d'étudier les mécanismes mis en place après la formation d'une MHC corticale, chez des souris mâles et femelles. Le deuxième objectif était de déterminer les effets de l'atorvastatine, médicament connu pour ses effets pléiotropes, sur la cognition et sur les mécanismes induits par la MHC. Six semaines après la formation d'une MHC induite par injection stéréotaxique de collagénase dans le cortex de souris C57BL/6J, des effets différents en fonction du sexe d'ordre cellulaire, protéique, génomique et métabolique étaient observés dans le cortex et l'hippocampe des souris mâles et femelles, conduisant à l'hypothèse d'une altération des réseaux cortico-hippocampiques, à l'origine de troubles de la cognition chez les mâles. L'atorvastatine corrigeait les modifications induites par la MHC en fonction du sexe et améliorait les troubles de la cognition chez les mâles. Au total, cette étude a montré, à partir d'un travail précis portant sur l'impact cognitif d'une MHC, que la prise en compte du sexe dans un protocole préclinique s'avère indispensable pour mieux élucider les mécanismes physiopathologiques de la maladie modélisée dans le but de développer des traitements les plus adaptés possibles.

**Mots clés : microhémorragie cérébrale, cognition, sexe, pharmacomodulation, atorvastatine, souris**

## **Abstract**

Cerebral microhemorrhages (CMH) are small lesions whose prevalence increases with age. CMH are associated with a risk of cognitive impairment. The mechanisms by which CMH impair cognitive function and an eventual sex effect on CMH remain under-explored. The first goal of this work was to characterize the mechanisms induced by a cortical CMH, in male and female mice. The second objective was to determine the effects of atorvastatin (AT), a drug known for its pleiotropic effects, on those mechanisms and on cognition. Six weeks after the formation of a CMH, induced by an injection of collagenase in the cortex of C57BL/6J mice, sex-specific cellular, protein, genomic, and metabolic modifications were observed in the cortex and hippocampus of male and female mice, suggesting an impairment of the cortico-hippocampal network explaining the cognitive impairment in males. AT has modified the CMH-induced sex-specific modifications and has improved cognition in males. This study highlights the necessity to take sex into account in preclinical studies to increase our comprehension of pathophysiological mechanisms and develop the most appropriate treatment.

**Key words: cerebral microhemorrhage, cognition, sex, pharmacomodulation, atorvastatin, rodent**

## Table des matières

<b>Introduction .....</b>	<b>- 1 -</b>
<b>1. Les microhémorragies cérébrales .....</b>	<b>- 2 -</b>
1.1. Définition et description.....	- 2 -
1.2. Impact des microhémorragies sur la cognition et le risque de démence.....	- 7 -
1.3. Physiopathologie des microhémorragies.....	- 9 -
<b>2. Sexe, microhémorragies cérébrales et cognition .....</b>	<b>- 21 -</b>
2.1. Sexe et microhémorragies cérébrales.....	- 22 -
2.2. Sexe et troubles cognitifs et démences d'origine vasculaire.....	- 23 -
2.3. Sexe et modèles de microhémorragies cérébrales.....	- 24 -
2.4. Œstradiol, neuroprotection et cognition.....	- 25 -
<b>3. Statines, microhémorragies cérébrales et cognition.....</b>	<b>- 37 -</b>
3.1. Pharmacologie des statines.....	- 37 -
3.2. Effets pléiotropes des statines : apport des études précliniques.....	- 40 -
3.3. Statines et microhémorragies cérébrales.....	- 43 -
3.4. Statines et cognition.....	- 44 -
3.5. Statines et sexe.....	- 45 -
<b>4. Mise en place et état des lieux des connaissances sur le modèle de MHC.....</b>	<b>- 47 -</b>
4.1. Mise en place du modèle.....	- 47 -
4.2. Effet de la microhémorragie chez les souris mâles.....	- 48 -
4.3. Effet de la microhémorragie chez les souris femelles.....	- 49 -
4.4. Conclusion.....	- 50 -
<b>Objectifs du travail de thèse.....</b>	<b>- 51 -</b>
<b>Matériel et méthodes.....</b>	<b>- 53 -</b>
<b>1. Protocoles expérimentaux.....</b>	<b>- 54 -</b>
1.1. Étude des mécanismes induits par la microhémorragie à court et moyen terme.....	- 54 -
1.2. Étude de l'effet de l'atorvastatine dans un contexte de microhémorragie cérébrale.....	- 55 -
1.3. Éthique.....	- 55 -
<b>2. Méthodes.....</b>	<b>- 56 -</b>
2.1. Étude du cycle œstral.....	- 56 -
2.2. Chirurgie stéréotaxique.....	- 58 -
2.3. Caractérisation de l'état de la BHE par injection d'isothiocyanate de fluorescéine.....	- 60 -
2.4. Imagerie par résonance magnétique (IRM).....	- 60 -
2.5. Métabolisme cérébral glucidique.....	- 64 -
2.6. Mise à mort et préparation des tissus pour l'histologie.....	- 64 -
2.7. Mise à mort et préparation des tissus pour la biologie moléculaire.....	- 65 -
2.8. Dosage du cholestérol total.....	- 66 -

2.9.	Analyse des astrocytes et de la microglie.....	- 66 -
2.10.	Dosage des protéines .....	- 68 -
2.11.	Analyse de l'expression protéique du BDNF par ELISA .....	- 69 -
2.12.	Analyse de l'expression protéique du VEGF, P-GSK3 $\beta$ et GSK3 $\beta$ par western blot.....	- 69 -
2.13.	Analyse de l'expression génique des ER $\alpha$ et ER $\beta$ par rt-qPCR.....	- 71 -
2.14.	Statistiques .....	- 74 -
<b>Résultats .....</b>		<b>- 77 -</b>
<b>1. Pourcentage de succès de la chirurgie et résultats de l'étude ancillaire .....</b>		<b>- 78 -</b>
1.1.	Pourcentage de succès de la chirurgie.....	- 78 -
1.2.	Étude ancillaire : Effet du cycle œstral sur le succès de la chirurgie.....	- 79 -
<b>2. Étude des effets locorégionaux aigus (24h après la chirurgie) .....</b>		<b>- 80 -</b>
2.1.	Parachyme cérébral .....	- 80 -
2.2.	Mobilité de l'eau dans les compartiments microvasculaires.....	- 80 -
2.3.	Intégrité de la BHE visualisée avec l'injection de FITC.....	- 82 -
<b>3. Étude des effets locorégionaux de la microhémorragie et de sa modulation par atorvastatine à 6 semaines post-chirurgie.....</b>		<b>- 83 -</b>
3.1.	Parachyme cérébral .....	- 83 -
3.2.	Mobilité de l'eau dans les compartiments microvasculaires.....	- 84 -
3.3.	Étude des astrocytes et de la microglie .....	- 86 -
3.4.	Expression protéique de GSK3 $\beta$ et de sa forme phosphorylée .....	- 89 -
3.5.	Expression protéique du VEGF.....	- 91 -
3.6.	Expression protéique du BDNF .....	- 92 -
3.7.	Expression relative de l'ARN messenger des ER $\alpha$ et $\beta$ .....	- 93 -
<b>4. Étude des effets hippocampiques de la microhémorragie et de sa modulation par l'atorvastatine à 6 semaines post chirurgie.....</b>		<b>- 97 -</b>
4.1.	Parachyme cérébral .....	- 97 -
4.2.	Mobilité de l'eau dans les compartiments microvasculaires.....	- 98 -
4.3.	Étude des astrocytes et de la microglie .....	- 99 -
4.4.	Expression protéique de GSK3 $\beta$ et de sa forme phosphorylée .....	- 104 -
4.5.	Expression protéique du VEGF.....	- 105 -
4.6.	Expression protéique du BDNF .....	- 106 -
4.7.	Expression relative de l'ARN messenger des ER $\alpha$ et $\beta$ .....	- 108 -
<b>5. Métabolisme cérébral à 6 semaines post-chirurgie .....</b>		<b>- 111 -</b>
5.1.	Effet de la microhémorragie.....	- 111 -
5.2.	Effet de l'atorvastatine .....	- 111 -
<b>6. Récapitulatif des effets locorégionaux et hippocampiques de la microhémorragie et de sa modulation pharmacologique à 6 semaines post-chirurgie .....</b>		<b>- 113 -</b>
6.1.	Effets dans le cortex .....	- 113 -

6.2. Effets dans l'hippocampe .....	- 114 -
<b>7. Suivi du poids et dosage du cholestérol plasmatique .....</b>	<b>- 115 -</b>
<b>Article 1 .....</b>	<b>- 117 -</b>
<b>Article 2 (en soumission).....</b>	<b>- 141 -</b>
<b>Discussion .....</b>	<b>- 167 -</b>
<b>1. Principaux résultats .....</b>	<b>- 169 -</b>
1.1. Les points principaux à retenir .....	- 169 -
1.2. Effet du cycle œstral sur le succès de la chirurgie .....	- 171 -
1.3. Effets de la chirurgie .....	- 171 -
1.4. Effets sexe-spécifiques de la microhémorragie à 24 h.....	- 172 -
<b>2. Perspectives : impact du sexe en recherche .....</b>	<b>- 175 -</b>
2.1. Recherche préclinique.....	- 175 -
2.2. Recherche clinique .....	- 177 -
2.3. Modulation pharmacologique .....	- 178 -
<b>3. Conclusion.....</b>	<b>- 182 -</b>
<b>Références .....</b>	<b>- 183 -</b>
<b>Annexe .....</b>	<b>- 193 -</b>



## Table des illustrations

Figure 1 : Coupes axiales de cerveaux avec microhémorragies en IRM T2*. D'après Greenberg et al. 2009. ....	- 2 -
Figure 2 : Microhémorragie sur une coupe de cerveau humain. D'après Veluw et al. 2019. ....	- 3 -
Figure 3 : Prévalence des MHC dans différentes populations. D'après Cordonnier et al, 2011. ....	- 5 -
Figure 4 : Localisation et formation des microhémorragies associées à l'hypertension et à la maladie d'Alzheimer. D'après Ungvari et al. 2017. ....	- 10 -
Figure 5 : Représentation schématique du réseau cérébral. D'après Heringa et al. 2014. ....	- 14 -
Figure 6 : Conséquences hypothétiques d'une microhémorragie. D'après Pétrault et al. 2019. ....	- 16 -
Figure 7 : Cinétique de l'inflammation locale après la formation d'une microhémorragie. D'après Ahn et al. 2018. ....	- 17 -
Figure 8 : Probabilité de présenter des microhémorragies en fonction de l'âge. D'après Vinke et al. 2018. ....	- 22 -
Figure 9 : Les facteurs de risque des troubles cognitifs et des démences d'origine vasculaire sont différents et ont un poids différent en fonction du sexe. D'après Gannon et al 2018. ....	- 23 -
Figure 10 : Prévalence des démences vasculaires avec l'âge. D'après Lobo et al. 2000. ....	- 24 -
Figure 11: Synthèse des hormones neurostéroïdiennes sexuelles dans le cerveau. D'après Arevalo et al. 2014. ....	- 27 -
Figure 12 : Effets de l'œstradiol via ses récepteurs sur la plasticité synaptique et la mémoire. D'après Finney et al. 2020. ....	- 28 -
Figure 13: Signalisation neuroprotectrice redondante induite par la liaison de l'œstradiol à ses récepteurs aux œstrogènes « classiques » et « non classiques ». D'après Arevalo et al. 2014. ....	- 30 -
Figure 14 : Quatre différentes voies de signalisation neuroprotectrices sont induites par la liaison de l'œstradiol à ses récepteurs aux œstrogènes. D'après Arevalo et al. 2015. ....	- 31 -
Figure 15: La voie de l'acide mévalonique conduisant à la formation du cholestérol et de protéines responsables des effets pléiotropes des statines. D'après Fracassi et al. 2019. ....	- 38 -
Figure 16 : Pharmacocinétique des statines et interactions potentielles avec les œstrogènes. D'après Faubion et al., 2019. ....	- 39 -
Figure 17 : Les statines sont capables d'induire le neurotrophisme et la plasticité synaptique en activant CREB par des mécanismes dépendants et indépendants de la voie du mévalonate. D'après Fracassi et al., 2019. ....	- 41 -
Figure 18 : Résultats issus de l'article de Bergeron et al 2018. ....	- 47 -
Figure 19: Évaluation de l'apprentissage et de la mémoire de référence spatiale par le labyrinthe de Barnes chez les souris mâles. D'après Bergeron et al 2018. ....	- 48 -
Figure 20: Évaluation de la mémoire visuospatiale par le test dPAL chez les souris mâles. D'après Bergeron et al 2018. ....	- 49 -
Figure 21 : Évaluation de la mémoire visuospatiale par le test dPAL chez les souris femelles. ...	- 49 -
Figure 22 : Distribution du sexe des animaux dans les études précliniques sur les traumatismes crâniens en 2011 et 2016. D'après Späni, Braun, et Van Eldik 2018. ....	- 50 -
Figure 23 : Protocole expérimental 1 et étude ancillaire. ....	- 54 -
Figure 24: Protocole expérimental 2. ....	- 55 -
Figure 25 : Prœstrus observé au microscope en lumière blanche X10. ....	- 56 -

Figure 26 : Estrus observé au microscope en lumière blanche X10. ....	- 57 -
Figure 27 : Diestrus observé au microscope en lumière blanche X10. ....	- 58 -
Figure 28 : Description de la chirurgie stéréotaxique. D’après Bergeron 2018 et Chen 2018. ....	- 59 -
Figure 29 : Coupes coronales du cerveau en T2*. D’après Bergeron 2018 et Chen 2018.....	- 61 -
Figure 30 : Représentation du site d’injection et de régions d’intérêts sur les séquences IRM. ....	- 63 -
Figure 31 : Les coupes de cerveaux sont réalisées grâce à l'atlas de Paxinos et Franklin. D’après Bergeron 2018. ....	- 65 -
Figure 32 : Représentation des plans de dissections (pointillés rouges) des cerveaux permettant d’isoler les régions d’intérêt. Modifié à partir de Chen 2018. ....	- 65 -
Figure 33 : Schéma d'une coupe de cerveaux en vue axiale. ....	- 67 -
Figure 34 : Analyse de la surface occupée par un astrocyte. ....	- 68 -
Figure 35 : Effet du cycle œstral sur le pourcentage de succès chez les femelles ayant eu une injection de sérum physiologique.....	- 79 -
Figure 36 : Effet du cycle œstral sur le pourcentage de succès chez les femelles ayant eu une injection de collagénase.....	- 79 -
Figure 37 : Coefficient apparent de diffusion chez les femelles et chez les mâles. ....	- 80 -
Figure 38 : Cartes moyenne de D* chez les femelles et chez les mâles sham et MHC, 24h après la chirurgie. ....	- 81 -
Figure 39 : Coefficient de pseudo-diffusion D* chez les femelles et chez les mâles. ....	- 81 -
Figure 40 : Visualisation de l'intégrité de la BHE par injection de FITC chez les femelles, 24h après la chirurgie.....	- 82 -
Figure 41 : Visualisation de l'intégrité de la BHE par injection de FITC chez les mâles, 24h après la chirurgie. ....	- 82 -
Figure 42: Coefficient apparent de diffusion dans le cortex des femelles et des mâles sham et MHC. ....	- 83 -
Figure 43 : Coefficient apparent de diffusion dans le cortex des femelles et des mâles MHC et MHC+AT. ....	- 83 -
Figure 44 : Cartes moyennes de D* chez les femelles et chez les mâles sham et MHC.....	- 84 -
Figure 45 Coefficient de pseudo-diffusion D* dans le cortex des femelles et des mâles sham et MHC.....	- 84 -
Figure 46 : Cartes moyennes de D* chez les femelles et chez les mâles MHC et MHC+AT. ....	- 85 -
Figure 47 : Coefficient de pseudo-diffusion D* dans les cortex des femelles et des mâles MHC et MHC+AT. ....	- 85 -
Figure 48 : Immunomarquage des astrocytes (GFAP en rouge), de la microglie (IBA1 en vert) et des noyaux (DAPI en bleu) sur des coupes représentatives.....	- 86 -
Figure 49 : Semi-quantification des astrocytes par mm <sup>2</sup> dans le cortex des femelles et des mâles sham et MHC. ....	- 86 -
Figure 50 : Surface moyenne occupée par un astrocyte autour de la lésion. ....	- 87 -
Figure 51 : Semi-quantification des astrocytes par mm <sup>2</sup> dans le cortex des femelles et des mâles MHC et MHC+AT. ....	- 88 -
Figure 52 : Semi-quantification des cellules microgliales par mm <sup>2</sup> dans le cortex des femelles et des mâles.....	- 88 -

Figure 53 : Semi-quantification des cellules microgliales par mm <sup>2</sup> dans le cortex des femelles et des mâles MHC et MHC+AT.....	- 89 -
Figure 54 : Western blot P-GSK3 $\beta$ /GSK3 $\beta$ dans le cortex des souris femelles et mâles sham et MHC.....	- 90 -
Figure 55 : Western blot P-GSK3 $\beta$ /GSK3 $\beta$ dans le cortex des souris femelles et mâles MHC et MHC+AT.....	- 90 -
Figure 56 : Western blot de VEGF dans le cortex des souris femelles et mâles sham et MHC. ...	- 91 -
Figure 57 : Western blot de VEGF dans le cortex des souris femelles et mâles MHC et MHC+AT. .-	92 -
Figure 58 : BDNF dans le cortex des souris femelles et mâles sham et MHC. ....	- 92 -
Figure 59 : BDNF dans le cortex des souris femelles et mâles MHC et MHC+AT.....	- 93 -
Figure 60 : Expression relative de l'ARNm des ER $\alpha$ et des ER $\beta$ en fonction du sexe dans le cortex. -	93 -
Figure 61 : Expression relative de l'ARNm des ER $\alpha$ et des ER $\beta$ dans le cortex chez les mâles et les femelles sham et MHC.....	- 94 -
Figure 62 : Expression relative de l'ARNm des ER $\alpha$ et des ER $\beta$ dans le cortex chez les mâles et les femelles MHC et MHC+AT.....	- 95 -
Figure 63 : Coefficient apparent de diffusion dans l'hippocampe des femelles et des mâles sham et MHC.....	- 97 -
Figure 64 : Coefficient apparent de diffusion dans les hippocampes des souris femelles et mâles MHC et MHC+AT.....	- 97 -
Figure 65 : Coefficient de pseudo-diffusion D* dans les hippocampes chez les femelles et chez les mâles sham et MHC.....	- 98 -
Figure 66 : Coefficient de pseudo-diffusion D* dans les hippocampes des femelles et des mâles MHC et MHC+AT.....	- 98 -
Figure 67 : Semi-quantification des astrocytes par mm <sup>2</sup> dans l'hippocampe des femelles et des mâles sham et MHC.....	- 99 -
Figure 68 : Surface moyenne occupée par un astrocyte dans l'hippocampe ipsilatéral.....	- 100 -
Figure 69 : Semi-quantification des astrocytes par mm <sup>2</sup> dans l'hippocampe des femelles et des mâles MHC et MHC+AT.....	- 101 -
Figure 70 : Surface moyenne occupée par un astrocyte dans l'hippocampe ipsilatéral.....	- 102 -
Figure 71 : Semi-quantification des cellules microgliales par mm <sup>2</sup> dans l'hippocampe des femelles et des mâles.....	- 103 -
Figure 72 : Semi-quantification des cellules microgliales par mm <sup>2</sup> dans l'hippocampe des femelles et des mâles MHC et MHC+AT.....	- 103 -
Figure 73 : Western blot P-GSK3 $\beta$ /GSK3 $\beta$ dans l'hippocampe des souris femelles et mâles sham et MHC.....	- 104 -
Figure 74 : Western blot P-GSK3 $\beta$ /GSK3 $\beta$ dans l'hippocampe des souris femelles et mâles MHC et MHC+AT.....	- 105 -
Figure 75 : Western blot de VEGF dans l'hippocampe des souris femelles et mâles sham et MHC. .-	105 -
Figure 76 : Western blot de VEGF dans l'hippocampe des souris femelles et mâles MHC et MHC+AT.....	- 106 -

Figure 77 : BDNF dans l'hippocampe des souris femelles et mâles sham et MHC. ....	- 107 -
Figure 78 : BDNF dans l'hippocampe des souris femelles et mâles MHC et MHC+AT. ....	- 107 -
Figure 79 : Expression relative de l'ARNm des ER $\alpha$ et des ER $\beta$ en fonction du sexe dans l'hippocampe. ....	- 108 -
Figure 80 : Expression relative de l'ARNm des ER $\alpha$ et des ER $\beta$ chez les femelles et les mâles sham et MHC dans l'hippocampe. ....	- 109 -
Figure 81 : Expression relative de l'ARNm des ER $\alpha$ et des ER $\beta$ chez les femelles et les mâles MHC et MHC+AT dans l'hippocampe. ....	- 110 -
Figure 82 : Analyse SPM du métabolisme glucidique cérébral (sham>MHC). ....	- 111 -
Figure 83 : Analyse SPM du métabolisme glucidique cérébral (MHC+AT>MHC) ....	- 112 -
Figure 84 : Suivi du poids et dosage du cholestérol sérique. ....	- 115 -
Figure 85 : Schéma récapitulatif des effets d'une microhémorragie corticale. ....	- 169 -

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Anticorps primaires et secondaires utilisés en immunofluorescence.....	- 67 -
Tableau 2 : Anticorps primaires et secondaires utilisés pour le western blot .....	- 71 -
Tableau 3 : Séquences d’amorces utilisées pour la quantification semi-relative par PCR .....	- 73 -
Tableau 4 : Bilan des souris opérées depuis le début de la thèse .....	- 78 -
Tableau 5 : Récapitulatif des effets de la microhémorragie et de l’atorvastatine en fonction du sexe dans le cortex à 6 semaines post-chirurgie, $\eta_G^2$ représente la taille de l’effet. ....	- 113 -
Tableau 6 : Récapitulatif des effets de la microhémorragie et de l’atorvastatine en fonction du sexe dans l’hippocampe à 6 semaines post-chirurgie, $\eta_G^2$ représente la taille de l’effet. ....	- 114 -

## Liste des abréviations

AAC : angiopathie amyloïde cérébrale  
Akt : protein kinase B  
BDNF : brain derived neurotrophic factor  
BHE : barrière hémato-encéphalique  
CREB : C-AMP Response Element-binding protein  
DWI : diffusion weighted imaging  
ER : récepteurs aux œstrogènes  
ERK : extracellular regulated kinase  
Ges: taille d'effet  $\eta^2$   
GSK3 $\beta$  : Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$   
GPER : ER couplés à des récepteurs aux protéines G  
HDL : high-density lipoprotein  
HMG-CoA réductase : 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A réductase  
IC<sub>95</sub>: intervalle de confiance à 95%  
ICAM1 : intercellular adhesion molecule 1  
IGF1 : insulin like growth factor 1  
IGF1R : récepteur à l'IGF1  
IRM : imagerie par résonance magnétique  
IL : interleukine  
JAK : Janus Kinases  
LDL: low-density lipoprotein  
LPS: lipopolysaccharides  
MHC : microhémorragie cérébrale  
MMP : métalloprotéinases  
MMSE : mini mental state examination  
MoCA : Montreal cognitive assessment  
NADPH oxydase :nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase  
NF- $\kappa$ B : nuclear factor kappa B  
NGF : nerve growth factor  
OATP : transporteur d'anion organique polypeptidique  
PI3K : phosphoinositol-3-kinase  
PPAR $\alpha$  : récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes  $\alpha$   
PPR : participation to prevalence ratio  
STAT : signal transducer and activator of transcription proteins  
TBP: TATA binding protein  
TRKB : tropomyosin receptor kinase B  
TNF: tumor necrosis factor  
VEGF : vascular endothelial growth factor

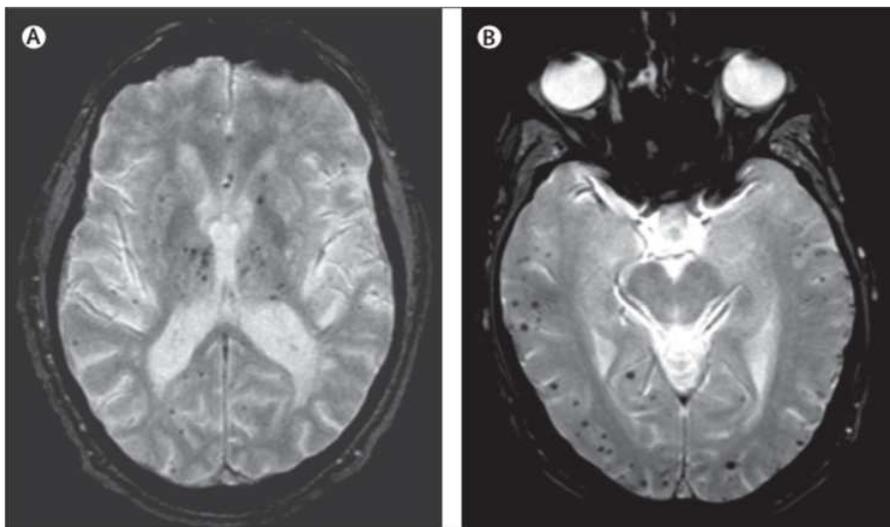
# **INTRODUCTION**

## 1. Les microhémorragies cérébrales

### 1.1. Définition et description

Depuis plus d'une dizaine d'années, les microhémorragies cérébrales (MHC), petites lésions retrouvées dans le parenchyme cérébral, suscitent un intérêt grandissant dans la recherche neurovasculaire (Cordonnier et al., 2007). Ces lésions ont d'abord été détectées et caractérisées en imagerie par résonance magnétique (IRM) par une séquence par écho de gradient T2\* ou par une séquence d'imagerie de susceptibilité magnétique (Ungvari et al., 2017). Ces séquences permettent d'obtenir un contraste entre le parenchyme cérébral et des substances paramagnétiques comme l'hemosidérine (un des produits de dégradation de l'hémoglobine). En IRM, les MHC apparaissent alors comme des lésions hypointenses, arrondies et homogènes (cf. Figure 1). D'après la revue de Greenberg et al. (2009), bien que la taille d'une MHC dépende de la résolution spatiale de l'IRM, de façon consensuelle, les lésions ayant un diamètre inférieur à 10mm sont considérées comme des MHC.

Les MHC se forment suite à la rupture de petits vaisseaux intracérébraux, artérioles ou capillaires (environ 200 micromètres de diamètre) (Ungvari et al., 2017). L'hémoglobine est libérée dans le parenchyme cérébral puis dégradée en partie par les macrophages en hemosidérine permettant, par ses propriétés paramagnétiques sa visualisation par IRM (cf Figure 1) (Pétrault et al., 2019a).

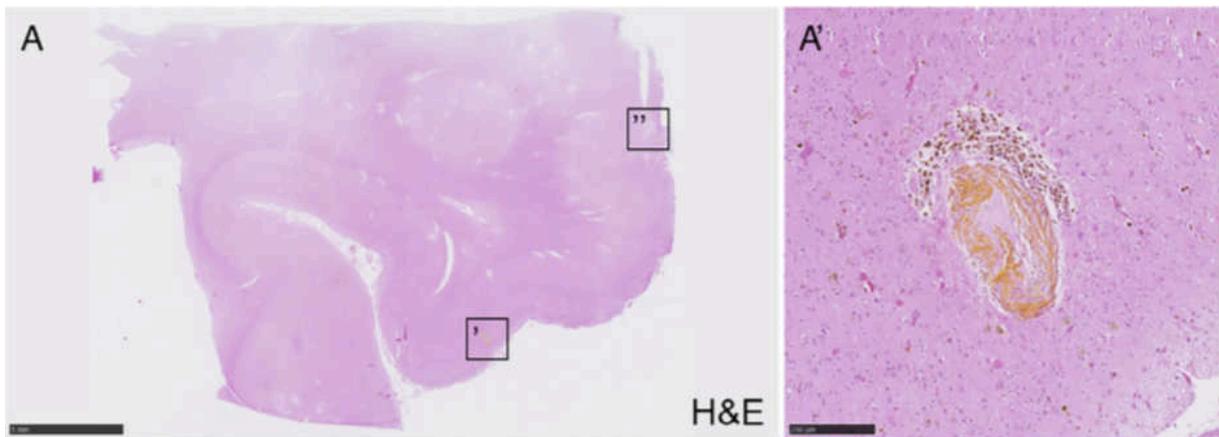


**Figure 1 : Coupes axiales de cerveaux avec microhémorragies en IRM T2\*. D'après Greenberg et al. 2009.**

*(A) Une IRM T2\* d'une femme de 84 ans souffrant d'hypertension. Les MHC sont présentes principalement dans les régions profondes (dans le thalamus bilatéral, le putamen, le caudé) (B) Une IRM T2\* d'une femme de 77 ans sans hypertension. Les MHC ne sont présentes que dans les régions lobaires du cerveau.*

Peu d'études histopathologiques ont été réalisées sur les MHC (Shoamanesh et al., 2011; van Veluw et al., 2017; Veluw et al., 2019). Bien qu'il existe un consensus sur la taille des

MHC visible en IRM, ce n'est pas le cas pour les MHC décrites en histologie. En histologie, les MHC ont été essentiellement caractérisées par une coloration à l'hématoxyline et éosine pour détecter les érythrocytes (Veluw et al., 2019) (cf Figure 2), ou par une coloration de Perls pour détecter les cellules chargées en fer (Shoamanesh et al., 2011) issues de la dégradation des érythrocytes.



**Figure 2 : Microhémorragie sur une coupe de cerveau humain. D'après Veluw et al. 2019.**  
MHC visible au niveau du cortex temporal avec une coloration par hématoxyline et éosine. Barre d'échelle de la photographie de gauche : 5mm, barre d'échelle de la photographie de droite : 250 µm.

### **1.1.1. Contexte pathologique**

Dans un contexte pathologique, les vasculopathies cérébrales comme la vasculopathie hypertensive (artériosclérose) et l'angiopathie amyloïde cérébrale (AAC) sont les principaux facteurs de risque de MHC (Ungvari et al., 2017). L'artériosclérose est caractérisée par une perte de cellules musculaires lisses, un épaississement du mur vasculaire qui résulte en une rigidification du mur vasculaire et une diminution de la lumière du vaisseau. Cette maladie affecte les artérioles pénétrantes profondes et est liée à l'âge ainsi qu'aux facteurs de risque vasculaires comme l'hypertension (Pantoni, 2010). L'AAC est caractérisée par une accumulation progressive de dépôts de protéine  $\beta$ -amyloïde dans la paroi des petites et moyennes artères et artérioles (Pantoni, 2010). Les vasculopathies hypertensives favoriseraient l'apparition de MHC profondes alors que l'AAC favoriserait l'apparition de MHC lobaires et ou corticales (Ungvari et al., 2017) (cf Figure 1).

#### **1.1.1.1. Hypertension**

L'étude de Jeerakathil et al. (2004) a analysé les données de 472 sujets âgés issues d'un échantillon représentatif de la population âgée de la cohorte de Framingham Heart Study et a

montré que l'augmentation de la pression systolique de 20mm Hg était associée à une augmentation du risque de MHC (OR=1,76 ; IC<sub>95%</sub>[1,17 ; 2,63] ; p<0,01). L'étude de Elmståhl et al. (2019) a analysé les données de 344 sujets âgés de 70 à 87 ans issues d'un échantillon représentatif de la population âgée suédoise et a montré un risque plus élevé de MHC chez les sujets présentant de l'hypertension (OR=1,93 ; IC<sub>95%</sub>[1,13 ; 3,28] ; p=0,016). De plus, l'analyse en sous-groupe en fonction de la localisation des MHC suggérait une association entre hypertension et MHC profondes (OR=3,11 ; IC<sub>95%</sub>[1,33 ; 7,28] ; p=0,009) mais pas lobaires (OR=1,67 ; IC<sub>95%</sub>[0,90 ; 3,69] ; p=0,105). L'étude de Li et al. (2020) réalisée de façon rétrospective sur des données issues d'une cohorte de 329 sujets chinois suggère que chez les sujets ayant eu un AVC ischémique, la présence de MHC était supérieure chez les sujets hypertendus ayant une hyperhomocystéinémie (51,1%) comparée aux sujets hypertendus sans hyperhomocystéinémie (18,8%) ou aux sujets non hypertendus et sans hyperhomocystéinémie (7,9%). Par ailleurs, une étude de plus faible niveau de preuve réalisée chez des sujets égyptiens a également montré chez des sujets ayant eu un AVC ischémique avec une fibrillation atriale que l'âge et l'hypertension étaient associés à une prévalence plus élevée de MHC (Elkhatib et al., 2020).

#### **1.1.1.2. Maladies neurodégénératives**

D'autres études observationnelles ont montré que l'AAC et la maladie d'Alzheimer (MA) pourraient être des facteurs de risque de MHC, notamment lobaires (Yates et al., 2011, 2014; Graff-Radford et al., 2018). L'étude de Graff-Radford et al. (2018) réalisée chez 1215 sujets américains âgés de 70 ans en moyenne et issus d'un échantillon représentatif de la cohorte de la Mayo Clinic Study of Aging a ainsi mis en évidence un risque augmenté de présenter des MHC avec la présence de plaques amyloïdes (OR=2,77 ; IC<sub>95%</sub>[1,38 ; 5,54] ; p=0,004). Toutefois, dans les analyse en sous-groupe en fonction de la localisation des MHC, ce risque n'était augmenté que pour les MHC lobaires (OR=1,17 ; IC<sub>95%</sub>[1,10 ; 1,25] ; p<0,001). Une étude de plus faible niveau de preuve réalisée chez des sujets coréens a montré que les sujets ayant la maladie de Parkinson avaient un risque plus élevé de présenter des MHC que des sujets contrôles (OR=2,1 ; IC<sub>95%</sub>[1,1 ; 4,0] ; p=0,02) (Kim et al., 2018). Les analyses en sous-groupes ont montré que le risque n'était augmenté que pour les MHC lobaires (OR= 2,2 ; IC<sub>95%</sub>[1,1 ; 4,7] ; p=0,03).

#### **1.1.1.3. Accidents vasculaires cérébraux ischémiques et hémorragiques**

Une méta-analyse réalisée sur des études prospectives et rétrospectives a montré que la prévalence des MHC augmentait chez les sujets ayant eu des accidents vasculaires cérébraux

(AVC) ischémiques (33,5% ; IC<sub>95%</sub>[30,7 ; 36,4]) ou hémorragiques (45,4% ; IC<sub>95%</sub>[41,8 ; 49,1]) (Cordonnier et al., 2007) en comparaison à des sujets sains (5% ; IC<sub>95%</sub>[3,9-6,2]) (cf Figure 3).

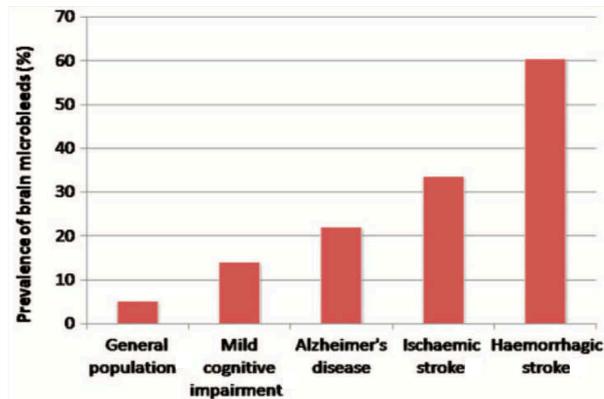


Figure 3 : Prévalence des MHC dans différentes populations. D'après Cordonnier et al, 2011.

D'autres études suggèrent que la présence de MHC augmenterait également le risque d'hémorragie intracérébrale. L'étude de Wilson et al. (2018) a été réalisée sur des données issues d'une cohorte multicentrique menée sur 78 hôpitaux anglais et un hôpital hollandais : cette étude a inclus 1447 sujets suivis pendant 24 mois, âgés de plus de 18 ans et anticoagulés pour une fibrillation atriale qui ont eu un AVC ischémique ou un accident ischémique transitoire. Chez ces patients, la présence de MHC est associée à un risque augmenté d'hémorragies intracérébrales (HR=3,67 ; IC<sub>95%</sub>[1,3 ; 10,6]). Ce risque augmentait d'ailleurs avec le nombre de MHC. Une méta-analyse incluant des études de cohortes prospectives et rétrospectives réalisées dans différentes populations (sujets âgés sains, sujets ayant des troubles de la mémoire et sujets ayant eu un AVC ischémique ou un accident ischémique transitoire) suggère que, toute population confondue, la présence de MHC serait associée à un risque élevé de présenter une hémorragie intracérébrale (HR=3,93 ; IC<sub>95%</sub> [2,71 ; 5,69] ; p<0,0001) (Charidimou et al., 2017). Enfin, l'étude de Miki et al. (2019), de plus faible niveau de preuve a également montré que l'absence de MHC réduisait le risque de récurrence d'AVC hémorragique chez des sujets japonais.

#### 1.1.1.4. Diabète et syndrome métabolique

Si le risque de dysfonction vasculaire chez les sujets diabétiques est connu (Mogi and Horiuchi, 2011), l'association entre le diabète et la présence de MHC n'est à ce jour, pas clairement établie et il semblerait qu'un diabète bien équilibré n'augmente pas le risque de MHC. L'étude de Caunca et al. (2016) réalisée chez 925 sujets américains (habitants de

Manhattan) sans AVC, âgés en moyenne de 70 ans a montré que la prise de traitements antidiabétiques (sans préciser le type de traitement ou même si les sujets étaient équilibrés par leur traitement) diminuait le risque de présenter des MHC (OR=0,25 ; IC<sub>95%</sub>[0,07 ; 0,86] ; p=0,028). Deux études cas-témoin, de plus faible niveau de preuve ont été réalisées chez des sujets hollandais. La première a montré que des sujets avec un diabète de type 2, bien équilibrés par leur traitement ne présentaient pas plus de MHC que les sujets contrôles (33% vs 43% ; p=0,33) (Brundel et al., 2014). La deuxième a montré une prévalence des MHC supérieure chez des sujets diabétiques avec une rétinopathie diabétique (suggérant un déséquilibre du diabète) comparé à des sujets diabétiques sans rétinopathie (21% vs 3% ; p=0,01) (Woerdeman et al., 2014). Enfin, d'après l'étude de Mitaki et al. (2018) réalisée chez 684 sujets japonais âgés en moyenne de 62 ans, un syndrome métabolique augmenterait le risque de présenter des MHC profondes (OR=4,03 ; IC<sub>95%</sub>[1,72 ; 9,41] ; p=0,001).

#### **1.1.1.5. Cholestérol**

Des variations du taux de cholestérol sérique pourraient également être impliquées dans la survenue des MHC. Toutefois, la littérature concernant l'effet du cholestérol sur les MHC est hétérogène. L'étude de Romero et al. (2014) menée sur 1965 sujets âgés de 66,5 ans et issus de la cohorte de Framingham Heart Study a montré que les sujets ayant un taux de cholestérol total bas avaient un risque augmenté de développer des MHC lobaires (OR=1,99 ; IC<sub>95%</sub>[1,14 ; 3,44]). Cependant, l'étude de Ding et al. (2015) réalisée chez une cohorte de 2635 sujets islandais âgés de 66 à 93 ans n'a pas montré que la diminution du taux de cholestérol était associée à un risque augmenté de MHC (RR=0,99 ; IC<sub>95%</sub>[0,91 ; 1,08]). De plus, ces auteurs ont montré qu'un taux élevé de HDL cholestérol était associé à un risque augmenté de MHC lobaires (RR=1,14 ; IC<sub>95%</sub>[1,03 ; 1,27]). Enfin, l'étude de Yubi et al. (2018), d'un plus faible niveau de preuve, réalisée chez des sujets japonais a montré que l'augmentation du taux de cholestérol était associée à un risque diminué de présenter des MHC profondes (OR=0,78 ; IC<sub>95%</sub>[0,63 ; 0,97] ; p=0,03).

#### **1.1.1.6. Mutations génétiques**

Dans la littérature, plusieurs articles ont investigué le lien entre MHC et présence de mutations génétiques. Ainsi, la mutation du gène Notch 3 est responsable d'une maladie héréditaire, le CADASIL, une artériopathie cérébrale autosomique dominante qui touche les petits vaisseaux. Le CADASIL induirait des MHC chez près de la moitié des personnes atteintes (Ungvari et al., 2017).

L'étude cas-témoin de Yubi et al. (2018) réalisée sur les sujets japonais a également mis en évidence une association entre la mutation de l'allèle  $\epsilon 4$  de l'apolipoprotéine E et un risque augmenté de présenter des MHC lobaires (OR=1,7 ; IC<sub>95%</sub>[1,08 ; 2,8] ; p=0,02).

#### **1.1.1.7. Autres étiologies**

Une revue de la littérature a également citée de façon plus anecdotique d'autres étiologies comme les endocardites d'origine infectieuse, les purpuras thrombocytopeniques thrombotiques, certaines  $\beta$ -thalassémies ou même l'apnée obstructive du sommeil (Noorbakhsh-Sabet et al., 2017).

## **1.2. Impact des microhémorragies sur la cognition et le risque de démence**

### **1.2.1. Troubles cognitifs**

Initialement considérées comme silencieuses, de nombreuses études épidémiologiques suggèrent que la présence de MHC augmenterait le risque de présenter des troubles cognitifs. La majorité des résultats de ces études repose sur deux tests d'évaluation cognitive rapide : le mini mental state examination (MMSE) et la Montreal Cognitive Assessment (MoCA). Le MMSE et la MoCA sont notés sur 30. Pour le MMSE, le seuil pathologique est variable selon le niveau d'éducation et le pays. Pour la MoCA le seuil pathologique est inférieur à 26.

Toutes les études issues d'une analyse de données de cohorte mettaient en évidence une association entre la présence de MHC et une altération des fonctions cognitives que ce soit chez des sujets non déments ou des sujets ayant la maladie d'Alzheimer (Poels et al., 2012; Akoudad et al., 2016b; Ding et al., 2017; Paradise et al., 2018; Elmståhl et al., 2019; Li et al., 2020). L'étude de Poels et al. (2012) réalisée chez 3979 sujets hollandais âgés en moyenne de 60 ans et issus de la cohorte de Rotterdam a montré qu'un nombre élevé de MHC était associé à un score MMSE plus faible et à une moins bonne performance lors des tests de vitesse de traitement de l'information et de vitesse motrice. Dans cette étude, les sujets ayant plus de 5 MHC présentaient une altération des performances dans la vitesse de traitement de l'information, les fonctions exécutives mais ne présentaient pas d'altération de la mémoire. L'étude de Akoudad et al. (2016), menée sur 3257 sujets de 60 ans en moyenne, issus de la même cohorte a mis en évidence une altération des domaines cognitifs différents en fonction de la localisation des MHC. Ainsi, les sujets ayant plus de 4 MHC lobaires présentaient une altération des fonctions exécutives et de la mémoire et les sujets ayant plus de 4 MHC profondes présentaient une altération de la vitesse de traitement de l'information ainsi que de la vitesse motrice. L'étude de Ding et al. (2017), réalisée chez 2602 sujets islandais âgés de 66 à 93 ans

issus de la cohorte de Reykjavik a montré que la présence de MHC profondes ou mixtes était associée à une altération de la mémoire, de la vitesse de traitement de l'information et des fonctions exécutives. Bien que la présence d'une MHC lobaire ne fût pas associée à un déclin cognitif, la présence de plus de 3 MHC lobaires était associée à une altération de la vitesse de traitement de l'information. Enfin, l'étude de Paradise et al. (2018) réalisée sur 302 sujets australiens âgés de 70 à 90 ans a montré que la présence de MHC était associée à une altération des fonctions exécutives et une altération des capacités visuospatiales.

Une méta-analyse incluant 25 études cas-témoins de diverses régions du monde, avec un total de 9343 participants sans maladies neurodégénératives ou accidents vasculaires cérébraux a montré que les sujets ayant des MHC avaient un risque plus élevé de troubles cognitifs ( $OR=3.54$ ;  $IC_{95\%}[2,29; 5.4]$  ;  $p<0.05$ ) avec de moins bons scores au MMSE et au MoCA et un déclin de certaines fonctions cognitives (l'orientation, l'attention et le calcul et la mémoire différée) (Li et al., 2017).

D'autres études comparatives, de plus faibles niveau de preuve, menées sur un échantillon plus restreint suggèrent aussi que la présence de MHC est associée à une moins bonne cognition globale ainsi qu'à une altération des fonctions exécutives (Yang et al., 2018; Abdullah et al., 2020; Qian et al., 2020)

Au final, ces études suggèrent que le risque de troubles cognitifs augmente en présence de MHC, qu'elles soient lobaires, mixtes ou profondes. Les fonctions cognitives globales, les fonctions exécutives, la vitesse de traitement de l'information, la mémoire visuospatiale seraient altérées par la présence de MHC et aggravées par l'augmentation du nombre de MHC.

### **1.2.2. Démences**

De nombreuses études se sont également intéressées à l'association entre les MHC et le risque de développer une démence. Les méta-analyses réalisées sur les données issues d'études de cohortes ne suggèrent pas que la présence de MHC soit associée à un risque accru de démence (Bos et al., 2018; Charidimou et al., 2018; Debette et al., 2018). Par exemple, la méta-analyse de Debette et al. (2018), incluant 5 études de cohortes (dont 3 études incluses dans les deux autres méta-analyses) n'a pas montré d'association entre la présence de MHC et le risque de démence (OR=1.41 ; IC<sub>95%</sub>[0.90 ; 2.21]).

Enfin, deux études comparatives se sont intéressées à l'effet des MHC sur le risque de démence dans des populations ayant des maladies neurovasculaires. Chez les sujets ayant eu un AVC ischémique ou une maladie des petites artères cérébrales, la présence de MHC augmenterait le risque de démence (Chen et al., 2018; Yatawara et al., 2020).

## **1.3. Physiopathologie des microhémorragies**

### **1.3.1. Formation des microhémorragies**

Les études observationnelles ont permis d'identifier de nombreux facteurs de risque impliqués dans le développement des MHC. L'hypertension, le dépôt de plaques amyloïdes dans la CAA et la MA vont fragiliser la paroi vasculaire, augmenter la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique et conduire à sa rupture et à la formation de MHC (Pétrault et al., 2019a) (cf Figure 4). Les modèles animaux de MHC disséminées ont permis de mieux caractériser les facteurs connus et d'identifier de nouveaux facteurs pouvant conduire à la formation des MHC (cf Annexe).

#### *Angiopathie amyloïde cérébrale*

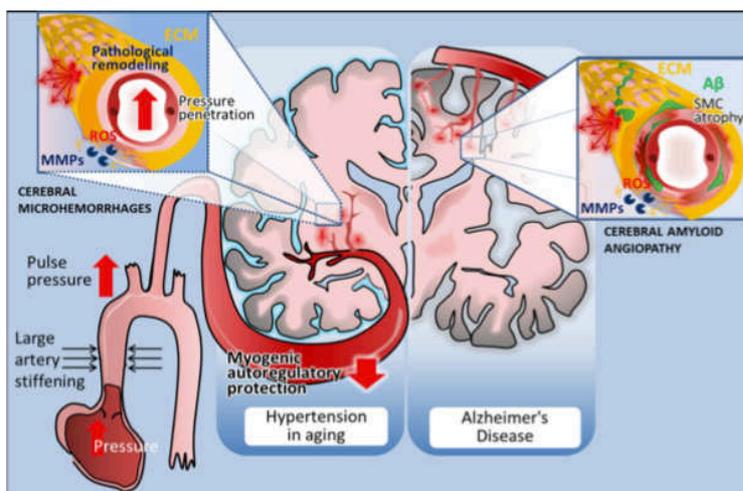
Plusieurs modèles de rongeurs ont confirmé que l'AAC, l'un des facteurs de risque les plus importants dans le développement des MHC, était associée à la formation de MHC spontanées liées à une fragilisation des vaisseaux cérébraux (cf Figure 4). Ces modèles présentent une surexpression du gène humain codant pour la protéine précurseur du peptide amyloïde humain (APP/PS1, APP23, Tg2576, rTg-DI, 5XFAD) (Fisher et al., 2011; Han et al., 2015; Cacciottolo et al., 2016; Jiao et al., 2016; Reuter et al., 2016; Marinescu et al., 2017; Davis et al., 2018; Hur et al., 2018).

## Âge, hypertension, stress oxydant et IGF-1

Les effets de l'âge et de l'hypertension sur le développement de MHC ont été évalués chez des rats spontanément hypertendus dans les travaux de Schreiber et al. (2012) ainsi que dans les travaux de Toth et al. (2015), sur des souris chez qui une hypertension était induite par un traitement *per os* d'angiotensine II. D'après Toth et al. (2015), l'âge augmenterait le stress oxydant et l'activation de certaines métalloprotéinases (MMP), qui pourraient concourir à l'exacerbation des MHC induites par l'hypertension (cf Figure 4).

Un autre modèle murin développé dans les travaux de Montgolfier Olivia et al. (2019) a également montré que l'augmentation de la pression pulsée induisait des MHC en fragilisant le mur vasculaire (cf Figure 4). D'après les travaux de Springo et al. (2015), un âge avancé serait associé à une altération de l'adaptation myogénique (la réponse d'une artère ou artériole à une modification de la pression sanguine pour maintenir un flux sanguin constant) à la pression pulsée dans les artères cérébrales moyennes isolées, conduisant à une augmentation de pression, vraisemblablement délétère dans les microvaisseaux cérébraux.

Il a également été mis en évidence dans les travaux de Tarantini et al. (2017) le rôle de l'insuffisance en « insulin like growth factor 1 » (IGF1) dans le développement des MHC liés à l'âge. L'insuffisance en IGF1 augmenterait le stress oxydant et l'activité de certaines MMP, conduisant à une dégradation de la matrice extracellulaire des vaisseaux puis à la formation de MHC.



**Figure 4 : Localisation et formation des microhémorragies associées à l'hypertension et à la maladie d'Alzheimer. D'après Ungvari et al. 2017.**

A gauche : Formation des MHC profondes liées à l'âge et à l'hypertension et à droite formation des MHC corticales/lobaires liées à la maladie d'Alzheimer où, les MHC se développent dans les vaisseaux touchés par l'AAC. A $\beta$  : peptide  $\beta$  amyloïde; ECM : extracellular matrix ; MMP : métalloprotéinases ; ROS : reactive oxygen species.

### *Inflammation*

D'autres modèles se sont intéressés au rôle de l'inflammation dans le développement des MHC (cf Annexe). Les travaux de Sudduth et al. (2017) ont montré qu'en provoquant un état inflammatoire par le biais d'un régime hyperhomocystéinémique, des MHC corticales et profondes apparaissaient dès 6 semaines de régime. A partir de 10 semaines de régime, le nombre de MHC était significativement différent du groupe contrôle. L'état inflammatoire induit par ce régime était caractérisé par une augmentation de certains marqueurs pro-inflammatoires comme l'interleukine (IL)-1B, le « tumor necrosis factor » (TNF) $\alpha$ , l'IL-12A, l'IL-6 accompagnée d'une neuroinflammation (augmentation de microglie M1 de phénotype pro-inflammatoire). De plus, les auteurs ont également mis en évidence une augmentation de certaines métalloprotéinases (MMP2 et MMP9). Les travaux de Sumbria et al. (2016) réalisés sur un modèle de MHC multiples et disséminées, basé sur l'induction d'un état inflammatoire par l'injection de doses répétées de lipopolysaccharides (LPS), ont montré que l'augmentation des marqueurs d'activation endothéliale (intercellular adhesion molecule (ICAM1)) et de fuite de la barrière hémato encéphalique (BHE) était associé à une augmentation du nombre de MHC et de la charge hémorragique. De plus, le nombre de cellules microgliales et d'astrocytes était significativement augmenté par rapport au groupe contrôle (injection de sérum physiologique). L'autre étude de Sumbria et al. (2017) basé sur le même modèle de MHC suggère que l'altération de la BHE et l'activation microgliale, plutôt que l'activation astrocytaire et endothéliale seraient impliquées dans le développement des MHC. De plus, Sumbria et al. (2018) ont montré, toujours dans ce même modèle que plus les souris étaient âgées, plus elles développaient de MHC. L'âge rendait les souris plus sensibles à l'inflammation induite par le LPS. L'étude de Zeng et al. (2018) a reproduit ce modèle de MHC chez des rats et a montré l'implication de certaines isoformes de la NO synthase. Sept jours après l'injection de LPS la formation de MHC s'accompagnait d'une activation astrocytaire et microgliale, d'une altération des jonctions serrées, d'une diminution des péricytes, ainsi que d'une augmentation d'oxyde nitrique synthase endothéliale et neuronale.

### *Hypoxie*

Un état d'hypoxie, comme l'ont montré les travaux de Hoffmann et al. (2016) peut aussi induire des MHC. Chez la souris, après 48h d'hypoxie suivie de 24h de réoxygénation, des MHC étaient localisées dans le bulbe olfactif, les ganglions basocellulaires et la substance blanche (incluant le corps calleux). La présence de MHC était associée à une augmentation de

la perméabilité de la BHE attestée par une perturbation de la localisation de la protéine zonula occludens-1 le long des jonctions cellulaires endothéliales.

### *Érythrophagocytose*

Enfin, une dernière hypothèse est celle de l'érythrophagocytose évoquée par Chang et al. (2018). *In vivo*, les globules rouges, sous l'effet d'un stress oxydant pourraient être érythrophagocytés par les cellules endothéliales. Les globules rouges exposeraient les phosphatidylcholines de leur double membrane lipidique, générant ainsi un signal déclenchant l'érythrophagocytose. Les globules rouges passeraient du compartiment intravasculaire vers le compartiment extravasculaire et formeraient des pseudo-MHC sans altérer l'intégrité de la monocouche de cellules endothéliales.

### **1.3.2. Hypothèses à l'origine des troubles de la cognition**

Si les facteurs impliqués dans la formation des MHC ont pour la plupart bien été caractérisés, les mécanismes à l'origine des troubles de la cognition associés à la présence de MHC le sont moins. En clinique, l'IRM a permis d'élucider quelques mécanismes présents chez les patients ayant des MHC qui pourraient participer au déclin cognitif.

L'intérêt de la modélisation des MHC dans les travaux précliniques réside dans le fait de pouvoir travailler dans des conditions précises, reproductibles et contrôlées. Les études précliniques basées sur des modèles de MHC localisés (cf Annexe) ont permis de découvrir une partie des mécanismes induits par les MHC qu'ils soient cellulaires ou moléculaires.

#### **1.3.2.1. Hypothèses cliniques**

##### *Débit sanguin cérébral*

La présence de MHC chez des sujets âgés sans troubles cognitifs serait associée à une hypoperfusion cérébrale chronique. En effet, une étude réalisée chez 55 sujets américains âgés de 87 ans ne présentant pas de troubles cognitifs s'est intéressée à l'association entre la présence de MHC et le débit sanguin cérébral (Gregg et al., 2015). La présence de MHC corticales était associée à une diminution du débit sanguin cérébral de l'ordre de 25%, d'autant plus marquée dans le cortex pariétal (-37 % comparé aux patients sans MHC). L'étude de Hashimoto et al. (2016) réalisée chez 22 sujets japonais âgés en moyenne de 69 ans et présentant une maladie des petites artères cérébrales a montré que l'augmentation du nombre de MHC était associée avec une diminution du débit sanguin cérébral dans le centre ovale (zone de la substance blanche située sous le cortex cérébral et qui est constituée de fibres de substances blanches issues du cortex cérébral)

### *Réactivité vasculaire*

D'autres études se sont intéressées à l'effet des MHC sur la réactivité cérébrale. Une étude cas-témoin menée chez des sujets hollandais de plus de 55 ans issues de la cohorte de Rotterdam n'a pas montré de différence de réactivité cérébrovasculaire entre 35 sujets ayant des MHC lobaires et 15 sujets contrôles (Akoudad et al., 2016a). Cependant, dans une étude comparative réalisée chez 49 patients hollandais ayant de l'athérosclérose issus de l'étude «Second Manifestations of ARterial disease », la présence de MHC serait associée à une altération légère de la réactivité cérébrovasculaire sur l'ensemble du cerveau (Conijn et al., 2012).

### *Métabolisme cérébral*

L'étude de Samuraki et al. (2015) réalisée chez 206 sujets japonais ayant la maladie d'Alzheimer a montré que les sujets présentant des MHC avaient une atrophie corticale ainsi qu'un hypométabolisme cortical. En préclinique, un résultat similaire a d'ailleurs été mis en évidence dans le modèle murin de MHC corticale développé dans les travaux de Bergeron et al. (2018) où il était associé un hypométabolisme cortical autour de la MHC.

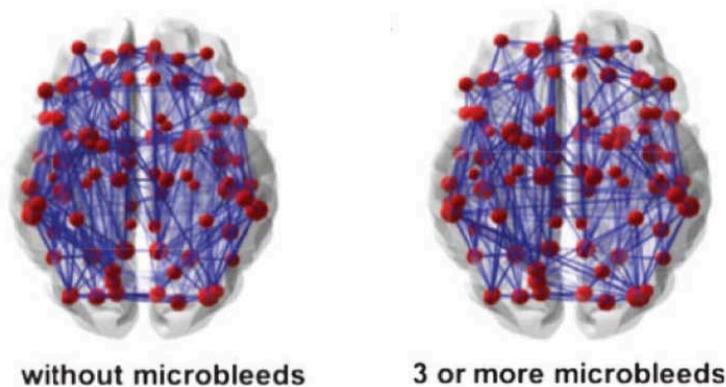
### *Morphologie hippocampique*

Deux études suggèrent que la présence de MHC serait associée avec des modifications morphologiques cérébrales. L'étude de Chowdhury et al. (2011) réalisée chez 1180 sujets japonais âgés de 40 à 93 ans et ne présentant pas de facteurs de risque de maladies neurovasculaires a mis en évidence que la présence de MHC corticales était associée à une atrophie hippocampique. L'étude de Su et al. (2019) menée sur 1029 sujets chinois a également suggéré que la présence de plus de 3 MHC était associée à un volume cérébral, hippocampique et de substance blanche sous-corticale plus faible que les sujets sans MHC.

### *Réseaux neuronaux*

Une des hypothèses développées dans les études cliniques est celle de l'altération des réseaux neuronaux (déterminés par des séquences d'imagerie par tenseur de diffusion qui, après post-traitement, permettent de reconstruire les réseaux de substance blanche) par les MHC. L'étude de Tuladhar et al. (2016) réalisée chez 436 sujets hollandais non déments âgés de 65 ans en moyenne et qui présentaient une maladie des petits artères cérébrales, a montré que la présence de MHC était corrélée négativement à la densité, à la force de connexion et à l'efficacité de travail du réseau de la substance blanche. De plus, chez ces sujets l'altération de

ce réseau était associée à des performances cognitives plus basses. Toujours chez des sujets hollandais, l'étude de Heringa et al. (2014) menée chez 77 sujets âgés de 78 ans en moyenne et ayant des troubles cognitifs légers a montré que la présence de plus de 3 MHC était associée à une perturbation du réseau de la substance blanche (cf Figure 5). Enfin, l'étude de Wang et al. (2019) réalisée chez 562 sujets chinois âgés de 55 à 65 ans a montré que la présence de MHC était associée à une altération des réseaux thalamo-corticaux.



**Figure 5 : Représentation schématique du réseau cérébral. D'après Heringa et al. 2014.**  
 Visualisation du réseau cérébral, en moyenne chez des sujets sans MHC à gauche et avec plus de 3 MHC à droite. Les points rouges représentent des régions cérébrales corticales et sous corticales et les lignes bleues les fibres de substance blanche reliant ces différentes régions. Une altération du réseau neuronal est visible chez les patients présentant plus de 3 MHC.

### *Espaces péri-vasculaires*

Une autre hypothèse implique les espaces péri-vasculaires qui entourent les artérioles pénétrantes et participent à l'élimination des déchets cérébraux. Une étude réalisée chez 46 sujets hollandais âgés en moyenne de 74 ans et présentant des troubles cognitifs légers suggérait que chez les sujets ayant des MHC, la dilatation de l'espace péri-vasculaire dans des zones autour des MHC était plus importante en comparaison à ces mêmes zones chez des sujets n'ayant pas de MHC (Bouvy et al., 2020). Dans les maladies des petits vaisseaux, des espaces péri-vasculaires élargis pourraient être le signe d'un mauvais drainage péri-vasculaire favorisant les lésions tissulaires adjacentes aux artérioles (van Veluw et al., 2020). L'altération de la clairance péri-vasculaire des peptides amyloïdes est d'ailleurs un des mécanismes physiopathologiques impliqués dans la maladie d'Alzheimer (van Veluw et al., 2020).

## *Conclusion*

Au final, les études cliniques réalisées suggèrent que les MHC pourraient induire des modifications métaboliques (Samuraki et al., 2015), cérébrovasculaires avec entre autre, un agrandissement de l'espace périvasculaire (Bouvy et al., 2020), des hypoperfusions (Gregg et al., 2015; Hashimoto et al., 2016) et une altération des réseaux neuronaux (Heringa et al., 2014; Tuladhar et al., 2016). De plus, les MHC corticales auraient un effet à distance en induisant une atrophie hippocampique (Chowdhury et al., 2011).

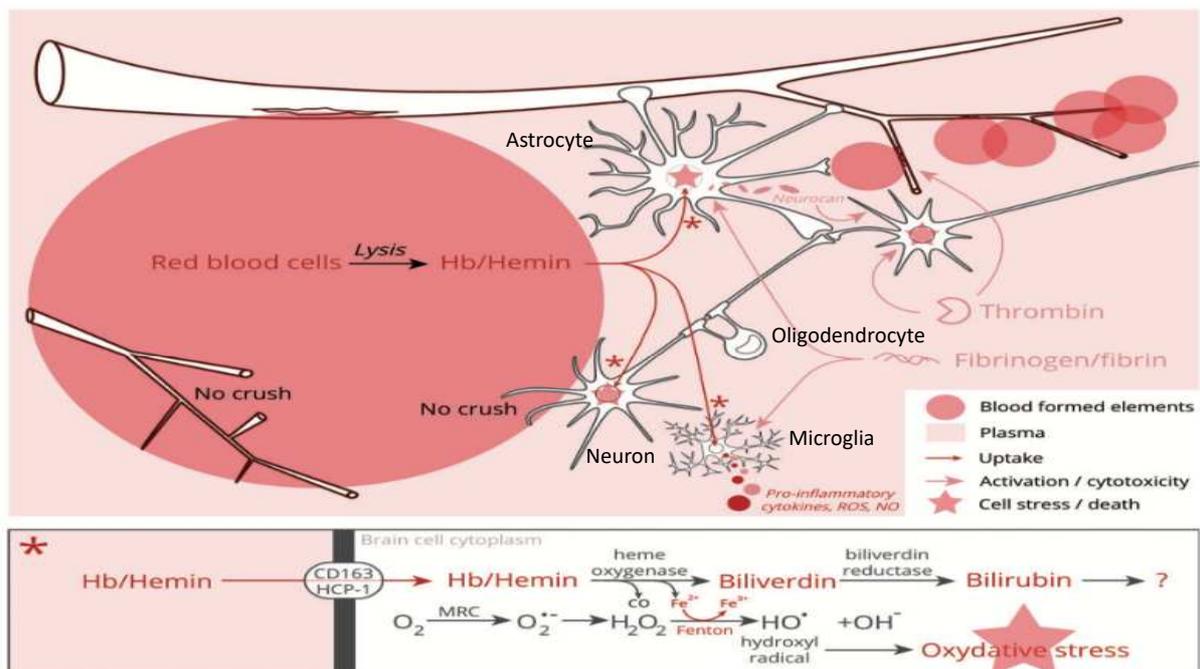
### **1.3.2.2. Hypothèses précliniques**

#### *Mécanismes primaires*

En préclinique, plusieurs pistes ont été proposées, dont la majorité d'entre elles proviennent des hypothèses tirées de la physiopathologie des hémorragies intracérébrales (HIC). Lors d'une HIC, l'afflux de sang dans le parenchyme va comprimer et détruire de manière mécanique les tissus environnant, à l'origine des dommages dit « primaires » (Pétrault et al., 2019a). Cependant, ce phénomène n'a pas l'air de s'appliquer dans le cadre des MHC. Dans le modèle de MHC de Rosidi et al. (2011) basé sur l'utilisation d'un laser pour créer une rupture des artérioles pénétrantes, la MHC induisait dans les heures suivant sa formation, un afflux de sang et de plasma qui comprimait les tissus à son contact et déplaçaient les dendrites du site de la microhémorragie de façon aiguë. Dans les jours qui suivaient la formation de la MHC, les dendrites retrouvaient leur place initiale et 2 semaines après, la MHC n'induisait pas de mort neuronale ou de dégénération de dendrites (cf Figure 6). Seule une légère diminution du flux sanguin dans les capillaires autour du site de la MHC était notée. Celle-ci d'après les auteurs ne serait pas suffisante pour provoquer une ischémie. Peu après, les travaux de Cianchetti et al. (2013) ont montré dans le même modèle de MHC, une diminution de la réponse neurale et astrocytaire à proximité de la MHC immédiatement après son induction, indiquant une perte transitoire du fonctionnement cortical normal qui s'est rétablie dès 24h. Au final, il ne semble pas que les mécanismes dits « primaires » jouent un rôle important dans l'altération cognitive induite par les MHC.

## Mécanismes secondaires

D'après la revue de Pétrault et al. (2019), les dommages dits « secondaires » pourraient résulter des produits de dégradation de l'hémoglobine (fer, bilirubine) libérés par la lyse des érythrocytes (cf Figure 6). Le fer, par la réaction de Fenton, peut générer des espèces réactives de l'oxygène qui pourraient altérer les membranes des neurones et induire leur mort. Les travaux de He et al. (2016), réalisés sur un modèle murin de MHC corticales par perforation au laser des artérioles pénétrantes (modèle similaire à celui de Rosidi et al., 2011)) ont montré, une semaine après l'induction des MHC, une altération de la mémoire spatiale (mémoire impliquant notamment l'hippocampe). Deux semaines après l'induction des MHC, les auteurs observaient des dépôts de fer, une dégénération des dendrites et une augmentation du nombre de microglies, qui pourraient relarguer des cytokines proinflammatoires. Les auteurs suggèrent que l'augmentation des dépôts de fer induits par la MHC pourrait altérer les connexions entre différentes zones cérébrales et participer à l'altération de la mémoire spatiale. Néanmoins, tout comme les travaux de Rosidi et al. (2011), il n'était pas observé de mort neuronale.

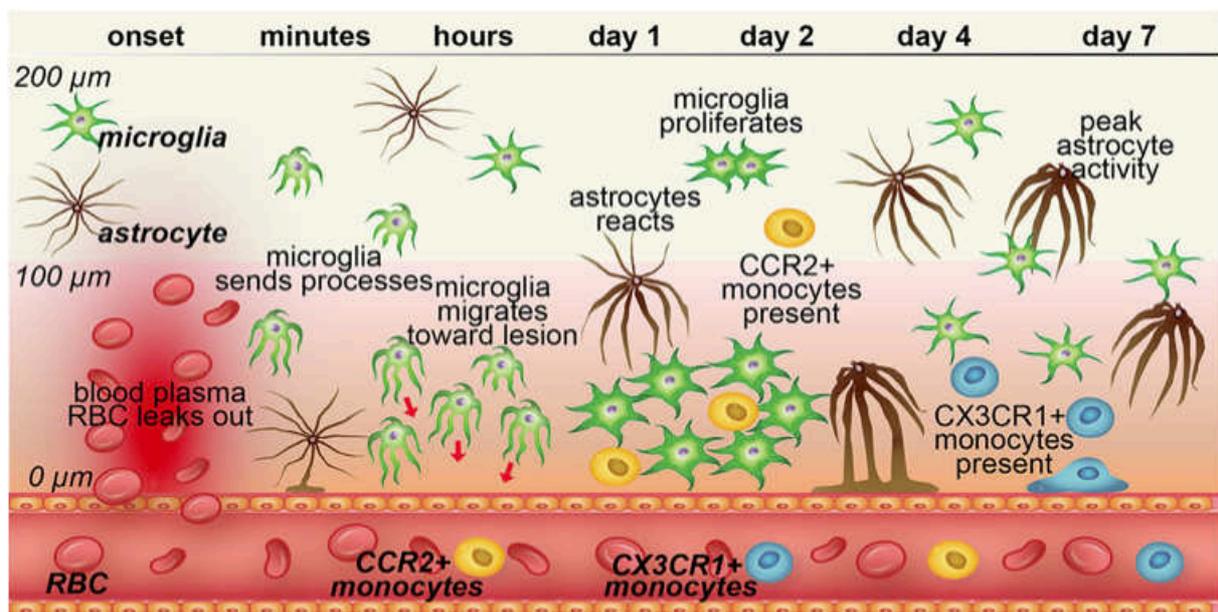


**Figure 6 : Conséquences hypothétiques d'une microhémorragie. D'après Pétrault et al. 2019.**

CO : monoxyde de carbone ; Hb : hémoglobine ; HCP-1 : protéine porteuse de l'hème-1 ; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : peroxyde d'hydrogène ; MRC : chaîne respiratoire mitochondriale ; NO : monoxyde d'azote ; O<sub>2</sub> : dioxygène ; O<sub>2</sub><sup>-</sup> : anion superoxyde ; OH<sup>-</sup> : radicaux hydroxyles ; ROS : espèces réactives de l'oxygène.

Suite à une MHC, des produits issus de la cascade de la coagulation sont relargués dans le parenchyme comme la thrombine ou le fibrinogène et pourraient exercer une toxicité neuronale et astrocytaire (Pétrault et al., 2019a). La thrombine, le fibrinogène et les produits de

dégradation de l'hémoglobine pourraient maintenir un état neuroinflammatoire concourant à une neurotoxicité locale. En ce sens, la neuroinflammation a été étudiée dans plusieurs travaux (Rosidi et al., 2011; He et al., 2016; Ahn et al., 2018). Ainsi, les travaux de Ahn et al. (2018), réalisés sur un modèle de MHC similaire à celui de Rosidi et al. (2011), se sont focalisés sur la cinétique de la neuroinflammation suivant l'apparition d'une MHC (cf Figure 7). Leurs résultats suggèrent que les cellules microgliales près d'une MHC réagissent en migrant rapidement vers la lésion entraînant une diminution de la densité de la microglie dans la zone proche de la MHC qui est recolonisée après une quarantaine d'heures et se rapprochait de son état basal à 2 semaines. L'expression des astrocytes activés autour de la lésion était plus tardive et commençait 2 jours après l'induction de la lésion pour atteindre un pic à 7 jours. De plus, les auteurs n'ont pas observé de « cicatrice astrogliale » à des temps plus longs. Au final, le modèle d'induction de MHC corticale par laser de Ahn et al. (2018) a montré que les cellules microgliales sont les premières à proliférer autour de la lésion, suivi des astrocytes. La MHC induisait également l'extravasation dans le parenchyme de quelques monocytes proinflammatoires (phénotype CCR2+) puis anti-inflammatoires (CX3CR1+). D'après les auteurs, ce phénomène neuroinflammatoire local pourrait être en partie responsable des troubles cognitifs engendrés par la MHC.



**Figure 7 : Cinétique de l'inflammation locale après la formation d'une microhémorragie. D'après Ahn et al. 2018.**

*Les cellules microgliales sont les premières à migrer vers la lésion puis activent les astrocytes. Une extravasation des monocytes (CCR2+ pro-inflammatoires, puis CX3CR1+ anti-inflammatoires) est également visible.*

### *Autres pistes possibles*

Les travaux de Bergeron et al. (2018) sur le modèle de MHC basé sur l'injection corticale de collagénase ont montré une altération de la mémoire visuospatiale et de référence spatiale ainsi qu'une diminution du métabolisme glucidique cortical et hippocampique suggérant une atteinte à la fois corticale et à distance.

D'autres pistes, tirées des mécanismes pathologiques impliqués dans les hémorragies intracérébrales restent à investiguer dans le champ des microhémorragies. Au niveau moléculaire, des travaux réalisés dans des modèles d'hémorragie intracérébrale induits soit par injection de sang autologue (Krafft et al., 2012) soit par injection de collagénase (Wang et al., 2013) ont montré une perturbation de la voie « Protéine Kinase B »(Akt)/ « Glycogène Synthase Kinase-3 $\beta$  » (GSK3 $\beta$ ) avec une augmentation de la forme active de GSK3 $\beta$ . GSK3 $\beta$  est une sérine/thréonine kinase ubiquitaire connue pour avoir un rôle important dans de nombreux processus biologiques dont la prolifération cellulaire, la migration, la différenciation, la polarité et la plasticité des neuroblastes et/ou des neurones et dans les voies de signalisation de l'apoptose (Zhao et al., 2017). GSK3 $\beta$  est notamment régulée négativement par les voies phosphoinositol-3-kinase (PI3K)-Akt et WNT (O'Leary and Nolan, 2015; Zhao et al., 2017). Sous forme active, GSK3 $\beta$  peut inhiber la voie de la  $\beta$ -caténine qui est notamment impliquée dans la neurogénèse ou la synthèse de facteurs de croissance comme le « brain-derived neurotrophic factor » (BDNF) ou le « vascular endothelial growth factor » (VEGF) (O'Leary and Nolan, 2015; Zhao et al., 2017). D'après la revue de O'Leary et Nolan (2015), GSK3 $\beta$  serait un élément clé dans la régulation des fonctions cognitives. Les travaux de Liu et al. (2018) réalisés dans un modèle d'hémorragie intracérébrale induit par injection de sang autologue ont d'ailleurs montré que l'inhibition pharmacologique de GSK3 $\beta$  par phosphorylation sur la sérine 9 induisait une amélioration des fonctions cognitives.

Ainsi, il n'est pas exclu que des mécanismes moléculaires identifiés dans des modèles d'hémorragie intracérébrale puissent, dans une moindre mesure, être impliqués dans la physiopathologie des MHC.

### *Conclusion*

Les modèles précliniques de MHC existants ont mis en évidence des mécanismes locaux et ont caractérisé en majorité une réponse de nature neuroinflammatoire à la MHC, pouvant être liés au moins en partie aux produits de dégradation de l'hémoglobine. Néanmoins, d'autres mécanismes locaux, similaires à ceux observés dans les hémorragies intracérébrales pourraient intervenir et restent à caractériser. Enfin, les modèles de MHC localisés ont montré des effets sur des mémoires hippocampiques, suggérant des mécanismes à distance du site initial des MHC.



## **2. Sexe, microhémorragies cérébrales et cognition**

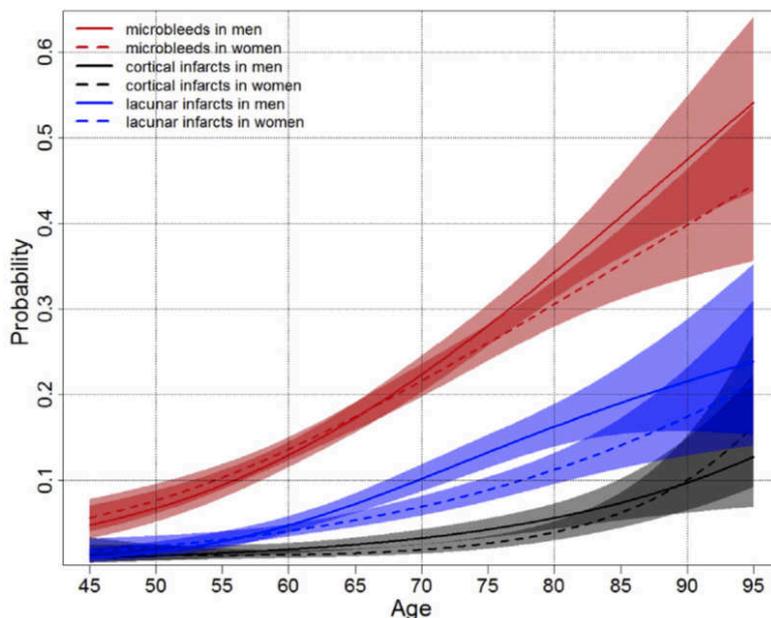
Le sexe est une caractéristique biologique ayant un grand impact sur la physiopathologie de nombreuses maladies. Des différences liées au sexe peuvent être présentes non seulement dans la prévalence, l'incidence, l'évolution des maladies, les mécanismes physiopathologiques mis en place mais également dans la réponse à des traitements pharmacologiques (Miller et al., 2016; Marini, 2018).

En 2016, le National Institutes of Health a émis des recommandations pour prendre en compte le sexe en tant que variable tant dans la recherche clinique que dans la recherche préclinique (2016). La même année, la revue de Miller et al. (2016) concluait d'ailleurs que le nombre d'études évaluant l'effet du sexe dans les maladies neurovasculaires était insuffisant.

D'après l'article de Shansky (2019), en préclinique, de façon empirique, les études ne seraient que peu réalisées chez les femelles en raison de la variation importante du niveau circulant d'hormones sexuelles en fonction du cycle œstral. Ces variations hormonales pourraient mener à des données ininterprétables chez les femelles. Ainsi, ce qui a pu commencer comme un choix pratique, ne travailler que chez les mâles, est devenu un dogme. La méta-analyse de Prendergast, Onishi, et Zucker (2014) a d'ailleurs débouté ce dogme. Les auteurs ont inclus 293 articles, et ont examiné les caractéristiques comportementales, morphologiques, physiologiques et moléculaires chez des souris mâles et femelles sans tenir compte de la phase du cycle œstral. La variabilité de ces caractéristiques n'était pas significativement plus importante chez les femelles que chez les mâles et était même sensiblement plus importante chez les mâles pour plusieurs caractéristiques. Ainsi, travailler en préclinique sur l'étude d'une maladie, notamment dans le domaine neurovasculaire pourrait donc être effectuée sur les femelles au même titre que sur les mâles.

## 2.1. Sexe et microhémorragies cérébrales

La majorité des études issues des données de cohorte suggèrent que le risque de présenter des MHC serait plus important chez les hommes que chez les femmes (Jeerakathil et al., 2004; Ding et al., 2015; Vinke et al., 2018; Elmståhl et al., 2019). A titre d'exemple, l'étude suédoise de Elmståhl et al. (2019) (détaillée dans la partie 1.1.1.1) a montré que le fait d'être un homme était associé à un risque élevé de présenter des MHC (OR=2.27 ; IC<sub>95%</sub>[1.37 ; 3.77] ; p<0.002) (Elmståhl et al., 2019). L'étude de trajectoire de Vinke et al. (2018) n'a pas montré de différence sur la probabilité d'avoir des MHC au cours du temps en fonction du sexe. Néanmoins, l'augmentation de la prévalence des MHC serait plus précoce chez les hommes que chez les femmes (cf Figure 8).

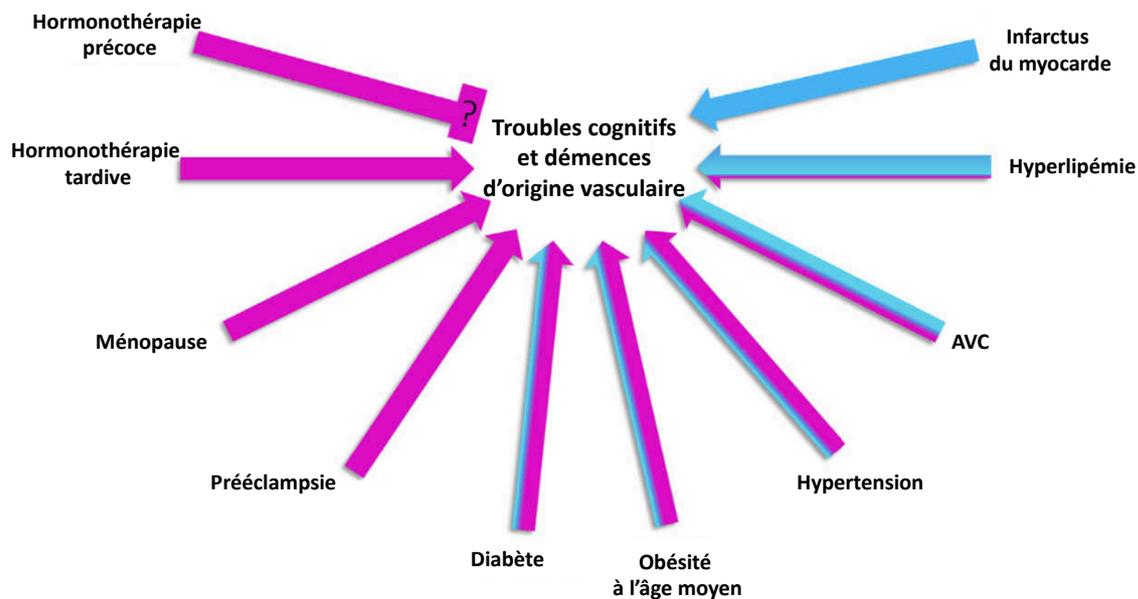


**Figure 8 : Probabilité de présenter des microhémorragies en fonction de l'âge. D'après Vinke et al. 2018.**  
Les traits continus et discontinus rouges représentent respectivement la probabilité des présenter des MHC avec l'âge chez l'homme et la femme.

## 2.2. Sexe et troubles cognitifs et démences d'origine vasculaire

### 2.2.1. Facteurs de risques

Les facteurs de risque contribuant aux troubles cognitifs et aux démences d'origine vasculaire pourraient avoir un poids différent et être différents en fonction du sexe (Gannon et al., 2018). En effet, chez les femmes, des facteurs de risques spécifiques (la ménopause, l'hormonothérapie substitutive tardive et la pré-éclampsie) et des facteurs de risques communs mais dont le poids est plus important chez les femmes (le diabète, l'obésité à l'âge moyen et l'hypertension) concourent à la survenue de troubles cognitifs et démences d'origine vasculaire (cf Figure 9). Tandis que, chez les hommes, l'infarctus du myocarde est un facteur de risque spécifique et l'hyperlipémie et les AVC sont des facteurs de risques communs aux deux sexes mais avec un risque plus important chez les hommes.



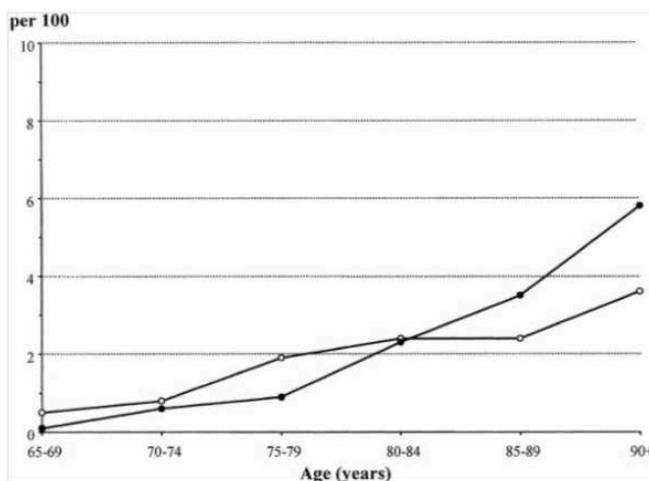
*Figure 9 : Les facteurs de risque des troubles cognitifs et des démences d'origine vasculaire sont différents et ont un poids différent en fonction du sexe. D'après Gannon et al 2018.*

*Chez les femmes et les hommes, les facteurs de risque et leur importance en fonction du sexe sont respectivement représentés par des flèches roses et bleues. Chez les femmes, la flèche à bout plat représente un facteur protecteur potentiel. AVC : accident vasculaire cérébral.*

### 2.2.2. Épidémiologie

Le lien entre la présence de MHC et le risque de troubles cognitifs ou de démences a déjà été abordé (partie 1.2). Néanmoins, aucune étude n'a à ce jour été réalisée pour évaluer le risque de troubles cognitifs ou de démences en fonction du sexe chez des sujets présentant des MHC. Cependant, dans d'autres maladies neurovasculaires comme les AVC, le risque de développer des troubles cognitifs pourrait être différent en fonction du sexe. En effet, l'étude de Corraini et al. (2017) a comparé des cohortes de patients danois ayant eu un AVC ischémique

(84220 sujets) ou hémorragique (16723 sujets) à des cohortes de sujets sans AVC et suggère que les risques de démence suite à un AVC ischémique ou hémorragique sont plus importants chez les hommes que chez les femmes. L'étude de Reitz et al. (2006) réalisée chez 1275 américains (avec 70% de femmes) d'en moyenne 73 ans a montré que les hommes avaient un déclin de la mémoire et des performances visuospatiales plus rapide que les femmes après un AVC ischémique. Concernant l'effet du sexe sur les démences vasculaires, l'étude de Lobo et al. (2000) a montré, en analysant les données de plusieurs cohortes européennes, qu'avec l'âge, la prévalence des démences vasculaires s'inverserait pour être plus importante chez les femmes que chez les hommes (cf Figure 10). D'après la revue de Gannon et al. (2018) ceci pourrait être en lien avec la diminution de l'imprégnation œstrogénique.



**Figure 10 : Prévalence des démences vasculaires avec l'âge. D'après Lobo et al. 2000.**  
Les cercles blancs désignent les hommes, les carrés noirs désignent les femmes.

### 2.3. Sexe et modèles de microhémorragies cérébrales

Peu de travaux précliniques ont étudié l'effet du sexe dans des modèles de MHC. Néanmoins, les travaux de Sumbria et al. (2018) basés sur l'induction de MHC multiples par injection de LPS ont montré que le nombre de MHC était supérieur chez les mâles en comparaison aux femelles. Cependant, le nombre de cellules gliales (microglie et astrocytes), ainsi que les marqueurs de perméabilité de la BHE n'étaient pas différents entre les mâles et les femelles. Dans l'étude de Rosidi et al. (2011), des MHC corticales multiples chez des souris mâles et femelles sont réalisées mais l'article ne mentionne pas d'analyse en fonction du sexe. Deux études réalisées par Cacciottolo et al. (2016) et Jiao et al. (2016) sur des modèles murins de maladie d'Alzheimer ont montré que les MHC étaient beaucoup plus nombreuses chez les souris femelles. Au total, dans les modèles murins, la formation et l'impact des MHC pourraient être différents en fonction du sexe.

## **2.4. Œstradiol, neuroprotection et cognition**

### **2.4.1. Influence d'une hormonothérapie de substitution sur la cognition**

Les observations issues des études épidémiologiques suggèrent que la prévalence des troubles cognitifs et démences d'origine vasculaire serait moins élevée chez les femmes que chez les hommes, en lien avec l'imprégnation œstrogénique chez les femmes. En ce sens, de nombreux essais cliniques ont évalué l'effet des hormonothérapies de substitution sur la survenue de maladies neurovasculaires ou sur les fonctions cognitives des femmes en péri et post-ménopause. La méta-analyse de Lethaby et al. (2008) réalisée sur 16 essais contrôlés randomisés n'a pas montré d'effets bénéfiques d'une hormonothérapie substitutive dans la prévention des troubles cognitifs après 4 ans de traitement chez les femmes en post-ménopause (OR=1,34 ; IC<sub>95%</sub>[0,95 ; 1,90]). D'autres essais contrôlés randomisés réalisés quelques années après cette méta-analyse et évaluant l'effet d'une hormonothérapie substitutive chez des femmes post-ménopausées sur certaines fonctions cognitives n'ont pas montré de différences par rapport aux groupes contrôles (Kocoska-Maras et al., 2011; Espeland et al., 2013; Gleason et al., 2015). Enfin, un autre essai contrôlé randomisé de Gorenstein et al. (2011) réalisé chez 59 femmes brésiliennes, âgées de 40 à 59 ans, en post-ménopause avec une hormonothérapie substitutive a tout de même montré une amélioration sur différents tests cognitifs comparée au placebo. Cependant, les auteurs concluent que ces différences significatives n'étaient pas cliniquement pertinentes.

Devant les différents échecs des essais cliniques menés, certains chercheurs ont soulevé l'hypothèse d'une fenêtre thérapeutique idéale pour initier un traitement par hormonothérapie et obtenir un effet neuroprotecteur ou procognitif. Cette fenêtre thérapeutique serait située en péri-ménopause. Ainsi, l'essai contrôlé randomisé de Maki et al. (2011) incluant 34 femmes américaines, post ménopausée et âgées en moyenne de 60 ans, a montré qu'un traitement par hormonothérapie initié en péri-ménopause améliorait la mémoire verbale et augmentait les fonctions hippocampiques en comparaison à des sujets contrôles sans hormonothérapie. Enfin, concernant le risque d'AVC ischémique, l'étude de Carrasquilla et al. (2017) réalisée sur une analyse groupée incluant 88914 sujets issues de 5 études de cohortes a montré que l'hormonothérapie substitutive, si elle est initiée moins de 5 ans après la ménopause était associé à un risque réduit d'AVC ischémique. A l'inverse, l'hormonothérapie substitutive initiée 5 ans après la ménopause était associée à un risque d'AVC ischémique augmenté.

## **2.4.2. Mécanismes neuroprotecteurs de l'œstradiol**

Bien que les essais contrôlés randomisés ne suggèrent que peu ou pas d'efficacité d'une hormonothérapie de substitution en termes de neuroprotection ou de cognition, de nombreux travaux précliniques sont en faveur d'un effet bénéfique, neuroprotecteur et procognitif de l'œstradiol (Arevalo et al., 2015).

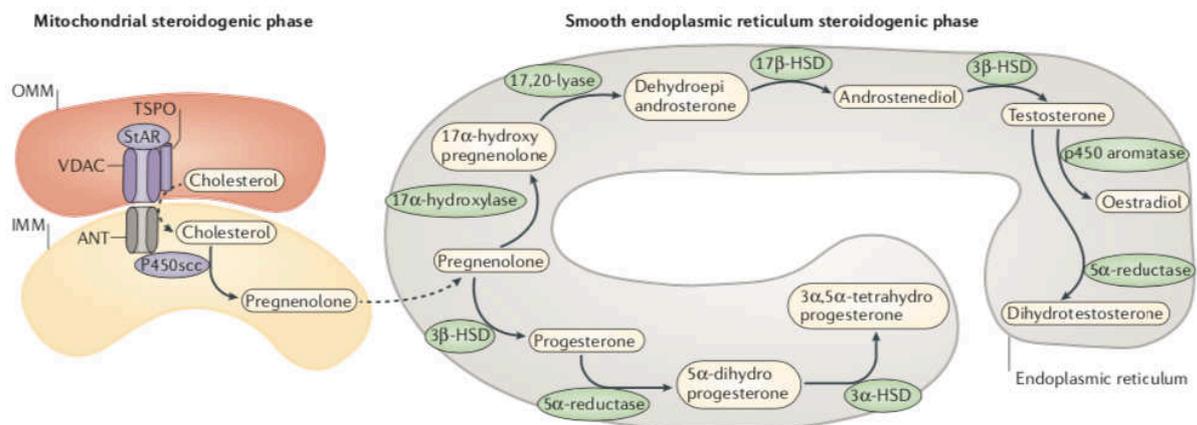
### **2.4.2.1. Œstradiol au niveau central**

#### *Synthèse de l'œstradiol*

L'œstradiol est produit en majorité dans les gonades. Cependant, il existe des sites de production extragonadiques, tels que les cellules endothéliales, les os, le tissu adipeux mais également au niveau central, les neurones et les cellules gliales (Arevalo et al., 2015). Il existe deux types d'œstradiol, le  $17\beta$ -œstradiol et son isomère, le  $17\alpha$ -œstradiol. L'œstradiol évoqué ici est le  $17\beta$ -œstradiol qui se lie plus facilement à ses récepteurs que le  $17\alpha$ -œstradiol (Finney et al., 2020).

#### *Conditions physiologiques*

Dans le cerveau, l'œstradiol est considéré comme un neurostéroïde sexuel qui peut agir localement en tant que facteur paracrine ou autocrine (Robison et al., 2019). Les hormones sexuelles (œstrogène, progestérone, androgène) sont toutes produites à partir du cholestérol et sont synthétisées à la fois chez les mâles et chez les femelles (cf Figure 11). En condition physiologique, l'œstradiol régule entre autres, la plasticité synaptique, la neurogénèse et la cognition.



**Figure 11: Synthèse des hormones neurostéroïdiennes sexuelles dans le cerveau. D'après Arevalo et al. 2014.** Au niveau cellulaire, le cholestérol est synthétisé dans la mitochondrie puis est converti en prégnénone. La prégnénone par des étapes successives dans le réticulum endoplasmique est convertie en différents neurostéroïdes sexuels. HSD: hydroxysteroid dehydrogenase ; IMM: inner mitochondrial membrane ; OMM: outer mitochondrial membrane; P450scc: cytochrome P450 cholesterol side chain cleavage; StAR: steroidogenic acute regulatory protein ; TSPO: translocator protein; VDAC: voltage dependent anion selective channel.

### Condition pathologique

En condition pathologique, après une lésion cérébrale, le cerveau répond en augmentant l'expression de l'aromatase, dernière enzyme clé nécessaire à la synthèse d'œstradiol (cf Figure 11) (Arevalo et al., 2015). De façon intéressante, chez les mâles, les astrocytes au contact de la BHE expriment l'aromatase. Lorsque la testostérone sérique franchit la BHE, les astrocytes pourraient donc directement la convertir en œstradiol en cas de besoin (Arevalo et al., 2015). En cas d'agression, les taux d'œstradiol cérébraux sont issus à la fois de la synthèse cérébrale mais également de l'œstradiol (chez les femelles) et de la testostérone (chez les mâles) périphériques.

#### 2.4.2.2. Œstradiol, neuroprotection et cognition

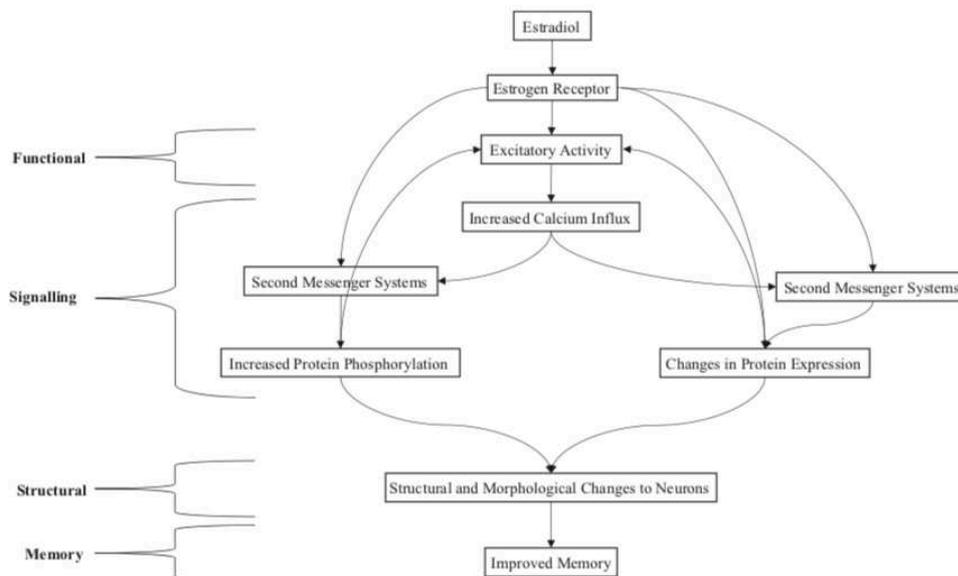
##### Neuroprotection

De nombreuses études ont montré qu'un apport exogène d'œstradiol dans des modèles de maladies neurovasculaires ou neurodégénératives avait des propriétés anti-inflammatoires, antioxydantes, pro-angiogéniques, la capacité d'augmenter la réactivité vasculaire et de diminuer la perméabilité de la BHE (Arevalo et al., 2015). La suppression (par ovariectomie) ou la baisse de la synthèse périphérique d'œstradiol (après la ménopause) diminuerait la neuroprotection induite par l'œstradiol. En effet, chez les rongeurs, l'ovariectomie accroît les

dommages cérébraux et diminue le métabolisme glucidique cérébral dans des modèles neurodégénératifs (Yue et al., 2005; Overk et al., 2012; Arevalo et al., 2015).

### *Cognition*

D'après la revue de la littérature de Finney et al. (2020), l'œstradiol en plus de ses propriétés neuroprotectrices est impliqué dans les processus de plasticité synaptique dans l'hippocampe et donc dans les processus de mémorisation. Cette action serait liée à plusieurs mécanismes, l'œstradiol en se liant à ses récepteurs active des voies de signalisation intracellulaire (décrites dans la section 2.4.3.2) et augmente la phosphorylation ou module l'expression de certaines protéines à l'origine de modifications structurales et morphologiques des neurones (dendritogénèse, axonogénèse) et d'une amélioration de la mémoire. De plus, d'après une expérience de Oberlander et Woolley (2017) réalisée sur des tranches d'hippocampe de rats et de rates, l'œstradiol augmenterait l'activité excitatrice postsynaptique et l'influx calcique intracellulaire. D'après les travaux de Di Mauro et al. (2017), toujours chez le rat, l'œstradiol augmenterait la potentialisation à long terme, phénomène qui sous-tendrait la plasticité synaptique et qui serait impliqué dans les processus d'apprentissage et de mémoire. Cette action de l'œstradiol serait médiée par les ER $\alpha$  et  $\beta$  ainsi que les GPER (Finney et al., 2020) (décrits dans la section 2.4.3).



**Figure 12 : Effets de l'œstradiol via ses récepteurs sur la plasticité synaptique et la mémoire. D'après Finney et al. 2020.**

### **2.4.3. Les récepteurs aux œstrogènes**

#### **2.4.3.1. Les différents types de récepteurs aux œstrogènes et leurs effets**

Les effets neuroprotecteurs et procognitifs de l'œstradiol sont expliqués par sa liaison aux récepteurs aux œstrogènes (ER), dont les plus connus sont les deux isoformes alpha (ER $\alpha$ ) et bêta (ER $\beta$ ). La présence des ER a été montrée dans les neurones, les astrocytes et les cellules microgliales. (Arevalo et al., 2015).

##### *Récepteurs aux œstrogènes intracellulaires*

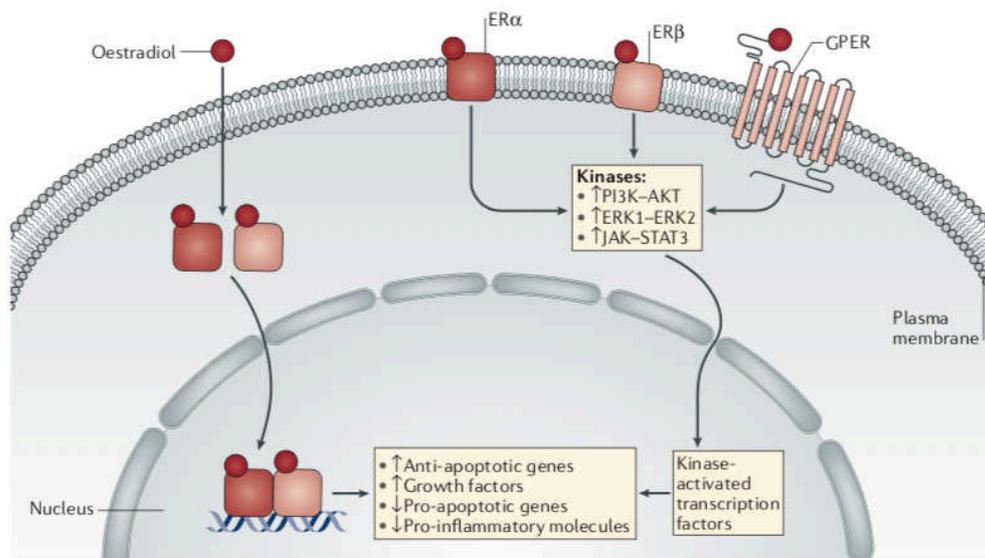
De façon classique, les ER intracellulaires ont une fonction nucléaire et agissent en tant que facteur de transcription. Au niveau intracellulaire, l'œstradiol peut se lier aux ER « classiques » et induire leur translocation dans le noyau puis leur homodimérisation ou hétérodimérisation. Ce complexe va alors permettre la reconnaissance et la liaison à des éléments de réponse aux œstrogènes (ERE) situés dans la région promotrice de gènes sur l'ADN et induire le recrutement de co-activateurs et co-répresseurs transcriptionnels pour entraîner la transcription de différents facteurs de croissance neuroprotecteurs tels que le BDNF, le VEGF, l'IGF1 et le « nerve growth factor » (NGF) (Acaz-Fonseca et al., 2014; Villa et al., 2016) (cf Figure 13).

##### *Récepteurs aux œstrogènes membranaires « classiques »*

D'après les travaux de Acconcia et al. (2004), les ER peuvent également être fixés par palmitoylation au niveau des membranes cellulaires et être à l'origine d'effets rapides, non génomiques de l'ordre de quelques secondes à quelques minutes par l'activation des voies de signalisation neuroprotectrices comme « extracellular regulated kinase » (ERK), PI3K-Akt et « janus kinase- signal transducer and activator of transcription proteins 3 » (JAK-STAT3)

##### *Récepteurs aux œstrogènes membranaires « non classiques »*

L'œstradiol peut aussi se lier à des ER membranaires dits « non classiques ». Ces derniers peuvent être des ER couplés à des récepteurs aux protéines G (GPER) (cf Figure 13). La liaison de l'œstradiol à GPER peut également activer les mêmes voies de signalisations que les ER membranaires « classiques », résultant en l'activation de voies de signalisation neuroprotectrices redondantes. Enfin, d'autres ER membranaires « non classiques » peuvent être couplés à une protéine G $\alpha_q$  mais ne sont pas décrits sur le schéma (Arevalo et al., 2015).



**Figure 13: Signalisation neuroprotectrice redondante induite par la liaison de l'œstradiol à ses récepteurs aux œstrogènes « classiques » et « non classiques ». D'après Arevalo et al. 2014.**

#### 2.4.3.2. Autres voies de signalisations neuroprotectrices des œstrogènes

L'œstradiol est le médiateur de cascades de signalisations neuroprotectrices multiples et parallèles décrites ci-dessous.

##### *Voie du récepteur à l'IGF1*

L'œstradiol active la voie de signalisation neuroprotectrice du récepteur à l'IGF1 (IGF1R) (cf voie a Figure 14) via l'interaction de ER $\alpha$  avec une sous-unité de PI3K. Ceci permet la formation d'un complexe multimoléculaire composé de ER $\alpha$ , IGF1R et PI3K. *In fine*, cette voie de signalisation va inhiber GSK3 $\beta$ . L'activation de cette voie et l'inhibition de GSK3 $\beta$  induit la translocation de la  $\beta$ -caténine vers le noyau cellulaire, ce qui d'une part inhibe l'activité transcriptionnelle de ER $\alpha$  et d'autre part, régule l'activité transcriptionnelle de molécules de survie. Les deux types d'ER « classiques » et « non classiques » seraient impliqués dans les activités neuroprotectrices de l'œstradiol.

##### *Voie WNT*

L'œstradiol, via un ER $\alpha$  membranaire active la voie de signalisation et entraîne l'inhibition de GSK3 $\beta$  et la translocation de  $\beta$ -caténine dans le noyau cellulaire (cf voie b Figure 14). Cette dernière régule l'activité transcriptionnelle de différents facteurs et favorise l'expression des molécules de survie.

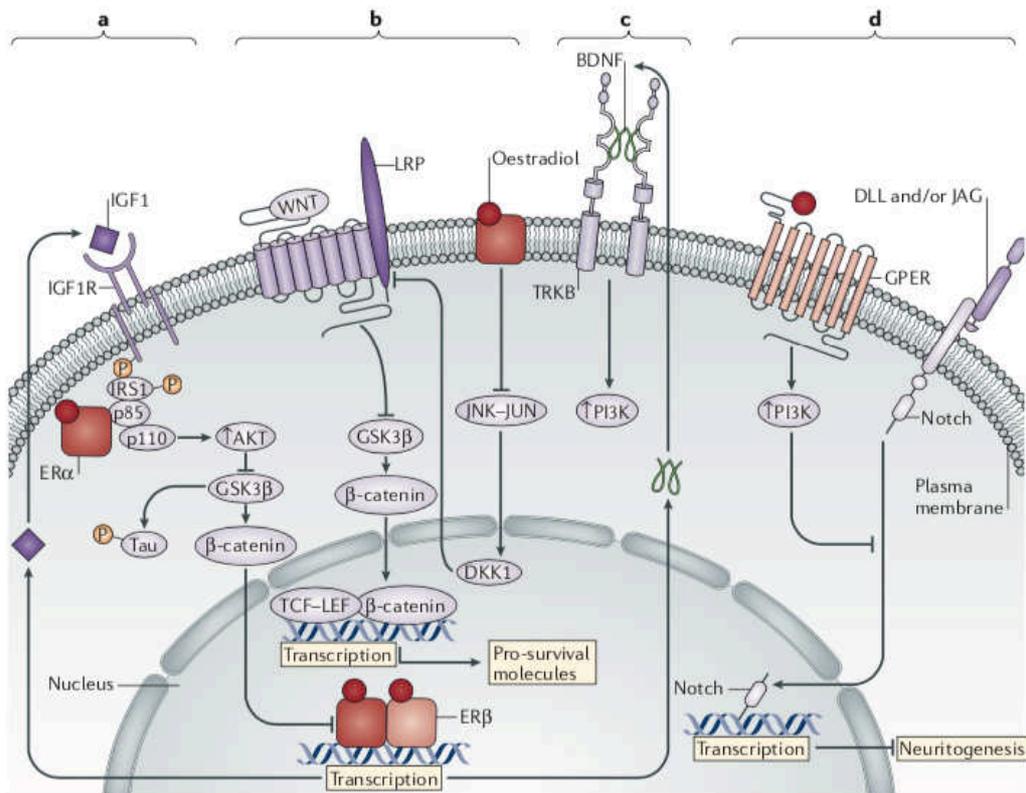
##### *Voie génomique classique*

L'œstradiol augmente aussi, via sa fixation aux ER « classiques » cytoplasmiques la transcription du BDNF mais aussi du VEGF (non décrit dans le schéma). Le BDNF va se fixer

à son récepteur « tropomyosin receptor kinase B » (TRKB) et induire via la PI3K des voies de signalisations protectrices (cf voie c Figure 14).

#### *Voie du récepteur à l'œstradiol couplé à la protéine G*

Enfin, l'œstradiol, par le biais d'un mécanisme impliquant GPER et PI3K, inhibe la signalisation Notch vers le noyau et favorise la neurogenèse (cf voie d Figure 14).



**Figure 14 : Quatre différentes voies de signalisation neuroprotectrices sont induites par la liaison de l'œstradiol à ses récepteurs aux œstrogènes. D'après Arevalo et al. 2015.**

*AKT: protein kinase B; BDNF: brain-derived neurotrophic factor; DLL: delta; DKK1: Dickkopf 1; E2: œstradiol; ERα: récepteurs aux œstrogènes α; GPER: G protein-coupled; ER GSK3β: glycogen synthase kinase 3β IGF1, IGF1R: insulin-like growth factor 1 and its receptor; IRS1: insulin receptor substrate 1; JAG: jagged; JNK-JUN: JUNamino-terminalprotein kinase; LEF: lymphoid enhancer-binding factor; LRP: lipoprotein receptor-related protein; PI3K: phosphoinositide 3-kinase; TCF: T cell factor.*

### **2.4.4. Les récepteurs aux œstrogènes dans les principales cellules cérébrales**

#### **2.4.4.1. Implication des ER dans les neurones**

*In vitro*, les propriétés neuroprotectrices de l'œstradiol ont été mises en évidence sur des cultures primaires de neurones corticaux (Bryant and Dorsa, 2010). Le prétraitement de ces neurones par de l'œstradiol protégeait les neurones issus de rats femelles uniquement. Les auteurs ont démontré que la protection de ces neurones chez la femelle était médiée par les ERα en utilisant des agonistes et des antagonistes spécifiques de ce récepteur. Dans une moindre mesure, ils ont mis en évidence un effet neuroprotecteur lié à l'activation de ERβ dans les

neurones provenant des rats mâles et femelles. Les travaux de Dubal et al. (2006 et 2001) dans un modèle d'ischémie par occlusion de l'artère cérébrale moyenne réalisé chez le rat ont montré en premier lieu, une up-régulation précoce des ER $\alpha$  (8h après l'occlusion) dans les neurones. De plus, les auteurs ont montré, toujours sur un modèle d'occlusion de l'artère cérébrale moyenne que, contrairement à des souris wild-type, l'œstradiol n'avait pas d'effet neuroprotecteur chez les souris avec une délétion de ER $\alpha$ . D'après la revue de Roque et Baltazar (2019), l'activation de GPER dans les neurones par l'œstradiol favoriserait via les voies de signalisations cellulaires décrites plus haut (section 2.4.3.1) la survie des neurones dans différentes conditions.

#### **2.4.4.2. Implication des ER dans les astrocytes**

Bien que l'implication des ER ait été caractérisée dans les neurones, notamment par les travaux de Dubal et al. (2006), il est important de considérer que dans le système nerveux il y a une communication entre les différentes populations cellulaires et, par conséquent, d'autres types cellulaires dont les astrocytes sont impliqués dans les actions neuroprotectrices de l'œstradiol (Acáz-Fonseca et al., 2015). En effet, les travaux de Spence et al. (2011; 2013) ont montré que seuls les ER $\alpha$  présents dans les astrocytes mais pas dans les neurones étaient à l'origine d'effets neuroprotecteurs et antiinflammatoires dans un modèle murin d'encéphalomyélite autoimmune. De plus, les travaux de Blurton-Jones et Tuszynski (2001) réalisés chez des singes ont montré que l'expression des ER était augmentée dans les astrocytes réactifs autour d'une lésion ce qui suggère que les astrocytes sont des acteurs incontournables des effets neuroprotecteurs médiés par l'œstradiol.

##### *Neuroprotection*

D'après la revue de Acáz-Fonseca et al. (2015), l'augmentation des ER dans les astrocytes réactifs pourrait favoriser le relargage de différents facteurs de croissance neuroprotecteurs (notamment BDNF, VEGF, IGF1, NGF). En effet, l'étude *in vitro* de Platania et al. (2005) a montré que les astrocytes cultivés dans du milieu contenant de l'œstradiol pouvaient relarguer des facteurs de croissance pour cellules gliales à l'origine d'une protection des motoneurones exposés à un stimulus neurotoxique. De plus, *in vitro*, les travaux de Carbonaro et al. (2009) ont montré que la surexpression de ER $\alpha$  dans les astrocytes permettait de diminuer la sensibilité des neurones corticaux exposés à un stimulus neurodégénératif (le peptide  $\beta$  amyloïde).

### *Stress oxydant*

L'œstradiol aurait également un effet protecteur en diminuant le stress oxydant et en protégeant les mitochondries (Acáz-Fonseca et al., 2015).

### *Neuroinflammation*

Les travaux de López Rodríguez et al. (2011) suggèrent que l'œstradiol pourrait moduler la réaction neuroinflammatoire locale induite dans un modèle de TC chez le rat en diminuant le nombre d'astrocytes réactifs. *In vitro*, les effets antiinflammatoires de l'œstradiol ont été étudiés par Lewis et al. (2008) avec l'utilisation de ligands sélectifs des ER ( $\alpha$  et  $\beta$ ) sur une culture d'astrocytes. Les cultures étaient prétraitées et mises en contact durant toute l'expérience avec de l'œstradiol ou des ligands sélectifs de l'un des deux récepteurs. Après le prétraitement, du LPS était ajouté pour induire une réponse inflammatoire pendant 24h. L'œstradiol et l'agoniste du ER $\beta$  diminuaient les taux de marqueurs inflammatoires (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et MMP-9) tandis que l'agoniste du ER $\alpha$  ne diminuait que le taux d'IL-1 $\beta$ . Ces résultats suggèrent que l'ER $\beta$  dans les astrocytes serait préférentiellement impliqué dans les processus antiinflammatoires de l'œstradiol.

### *Œdème*

D'après la revue de Acáz-Fonseca et al. (2014), les astrocytes présentent également des canaux à l'aquaporine 4 impliqués dans le contrôle de l'œdème qui participent à la migration astrocytaire, la formation de la cicatrice astrogliale et la régulation de la neuroinflammation et de la gliose. L'œstradiol pourrait contrôler les œdèmes en diminuant l'expression de l'aquaporine 4.

### *Excitotoxicité neuronale*

D'après les travaux de Pawlak et al. (2005), l'œstradiol pourrait diminuer l'excitotoxicité neuronale induite par le glutamate en augmentant l'expression des transporteurs glutamatergiques astrocytaires.

#### **2.4.4.3. Implication des ER dans la microglie**

D'après la revue de Villa et al. (2016), les ER sont également présents dans la microglie et pourraient, tout comme avec les astrocytes prévenir et contrôler la réponse inflammatoire. Les travaux de Vegeto et al. (2003) suggèrent que l'action anti-inflammatoire de l'œstradiol serait médiée par les ER $\alpha$  dans les cellules microgliales et non par les ER $\beta$ . En effet, ces chercheurs ont induit un état inflammatoire systémique par injection de LPS, chez des souris femelles avec une délétion de ER $\alpha$  ou ER $\beta$  et ont montré une diminution du nombre de cellules microgliales exprimant des marqueurs d'inflammation après l'ajout d'œstradiol chez les souris n'exprimant que ER $\alpha$ . Au contraire, les souris n'exprimant que ER $\beta$  n'avaient pas de modifications du nombre de cellules microgliales après ajout d'œstradiol. De façon intéressante, les auteurs ont mis en évidence que la réactivité de la microglie à l'injection de LPS ou de LPS et d'œstradiol n'était pas influencée par la phase du cycle œstral. Les travaux de Zhao et al. (2016) ont montré *in vitro*, sur des cultures de cellules microgliales que l'activation de GPER par un agoniste G1 pouvait réduire l'expression protéique de IL-1 $\beta$  et de TNF- $\alpha$ . Ainsi, GPER serait aussi impliqué dans les effets antiinflammatoires de l'œstradiol dans les cellules microgliales.

#### **2.4.4.4. Implication des ER dans les cellules endothéliales**

Les travaux de Jesmin et al. (2010) réalisés chez des souris femelles ont montré que les ER via la voie PI3K-Akt stimuleraient la formation de VEGF nécessaire à l'angiogenèse cérébrale (Jesmin et al., 2010). De plus, l'œstradiol, via ses ER augmenterait la synthèse de monoxyde d'azote qui joue un rôle critique dans le maintien du tonus vasculaire cérébral (Stirone et al., 2003). Les ER seraient également impliqués dans le maintien de l'intégrité de la BHE. L'activation de GPER, le récepteur à la protéine G couplé à ER $\alpha$  chez des rates ovariectomisées prévenait la rupture des jonctions serrées induite après ischémie (Lu et al., 2016). *In vitro*, l'activation des ER $\alpha$  et  $\beta$  par l'œstradiol dans les cellules endothéliales diminuait l'altération des jonctions serrées après ischémie/reperfusion (Shin et al., 2016). L'activation de ER $\alpha$  corrigeait la diminution de l'occludine tandis que l'activation de ER $\beta$  corrigeait la diminution de la claudine-5. Ces deux protéines étant impliquées dans les jonctions serrées de la BHE.

#### **2.4.5. Variation de l'expression des ER en fonction de l'âge et du sexe et du cycle œstral.**

##### *Condition physiologique*

En condition physiologique, de façon constitutive, dans le cortex, les souris femelles présentent un plus grand niveau protéique d'ER $\alpha$  et d'ER $\beta$  que les mâles. Chez les deux sexes, avec l'âge, le niveau protéique d'ER $\alpha$  ne semble pas diminuer à l'inverse du niveau protéique d'ER $\beta$  (Sharma and Thakur, 2006).

##### *Condition pathologique*

Les travaux de T.-Y. Chen et al. (2010) ont montré que, chez des rats ayant eu une injection de fer ferreux dans le noyau caudé (permettant de mimer les effets du fer relargué dans le parenchyme lors d'une hémorragie intracérébrale), le niveau d'expression protéique de ER $\alpha$  était différent en fonction du sexe avec une surexpression de ce récepteur chez les femelles. Quant à lui, le niveau d'expression protéique de ER $\beta$  n'était pas différent en fonction du sexe.



### **3. Statines, microhémorragies cérébrales et cognition**

#### **3.1. Pharmacologie des statines**

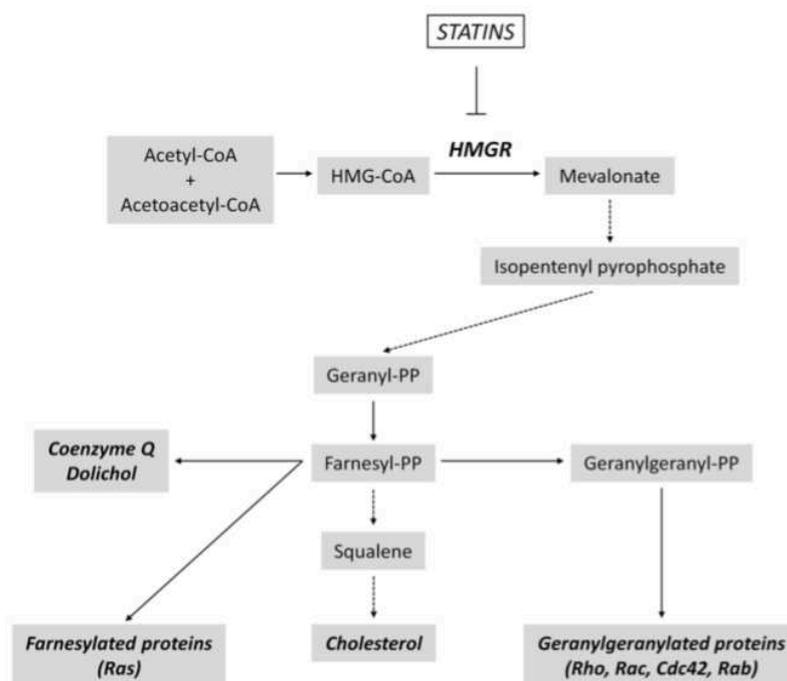
##### **3.1.1. Classe pharmacothérapeutique et indications**

Les statines sont une classe de médicaments hypolipémiants. Actuellement, 5 statines sont disponibles sur le marché français : l'atorvastatine, la pravastatine, la rosuvastatine, la simvastatine et la fluvastatine.

L'atorvastatine, la rosuvastatine et la simvastatine sont indiqués dans le traitement des hypercholestérolémies familiales homozygotes en complément d'un régime et d'autres traitements hypolipémiants. Toutes les statines sauf la fluvastatine sont indiquées en prévention des maladies cardiovasculaires chez les sujets adultes considérés à risque de survenue d'un premier événement cardiovasculaire. La pravastatine, la fluvastatine et la simvastatine sont également indiquées dans la prévention secondaire cardiovasculaire (réduction de la mortalité et de la morbidité cardiovasculaires) chez les patients ayant une pathologie cardiovasculaire avérée d'origine athéroscléreuse ou un diabète.

##### **3.1.2. Pharmacodynamie**

Les statines sont des inhibiteurs sélectifs et compétitifs de la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A réductase (HMG-CoA réductase), l'enzyme responsable de la biotransformation de l'HMG-CoA en mévalonate, un précurseur du cholestérol (cf Figure 15). Les statines entraînent une diminution de la synthèse du cholestérol total, du « low-density lipoprotein » (LDL)-cholestérol en stimulant l'expression des récepteurs LDL, augmentent le « high-density lipoprotein » (HDL)-cholestérol et diminuent les triglycérides (McFarland et al., 2014). En inhibant l'HMG-CoA réductase, les statines diminuent la synthèse d'intermédiaires isoprénoïdes tels que le géranylgeranylpyrophosphate (géranylgeranyl-PP) et le farnésylpyrophosphate (farnésyl-PP) (cf Figure 15). Par conséquent, les statines diminuent l'isoprénylation (modifications post traductionnelles de protéines par fixation de résidus géranyl ou farnésyl, permettant aux protéines G de se fixer à la membrane cellulaire, d'être transportées dans la cellule et de passer de la forme active à inactive) de protéines G tels que Rho, Rac, Ras et Rab et Cdc42. Ces petites protéines G sont impliquées dans de nombreuses voies de signalisation. En inhibant ces isoprénoïdes, les statines exercent de nombreux effets « pléiotropes » qui pourraient leur conférer des propriétés neuroprotectrices et procognitives (décrits en 3.2)(Mendoza-Oliva et al., 2014).



**Figure 15:** La voie de l'acide mévalonique conduisant à la formation du cholestérol et de protéines responsables des effets pléiotropes des statines. D'après Fracassi et al. 2019.  
 HMGR : HMG-CoA réductase ; PP : pyrophosphate

### 3.1.3. Pharmacocinétique

Les statines sont absorbées par voie orale et subissent un effet de premier passage hépatique diminuant leur biodisponibilité de 5 à 30%. Elles pénètrent dans les cellules intestinales de manière passive ou par transport actif (cf Figure 16) et sont ensuite transportées par la circulation sanguine porte dans les hépatocytes. Certaines statines dont l'atorvastatine peuvent être partiellement métabolisées par les cytochromes 3A4 et 3A5 dans la cellule intestinale et dans les hépatocytes (réactions de phase I). Toujours dans les hépatocytes, les statines peuvent subir une glucurono-conjugaison ou une sulfo-conjugaison médiée par les enzymes polymorphes glucuronosyltransférase et sulfotransférase (réactions de phase II) (Faubion et al., 2019). Dans le sang, les statines se lient à l'albumine de façon variable (de 43 à 99%) et présentent des demi-vies allant d'un demi-heure à plus de 20 heures (Shitara and Sugiyama, 2006). Enfin, les statines peuvent être transportées hors de l'hépatocyte, dans la bile et seront éliminées ou dans la circulation sanguine et seront éliminées par filtration rénale.

Les statines présentent des profils de solubilités variés influant directement leur capacité à traverser la BHE. D'après la revue de Fracassi et al. (2019), la simvastatine, la lovastatine et la pravastatine peuvent être détectées dans le cortex cérébral de souris à 1, 3 et 6 heures après une seule administration orale. Les niveaux de détection de ces composés reflètent leur lipophilie : la simvastatine et la lovastatine sont administrées sous forme de lactones hydrophobes qui peuvent facilement traverser la BHE. Au contraire, la forme acide de la

pravastatine est très hydrophile, ce qui empêche la perméabilité de la BHE à celle-ci (Fracassi et al., 2019). Cependant, la capacité de la pravastatine (et d'autres statines sous forme acide ouverte comme l'atorvastatine) à atteindre le SNC peut s'expliquer par des mécanismes de transport actifs. Ces statines sont les substrats d'un transporteur d'anion organique polypeptidique (OATP) 2 (Fracassi et al., 2019). L'OATP2 s'exprime à des niveaux considérables dans la BHE, ce qui suggère que ce transporteur joue un rôle clé dans le passage des statines acides des compartiments extracellulaires à intracellulaires dans le cerveau. Dans le SNC, le cholestérol participe à des processus cellulaires clés tels que la différenciation cellulaire, la formation dendritique et synaptique, le guidage axonal, la neurotransmission ou même l'endocytose. (Mendoza-Oliva et al., 2014). Néanmoins, la biosynthèse du cholestérol central serait régulée de la même manière que celle du cholestérol périphérique en impliquant notamment l'HMG-CoA réductase sur laquelle les statines peuvent intervenir.

Enfin, il est également intéressant de noter que tout comme les statines, les oestrogènes sont des substrats des enzymes responsables de réaction de phase I ou II (cf Figure 16) ce qui rendrait au niveau périphérique, des phénomènes de compétition possibles entre les statines et les œstrogènes. De plus, d'après les travaux de Kanai et al. (1996), les OATP sont également des transporteurs de l'œstradiol glucuroconjugué. Il n'est ainsi pas exclu qu'un phénomène de compétition pourrait se produire entre les statines et les œstrogènes lors du passage de la BHE.

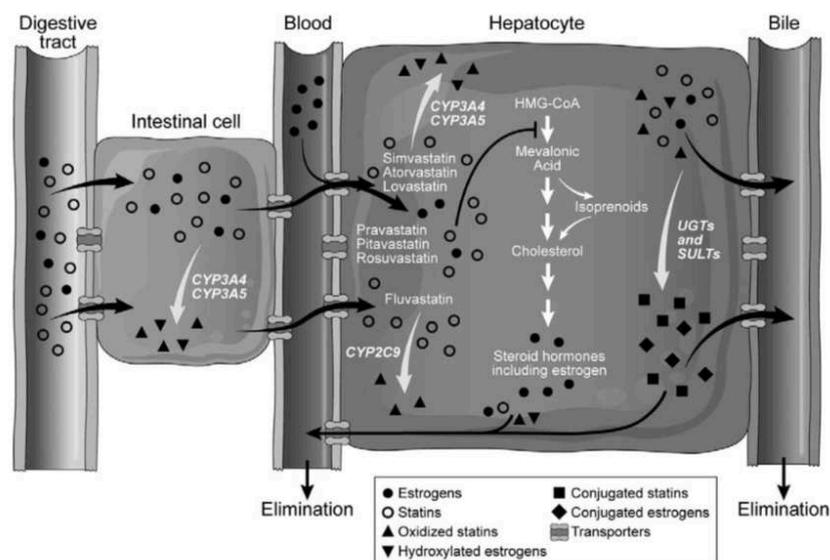


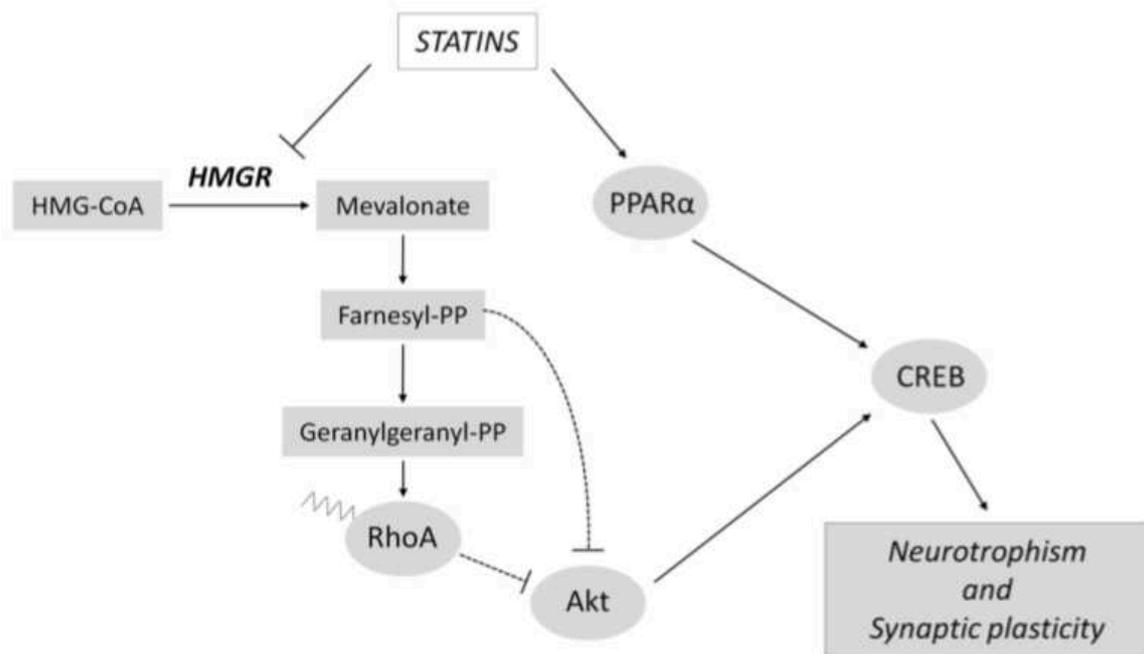
Figure 16 : Pharmacocinétique des statines et interactions potentielles avec les œstrogènes. D'après Faubion et al., 2019.

## **3.2.Effets pléiotropes des statines : apport des études précliniques**

### **3.2.1. Effets sur la mémoire, la plasticité synaptique, la neurogénèse**

Les statines pourraient avoir un effet bénéfique sur les processus cognitifs et la mémoire en agissant par le biais de différents mécanismes dans l'hippocampe. D'après la revue de Fracassi et al. (2019), en inhibant l'HMG-CoA réductase, les statines vont diminuer l'isoprénylation de RhoA qui va entraîner une augmentation de la phosphorylation de Akt et augmenter *in fine* la transcription de la protéine « C-AMP Response Element-binding protein » (CREB) impliquée dans l'expression de facteurs neurotrophiques tels que le BDNF qui intervient dans la neurogénèse et dans les processus cognitifs (cf Figure 17). De plus, d'après les travaux de Kurata et al. (2012), les statines sont des ligands du récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ). L'activation de ce récepteur nucléaire résulte également dans la transcription de CREB. La diminution de la synthèse de certains isoprénoïdes par les statines va également entraîner l'activation de la voie WNT/ $\beta$  caténine qui va stimuler la neurogénèse (Robin et al., 2014). En diminuant la synthèse du farnésyl pyrophosphate, les statines augmentent l'expression du récepteur nicotinique à l'acétylcholine  $\alpha 7$ , lui aussi impliqué dans la phosphorylation de kinases comme Akt et ERK (Wang et al., 2015; Chen et al., 2016). Par ces différents mécanismes, les statines vont augmenter la potentialisation à long terme des neurones hippocampiques et donc améliorer la plasticité synaptique résultant en une amélioration de la mémoire (Métais et al., 2014; Chen et al., 2016).

Les propriétés procognitives des statines ont été démontrées dans divers modèles de maladies neurodégénératives ou neurovasculaires ou même de traumatismes crâniens (Qu et al., 2005; Peng et al., 2014; Wang et al., 2015; Zhou et al., 2016; Bergeron et al., 2018). La majorité des études retrouvées mettait en évidence une correction de l'altération induite par la pathologie modélisée sur différents types de mémoires testées (mémoire de reconnaissance, de référence spatiale, visuospatiale, de travail). A titre d'exemple, l'atorvastatine améliorait la mémoire de reconnaissance (évaluée par le test de reconnaissance de nouvel objet) et la mémoire de référence spatiale (évaluée par le labyrinthe de Morris) dans un modèle de souris ayant la maladie d'alzheimer (APP/PS1) (Zhou et al., 2016). Dans un contexte de MHC corticale, l'atorvastatine corrigeait également l'altération de la mémoire de référence spatiale (évaluée par le labyrinthe de Barnes) et de la mémoire visuospatiale (évaluée par le Paired-Associate Learning) (Bergeron et al., 2018).



*Figure 17 : Les statines sont capables d'induire le neurotrophisme et la plasticité synaptique en activant CREB par des mécanismes dépendants et indépendants de la voie du mévalonate. D'après Fracassi et al., 2019.*

### 3.2.2. Effets sur l'inflammation et sur le stress oxydant

De nombreuses études ont montré que les statines avaient des propriétés anti-inflammatoires. La revue de Mendoza-Oliva, Zepeda, et Arias (2014) indique que l'atorvastatine diminuait la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1, l'IL-6 et le TNF- $\alpha$  dans un modèle murin de maladie d'Alzheimer. Cette diminution de cytokines était associée à une amélioration des fonctions cognitives. D'après les travaux de Chu et al. (2015) réalisés sur un modèle lésionnel de moelle épinière chez le rat, l'atorvastatine diminuerait également la production de cytokines pro-inflammatoires en diminuant le facteur de transcription « nuclear factor kappa B » NF- $\kappa$ B. L'action anti-inflammatoire des statines pourrait aussi être médiée en partie par leur action sur les PPAR $\alpha$ . Les travaux de Ouk et al. (2014) réalisés sur un modèle de souris ischémié par occlusion de l'artère cérébrale moyenne chez des souris wild-type et des souris ayant une délétion du PPAR $\alpha$  ont montré que ce récepteur était impliqué dans la modulation de l'interleukine 6 et que l'expression de ICAM1, permettant entre autres l'extravasation des leucocytes dans le parenchyme cérébral, était diminuée par l'atorvastatine.

D'autres études ont également montré que les statines diminuaient l'activation gliale dans des modèles de traumatisme crânien notamment (Holmberg et al., 2008; Li et al., 2009). D'après la revue de Fracassi et al. (2019), la diminution des cytokines pro-inflammatoires serait liée à la diminution de l'isoprénylation de la protéine Ras et de Rac qui diminuerait l'activation

des astrocytes et de la microglie. De plus, Rac joue un rôle essentiel dans l'activation de la « nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase » (NADPH oxydase), enzyme qui génère des espèces réactives de l'oxygène. En inhibant l'isoprénylation de Rac, les statines diminueraient alors le stress oxydant.

### **3.2.3. Effets sur l'unité neurovasculaire**

Les statines pourraient exercer de nombreux effets bénéfiques sur la paroi vasculaire. Les travaux de Hamel et al. (2016) ont montré dans un modèle murin de maladie d'Alzheimer que la simvastatine rétablissait les réponses dilatatoires de l'endothélium et des cellules musculaires lisses dans les artères cérébrales, ainsi que la disponibilité initiale de monoxyde d'azote dans la paroi vasculaire des artères cérébrales. De plus, la simvastatine diminuait le stress oxydant vasculaire. La simvastatine en diminuant la prénylation des Rho GTPases, permettrait de rétablir le fonctionnement de divers canaux potassiques endothéliaux ou des cellules musculaires lisses qui contribuent aux réponses dilatatoires, en plus d'augmenter la biodisponibilité du monoxyde d'azote. D'après les travaux de Kurata et al. (2012) dans un autre modèle murin de maladie d'Alzheimer, l'atorvastatine préservait la structure fondamentale de la membrane basale et participait à conserver l'intégrité de l'unité neurovasculaire.

Dans le modèle murin d'ischémie par occlusion de l'artère cérébrale moyenne de Potey et al. (2015), l'atorvastatine augmentait la reperfusion des capillaires sanguins cérébraux. Enfin, d'après les travaux de Kureishi et al. (2000) mené sur des membres ischémiés de lapins normocholestérolémiques, la simvastatine pourrait également promouvoir l'angiogenèse par la voie de signalisation Akt en augmentant la production de VEGF.

### **3.3. Statines et microhémorragies cérébrales**

#### **3.3.1. Études cliniques**

Les études observationnelles et interventionnelles se sont intéressées au risque de développer des MHC avec la prise de statines. L'étude de Romero et al. (2014) menée sur 1965 sujets âgés de 66,5 ans en moyenne et issus de la cohorte de Framingham a montré que l'utilisation de statines était associée à un risque augmenté de développer des MHC lobaires (OR= 1,52 ; IC<sub>95%</sub> [1,02 ; 2,27]). Un résultat similaire a été retrouvé dans l'étude de Haussen Diogo C. et al. (2012) menée sur une cohorte de 163 sujets américains, âgés en moyenne de 60 ans et ayant eu un AVC hémorragique. Néanmoins, l'étude comparative de Martí-Fàbregas et al. (2018) réalisée sur 477 espagnols ayant eu un AVC ischémique ou un accident ischémique transitoire d'origine cardioembolique, n'a pas montré que les patients sous statines avaient un risque augmenté de développer des MHC. Enfin, une analyse post-hoc issue d'un essai contrôlé randomisé chez 81 sujets chinois ayant eu un AVC ischémique n'a pas montré que la prise de statine était associée à une modification de l'incidence des MHC (Xiong et al., 2014). Aux vues des résultats et du type de population, différents en fonction des études, il est difficile de tirer une conclusion formelle sur l'association entre statines et risque de MHC.

#### **3.3.2. Études précliniques**

Seuls 2 articles ont étudié l'effet d'une pharmacomodulation par atorvastatine dans des modèles de MHC. Les travaux de Reuter et al. (2016) réalisés sur un modèle transgénique (APP23) ont montré que l'atorvastatine ne modifiait pas le nombre de MHC. Dans un contexte de MHC corticale induit par injection de collagénase, l'atorvastatine améliorait la mémoire de référence spatiale ainsi que la mémoire visuospatiale, toutes deux altérées par la MHC (Bergeron et al., 2018).

Les effets de l'atorvastatine et de la simvastatine ont cependant bien été caractérisés dans des modèles d'hémorragie intracérébrale et pourraient s'appliquer dans des modèles de MHC. Dans le modèle d'hémorragie basé sur l'injection de collagénase, d'après les travaux de Cui et al. (2012) et de Ewen et al. (2013), l'atorvastatine aurait des propriétés anti-oedémateuses et diminuerait la mort neuronale et l'inflammation associées à l'hémorragie. Dans le modèle d'hémorragie basé sur l'injection de sang autologue, d'après Seyfried et al. (2004), l'atorvastatine augmenterait la synaptogenèse et la migration neuronale dans la zone hémorragique. D'après Karki et al. (2009), Wang et al. (2018) et Chen et al. (2019), la simvastatine aurait des propriétés anti-oedémateuses et augmenterait le recrutement de cellules microgliales de type M2 (anti-inflammatoires) notamment par l'activation du récepteur PPAR $\gamma$ .

Enfin, d'après Yang et al. (2012), l'atorvastatine et la simvastatine augmenteraient également la synthèse de facteurs de croissance BDNF, VEGF, NGF et la phosphorylation d'Akt et de GSK3 $\beta$ .

### **3.4. Statines et cognition**

#### **3.4.1. Études cliniques**

De nombreuses études se sont intéressées à l'effet des statines sur la cognition dans diverses populations de sujets âgés (sujets ayant des fonctions cognitives normales, des troubles cognitifs légers ou des sujets ayant la maladie d'Alzheimer ou une démence vasculaire).

##### **3.4.1.1. Troubles cognitifs**

Bien que des effets bénéfiques sur la cognition aient été mis en évidence dans la majorité des études observationnelles, ils n'ont pas été confirmés dans des études de plus haut niveau de preuve (Barus et al., 2019). En effet, les méta-analyses incluant des essais contrôlés randomisés (Richardson et al., 2013; Ott et al., 2015) n'ont pas montré d'effets bénéfiques des statines sur la cognition chez les sujets ayant une cognition normale, des troubles cognitifs légers ou la maladie d'Alzheimer. Par exemple, la méta-analyse de Ott et al. (2015) a inclus 14 essais contrôlés randomisés avec un total de 27643 sujets et n'a pas montré de modification des fonctions cognitives chez des sujets sains ou des sujets ayant la maladie d'Alzheimer.

##### **3.4.1.2. Démences**

La méta-analyse de McGuinness et al. (2014) s'est intéressée à l'effet des statines dans le traitement de la démence. Cette méta-analyse a inclus 4 essais contrôlés randomisés qui évaluaient l'effet d'un traitement de 6 mois minimum par statines chez un total de 1154 sujets ayant une démence et âgés de 50 à 90 ans. La prise de statines chez des patients ayant une démence n'améliorait pas les fonctions cognitives. Deux ans plus tard, la revue de McGuinness et al. (2016) s'est intéressée à l'effet des statines sur la prévention des démences. Deux essais contrôlés randomisés ont été inclus avec un total de 26340 sujets âgés d'au moins 65 ans qui présentaient une fonction cognitive normale à l'inclusion, évalués sur l'effet d'un traitement par statine d'une durée minimale de 12 mois. Ces études suggèrent que les statines données chez des sujets de plus de 65 ans présentant des facteurs de risque cardiovasculaires ne modifieraient pas l'incidence de troubles cognitifs ou de démence. Néanmoins, l'évaluation de la cognition n'était pas le critère principal dans ces 2 essais.

Au contraire des travaux de McGuinness et al. (2016; 2014), toutes les méta-analyses comportant des études observationnelles, d'un plus faible niveau de preuve, suggèrent une

diminution du risque de démence associé à la prise de statines (Song et al., 2013; Swiger et al., 2013; Wong et al., 2013; Macedo et al., 2014; Zhang et al., 2018). D'après les études incluses dans ces méta-analyses, le fait de commencer le traitement par de fortes doses de statines lipophiles avant 80 ans et de prendre ces statines pendant une longue période pourrait réduire le risque de démence.

#### **3.4.1.3. Conclusion**

Les études à l'appui d'un effet préventif causal ou curatif des statines sur le risque de déclin cognitif ou de démence sont contradictoires. En dépit des études observationnelles qui montrent un effet bénéfique des statines, celui-ci n'est pas retrouvé dans des études de plus haut niveau de preuve. De plus, la revue de Power et al. (2015) souligne que de nombreuses études pourraient présenter un biais de causalité inverse. En effet, les troubles cognitifs chez les patients diminueraient leur adhérence au traitement et par conséquent la motivation du médecin à prescrire des statines ; de ce fait, ces patients ayant des troubles cognitifs sont inclus dans les groupes de patients contrôles.

#### **3.4.2. Études précliniques**

Le rationnel de l'effet procognitif des statines ainsi que certaines études précliniques évaluant l'effet des statines sur la cognition ont été détaillées plus haut (section 3.2.1).

### **3.5. Statines et sexe**

La revue de Faubion et al. (2019) souligne l'importance de considérer que les statines pourraient avoir une efficacité différente en fonction du sexe et ce indépendamment de la réduction du LDL cholestérol qui apparaît être similaire chez les hommes et les femmes d'après la méta-analyse du groupe Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaboration et al. (2015) incluant 174000 sujets (27% de femmes) issues de 27 essais contrôlés randomisés.

#### **3.5.1. Prévention des maladies cardiovasculaires**

D'après la revue de Faubion et al. (2019), les statines n'auraient pas d'effet sur le risque de mortalité, le risque d'AVC et le risque d'insuffisance coronarienne en prévention primaire chez les femmes. Chez les hommes, les statines diminueraient le risque d'insuffisance coronarienne mais pas le risque de mortalité ni le risque d'AVC en prévention primaire. En prévention secondaire, les statines diminueraient le risque de mortalité toutes causes et le risque d'AVC chez les hommes uniquement.

### **3.5.2. Microhémorragies cérébrales**

Aucune étude n'a à ce jour été réalisée sur l'effet des statines en fonction du sexe sur le risque de développer des MHC ou sur l'impact cognitif des MHC.

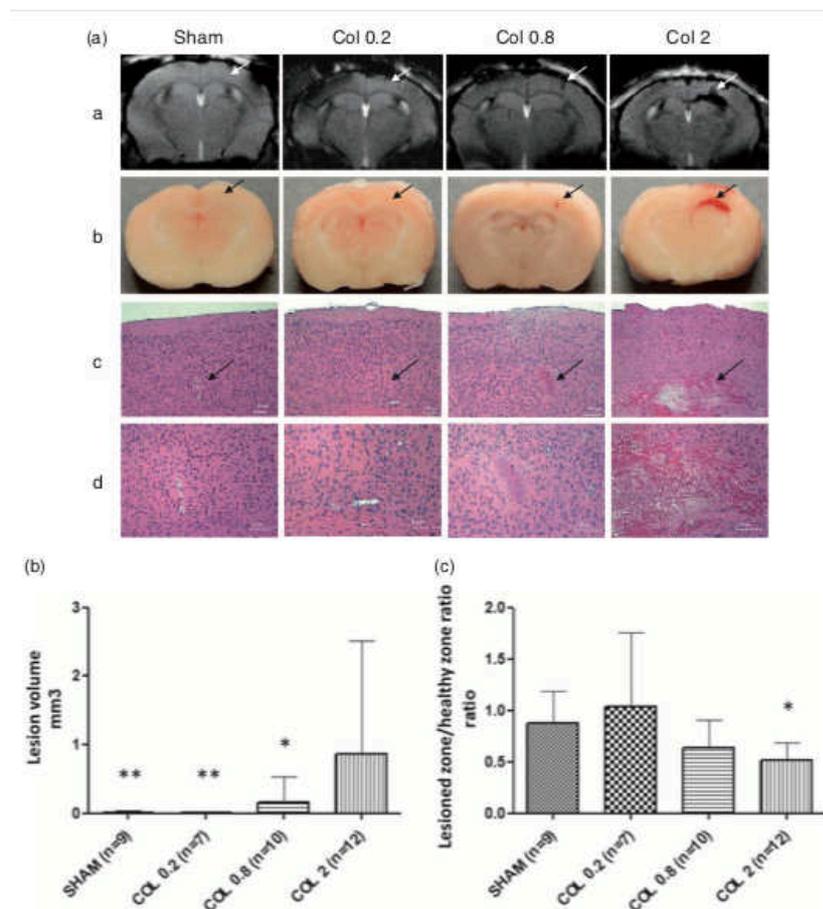
### **3.5.3. Démence de type maladie d'Alzheimer**

L'étude de Zissimopoulos et al. (2017) incluant 399979 sujets américains de plus de 65 ans issus d'un échantillon des bénéficiaires du Medicare a montré une diminution du risque de développer la maladie d'Alzheimer au cours du temps similaire entre les hommes (HR=0,88 ; IC<sub>95%</sub>[0,83 ; 0,93] ; p<0,001) et les femmes (HR=0,85 ; IC<sub>95%</sub>[0,82 ; 0,89] ; p<0,001) avec une forte exposition de statines suggérant donc un effet similaire des statines sur la réduction du risque de maladie d'Alzheimer. Cependant, une étude de cohorte de G. Li et al. (2006) menée sur un plus faible effectif avec 2356 sujets américains a évalué l'association entre statines et incidence de la maladie d'Alzheimer et a montré que le risque était diminué chez les hommes (RR=0,19 ; IC<sub>95%</sub>[0,05 ; 0,67]) mais pas chez les femmes (RR=0,73 ; IC<sub>95%</sub>[0,31 ; 1,70]). Ces études ne permettent pas de conclure formellement quant à un effet des statines différent en fonction du sexe sur le risque de démence. Les effets procognitifs des statines pourraient être en partie expliqués par leur action sur les PPAR $\alpha$  (voir la section 3.2.1). D'après les travaux de Dotson et al. (2016), les PPAR $\alpha$  seraient soumis à un dimorphisme sexuel avec une plus grande expression protéique chez le mâle, que chez la femelle.

## 4. Mise en place et état des lieux des connaissances sur le modèle de MHC

### 4.1. Mise en place du modèle

La modélisation d'une MHC corticale chez des souris C57BL/6J a été mise en place et valorisée dans le laboratoire par une publication (Bergeron et al., 2018) et par la soutenance de deux thèses de sciences (Bergeron, 2018; Chen, 2018). Une injection de 1 $\mu$ L de collagénase (enzyme protéolytique de type VII) dans le cortex primaire sensorimoteur a été réalisée chez des souris C57BL/6J âgées de 10 à 12 semaines. La collagénase va créer une microhémorragie cérébrale en agissant sur la membrane basale des vaisseaux sanguins. Le choix de la dose a été déterminé à l'aide d'une gamme de 3 concentrations 0,2  $\mu$ U ; 0,8  $\mu$ U et 2  $\mu$ U. Aux vues de l'effet dose, pour induire une MHC, la dose retenue était de 0,8  $\mu$ U (cf Figure 18). Cette dose induisait une lésion correspondante à la somme du poids moyen des MHC retrouvées chez l'homme soit environ 0,006% (toute proportion gardée avec la souris).



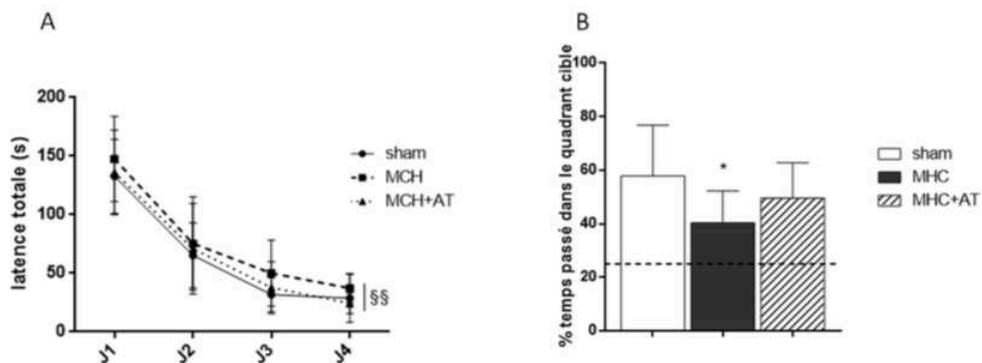
**Figure 18 : Résultats issus de l'article de Bergeron et al 2018.**

(a) Vue coronale de a) l'IRM T2\*, b) les cerveaux à l'état frais, c et d) les tissus colorés par H&E ; pour les différents groupes (sham, COL 0,2, COL 0,8 et COL 2) 24 h après la chirurgie stéréotaxique. Les flèches représentent le site d'injection. (b) Volume de la lésion (exprimé en mm<sup>3</sup>) dans les groupes COL 0,2, COL 0,8 et COL 2. Le volume était significativement différent dans chaque groupe par rapport au groupe COL 2 \*  $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$  ; (c) Le rapport zone lésionnelle T2\*/zone saine pour les groupes sham, COL 0,2, COL 0,8 et COL 2 ; \*  $p < 0,05$ . Les données sont exprimées sous forme de moyennes +/- SD.

## 4.2. Effet de la microhémorragie chez les souris mâles

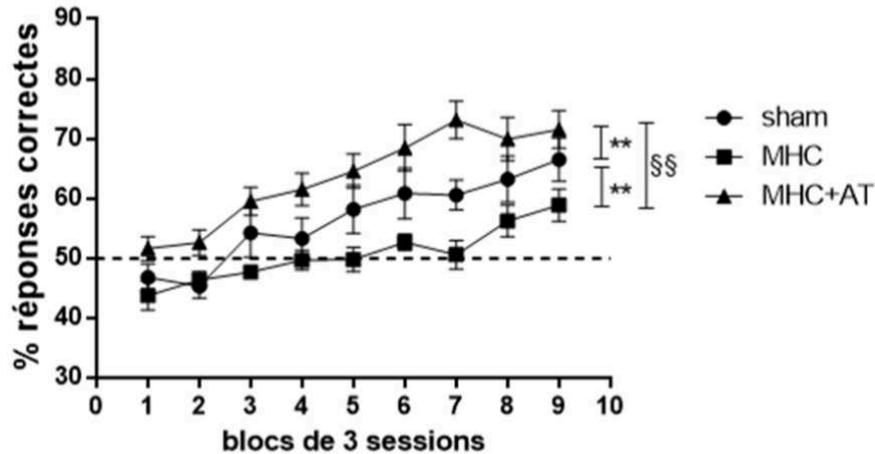
Dans l'article de Bergeron et al. (2018), le retentissement de la MHC a été caractérisé d'un point de vue fonctionnel avec une évaluation neurocomportementale et morphologique 6 semaines après la chirurgie chez les souris mâles. L'évaluation morphologique par IRM et par tomographie par émission de positons (TEP) avec injection de Fluorodeoxyglucose (FDG) retrouvait notamment un hypométabolisme cortical et hippocampique. L'évaluation neurocomportementale retrouvait une altération de deux types de mémoire essentiellement hippocampiques : la mémoire de référence spatiale (cf Figure 19) (évaluée par le test de Barnes) et la mémoire visuo-spatiale (cf Figure 20) (évaluée par le Touchscreen avec le test du Paired Associate Learning task)). Cet article suggérait que la MHC avait à la fois un retentissement local (hypométabolisme cortical) et à distance, dans l'hippocampe (hypométabolisme et altération de la mémoire).

De plus, afin de déterminer la sensibilité du modèle à une modulation pharmacologique, un groupe de souris MHC a été traité par atorvastatine (5mg/kg/jour). Il a été retrouvé une correction de l'altération induite par la MHC avec l'atorvastatine.



**Figure 19: Évaluation de l'apprentissage et de la mémoire de référence spatiale par le labyrinthe de Barnes chez les souris mâles. D'après Bergeron et al 2018.**

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



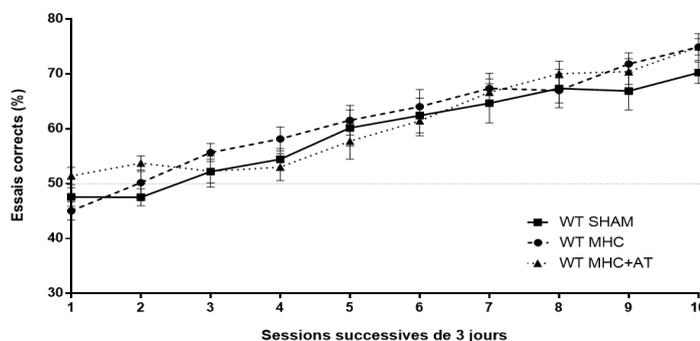
**Figure 20: Évaluation de la mémoire visuospatiale par le test dPAL chez les souris mâles. D'après Bergeron et al 2018.**

La ligne pointillée représente le pourcentage de réponses correctes dû au hasard. sham n=7 ; MHC n=9 ; MHC+AT n=9 ; \*\* p<0,01 MHC ou MHC+AT vs sham et §§ p<0,01 MHC vs MHC+AT. Les données sont représentées en moyennes ± SD.

### 4.3.Effet de la microhémorragie chez les souris femelles

La réalisation d'une MHC corticale a également été réalisée selon le même protocole chez des souris femelles C57BL/6J dans les mêmes conditions que les souris mâles (Chen, 2018). La sensibilité du modèle à une modulation pharmacologique par atorvastatine à la même dose a également été testée.

L'évaluation neurocomportementale à 6 semaines post-chirurgie ne retrouvait aucun effet de la microhémorragie sur la mémoire de travail (évaluée par le labyrinthe en Y), la mémoire de reconnaissance (évaluée par le test de reconnaissance d'objet) ou la mémoire visuospatiale (évaluée par le Touchscreen avec le test du paired-associate learning task) (cf Figure 21). De plus, contrairement aux souris mâles, l'atorvastatine n'améliorait pas la mémoire visuospatiale.



**Figure 21 : Évaluation de la mémoire visuospatiale par le test dPAL chez les souris femelles.**

Les résultats sont représentés par des blocs de trois jours. sham : n=12 ; MHC : n=11 ; MHC+AT : n=12. Les données sont représentées en moyennes ± SD.

#### 4.4. Conclusion

Chez la souris, la réponse fonctionnelle à une MHC s'avère être différente en fonction du sexe en termes d'altérations fonctionnelles induites (présentes chez les mâles, absentes chez les femelles).

L'effet du sexe reste assez peu étudié en préclinique. La revue de McFall et al. (2020) réalisée sur les études précliniques publiées entre 2005 et 2015 portant sur les troubles cognitifs d'origine vasculaire a montré que 62% des études étaient réalisées chez le mâle, 3% chez les femelles, 16% chez les 2 sexes et dans 19% des cas, le sexe n'était pas spécifié. Sur les modèles de traumatisme crânien, la revue de Späni, Braun, et Van Eldik (2018) a montré que la majorité des études sont réalisées chez le mâle (cf Figure 22). De plus, cette revue a montré que sur une période de 6 ans (entre 2011 et 2016), en proportion, le nombre d'études réalisé chez les femelles n'a quasiment pas évolué. De façon générale, peu d'études précliniques sont donc réalisées à la fois chez le mâle et chez la femelle alors que de nombreuses différences en fonction du sexe sont mises en évidence, notamment dans des modèles d'hémorragie intracérébrales ou de traumatismes crâniens (Lei et al., 2012; Xie et al., 2016; Späni et al., 2018; Tucker et al., 2019).

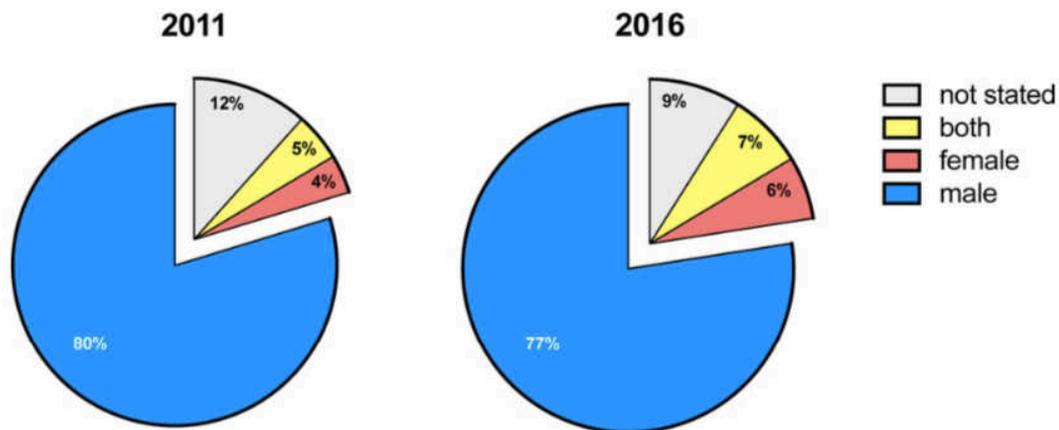


Figure 22 : Distribution du sexe des animaux dans les études précliniques sur les traumatismes crâniens en 2011 et 2016. D'après Späni, Braun, et Van Eldik 2018.

# **OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE**

Les données issues des deux thèses précédentes ont montré que 6 semaines après la chirurgie, la microhémorragie cérébrale n'altérait la mémoire visuospatiale que chez les mâles. De plus, l'atorvastatine n'exerçait des effets procognitifs que chez les mâles. De ces résultats, nous en avons tiré l'hypothèse que l'effet d'une microhémorragie cérébrale pouvait être différent selon le sexe, tant sur les mécanismes cellulaires et moléculaires mis en place après l'induction, que sur la modulation pharmacologique.

Compte tenu des données actuelles sur les microhémorragies cérébrales exposées précédemment, ce travail de thèse s'est divisé en deux objectifs principaux. Le premier objectif a consisté à étudier les mécanismes mis en place après la formation d'une MHC corticale, au niveau local et au niveau hippocampique, chez des souris mâles et femelles. Le deuxième objectif a consisté à déterminer dans un contexte pathologique, chez des souris mâles et femelles ayant une microhémorragie cérébrale, les effets de l'atorvastatine sur certains des mécanismes étudiés.

# **MATERIEL ET METHODES**

# 1. Protocoles expérimentaux

## 1.1. Étude des mécanismes induits par la microhémorragie à court et moyen terme

Des souris mâles et femelles de fond génétique C57BL/6J (Elevage Janvier, Le Genest Saint Isle, France) pesant entre 28 et 32 grammes pour les mâles et 20 et 22 grammes pour les femelles ont été utilisées pour ce protocole. Tout comme pour les travaux de Bergeron (2018) et Chen (2018), les animaux étaient logés dans des cages transparentes (cinq ou moins par cage) avec du matériel d'enrichissement et maintenus dans une pièce climatisée (température 19-24°C ; humidité relative : 45-65%) avec un cycle jour/nuit de 12 heures (lumières allumées à 7h00), et de la nourriture et de l'eau *ad libitum*. Ce protocole (cf Figure 23) avait pour objectif d'étudier certains mécanismes mis en place de façon aiguë (24h post-chirurgie) et subaiguë (6 semaines post-chirurgie) après la formation de la MHC. Une étude ancillaire à ce protocole avait pour objectif d'évaluer l'effet du cycle œstral sur le pourcentage de succès de la chirurgie. Pour l'étude ancillaire, 2 à 3 souris de chaque groupe ont été mis à mort pour évaluer l'état de la barrière hémato-encéphalique par injection de FITC. Les animaux étaient mis à mort à 6 semaines post-chirurgie et les cerveaux étaient prélevés pour réaliser soit les analyses immunohistochimiques soit les analyses de biologie moléculaire.

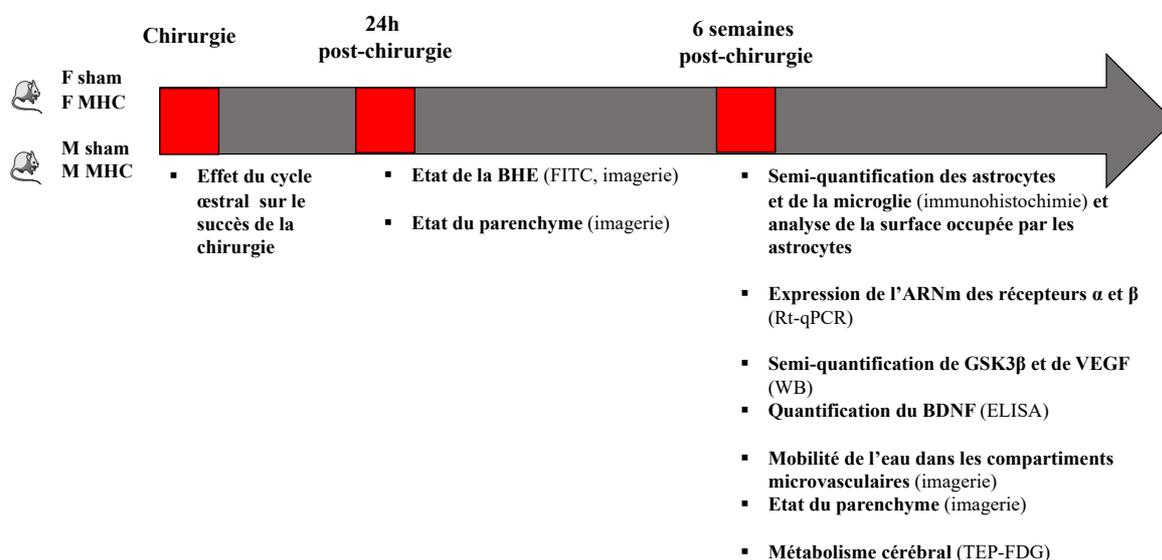


Figure 23 : Protocole expérimental 1 et étude ancillaire.

## 1.2. Étude de l'effet de l'atorvastatine dans un contexte de microhémorragie cérébrale

Ce deuxième protocole (cf Figure 24) visait à étudier au sein de souris ayant une microhémorragie cérébrale, l'effet de l'atorvastatine sur les mécanismes étudiés dans le premier protocole. Ce protocole a été réalisé parallèlement au premier. Les souris ayant un traitement par atorvastatine provenaient du même éleveur et ont été hébergées dans les mêmes conditions que les autres souris. La seule différence résidait dans l'alimentation, la prise de traitement se faisant *per os* avec des croquettes préparées au laboratoire et contenant de l'atorvastatine (1 comprimé d'atorvastatine 10mg dissous dans un liquide véhicule et mélangé avec 300g de croquettes). Le liquide véhicule était composé d'eau distillée, de Tween 20 et de carboxyméthylcellulose. Dès la chirurgie et pendant tout le temps de suivi, les groupes MHC+AT recevaient un traitement par atorvastatine (5mg/kg/j). Les animaux étaient mis à mort à 6 semaines post-chirurgie et les cerveaux étaient prélevés pour réaliser soit les analyses immunohistochimiques soit les analyses de biologie moléculaire.

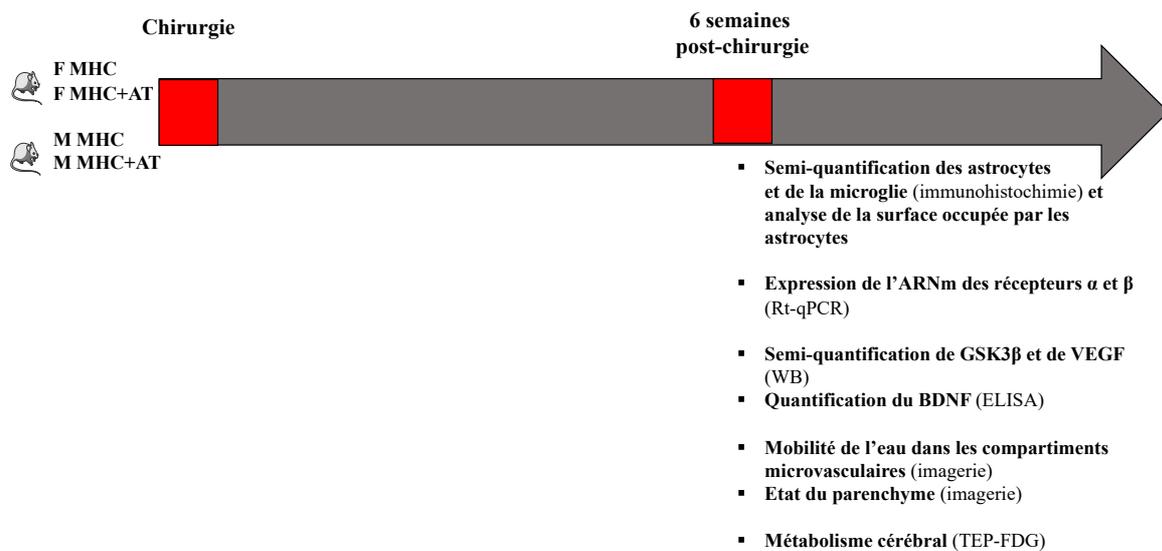


Figure 24: Protocole expérimental 2.

## 1.3. Éthique

Les directives européennes et françaises relatives à la protection et à l'utilisation des animaux de laboratoire ont été respectées. Le protocole a reçu l'accord du comité d'éthique en expérimentation animale (CEEA n°75) du ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. Ce protocole est enregistré sous le numéro 2018042309364017-v5.

## 2. Méthodes

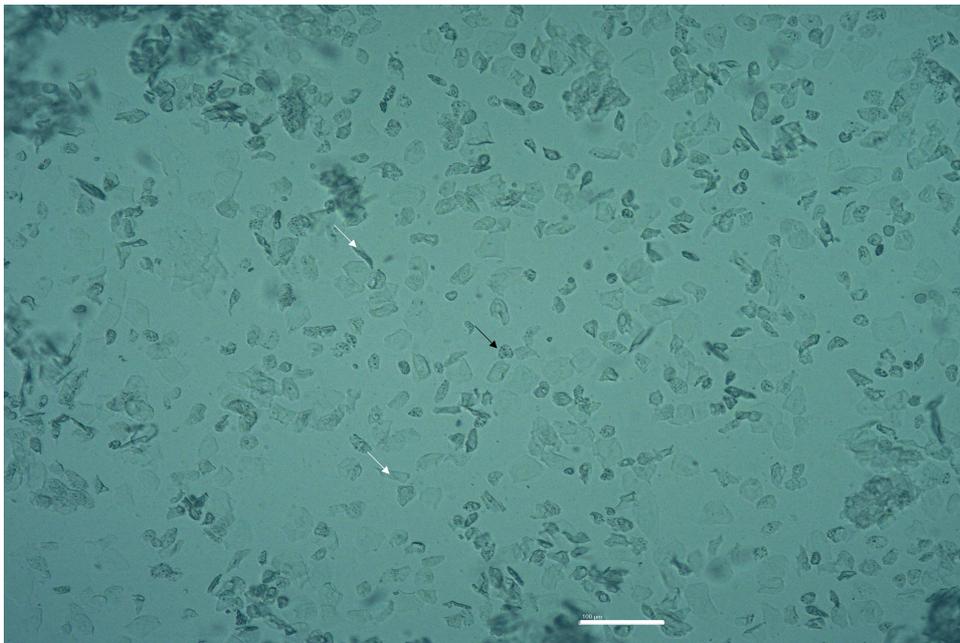
### 2.1. Étude du cycle œstral

Pour étudier l'effet du cycle œstral sur le succès de la chirurgie dans l'étude ancillaire, un prélèvement des cellules vaginales un quart d'heure avant la chirurgie était effectué. Le protocole qui suit est issue de la publication de (Caligioni, 2009).

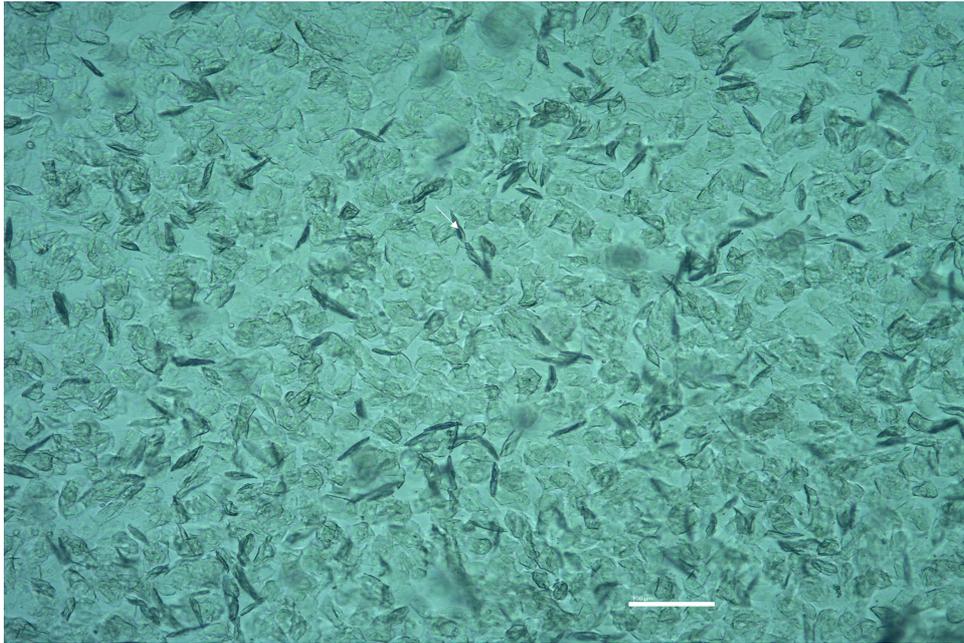
Une contention de la souris est réalisée puis le vagin est rincé par allers-retours successifs avec une solution de 10  $\mu$ L de sérum physiologique. Cette solution est ensuite étalée sur une lame cytologique et observée à un faible éclairage à l'aide d'un microscope électronique au grossissement X10.

Selon les travaux de Cora, Kooistra, et Travlos (2015), 4 phases du cycle œstral peuvent être différenciées en fonction du type de cellules observées : le proœstrus, l'œstrus, le metœstrus et le diœstrus. Chaque phase du cycle est caractérisée par un type cellulaire prédominant. De façon plus simple, lors de l'observation au microscope, le metœstrus peut être regroupé avec le diœstrus.

Le proœstrus dure moins de 24h chez la souris. Cette phase est caractérisée par la prédominance de petites cellules épithéliales nucléées, puis de plus larges cellules épithéliales nucléées ainsi que des cellules épithéliales kératinisées (cf Figure 25). Aucun neutrophile n'est observé durant cette phase. Cette phase est caractérisée par une densité cellulaire moyenne.



**Figure 25 : Proœstrus observé au microscope en lumière blanche X10.**  
Les flèches blanches montrent des cellules épithéliales kératinisées. La flèche noire montre une cellule épithéliale nucléée.

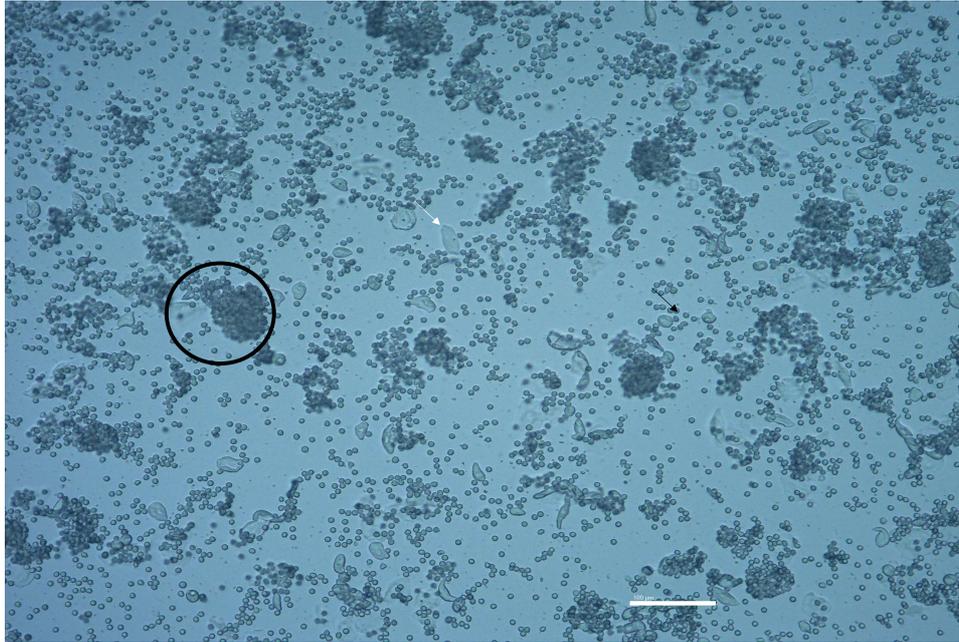


**Figure 26 : Estrus observé au microscope en lumière blanche X10.**  
*La flèche blanche montre une cellule épithéliale kératinisée avec un aspect de "corn flakes".*

L'œstrus dure entre 12 et 48h chez la souris (cf Figure 26). Cette phase est caractérisée par un nombre élevé de cellules épithéliales kératinisées.

Le metestrus peut durer jusqu'à 24h chez la souris. Cette phase est caractérisée par la présence des cellules épithéliales kératinisées et de polynucléaires neutrophiles. Des cellules épithéliales nucléées peuvent apparaître occasionnellement.

Le diestrus est la phase la plus longue du cycle chez les souris (cf Figure 27). Cette phase dure de 48 à 72h chez les souris. Elle est caractérisée par une combinaison de polynucléaires neutrophiles et de cellules épithéliales nucléées (petites ou grandes). Un faible nombre de cellules épithéliales anucléées peuvent être présentes. D'un point de vue microscopique la différence entre le metestrus et le diestrus n'est pas toujours évidente aussi, de façon plus simple, le parti a été pris de considérer le metestrus et le diestrus comme une seule phase (Cora et al., 2015).



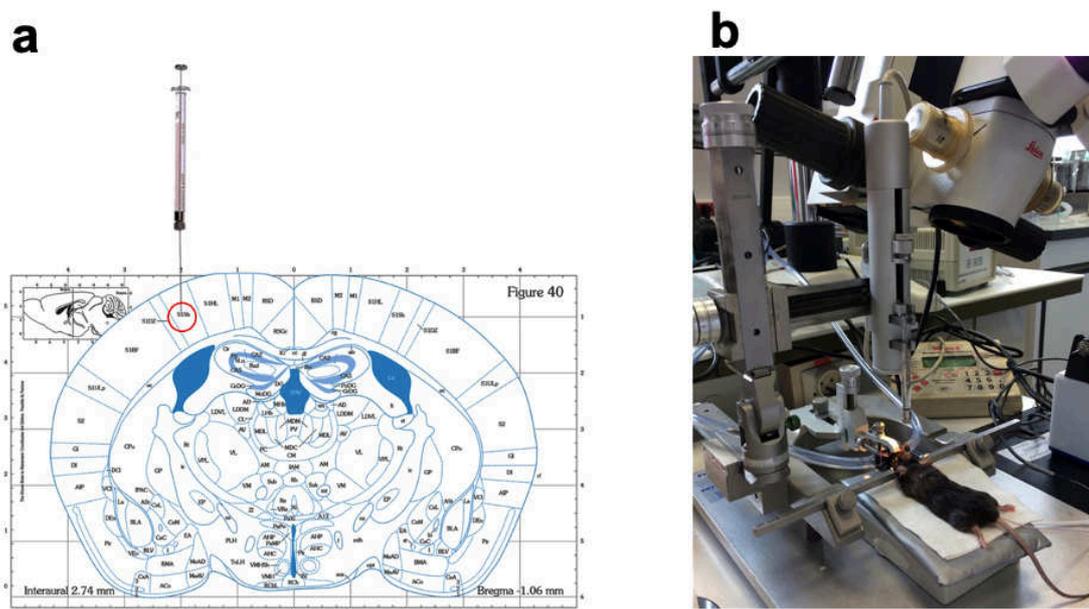
**Figure 27 : Diestrus observé au microscope en lumière blanche X10.**

*La flèche blanche montre une grande cellule épithéliale nucléée, la flèche noire montre une petite cellule épithéliale nucléée. Le cercle montre un agglutinat de polynucléaires neutrophiles.*

## 2.2. Chirurgie stéréotaxique

Le protocole qui suit est issu des travaux de thèse précédents de Bergeron (2018) et Chen (2018). Chez les mâles (M) et les femelles (F), au sein de chaque sexe, après randomisation, la chirurgie stéréotaxique est réalisée, les groupes sham (M sham et F sham) reçoivent une injection de  $1\mu\text{L}$  de sérum physiologique et les groupes MHC (M MHC et F MHC) et MHC+AT (M MHC+AT et F MHC+AT) reçoivent une injection de  $1\mu\text{L}$  de collagénase ( $0.8\mu\text{UI}/\mu\text{L}$ ) pour constituer la lésion. Les chirurgies sont réalisées entre 10 et 12 semaines de vie. Les souris sont anesthésiées avec de l'isoflurane (induction à 3%, maintenance 2 à 2,5%). Pendant l'opération, les souris sont placées sur un tapis chauffant et leur température est contrôlée par un thermomètre rectal afin d'être maintenue entre  $36^{\circ}\text{C}$  et  $36^{\circ}5\text{C}$ . La souris est positionnée dans le cadre stéréotaxique (Knopf Instruments, Tujunga, CA, USA), maintenue par des barres d'oreilles et de gueule. Une incision sagittale médiane du scalp de la souris est ensuite effectuée afin de dégager le bregma, qui est mis en évidence grâce à l'application d'eau oxygénée (15%). Puis à l'aide d'une fraiseuse, une brèche arrondie de 1mm environ est réalisée, contrôlée sous microscope binoculaire à -1 mm sur l'axe antéropostérieur et -2mm sur l'axe médiolatéral (AP - 1 mm; DV - 1 mm; ML 2 mm) par rapport au bregma, le zéro étant l'entrée de l'aiguille dans le parenchyme cérébral (cf Figure 28). Une injection de  $1\mu\text{L}$  de collagénase bactérienne de type IV (COL C2399, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), à une concentration de  $0,8\mu\text{UI}/\mu\text{L}$

est réalisée à 1mm de profondeur dans le cortex primaire somatosensoriel, afin d'induire une lésion hémorragique de petite taille (Bergeron (2018) et Chen (2018)). La collagénase est une enzyme intra cellulaire protéolytique qui catalyse l'hydrolyse du collagène. Le collagène étant un constituant essentiel de la lame basale de la BHE, la collagénase est donc utilisée pour induire une hémorragie. L'injection se fait à l'aide d'une seringue (Reno, NV, Etats-Unis) et d'une aiguille (Phymep), réalisée à façon (250x500 $\mu$ m) introduite très lentement dans le cortex pour éviter tout traumatisme et d'un pousse seringue électrique (Micro 4® Microsyringe Pump Controller – World precisions instruments, Sarasota, Florida). La collagénase est injectée pendant 5 minutes à une vitesse de 200nL/min. L'aiguille reste encore en place pendant 5 min puis est retirée très lentement à 0,5mm/min. Un reflux éventuel lors du retrait de l'aiguille est tamponné. Le scalp est ensuite suturé et la souris est placée sous une lampe chauffante jusqu'à son réveil. Le groupe témoin est soumis à la même procédure avec une injection d'1  $\mu$ L de sérum physiologique (NaCl 0,9%). Une IRM est réalisée à 24h post-chirurgie. Elle permettait de vérifier en aveugle des groupes, l'absence ou la présence de MHC et constituait le critère d'inclusion.



**Figure 28 : Description de la chirurgie stéréotaxique. D'après Bergeron 2018 et Chen 2018.**

(a) Schématisation de l'endroit de l'injection sur une coupe de l'atlas de Paxinos and Watson (b) photo du placement de la souris dans le cadre stéréotaxique lors de la chirurgie.

### **2.3. Caractérisation de l'état de la BHE par injection d'isothiocyanate de fluorescéine**

Vingt-quatre heures après la chirurgie, l'intégrité de la BHE au niveau du site d'injection a été évaluée de façon qualitative grâce à l'injection d'isothiocyanate de fluorescéine (FITC)-Dextran (2000 kDa, 10 mg/mL, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Le protocole suivant provient des travaux de Kuntz et al. (2014). Une extravasation de cette solution indique une rupture de la BHE. Les souris sont placées dans une boîte de contention, un spray de lidocaïne est appliqué sur la queue puis une solution de 100 µL de FITC-Dextran est ensuite injectée grâce à une seringue à insuline dans la veine caudale de la souris. Cette injection est suivie immédiatement par injection intrapéritonéale de pentobarbital (Doléthal®, Vétoquinol, France) à 150 mg/Kg. Deux minutes après, la souris est décapitée, le cerveau est prélevé et post-fixé dans une solution à 4% de paraformaldehyde pendant 24h à 4°C. Il est ensuite congelé avec de l'azote liquide. Le cerveau est ensuite découpé en tranche de 40µm sur un plan coronal à l'aide d'un cryostat (Leika) et monté avec du Vectashield hardset medium with DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA).

Les lames obtenues sont ensuite scannées en trois dimensions à l'aide d'un scanner de lames (Zeiss Axio Scan.Z1, Gena, Germany), un post-traitement des coupes est réalisé à l'aide d'une méthode de projection de données 3D qui projettent dans un plan de visualisation les voxels d'intensité maximale des différentes coupes (Maximum Intensity Projection).

### **2.4. Imagerie par résonance magnétique (IRM)**

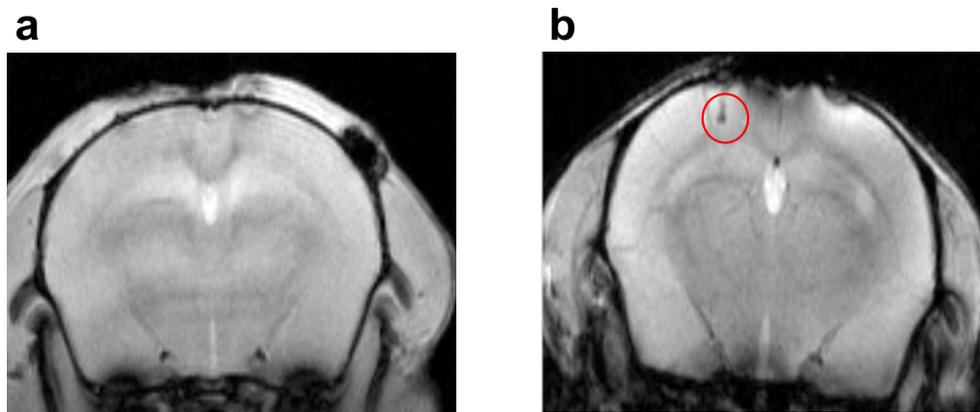
#### **2.4.1. Visualisation de la lésion à 24h post-chirurgie**

La présence ou l'absence de MHC est définie à l'aide de l'imagerie par résonance magnétique (IRM) de 7 Tesla de marque Bruker BioSpec 7.0T/20cm (Ettlingen, Allemagne). Des images sont acquises 24h après la chirurgie pour caractériser la lésion en phase aiguë, ainsi qu'en phase subaiguë (6 semaines post-chirurgie) comme décrits dans les thèses de (Bergeron, 2018; Chen, 2018).

Pendant l'acquisition des images, les souris sont anesthésiées par isoflurane (induction à 3%, maintien à 1,5%), pour éviter une hypothermie, une couverture chauffante est placée sur la souris. Un monitoring de la fréquence respiratoire et de la saturation en oxygène de l'hémoglobine est réalisé tout au long de l'acquisition. Toutes les séquences sont acquises par la plateforme d'imagerie préclinique en aveugle.

Les séquences choisies sont en pondération T2 pour les coupes anatomiques, et pour visualiser l'œdème afin de choisir une coupe cible (TR/TE: 5000/33 ms; champ de vue (field of view FOV): 2 cm) ; T2\* sensible à la présence d'hémossidérine pour visualiser l'hémorragie (TR/TE; 1500/24.5 ms; champ de vue (field of view FOV): 2 cm). Pour toutes les séquences, des images coronales d'une épaisseur de 0,5 mm sont réalisées.

Deux observateurs évaluent la présence ou non de la MHC sur la séquence T2\*. Le critère d'inclusion pour les groupes MHC et MHC + AT était la présence d'une MHC à l'endroit de la chirurgie. A l'inverse, le critère d'inclusion pour les groupes sham était l'absence de MHC à l'endroit de la chirurgie (cf Figure 29). L'absence de lésion pour les groupes ayant une MHC ou la présence de lésion pour les groupes sham constituaient les critères d'exclusion.



**Figure 29 : Coupes coronales du cerveau en T2\*. D'après Bergeron 2018 et Chen 2018.**  
(a) souris sham sans lésion, (b) souris avec une lésion microhémorragique indiquée par un cercle rouge.

#### **2.4.2. Évaluation de la mobilité de l'eau dans les compartiments microvasculaires et de l'état du parenchyme**

L'intégrité de la BHE peut être évaluée avec une séquence de diffusion DWI (diffusion weighted imaging) réalisée en IRM. Cette séquence a été réalisée à 24h post-chirurgie (à la suite de la T2\*) et à 6 semaines post-chirurgie. L'objectif de cette séquence est d'obtenir des images dont le contraste est influencé par la mobilité des molécules d'eau.

La séquence DWI est réalisée sur une coupe axiale unique positionnée au niveau du site d'injection (définies à l'aide de la séquence T2\*). Elle est réalisée dans trois directions [1, 0, 0],[0, 1, 0],[0, 0, 1] pour lesquelles 11 valeurs de b sont utilisées pour caractériser la

décroissance du signal. Les valeurs de b ont été définies comme suit : 1, 10, 20, 30, 40, 60, 80, 100, 400, 600, 800, and 1,000 seconds/ mm<sup>2</sup>. Les paramètres de la séquence étaient les suivants : champ de vue : 20 mm X 20 mm ; taille de la matrice : 128 X 128 ; épaisseur de coupe : 1 mm ; temps de répétition : 3 000 millisecondes ; temps d'écho : 30 millisecondes ; temps d'acquisition : 13 minutes.

Lors de la séquence de diffusion, différents gradients de champ magnétique (différentes valeurs de b) sont appliqués, rendant le signal IRM obtenu, sensible aux déplacements moléculaires de l'eau. La mobilité de l'eau peut être évaluée dans différents compartiments en fonction des gradients de diffusion réalisés.

Les gradients de diffusion définis par les valeurs de b comprises entre 100 et 1 000 secondes/mm<sup>2</sup> permettent avec la résolution d'une équation mono-exponentielle, d'évaluer de façon quantitative en calculant le coefficient apparent de diffusion (ADC), le degré de mobilité des molécules d'eau dans le parenchyme cérébral (cf Équation 1). Ainsi, un hyposignal (correspondant à la diminution de l'ADC) est corrélée à un gonflement cellulaire ainsi qu'à un œdème cytotoxique (Le Bihan, 2007). *A contrario*, un hypersignal (une augmentation de l'ADC) est en faveur d'un œdème vasogénique (Goetz et al., 2004).

$$\frac{S}{S_0} = e^{-ADC \times b}$$

**Équation 1 : b est le coefficient de diffusion, S le signal mesuré pour une valeur de b, S<sub>0</sub> le signal mesuré lorsque b=0.**

D'après Kuntz et al. (2014), avec de faibles valeurs de b comprises entre 0 et 100 secondes/mm<sup>2</sup>, les contraintes ultrastructurales des molécules d'eau dans le compartiment microvasculaire peuvent être évaluées quantitativement en calculant la composante pseudo-diffusive D\*. Les variations de D\* observée dans une région d'intérêt pourrait alors refléter l'intégrité de la microvascularisation de cette région d'intérêt. Une augmentation de ce coefficient serait en faveur d'une augmentation de la mobilité des molécules d'eau dans le compartiment microvasculaire et refléterait indirectement une altération de la BHE. L'équation mono-exponentielle précédemment utilisée pour calculer l'ADC ne peut plus s'appliquer pour calculer le D\*, la décroissance de l'intensité du signal IRM pour les valeurs de b de 0 à 1000 secondes/mm<sup>2</sup> est mieux caractérisée par une équation biexponentielle (cf Équation 2).

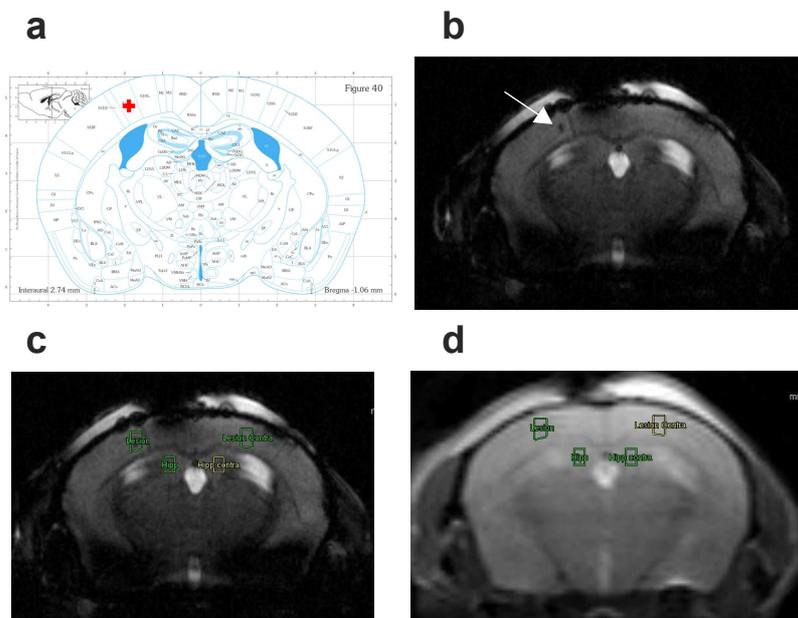
$$\frac{S}{S_0} = (1 - f) \times e^{-ADC \times b} + f \times e^{-(ADC \times D^*) \times b}$$

**Équation 2 : b est le coefficient de diffusion, S le signal mesuré pour une valeur de b, S<sub>0</sub> le signal mesuré lorsque b=0, f est la fraction du volume sanguin circulant fixée entre 0 et 0,05%.**

Pour résumer, de façon globale, les valeurs de  $b$  de 0 à 100 secondes/mm<sup>2</sup> sont utilisées pour caractériser le déplacement des molécules d'eau dans les microvaisseaux et les valeurs de  $b$  de 100 à 1 000 secondes/mm<sup>2</sup> sont utilisées pour caractériser le déplacement des molécules d'eau dans le parenchyme cérébral (Kuntz et al., 2014).

À partir des données expérimentales recueillis sur les séquences de diffusion, l'équation bi-exponentielle a été appliquée pour caractériser le coefficient de pseudo-diffusion  $D^*$  de la composante microvasculaire.

Lors du post traitement des images, 4 régions d'intérêts (ROI) ont été tracées sur la T2\* puis reportées sur l'image de diffusion (cf Figure 30). Deux ROI du côté ipsilatéral (1 rectangle au niveau du site lésionnel et un rectangle au niveau de l'hippocampe) et deux ROI du côté controlatéral ont été réalisées (1 rectangle au niveau du site controlésionnel et un rectangle au niveau hippocampique). Pour chacune de ces régions d'intérêt, il a été relevé la valeur de l'ADC obtenu à partir du logiciel de Paravision 5.1. (Bruker Biospin MRI, Bellerica, MA, USA) et la valeur de  $D^*$  obtenue après réalisation de l'équation bi-exponentielle sur GraphPad Prism (version 7.00 pour Mac, GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com). Une carte moyenne (sur les souris incluses dans l'analyse) de  $D^*$  a également été réalisée par les imageurs à partir de la séquence DWI.



**Figure 30 : Représentation du site d'injection et de régions d'intérêts sur les séquences IRM.**

(a) Représentation du site d'injection sur l'atlas de Paxinos (b) Vue coronale en T2\* représentative d'une MHC désignée par la flèche blanche (c) Représentation des régions d'intérêts sur la vue coronale de la T2\* (d) Transposition des régions d'intérêt sur les séquences de diffusion.

## **2.5.Métabolisme cérébral glucidique**

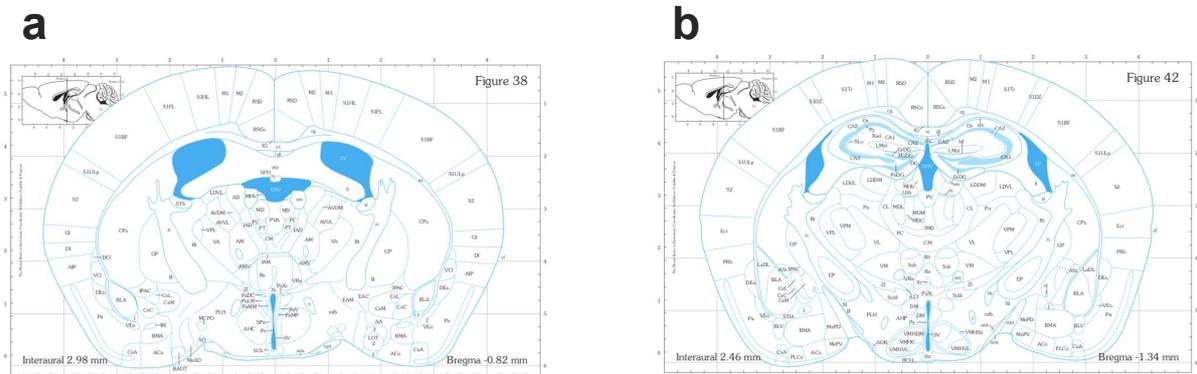
Dans les thèses précédentes (Chen 2018 et Bergeron 2018), l'évaluation du métabolisme cérébral *in vivo* a été réalisée 6 semaines après la chirurgie chez les souris mâles et femelles sham, MHC et MHC+AT par injection de fluorodeoxyglucose radiomarqué. Les images TEP avaient été converties en valeur de fixation normalisée (standardized uptake value, SUV.  $SUV = \text{fixation [MBq/mL]} \times \text{poids [g]} / \text{dose injectée [Mbq]}$ ).

Dans ce travail, un autre type de post traitement a été réalisé, basé sur une cartographie statistique paramétrique (SPM) à l'aide de SPM12. Le SPM est un logiciel développé par le Wellcome Department of Imaging Neuroscience de l'University College (<https://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm/>). Le SPM permet d'obtenir une comparaison voxel par voxel des images TEP moyennées de deux différents groupes en partant d'une hypothèse *a priori*. Un t-test unilatéral à deux échantillons a été effectué pour comparer les groupes sham et MHC et les groupes MHC et MHC+AT chez les souris mâles et femelles. Les hypothèses formulées *a priori* étaient les suivantes : la MHC diminuait le métabolisme cérébral comparé au groupe sham ; l'atorvastatine augmentait le métabolisme cérébral comparé au groupe MHC. Les cartes statistiques t ont été établies avec un seuil de  $p < 0,05$ , non corrigé. Un seuil minimal de 100 voxels par cluster a été retenu, seuls les clusters significatifs avec  $p < 0,05$  ont été pris en compte (Bertoglio et al., 2018).

## **2.6.Mise à mort et préparation des tissus pour l'histologie**

En fin de protocole, les souris reçoivent une injection intrapéritonéale de pentobarbital (Doléthal®, Vétoquinol, France) à 150 mg/Kg et la préparation des tissus est réalisée comme dans les thèses de (Chen 2018 et Bergeron 2018). Les souris sont ensuite perfusées par voie intracardiaque en positionnant un cathéter à l'apex du ventricule gauche et en incisant l'oreillette droite afin de laisser le sang s'écouler. La perfusion débute avec du sérum physiologique hépariné froid (environ 15 mL) jusqu'à ce que le sang soit remplacé par le sérum perfusé et que les organes, notamment le foie, soient décolorés. La perfusion est alors poursuivie avec 40 mL de paraformaldéhyde (PFA) 4% (Diapath, Italie). Les cerveaux sont ensuite prélevés et placés une nuit en post-fixation dans un bain de PFA à 4°C. Les cerveaux sont ensuite déshydratés dans une solution de sucrose 30% (Sigma-Aldrich, France) pendant 24 heures pour permettre une cryoprotection. Enfin, ils sont plongés pendant 1 min dans de l'isopentane maintenu à - 40°C puis conservés à - 80°C. Par la suite, au niveau du site lésionnel, des coupes de 20  $\mu\text{m}$  d'épaisseur sont réalisées à -20°C au cryostat (CM 3050 S, Leica, Allemagne) et recueillies sur lames (Superfrost plus®, Thermo Fisher Scientific®, Etats-Unis).

Le niveau de coupe a été choisi de façon à encadrer la zone d'injection (bregma - 0,82 mm à - 1,34 mm selon l'atlas de Paxinos et Franklin (2019)) (cf Figure 31).

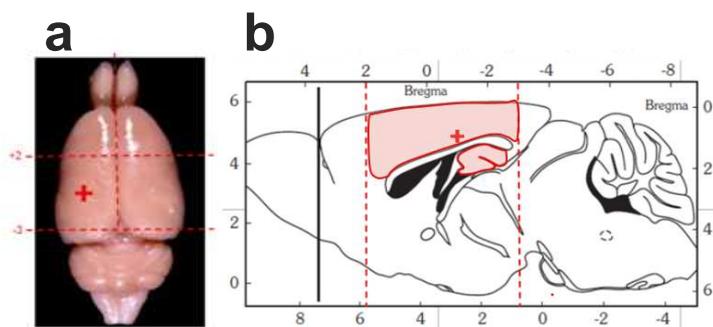


**Figure 31 :** Les coupes de cerveaux sont réalisées grâce à l'atlas de Paxinos et Franklin. D'après Bergeron 2018.

(a) Premier niveau de coupe situé à -0,82mm en partant du bregma (b) Dernier niveau de coupe situé à -1,34mm en partant du bregma.

## 2.7. Mise à mort et préparation des tissus pour la biologie moléculaire

De la même façon que la mise à mort destinée à l'obtention des tissus pour l'immunohistochimie, les souris reçoivent une injection intrapéritonéale de pentobarbital (Doléthol®, Vétoquinol, France) à 150 mg/Kg. Elles sont ensuite perfusées avec du sérum physiologique hépariné froid (environ 15 mL) et les cerveaux sont prélevés. Quatre régions d'intérêt sont découpées à l'aide d'une matrice (cf Figure 32) comme indiqué dans la thèse de Chen (2018) : le cortex ipsilatéral ; le cortex controlatéral ; l'hippocampe ipsilatéral ; l'hippocampe controlatéral. Les biopsies sont ensuite congelées dans de l'azote liquide puis conservés à - 80°C.



**Figure 32 :** Représentation des plans de dissections (pointillés rouges) des cerveaux permettant d'isoler les régions d'intérêt. Modifié à partir de Chen 2018.

La croix rouge désigne le site d'injection. (a) Vue du cerveau à l'état frais. (b) Représentation d'une coupe sagittale de cerveau, les régions d'intérêts sont présentées en rouge.

## **2.8. Dosage du cholestérol total**

Au moment de la mise à mort, un prélèvement sanguin rétroorbitaire est réalisé chez les souris MHC et MHC+AT suivant le protocole des thèses de (Bergeron, 2018; Chen, 2018). Le sang est recueilli dans un tube EDTA (Microvette<sup>®</sup> 500µL K3E, SARSTEDT) et centrifugé à 4500 rpm pendant 20 minutes à 4°C afin de récupérer le plasma qui est conservé à -80°C.

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

## **2.9. Analyse des astrocytes et de la microglie**

### **2.9.1. Protocole d'immunofluorescence**

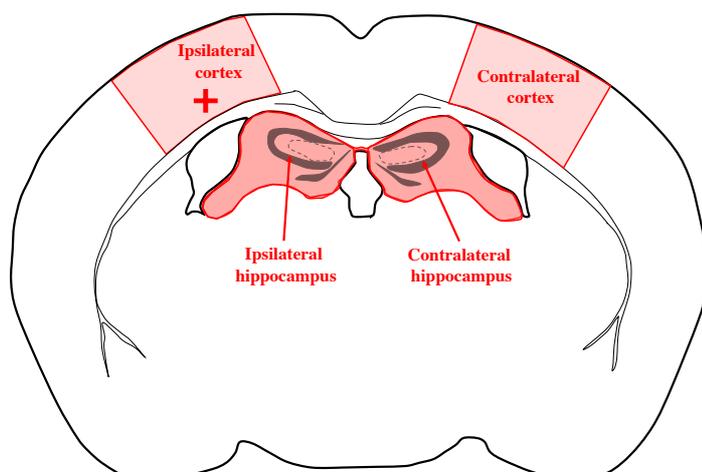
Les lames sont d'abord rincées 3 fois 10 minutes dans une solution de KPBS. Le détournage des lames est ensuite réalisé avec un PAP pen (ImmEdge<sup>®</sup>, Vector, Etats-Unis). Une étape de blocage des sites d'interactions non spécifiques est réalisée par incubation des lames dans du sérum de cheval (S-1000, Vector, Etats-unis) dilué au 2/100<sup>ème</sup> dans du KPBS + triton X-100 pendant 1 heure à température ambiante. Le triton permet de perméabiliser les cellules. L'excès de solution de saturation est ensuite retiré et les anticorps primaires sont déposés pour une durée de 12 heures, à 4°C (cf Tableau 1). Les lames sont alors rincées au KPBS et incubées avec les anticorps secondaires (cf Tableau 1) pendant 1 heure à l'abri de la lumière. Après rinçage des lames au KPBS, les lames sont montées avec le milieu de montage (Vectashield<sup>®</sup> hardset<sup>™</sup> with DAPI, Vector, Etats-Unis).

**Tableau 1 : Anticorps primaires et secondaires utilisés en immunofluorescence**

Cible	Espèce productrice	Dilution	Fournisseur	Référence
<b>Anticorps primaire</b>				
IBA-1	Lapin	1/500	Wako	SC17750
GFAP	Chèvre	1/500	Abcam	AB53554
<b>Anticorps secondaire</b>				
Alexa Fluor donkey anti-rabbit 488	Âne	1/500	Invitrogen	A21206
Alexa Fluor donkey anti-goat 568	Âne	1/500	Abcam	AB175704

### 2.9.2. Semi-quantification des astrocytes et de la microglie

Pour l'analyse, les coupes ont été numérisées sur un scanner de lames Zeiss AxioScan.Z1 avec un grossissement de X20. Dans le cortex, deux zones d'intérêt ont été analysées (cf Figure 33) : une zone de 1,33(+/- 0,51) mm<sup>2</sup> axée sur la lésion et une autre zone de taille similaire dans le cortex controlatéral. Les hippocampes ipsi et controlatéral en regard de la lésion ont également été délimités. Le nombre d'astrocytes et de cellules microgliales sur ces 4 zones ont été quantifiés à l'aide du logiciel ImageJ par un observateur aveugle aux groupes expérimentaux.

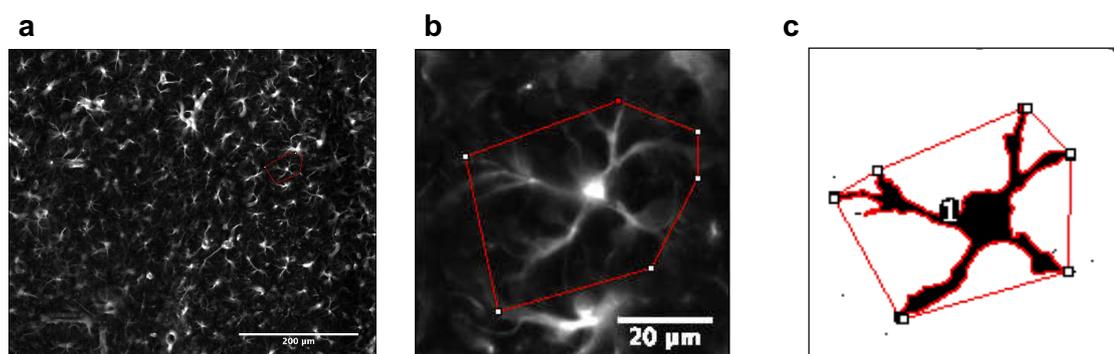


**Figure 33 : Schéma d'une coupe de cerveau en vue axiale.**

Sur les 4 zones représentées en rouge le nombre d'astrocytes et de cellules microgliales ont été quantifié. La croix rouge représente l'emplacement de la lésion.

### 2.9.3. Analyse de la surface occupée par les astrocytes

L'analyse de la surface occupée par des astrocytes isolés a été réalisée autour du site d'injection et dans l'hippocampe ipsilatéral. Nous avons émis l'hypothèse qu'une augmentation de la surface couverte par un astrocyte marqué par la GFAP pourrait signer un état hypertrophique, une caractéristique cardinale de la réactivité des astrocytes (Grosche et al., 2013; Ben Haim et al., 2015). A l'aide du logiciel ImageJ, le volume occupé par des astrocytes isolés a été mesuré (cf Figure 34) autour du site d'injection ainsi que dans l'hippocampe ipsilatéral.



**Figure 34 : Analyse de la surface occupée par un astrocyte.**

(a) Hippocampe représentatif, le polygone rouge (au milieu à droite) délimite un astrocyte isolé, la barre d'échelle est de 200µm (b) vue zoomée sur l'astrocyte isolé (c) détermination de la surface occupée par l'astrocyte avec ImageJ.

### 2.10. Dosage des protéines

Les tissus sont homogénéisés à l'ULTRA-TURRAX® (IKA® T10 Basic) dans une solution contenant du RIPA, des inhibiteurs de phosphatases et des inhibiteurs de protéases. Cinq cents microlitres de cette solution sont ajoutés dans les échantillons de cortex et 300 microlitres dans les échantillons d'hippocampes. Les échantillons homogénéisés sont laissés au repos pendant 30 minutes dans de la glace avant d'être centrifugés (4°C à 13000, 30 minutes). Le surnageant qui contient les protéines est ensuite récupéré et dilué au 20<sup>ème</sup> pour être dosé. Une gamme étalon est ensuite préparée avec une solution de BSA allant de 0 à 2mg/mL. Le dosage des échantillons est ensuite réalisé avec le kit Pierce BCA (protein assay Thermo 23225-23227). Une solution A+B est réalisé en ajoutant un volume de réactif B dans 50 volumes du réactif A du kit. Dix microlitres de chaque dilution de la gamme étalon et de chaque échantillon additionné de réactif sont déposés dans les puits d'une microplaque. Deux cents microlitres de solution A+B sont ajoutés dans chaque puits (Kit Biorad). Après une incubation de 30 à 40

minutes, la densité optique est lue dans un spectrophotomètre dans une longueur d'onde de 570nm. Les concentrations de chaque échantillon sont ensuite calculées grâce à une droite de régression réalisée à partir de la gamme étalon.

### **2.11. Analyse de l'expression protéique du BDNF par ELISA**

Le dosage est réalisé à l'aide du kit de dosage de BDNF par une méthode sandwich. Le BDNF doit posséder deux épitopes différents, il est pris en sandwich entre un anticorps « coaté » sur la plaque et un anticorps biotinylé ajouté dans un deuxième temps permettant la révélation. La gamme étalon de ce kit permet de doser des échantillons ayant une concentration comprise entre 66 à 16000 pg/mL. Après un premier lavage, des anticorps biotinylés anti-BDNF se fixent au BDNF de l'échantillon. Un autre lavage est réalisé puis de la streptavidine conjuguée à de l'hydroxyperoxydase de raifort est ajouté et laissé à incuber pendant 45 minutes. Un dernier lavage est réalisé et un substrat est ajouté dans le puits et incubé pendant 30 minutes. Une réaction enzymatique entre le substrat est l'hydroxyperoxydase va émettre une couleur jaune dont l'intensité sera liée à la proportion de BDNF présente dans l'échantillon. Une solution est ajoutée pour stopper la réaction enzymatique, la couleur va passer du bleue au jaune et l'intensité sera mesurée directement après à 450nm.

Une courbe logistique à 4 paramètres comprenant en abscisse le log de la concentration de la gamme étalon et en ordonné la densité optique de la gamme étalon est réalisée sur GraphPad Prism (version 7.00 pour Mac, GraphPad Software, La Jolla California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)). Elle permet de déterminer la concentration de BDNF en pg par mg de tissus de chacun des échantillons.

### **2.12. Analyse de l'expression protéique du VEGF, P-GSK3 $\beta$ et GSK3 $\beta$ par western blot**

#### **2.12.1. Migration et transfert**

Un tampon de charge est préparé avec une solution de laemmli et de  $\beta$ -mercapto ethanol à 10% (450 microlitres de laemmli 4X et 50 microlitres de  $\beta$ -mercapto ethanol). La préparation des échantillons se fait ensuite dans la glace. Chaque échantillon contient 25 microgrammes de protéines auquel est ajouté du laemmli à hauteur de  $\frac{1}{4}$  du volume final de l'échantillon. Les échantillons sont ensuite chauffés 5 minutes à 95°C pour dénaturer les protéines.

Les échantillons ainsi qu'un ladder sont déposés dans les puits d'un gel d'électrophorèse (16 microlitres par puits soit 20 microgrammes de protéines par puits). La migration des protéines selon leur taille se fait à ampérage constant (0,035A pour 1gel ou 0,07A pour 2 gels

pendant 30 minutes à moduler en fonction de la taille de la protéine étudiée) dans une solution de migration Tris/Glycine/SDS (Biorad, France)

Le gel est ensuite placé au contact d'une membrane en PVDF, entre deux feuilles de papier Whatmann imbibées de tampon de transfert Tris/Glycine (Biorad, France) et le transfert est réalisé par application d'un courant constant (3A pendant 10 minutes) avec un appareil de transfert pour milieu semi-humide (Thermo Fisher Scientific, Etats Unis). Les membranes sont ensuite découpées pour ne conserver que la zone contenant la protéine d'intérêt.

### **2.12.2. Immunodétection des protéines d'intérêts**

Les sites d'interactions non-spécifiques des membranes sont bloqués après incubation pendant une heure *a minima* dans une solution de sérum bovin BSA (bovine serum albumin) à 5% et de TBS Tween à 0,05%. Enfin, les membranes sont incubées toute la nuit à 4°C dans cette même solution à laquelle est ajouté l'anticorps primaire d'intérêt (cf Tableau 2). Le lendemain les membranes sont rincées par des solutions successives de TBS tween 0,1% (3X) et de TBS (3X). Les membranes sont ensuite incubées avec les anticorps secondaires pendant 1h (cf Tableau 2) puis sont rincées comme précédemment décrit. La révélation se fait ensuite par chimioluminescence à l'aide du kit ECL Prime (GE HealthCare, Etats Unis) avec le Las 4000 (GE HealthCare, Etats Unis). Le substrat chimioluminescent présent dans la solution réagit avec la peroxydase couplée à l'anticorps secondaire et produit un signal visible qui sera quantifié par mesure de la densité optique.

Après révélation, les membranes ayant servies pour détecter la protéine P-GSK3 $\beta$  sont strippées pendant 10 min sous agitation à l'aide d'une solution de stripping (Interchim, France) puis bloquées et incubées avec l'anticorps anti GSK3 $\beta$  et révélées selon la même procédure.

Afin de mesurer le niveau d'actine de chaque échantillon, les membranes sont incubées avec l'anticorps anti-actine puis incubées avec l'anticorps secondaire correspondant et révélées (cf Tableau 2).

Ainsi, les valeurs de densité optique obtenues pour chaque échantillon sont normalisées en calculant le rapport de l'intensité du signal de la protéine d'intérêt sur l'intensité du signal de l'actine. Pour Phospho Ser9-GSK3 $\beta$ , un ratio est réalisé entre les intensités de signal des formes phosphorylées et totales (P-GSK3 $\beta$ /GSK3 $\beta$ ). Plus le ratio est élevé plus la protéine est inactive. Les résultats sont exprimés sous forme de rapport de densité relative, normalisé à la valeur moyenne du cortex controlatéral ou de l'hippocampe controlatéral du groupe sham.

**Tableau 2 : Anticorps primaires et secondaires utilisés pour le western blot**

Cible	Espèce productrice	Dilution	Fournisseur	Référence
<b>Anticorps primaires</b>				
Phospho Ser9-GSK3 $\beta$	Lapin	1/2000	Cell Signaling	9315S
GSK3 $\beta$	Lapin	1/1000	Cell Signaling	9336S
VEGF	Lapin	1/1000	Genetex	GTX102643
Actine	Lapin	1/10000	Santa Cruz	SC4778
<b>Anticorps secondaires</b>				
Horseradish peroxydase goat anti rabbit	Chèvre	1/10000	Millipore	AP106P

### **2.13. Analyse de l'expression génique des ER $\alpha$ et ER $\beta$ par rt-qPCR**

L'expression de différents gènes pour le cortex et les hippocampes ipsi et controlatéraux est évaluée par la méthode de PCR quantitative en temps réel. Cette méthode comporte trois étapes : l'extraction de l'ARN à partir des tissus cérébraux congelés frais ; la synthèse de l'ADNc ; la PCR. Le protocole qui suit est tiré en partie de la thèse de Chen (2018).

#### **2.13.1. Extraction de l'ARN**

Chaque tissu est homogénéisé dans une solution d'Extract-all® (Eurobio) à raison de 0,5 mL d'Extract-all® pour 1mg de tissu, composée de phénol et d'isothiocyanate de guanidine, à l'ULTRA-TURRAX® (IKA® T10 Basic). Après cinq minutes de repos permettant la complète dissociation des complexes nucléoprotéiques et l'ajout de 0,1 ml de chloroforme (SIGMA®) pour 0,5 ml d'Extract-all®, les échantillons sont centrifugés à 10 000 g durant 10 minutes à 4°C. Se forment trois phases dont la phase aqueuse supérieure incolore, laquelle contient exclusivement les ARN. Pour que ces derniers précipitent, la phase aqueuse est transférée dans un nouveau tube avec 0,25 ml d'isopropanol (SIGMA®) pour 0,5 ml d'Extract-all® initial. La nouvelle solution est vigoureusement mélangée puis elle est centrifugée à 10 000 g pendant 20 minutes à 4°C. Une fois le surnageant éliminé, un culot blanc reste sur la paroi et est récupéré. On y ajoute 0,5 ml d'éthanol (FLUKA® Analytical) à 75% pour 0,5 ml d'Extract-all® utilisé au départ. Puis la solution est de nouveau vigoureusement mélangée puis centrifugée à 10 000 g pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant est jeté tandis que le culot d'ARN est séché à l'air libre pendant une heure. Il est ensuite mis en solution dans de l'eau ultra-pure (Eurobio). La concentration de la préparation finale d'ARN totaux est dosée par le Nanodrop® (labtech.com) sur la plateforme d'interactions moléculaires et d'imagerie cellulaire

de l'IMPRT. La solution est libre de contaminants si les ratios des densités optiques (A) 260 nm/A280nm et A230 nm /A260nm sont supérieurs à 1,8.

### **2.13.2. Synthèse des ADN complémentaires (ADNc)**

Les possibles traces d'ADN sont dégradées grâce à une étape enzymatique assurée par la DNase. Le mélange réactionnel est composé de 5 µl de tampon 10X de l'enzyme (Roche), 1 µl de DNase I, et 2 µg d'ARN. Il est ajusté avec de l'eau pour obtenir un volume final de 50 µl. Il est ensuite incubé à 37°C afin d'activer l'enzyme durant 40 minutes, et à 75 °C pour la désactiver pendant 25 minutes.

L'étape suivante consiste en la conversion de l'ARN en ADNc par l'activité de l'enzyme reverse transcriptase. Le mélange réactionnel est formé de 25 µl de solution d'ARNm, 8 µl de Tampon 5 X (5 X First Strand Buffer, Invitrogen™), 0,5 µL d'enzyme SuperScript® III Reverse Transcriptase (Invitrogen™), 2 µL d'hexamères (Random Primer, Invitrogen™) afin d'amorcer la réaction, 1 µL d'oligodT 0,1 M (Invitrogen™) et 1 µL de nucléotides (dNTP à 10 mM, Invitrogen™) pour l'élongation des brins. Il est complété avec de l'eau pour obtenir un volume final de 40 µl. Les différentes étapes sont l'hybridation (10 minutes à 24°C), l'élongation de l'ADNc (40 minutes à 50°C) et la désactivation de l'enzyme (15 minutes à 75°C). Le volume du mélange est ensuite dilué avec de l'eau pour obtenir un volume final de 200 µL (soit une concentration à 1/5eme du départ).

### **2.13.3. La PCR quantitative en temps réel**

La quantification de l'ADNc répliqué en temps réel est réalisée grâce à la mesure du nombre d'amplicons, sur lesquels se sont fixés des fluorophores SYBR green, spécifiques de l'ADN, à chaque cycle. Plus l'échantillon est concentré en gènes cibles, moins il faudra de cycles pour atteindre un point pour lequel le signal est significativement supérieur au seuil de détection de l'appareil. Ce point est défini comme le *Crossing threshold* (CT). Les amorces des gènes d'intérêt ont été réalisées avec l'aide du responsable en biologie moléculaire du laboratoire.

Dans un premier temps, une amplification est produite sur un gène de référence, la protéine TATA Binding Protein (TBP), pour chaque échantillon. Le mélange réactionnel est constitué de 1 µL de la solution du tube 1 (10 µL de tube 1a, LightCycler® Faststart Enzyme mélangé délicatement dans le tube 1b LightCycler® Faststart Réaction Mix SYBR Green), 3,2 µL d'eau stérile, 0,8 µL de MgCL2 à 25mM, 1 µL d'amorce sens à 3 µM, et 1 µL d'amorce sens à 3 µM. Il est disposé dans les capillaires (LightCycler® Capillaire Roche) avec 3 µL

d'échantillon à analyse, qui sont ensuite centrifugés pendant 10 secondes à 3000 rpm. La PCR en elle-même est réalisée automatiquement par le Thermocycler LightCycler® Instrument selon les étapes suivantes : un cycle de 8 minutes à 95 degrés, suivi de 40 cycles répétés de 10 secondes de dénaturation à 95 degrés, 10 secondes d'hybridation à 60 degrés et 10 secondes d'élongation à 72 degrés. Une courbe de fusion est établie permettant de vérifier la spécificité des amplicons. Les couples d'amorces utilisés (TIB® MOLBIOL) sont répertoriés dans le Tableau 3.

**Tableau 3 : Séquences d'amorces utilisées pour la quantification semi-relative par PCR**

Gènes d'intérêt	Séquences d'amorces
TBP sens	5' – ggcggtttggctaggttt – 3'
TBP anti-sens	5' – gggttatcttcacacacatga – 3'
ER $\alpha$ sens	5' – caactgggcaaagagagtgc – 3'
ER $\alpha$ anti- sens	5' – ccagacgagaccaatcatca – 3'
ER $\beta$ sens	5' – agaatgtccaccgctagg – 3'
ER $\beta$ anti-sens	5' – agctgagaaaaatccttgtaga – 3'

#### 2.13.4. Quantification relative des ER $\alpha$ et ER $\beta$

La quantification relative de l'expression génique des récepteurs a été réalisée en se basant sur la méthode du  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Livak and Schmittgen, 2001). Celle-ci se fait en 3 étapes. La TBP sert de gène de référence et les gènes cibles sont les ER.

La première étape est la normalisation par rapport au gène de référence (cf Équation 3)

$$\Delta CT_{\text{échantillon}} = CT_{\text{gène de référence}} - CT_{\text{gène cible}}$$

*Équation 3 : Normalisation par rapport au gène de référence*

La deuxième étape est la normalisation par rapport aux échantillons contrôles (cf Équation 4). Les échantillons contrôles sont ici le cortex controlatéral du groupe sham ou l'hippocampe controlatéral du groupe sham.

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{échantillon}} - \Delta CT_{\text{moyen des échantillons contrôles}}$$

*Équation 4 : Normalisation par rapport au contrôle*

La troisième étape est la détermination de la variation du nombre de copie du gène. La valeur moyenne des échantillons de références étant égale à 1 (cf Équation 5).

$$\text{Variation du nombre de copie du gène} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

*Équation 5 : Variation du nombre de copie du gène*

## **2.14. Statistiques**

### **2.14.1. Pourcentage de succès de la chirurgie et effet du cycle œstral**

Pour l'évaluation du pourcentage de succès de la chirurgie le test du Khi deux a été réalisé et pour l'évaluation de l'effet du cycle œstral le test exact de Fisher a été réalisé. La taille d'effet est exprimée avec le V de Cramér qui mesure l'association entre deux variables qualitatives.

### **2.14.2. Analyses d'imagerie, immunohistochimie, western blots et ELISA**

Pour les analyses d'imagerie (ADC et D\*), pour l'immunohistochimie et les western blots une ANOVA à 2 facteurs à mesures répétées a été réalisée pour prendre en compte la corrélation entre les 2 aires cérébrales et pour le suivi du poids entre les différents temps. Les comparaisons post-hocs ont été réalisées avec la correction de Bonferroni. La taille d'effet est exprimée avec  $\eta^2$  généralisé « generalised Eta-squared » ( $\eta^2_G$ ) et varie entre 0 et 1. D'après Bakeman (2005), un effet de petite taille se situe autour de 0,02. Un effet de taille moyenne se situe autour de 0,13. Un effet de grande taille se situe autour de 0,26 et plus.

### **2.14.3. Surface occupée par les astrocytes**

Pour la surface occupée par les astrocytes, un test de Kolmogorov-Smirnov a été réalisé pour s'assurer de la normalité de la distribution puis un test de student a été réalisé pour comparer le groupe sham et le groupe MHC au sein de chaque sexe. La taille d'effet est exprimée avec  $\eta^2$ . D'après Bakeman (2005), un effet de petite taille se situe autour de 0,01 ; un effet de taille moyenne se situe autour de 0,06 et un effet de grande taille autour de 0,14 et plus.

### **2.14.4. Dosage du cholestérol**

Pour le dosage du cholestérol, une ANOVA à 2 facteurs a été réalisée avec le facteur groupe et le facteur sexe. La taille d'effet est exprimée avec  $\eta^2$  généralisé comme décrit plus haut.

### **2.14.5. Suivi du poids**

Pour le suivi du poids, un modèle linéaire mixte a été réalisé.

### **2.14.6. Logiciel et packages utilisés**

Les données ont été analysées avec le logiciel R version 3.4.3 (R Core Team (2017) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>) et l'environnement R Studio Version 1.1.383.

Le package utilisé pour réaliser les comparaisons de pourcentages était gmodel (Gregory R. Warnes, Ben Bolker, Thomas Lumley, Randall C Johnson. Contributions from Randall C. Johnson are Copyright SAIC-Frederick, Inc. Funded by the Intramural Research Program, of the NIH, National Cancer Institute and Center for Cancer Research under NCI Contract NO1-CO-12400. (2018). gmodels: Various R Programming Tools for Model Fitting. R package version 2.18.1. <https://CRAN.R-project.org/package=gmodels>)

Les packages utilisés pour les ANOVA 2 facteurs étaient « Afex » (Henrik Singmann, Ben Bolker, Jake Westfall and Frederik Aust (2019). afex: Analysis of Factorial Experiments. R package version 0.23-0. <https://CRAN.R-project.org/package=afex>) et « Emmeans » pour les comparaisons post-hoc (Russell Lenth (2019). emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means. R package version 1.3.3. <https://CRAN.R-project.org/package=emmeans>).

Les packages utilisés pour réaliser le modèle linéaire mixte étaient « lme4 » (Douglas Bates, Martin Maechler, Ben Bolker, Steve Walker (2015). Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *Journal of Statistical Software*, 67(1), 1-48. doi:10.18637/jss.v067.i01.) et « lmerTest » (Kuznetsova A, Brockhoff PB and Christensen RHB (2017). "lmerTest Package: Tests in Linear Mixed Effects Models." *Journal of Statistical Software*, \*82\*(13), pp. 1-26. doi: 10.18637/jss.v082.i13 (URL: <http://doi.org/10.18637/jss.v082.i13>).



# RESULTATS

## 1. Pourcentage de succès de la chirurgie et résultats de l'étude ancillaire

### 1.1. Pourcentage de succès de la chirurgie

Indépendamment du sexe, le pourcentage de succès global était de 59%. Le pourcentage de succès de l'opération après injection de sérum physiologique était plus important chez les femelles que chez les mâles ( $p=0,03$ ) mais n'était pas différent après injection de collagénase entre les femelles et les mâles MCH ou MCH+AT (cf Tableau 4).

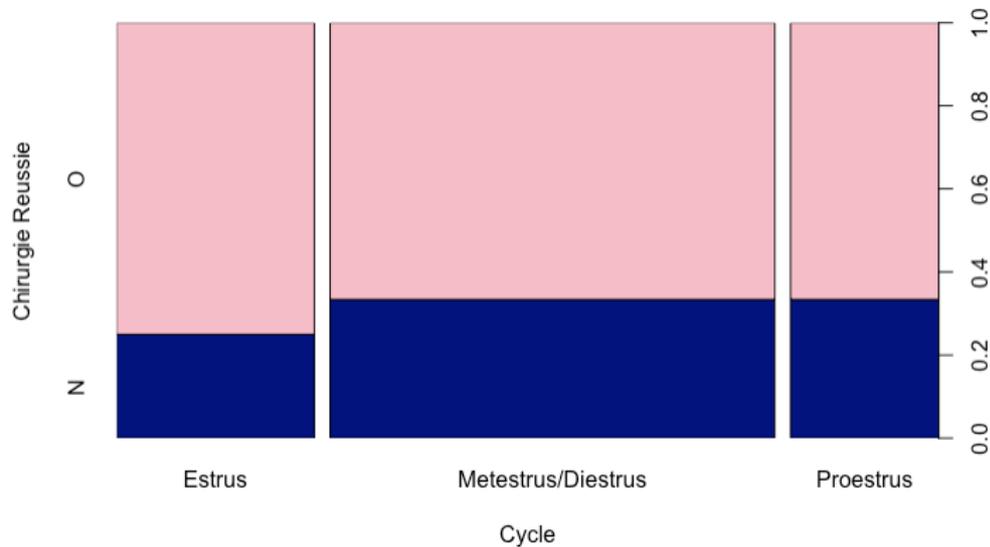
**Tableau 4 : Bilan des souris opérées depuis le début de la thèse**

Groupes	Succès n (%)	Échecs n (%)	p value
<b>Sham</b>	<b>69 (50,7)</b>	<b>67 (49,3)</b>	
Femelles	25 (65,8)	13 (34,2)	<b>0,03</b>
Mâles	44 (44,9)	54 (54,6)	
<b>MHC</b>	<b>118 (63,4)</b>	<b>68 (36,6)</b>	
Femelles	46 (60,5)	30 (33,1)	0,54
Mâles	72 (65,5)	38 (36,7)	
<b>MHC+AT</b>	<b>65 (63,7)</b>	<b>37 (36,3)</b>	
Femelles	21 (60,0)	14 (40,0)	0,57
Males	44 (65,7)	23 (34,3)	
<b>Total</b>	<b>252 (59,4)</b>	<b>172 (40,6)</b>	

## 1.2. Étude ancillaire : Effet du cycle œstral sur le succès de la chirurgie

### 1.2.1. Souris sham

Le cycle œstral n'avait pas d'effet sur le pourcentage de succès de la chirurgie chez les souris sham (cf Figure 35).

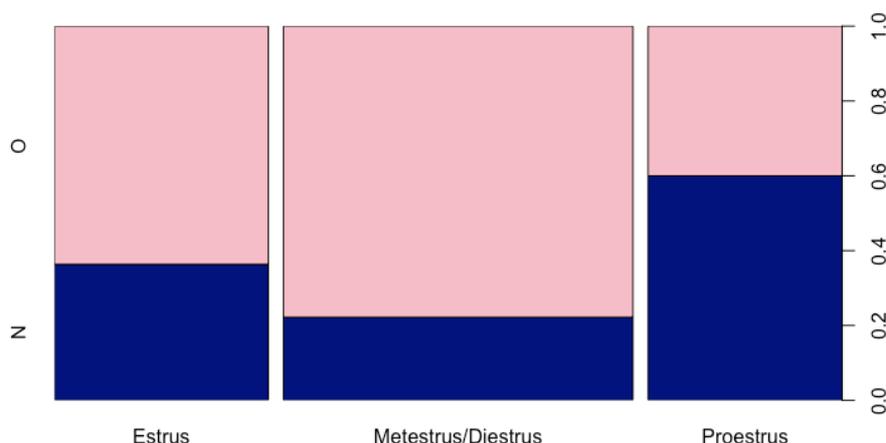


**Figure 35 :** Effet du cycle œstral sur le pourcentage de succès chez les femelles ayant eu une injection de sérum physiologique.

*N*=échec de la chirurgie, *O*= succès de la chirurgie, 4 souris en œstrus, 9 souris en metestrus/diestrus, 3 souris en præstrus.

### 1.2.2. Souris avec une microhémorragie

Le cycle œstral n'avait pas d'effet sur le pourcentage de succès de la chirurgie chez les souris ayant eu une injection de collagénase ( $p=0,15$ ) (cf Figure 36). Néanmoins il expliquait à hauteur de 32% la variabilité du succès de la chirurgie.



**Figure 36 :** Effet du cycle œstral sur le pourcentage de succès chez les femelles ayant eu une injection de collagénase.

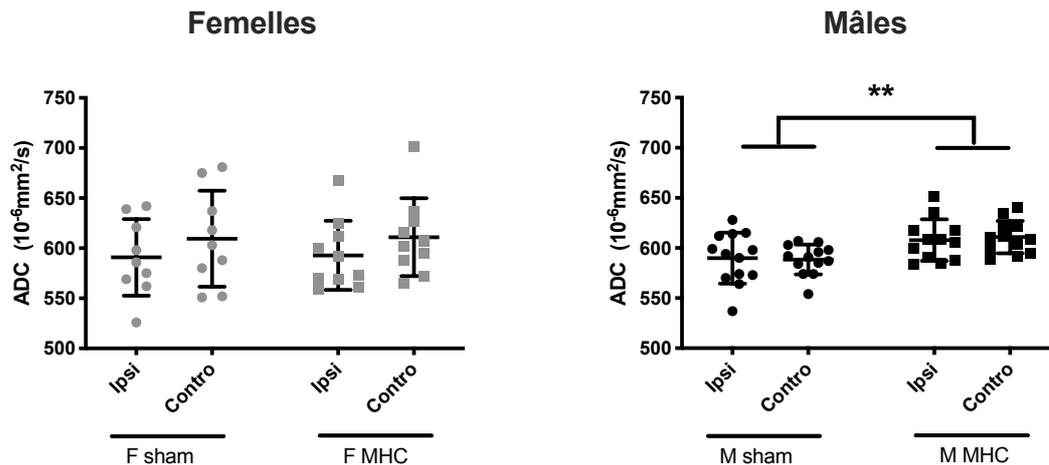
*N*=échec de la chirurgie, *O*= succès de la chirurgie,  $n=11$  souris en œstrus,  $n=18$  souris en metestrus/diestrus,  $n=10$  souris en præstrus.

## 2. Étude des effets locorégionaux aigus (24h après la chirurgie)

### 2.1. Parenchyme cérébral

Chez les femelles, 24 heures après l'opération, la microhémorragie n'induisait pas de modification de l'ADC comparé au groupe sham (cf Figure 37).

Chez les mâles, la microhémorragie induisait une augmentation de l'ADC en comparaison au groupe sham ( $F(1,23)=8,67$ ;  $p=0,007$  ;  $\eta_G^2=0,22$ ) (cf Figure 37).



**Figure 37 : Coefficient apparent de diffusion chez les femelles et chez les mâles.**

(F sham n=9 ; F MHC n=10 ; M sham n=13 ; M MHC n=12). Les barres représentent la moyenne et l'écart type. Sur le graphe de droite, la différence entre les deux groupes sham et MHC est représentée par les barres horizontales visibles au-dessus du nuage de points. \*\* $p<0,01$

### 2.2. Mobilité de l'eau dans les compartiments microvasculaires

Chez les femelles, le coefficient de pseudo-diffusion  $D^*$  variait en fonction du groupe et de la zone corticale (interaction ;  $F(1,16)=6,7$  ;  $p=0,02$  ;  $\eta_G^2=0,17$ ). La MHC induisait une augmentation du coefficient de pseudo-diffusion  $D^*$  du côté lésé en comparaison au côté non lésé ( $p=0,039$ ) mais également en comparaison au côté lésé chez les sham ( $p=0,011$ ) (cf Figure 38 et Figure 39).

Chez les mâles, la microhémorragie n'induisait pas de modification du coefficient de pseudo-diffusion  $D^*$  par rapport au groupe sham (cf Figure 38 et Figure 39).

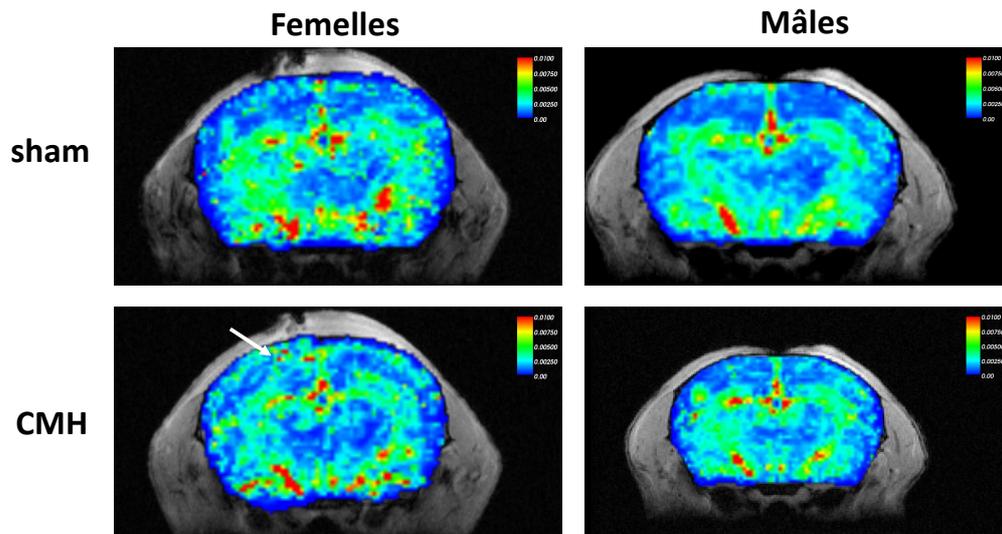


Figure 38 : Cartes moyenne de  $D^*$  chez les femelles et chez les mâles sham et MHC, 24h après la chirurgie. La flèche blanche chez les femelles indique la microhémorragie.

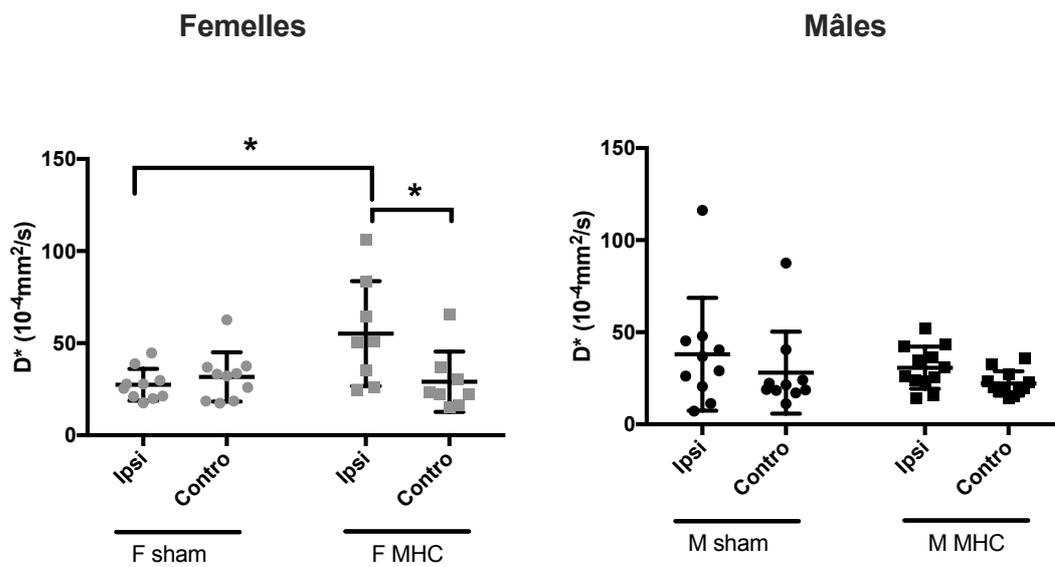
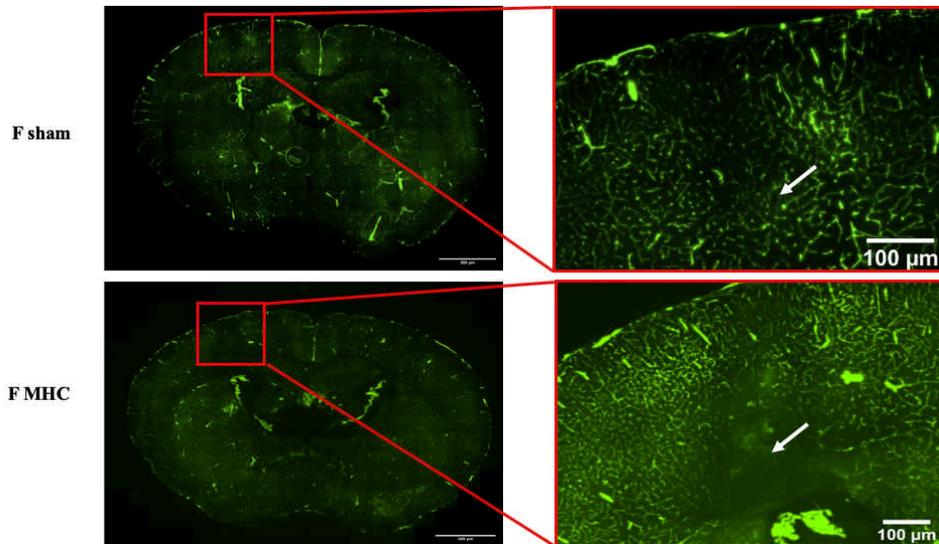


Figure 39 : Coefficient de pseudo-diffusion  $D^*$  chez les femelles et chez les mâles. (F sham  $n=9$  ; F MHC  $n=8$  ; M sham  $n=10$  ; M MHC  $n=10$ ). Les barres représentent la moyenne et l'écart type.  $*p<0,05$

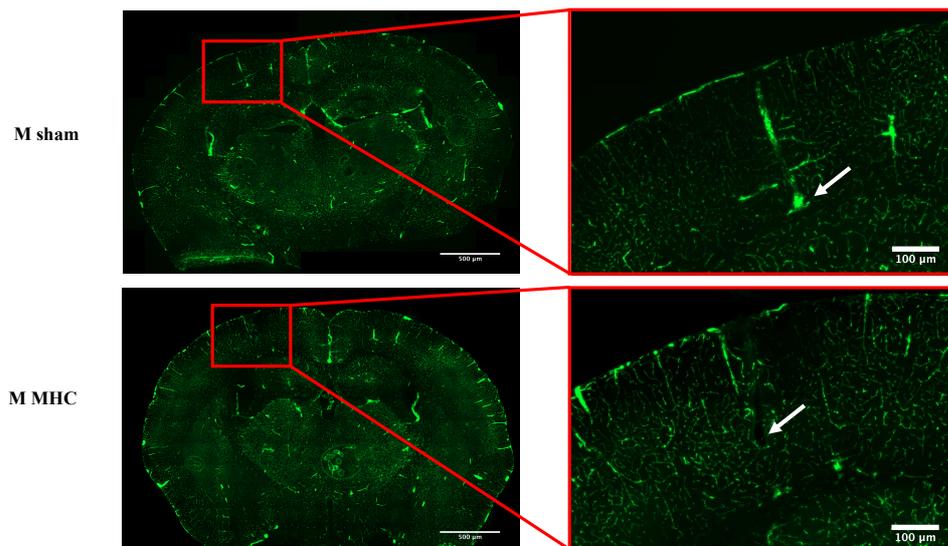
### 2.3. Intégrité de la BHE visualisée avec l'injection de FITC

Chez les femelles, la collagénase a induit une altération de la BHE (visible par extravasation du FITC au niveau du site d'injection). Cette altération n'est pas retrouvée chez le groupe sham (cf Figure 40).



**Figure 40 :** Visualisation de l'intégrité de la BHE par injection de FITC chez les femelles, 24h après la chirurgie. Barres d'échelles sur les photos de gauche 500µm, barres d'échelles sur les photos de droite 100 µm. La flèche représente le site d'injection.

Chez les mâles, la collagénase a induit une hémorragie qui reste localisée dans le cortex au niveau du point d'impact de l'aiguille (cf Figure 41). Aucune extravasation de FITC n'était visible chez les groupes sham et MHC indiquant une absence d'altération de la BHE à 24h.



**Figure 41 :** Visualisation de l'intégrité de la BHE par injection de FITC chez les mâles, 24h après la chirurgie. Barres d'échelles sur les photos de gauche 500µm, barres d'échelles sur les photos de droite 100 µm. La flèche représente le site d'injection.

### 3. Étude des effets locorégionaux de la microhémorragie et de sa modulation par atorvastatine à 6 semaines post-chirurgie

#### 3.1. Parenchyme cérébral

##### 3.1.1. Effet de la microhémorragie

La microhémorragie n'induisait pas de modification de l'ADC chez les femelles ou chez les mâles (cf Figure 42).

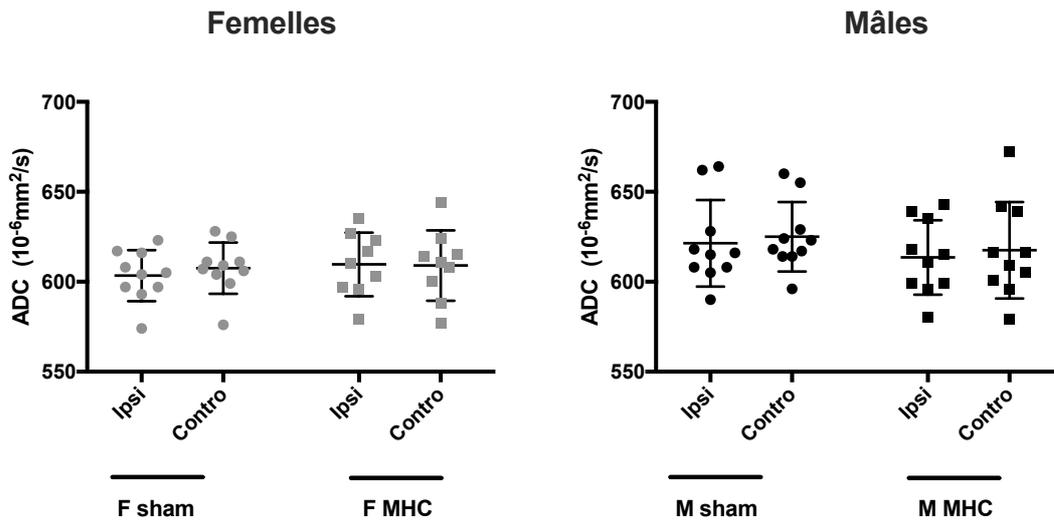


Figure 42: Coefficient apparent de diffusion dans le cortex des femelles et des mâles sham et MHC. (F sham n=10 ; F MHC n=9 ; M MHC n=10 ; M MHC n=10). Les barres représentent la moyenne et l'écart type.

##### 3.1.2. Effet de l'atorvastatine

Le traitement n'induisait pas de modification de l'ADC chez les femelles ou chez les mâles (cf Figure 43).

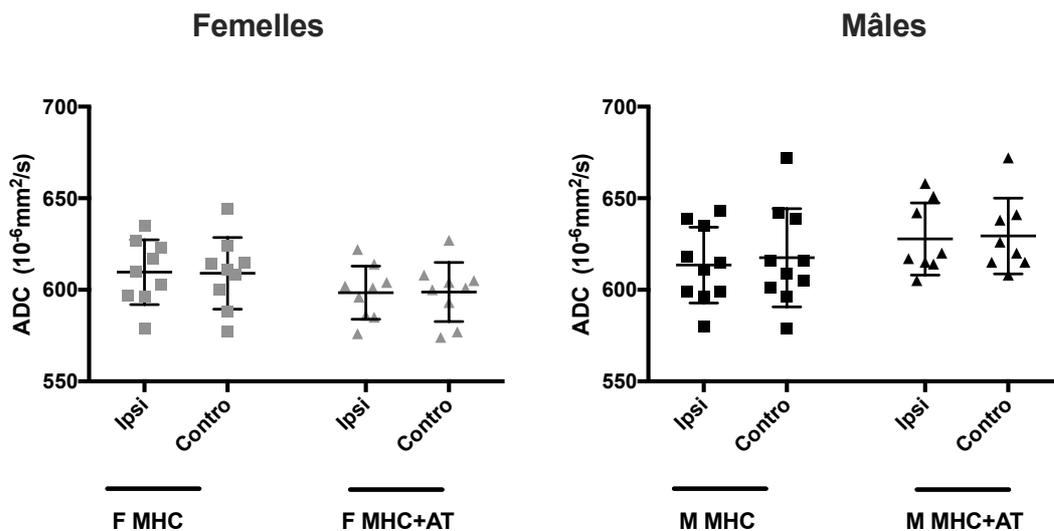


Figure 43 : Coefficient apparent de diffusion dans le cortex des femelles et des mâles MHC et MHC+AT. (F MHC n=9 ; F MHC+AT n=9 ; M MHC n=10 ; M MHC+AT n=8). Les barres représentent la moyenne et l'écart type.

## 3.2. Mobilité de l'eau dans les compartiments microvasculaires

### 3.2.1. Effet de la microhémorragie

Chez les femelles, la microhémorragie ne modifiait pas le coefficient de pseudo-diffusion  $D^*$  (cf Figure 44 et Figure 45).

Chez les mâles au contraire, la microhémorragie diminuait le coefficient de pseudo-diffusion  $D^*$  en comparaison au groupe sham ( $F(1,13)=6,03$  ;  $p=0,03$  ;  $\eta_G^2=0,22$ ) (cf Figure 44 et Figure 45).

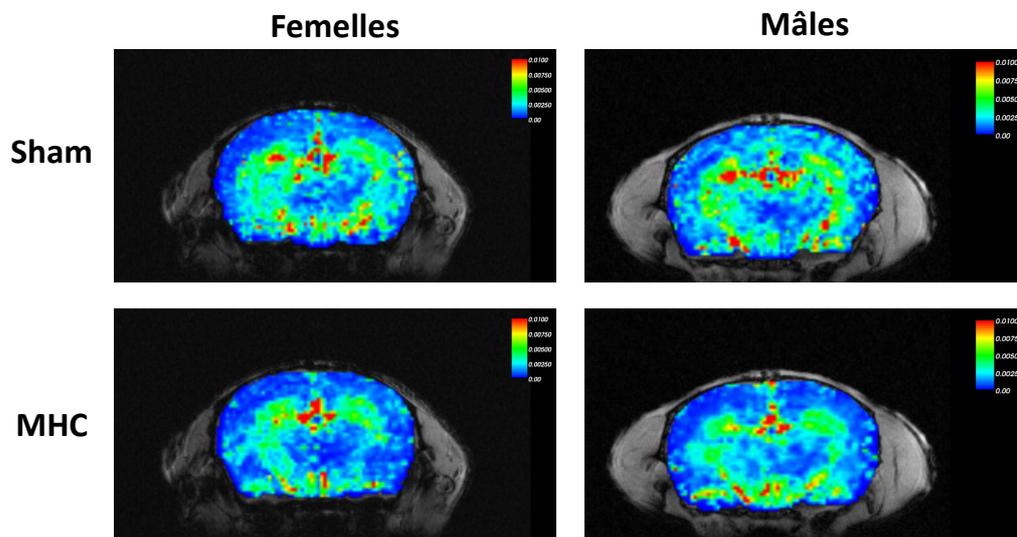


Figure 44 : Cartes moyennes de  $D^*$  chez les femelles et chez les mâles sham et MHC.

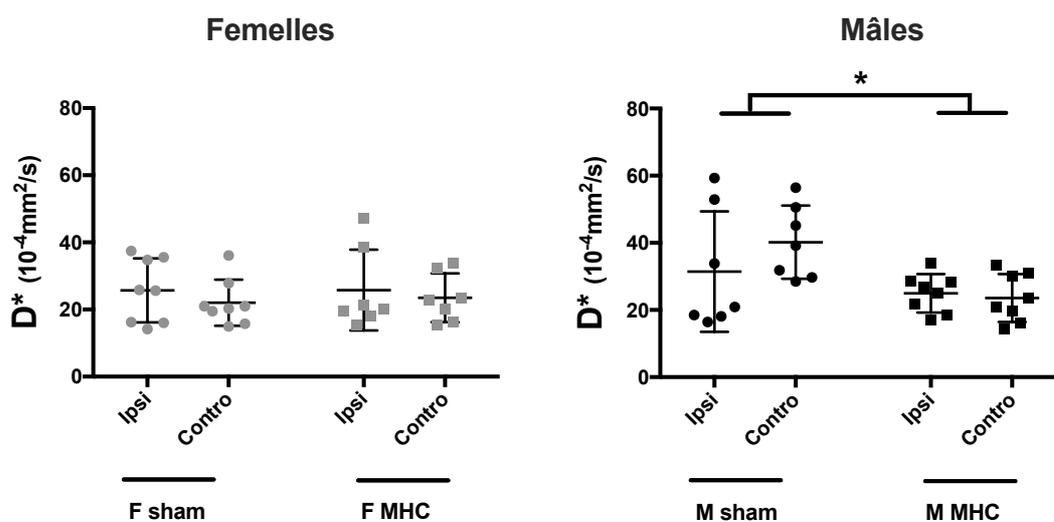


Figure 45 Coefficient de pseudo-diffusion  $D^*$  dans le cortex des femelles et des mâles sham et MHC. (F sham  $n=8$  ; F MHC  $n=7$  ; M sham  $n=7$  ; M MHC  $n=8$ ). Les barres représentent la moyenne et l'écart type. \* $p<0,05$

### 3.2.2. Effet de l'atorvastatine

Le traitement par atorvastatine ne modifiait pas la mobilité de l'eau dans les compartiments microvasculaires chez les mâles et les femelles (cf Figure 46 et Figure 47).

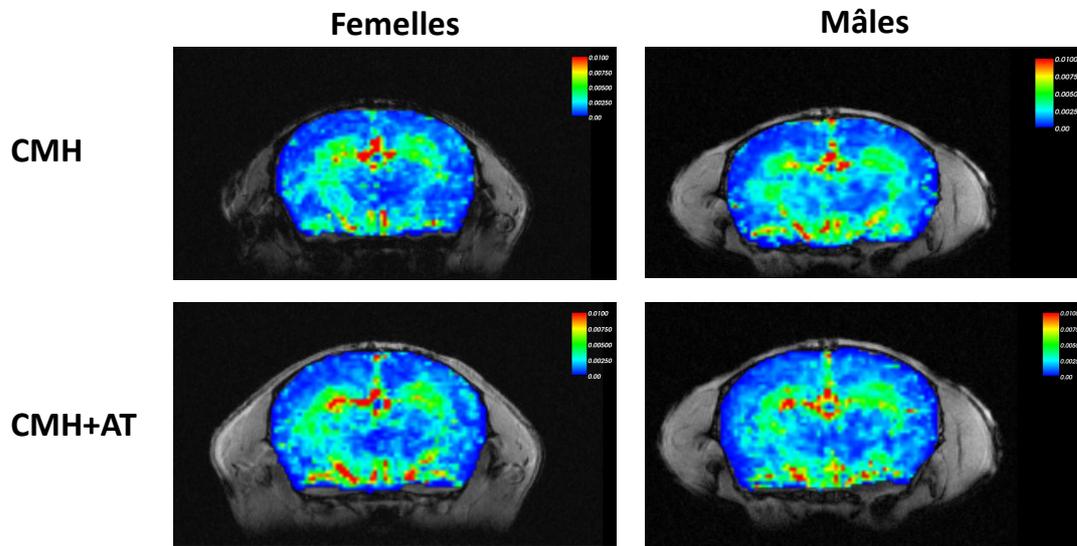


Figure 46 : Cartes moyennes de  $D^*$  chez les femelles et chez les mâles MHC et MHC+AT.

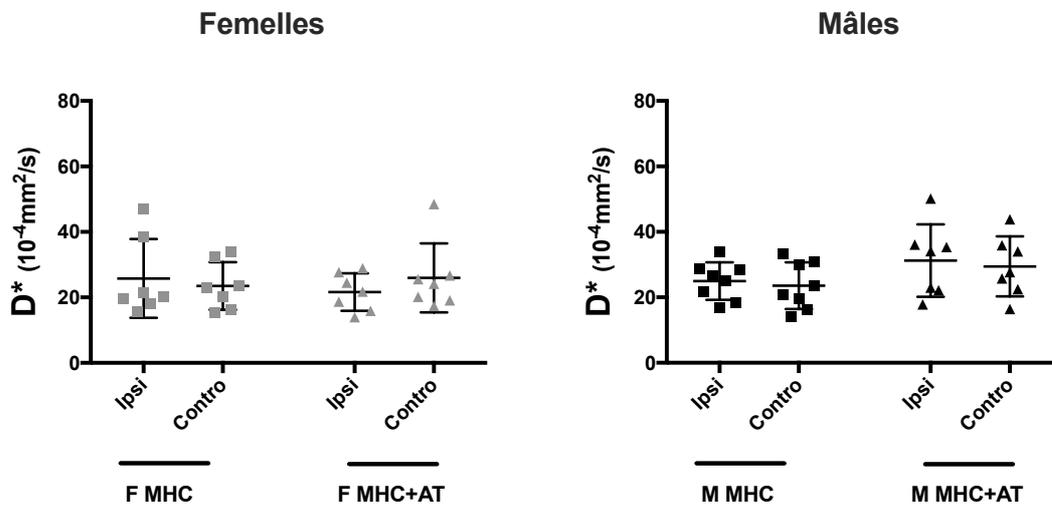


Figure 47 : Coefficient de pseudo-diffusion  $D^*$  dans les cortex des femelles et des mâles MHC et MHC+AT. (F MHC  $n=7$  ; F MHC+AT  $n=7$  ; M MHC  $n=8$  ; M MHC+AT  $n=7$ ). Les barres représentent la moyenne et l'écart type.

### 3.3. Étude des astrocytes et de la microglie

Six semaines après l'opération, des astrocytes et des cellules gliales sont présents au niveau du site d'injection (cf Figure 48) chez tous les groupes avec une majorité d'astrocytes chez les femelles.

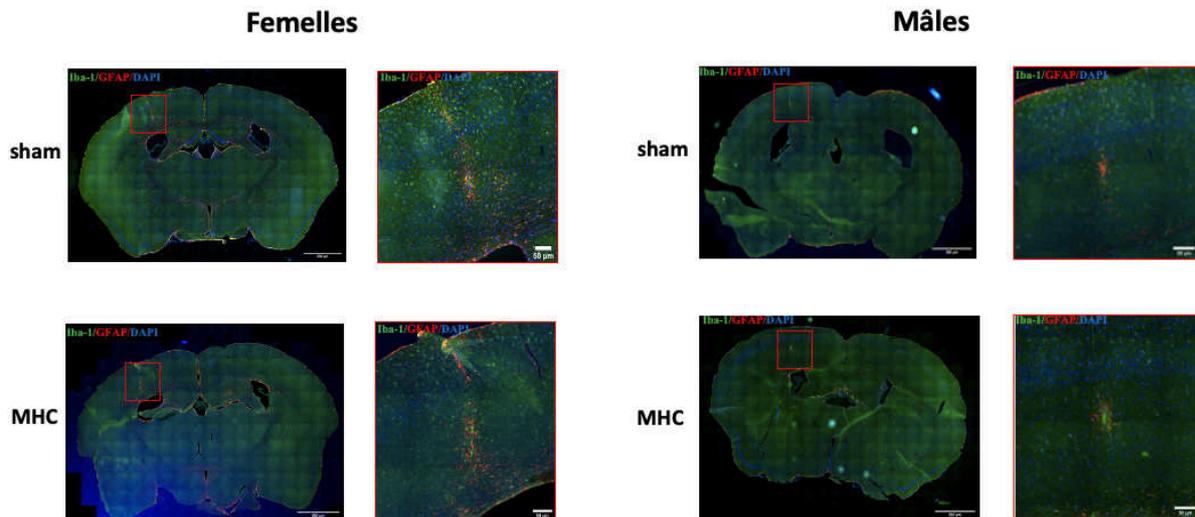


Figure 48 : Immunomarquage des astrocytes (GFAP en rouge), de la microglie (IBA1 en vert) et des noyaux (DAPI en bleu) sur des coupes représentatives.

Les barres d'échelles sont respectivement 500 $\mu$ m et 50 $\mu$ m.

#### 3.3.1. Étude des astrocytes

##### 3.3.1.1. Effet de la microhémorragie

Chez les femelles et chez les mâles, la microhémorragie n'avait pas d'effet sur le nombre d'astrocytes (cf Figure 49).

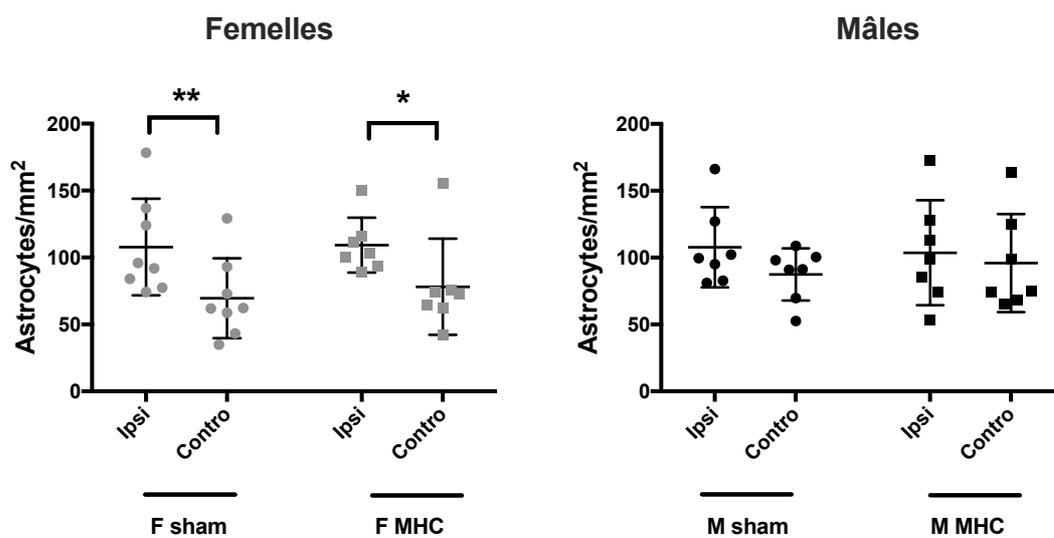
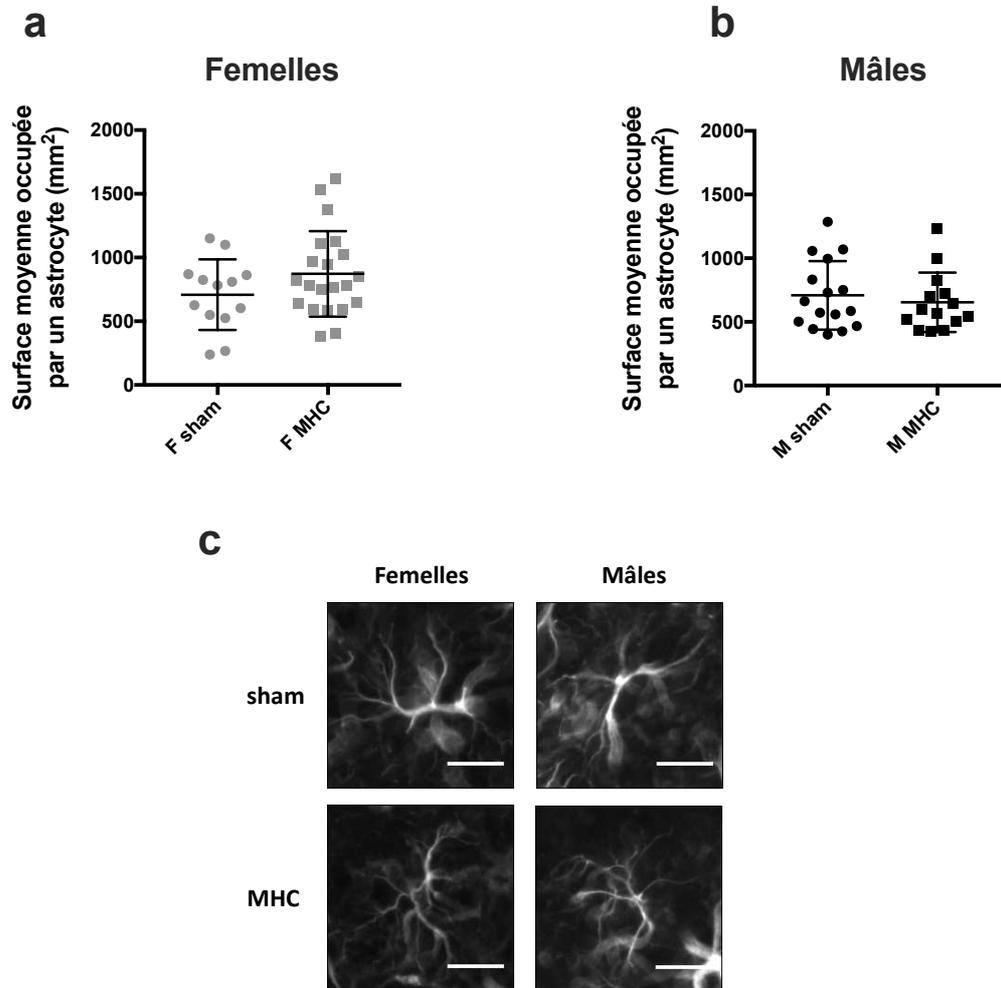


Figure 49 : Semi-quantification des astrocytes par  $\text{mm}^2$  dans le cortex des femelles et des mâles sham et MHC. (F sham n=8 ; F MHC n=7 ; M sham n=7 ; M MHC n=7). Les barres représentent la moyenne et l'écart type.

\* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$

### 3.3.1.2. Effet de la microhémorragie sur la surface occupée par les astrocytes autour du site d'injection

La surface moyenne occupée par un astrocyte autour du site d'injection n'était pas modifiée par la microhémorragie chez les femelles et chez les mâles (cf Figure 50).



**Figure 50 : Surface moyenne occupée par un astrocyte autour de la lésion.**

(a) chez les femelles sham et MHC et (b) chez les mâles sham et MHC. Les barres représentent la moyenne et l'écart type. (c) Astrocytes représentatifs. La barre d'échelle est 20µm.

### 3.3.1.3. Effet de l'atorvastatine

Chez les femelles, le traitement ne modifiait pas le nombre d'astrocytes (cf Figure 51).

Chez les mâles, le traitement ne modifiait pas le nombre d'astrocytes. Cependant, le nombre d'astrocytes du côté lésé était plus important que celui du côté non lésé ( $p=0,0006$ ) (cf Figure 51).

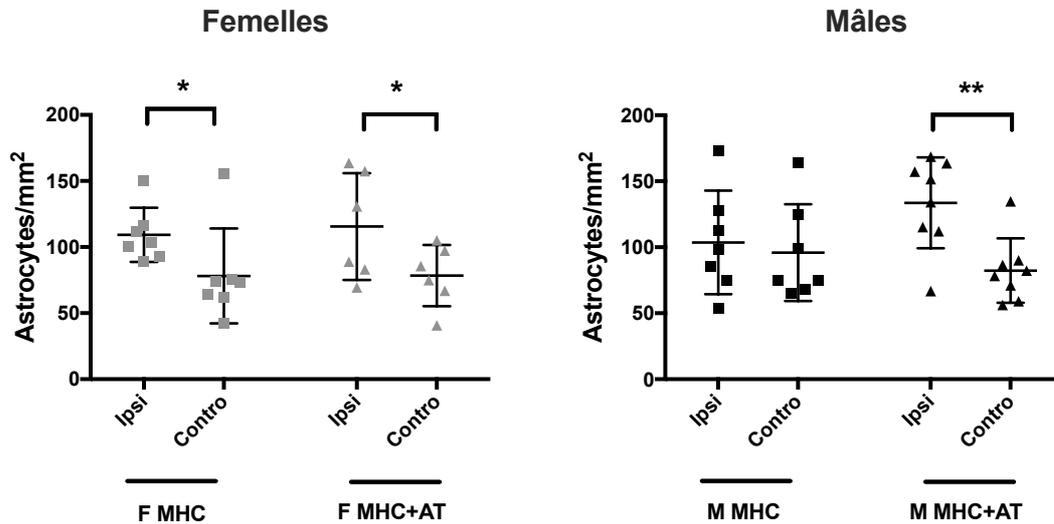


Figure 51 : Semi-quantification des astrocytes par mm<sup>2</sup> dans le cortex des femelles et des mâles MHC et MHC+AT.

(F MHC n=7 ; F MHC+AT n=6 ; M MHC n=7 ; M MHC+AT n=8). Les barres représentent la moyenne et l'écart type. \* $p<0,05$

### 3.3.2. Étude de la microglie

#### 3.3.2.1. Effet de la microhémorragie

La microhémorragie ne modifiait pas le nombre de cellules microgliales chez les femelles et chez les mâles (cf Figure 52).

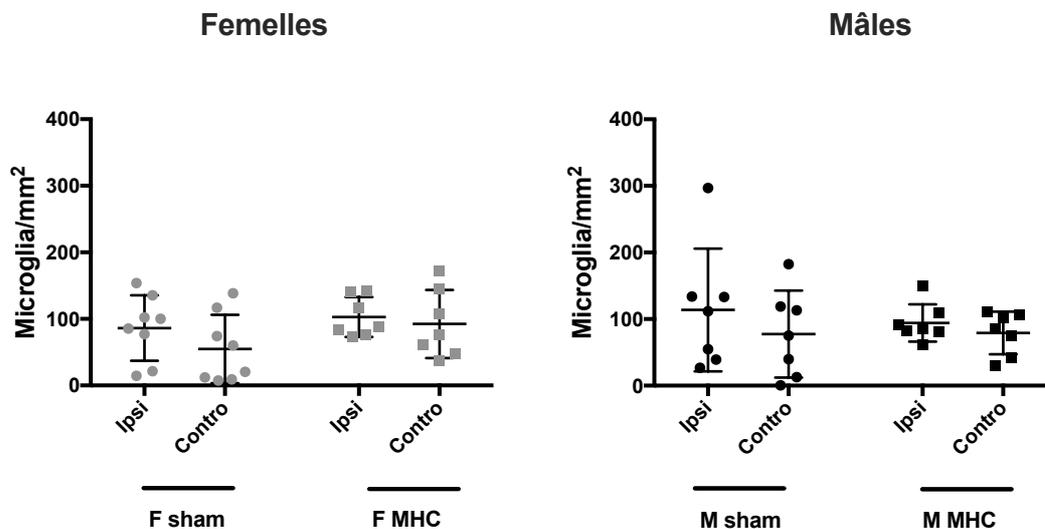


Figure 52 : Semi-quantification des cellules microgliales par mm<sup>2</sup> dans le cortex des femelles et des mâles.

(F sham n=8 ; F MHC n=7 ; M sham n=7 ; M MHC n=7). Les barres représentent la moyenne et l'écart type.

### 3.3.2.2. Effet de l'atorvastatine

Chez les femelles, l'atorvastatine ne modifiait pas le nombre de cellules microgliales (cf Figure 53).

Chez les mâles, le traitement ( $124 \pm 30$  Vs  $87 \pm 11$  ;  $F(1,13)=5,57$  ;  $p=0,03$  ;  $\eta^2_G=0,26$ ) augmentait le nombre de cellules microgliales. De plus, il induisait une augmentation du nombre de cellules microgliales autour de la lésion en comparaison au côté non lésé ( $146 \pm 49$  Vs  $102 \pm 43$  ;  $p=0,009$ ) (cf Figure 53).

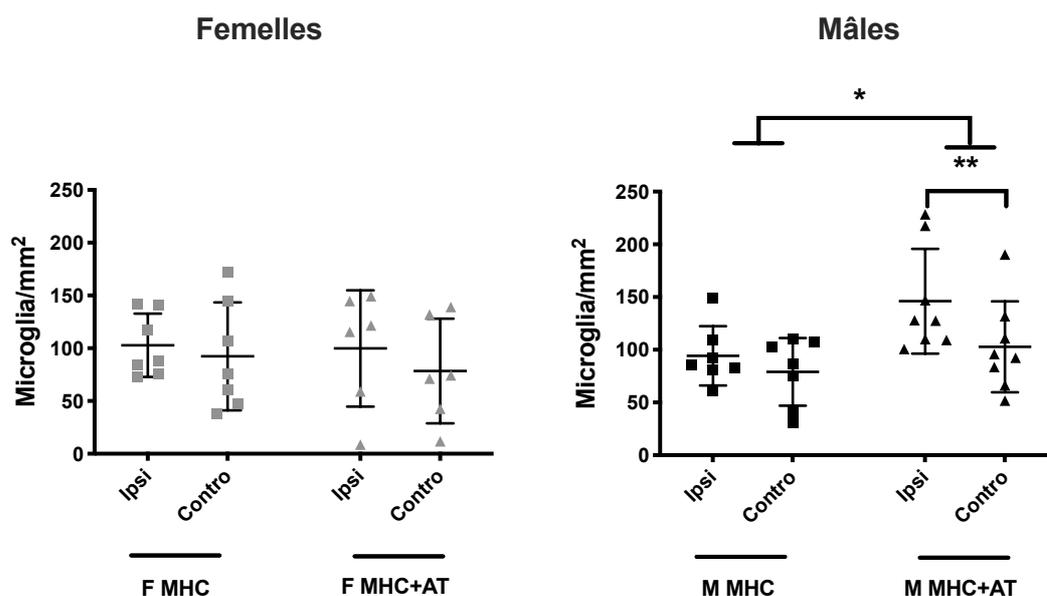


Figure 53 : Semi-quantification des cellules microgliales par mm<sup>2</sup> dans le cortex des femelles et des mâles MHC et MHC+AT.

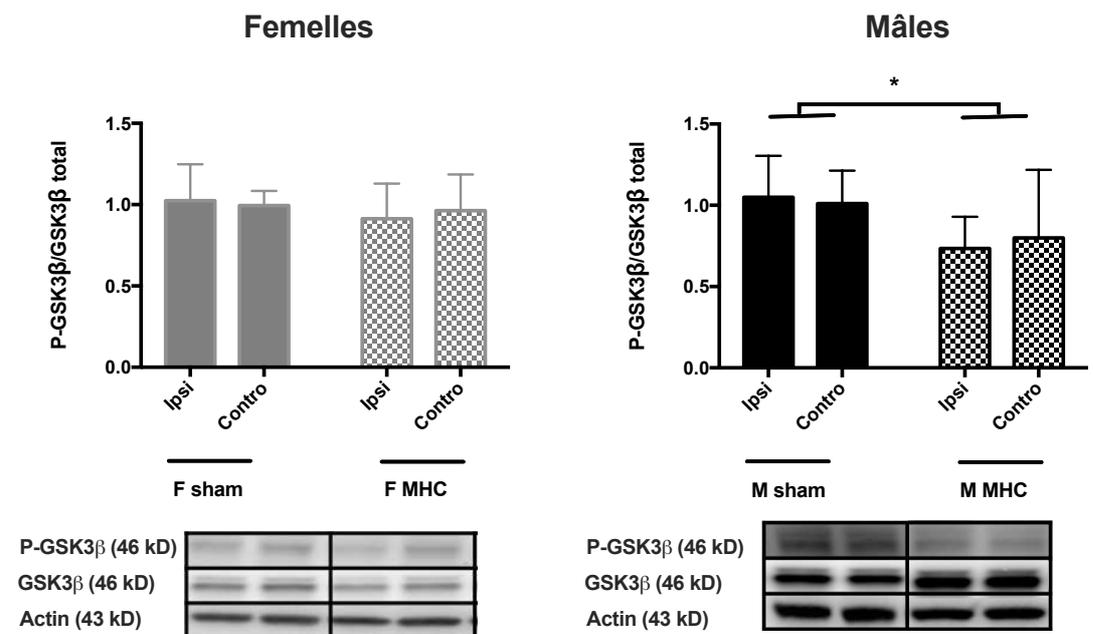
(F MHC n=7 ; F MHC+AT n=6 ; M MHC n=7 ; M MHC+AT n=8). Les barres représentent la moyenne et l'écart type. \* $p<0,05$  ; \*\*  $p<0,01$

## 3.4. Expression protéique de GSK3 $\beta$ et de sa forme phosphorylée

### 3.4.1. Effet de la microhémorragie

Chez les femelles, la microhémorragie ne modifiait pas l'expression protéique du ratio P-GSK3 $\beta$ /GSK3 $\beta$  (cf Figure 54).

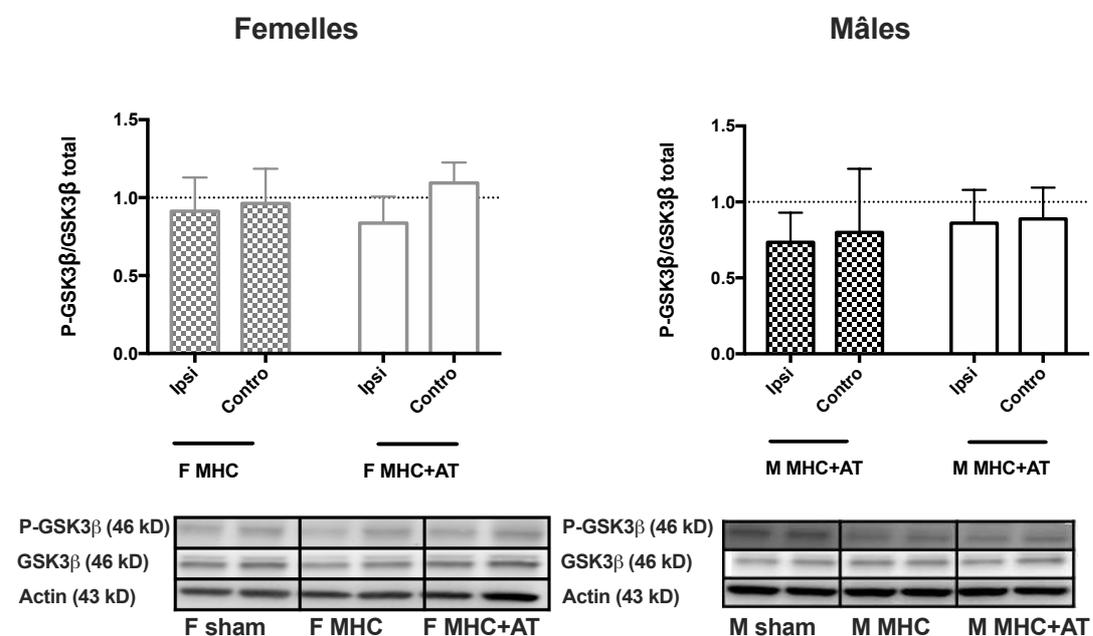
Chez les mâles, la microhémorragie diminuait l'expression protéique du ratio P-GSK3 $\beta$ /GSK3 $\beta$  en comparaison au groupe sham ( $F(2,13)=10,5$  ;  $p=0,002$  ;  $\eta^2_G=0,57$ ) (cf Figure 54).



**Figure 54 :** Western blot P-GSK3 $\beta$ /GSK3 $\beta$  dans le cortex des souris femelles et mâles sham et MHC. (F sham n=5 ; F MHC n=6 ; M sham n=5 ; M MHC n=6). Les barres représentent la moyenne et l'écart type. \*p<0,05

### 3.4.2. Effet de l'atorvastatine

Chez les femelles et chez les mâles, l'atorvastatine n'avait pas d'effet sur l'expression protéique du ratio de P-GSK3 $\beta$ /GSK3 $\beta$  (cf Figure 55).



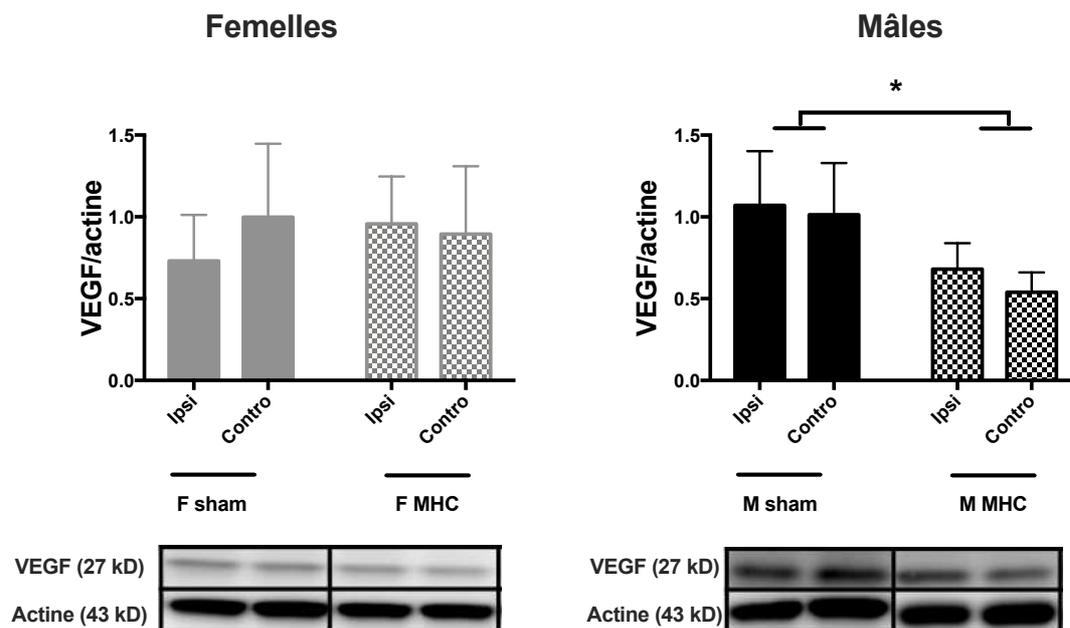
**Figure 55 :** Western blot P-GSK3 $\beta$ /GSK3 $\beta$  dans le cortex des souris femelles et mâles MHC et MHC+AT. (F MHC n=6 ; F MHC+AT n=5 ; M MHC n=6 ; M MHC+AT n=5). Les barres représentent la moyenne et l'écart type.

### 3.5.Expression protéique du VEGF

#### 3.5.1. Effet de la microhémorragie

Chez les femelles, la microhémorragie ne modifiait pas l'expression protéique de VEGF (cf Figure 56).

Chez les mâles, la microhémorragie induisait une diminution de l'expression protéique de VEGF ( $F(1,9)=10,5$  ;  $p=0,01$  ;  $\eta_G^2= 0,49$ ) (cf Figure 56).

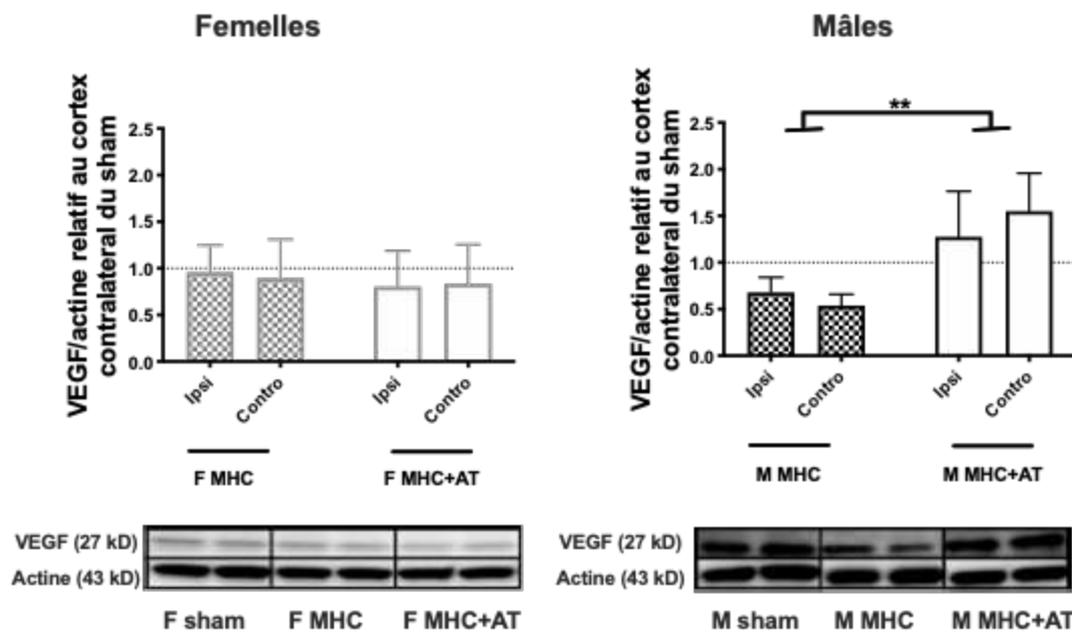


**Figure 56 : Western blot de VEGF dans le cortex des souris femelles et mâles sham et MHC.** (F sham n=5 ; F MHC n=6 ; M sham n=5 ; M MHC n=6). Les barres représentent la moyenne et l'écart type. \* $p<0,05$

#### 3.5.2. Effet de l'atorvastatine

Chez les femelles, l'atorvastatine n'induisait pas de différence d'expression protéique de VEGF (cf Figure 57).

Chez les mâles, l'expression protéique de VEGF était augmentée par l'atorvastatine ( $F(1,9)=21,48$  ;  $p=0,002$  ;  $\eta_G^2= 0,66$ ) (cf Figure 57).



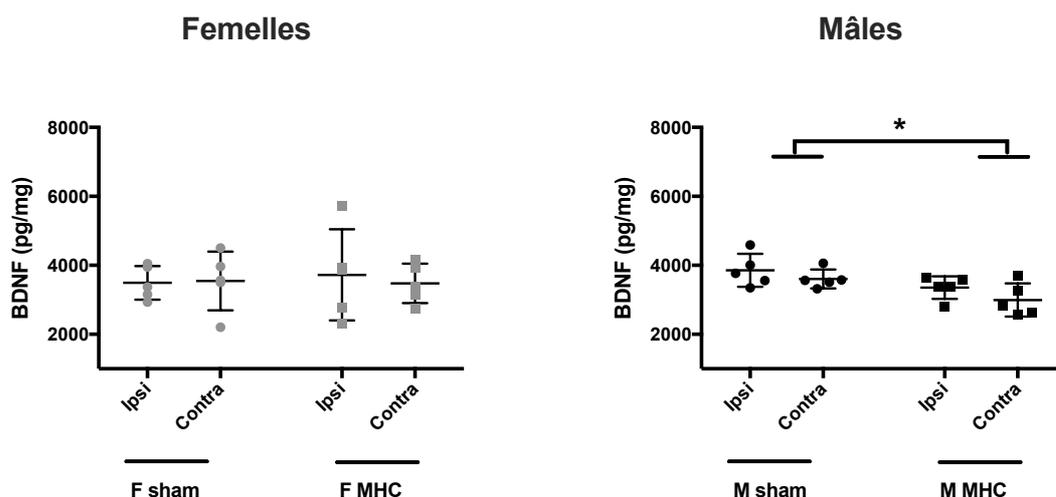
**Figure 57 :** Western blot de VEGF dans le cortex des souris femelles et mâles MHC et MHC+AT. (F MHC n=6 ; F MHC+AT n=5 ; M MHC n=6 ; M MHC+AT n=5). Les barres représentent la moyenne et l'écart type. \*\*  $p < 0,01$

### 3.6.Expression protéique du BDNF

#### 3.6.1. Effet de la microhémorragie

Chez les femelles, la microhémorragie ne modifiait pas la concentration de BDNF (cf Figure 58).

Chez les mâles, la microhémorragie induisait une diminution de la concentration de BDNF ( $F(1,8)=6,9$  ;  $p=0,03$  ;  $\eta_G^2=0,37$ ) (cf Figure 58).



**Figure 58 :** BDNF dans le cortex des souris femelles et mâles sham et MHC. (F sham n=5 ; F MHC n=5 ; M sham n=5 ; M MHC n=5). Les barres représentent la moyenne et l'écart type. \*  $p < 0,05$

### 3.6.2. Effet de l'atorvastatine

L'atorvastatine augmentait la concentration de BDNF chez les femelles et les mâles ( $F(1,8)=92,7$  ;  $p=0,00001$  ;  $\eta_G^2=0,86$  et  $F(1,8)=306,9$  ;  $p=1,15 \times 10^{-7}$  ;  $\eta_G^2=0,92$  respectivement).

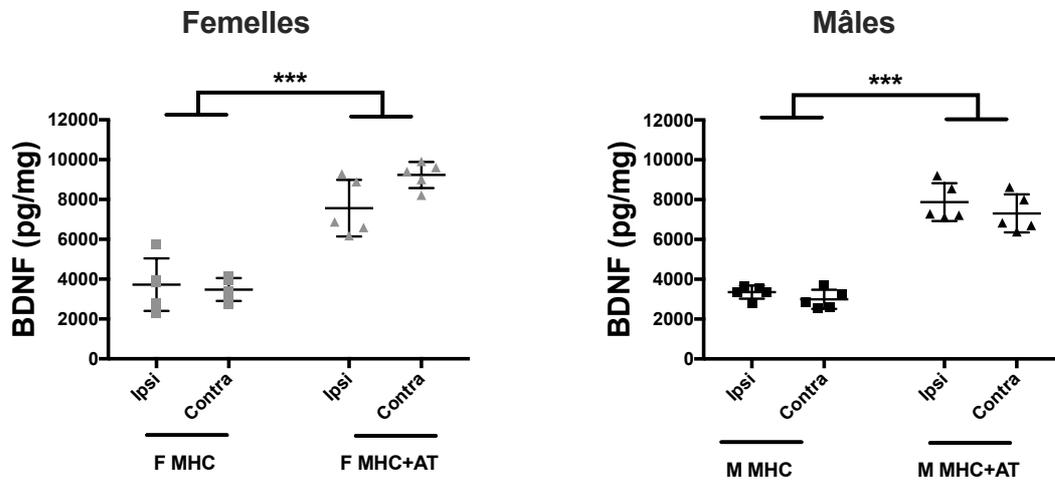


Figure 59 : BDNF dans le cortex des souris femelles et mâles MHC et MHC+AT. (F MHC n=5 ; F MHC+AT n=5 ; M MHC n=5 ; M MHC+AT n=5). Les barres représentent la moyenne et l'écart type. \*\*\*  $p < 0,005$

## 3.7. Expression relative de l'ARN messager des ER $\alpha$ et $\beta$

### 3.7.1. Effet du sexe

L'expression relative de l'ARNm de ER $\alpha$  était augmentée chez les femelles en comparaison aux mâles ( $F(1,12)=16,5$  ;  $p=0,002$  ;  $\eta_G^2=0,50$ ). L'expression relative de l'ARNm de ER $\beta$  n'était pas différente en fonction du sexe (cf Figure 60).

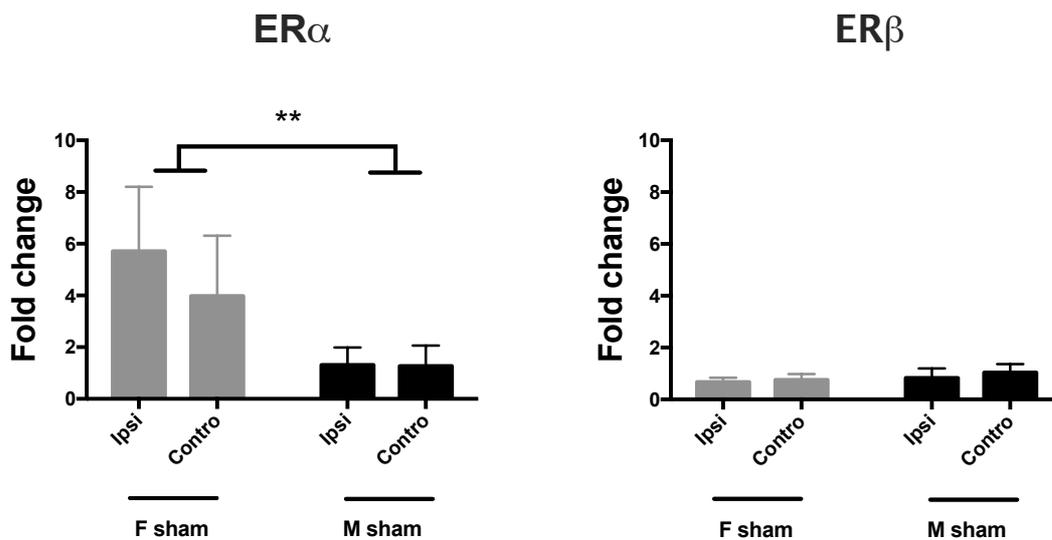
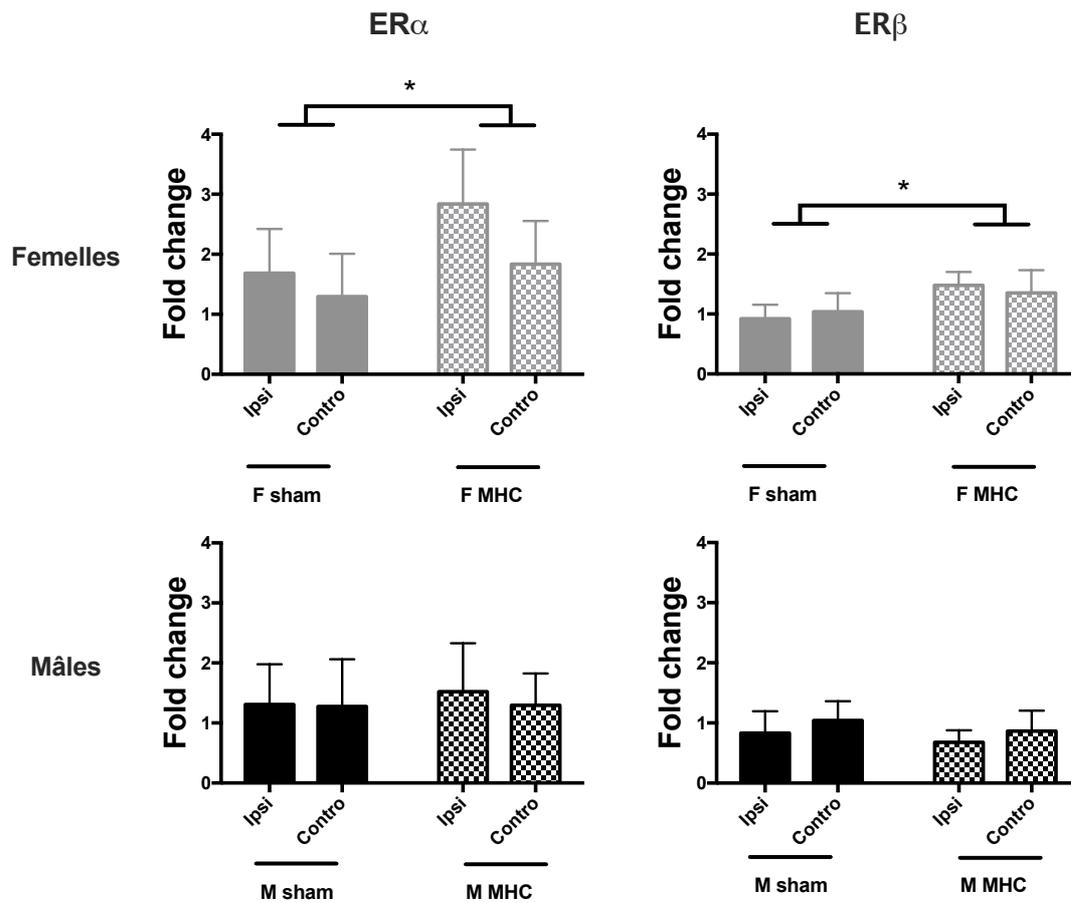


Figure 60 : Expression relative de l'ARNm des ER $\alpha$  et des ER $\beta$  en fonction du sexe dans le cortex. Le groupe de référence est le cortex controlatéral du groupe mâle sham (n=7/groupe). Les barres représentent la moyenne et l'écart type. \*\*  $p < 0,01$

### 3.7.2. Effet de la microhémorragie

Chez les femelles, la microhémorragie augmentait l'expression relative de l'ARNm de ER $\alpha$  en comparaison au groupe sham ( $F(1,12)=6,4$  ;  $p=0,02$  ;  $\eta_G^2= 0,21$ ). La microhémorragie augmentait l'expression relative de l'ARNm de ER $\beta$  en comparaison au groupe sham ( $F(1,12)=20,9$  ;  $p=0,0006$  ;  $\eta_G^2= 0,38$ ). (cf Figure 61).

Chez les mâles, la microhémorragie n'induisait pas de modification de l'expression relative de l'ARNm des ER $\alpha$  et ER $\beta$  (cf Figure 61).



**Figure 61 : Expression relative de l'ARNm des ER $\alpha$  et des ER $\beta$  dans le cortex chez les mâles et les femelles sham et MHC.**

Le groupe de référence est le cortex controlatéral du groupe sham ( $n=7$ /groupe). Les barres représentent la moyenne et l'écart type. \* $p<0,05$

### 3.7.3. Effet du traitement

Chez les femelles, l'atorvastatine diminuait l'expression relative de l'ARNm de ER $\alpha$  en comparaison au groupe MHC (F(1,12)=18,23 ; p=0,001 ;  $\eta_G^2= 0,47$ ) et l'expression relative de l'ARNm de ER $\beta$  en comparaison au groupe MHC (F(1,12)=28,45 ; p=0,0002 ;  $\eta_G^2= 0,51$ ). (cf Figure 62).

Chez les mâles, l'atorvastatine n'induisait de modification de l'expression relative de l'ARNm de ER $\alpha$  et ER $\beta$  (cf Figure 62).

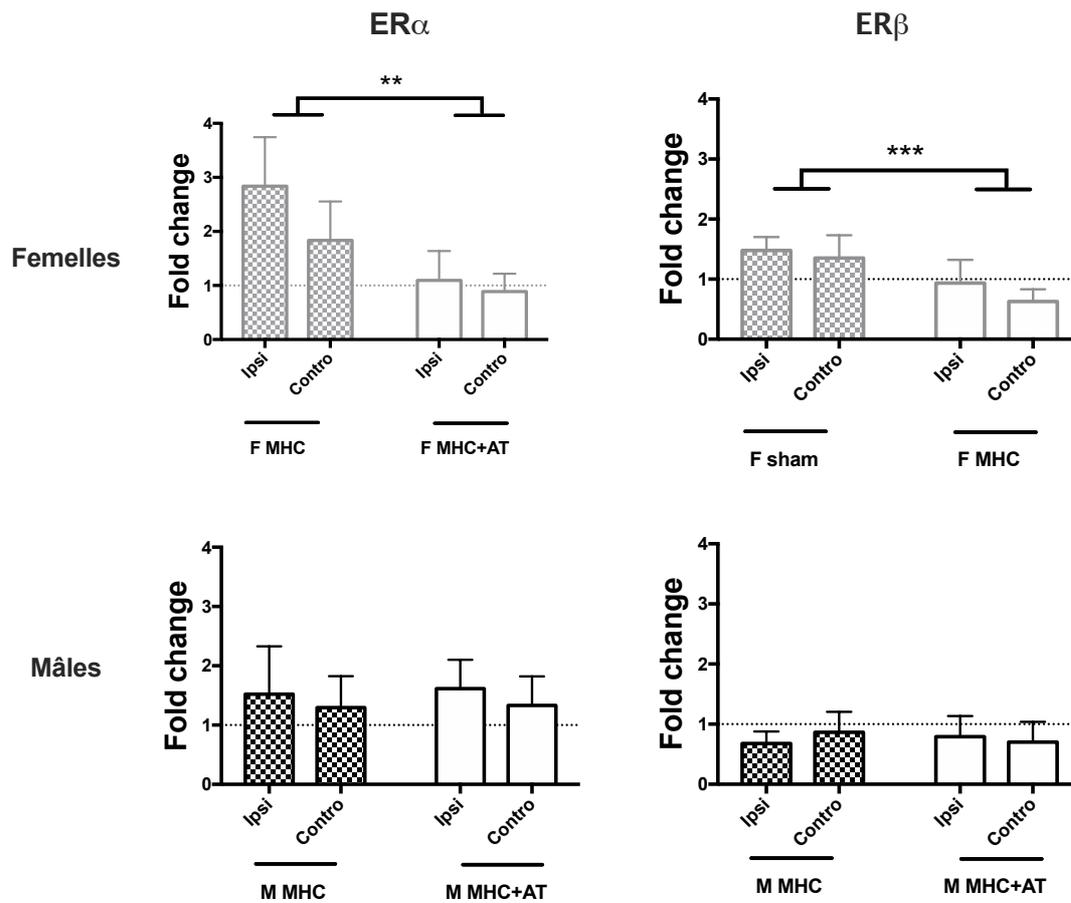


Figure 62 : Expression relative de l'ARNm des ER $\alpha$  et des ER $\beta$  dans le cortex chez les mâles et les femelles MHC et MHC+AT.

Le groupe de référence est le cortex controlatéral du groupe sham (n=7/groupe). Les barres représentent la moyenne et l'écart type.



## 4. Étude des effets hippocampiques de la microhémorragie et de sa modulation par l'atorvastatine à 6 semaines post chirurgie

### 4.1. Parenchyme cérébral

#### 4.1.1. Effet de la microhémorragie

Le coefficient apparent de diffusion dans l'hippocampe n'était pas modifié par la microhémorragie chez les femelles et les mâles (cf Figure 63).

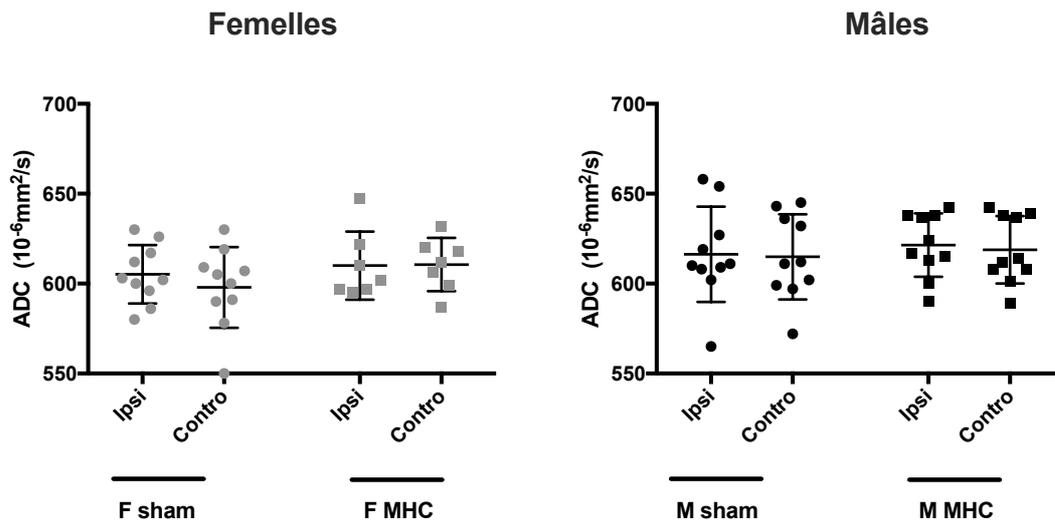


Figure 63 : Coefficient apparent de diffusion dans l'hippocampe des femelles et des mâles sham et MHC. (F sham n=10 ; F MHC n=9 ; M sham n=10 ; M MHC n=10). Les barres représentent la moyenne et l'écart type.

#### 4.1.2. Effet de l'atorvastatine

Le coefficient apparent de diffusion n'était pas modifié par le traitement chez les femelles et les mâles (cf Figure 64).

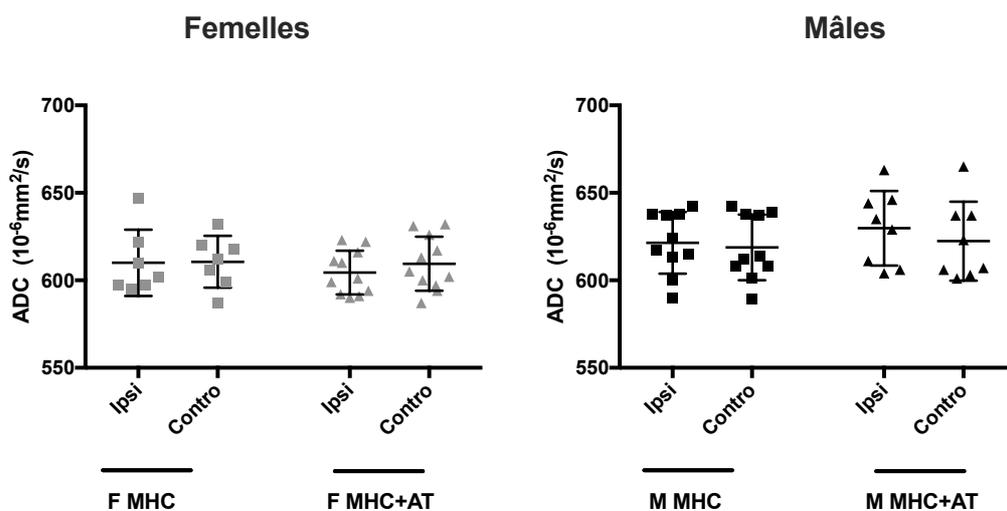


Figure 64 : Coefficient apparent de diffusion dans les hippocampes des souris femelles et mâles MHC et MHC+AT. (F MHC n=9 ; F MHC+AT n=11 ; M MHC n=10 ; M MHC+AT n=8). Les barres représentent la moyenne et l'écart type.

## 4.2. Mobilité de l'eau dans les compartiments microvasculaires

### 4.2.1. Effet de la microhémorragie

Le coefficient de pseudo-diffusion  $D^*$  dans l'hippocampe n'était pas modifié par la microhémorragie chez les femelles et les mâles (cf Figure 65).

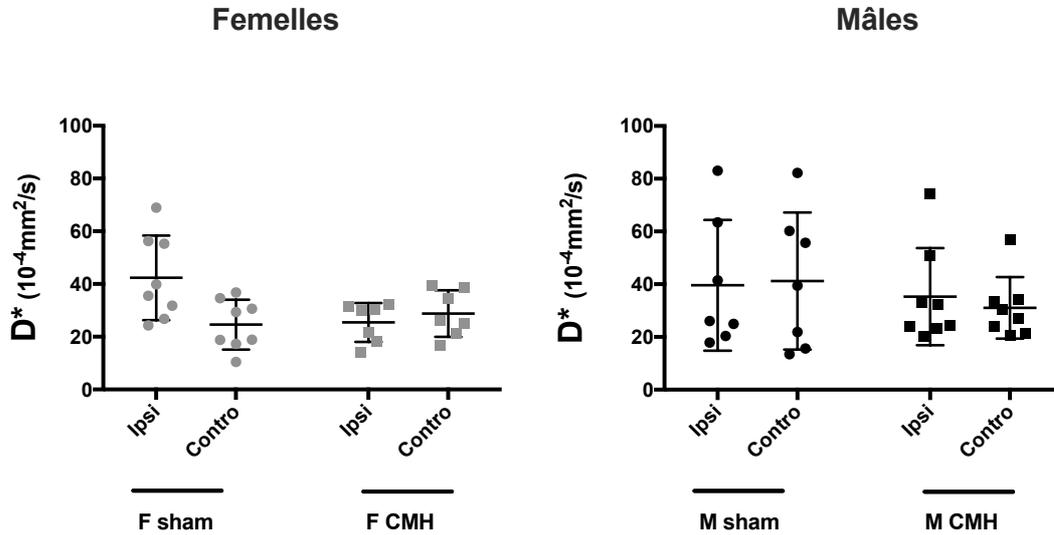


Figure 65 : Coefficient de pseudo-diffusion  $D^*$  dans les hippocampes chez les femelles et chez les mâles sham et MHC.

(F sham  $n=8$  ; F MHC  $n=7$  ; M sham  $n=7$  ; M MHC  $n=8$ ). Les barres représentent la moyenne et l'écart type.

### 4.2.2. Effet de l'atorvastatine

Le coefficient de diffusion dans l'hippocampe n'était pas modifié par le traitement chez les femelles et les mâles (cf Figure 66).

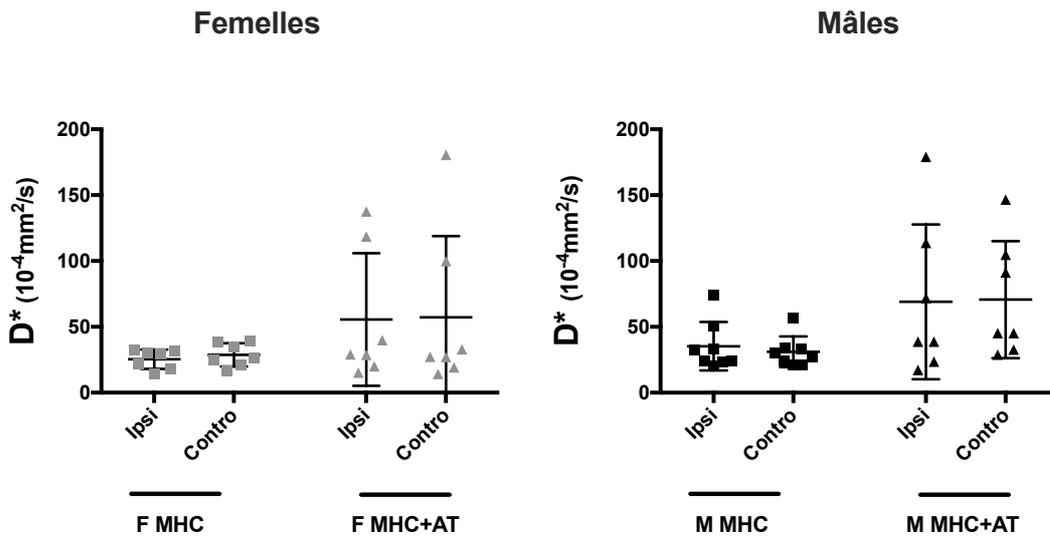


Figure 66 : Coefficient de pseudo-diffusion  $D^*$  dans les hippocampes des femelles et des mâles MHC et MHC+AT.

(F MHC  $n=7$  ; F MHC+AT  $n=7$  ; M MHC  $n=8$  ; M MHC+AT  $n=7$ ). Les barres représentent la moyenne et l'écart type.

### 4.3. Étude des astrocytes et de la microglie

#### 4.3.1. Astrocytes

##### 4.3.1.1. Effet de la microhémorragie

Chez les femelles, la microhémorragie augmentait le nombre d'astrocytes en comparaison au groupe sham ( $F(1,12)=9,6$  ;  $p=0,009$  ;  $\eta_G^2= 0,41$ ). (cf Figure 67).

Chez les mâles, la microhémorragie augmentait le nombre d'astrocytes en comparaison au groupe sham ( $F(1,12)=6,1$  ;  $p=0,03$  ;  $\eta_G^2= 0,3$ ). (cf Figure 67).

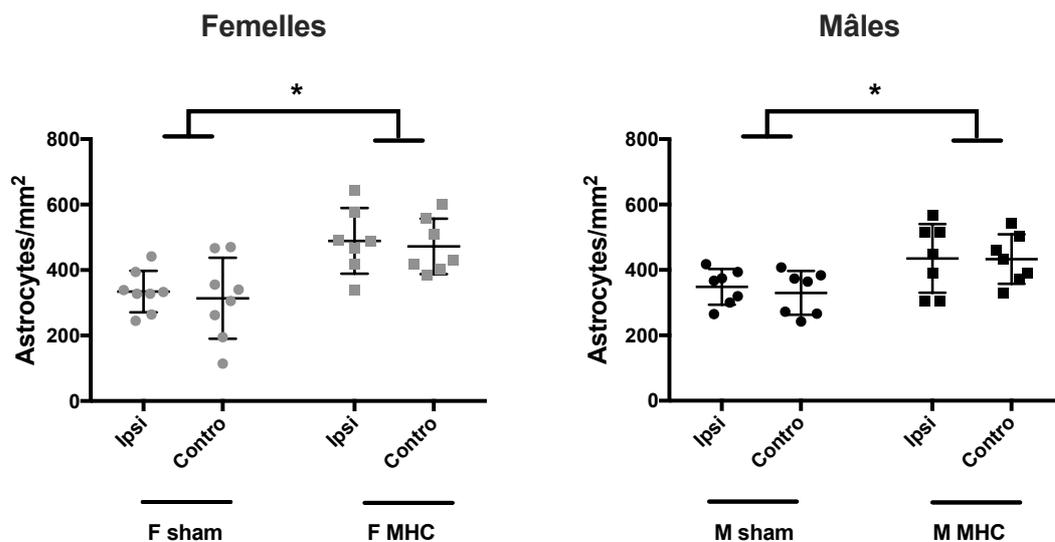


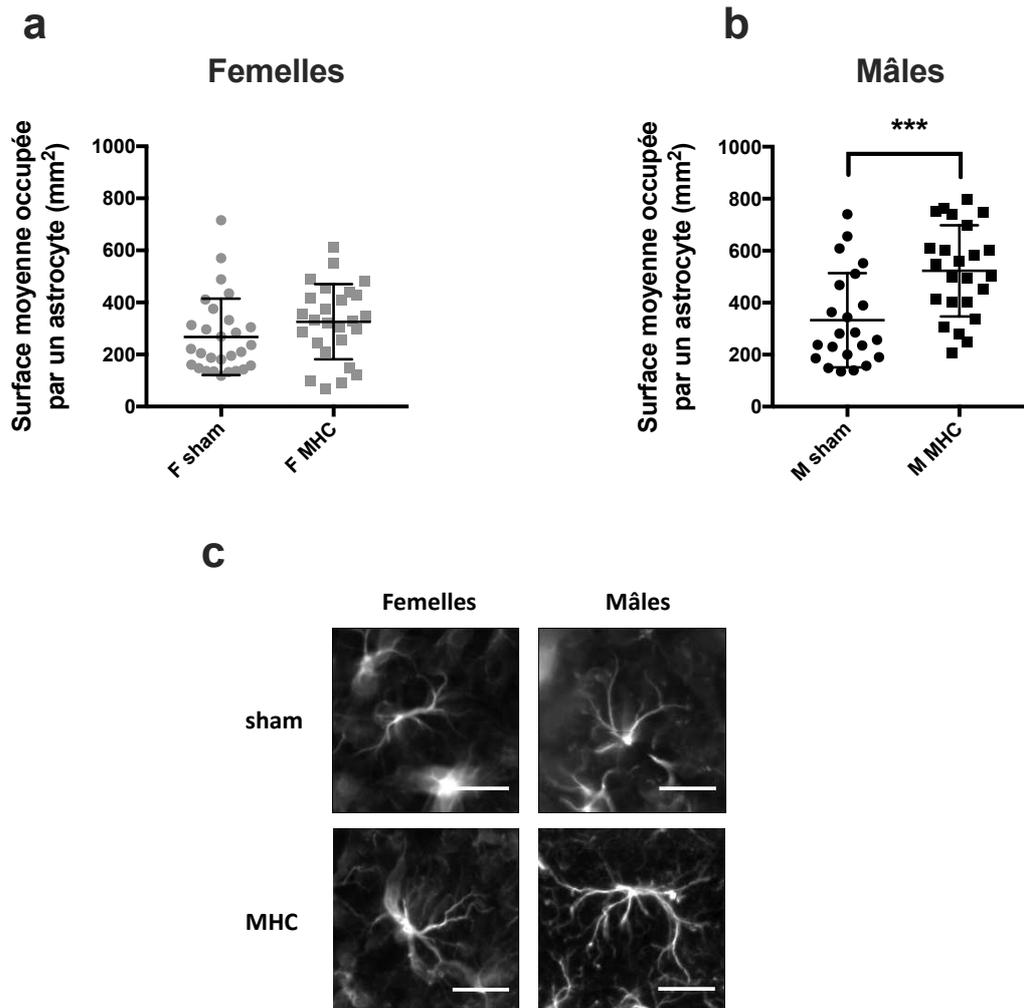
Figure 67 : Semi-quantification des astrocytes par  $\text{mm}^2$  dans l'hippocampe des femelles et des mâles sham et MHC.

(F sham  $n=8$  ; F MHC  $n=7$  ; M sham  $n=7$  ; M MHC  $n=7$ ). Les barres représentent la moyenne et l'écart type.  $*p<0,05$

#### 4.3.1.2. Effet de la microhémorragie sur la surface occupée par les astrocytes

Chez les femelles, la surface moyenne occupée par un astrocyte dans l'hippocampe ipsilatéral n'était pas différente entre le groupe sham et le groupe MHC (cf Figure 68).

Chez les mâles, la surface moyenne occupée par un astrocyte dans l'hippocampe ipsilatéral était plus importante chez le groupe MHC que chez le groupe sham ( $p=0,0008$  ;  $\eta^2=0,23$ ) (cf Figure 68).



**Figure 68 : Surface moyenne occupée par un astrocyte dans l'hippocampe ipsilatéral.** (a) chez les femelles sham et MHC et (b) chez les mâles sham et MHC. Les barres représentent la moyenne et l'écart type. \*\*\* $p < 0,005$  (c) Astrocytes représentatifs. La barre d'échelle est 20 μm.

### 4.3.1.3. Effet de l'atorvastatine sur les astrocytes

Chez les femelles, l'atorvastatine diminuait le nombre d'astrocytes dans l'hippocampe en comparaison au groupe sham ( $F(1,11)=8,2$  ;  $p=0,02$  ;  $\eta^2=0,39$ ). (cf Figure 69).

Chez les mâles, l'atorvastatine ne modifiait pas le nombre d'astrocytes hippocampiques en comparaison au groupe sham (cf Figure 69).

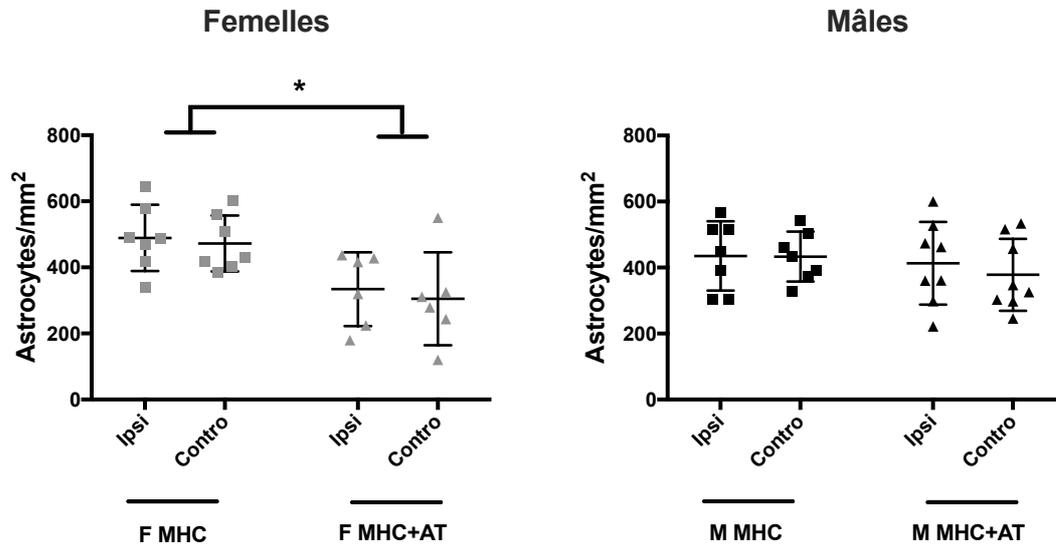
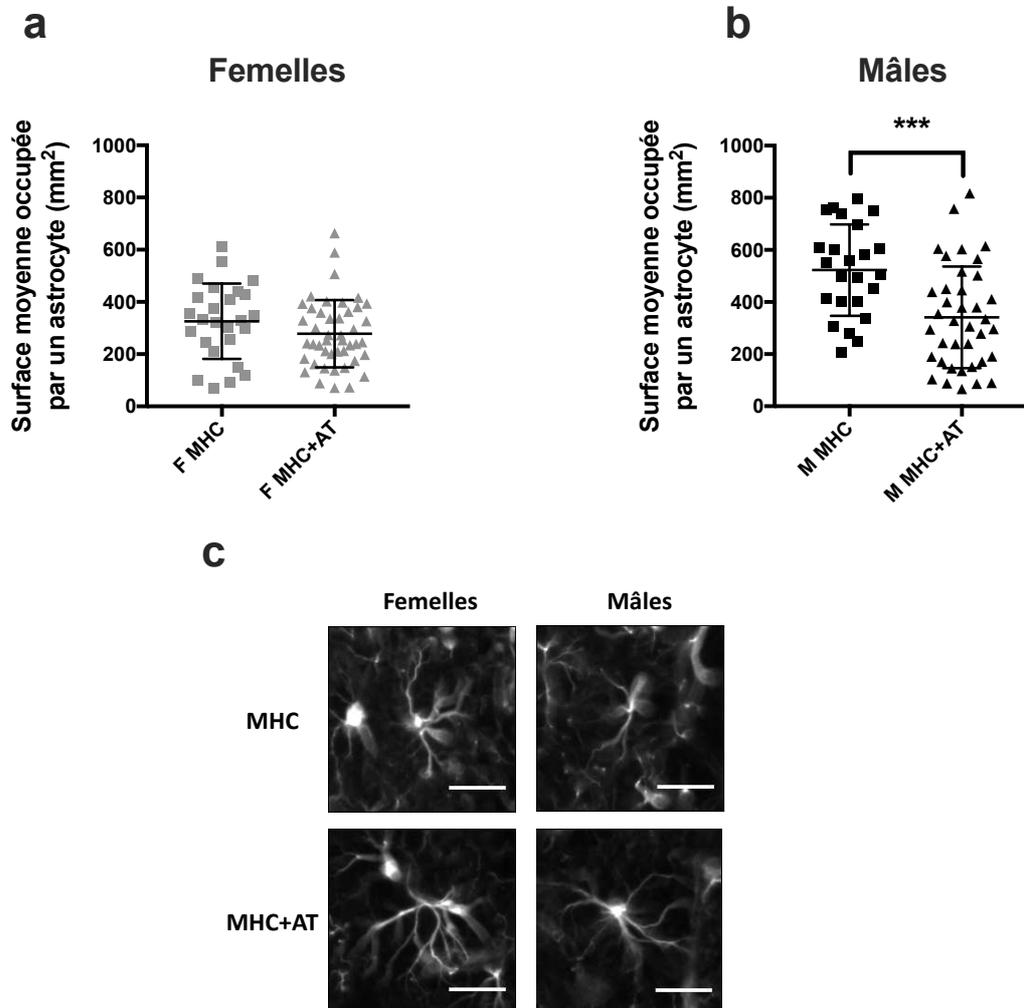


Figure 69 : Semi-quantification des astrocytes par  $\text{mm}^2$  dans l'hippocampe des femelles et des mâles MHC et MHC+AT. (F MHC  $n=7$  ; F MHC+AT  $n=6$  ; M MHC  $n=7$  ; M MHC+AT  $n=8$ ). Les barres représentent la moyenne et l'écart type. \* $p<0,05$

#### 4.3.1.4. Effet de l'atorvastatine sur la surface occupée par les astrocytes

Chez les femelles, l'atorvastatine ne diminuait pas la surface occupée par les astrocytes tandis que chez les mâles, l'atorvastatine diminuait la surface occupée par les astrocytes (cf Figure 70) ( $p=0,0005$  ;  $\eta^2=0,19$ ).



**Figure 70 : Surface moyenne occupée par un astrocyte dans l'hippocampe ipsilatéral.** (a) chez les femelles MHC et MHC+AT et (b) chez les mâles MHC et MHC+AT. Les barres représentent la moyenne et l'écart type. \*\*\* $p<0,005$  (c) Astrocytes représentatifs. La barre d'échelle est 20 $\mu$ m

## 4.3.2. Cellules microgliales

### 4.3.2.1. Effet de la microhémorragie

La microhémorragie ne modifiait pas le nombre de cellules microgliales chez les femelles ou chez les mâles (cf Figure 71).

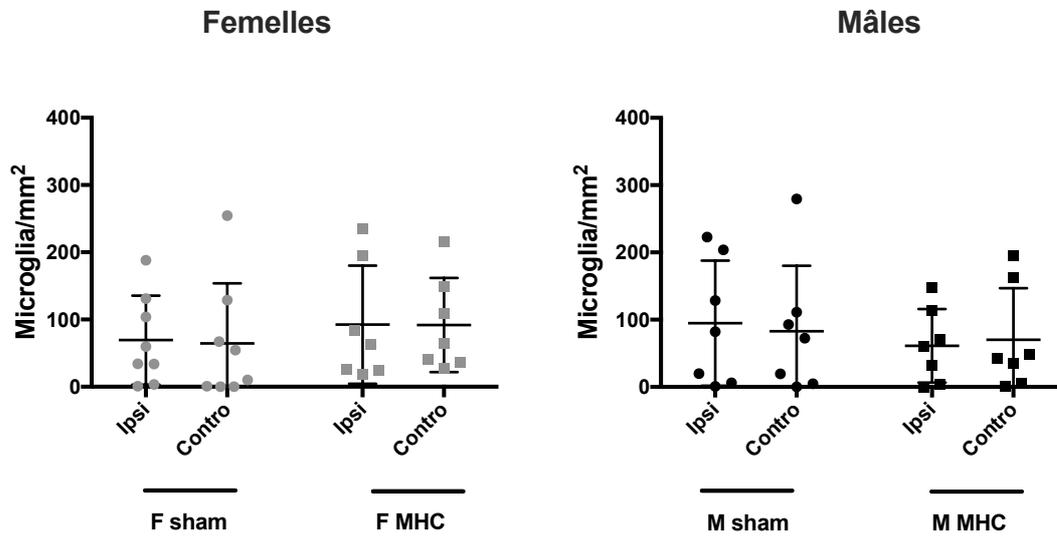


Figure 71 : Semi-quantification des cellules microgliales par  $\text{mm}^2$  dans l'hippocampe des femelles et des mâles.

(F sham  $n=8$  ; F MHC  $n=7$  ; M sham  $n=7$  ; M MHC  $n=7$ ). Les barres représentent la moyenne et l'écart type.

### 4.3.2.2. Effet de l'atorvastatine

Le traitement ne modifiait pas le nombre de cellules microgliales chez les femelles ou chez les mâles (cf Figure 72).

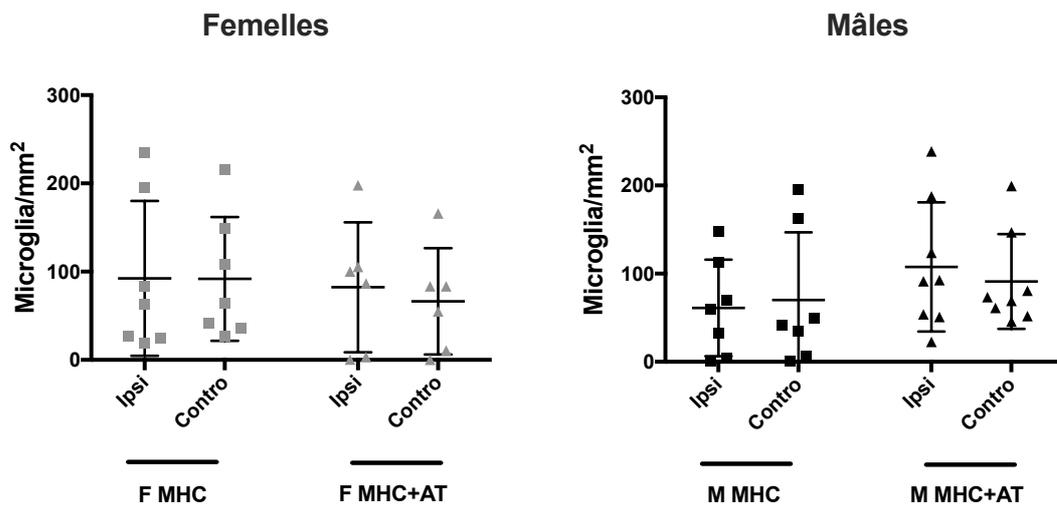


Figure 72 : Semi-quantification des cellules microgliales par  $\text{mm}^2$  dans l'hippocampe des femelles et des mâles MHC et MHC+AT.

(F MHC  $n=7$  ; F MHC+AT  $n=6$  ; M MHC  $n=7$  ; M MHC+AT  $n=8$ ). Les barres représentent la moyenne et l'écart type.

## 4.4. Expression protéique de GSK3 $\beta$ et de sa forme phosphorylée

### 4.4.1. Effet de la microhémorragie

La microhémorragie ne modifiait pas l'expression protéique du ratio P-GSK3 $\beta$ / GSK3 $\beta$  chez les femelles ou chez les mâles (cf Figure 73).

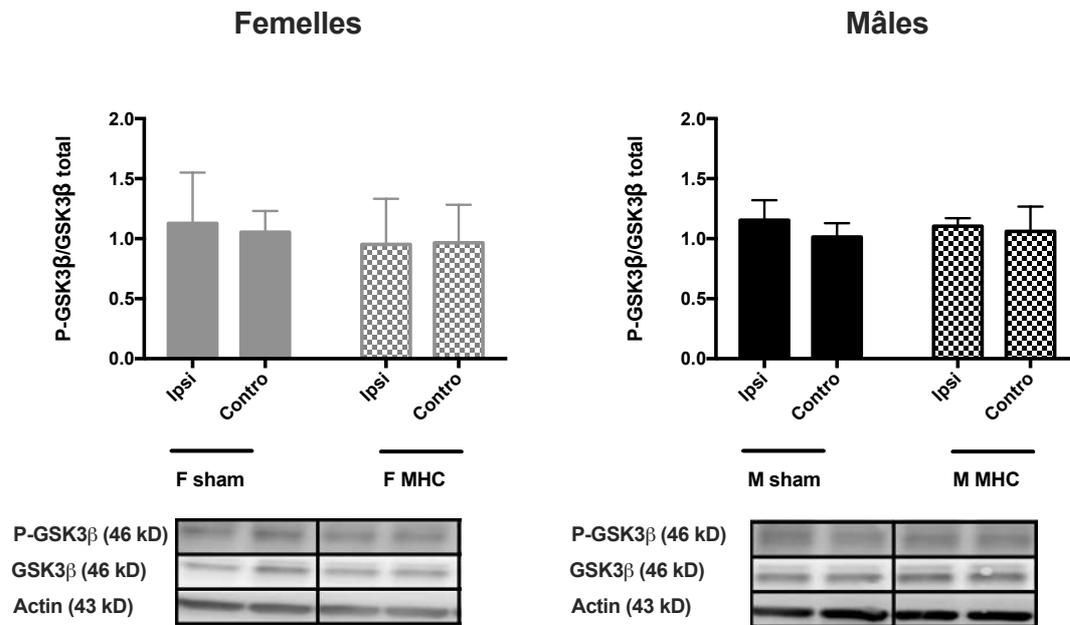
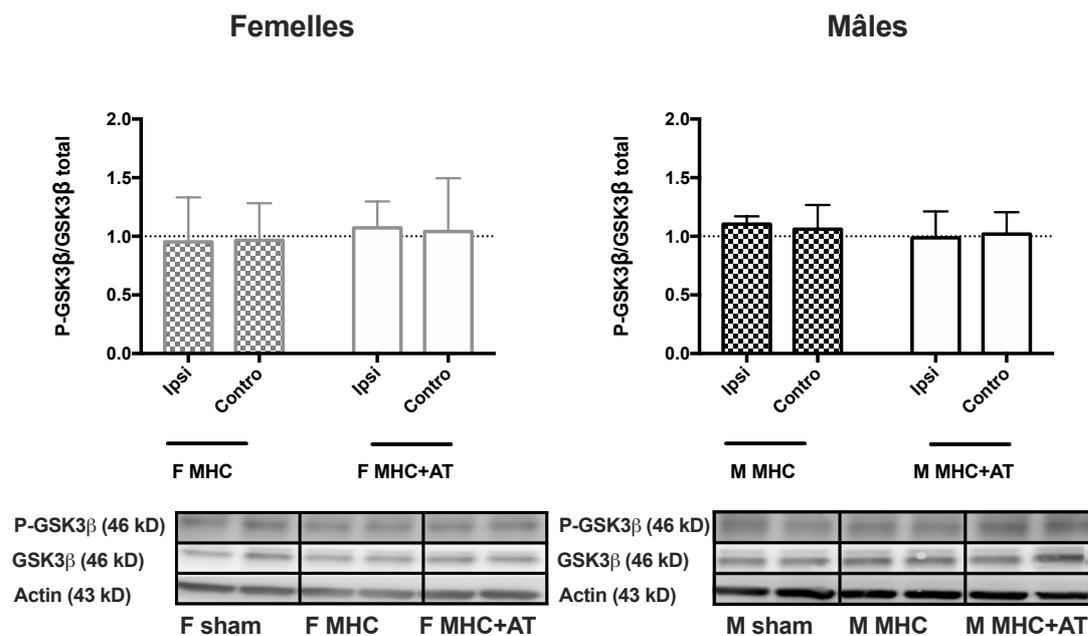


Figure 73 : Western blot P-GSK3 $\beta$ /GSK3 $\beta$  dans l'hippocampe des souris femelles et mâles sham et MHC. (F sham n=5 ; F MHC n=6 ; M sham n=5 ; M MHC n=6). Les barres représentent la moyenne et l'écart type

### 4.4.2. Effet de l'atorvastatine

Le traitement ne modifiait pas l'expression protéique du ratio P-GSK3 $\beta$ / GSK3 $\beta$  chez les femelles ou chez les mâles (cf Figure 74).



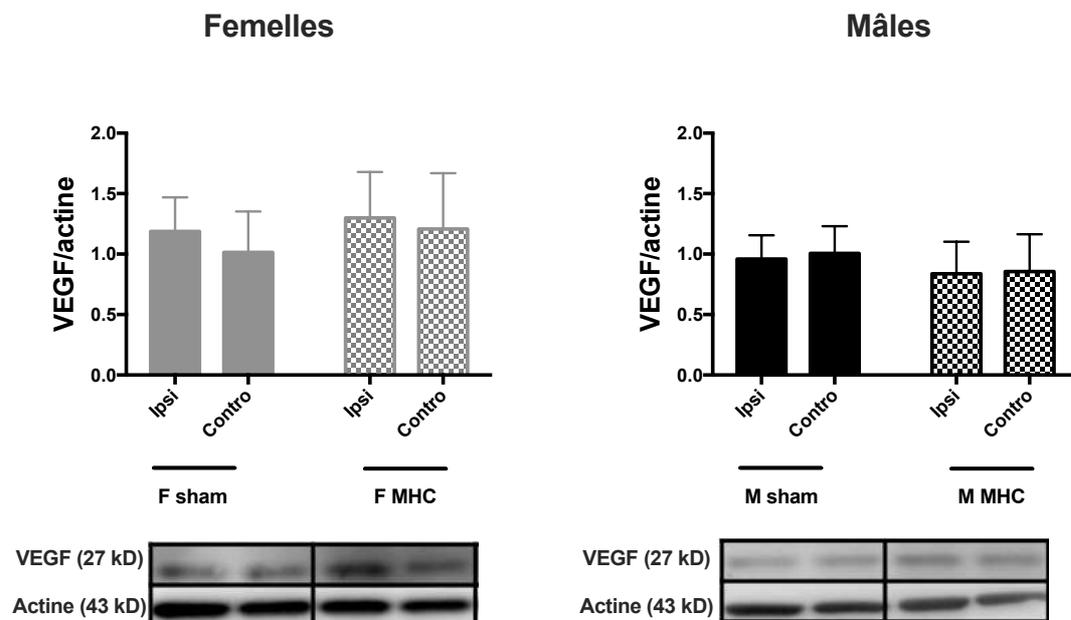
**Figure 74 :** Western blot P-GSK3β/GSK3β dans l'hippocampe des souris femelles et mâles MHC et MHC+AT.

(F MHC n=6 ; F MHC+AT n=5 ; M MHC n=6 ; M MHC+AT n=5). Les barres représentent la moyenne et l'écart type.

## 4.5.Expression protéique du VEGF

### 4.5.1. Effet de la microhémorragie

La microhémorragie ne modifiait pas l'expression protéique de VEGF chez les femelles ou chez les mâles (cf Figure 75).



**Figure 75 :** Western blot de VEGF dans l'hippocampe des souris femelles et mâles sham et MHC.

(F sham n=5 ; F MHC n=6 ; M sham n=5 ; M MHC n=6). Les barres représentent la moyenne et l'écart type.

#### 4.5.2. Effet de l'atorvastatine

Le traitement ne modifiait pas l'expression protéique de VEGF chez les femelles ou chez les mâles (cf Figure 76).

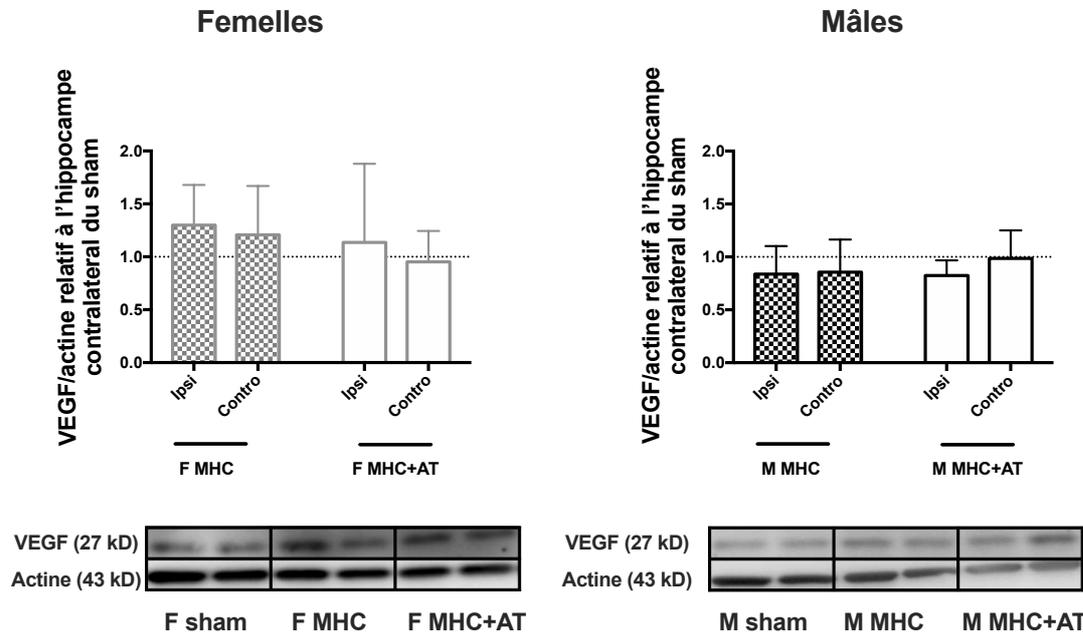


Figure 76 : Western blot de VEGF dans l'hippocampe des souris femelles et mâles MHC et MHC+AT. (F MHC n=6 ; F MHC+AT n=5 ; M MHC n=6 ; M MHC+AT n=5). Les barres représentent la moyenne et l'écart type.

### 4.6. Expression protéique du BDNF

#### 4.6.1. Effet de la microhémorragie

Dans l'hippocampe des femelles, la microhémorragie induisait une diminution de la concentration de BDNF ( $F(1,8)=20,6$  ;  $p=0,003$  ;  $\eta_G^2=0,48$ ). (cf Figure 77).

Dans l'hippocampe des mâles, la microhémorragie ne modifiait pas la concentration de BDNF (cf Figure 77).

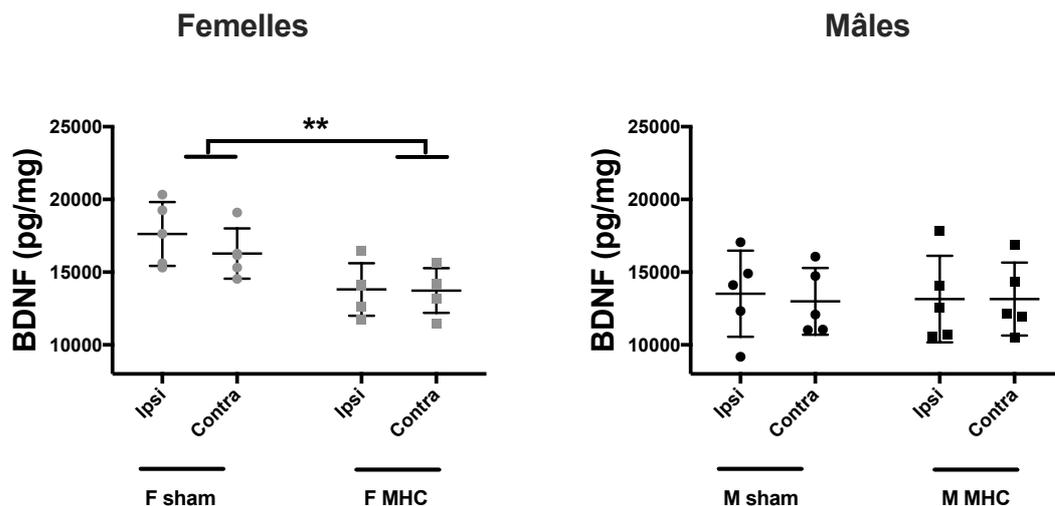


Figure 77 : BDNF dans l'hippocampe des souris femelles et mâles sham et MHC. (F sham n=5 ; F MHC n=5 ; M sham n=5 ; M MHC n=5). Les barres représentent la moyenne et l'écart type

#### 4.6.2. Effet de l'atorvastatine

Le traitement ne modifiait pas la concentration de BDNF chez les femelles et chez les mâles (cf Figure 78).

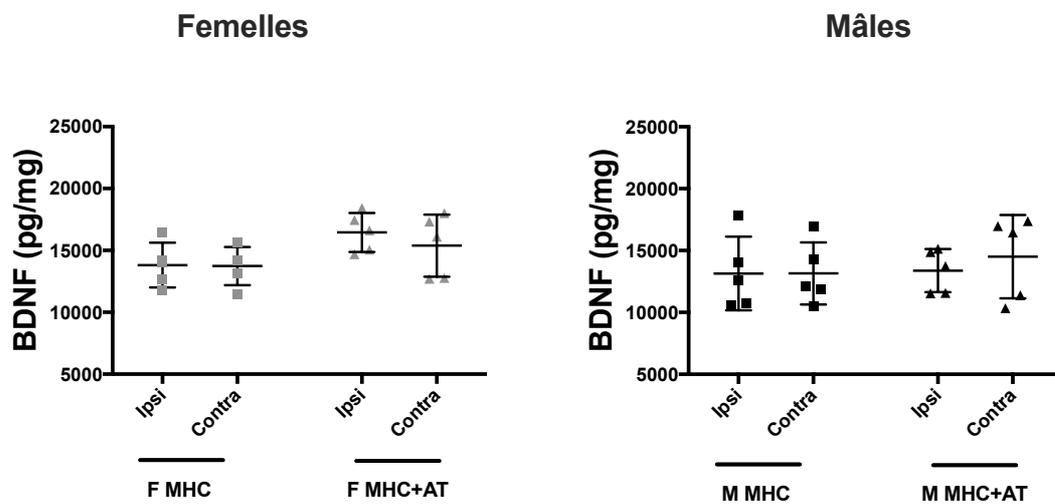
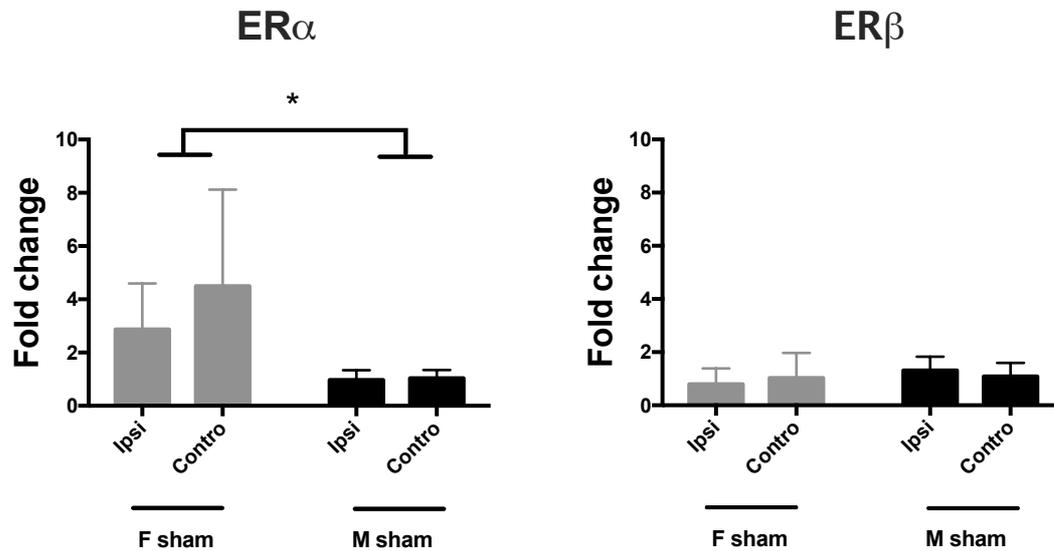


Figure 78 : BDNF dans l'hippocampe des souris femelles et mâles MHC et MHC+AT. (F MHC n=5 ; F MHC+AT n=5 ; M MHC n=5 ; M MHC+AT n=5). Les barres représentent la moyenne et l'écart type.

## 4.7. Expression relative de l'ARN messenger des ER $\alpha$ et $\beta$

### 4.7.1. Effet du sexe

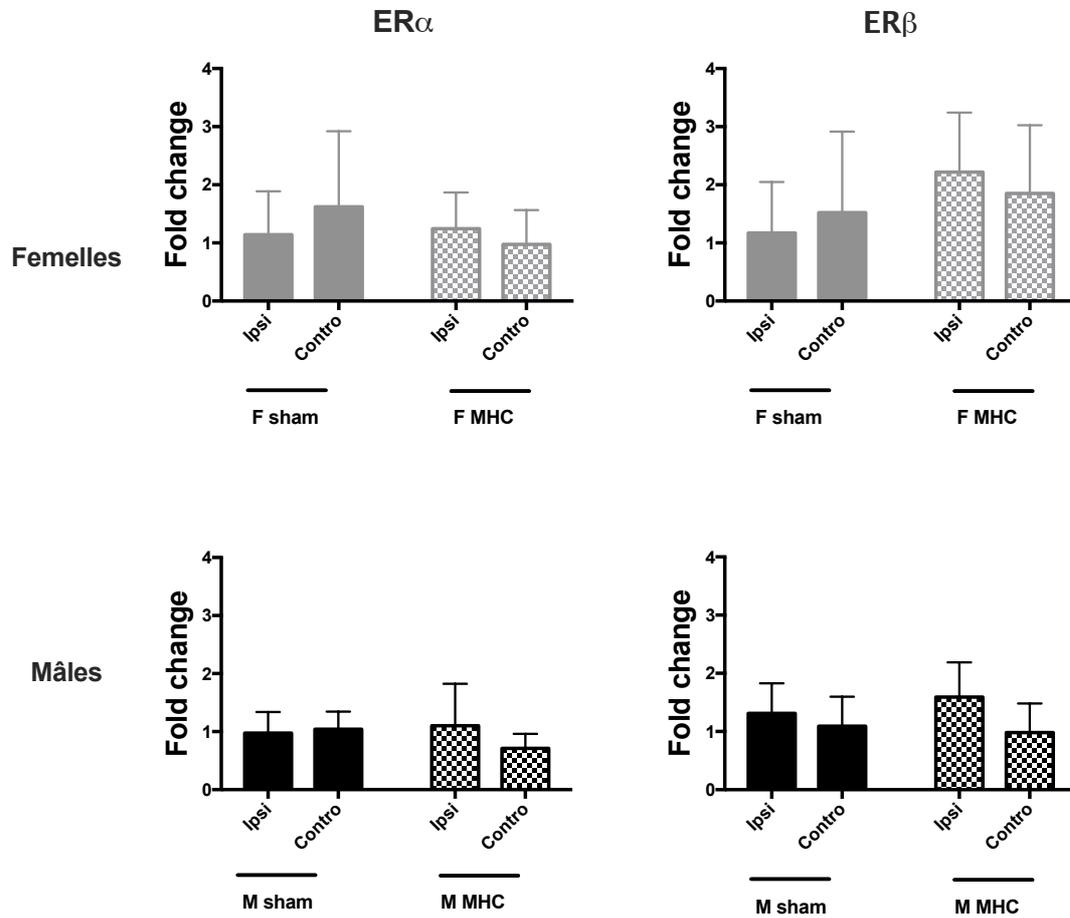
L'expression relative de l'ARNm de ER $\alpha$  était différente en fonction du sexe ( $F(1,12)=8,36$  ;  $p=0,01$  ;  $\eta_G^2=0,32$ ) tandis que l'expression relative de l'ARNm de ER $\beta$  n'était pas différente en fonction du sexe (cf Figure 79).



**Figure 79 : Expression relative de l'ARNm des ER $\alpha$  et des ER $\beta$  en fonction du sexe dans l'hippocampe.** Le groupe de référence est le cortex controlatéral du groupe mâle sham ( $n=7$ /groupe). Les barres représentent la moyenne et l'écart type. \* $p<0,05$

#### 4.7.2. Effet de la microhémorragie

La microhémorragie ne modifiait pas l'expression relative de l'ARNm des ER $\alpha$  et des ER $\beta$  chez les femelles ou chez les mâles (cf Figure 80).

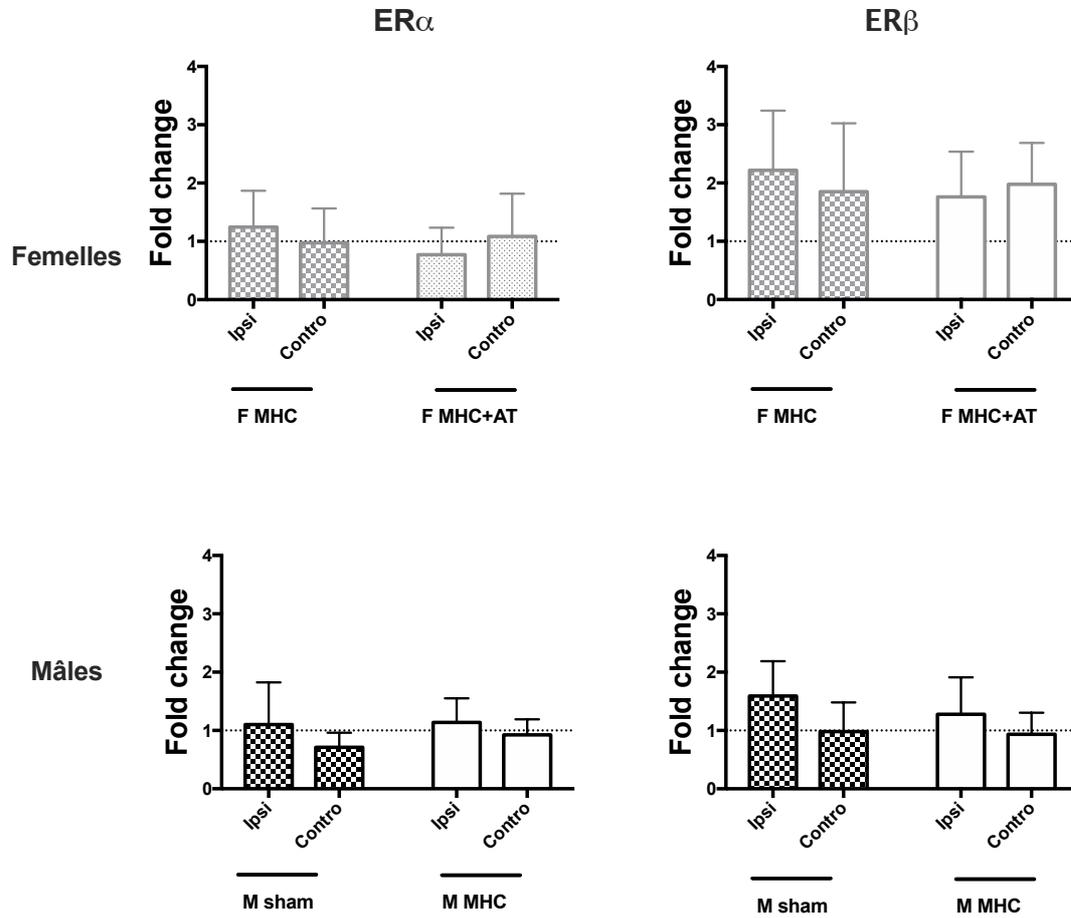


**Figure 80 : Expression relative de l'ARNm des ER $\alpha$  et des ER $\beta$  chez les femelles et les mâles sham et MHC dans l'hippocampe.**

Le groupe de référence est l'hippocampe controlatéral du groupe sham (n=7/groupe). Les barres représentent la moyenne et l'écart type.

### 4.7.3. Effet de l'atorvastatine

Le traitement ne modifiait pas l'expression relative de l'ARNm des ER $\alpha$  et des ER $\beta$  chez les femelles ou chez les mâles (cf Figure 81).



**Figure 81 : Expression relative de l'ARNm des ER $\alpha$  et des ER $\beta$  chez les femelles et les mâles MHC et MHC+AT dans l'hippocampe.**

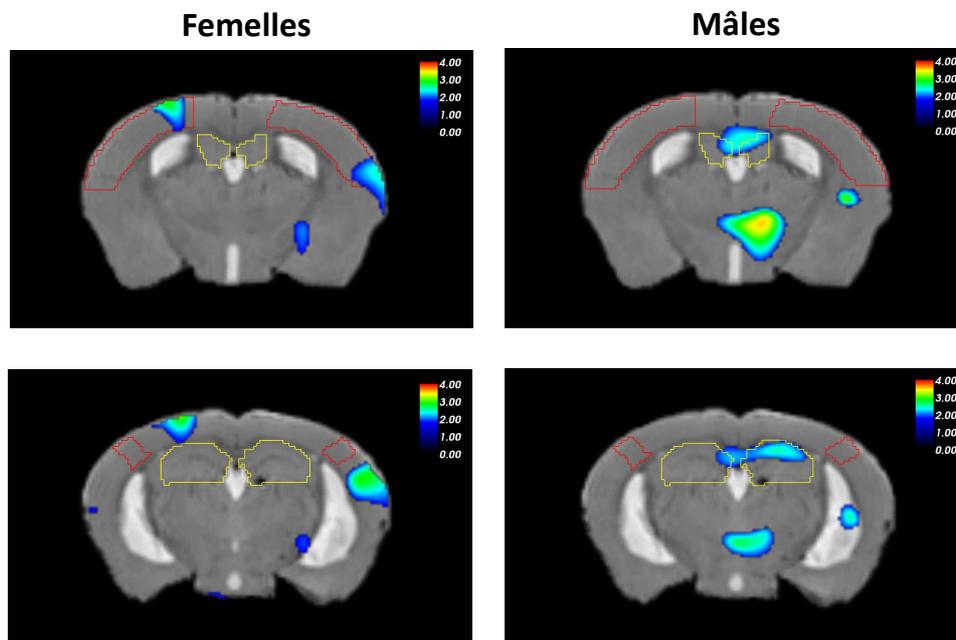
Le groupe de référence est le cortex controlatéral du groupe mâle sham (n=7/groupe). Les barres représentent la moyenne et l'écart type.

## 5. Métabolisme cérébral à 6 semaines post-chirurgie

### 5.1. Effet de la microhémorragie

Chez les femelles, le groupe sham présentait un hypermétabolisme glucidique au niveau du site d'injection qui s'étendait dans le cortex primaire sensorimoteur comparé au groupe MHC.

Chez les mâles, le groupe sham présentait un hypermétabolisme glucidique en comparaison au groupe MHC au niveau hippocampique, de façon prédominante dans l'hippocampe controlatéral (cf Figure 82).

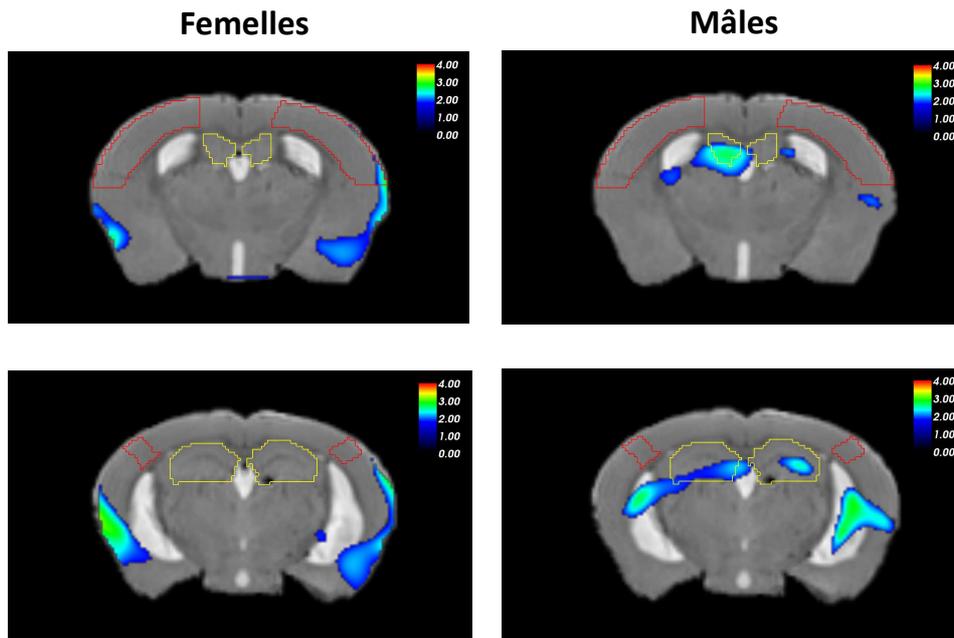


**Figure 82 : Analyse SPM du métabolisme glucidique cérébral (sham>MHC)**

Carte statistique des valeurs  $T$  (seuil  $p < 0,05$  (non corrigé)). Seuls les clusters de plus de 100 voxels sont représentés sur une image IRM de cerveau de souris. Les clusters montrent des concentrations de [18F]FDG augmentées chez les souris sham en comparaison aux souris CMH (sham>CMH). La zone primaire somatosensorielle est encadrée en rouge, l'hippocampe est encadré en jaune. Respectivement, à gauche, le côté ipsilatéral et à droite, le côté controlatéral.

### 5.2. Effet de l'atorvastatine

Chez les femelles, l'atorvastatine n'induisait pas d'hypermétabolisme que ce soit dans le cortex primaire sensorimoteur ou dans l'hippocampe. Au contraire chez les mâles, l'atorvastatine induisait un hypermétabolisme hippocampique avec une prédominance du côté lésé (cf Figure 83).



**Figure 83 : Analyse SPM du métabolisme glucidique cérébral (MHC+AT>MHC)**

Carte statistique des valeurs T (seuil  $p < 0,05$  (non corrigé)). Seuls les clusters de plus de 100 voxels sont représentés sur une image IRM de cerveau de souris. Les clusters montrent des concentrations de  $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$  augmentées chez les souris CMH+AT en comparaison aux souris CMH (CMH+AT>CMH). La zone primaire somatosensorielle est encadrée en rouge, l'hippocampe est encadré en jaune. Respectivement, à gauche, le côté ipsilatéral et à droite, le côté controlatéral.

## 6. Récapitulatif des effets locorégionaux et hippocampiques de la microhémorragie et de sa modulation pharmacologique à 6 semaines post-chirurgie

### 6.1. Effets dans le cortex

Les effets dans le cortex liés à la microhémorragie et à sa modulation pharmacologique ont été récapitulés dans le Tableau 5

*Tableau 5 : Récapitulatif des effets de la microhémorragie et de l'atorvastatine en fonction du sexe dans le cortex à 6 semaines post-chirurgie,  $\eta^2$  représente la taille de l'effet.*

	Femelles		Mâles	
	Effet de la microhémorragie sham Vs MHC ( $\eta^2$ )	Effet de l'atorvastatine MHC Vs MHC+AT ( $\eta^2$ )	Effet de la microhémorragie Sham Vs MHC ( $\eta^2$ )	Effet de l'atorvastatine MHC Vs MHC+AT ( $\eta^2$ )
<b>Imagerie</b>				
ADC	=	=	=	=
D*	=	=	↓ (0,22)	=
<b>Neuroinflammation</b>				
Astrocytes	=	=	=	=
Microglie	=	=	=	↑ (0,26)
<b>Expr. protéique</b>				
P-GSK3 $\beta$ / GSK3 $\beta$	=	=	↓ (0,57)	=
BDNF	=	↑ (0,86)	↓ (0,37)	↑ (0,92)
VEGF	=	=	↓ (0,49)	↑ (0,66)
<b>Expr. génomique</b>				
ER $\alpha$	↑ (0,21)	↓ (0,47)	=	=
ER $\beta$	↑ (0,38)	↓ (0,51)	=	=
<b>Métabol. glucidique</b>	↓	=	=	=

## 6.2.Effets dans l'hippocampe

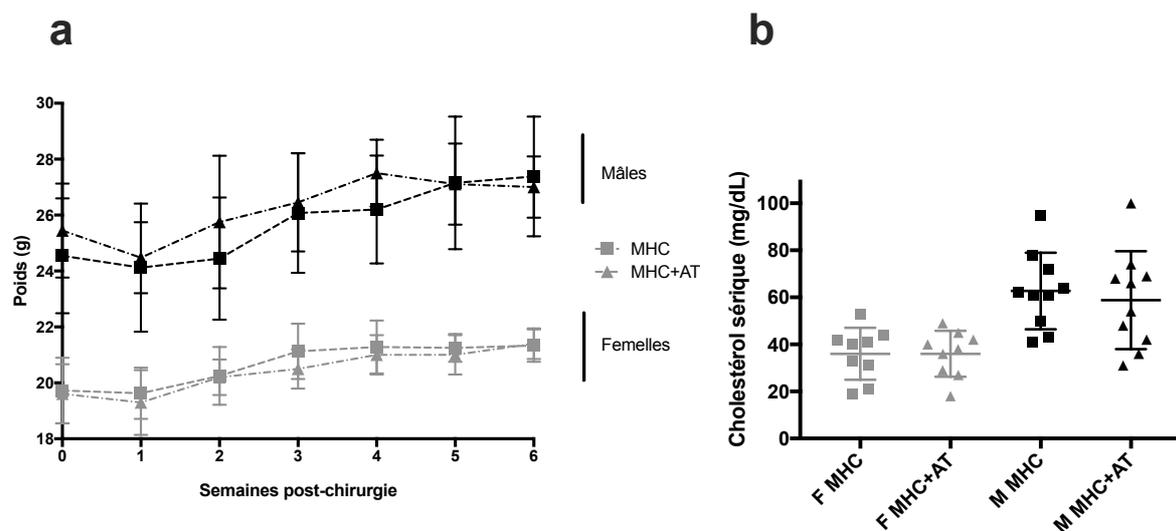
Les effets dans l'hippocampe liés à la microhémorragie et à sa modulation pharmacologique ont été récapitulés dans le Tableau 6.

**Tableau 6 : Récapitulatif des effets de la microhémorragie et de l'atorvastatine en fonction du sexe dans l'hippocampe à 6 semaines post-chirurgie,  $\eta^2$  représente la taille de l'effet.**

	Femelles		Mâles	
	Effet de la microhémorragie sham Vs MHC ( $\eta^2$ )	Effet de l'atorvastatine MHC Vs MHC+AT ( $\eta^2$ )	Effet de la microhémorragie Sham Vs MHC ( $\eta^2$ )	Effet de l'atorvastatine MHC Vs MHC+AT ( $\eta^2$ )
<b>Imagerie</b>				
ADC	=	=	=	=
D*	=	=	=	=
<b>Neuroinflammation</b>				
Astrocytes	↑ (0,41)	↓ (0,39)	↑ (0,30)	=
Microglie	=	=	=	=
<b>Expr. protéique</b>				
P-GSK3 $\beta$ / GSK3 $\beta$	=	=	=	=
BDNF	↓ (0,48)	=	=	=
VEGF	=	=	=	=
<b>Expr. génomique</b>				
ER $\alpha$	=	=	=	=
ER $\beta$	=	=	=	=
<b>Métabol. glucidique</b>	=	=	↓	↑

## 7. Suivi du poids et dosage du cholestérol plasmatique

Le poids augmentait au cours du temps ( $p < 0,0005$  pour les femelles et les mâles) et était différent en fonction du sexe ( $p < 0,0005$ ). Le type de croquettes (avec ou sans atorvastatine) ne modifiait pas la prise de poids. Le taux de cholestérol plasmatique était différent selon le sexe ( $F(1,34)=24,2$  ;  $p=1,92 \times 10^{-5}$ ,  $\eta_G^2=0,42$ ) mais n'était pas modifié par l'atorvastatine (cf Figure 84).



**Figure 84 : Suivi du poids et dosage du cholestérol sérique.**

(a) Suivi du poids en fonction des semaines post-chirurgie chez les souris femelles et mâles (b) Dosage du cholestérol sérique à 6 semaines post-chirurgie. Les barres représentent la moyenne.  $n = 9$  à  $10$  par groupe.



# **ARTICLE 1**



## Sex differences in cognitive impairment induced by cerebral microhemorrhage

Romain Barus<sup>1\*</sup>, Sandrine Bergeron<sup>1\*</sup>, Florent Auger<sup>1</sup>, Charlotte Laloux<sup>1</sup>, Emilie Skrobala<sup>1</sup>, Antonino Bongiovanni<sup>2</sup>, Camille Potey<sup>1</sup>, Régis Bordet<sup>1</sup>, Yaohua Chen<sup>1</sup>, Sophie Gautier<sup>1</sup>

\*“These authors contributed equally to this work”

1. Univ.Lille, Inserm, CHU-Lille, Lille Neuroscience & Cognition research centre UMR-S1172, Degenerative and Vascular Cognitive Disorders, F-59000, Lille, France

2. Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, US 41 - UMS 2014 - PLBS, F-59000 Lille, France

Romain Barus: barus.romain@gmail.com, ORCID: 0000-0002-1512-1265

Sandrine Bergeron: sandrine.bergeron@chru-lille.fr

Florent Auger: florent.auger@inserm.fr

Charlotte Laloux: charlotte.laloux@univ-lille.fr

Emilie Skrobala: emilie.skrobala@hotmail.fr

Antonino Bongiovanni: antonino.bongiovanni@univ-lille.fr

Camille Potey: camille.potey@chru-lille.fr

Régis Bordet; regis.bordet@univ-lille.fr

Yaohua Chen: yaohua.sophie.chen@gmail.com, ORCID: 0000-0003-1778-1790

**Sophie Gautier: [sophie.gautier@chru-lille.fr](mailto:sophie.gautier@chru-lille.fr), corresponding author**

### Acknowledgements

We thank the in vivo imaging core facility for assistance, the Neurophysiological and behavioral exploration platform for rodent (Federation of Neurosciences, University of Lille) and Dr. Meryem Tardivel of the BICeL-Campus HU Facility for access to systems and technical advice.

## Abstract

It has been suggested that cerebral microhemorrhages (CMHs) could be involved in cognitive decline. However, little is known about the sex-dependency of this effect. Using a multimodal approach combining behavioral tests, *in vivo* imaging, biochemistry and molecular biology, we studied the cortical and hippocampal impact of a CMH in male and female mice (C57BL/6J) 6 weeks post-induction using a collagenase-induced model. Our work shows for the first time that a single cortical CMH exerts sex-specific effects on cognition. It notably induced visuospatial memory impairment in males only. This sex difference might be explained by cortical changes secondary to the lesion. In fact, the CMH induced an up-regulation of ER $\alpha$  mRNA only in the female cortex. Besides, in male mice, we observed an impairment of pathways associated to neuronal, glial or vascular functions: decrease in the P-GSK3 $\beta$ /GSK3 $\beta$  ratio, in BDNF and VEGF levels and in microvascular water mobility. The CMH also exerted spatial remote effects in the hippocampus by increasing the number of astrocytes in both sexes, increasing the mean area occupied by each astrocyte in males and decreasing hippocampal BDNF in females suggesting a cortical-hippocampal network impairment. This work demonstrates that a CMH could directly affect cognition in a sex-specific manner and highlights the need to study both sexes in preclinical models.

Key words: cognitive impairment, cerebral microhemorrhage, estrogen receptors, neuronal network, preclinical model, sex effect.

## **Declarations**

### **Funding**

None.

### **Conflict of interest/competing interests**

The authors declare that they have no conflict of interests.

### **Ethics approval**

All procedures performed in studies involving animals were in accordance with the ethical standards of the institution at which the studies were conducted and ethical approval was obtained from the national Ethical Committee in Animal Experimentation (CEEA n°75, Comité d’Ethique en Expérimentation Animale) of the French Ministry for Education and Research (agreement number: n°2018042309364017-v5) and were performed in strict compliance with the European Union Directive 2010/63/EU. Experiments were reported in accordance with the ARRIVE guidelines.

### **Consent to participate**

Not applicable.

### **Consent for publication**

Not applicable

### **Availability of data and material**

The data analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request

### **Code availability**

Fiji, RRID:SCR\_002285

GraphPad Prism, RRID:SCR\_002798

Statistical Analysis System, RRID:SCR\_008567

### **Author’s contribution**

RB and SB designed, acquired, analyzed and interpreted the data. RB and SB performed literature search and drafted the manuscript. FA interpreted the imaging data and revised the manuscript. ES analyzed the data and revised the manuscript. CL and AB provided experimental support and revised the manuscript. AB performed Fiji macro and revised the manuscript. CP revised the manuscript. RB, YC and SG designed and conceived the study. RB, YC and SG did critical revision and approved the final version of the manuscript.

## 1. Introduction

Over the past decade, there has been a growing interest in cerebral microhemorrhages (CMHs) [1]. Initially considered as silent lesions, CMHs have been associated with an alteration of cognitive functions, in particular of visuospatial memory [2,3]. Charidimou and collaborators even found in their latest meta-analyses that the presence of CMHs might be associated with incident dementia in the general population [4].

CMHs are punctiform lesions that can be detected by magnetic resonance imaging (MRI) using a T2\* sequence [5]. They are often associated with cerebral vasculopathies such as cerebral amyloid angiopathy (CAA) and “hypertensive arteriopathy”. The pathological processes that underlie CMHs vary from one brain location to another. CAA is the most notable correlate of exclusively lobar CMHs. In contrast, the “hypertensive arteriopathy” is predominantly associated with deep CMHs (Grosche et al., 2013; Ben Haim et al., 2015; Matias et al., 2019)[5]. Determining the impact of a single CMH in the human brain aside from the effect of underlying pathologies is challenging. To address this issue, we previously developed a collagenase-induced CMH murine model to determine the impact of a single cortical CMH on cognition [6]. In this model, CMH induced cognitive impairment of two hippocampus-dependent memories (visuospatial and spatial reference memories) along with alteration of cortical and hippocampal metabolisms in male mice [6]. Cognitive alterations were also reported in other murine models of CMHs [7,8].

Interestingly, as markers of vascular burden, CMHs are more prevalent in males than in females in the clinical setting [9–11]. In neurovascular diseases, sex-related differences exist notably in terms of prevalence and of cognitive impact [12,13]. Differential concentrations of sex hormones such as androgens or estradiol, may support these sex differences [12,14,15]. In neurovascular diseases, androgens might have both beneficial and detrimental effects while an increasing body of evidence supports a beneficial effect of estradiol [15,16]. In fact, estradiol exerts a plethora of beneficial effects on different targets [16]. Notably, by binding to Estrogen Receptors alpha (ER $\alpha$ ) and beta (ER $\beta$ ) on neurons, glial or endothelial cells, estradiol could exert anti-inflammatory activities [17,18], activate neuroprotective signaling pathways [19] and regulate cerebral blood flow[20].

The role of sex dimorphism in the cognitive consequences of CMHs is unknown. Based on a multimodal approach combining behavioral tests, *in vivo* imaging, biochemistry and molecular biology, we characterized the impact of a cortical CMH depending on sex, 6 weeks after the lesion induction.

## 2. Methods

### 2.1. Animals

Adult male and female C57Bl6/J mice (Elevage Janvier, Le Genest Saint Isle, France; weight range 28–32 g for males, and 20–22 g for females) were used in these experiments. The animals were housed in transparent cages (five or less per cage) with nesting material and maintained in a climate-controlled room (temperature 19–24°C; relative humidity: 45–65%) with a 12-h low/dark cycle (lights on at 7:00 am), and food and water ad libitum.

### 2.2. Surgical Procedure

Briefly, as previously described [6], a single CMH was induced in the left primary somatosensory cortex by a stereotaxic injection of the proteolytic enzyme type VII bacterial collagenase (COL C2399, Sigma-Aldrich,

St. Louis, MO, USA). 10 to 12 week-old mice were anesthetized with isoflurane (induction: 3%; maintenance: 2–2.5%) and body temperature was kept constant at 36 to 36.5°C via a heating blanket connected to an intrarectal thermometer. Once positioned in a stereotaxic frame (Knopf Instruments, Tujunga, CA, USA), a one mm-hole was drilled through the skull at 1 mm (posterior) and 2 mm (left) from bregma. A single volume of collagenase or saline was injected (Stereotaxic coordinates: AP -1mm; DV -1mm; ML 2mm) using a micro-syringe pump (Micro 4® Microsyringe Pump Controller – World Precisions Instruments, Sarasota, FL, USA). 1 µL of collagenase (0.8 µU) (to induce the CMH) or saline (for the sham-operated groups) was injected over a period of 5 minutes and the needle was left in place for another 5 minutes after the end of the injection. The scalp was then sutured and the mouse was placed under a red warm light to recover. After surgery, the inclusion criteria were determined by MRI after 24 hours, based on the 24h-T2\* sequence analyzed by blinded observers: presence of a hemorrhage in the CMH groups; absence of a hemorrhage in the sham groups.

### 2.3. In vivo imaging

#### MRI Sequences

Twenty-four hours after surgery, all mice underwent micro MRI (7-Tesla; BioSpec 70/ 20, Bruker, Ettlingen, Germany) with a T2\* sequence to confirm the presence or the absence of the CMH (repetition time (TR)/echo time (TE): 1500/24.5 ms; field of view (FOV): 2 cm; spatial resolution: 156 mm<sup>2</sup>) (figure 1, panel 1). Image processing was performed on 0.5 mm-thick coronal slices to characterize acute phase lesions. A Diffusion Weighted Imaging (DWI) sequence was performed on a single axial section positioned at the injection site (defined using the T2\* sequence). This sequence was carried out in three directions [1, 0, 0, 0],[0, 1, 0],[0, 0, 0, 1] for which 12 values of b are used to characterize the signal decrease. The b values have been defined as follows: 0, 10, 20, 30, 40, 60, 80, 100, 400, 600, 800, and 1,000 seconds/mm<sup>2</sup>. The sequence parameters were as follows: FOV: 20 x 20 mm; matrix size: 128 X 128; cutting thickness: 1 mm; TR/TE: 3000/30 ms; acquisition time: 13 minutes. These MRI sequences were repeated at 6 weeks post-surgery.

#### Microvascular water mobility assessment

We used the DWI sequence to assess water mobility in microvascular compartments at 6 weeks after surgery [21]. With low b values between 0 and 100 seconds/mm<sup>2</sup>, the constraints of water molecules in the microvascular compartment can be evaluated quantitatively by calculating the pseudo-diffusive component D\*. An increase of D\* would favor increased mobility of water molecules. In contrast, a decrease of D\* might reflect a hypomobility of water in microvascular vessels and favors a hypoperfusion. The decrease in MRI signal strength for b values from 0 to 1,000 seconds/mm<sup>2</sup> is characterized by a biexponential equation (see formula 1).

$$\frac{S}{S_0} = (1 - f) \times e^{-ADC \times b} + f \times e^{-(ADC + D^*) \times b}$$

*Formula 1: b is the diffusion coefficient, S is the signal measured for a value of b, S<sub>0</sub> is the signal measured when b=0, f is the fraction of the circulating blood volume fixed between 0 and 0.05%, ADC is the apparent diffusion coefficient [21].*

During post-processing, 4 Regions Of Interest (ROI) were traced on the T2\* sequence and then transferred to the DWI sequence (figure 1, panel 1c): 2 ipsilateral ROI (1 rectangle on the injection site and 1 rectangle on the hippocampus), 2 contralateral ROI (1 rectangle at the contralateral site and 1 rectangle on the hippocampus) were

created. The  $D^*$  value was then obtained after realizing the bi-exponential equation (formula 1) on GraphPad Prism (version 7.00 for Mac, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

## **2.4. Behavioral assessment**

### **Non-cognitive tests**

As a prerequisite, we investigated spontaneous locomotor activity and anxiety level to ensure that an underlying motor deficit and/or an anxiety disorder would not interfere with the animal abilities during cognitive testing [22].

#### **Spontaneous locomotor activity**

Spontaneous locomotor activity was assessed in an open field test, using an infrared actimeter (Bioseb, Vitrolles, France). The apparatus consisted of a square arena (45 x 45 cm) with a black polymethyl methacrylate floor and transparent 34 cm-high polymethyl methacrylate walls. Mice were placed in the center of the arena and allowed to explore freely for 10 minutes. Activity was recorded by two rows of infrared photocell sensors and processed with the Actitrack software (Bioseb). The total distance covered (in cm) was calculated.

#### **Anxiety**

The Elevated Plus Maze (EPM) was used to assess the anxiety behavior of the mice. The equipment consisted of four arms (36.5 x 6 cm) forming an elevated cross positioned 50 cm above the floor. Two arms were opened, and the other two were enclosed by 14.5cm-high walls. The mouse was placed in the middle of the maze and allowed to explore the maze for 10 minutes. A video tracking system (Ethovision XT 7.0, Noldus, Wageningen, Netherlands) recorded movements to calculate the percentage of time spent in the open arms, used as an index of anxiety behavior.

### **Cognitive tests**

#### **Recognition memory**

The Novel Object Recognition (NOR) test is used to assess object recognition memory. The protocol was inspired by the work of Léger and collaborators, with minor modifications [23]. The experimental device consisted of a square enclosure (50 x 50 cm) surrounded entirely by black partitions to restrict the visual field of the mice to the test arena. The test was run over 3 days and included: a habituation phase of 10 minutes per day for the first 2 days; the first day in an empty enclosure; the second day in the same enclosure with two identical training objects; the third day consisted of a first acquisition phase of 15 minutes with 2 identical objects (different from those used on the second day) and a second phase of 5 minutes for the retention test with a retention interval of 1 hour. During the retention test, the arena contained a familiar object (which was present during the 15-minute acquisition phase) and a new object. Movements were recorded for analysis using the Ethovision XT 7.0 software (Noldus, Netherlands). A blinded operator analyzed the time spent exploring the objects (novel and familiar) for the mice which explored for 20 seconds (exclusion threshold) or more during the acquisition phase. The discernment index was calculated as the subtraction of the time spent exploring the novel object and the familiar object divided by the total time exploring either object.

#### **VisuoSpatial Memory (VSM)**

VSM, a hippocampus-dependent memory [24], was evaluated in the Paired Associated Learning (PAL) task using touchscreen operant chambers (Campden Instruments Ltd, Cambridge, UK) [6,25]. Mice were tested for their ability to associate objects with spatial locations as shown on the screen. Before the PAL task, mice were

pre-trained during several phases of instrumental operant conditioning. In the “habituation” phase, mice were trained to collect free rewards (7 ml of chocolate flavored milk, accompanied by illumination of the tray where the reward was and a 1-second sound tone) during 20 and 40-minute long sessions. In the “initial touch” and “must touch” PAL training phases, mice were trained to touch the screen and then to specifically touch a white square stimulus to obtain a reward. In the “punish incorrect” phase (the final stage of pre-training), a nose-poke of the white square stimulus (i.e. a correct response) was rewarded. A nose-poke of one of the two other blank windows (i.e. an incorrect response) resulted in house light illumination for a 5-second time-out period (no reward). When all the mice achieved a correct response rate of more than 75% over two consecutive sessions, they were moved onto the “different PAL” (dPAL) training phase.

For the dPAL task, one of six possible trial types was randomly presented on the screen. For each trial type, only one visual stimulus (a flower, an airplane or a spider) was presented in its correct location (+); a second visual stimulus was presented in one of the two incorrect locations (-), and the third location remained blank. Each trial type was presented an equal number of times and was not repeated in more than two consecutive trials. Mice were tested for their ability to nose-poke the correct location in each trial. An incorrect choice was followed by an additional correction trial with the previous pair of stimuli in the same spatial configuration, until the mouse made the correct choice. A correct choice was rewarded. An incorrect choice was followed by house light illumination for a 5-second time-out period. Mice performed 36 trials per session in less than 60 minutes, for 30 successive sessions (one per day). Correction trials were not counted in the total number of trials. In view of potential day-to-day variations in the performance levels of mice, VSM was measured as the mean percentage of correct responses over a three-day period (block of three days), 10 blocks were performed for the total dPAL task.

## **2.5. Preparation of samples for biochemistry and molecular biology analysis**

At 6 weeks post-surgery, mice were intraperitoneally injected with a lethal dose of pentobarbital. Mice destined to immunohistochemistry were perfused transcardially with cold heparinized physiological saline then perfused with paraformaldehyde. Brains were collected, left in paraformaldehyde overnight, then in a 30% sucrose solution and finally frozen in liquid nitrogen. Mice destined to molecular biology were perfused with cold heparinized physiological saline only. Brains were collected and placed in a transparent plexiglass matrix to be dissected. Two coronal cuts were made at + 2 mm and -3 mm from the bregma, to extract an ipsilateral region (left) restricted to the surroundings of the lesion, a contralateral region (right) and the ipsilateral and contralateral hippocampus. The samples were then collected and frozen in liquid nitrogen (figure 1, panel 2).

## **2.6. Protein dosage**

The tissues were homogenized with an ULTRA-TURRAX® (IKA® T10 Basic, IKA, Stauffen, Germany) in a solution containing RIPA buffer, phosphatase and protease inhibitors. Homogenized samples were left for 30 minutes in ice before being centrifuged (4°C, 13,000g, 30 minutes). The supernatant containing the proteins was then recovered, a 1:20 dilution was prepared and the protein content was quantified using the Pierce BCA kit (Thermo Fischer, Waltham, MA, USA).

## 2.7. Estrogen receptors mRNA expression

mRNAs were extracted from tissues using Extract-all® extraction buffer (Eurobio, Les Ulis, France) and was reverse transcribed using SuperScript® III retrotranscriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) to generate cDNA. Real-time PCR was carried out on cDNA using manufactured primer sets and the LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green reaction mix (Roche Diagnostic, Meylan, France). The primer sequences were as follow: TBP sense (ggcggtttgctaggttt), TBP anti-sense (gggttatctcacacccatga), ER $\alpha$  sense (caactgggcaaagagagtgc), ER $\alpha$  anti-sense (ccagacgagaccaatcatca), ER $\beta$  sense (agaatgtccaccgctagg), ER $\beta$  anti-sense (agctgagaaaaatccttgtaga). The relative quantities of the ER $\alpha$  and ER $\beta$  genes were determined by using the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method [26]. The housekeeping gene used to calculate the delta threshold cycle ( $\Delta CT$ ) was the TBP. We calculated the  $\Delta\Delta CT$  which was the difference in  $\Delta CT$  between the target sample and the reference sample (defined as the contralateral cortex of the sham group).

## 2.8. GFAP and IBA1 Immunohistochemistry

As estradiol targets astrocytes and glial cells through ER [16,18], we studied these cells by labeling GFAP and IBA1. 20- $\mu$ m brain sections were washed 3 times in 0.02 M KPBS (pH 7.4) for 10 minutes at room temperature. Sections were incubated for 1 hour with KPBS containing 0.3% Triton-X100 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) and 2% horse serum albumin (Vector laboratories, Burlingame, CA, USA). Sections were then incubated overnight at 4°C with a GFAP goat anti-mouse IgG antibody (1:500; Abcam, Cambridge, MA, USA) and a IBA1 rabbit anti-mouse IgG antibody (1:500, Wako Chemicals USA, Richmond, VA, USA). Sections were washed with KPBS and incubated at room temperature for 1 hour with an Alexa 488-conjugated donkey anti-rabbit antibody (1:500, BioLegend, San Diego, CA, USA) or with an Alexa 568-conjugated donkey anti-goat antibody (1:500, Abcam, Cambridge, MA, USA). Finally, the slides were mounted with the Vectashield-DAPI mounting medium (Vector laboratories, Burlingame, CA, USA) and stored at 4°C. For each mouse, five slides bearing 5 brain sections were processed (including and surrounding the lesion on both sides).

The slides were then scanned on a Zeiss AxioScan.Z1 slide scanner (Zeiss, Jena, Germany), magnification factor  $\times 20$ . By using the FIJI software [27] we delimited 4 areas of interest per brain section. In the cortex, two areas were analyzed: one localized the ipsilateral cortex and a second of the same area in the contralateral cortex. On the same section, we also delimited the ipsilateral and contralateral hippocampus. The total positive green and red cells were quantified using the FIJI software by an observer blinded to the experimental groups. We calculated the mean number of positive green and red cells per area. Further, by using the FIJI software, we analyzed the surface area occupied by isolated astrocytes around the injection site and in the ipsilateral hippocampus.

## 2.9. phospho-GSK3 $\beta$ /GSK3 $\beta$ ratio and VEGF levels

The binding of estradiol to ER $\alpha$  activates a signaling pathway which inhibits GSK3 $\beta$  by phosphorylating it [16]. The activation of ER $\alpha$  has also been shown to enhance the transcription of VEGF [28]. We studied phosphor-Ser9-GSK3 $\beta$ , total GSK3 $\beta$  and VEGF by Western blot. The lower the ratio (phosphor-Ser9-GSK3 $\beta$ /GSK3 $\beta$ ), the greater the activity of GSK3 $\beta$  is. Samples (20  $\mu$ g of total proteins) were electrophoresed on 10–20%

polyacrylamide tris-tricine gels (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and transferred onto a 0.2  $\mu\text{m}$  nitrocellulose membrane. Membranes were washed in TBS-Tween and blocked with 5% bovine serum albumin (BSA) in TBS-Tween (TBS-T) for 1 hour at room temperature. Membranes were then incubated with a rabbit anti-phospho-Ser9-GSK3 $\beta$  antibody (1:1,000, Cell Signaling Technologies, Danvers, MA, USA) or a rabbit anti-VEGF antibody (1:1,000, GeneTex, Irvine, CA, USA). After washes, membranes were incubated with a secondary anti-rabbit antibody conjugated with horseradish peroxidase (1:2,000 in 5% BSA-TBS-T). Membranes were washed in TBS-T and bound antibodies were detected using ECL revelation on film. To detect total GSK3 $\beta$ , membranes were stripped, blocked and incubated with the corresponding antibody (rabbit anti-total GSK3 $\beta$  antibody, 1:2,000 Cell Signaling Technologies, Danvers, MA, USA). Membranes were washed and incubated with an anti-rabbit antibody conjugated with horseradish peroxidase (1:4,000) and bound antibody detected using ECL revelation on film. Finally, to measure the levels of actin, membranes were stripped a second time and probed with an anti-mouse  $\beta$ -actin antibody (1:10,000, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA).

All films were scanned and quantified using the FIJI software. Results were expressed as relative density ratio, normalized to the mean value measured for the contralateral cortex or hippocampus of the sham group.

### **2.10. BDNF quantification**

The activation of ER $\alpha$  induces the transcription of BDNF [16]. BDNF levels were quantified in the tissues with a commercial ELISA kit (ab99978, Abcam, Cambridge, UK). A 4-parameter logistic curve including the log of the concentration of the standard range on the abscissa and the optical density of the standard range on the ordinate was produced on GraphPad Prism (version 7.00 for Mac, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) to determine the concentration of each sample.

### **2.11. Experimental groups and evaluation time**

Experimental groups consisted of 4 groups of mice: female or male mice with induced CMH, named F CMH and M CMH, and female or male mice sham-operated, named F sham and M sham. All mice were randomly allocated to the different groups. Mice underwent the experiments 6 weeks after surgery. The repartition of the mice used in this study is presented in the following flowchart (Fig. 2).

### **2.12. Statistics**

Data are represented as mean  $\pm$  standard deviation (SD). The normality of distributions was assessed using the Shapiro-Wilk test. An analysis of variance or a Kruskal-Wallis test was used to compare quantitative parameters between the 2 groups (sham-operated, CMH). For the dPAL test, repeated measures were analyzed using a linear mixed model with group, time, and interaction group\*time as fixed effects. *In vivo* imaging, immunohistochemistry and RT-qPCR data were analyzed with a linear mixed model to take into account the correlation between brain areas. Group, area and interaction group\*area were included as fixed effects in the model. Post-hoc comparisons were conducted with Bonferroni corrections. Data were analyzed with the SAS software (version 9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). The threshold for statistical significance was set to 0.05.

### 3. Results

#### 3.1. Neurobehavioral characterization according to the sex

##### **Non cognitive tests: the CMH did not impact the locomotor activity and anxiety levels in both female and male mice**

In both female and male mice, neither the motor activity nor the anxiety level differed between sham and CMH groups (Fig. 3, panels 2a-d).

##### **Cognitive tests: CMH induced a sex-specific effect on visuospatial memory but not on recognition memory**

Recognition memory was not altered in sham and CMH groups, in both male and female mice (Fig. 3, panels 2e-g).

In terms of VSM, we observed a sex-specific effect of the CMH. In male mice, the learning process over time was efficient for the 2 groups ( $p < 0.0001$ ) (Fig. 3, panel 2h). However, this learning process was delayed in male CMH mice from the 4<sup>th</sup> block – this delay became significant from the 8<sup>th</sup> block compared with the male sham mice. During the final session, VSM was significantly impaired in the CMH group compared with the male sham mice ( $p < 0.05$ ).

In female mice, the learning process was ascertained by the increasing percentage of correct response over time ( $p < 0.0001$ ) (Fig. 3, panel 2f). The evolution of this parameter was similar for the 2 groups. During the final session, the percentage of correct responses was not different between the 2 groups, showing no effect of the CMH on VSM.

##### **CMH-induced sex-specific changes in mRNA ER expression**

In the cortex, the mRNA expression of ER $\alpha$ , but not ER $\beta$ , was higher in female groups compared with their male counterparts as shown for sham groups on Fig. 4, panels 1a-b (ER $\alpha$ , mean  $\pm$  SD:  $4.8 \pm 2.3$  vs.  $1.3 \pm 0.5$ ;  $p = 0.002$ ). In females, the CMH induced an up-regulation of ER $\alpha$  mRNA ( $>2$  folds) compared with the sham group ( $p < 0.05$ ) (Fig. 4, panel 1c). The expression of ER $\beta$  was slightly upregulated ( $<2$  folds) by the CMH in female mice (F CMH group) compared with the sham group ( $p < 0.05$ ) (Fig. 4, panel 1d). In male mice, neither the ER $\alpha$  nor the ER $\beta$  mRNA expression was modified by the CMH (Fig. 4, panel 1e-f).

In the hippocampus, mRNA expression of ER $\alpha$  but not ER $\beta$  was higher in the female groups compared with their male counterparts as shown for sham groups on Fig. 4, panel 2a, 2b (ER $\alpha$ , mean  $\pm$  SD:  $3.68 \pm 2.4$  vs.  $1.0 \pm 0.3$ ;  $p = 0.01$ ). Neither the ER $\alpha$  mRNA expression nor the ER $\beta$  mRNA expression was modified in the female and male groups by the CMH (Fig. 4, panels 2c-f).

#### 3.2. CMH exerts sex-specific modulations of estradiol targets and ER-signaling pathways

##### **Recruitment of astrocytes and microglia**

In the cortex, the number of astrocytes increased near the needle track in female mice, without a distinctive effect of CMH (Fig. 5, panel 1, panel 2c). This effect was not present in male groups. Around the needle track, the mean area occupied by each astrocyte was not different between groups in both sexes (Fig. 5, panels 2e and 2f). No CMH effect was observed on microglia in both male and female mice (Fig. 5, panels 2a and 2b).

In the hippocampus, the CMH did not affect microglia in both male and female mice (Fig. 5, panels 3a and 3b). However, the CMH induced an increase of the number of astrocytes positive for GFAP compared with the sham group in females (mean  $\pm$  SD: 481  $\pm$  88 vs. 338  $\pm$  83;  $p=0.01$ ) (Fig. 5, panels 3c) as well as in males (mean  $\pm$  SD: 434  $\pm$  86 vs. 339  $\pm$  54;  $p=0.03$ ) (Fig. 5, 3d). Besides, the effect of the CMH on the mean area occupied by each astrocyte was different according to sex ( $p<0.03$ ) (Fig. 5, panels 3e and 3f). The CMH increased the mean area occupied by each astrocyte in the hippocampus of male mice compared to female CMH ( $p=0.0001$ ) and to the male sham groups ( $p=0.0002$ ).

#### **Modulation of GSK3 $\beta$ and BDNF**

In cortex, the P-GSK3 $\beta$ /total GSK3 $\beta$  ratio and the levels of BDNF were not different among the female groups (Fig. 6, panel 1a). However, in the male cortex, the CMH induced a decrease of the P-GSK3 $\beta$ /total GSK3 $\beta$  ratio compared with the sham group (mean  $\pm$  SD: 0.77  $\pm$  0.15 vs. 1.03  $\pm$  0.17;  $p=0.05$ ) (Fig. 6, panel 1b). The CMH also decreased BDNF levels compared with the male sham group (mean  $\pm$  SD: 3174  $\pm$  285 vs. 3729  $\pm$  374;  $p=0.03$ ).

In the hippocampus of both male and female mice, no effect of CMH was observed on the phospho-GSK3 $\beta$ /total GSK3 $\beta$  ratio (Fig. 6, panels 2a and 2c). The CMH induced a decrease in BDNF levels compared with sham in the female group (mean  $\pm$  SD: 13775  $\pm$  1354 vs. 16955  $\pm$  790;  $p<0.05$ ) whereas induced no effect in the male group (Fig. 6, panel 2d). Of note, BDNF levels in the hippocampus of female sham mice were higher than in male sham mice (mean  $\pm$  SD: 16955  $\pm$  790 vs. 13255  $\pm$  1525;  $p=0.001$ ).

#### **Cerebrovascular effects: impact on VEGF levels and microvascular water mobility (D\*)**

In the cortex, neither the VEGF levels nor the D\* measurements were modified by the CMH in female mice (Fig. 7, panel 1a). In male mice, the CMH induced a decrease in VEGF levels compared with the sham group (mean  $\pm$  SD: 1.04  $\pm$  0.3 vs. 0.61  $\pm$  0.12;  $p=0.01$ ) (Fig. 7, panel 1b). The CMH also induced a reduction in D\* values compared with the male sham group ( $p=0.018$ ) as observed in the D\* map, suggesting diminished water mobility in microvascular compartments (Fig. 7, panel 1d).

In the hippocampus of both females and males, the CMH modified neither VEGF levels or the D\* value (Fig. 7, 2a-2d).

## **4. Discussion**

Our work shows for the first time that a single cortical CMH exerts sex-specific effects on cognition, and especially on VSM. This sex difference might be explained by cortical changes related to the lesion. In fact, the CMH induced an up-regulation of ER $\alpha$  mRNA in the female cortex only. Besides, in male mice, we observed an impairment of pathways associated to neuronal, glial or vascular functions, as highlighted by the decrease in the P-GSK3 $\beta$ /GSK3 $\beta$  ratio, in BDNF and VEGF levels and in water mobility in the microvasculature. Sex differences were also observed in the hippocampus, as a remoted effect: the CMH induced an increase in the number of astrocytes in both sexes. Interestingly, an increase of astrocyte volume was observed only in male mice whereas a decrease of BDNF expression was observed only in female mice.

At the injection site, astrocytes can present either neurotoxic or neuroprotective properties to their surroundings [29,30]. In females, the surgery induced an increase of astrocytes around the injection site without cognitive consequences. In males, the CMH did not induce a local increase of astrocytes but triggered local deleterious effects commonly observed in intracerebral hemorrhage or stroke models [31–33]. Among these effects, GSK3 $\beta$  plays a pivotal role. The active form of GSK3 $\beta$  induces apoptosis, aggravates neuronal injury [32,34] and also alters neuronal cytoarchitecture [35]. Other players are BDNF and VEGF, two critical growth factors promoting angiogenesis, neurogenesis, neuronal survival and plasticity [31,36]. The inhibition of GSK3 $\beta$  or the up-regulation of BDNF and VEGF are associated with an improvement in cognition [32,33,37]. Thus, the observed decreases in P-GSK3 $\beta$ /GSK3 $\beta$  ratio, BDNF and VEGF levels induced by the CMH might participate in brain injury and ultimately in the cognitive alteration, as previously described [6].

This significant VSM alteration cannot be ascribed to a lack of motor activity or to a modified level of anxiety. Interestingly, this cognitive alteration was highlighted by a neurobehavioral test mostly hippocampus-dependent [24], demonstrating a spatial remote effect despite the CMH location in the primary somatosensory cortex. Moreover, in contrast to clinical studies where CMHs coexist with underlying pathologies [38], we demonstrated in our model that an isolated cortical lesion without associated vasculopathies can alter hippocampal-dependent memory. Other CMH models exhibited a cognitive impairment implicating the hippocampus [7,39] in male rodents. In their model of laser-induced CMH (5 cortical and parietal lesions), He and collaborators observed an early alteration of spatial memory (one week after the induction) [7]. In a dietary model of vascular dementia displaying CMHs (deep and cortical) and neuroinflammation, the spatial memory impairment occurred one week after the formation of CMHs [39]. In our model, the local modifications induced by the cortical CMH might have triggered spatial remote effects in the hippocampus. Indeed, in male mice, this CMH induced an hippocampal hypometabolism [6]. Further, the CMH induced an increase in the number of GFAP positive astrocytes in the hippocampus in both sexes, but an increase in the astrocyte surface area was only seen in males. Interestingly, similar results were observed in another animal model with an increase of the hippocampal GFAP staining in both sexes but an increase of S100B content, a marker of reactive astrocytes only in male group [40]. We hypothesized that a modification of the surface area covered by a GFAP-labeled astrocyte could indicate a morphological change resulting in different properties potentially harmful [30,41,42]. Thus, investigate the hippocampal astrocytic profiles and their phenotypes in CMH mice to determine their functions will be relevant in future works. We cannot explain the lower BDNF levels in female hippocampus, but the available data is heterogenous on this matter. The BDNF level could vary according to the hippocampus area and to the sex [43–47]. In addition, BDNF modulation alone is insufficient to explain the modulation of the cognitive processes [48]. Thus, a direct association between hippocampus BDNF levels and visuospatial memory is difficult to establish.

Other preclinical models have also highlighted that a focal brain injury can trigger spatial remote effects [49,50]. A MCAO stroke model in male rats also allowed to show that a cortico-striatal lesion induced hippocampal deformations [49]. A mouse model of cortical traumatic brain injury induced a thalamic neuroinflammation that persisted even after the end of inflammatory response in the primary injury site leading to further brain network disorganization and dysfunction [50]. The CMH might have impaired some specific neuronal networks between the cortex and the hippocampus. Indeed, Mechling and collaborators have highlighted connections between these two areas by performing resting state functional MRI [51]. This hypothesis is contemplated in patients with mild cognitive impairment as well as in patients with Alzheimer's disease, in whom

CMHs could disrupt and weaken the neuronal network [52,53]. The absence of effect on the recognition memory, although involving the hippocampus, might be explained by the concomitant crucial role of the perirhinal cortex [54].

Neither clinical nor experimental work has studied the sex-specific effect of the CMH on cognition. Nevertheless, some intracerebral hemorrhage or traumatic brain injury models demonstrated that female mice are functionally less impaired than males [55,56]. The only study that investigated CMHs and the influence of sex observed that the number, size, and total area of CMH were increased with age in lipopolysaccharides (LPS)-treated male mice, compared with LPS-treated female aged mice [57].

We chose to investigate ER $\alpha$  and  $\beta$  knowing that these receptors are involved in the pathophysiology of several neurovascular diseases models, with a predominant implication of ER $\alpha$  [58,59]. In our model, the expression of ER $\alpha$  but not ER $\beta$  mRNA is higher in females compared to males. Moreover, the CMH induced a cortical up-regulation of ER $\alpha$  mRNA and a slight up-regulation of ER $\beta$  mRNA only in female mice, indicating the role of estradiol. Estradiol can target the different cells present in the nervous system. Direct effects of estradiol on glial cells or brain endothelial cells can ultimately affect neurons [16]. Reciprocally, direct effects of estradiol on neurons affect the other cell types. We hypothesized that the ER-mediated regulation could affect various estradiol-dependent targets or signaling pathways and modulate the CMH-induced cognitive effect. ER $\alpha$ -mediated regulation might also elicit the release of trophic factors as BDNF [16,60]. Furthermore, the activation of ER $\alpha$  in neurons by estradiol leads to the inhibition of GSK3 $\beta$ , which ultimately promotes synaptic plasticity, neuron survival, exerts pro-cognitive effects and helps to the maintenance of the neuronal cytoarchitecture [16,35]. Estradiol can also act on brain blood vessels, and participate to the regulation of cerebral blood flow and of the vascular unit metabolism [16]. In endothelial cells, ER $\alpha$  activation might induce the production of VEGF [28,61] and participate in cerebral blood flow regulation [16,20]. In our model, the observed sex-related effects could be in relation with estradiol since the expression of ER, notably ER $\alpha$  was differentially modulated by the CMH. Estradiol, driven in part by ER $\alpha$  might exert beneficial effects in the local environment surrounding the CMH by promoting neuron survival and maintaining a functional neurovascular unit [16,20]. Furthermore, estradiol might participate in the maintenance of the functional connectivity between two brain areas [62] notably by inhibiting GSK3 $\beta$  [63] and modulating BDNF [64]. Thus, we hypothesize that estradiol, notably via ER $\alpha$  and its downstream effects on signaling pathways, could modulate the functional connectivity between the cortex and the hippocampus. This modulation might preserve the cortico-hippocampal network necessary to the functioning of hippocampal-dependent memories [65].

The CMH in females thus might have triggered compensatory effects through the activation of ER $\alpha$ , resulting in the absence of cognitive impact. In contrast, in males, the lower levels of ER $\alpha$  mRNA expression associated with the lack of up-regulation induced by the CMH might explain the cognitive impact and the decrease of the P-GSK3 $\beta$ /GSK3 $\beta$  ratio, of VEGF and BDNF expression and of microvascular water mobility after CMH induction. GSK3 $\beta$  is essential to maintain a functional neuronal cytoarchitecture [35] while VEGF is essential to maintain a functional cerebrovascular structure [20] and BDNF promotes neuron survival [16]. One can hypothesize that these effects, different according to sex, might have contributed to the impairment of the cortical-hippocampal network. To provide a deeper understanding of these sex differences, it could be interesting in

addition to study the implication of other factors, such as the membrane-associated G protein-coupled ER or androgens and their receptors, in the physiopathology of CMH.

## 5. Conclusions

By triggering local deleterious effects in male mice, CMH could impair the cortical-hippocampal network and lead to an impairment of visuospatial memory. This work demonstrates that a CMH could directly affect cognition in a sex-specific manner and highlights the need to study both sexes in preclinical models. Taking into account the sex in the physiopathology of neurovascular diseases also appears essential in humans to develop personalized patient care.

## 6. References

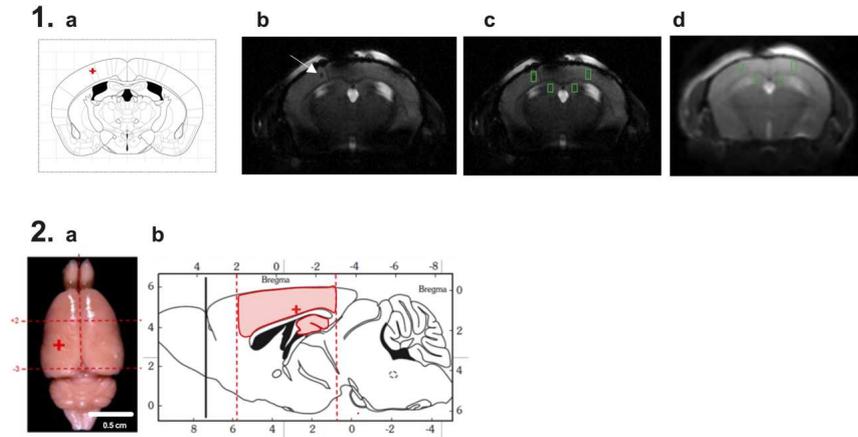
1. Cordonnier C, Al-Shahi Salman R, Wardlaw J. Spontaneous brain microbleeds: systematic review, subgroup analyses and standards for study design and reporting. *Brain J Neurol.* 2007;130:1988–2003.
2. Akoudad S, Wolters FJ, Viswanathan A, de Bruijn RF, van der Lugt A, Hofman A, et al. Association of Cerebral Microbleeds With Cognitive Decline and Dementia. *JAMA Neurol.* 2016;73:934–43.
3. Paradise M, Seruga A, Crawford JD, Chaganti J, Thalamuthu A, Kochan NA, et al. The relationship of cerebral microbleeds to cognition and incident dementia in non-demented older individuals. *Brain Imaging Behav.* 2018;
4. Charidimou A, Shams S, Romero JR, Ding J, Veltkamp R, Horstmann S, et al. 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). *Int J Stroke Off J Int Stroke Soc.* 2018;1747493017751931.
5. Ungvari ZI, Tarantini S, Kirkpatrick AC, Csiszar A, Prodan CI. Cerebral microhemorrhages: mechanisms, consequences and prevention. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2017;ajpheart.00780.2016.
6. Bergeron S, Chen Y, Auger F, Deguil J, Durieux N, Skrobala E, et al. Role of cortical microbleeds in cognitive impairment: In vivo behavioral and imaging characterization of a novel murine model. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab.* 2018;271678X17752765.
7. He X, Lan Y, Zhang Q, Liu D, Wang Q, Liang F, et al. Deferoxamine inhibits microglial activation, attenuates blood–brain barrier disruption, rescues dendritic damage, and improves spatial memory in a mouse model of microhemorrhages. *J Neurochem.* 2016;138:436–47.
8. Pétrault M, Ouk T, Pétrault O, Bastide M, Bordet R, Bérézowski V. Safety of oral anticoagulants on experimental brain microbleeding and cognition. *Neuropharmacology.* 2019;155:162–72.
9. Jeerakathil T, Wolf PA, Beiser A, Hald JK, Au R, Kase CS, et al. Cerebral microbleeds: prevalence and associations with cardiovascular risk factors in the Framingham Study. *Stroke.* 2004;35:1831–5.
10. Ding J, Sigurdsson S, Garcia M, Phillips CL, Eiriksdottir G, Gudnason V, et al. Risk Factors Associated With Incident Cerebral Microbleeds According to Location in Older People: The Age, Gene/Environment Susceptibility (AGES)-Reykjavik Study. *JAMA Neurol.* 2015;72:682–8.
11. Elmståhl S, Ellström K, Siennicki-Lantz A, Abul-Kasim K. Association between cerebral microbleeds and hypertension in the Swedish general population “Good Aging in Skåne” study. *J Clin Hypertens.* 2019;21:1099–107.
12. Honarpisheh P, McCullough LD. Sex as a biological variable in the pathology and pharmacology of neurodegenerative and neurovascular diseases. *Br J Pharmacol.* 2019;bph.14675.
13. Ahnstedt H, McCullough LD, Cipolla MJ. The Importance of Considering Sex Differences in Translational Stroke Research. *Transl Stroke Res.* 2016;7:261–73.
14. Koellhoffer EC, McCullough LD. The effects of estrogen in ischemic stroke. *Transl Stroke Res.* 2013;4:390–401.
15. Boese AC, Kim SC, Yin K-J, Lee J-P, Hamblin MH. Sex differences in vascular physiology and pathophysiology: estrogen and androgen signaling in health and disease. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol.* 2017;313:H524–45.
16. Yanguas-Casás N, Brocca ME, Azcoitia I, Arevalo MA, Garcia-Segura LM. Estrogenic Regulation of Neuroprotective and Neuroinflammatory Mechanisms: Implications for Depression and Cognition. In: Brinton RD, Genazzani AR, Simoncini T, Stevenson JC, editors. *Sex Steroids Eff Brain Heart Vessels Vol 6 Front Gynecol Endocrinol* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2019 [cited 2019 Dec 12]. p. 27–41.

Available from: [https://doi.org/10.1007/978-3-030-11355-1\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-030-11355-1_3)

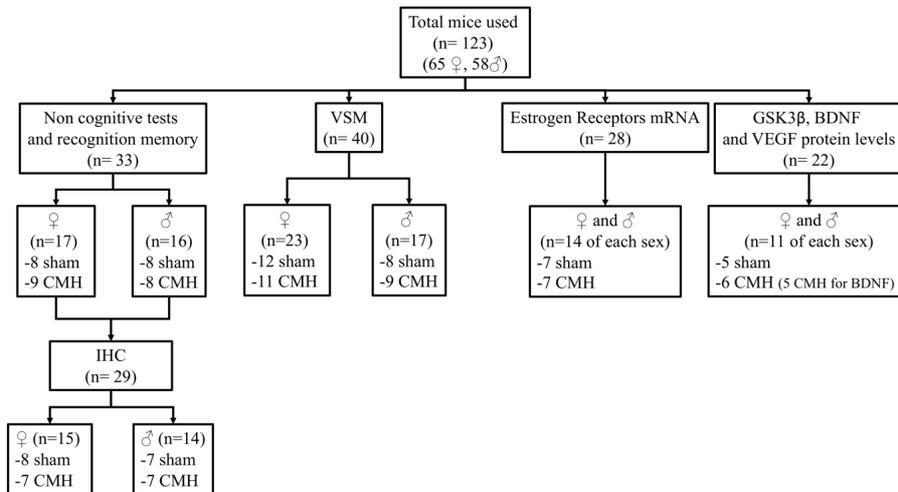
17. Wang C, Jie C, Dai X. Possible roles of astrocytes in estrogen neuroprotection during cerebral ischemia. *Rev Neurosci*. 2014;25:255–68.
18. Villa A, Vegeto E, Poletti A, Maggi A. Estrogens, Neuroinflammation, and Neurodegeneration. *Endocr Rev*. 2016;37:372–402.
19. Arevalo M-A, Azcoitia I, Garcia-Segura LM. The neuroprotective actions of oestradiol and oestrogen receptors. *Nat Rev Neurosci*. 2015;16:17–29.
20. Robison LS, Gannon OJ, Salinero AE, Zuloaga KL. Contributions of sex to cerebrovascular function and pathology. *Brain Res*. 2019;1710:43–60.
21. Kuntz M, Mysiorek C, Pétrault O, Pétrault M, Uzbekov R, Bordet R, et al. Stroke-induced brain parenchymal injury drives blood–brain barrier early leakage kinetics: a combined in vivo/in vitro study. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2014;34:95–107.
22. Shepherd A, Tyebji S, Hannan AJ, Burrows EL. Translational Assays for Assessment of Cognition in Rodent Models of Alzheimer’s Disease and Dementia. *J Mol Neurosci MN*. 2016;60:371–82.
23. Leger M, Quiedeville A, Bouet V, Haelewyn B, Boulouard M, Schumann-Bard P, et al. Object recognition test in mice. *Nat Protoc*. 2013;8:2531–7.
24. Kim CH, Heath CJ, Kent BA, Bussey TJ, Saksida LM. The role of the dorsal hippocampus in two versions of the touchscreen automated paired associates learning (PAL) task for mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 2015;232:3899.
25. Horner AE, Heath CJ, Hvoslef-Eide M, Kent BA, Kim CH, Nilsson SRO, et al. The touchscreen operant platform for testing learning and memory in rats and mice. *Nat Protoc*. 2013;8:1961–84.
26. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods San Diego Calif*. 2001;25:402–8.
27. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*. 2012;9:676–82.
28. Jesmin S, Mowa CN, Sultana SN, Mia S, Islam R, Zaedi S, et al. Estrogen receptor alpha and beta are both involved in the cerebral VEGF/Akt/NO pathway and cerebral angiogenesis in female mice. *Biomed Res Tokyo Jpn*. 2010;31:337–46.
29. Adams KL, Gallo V. The diversity and disparity of the glial scar. *Nat Neurosci*. 2018;21:9–15.
30. Matias I, Morgado J, Gomes FCA. Astrocyte Heterogeneity: Impact to Brain Aging and Disease. *Front Aging Neurosci*. *Frontiers*; 2019;11:59.
31. Ishrat T, Sayeed I, Atif F, Hua F, Stein DG. Progesterone is neuroprotective against ischemic brain injury through its effects on the phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B signaling pathway. *Neuroscience*. 2012;210:442–50.
32. Liu Z, Li R, Jiang C, Zhao S, Li W, Tang X. The neuroprotective effect of lithium chloride on cognitive impairment through glycogen synthase kinase-3 $\beta$  inhibition in intracerebral hemorrhage rats. *Eur J Pharmacol*. 2018;840:50–9.
33. Ong LK, Chow WZ, TeBay C, Kluge M, Pietrogrande G, Zalewska K, et al. Growth Hormone Improves Cognitive Function After Experimental Stroke. *Stroke*. 2018;49:1257–66.
34. Krafft PR, Altay O, Rolland WB, Duris K, Lekic T, Tang J, et al.  $\alpha 7$  Nicotinic Acetylcholine Receptor Agonism Confers Neuroprotection Through GSK-3 $\beta$  Inhibition in a Mouse Model of Intracerebral Hemorrhage. *Stroke*. 2012;43:844–50.
35. Bele MS, Gajare KA, Deshmukh AA. Caloric restriction mimetic 2-deoxyglucose maintains cytoarchitecture and reduces tau phosphorylation in primary culture of mouse hippocampal pyramidal neurons. *Vitro Cell Dev Biol - Anim*. 2015;51:546–55.
36. Zhao Y, Wei ZZ, Zhang JY, Zhang Y, Won S, Sun J, et al. GSK-3 $\beta$  Inhibition Induced Neuroprotection, Regeneration, and Functional Recovery after Intracerebral Hemorrhagic Stroke. *Cell Transplant*. 2017;26:395–407.
37. Plaschke K, Staub J, Ernst E, Marti HH. VEGF overexpression improves mice cognitive abilities after unilateral common carotid artery occlusion. *Exp Neurol*. 2008;214:285–92.
38. Shih AY, Hyacinth HI, Hartmann DA, Veluw SJ van. Rodent Models of Cerebral Microinfarct and Microhemorrhage. *Stroke*. 2018;STROKEAHA.117.016995.
39. Sudduth TL, Powell DK, Smith CD, Greenstein A, Wilcock DM. Induction of hyperhomocysteinemia models vascular dementia by induction of cerebral microhemorrhages and neuroinflammation. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2013;33:708–15.
40. Biasibetti R, Almeida dos Santos JP, Rodrigues L, Wartchow KM, Suardi LZ, Nardin P, et al. Hippocampal changes in STZ-model of Alzheimer’s disease are dependent on sex. *Behav Brain Res*. 2017;316:205–14.
41. Grosche A, Grosche J, Tackenberg M, Scheller D, Gerstner G, Gumprecht A, et al. Versatile and Simple Approach to Determine Astrocyte Territories in Mouse Neocortex and Hippocampus. *PLoS ONE*. 2013;8:e69143.

42. Ben Haim L, Carrillo-de Sauvage M-A, Ceyzariat K, Escartin C. Elusive roles for reactive astrocytes in neurodegenerative diseases. *Front Cell Neurosci.* 2015;9:278.
43. Franklin TB, Perrot-Sinal TS. Sex and ovarian steroids modulate brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein levels in rat hippocampus under stressful and non-stressful conditions. *Psychoneuroendocrinology.* 2006;31:38–48.
44. Hill RA, van den Buuse M. Sex-dependent and region-specific changes in TrkB signaling in BDNF heterozygous mice. *Brain Res.* 2011;1384:51–60.
45. Gallego X, Cox RJ, Funk E, Foster RA, Ehringer MA. Voluntary exercise decreases ethanol preference and consumption in C57BL/6 adolescent mice: Sex differences and hippocampal BDNF expression. *Physiol Behav.* 2015;138:28–36.
46. Chan CB, Ye K. Sex differences in brain-derived neurotrophic factor signaling and functions: Sex Differences in BDNF Activity. *J Neurosci Res.* 2017;95:328–35.
47. Rossetti AC, Paladini MS, Trepici A, Mallien A, Riva MA, Gass P, et al. Differential Neuroinflammatory Response in Male and Female Mice: A Role for BDNF. *Front Mol Neurosci.* 2019;12:166.
48. Allard JS, Perez EJ, Fukui K, Carpenter P, Ingram DK, Cabo R de. Prolonged metformin treatment leads to reduced transcription of Nrf2 and neurotrophic factors without cognitive impairment in older C57BL/6J mice. *Behav Brain Res.* 2016;301:1–9.
49. Delattre C, Bournonville C, Auger F, Lopes R, Delmaire C, Henon H, et al. Hippocampal Deformations and Entorhinal Cortex Atrophy as an Anatomical Signature of Long-Term Cognitive Impairment: from the MCAO Rat Model to the Stroke Patient. *Transl Stroke Res.* 2018;9:294–305.
50. Hosomi S, Watabe T, Mori Y, Koyama Y, Adachi S, Hoshi N, et al. Inflammatory projections after focal brain injury trigger neuronal network disruption: An 18F-DPA714 PET study in mice. *NeuroImage Clin.* 2018;20:946–54.
51. Mechling AE, Hübner NS, Lee H-L, Hennig J, von Elverfeldt D, Harsan L-A. Fine-grained mapping of mouse brain functional connectivity with resting-state fMRI. *NeuroImage.* 2014;96:203–15.
52. Heringa SM, Reijmer YD, Leemans A, Koek HL, Kappelle LJ, Biessels GJ, et al. Multiple microbleeds are related to cerebral network disruptions in patients with early Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis JAD.* 2014;38:211–21.
53. Tuladhar AM, van Dijk E, Zwiers MP, van Norden AGW, de Laat KF, Shumskaya E, et al. Structural network connectivity and cognition in cerebral small vessel disease: Structural Network and Cognition. *Hum Brain Mapp.* 2016;37:300–10.
54. Winters BD, Saksida LM, Bussey TJ. Object recognition memory: Neurobiological mechanisms of encoding, consolidation and retrieval. *Neurosci Biobehav Rev.* 2008;32:1055–70.
55. Lei B, Wang H, Jeong S, Hsieh JT, Majeed M, Dawson H, et al. Progesterone Improves Neurobehavioral Outcome in Models of Intracerebral Hemorrhage. *Neuroendocrinology.* 2016;103:665–77.
56. Tucker LB, Velosky AG, Fu AH, McCabe JT. Chronic Neurobehavioral Sex Differences in a Murine Model of Repetitive Concussive Brain Injury. *Front Neurol.* 2019;10:509.
57. Sumbria RK, Grigoryan MM, Vasilevko V, Paganini-Hill A, Kilday K, Kim R, et al. Aging exacerbates development of cerebral microbleeds in a mouse model. *J Neuroinflammation. Journal of Neuroinflammation;* 2018;15:69.
58. Dubal DB, Zhu H, Yu J, Rau SW, Shughrue PJ, Merchenthaler I, et al. Estrogen receptor  $\alpha$ , not  $\beta$ , is a critical link in estradiol-mediated protection against brain injury. *Proc Natl Acad Sci.* 2001;98:1952–7.
59. Dubal DB, Rau SW, Shughrue PJ, Zhu H, Yu J, Cashion AB, et al. Differential modulation of estrogen receptors (ERs) in ischemic brain injury: a role for ER $\alpha$  in estradiol-mediated protection against delayed cell death. *Endocrinology.* 2006;147:3076–84.
60. Spence RD, Hamby ME, Umeda E, Itoh N, Du S, Wisdom AJ, et al. Neuroprotection mediated through estrogen receptor- $\alpha$  in astrocytes. *Proc Natl Acad Sci.* 2011;108:8867–72.
61. Acaz-Fonseca E, Sanchez-Gonzalez R, Azcoitia I, Arevalo MA, Garcia-Segura LM. Role of astrocytes in the neuroprotective actions of 17 $\beta$ -estradiol and selective estrogen receptor modulators. *Mol Cell Endocrinol.* 2014;389:48–57.
62. Reding KM, Grayson DS, Miranda-Dominguez O, Ray S, Wilson ME, Toufexis D, et al. Effects of social subordination and oestradiol on resting-state amygdala functional connectivity in adult female rhesus monkeys. *J Neuroendocrinol.* 2020;32:e12822.
63. Tamura M, Mukai J, Gordon JA, Gogos JA. Developmental Inhibition of Gsk3 Rescues Behavioral and Neurophysiological Deficits in a Mouse Model of Schizophrenia Predisposition. *Neuron.* 2016;89:1100–9.
64. Srivastava DP, Woolfrey KM, Evans PD. Mechanisms underlying the interactions between rapid estrogenic and BDNF control of synaptic connectivity. *Neuroscience.* 2013;239:17–33.
65. Holschneider D, Givrad T, Yang J, Stewart S, Francis S, Wang Z, et al. Cerebral perfusion mapping during retrieval of spatial memory in rats. *Behav Brain Res.* 2019;375:112116.

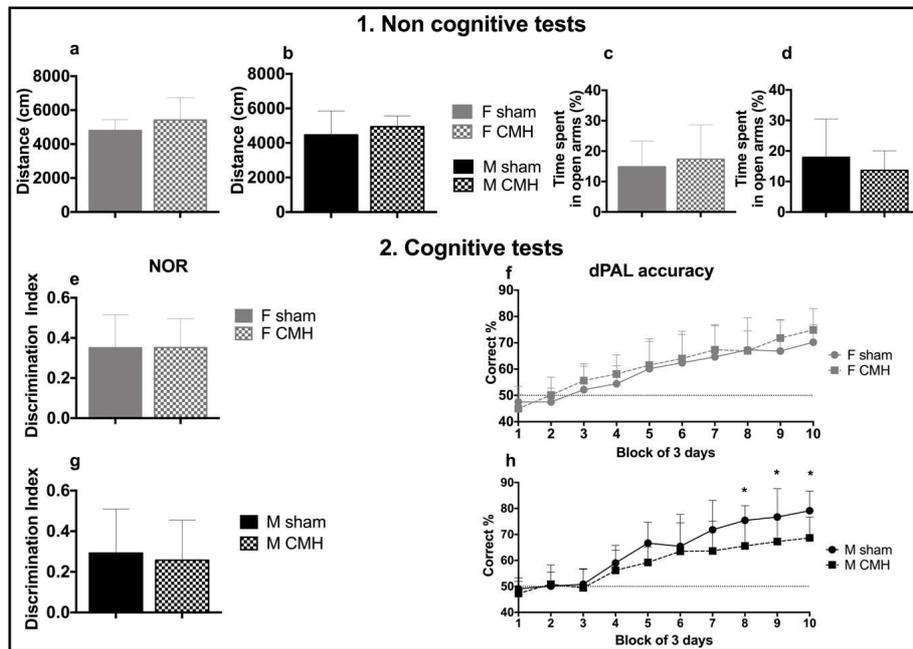
## 7. Legends and figures



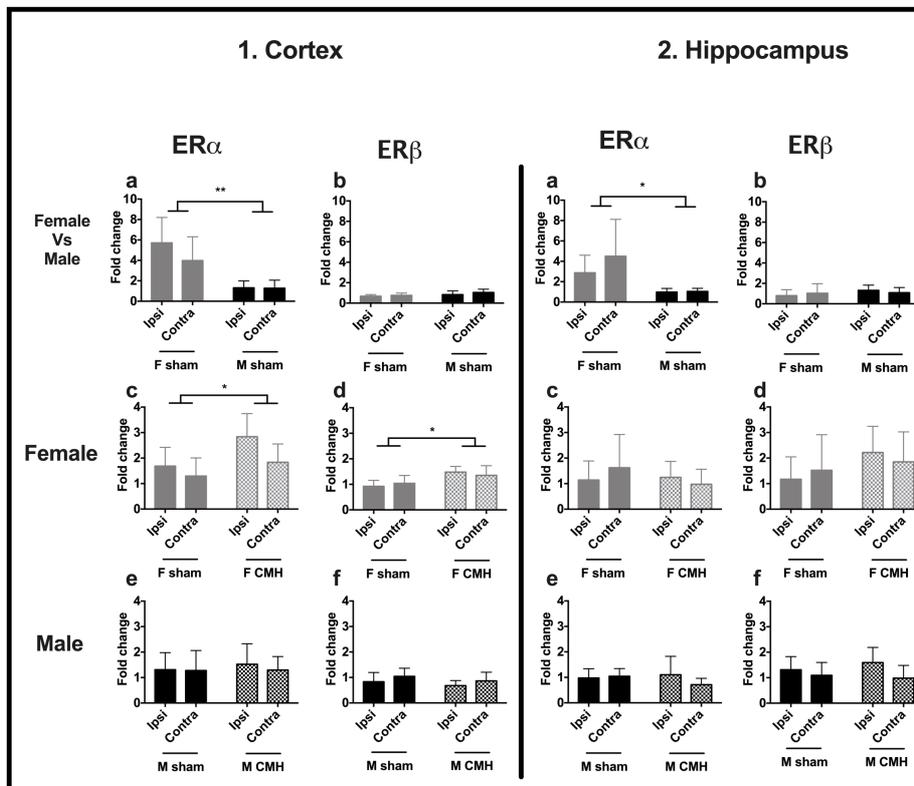
**Fig 1** (1) Coronal view of (1a) a mouse brain section in the Paxinos atlas, the red cross shows the injection site; (1b) T2\* sequence brain MRI with, the white arrow shows the microhemorrhage; (1c) T2\* sequence with the 4 Regions Of Interest (ROI), represented by rectangles: 2 ipsilateral areas (one in the injection site in the cortex, another one in the hippocampus); 2 contralateral areas (one in the cortex, another one in the hippocampus); (1d) Diffusion Weighted Imaging sequence with the ROIs transferred from the T2\* sequence; (2a) Dissection planes (red dotted lines) on fresh tissue to collect the structures of interest, the scale bar is 0.5 cm; (2b) Sagittal view of a mouse brain on the Paxinos atlas, the red cross shows the injection site, the red zone shows the collected structures.



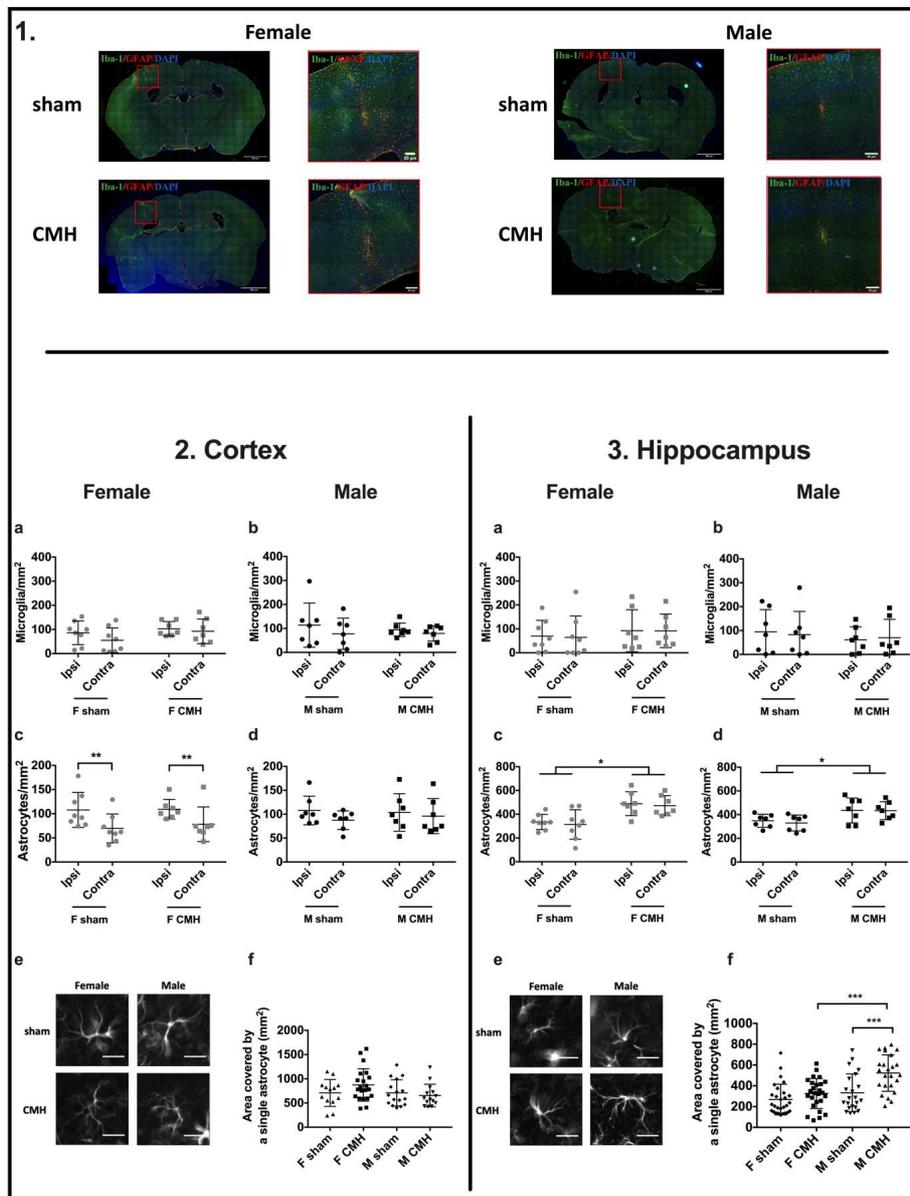
**Fig. 2** Flow chart of mice used for the study. (BDNF) Brain Derived Neurotrophic Factor. (CMH) Cerebral MicroHemorrhage, (GSK3β) glycogen synthase kinase-3 β. (IHC) ImmunoHistoChemistry. (VSM) VisuoSpatial Memory. (VEGF) Vascular Endothelial Growth Factor



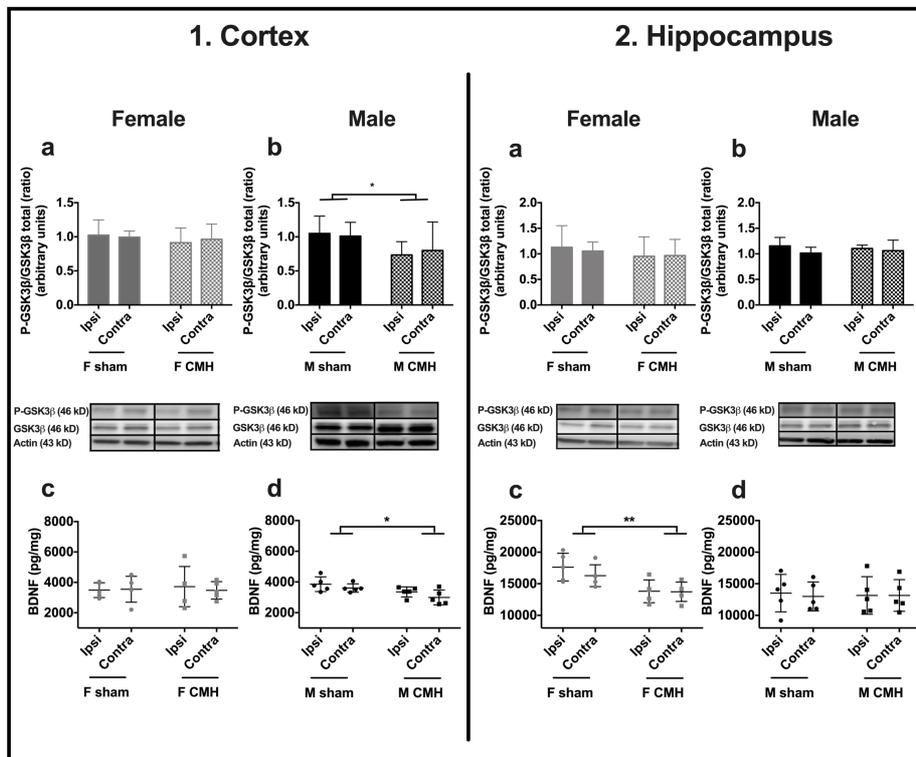
**Fig. 3** Neurobehavioral assessment in male and female mice. (1a-d) non cognitive tests. (a,b) general locomotor activity in female and male mice. (c,d) level of anxiety in female and male mice. (2e-h) cognitive tests. (e,g) Novel object recognition (NOR) in female and male mice. (2f-h) dPAL task in female and male mice. (For non-cognitive tests and NOR, sham=8/group and CMH=9/group; for dPAL task, F sham n=12, F CMH n=11, M sham n=8, M CMH n=9). Dotted lines (f and h) represent values expected by chance (up to 50% of correct responses). Data are presented as means +/- SD \*p < 0.05, M CMH vs. M sham



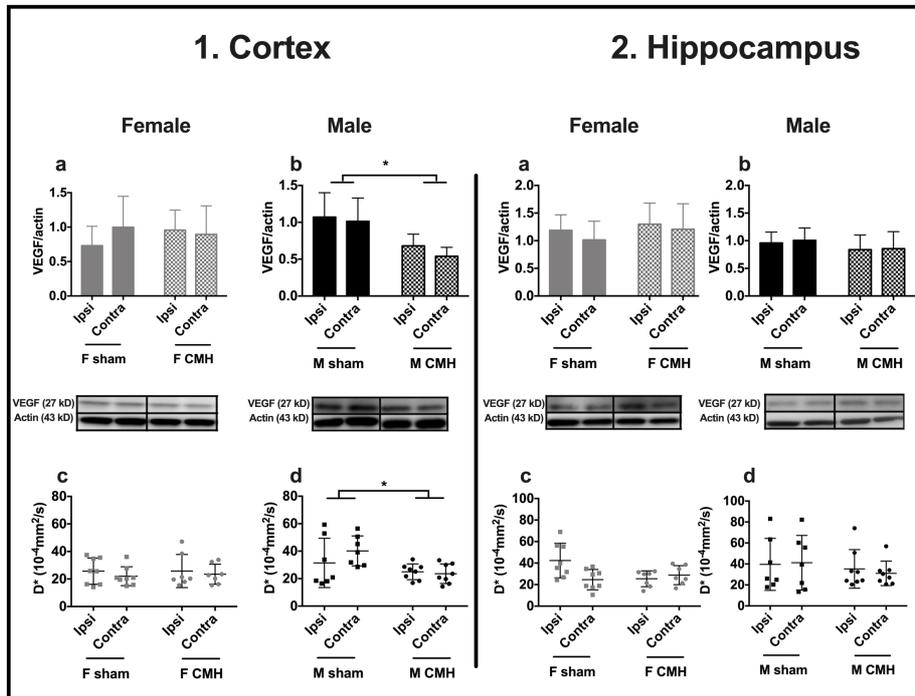
**Fig. 4** mRNA expression of ER $\alpha$  and ER $\beta$  in the female and male cortex and hippocampus. (1a-1f) mRNA expression of ER $\alpha$  and ER $\beta$  in the cortex of male and female mice. (2a-2f) mRNA expression of ER $\alpha$  and ER $\beta$  in the hippocampus of male and female mice. (1a, 2a) ER $\alpha$  mRNA of female sham compared with male sham. (1b, 2b) ER $\beta$  mRNA of female sham compared with male sham. (1c, 1d, 2c, 2d) ER $\alpha$  and ER $\beta$  mRNA of female sham compared with female CMH. (1e, 2e, 1f, 2f) ER $\alpha$  and ER $\beta$  mRNA of male sham compared with male CMH. (n=7 per group). Data are presented as means  $\pm$  SD \*p<0.05 \*\* p<0.005



**Fig. 5** Labeling and quantification of microglia and astrocytes in the male and female cortex and hippocampus. (1) Representative brain slices showing the injection site (nuclei (DAPI), astrocytes (GFAP) and microglia (IBA1) are respectively in blue, red and green). (2a-d) microglial cells and astrocytes per mm<sup>2</sup> in the cortex. (2e) representative astrocyte surrounding the injection site. (3a-d) microglial cells and astrocytes per mm<sup>2</sup> in the hippocampus (female CMH n=7, female sham, n=8) (male, n=7/group). (3e) representative astrocytes in the hippocampus. (2f, 3f) area covered by an astrocyte (several astrocytes per mice). Data are presented as means +/- SD \* p<0.05



**Fig. 6** P-GSK3 $\beta$ /total GSK3 $\beta$  ratio and BDNF in female and male cortex (1a-1d) and hippocampus (2a-2d). (a) P-GSK3 $\beta$ /total GSK3 $\beta$  ratio in the female mice. (b) P-GSK3 $\beta$ /total GSK3 $\beta$  ratio in the male mice. (c) BDNF levels in the female mice. (d) BDNF levels in the male mice. (In female and male groups, for the P-GSK3 $\beta$ /total GSK3 $\beta$  ratio, n=5/sham and n=6/CMH In female and male groups, for BDNF, n=5 per group). Data are presented as means  $\pm$  SD \*p<0.05 \*\*p<0.005



**Fig. 7** VEGF levels and  $D^*$  value in female and male cortex (1a-d) and hippocampus (2a-d). (a,b) VEGF levels in female and male mice. (c,d)  $D^*$  value in female and male mice. (For VEGF levels in female and male mice,  $n=5/\text{sham}$ ,  $n=6/\text{CMH}$ . For  $D^*$  value, in female mice,  $n=8/\text{group}$ . For  $D^*$  value, in male mice,  $n=7/\text{sham}$  and  $n=8/\text{CMH}$ ). Data are presented as mean  $\pm$  SD \* $p < 0.05$

**ARTICLE 2**  
**(EN SOUMISSION)**



# **Beneficial effects of atorvastatin on sex-specific cognitive impairment induced by a cerebral microhemorrhage in a murine model**

Sandrine Bergeron<sup>1\*</sup>, Romain Barus<sup>1\*</sup>, Florent Auger<sup>1</sup>, Clémence Leboullanger<sup>1</sup>, Antonino Bongiovanni<sup>1</sup>, Meryem Tardivel<sup>1</sup>, Charlotte Laloux<sup>1</sup>, Camille Potey<sup>1</sup>, Régis Bordet<sup>1</sup>, Yaohua Chen<sup>1</sup>, Sophie Gautier<sup>1</sup>

\*“These authors contributed equally to this work”

1. Univ.Lille, Inserm, CHU-Lille, Lille Neuroscience & Cognition research centre UMR-S1172, Degenerative and Vascular Cognitive Disorders, F-59000, Lille, France

Pharmacology Department, 1 place de Verdun, 59045 Lille Cedex

03 20 44 68 64, [sophie.gautier@chru-lille.fr](mailto:sophie.gautier@chru-lille.fr)

Running headline: Cerebral microhemorrhage, sex, cognition, statin

## **What is known**

A cerebral microhemorrhage (CMH) can induce sex-specific cognitive impairment along with cortical and hippocampal alterations.

## **What this study adds**

Atorvastatin prevents the CMH-induced sex-specific cognitive impairment.

## **What is the clinical significance?**

Atorvastatin may be an interesting treatment in patients with CMH and cognitive impairment.

## **Abstract**

### **Background and purposes**

Cerebral microhemorrhages (CMH) are associated with cognitive decline in humans. In rodents, CMHs induce cognitive impairment in male mice only along with sex-specific cortical and hippocampal modifications affecting neural, glial and vascular functions. Statins, prescribed in the context of cardiovascular risk factors, have been proposed to prevent cognitive decline. We tested here the action of atorvastatin on CMH-induced cognitive impairment in our murine model of CMH.

### **Experimental approach**

Using a multimodal approach combining behavioral tests, *in vivo* imaging, biochemistry and molecular biology, the effects of oral administration of atorvastatin (AT) on the sex-specific modifications induced by a cortical CMH was studied in male and female mice (C57BL/6J) at 6 weeks post-induction using a collagenase-induced model.

### **Key results**

AT drove specific effects according to the sex-specific CMH-induced modifications. In males: AT improved the visuospatial memory; enhanced BDNF and VEGF expression in the cortex and induced a local modulation of microglial response to the CMH. In the hippocampus, AT increased glucose metabolism and modulated astrocytes morphology. In females: AT did not modulate visuospatial memory despite the increased expression of cortical BDNF and the decrease of the number of hippocampal astrocytes. AT also induced a decrease of the expression of cortical estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ . AT did not modify the weight nor the serum cholesterol levels in both sexes.

### **Conclusion and implications**

AT modulated the sex-specific cognitive impairment induced by the CMH in males. It could represent a promising candidate for future clinical trials in patients with CMH. Additionally, response to disease and to treatment must be taken into account the influence of sex.

## 1 Introduction

Cerebral microhemorrhages (CMH) are associated with cognitive decline in humans (Wu et al., 2014; Li et al., 2017; Paradise et al., 2018; Elmståhl et al., 2019; Abdullah et al., 2020; Qian et al., 2020) and in rodent models (Sudduth et al., 2013, 2017; He et al., 2016; Bergeron et al., 2018; Pétrault et al., 2019; Barus et al., 2020). Experimentally, a single cortical CMH without any underlying pathology is able to induce cognitive alterations (Bergeron et al., 2018). Along with this cognitive impairment exclusively observed in male mice, this CMH triggered sex-specific cortical and hippocampal modifications affecting neural, glial and vascular functions (Bergeron et al., 2018; Barus et al., 2020).

Pharmacological modulations of the impacts of a CMH could help to explore its pathophysiology in depth and lead to the development of potential preventive treatments (He et al., 2016). Statins are a well-known class of drugs widely prescribed to treat dyslipidemia. They reduce the expression of cholesterol by inhibiting the HMG-CoA reductase, a key enzyme involved in the mevalonate pathway (Fracassi et al., 2019). Statins also modulate the expression of various proteins e.g. GSK3 $\beta$ , BDNF and VEGF involved among other things in neurogenesis and angiogenesis (Wu et al., 2008; Fracassi et al., 2019) and the recruitment of neuroinflammatory cells (Han et al., 2012; Mendoza-Oliva et al., 2014). Statins, evaluated in experimental ischemic stroke models (Potey et al., 2015) or intracerebral hemorrhage models (Karki Kishor et al., 2009; Wang et al., 2018) improved the neurological outcome and promoted neurovascular recovery. Preclinical studies argue for a procognitive effect of statins through the modulation of memory-related pathways (Lu et al., 2007; Kurata et al., 2012; Peng et al., 2014; Kaviani et al., 2017; Bergeron et al., 2018; Fracassi et al., 2019) also observed in observational clinical studies (Zhang et al., 2018; Alsehli et al., 2020). Hence, further investigations on AT effects on the sex-specific cognitive alterations induced by a cortical CMH could be valuable.

The aim of the study was to evaluate the effects of a long-term oral administration of atorvastatin on the sex-specific cognitive alterations induced by a cortical CMH, 6 weeks after surgery, using a multimodal approach based on neurobehavioral evaluations, in vivo imaging and biochemistry tests.

## **2 Methods**

### **2.1 Ethical statement**

All experiments were approved by the national Ethical Committee in Animal Experimentation (CEEA n°75, Comité d’Ethique en Expérimentation Animale) of the French Ministry for Education and Research (agreement number: n°2018042309364017-v5) and were performed in strict compliance with the European Union Directive 2010/63/EU. Experiments were reported in accordance with the ARRIVE guidelines.

### **2.2 Animals**

Adult male and female C57Bl6/J mice (Elevage Janvier, Le Genest Saint Isle, France; weight range 28–32 g for males, and 20–22 g for females) were used during these experiments. The animals were housed in transparent cages (five or less per cage) with nesting material and maintained in a climate-controlled room (temperature 19–24°C; relative humidity: 45–65%) with a 12-h light/dark cycle (lights on at 7:00 am), and food and water ad libitum.

### **2.3 Experimental groups and evaluation time**

Experimental groups consisted of male (M) and female (F) mice subjected to CMH induction. Mice were randomized to receive either normal food or food with atorvastatin (AT) for 6 weeks. Four groups of mice were constituted: F CMH, F CMH+AT, M CMH and M CMH+AT. All experiments were carried out 6 weeks after surgery. 35 mice were used for non-cognitive tests and novel object recognition (8 to 9 mice per group) and for the glucose metabolism study with FDG PET. 42 mice were used to assess visuospatial memory (VSM) (9 to 12 mice per group) and for immunohistochemistry. 22 mice were used for western blotting and ELISA (5 to 6 mice per group). 28 mice were used for molecular biology (7 mice per group). As previously described (Barus et al., 2020), the CMH induced cortical and hippocampal modifications. Thus, AT effects were analyzed in these two areas.

### **2.4 Surgical Procedure**

As previously described (Bergeron et al., 2018; Barus et al., 2020), a single cortical CMH was induced in the left primary somatosensory cortex by a stereotaxic injection of the proteolytic enzyme type VII bacterial collagenase (COL C2399, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). 10 to 12 week-old mice were anesthetized with isoflurane (induction: 3%; maintenance: 2–2.5%) and body temperature was kept constant at 36 to 36.5°C via a heating blanket

connected to an intrarectal thermometer. Once positioned in a stereotaxic frame (Knopf Instruments, Tujunga, CA, USA), a one mm-hole was drilled through the skull at 1 mm (posterior) and 2 mm (left) from bregma. A single volume of collagenase (for the CMH groups) or saline (for the sham groups) was injected (stereotaxic coordinates AP – 1 mm; DV – 1 mm; ML 2 mm) using a micro-syringe pump (Micro 4® Microsyringe Pump Controller – World Precisions Instruments, Sarasota, FL, USA). 1 µL of collagenase (0.8 µU) was injected over a period of 5 minutes and the needle was left in place for another 5 minutes after the injection ended. The scalp was then sutured and the mouse was placed under a warm red light to recover. After surgery, the inclusion criterion was assessed by MRI after 24 hours, based on the 24h-T2\* sequence analyzed by blinded observers: presence of a hemorrhage in the CMH groups.

## **2.5 Pharmacological modulation by atorvastatin**

To study the effect of atorvastatin treatment on mice after a CMH, atorvastatin was administered at a dose of 5 mg/kg/day and mixed into the standard chow of the mice. Atorvastatin administration was initiated immediately after surgery in the CMH+AT groups and continued throughout the 6-week follow-up period.

## **2.6 Cholesterol dosing**

At 6 weeks post-surgery, a retro orbital blood sample was collected in an EDTA tube (Microvette® 500µL K3E, Sarstedt, Nümbrecht, Germany) and centrifuged at 4500 RPM for 20 minutes at 4°C to recover plasma. Total cholesterol was assayed with the VetTest® 8008 (IDEXX, Hoofddorp, Netherlands).

## **2.7 Behavioral assessment**

As a prerequisite, we investigated spontaneous locomotor activity and anxiety level to ensure that an underlying motor deficit and/or an anxiety disorder would not interfere with the animal abilities during cognitive testing (Shepherd et al., 2016).

### **2.7.1 Spontaneous locomotor activity**

Spontaneous locomotor activity was assessed in an open field test, using an infrared actimeter (Bioseb, Vitrolles, France). The apparatus consisted of a square arena (45 x 45 cm) with a black polymethyl methacrylate floor and transparent 34 cm-high polymethyl methacrylate walls. Mice were placed in the center of the arena and allowed to explore freely for 10 minutes. Activity was recorded by two rows of infrared photocell sensors and processed with the Actitrack® software (Bioseb). The total distance covered (in cm) was calculated.

### **2.7.2 Anxiety**

The elevated plus-maze was used to assess the anxiety behavior of the mice. The equipment consisted of four arms (36.5 x 6 cm) forming an elevated cross positioned 50 cm above the floor. Two arms were opened, and the other two were enclosed by 14.5cm-high walls. The mouse was placed in the middle of the maze and allowed to explore the maze for 10 minutes. A video tracking system (Ethovision® XT 7.0, Noldus, Wageningen, Netherlands) recorded movements to calculate the percentage of time spent in the open arms, used as an index of anxiety behavior.

### **2.7.3 Recognition memory**

The Novel Object Recognition (NOR) test is used to assess object recognition memory. The protocol was inspired by the work of Léger and collaborators, with minor modifications (Leger et al., 2013). The experimental device consisted of a square enclosure (50 x 50 cm) surrounded entirely by black partitions to restrict the visual field of the mice to the test arena. The test was ran over 3 days and included a habituation phase of 10 minutes per day for the first 2 days; the first day in an empty enclosure; the second day in the same enclosure with two identical training objects; the third day consisted of a first acquisition phase of 15 minutes with 2 identical objects (different from those used on the second day) and a second phase of 5 minutes with a retention interval of 1 hour (retention test). During the retention test, the arena contained a familiar object (present during the 15-minute acquisition phase) and a new object. Movements were recorded for analysis using the Ethovision® XT 7.0 software (Noldus). A blinded operator analyzed the time spent exploring the objects (novel and familiar) for the mice that explored the objects for at least 20 seconds (exclusion threshold) during the acquisition phase. The discernment index was calculated as the subtraction of the time spent exploring the novel object and the familiar object divided by the total time exploring either object.

### **2.7.4 VisuoSpatial Memory (VSM)**

VSM, a hippocampus-dependent memory (Kim et al., 2015), was evaluated in the Paired Associated Learning (PAL) task using touchscreen operant chambers (Campden Instruments Ltd, Cambridge, UK) (Horner et al., 2013; Bergeron et al., 2018). Mice were tested for their ability to associate objects with spatial locations as shown on the screen. Before the PAL task, mice were pre-trained during several phases of instrumental operant conditioning. In the “habituation” phase, mice were trained to collect free rewards (drops of chocolate flavored milk, accompanied by illumination of the tray where the reward was located and a 1-second

sound tone) during 20 and 40-minute long sessions. In the “initial touch” and “must touch” PAL training phases, mice were trained to touch the screen and then to specifically touch a white square stimulus to obtain a reward. In the “punish incorrect” phase, final stage of pre-training, a nose-poke on the white square stimulus (i.e. a correct response) was rewarded. A nose-poke on one of the two other blank windows (i.e. an incorrect response) resulted in house light illumination for a 5-second time-out period (no reward). When all mice achieved a correct response rate of more than 75% over two consecutive sessions, they were moved onto the “different PAL” (dPAL) training phase.

For the dPAL task, one of six possible trial types was randomly presented on the screen. For each trial type, only one visual stimulus (a flower, an airplane or a spider) was presented in its correct location (+); a second visual stimulus was presented in one of the two incorrect locations (-), and the third location remained blank. Each trial type was presented an equal number of times and was not repeated in more than two consecutive trials. Mice were tested for their ability to nose-poke the correct location in each trial. An incorrect choice was followed by an additional correction trial with the previous pair of stimuli in the same spatial configuration, until the mouse made the correct choice. A correct choice was rewarded. An incorrect choice was followed by house light illumination for a 5-second time-out period. Mice performed 36 trials per session in less than 60 minutes, for 30 successive sessions (one per day). Correction trials were not counted in the total number of trials. In view of potential day-to-day variations in the performance levels of mice, VSM was measured as the mean percentage of correct responses over a three-day period (block of three days), 10 blocks were performed for the total dPAL task.

## **2.8 In vivo imaging**

### **2.8.1 MRI Sequences**

Twenty-four hours after surgery, all mice underwent micro MRI (7-Tesla; BioSpec 70/20, Bruker, Ettlingen, Germany) with a T2\* sequence to confirm the presence or the absence of the CMH (repetition time (TR)/echo time (TE): 1500/24.5 ms; field of view (FOV): 2 cm; spatial resolution: 156  $\mu\text{m}^2$ ).

### **2.8.2 Fluorodeoxyglucose – Positron Emission Tomography.**

6 weeks after surgery, cerebral metabolism was studied by performing a microPET scan (Inveon, Siemens) with an intraperitoneal injection of fluorinated analog of glucose, the

fluorodeoxyglucose ( $[^{18}\text{F}]$  FDG) (13+/-5 MBq; 250–500 ml in volume, IBA-CisBio, Saclay, France). A 15-min PET scan was initiated 60min after radiotracer injection.

To assess changes in metabolism in the areas of interest (cortex and hippocampus), data from the scanner were formatted into three frames of 5 minutes. Those 3 frames were averaged and registered with SPM 12 (Wellcome Department of Cognitive Neurology, London, UK; <http://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm/>). PET and CT images were rigidly co-registered with SPM 12. All CT scans were registered to an in-house CT template and brain masks were extracted and applied to PET images with ANTS (Advanced Normalization Tools package). PET images were registered to Ma-Benveniste-Mirrione FDG mouse atlas. Voxel-based analysis with Statistical Parametric Mapping (SPM) was performed using SPM12. Two-sample t-tests were done to compare CMH+AT vs CMH in both males and females. The a-priori hypothesis was that the statin treatment increased cerebral  $[^{18}\text{F}]$ FDG uptake compared with CMH groups (Tong et al., 2012). Statistical T-maps were thresholded at  $p < 0.05$ , uncorrected at voxel level and cluster threshold of 100 voxels were considered and reported (Bertoglio et al., 2018).

## **2.9 Preparation of samples for biochemistry and molecular biology analysis**

At 6 weeks post-surgery, mice were intraperitoneally injected with a lethal dose of pentobarbital and subsequently perfused transcardially with cold heparinized physiological saline. Mice destined to immunohistochemistry were then perfused with paraformaldehyde. Brains were collected, left in paraformaldehyde overnight, then in a 30% sucrose solution and finally frozen in liquid nitrogen. Mice destined to molecular biology were perfused with cold heparinized physiological saline. Brains were collected and placed in a transparent plexiglas matrix to be dissected as previously described (Barus et al., 2020). Two coronal cuts were performed at + 2mm and -3mm from the bregma to extract an ipsilateral defined region (left) around the lesion and a contralateral region (right).

### **2.10 Protein dosage**

The tissues were homogenized with an ULTRA-TURRAX® (IKA® T10 Basic, IKA, Staufen, Germany) in a solution containing RIPA buffer, phosphatase and protease inhibitors. Homogenized samples were left on ice for 30 minutes before being centrifuged (4°C, 13000g, 30 minutes). The supernatant containing the proteins was then recovered, a 1:20 dilution was

prepared and the protein content was quantified using the Pierce BCA kit (Thermo Fischer, Waltham, MA, USA).

### **2.11 GFAP and IBA1 Immunohistochemistry**

As statins might modulate astrocytes and glial cells, we studied these cell types by labeling GFAP and IBA1 (Li et al., 2009). Twenty  $\mu\text{m}$ -thick brain sections were washed 3 times in 0.02 M KPBS (pH 7.4) for 10 minutes at room temperature. Sections were incubated for 1 hour with KPBS containing 0.3% Triton-X100 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) and 2% horse serum albumin (Vector laboratories, Burlingame, CA, USA). Sections were then incubated overnight at 4°C with a GFAP goat anti-mouse IgG antibody (1:500; Abcam, Cambridge, MA, USA) and a IBA1 rabbit anti-mouse IgG antibody (1:500, Wako Chemicals USA, Richmond, VA, USA). Sections were washed with KPBS and incubated at room temperature for 1 hour with an Alexa 488-conjugated donkey anti-rabbit antibody (1:500, BioLegend, San Diego, CA, USA) or with an Alexa 568-conjugated donkey anti-goat antibody (1:500, Abcam, Cambridge, MA, USA). Finally, the slides were mounted in Vectashield-DAPI® mounting medium (Vector laboratories) and stored at 4°C. For each mouse, 5 slides bearing 5 brain sections were processed (including and surrounding the lesion on both sides of the brain).

The slides were then scanned on a Zeiss AxioScan.Z1® slide scanner (Zeiss, Jena, Germany), magnification factor  $\times 20$ . 4 areas of interest were delimited by using the FIJI software (Schindelin et al., 2012). In the cortex, two areas were analyzed: one localized on the lesion area (ipsilateral cortex) and a second on the same area in the contralateral cortex. On the same section, we also delimited the ipsilateral and contralateral hippocampus. Total positive green and red cells were quantified using the FIJI software by an observer blinded to the experimental groups. We calculated the mean number of positive green and red cells per area. We also analyzed the surface area occupied by marked astrocytes in the ipsilateral hippocampus with the FIJI software (Schindelin et al., 2012).

### **2.12 VEGF levels and phospho-GSK3 $\beta$ /GSK3 $\beta$ ratio**

As statins can induce the expression of VEGF (Kureishi et al., 2000) and inhibit GSK3 $\beta$  by phosphorylation (Yang et al., 2012), we studied phospho-Ser9-GSK3 $\beta$ , total GSK3 $\beta$  and VEGF by Western blot. Samples (20  $\mu\text{g}$  of total proteins) were electrophoresed on 10–20% polyacrylamide tris-tricine gels (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and transferred onto a 0.2  $\mu\text{m}$

nitrocellulose membrane. Membranes were washed in TBS-Tween and blocked with 5% bovine serum albumin (BSA) in TBS-Tween (TBS-T) for 1 hour at room temperature. Membranes were then incubated with a rabbit anti-phospho-Ser9-GSK3 $\beta$  antibody (1:1,000, Cell Signaling, MA, USA) or a rabbit anti-VEGF antibody (1:1,000, Genetex, Inc., Irvine, CA, USA). After several washes, membranes were incubated with a secondary anti-rabbit antibody conjugated with horseradish peroxidase (1:2,000 in 5% BSA-TBS-T). Membranes were washed in TBS-T and bound antibodies were detected using ECL revelation on film. To detect total GSK3 $\beta$ , membranes were stripped, blocked and incubated with the corresponding antibody (rabbit anti-total GSK3 $\beta$  antibody, 1:2,000 Cell Signaling, Danvers, MA, USA). Membranes were washed and incubated with an anti-rabbit antibody conjugated with horseradish peroxidase (1:4,000) and bound antibody detected using ECL revelation on film. Finally, to measure the levels of actin, membranes were stripped a second time and probed with an anti-mouse  $\beta$ -actin antibody (1:10,000, Santa Cruz, Dallas, TX, USA).

All films were scanned and quantified using the FIJI software. Results were expressed as relative density ratio, normalized to the mean value measured for the contralateral cortex or hippocampus of the sham groups.

### **2.13 BDNF quantification**

Statins can enhance the expression of BDNF (Fracassi et al., 2019) thus BDNF levels were quantified in the tissues with a commercial ELISA kit (ab99978, Abcam, Cambridge, UK). A 4-parameter logistic curve including the log of the concentration of the standard range on the abscissa and the optical density of the standard range on the ordinate was produced on GraphPad Prism (version 7.00 for Mac, GraphPad Software, La Jolla California USA) to determine the concentration of each sample.

### **2.14 Estrogen receptors mRNA expression**

mRNAs were extracted from tissues using Extract-all<sup>®</sup> extraction buffer (Eurobio, Les Ulis, France) and was reverse transcribed using SuperScript<sup>®</sup> III retrotranscriptase (Invitrogen) to generate cDNAs. Real-time PCR was carried out on cDNAs using manufactured primer sets and the LightCycler<sup>®</sup> FastStart DNA Master SYBR Green reaction mix (Roche Diagnostic, Meylan, France). The primer sequences were as follow: TBP sense (ggcggtttgctaggttt), TBP anti-sense (gggttatcttcacacacatga), ER $\alpha$  sense (caactgggcaaagagagtgct), ER $\alpha$  anti-sense (ccagacgagaccaatcatca), ER $\beta$  sense (agaatgtccaccgctagg), ER $\beta$  anti-sense (agctgagaaaaatcctgtgaga). The relative quantities of ER $\alpha$  and ER $\beta$  genes were determined by

using the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method (Livak and Schmittgen, 2001). The housekeeping gene used to calculate the delta threshold cycle ( $\Delta CT$ ) was TBP. We calculated the  $\Delta\Delta CT$  which was the difference in  $\Delta CT$  between the target sample and the reference sample (defined as the contralateral cortex of the sham group).

### 2.15 Data and statistical analysis

The data and statistical analysis complies with the recommendations on experimental design and analysis in pharmacology (Curtis et al., 2018). Outliers were not removed prior to analysis. Data are represented as mean  $\pm$  standard deviation (SD). The normality of distributions was assessed using the Shapiro-Wilk test. For locomotor activity, NOR, EPM tests and astrocytes area, a t-test was used to compare the quantitative parameters between the 2 groups CMH and CMH+AT. For cholesterol levels, a two-way ANOVA was used with group, sex and interaction group\*sex as fixed effects. For body weight follow-up and the dPAL test, quantitative parameters were analyzed using a two-way ANOVA with repeated measures, with group, time, and interaction group\*time as fixed effects. *In vivo* imaging, biochemistry and immunohistochemistry data were analyzed with a two-way ANOVA with repeated measures to take into account the correlation between brain areas. Group, area and interaction group\*area were included as fixed effects. For the ANOVA, post-hoc tests were done only if F was significant and there was no variance inhomogeneity. Post-hoc comparisons were conducted with Bonferonni corrections (comparisons between ipsilateral and contralateral zones within the same group or between the same zones of two different groups were performed). Data were analyzed with R software version 3.4.3 (R Core Team (2017) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>) and R Studio environment version Version 1.1.383. Packages used for two-way ANOVA was afex (Henrik Singmann, Ben Bolker, Jake Westfall and Frederik Aust (2019). afex: Analysis of Factorial Experiments. R package version 0.23-0. <https://CRAN.R-project.org/package=afex>) and emmeans for post-hoc comparisons (Russell Lenth (2019). emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means. R package version 1.3.3. <https://CRAN.R-project.org/package=emmeans>).

### 3 Results

#### 3.1 Body weight follow-up and cholesterol dosing

Body weight kept increasing over time with overall lower weights in females compared to males and regardless of the diet (normal pellets or AT pellets) (Figure 1, panel a).

At 6 weeks post-surgery, lower cholesterol levels were observed in females compared to males (mean  $\pm$  SD:  $36 \pm 10$ mg/dL vs.  $61 \pm 18$ mg/dL  $p < 0.0001$ ), without any impact of AT (Figure 1, panel b).

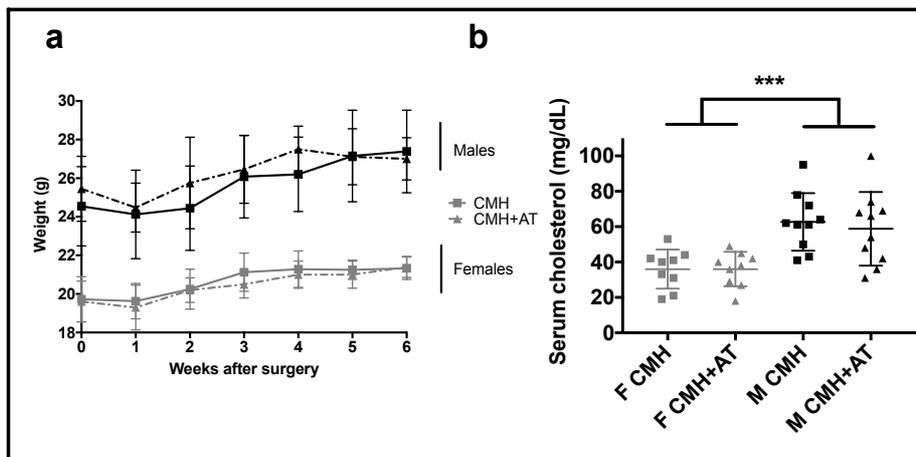


Figure 1: (a) Weight follow-up over 6 weeks after surgery in female and male mice ( $n=7$ /group). (b) Serum cholesterol dosing at 6 weeks post-surgery in female ( $n=9$ /group) and male ( $n=10$ /group) mice. \*\*\*:  $p < 0.0005$

#### 3.2 AT effects on neurobehavioral tests

AT exerted an effect on male neurobehavior only (Figure 2, panel 1). In male mice, AT did not modulate motor activity (data not shown) but increased the time spent in open arms (mean  $\pm$  SD:  $22.2 \pm 6.3\%$  Vs  $13.7 \pm 6.3\%$ ;  $p=0.01$ ) showing lower anxiety levels than in the M CMH group (Figure 2, panel 2a). No modification of recognition memory was observed (Figure 2, panel 2b) but AT improved visuospatial memory as indicated by a significant increase of the percentage of correct answer over time in the dPAL task compared to the M CMH group ( $p=0.047$ ) (Figure 2, panel 2c).

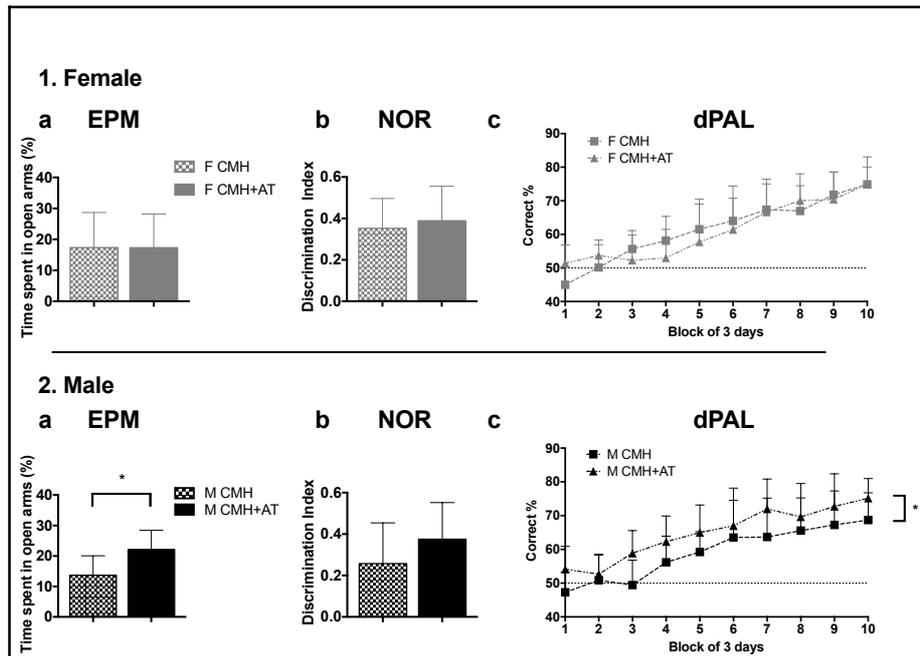


Figure 2: (a) Non cognitive and (b,c) cognitive tests performed in (1) female and (2) male mice; (a) EPM: Elevated Plus Maze; (b) NOR: Novel Object Recognition; (c) dPAL: different Paired Associated Learning. (EPM and NOR, F MHC and F MHC+AT: n=9, M MHC: n=8, M MHC+AT: n=9; for dPAL, F MHC: n=11, F MHC+AT: n=12, M MHC: n=9, M MHC+AT: n=10) \*: p<0.05

### 3.3 AT effects on cerebral metabolism

In females, the voxel-based analysis did not reveal any AT effect on cerebral metabolism in the studied areas. In males, significant differences were found between M CMH and M CMH+AT groups with an increase of glucose uptake in the hippocampus but not in the primary somatosensory cortex in the M CMH+AT group (Figure 3, panel 2b)

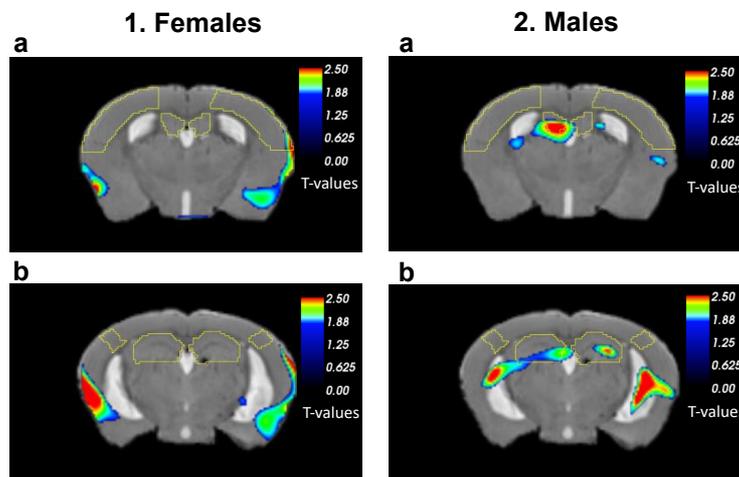


Figure 3: Voxel Based Analysis, overlaid onto MRI template (coronal slice), reflecting a significant ( $p<0.05$ ) regional increase in  $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$  Uptake in CMH+AT mice compared with CMH mice in both sexes at 6 weeks post-surgery. Clusters of more than 100 voxels are represented (a) Coronal view focused on the lesion area (b) Coronal view focused on the hippocampal area. Delineated yellow ROIs are primary somatosensory cortex and hippocampus.

### 3.4 AT effects on CMH-induced cortical modifications

#### 3.4.1 Neuroinflammation

In female mice, no difference was evidenced on any of the evaluated parameters (number of microglial cells or astrocytes) between F CMH-AT group and F CMH group (Figure 4, panel 1a, 1b and 1c).

In males, the number of microglial cells (Figure 4, panel 2a and 2c) was increased in M CMH-AT group compared to M CMH group (mean  $\pm$  SD:  $124 \pm 42$  cells/mm<sup>2</sup> vs.  $76 \pm 35$  cells/mm<sup>2</sup>;  $p=0.03$ ), particularly around the needle track (mean  $\pm$  SD:  $146 \pm 50$  cells/mm<sup>2</sup> vs.  $102 \pm 40$  cells/mm<sup>2</sup> in the contralateral cortical area;  $p=0.009$ ) (Figure 4, panel 2a and 2c).

There was no difference in the number of astrocytes in treated males or females compared to CMH mice (Figure 4, panel 1b and 1c). Off note, in the M CMH+AT, F CMH and F CMH+AT groups, the number of astrocytes was increased in the surroundings of the needle track compared to the contralateral cortical area (Figure 4, panel 1b and 2b).

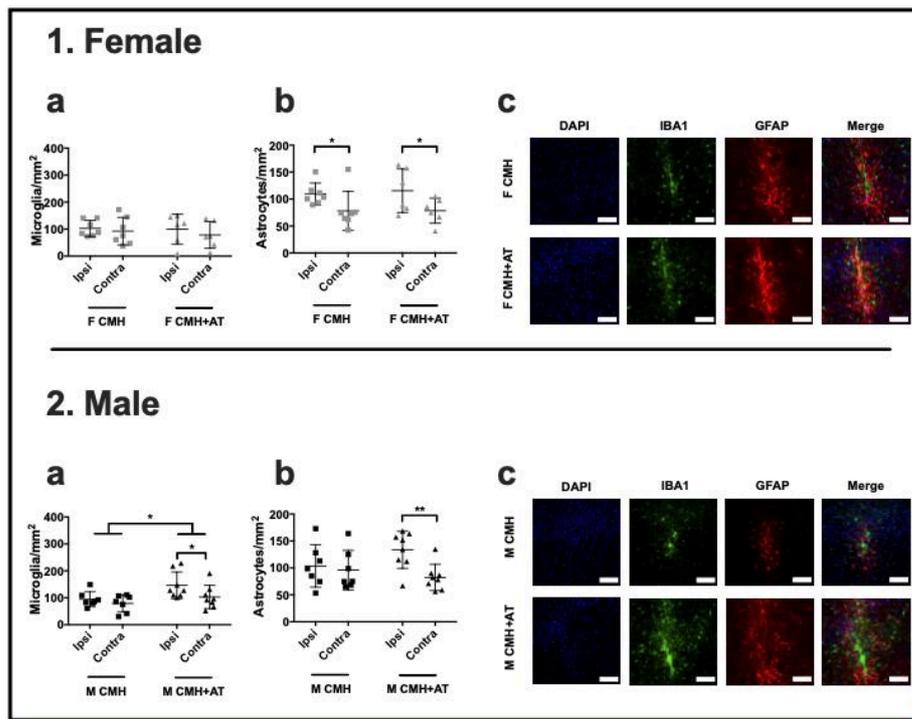


Figure 4: (1a-b) Microglial cells and astrocytes per mm<sup>2</sup> in the cortex of female mice. (2 a-b) Microglial cells and astrocytes per mm<sup>2</sup> in the cortex of male mice (1c-2c) Representative view of the lesion, scale bar is 100µm (F CMH: n=7, F CMH+AT n=6, M CMH: n=7, M CMH+AT n=8). Data are presented as means ±SD. \*:p<0.05; \*\*:p<0.005

### 3.4.2 Signaling pathways

#### 3.4.2.1 GSK3β

The treatment did not affect the P-GSK3β/GSK3β ratio in both sexes (data not shown).

#### 3.4.2.2 Growth factors

Growth factors expression was modified in both sexes under atorvastatin treatment. In females, BDNF levels were increased in the F CMH-AT group compared to the F CMH group (mean ± SD: 8400 ± 751 vs. 3599 ± 528; p<0.0005) but VEGF levels were not affected (Figure 5, panel 1). In males, both BDNF (mean ± SD: 7592 ± 486 vs. 3174 ± 285; p<0.0005) and VEGF levels (mean ± SD: 1.4 ± 0.4 vs. 0.61 ± 0.12; p=0.001) were increased in the cortex of M CMH-AT group compared to the M CMH group (Figure 5, panel 2).

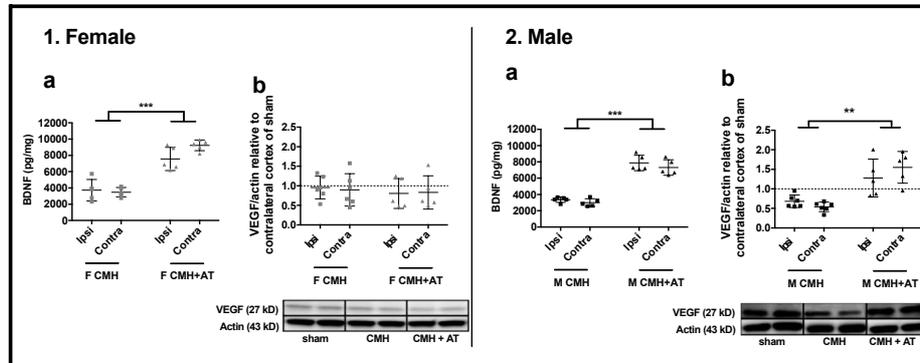


Figure 5: (1a-b) BDNF and VEGF levels in cortex of female mice. (2a-b) BDNF and VEGF levels in cortex of male mice (BDNF: n=5/group; VEGF CMH n=6/group; VEGF CMH+AT n=5/group) Data are presented as means  $\pm$ SD. \*\*:  $p < 0.005$ ; \*\*\*:  $p < 0.0005$

### 3.4.2.3 Estrogen receptors

mRNA expression of ER $\alpha$  and ER $\beta$  was modified in the female CMH+AT group only. mRNA expression of ER $\alpha$  was decreased compared to the F CMH group (mean fold change  $\pm$  SD:  $2.3 \pm 0.78$  vs.  $0.99 \pm 0.37$ ;  $p = 0.001$ ), and ER $\beta$  mRNA expression also (mean fold change  $\pm$  SD:  $1.42 \pm 0.22$  vs.  $0.78 \pm 0.23$ ;  $p = 0.0002$ )

## 3.5 AT effects on CMH-induced hippocampal modifications

### 3.5.1 Neuroinflammation

There was no difference regarding microglial cells between the groups in female and male mice but AT differently modulated the number of astrocytes and its qualitative state according to sexes. The number of astrocytes was decreased in F CMH+AT group compared with F CMH group ( $319 \pm 114$  vs.  $480 \pm 88$ ;  $p = 0.02$ ) (Figure 6, panel 1a) but the mean area occupied by each astrocyte did not differ (Figure 6, panel 1b and 1c). In contrast, in males, the number of astrocytes was not different between groups (Figure 6, panel 2a) but the mean area occupied by each astrocyte was decreased by AT ( $341 \pm 194$  vs.  $522 \pm 175$ ;  $p < 0.0005$ ) (Figure 6, panel 2b and 2c).

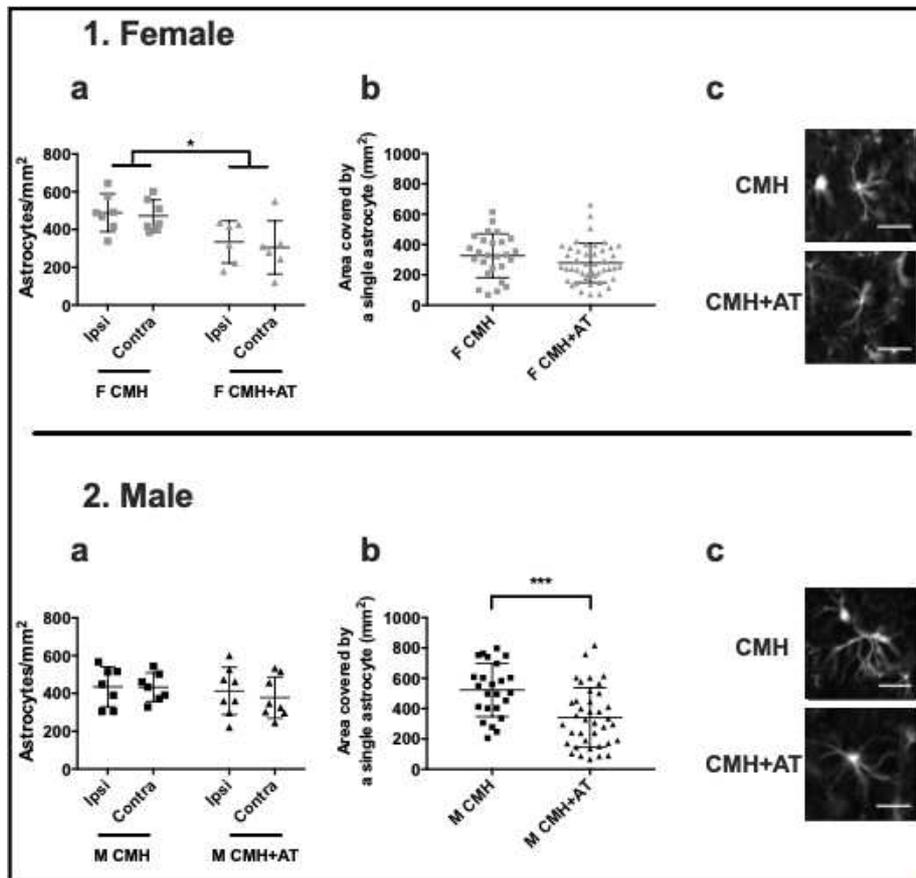


Figure 6 : (1a-2a) Astrocytes per mm<sup>2</sup> in the female and male hippocampus. (F CMH: n=7, F CMH+AT n=6, M CMH: n=7, M CMH+AT n=8) (1b-2b) Mean area covered by a single astrocyte in the female and male ipsilateral hippocampus. (1c-2c) Representative astrocytes in the ipsilateral hippocampus in female and male mice. Data are presented as means  $\pm$ SD. \*:  $p < 0.05$ ; \*\*\*:  $p < 0.0005$

### 3.5.2 Signaling pathways

In the hippocampus, neither the P-GSK3 $\beta$ /GSK3 $\beta$  ratio, VEGF and BDNF levels nor mRNA expression of estrogen receptors differed between.

## 4 Discussion

In this model, AT drove specific effects according to sex-specific CMH-induced modifications. In males: AT improved visuospatial memory; enhanced BDNF and VEGF levels in the cortex and induced a local modulation of the microglial response to the CMH; in the hippocampus, AT increased glucose metabolism and modulated the morphology of astrocytes.

In females: AT did not modulate visuospatial memory despite the increase in cortical levels of BDNF and the decrease in the number of hippocampal astrocytes. AT treatment was also associated with a decrease in the expression of cortical ER $\alpha$  and ER $\beta$ . AT did not modify the weight or the serum cholesterol levels in both sexes.

AT modulation likely relies on its pleiotropic pharmacological properties unrelated to its effects on cholesterol in both female and male mice as cholesterol levels were not modified by the treatment. In the surroundings of the lesion in the male cortex, microglial density was increased under treatment with atorvastatin. Microglia is an essential component of the glial scar implicated in the protection of the neural tissue (Bellver-Landete et al., 2019). According to the review of Xu et al., (2017), statins might also enhance the anti-inflammatory phenotype (M2) of microglial cells. The increase of BDNF and VEGF levels in the male cortex induced by AT is involved in neuronal, axonal and dendritic protection (Yang et al., 2012; Cui et al., 2018). It might help to preserve the vasculature by enhancing the survival of endothelial cells and promoting blood vessel development (Kureishi et al., 2000). Indeed, in intracerebral hemorrhage models, statins have been shown to increase angiogenesis and neurogenesis around the hematoma, thus improving the neurological outcome (Karki et al., 2009; Yang et al., 2011) and preserving a functional neurovascular unit (Kurata et al., 2012).

In the hippocampus, as shown with simvastatin (Xie et al., (2011), the number of astrocytes was decreased in females in the AT group. In males, the astrocytic surface was reduced with AT suggesting morphological modifications (Ben Haim et al., 2015). Knowing that astrocytes are implicated in glucose uptake, statins might enhance glucose uptake in the hippocampus via this morphological modulation of astrocytes (Liu et al., 2017). They might also have participated to the restoration of brain connectivity (Kanner et al., 2018). In fact, in males, the cortical deleterious effects of the CMH might disrupt or weaken the neuronal network between the cortex and the hippocampus, resulting in cognitive impairment (Barus et al., 2020). By creating and promoting a favorable cortical microenvironment AT might have protected this neuronal network and counteracted the remote effects of the CMH on the hippocampus.

As a possible consequence, we observed that treatment with AT improved VSM in males as previously described (Bergeron et al., 2018). Several hypotheses can be raised to explain its procognitive effects such as the increase in cortical levels of BDNF and VEGF (Plaschke et al., 2008; Ong et al., 2018) observed in our model. Moreover, the enhancement of glucose uptake is accompanied by cognitive improvement (Tong et al., 2012). One can hypothesize that the

procognitive effects of AT might be unrelated to the expression of ERs as the latter was not modulated by AT in males. Furthermore, in females, we observed a decrease of ER levels in the AT group. However, this was not associated with cognitive defects suggesting that the CMH-induced compensatory effects do not exclusively rely on ER modulation (Barus et al., 2020). Several previous studies showed beneficial effects of AT on spatial memory involving the hippocampus on experimental models of intracerebral hemorrhage, ischemic stroke, vascular dementia or traumatic brain injury) (Qu et al., 2005; Lu et al., 2007; Koladiya et al., 2008; Yang et al., 2012; Zaghi et al., 2016) and even under physiological conditions without any induced cerebral damage (Roy et al., 2015).

In clinical studies, the cognitive impact of statins remains controversial (Power et al., 2015; McGuinness et al., 2016; Barus et al., 2019). Overall, these cognitive effects might be diluted as these studies only take sex into account as a covariable. Indeed, to better characterize the cognitive effects of statins, a sex-stratified design would be relevant. Sex-differences are described regarding the risk and the evolution of several neurological diseases as well as sex-specific effects of drugs (Docherty et al., 2019; Honarpisheh and McCullough, 2019; Karp and Reavey, 2019; Goldstein et al., 2020). This justifies a sex-stratification to better characterize the effects.

In conclusion, atorvastatin might be a promising candidate to prevent deleterious cognitive effects induced by the CMH. This study highlights the need to investigate sex differences in the effects of statins on cognition, notably among CMH patients in the view of precision medicine (Ferretti et al., 2019).

## 5 References

- Abdullah, K.M., Zaki Eldin, H.M., Bayomy, I.M., Awadallah, M.Y., and Wahid El Din, M.M. (2020). Do cerebral microbleeds affect cognition in patients with symptomatic small vessel disease? *Egypt. J. Neurol. Psychiatry Neurosurg.* 56: 7.
- Alsehli, A.M., Olivo, G., Clemensson, L.E., Williams, M.J., and Schiöth, H.B. (2020). The Cognitive Effects of Statins are Modified by Age. *Sci. Rep.* 10: 6187.
- Barus, R., Béné, J., Deguil, J., Gautier, S., and Bordet, R. (2019). Drug interactions with dementia-related pathophysiological pathways worsen or prevent dementia. *Br. J. Pharmacol.* 176: 3413–3434.
- Barus, R., Bergeron, S., Auger, F., Laloux, C., Skrobala, E., Bongiovanni, A., et al. (2020). Sex Differences in Cognitive Impairment Induced by Cerebral Microhemorrhage. *Transl. Stroke*

Res.

Bellver-Landete, V., Bretheau, F., Mailhot, B., Vallières, N., Lessard, M., Janelle, M.-E., et al. (2019). Microglia are an essential component of the neuroprotective scar that forms after spinal cord injury. *Nat. Commun.* *10*: 1–18.

Ben Haim, L., Carrillo-de Sauvage, M.-A., Ceyzariat, K., and Escartin, C. (2015). Elusive roles for reactive astrocytes in neurodegenerative diseases. *Front. Cell. Neurosci.* *9*: 278.

Bergeron, S., Chen, Y., Auger, F., Deguil, J., Durieux, N., Skrobala, E., et al. (2018). Role of cortical microbleeds in cognitive impairment: In vivo behavioral and imaging characterization of a novel murine model. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* *39*: 1015–1025.

Bertoglio, D., Kosten, L., Verhaeghe, J., Thomae, D., Wyffels, L., Stroobants, S., et al. (2018). Longitudinal Characterization of mGluR5 Using <sup>11</sup>C-ABP688 PET Imaging in the Q175 Mouse Model of Huntington Disease. *J. Nucl. Med.* *59*: 1722–1727.

Cui, X., Fu, Z., Wang, M., Nan, X., and Zhang, B. (2018). Pitavastatin treatment induces neuroprotection through the BDNF-TrkB signalling pathway in cultured cerebral neurons after oxygen-glucose deprivation. *Neurol. Res.* *40*: 391–397.

Curtis, M.J., Alexander, S., Cirino, G., Docherty, J.R., George, C.H., Giembycz, M.A., et al. (2018). Experimental design and analysis and their reporting II: updated and simplified guidance for authors and peer reviewers: Editorial. *Br. J. Pharmacol.* *175*: 987–993.

Docherty, J.R., Stanford, S.C., Panattieri, R.A., Alexander, S.P.H., Cirino, G., George, C.H., et al. (2019). Sex: A change in our guidelines to authors to ensure that this is no longer an ignored experimental variable. *Br. J. Pharmacol.* *176*: 4081–4086.

Elmståhl, S., Ellström, K., Siennicki-Lantz, A., and Abul-Kasim, K. (2019). Association between cerebral microbleeds and hypertension in the Swedish general population “Good Aging in Skåne” study. *J. Clin. Hypertens.* *21*: 1099–1107.

Ferretti, M.T., Santuccione-Chadha, A., and Hampel, H. (2019). Account for sex in brain research for precision medicine. *Nature* *569*: 40–40.

Fracassi, A., Marangoni, M., Rosso, P., Pallottini, V., Fioramonti, M., Siteni, S., et al. (2019). Statins and the Brain: More than Lipid Lowering Agents? *Curr. Neuropharmacol.* *17*: 59–83.

Goldstein, J.M., Langer, A., and Lesser, J.A. (2020). Sex Differences in Disorders of the Brain and Heart—A Global Crisis of Multimorbidity and Novel Opportunity. *JAMA Psychiatry.*

Han, X., Yang, N., Cui, Y., Xu, Y., Dang, G., and Song, C. (2012). Simvastatin mobilizes bone marrow stromal cells migrating to injured areas and promotes functional recovery after spinal cord injury in the rat. *Neurosci. Lett.* *521*: 136–141.

- He, X., Lan, Y., Zhang, Q., Liu, D., Wang, Q., Liang, F., et al. (2016). Deferoxamine inhibits microglial activation, attenuates blood–brain barrier disruption, rescues dendritic damage, and improves spatial memory in a mouse model of microhemorrhages. *J. Neurochem.* *138*: 436–447.
- Honarpisheh, P., and McCullough, L.D. (2019). Sex as a biological variable in the pathology and pharmacology of neurodegenerative and neurovascular diseases. *Br. J. Pharmacol.* bph.14675.
- Horner, A.E., Heath, C.J., Hvoslef-Eide, M., Kent, B.A., Kim, C.H., Nilsson, S.R.O., et al. (2013). The touchscreen operant platform for testing learning and memory in rats and mice. *Nat. Protoc.* *8*: 1961–1984.
- Kanner, S., Goldin, M., Galron, R., Ben Jacob, E., Bonifazi, P., and Barzilai, A. (2018). Astrocytes restore connectivity and synchronization in dysfunctional cerebellar networks. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *115*: 8025–8030.
- Karki, K., Knight, R.A., Han, Y., Yang, D., Zhang, J., Ledbetter, K.A., et al. (2009). Simvastatin and atorvastatin improve neurological outcome after experimental intracerebral hemorrhage. *Stroke* *40*: 3384–3389.
- Karki Kishor, Knight Robert A., Han Yuxia, Yang Dongmei, Zhang Jianfeng, Ledbetter Karyn A., et al. (2009). Simvastatin and Atorvastatin Improve Neurological Outcome After Experimental Intracerebral Hemorrhage. *Stroke* *40*: 3384–3389.
- Karp, N.A., and Reavey, N. (2019). Sex bias in preclinical research and an exploration of how to change the status quo. *Br. J. Pharmacol.* *176*: 4107–4118.
- Kaviani, E., Rahmani, M., Kaeidi, A., Shamsizadeh, A., Allahtavakoli, M., Mozafari, N., et al. (2017). Protective effect of atorvastatin on d-galactose-induced aging model in mice. *Behav. Brain Res.* *334*: 55–60.
- Kim, C.H., Heath, C.J., Kent, B.A., Bussey, T.J., and Saksida, L.M. (2015). The role of the dorsal hippocampus in two versions of the touchscreen automated paired associates learning (PAL) task for mice. *Psychopharmacology (Berl.)* *232*: 3899.
- Koladiya, R.U., Jaggi, A.S., Singh, N., and Sharma, B.K. (2008). Ameliorative role of Atorvastatin and Pitavastatin in L-Methionine induced vascular dementia in rats. *BMC Pharmacol.* *8*: 14.
- Kurata, T., Kawai, H., Miyazaki, K., Kozuki, M., Morimoto, N., Ohta, Y., et al. (2012). Statins have therapeutic potential for the treatment of Alzheimer’s disease, likely via protection of the neurovascular unit in the AD brain. *J. Neurol. Sci.* *322*: 59–63.
- Kureishi, Y., Luo, Z., Shiojima, I., Bialik, A., Fulton, D., Lefer, D.J., et al. (2000). The HMG-

CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nat. Med.* 6: 1004–1010.

Leger, M., Quiedeville, A., Bouet, V., Haelewyn, B., Boulouard, M., Schumann-Bard, P., et al. (2013). Object recognition test in mice. *Nat. Protoc.* 8: 2531–2537.

Li, B., Mahmood, A., Lu, D., Wu, H., Xiong, Y., Qu, C., et al. (2009). Simvastatin attenuates microglia, astrocyte activation and decreases IL-1 $\beta$  Level following traumatic brain injury. *Neurosurgery* 65: 179–186.

Li, X., Yuan, J., Yang, L., Qin, W., Yang, S., Li, Y., et al. (2017). The significant effects of cerebral microbleeds on cognitive dysfunction: An updated meta-analysis. *PloS One* 12: e0185145.

Liu, W., Zhuo, P., Li, L., Jin, H., Lin, B., Zhang, Y., et al. (2017). Activation of brain glucose metabolism ameliorating cognitive impairment in APP/PS1 transgenic mice by electroacupuncture. *Free Radic. Biol. Med.* 112: 174–190.

Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods San Diego Calif* 25: 402–408.

Lu, D., Qu, C., Goussev, A., Jiang, H., Lu, C., Schallert, T., et al. (2007). Statins increase neurogenesis in the dentate gyrus, reduce delayed neuronal death in the hippocampal CA3 region, and improve spatial learning in rat after traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* 24: 1132–1146.

McGuinness, B., Craig, D., Bullock, R., and Passmore, P. (2016). Statins for the prevention of dementia. In *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (John Wiley & Sons, Ltd), p.

Mendoza-Oliva, A., Zepeda, A., and Arias, C. (2014). The complex actions of statins in brain and their relevance for Alzheimer’s disease treatment: an analytical review. *Curr. Alzheimer Res.* 11: 817–833.

Ong, L.K., Chow, W.Z., TeBay, C., Kluge, M., Pietrogrande, G., Zalewska, K., et al. (2018). Growth Hormone Improves Cognitive Function After Experimental Stroke. *Stroke* 49: 1257–1266.

Paradise, M., Seruga, A., Crawford, J.D., Chaganti, J., Thalamuthu, A., Kochan, N.A., et al. (2018). The relationship of cerebral microbleeds to cognition and incident dementia in non-demented older individuals. *Brain Imaging Behav.*

Peng, W., Yang, J., Yang, B., Wang, L., Xiong, X., and Liang, Q. (2014). Impact of Statins on Cognitive Deficits in Adult Male Rodents after Traumatic Brain Injury: A Systematic Review. *BioMed Res. Int.* 2014: 261409.

- Pétrault, M., Ouk, T., Pétrault, O., Bastide, M., Bordet, R., and Bérézowski, V. (2019). Safety of oral anticoagulants on experimental brain microbleeding and cognition. *Neuropharmacology* 155: 162–172.
- Plaschke, K., Staub, J., Ernst, E., and Marti, H.H. (2008). VEGF overexpression improves mice cognitive abilities after unilateral common carotid artery occlusion. *Exp. Neurol.* 214: 285–292.
- Potey, C., Ouk, T., Pétrault, O., Pétrault, M., Berezowski, V., Salleron, J., et al. (2015). Early treatment with atorvastatin exerts parenchymal and vascular protective effects in experimental cerebral ischaemia. *Br. J. Pharmacol.* 172: 5188–5198.
- Power, M.C., Weuve, J., Sharrett, A.R., Blacker, D., and Gottesman, R.F. (2015). Statins, cognition, and dementia—systematic review and methodological commentary. *Nat. Rev. Neurol.* 11: 220–229.
- Qian, Y., Zheng, K., Wang, H., You, H., Han, F., Ni, J., et al. (2020). Cerebral microbleeds and their influence on cognitive impairment in Dialysis patients. *Brain Imaging Behav.*
- Qu, C., Lu, D., Goussev, A., Schallert, T., Mahmood, A., and Chopp, M. (2005). Effect of atorvastatin on spatial memory, neuronal survival, and vascular density in female rats after traumatic brain injury. *J. Neurosurg.* 103: 695–701.
- Roy, A., Jana, M., Kundu, M., Corbett, G.T., Rangaswamy, S.B., Mishra, R.K., et al. (2015). HMG-CoA Reductase Inhibitors Bind to PPAR $\alpha$  to Upregulate Neurotrophin Expression in the Brain and Improve Memory in Mice. *Cell Metab.* 22: 253–265.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., et al. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 9: 676–682.
- Shepherd, A., Tyebji, S., Hannan, A.J., and Burrows, E.L. (2016). Translational Assays for Assessment of Cognition in Rodent Models of Alzheimer’s Disease and Dementia. *J. Mol. Neurosci.* MN 60: 371–382.
- Sudduth, T.L., Powell, D.K., Smith, C.D., Greenstein, A., and Wilcock, D.M. (2013). Induction of hyperhomocysteinemia models vascular dementia by induction of cerebral microhemorrhages and neuroinflammation. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 33: 708–715.
- Sudduth, T.L., Weekman, E.M., Price, B.R., Gooch, J.L., Woolums, A., Norris, C.M., et al. (2017). Time-course of glial changes in the hyperhomocysteinemia model of vascular cognitive impairment and dementia (VCID). *Neuroscience* 341: 42–51.
- Tong, X.-K., Lecrux, C., and Hamel, E. (2012). Age-Dependent Rescue by Simvastatin of Alzheimer’s Disease Cerebrovascular and Memory Deficits. *J. Neurosci.* 32: 4705–4715.
- Wang, Y., Chen, Q., Tan, Q., Feng, Z., He, Z., Tang, J., et al. (2018). Simvastatin accelerates hematoma resolution after intracerebral hemorrhage in a PPAR $\gamma$ -dependent manner.

Neuropharmacology 128: 244–254.

Wu, H., Lu, D., Jiang, H., Xiong, Y., Qu, C., Li, B., et al. (2008). Simvastatin-mediated upregulation of VEGF and BDNF, activation of the PI3K/Akt pathway, and increase of neurogenesis are associated with therapeutic improvement after traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* 25: 130–139.

Wu, R., Feng, C., Zhao, Y., Jin, A.-P., Fang, M., and Liu, X. (2014). A Meta-Analysis of Association between Cerebral Microbleeds and Cognitive Impairment. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* 20: 2189–2198.

Xie, C., Sun, J., Qiao, W., Lu, D., Wei, L., Na, M., et al. (2011). Administration of Simvastatin after Kainic Acid-Induced Status Epilepticus Restrains Chronic Temporal Lobe Epilepsy. *PLOS ONE* 6: e24966.

Xu, H., Wang, Z., Li, J., Wu, H., Peng, Y., Fan, L., et al. (2017). The Polarization States of Microglia in TBI: A New Paradigm for Pharmacological Intervention (Hindawi).

Yang, D., Han, Y., Zhang, J., Chopp, M., and Seyfried, D.M. (2012). Statins Enhance Expression of Growth Factors and Activate the PI3K/Akt-mediated Signaling Pathway after Experimental Intracerebral Hemorrhage. *World J. Neurosci.* 2: 74–80.

Yang, D., Knight, R.A., Han, Y., Karki, K., Zhang, J., Ding, C., et al. (2011). Vascular recovery promoted by atorvastatin and simvastatin after experimental intracerebral hemorrhage: magnetic resonance imaging and histological study. *J. Neurosurg.* 114: 1135–1142.

Zaghi, G.G.D., Godinho, J., Ferreira, E.D.F., Ribeiro, M.H.D.M., Previdelli, I.S., Oliveira, R.M.W. de, et al. (2016). Robust and enduring atorvastatin-mediated memory recovery following the 4-vessel occlusion/internal carotid artery model of chronic cerebral hypoperfusion in middle-aged rats. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 65: 179–187.

Zhang, X., Wen, J., and Zhang, Z. (2018). Statins use and risk of dementia: A dose-response meta analysis. *Medicine (Baltimore)* 97: e11304.

# **DISCUSSION**

Les principaux résultats ont été discutés dans les deux articles publiés. Néanmoins, dans une volonté d'intégration de ces résultats, nous les discuterons sous forme de points à retenir ainsi que de perspectives.

# 1. Principaux résultats

## 1.1. Les points principaux à retenir

Les effets corticaux et hippocampiques induits par la microhémorragie corticale et modulés par l'atorvastatine ont été résumés dans la Figure 85.

### Microhémorragie corticale

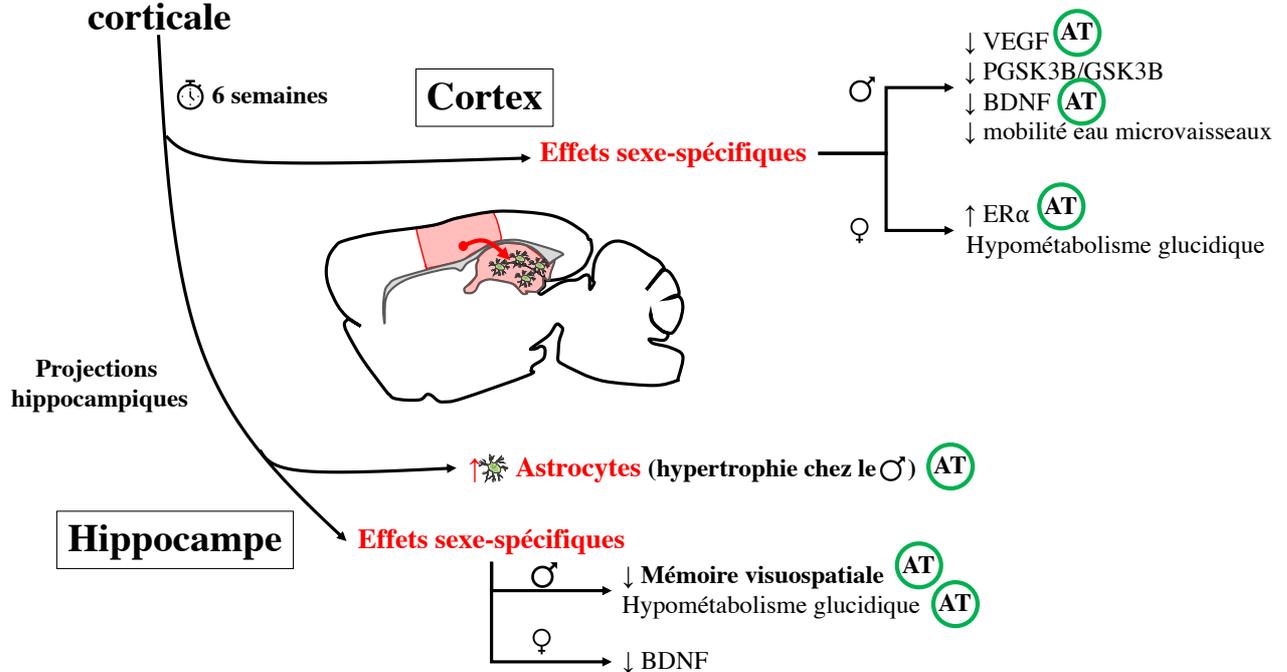


Figure 85 : Schéma récapitulatif des effets d'une microhémorragie corticale.

Dans le cercle vert, l'atorvastatine corrige les effets induits par la microhémorragie. AT: atorvastatine; BDNF : brain derived neurotrophic factor ; ER : récepteurs aux oestrogènes ; GSK3β : Glycogen Synthase Kinase-3β ; VEGF : vascular endothelial growth factor.

Six semaines après sa formation, il a été mis en évidence **qu'une microhémorragie induisait des mécanismes différents entre les mâles et les femelles au niveau cortical et hippocampique, vraisemblablement délétères chez les mâles, à l'origine d'un trouble cognitif** observé uniquement chez ces derniers (Barus et al., 2020). Au niveau cortical chez les mâles, l'expression de plusieurs protéines d'intérêts (GSK3 $\beta$ , BDNF, VEGF) et la mobilité de l'eau dans les microvaisseaux étaient altérées en condition hémorragique. Chez les femelles, un hypométabolisme autour de la zone lésée ainsi qu'une augmentation des récepteurs aux œstrogènes au niveau cortical étaient observés. Ainsi, **l'absence d'altération cognitive chez les femelles nous a amené à considérer l'hypothèse d'une implication, au moins partielle, des récepteurs aux œstrogènes dans un phénomène de neuroprotection.** Dans l'hippocampe, l'augmentation du nombre d'astrocytes chez les mâles et les femelles suggérait **un effet à distance au niveau hippocampique, siège de la mémoire, effet possiblement en lien avec une altération par la microhémorragie des réseaux neuronaux entre le cortex et l'hippocampe.** La modification de la morphologie astrocytaire associée à un hypométabolisme glucidique chez les mâles uniquement confortait cette hypothèse.

Deux points sont également intéressants à discuter. Chez les mâles, la microhémorragie a diminué le coefficient de pseudo-diffusion  $D^*$ , signe d'après Kuntz et al., (2014) d'une modification de la mobilité de l'eau dans les compartiments microvasculaires au niveau cortical. Cependant, cette diminution n'indique pas pour autant une hypoperfusion des microvaisseaux, qu'il faudrait étudier. D'après la revue de Le Bihan (2019), le débit sanguin dans les microvaisseaux pourrait être approximé par le produit  $fD^*$  (la fraction de sang circulant multiplié par le coefficient de pseudo-diffusion). Enfin, il est intéressant de relever que l'absence d'effets localisés uniquement au microenvironnement de la lésion chez les mâles semble indiquer une atteinte plus générale du cortex (à la fois du côté ipsi et controlatéral). Ceci peut s'expliquer par le fait que le cortex primaire somatosensorimoteur dans lequel a été réalisée la lésion serait connecté à son homologue du côté controlatéral, d'après les travaux de Mechling et al., (2014) réalisés en IRM fonctionnelle chez la souris.

**Les effets pléiotropes de l'atorvastatine ont permis de corriger la majorité des modifications sexe-spécifiques induites par la microhémorragie.** Dans ce travail, il n'a pas été possible de conclure à un effet sexe-spécifique de l'atorvastatine. Les statines, bien que suscitant toujours un débat dans la communauté scientifique quant à leur association avec un risque augmenté de microhémorragies (Romero et al., 2014) mais également à leurs potentiels effets procognitifs (Alsehli et al., 2020), pourraient dans ce même contexte, se présenter comme

des potentiels candidats médicaments en agissant **sur les mécanismes physiopathologiques à l'origine d'une altération de la cognition induite par la microhémorragie** chez le mâle. Enfin, l'absence de modulation de l'expression des récepteurs aux œstrogènes par l'atorvastatine chez les mâles suggère que **les effets procognitifs de l'atorvastatine ne passe pas par les récepteurs aux œstrogènes**. La diminution de l'expression des récepteurs aux œstrogènes chez les femelles, sans modification de la cognition suggère elle, que **les récepteurs aux œstrogènes ne sont pas les seuls à intervenir dans les mécanismes neuroprotecteurs mis en place chez les femelles** (Xie et al., 2019; Acaz-Fonseca et al., 2020).

### **1.2.Effet du cycle œstral sur le succès de la chirurgie**

La majorité des travaux précliniques sont réalisés chez le mâle, notamment à cause du dogme qui consiste à penser que les paramètres étudiés seront inévitablement soumis à variation chez les femelles en fonction des phases du cycle œstral. Cependant, la méta-analyse de Prendergast, Onishi, et Zucker (2014) concluait que l'utilisation de souris femelles dans la recherche en neurosciences ne nécessitait pas de surveiller le cycle œstral. Dans le domaine neurovasculaire, certains travaux comme ceux de Lei et al. (2016) réalisés sur des rats ayant une hémorragie intracérébrale par injection de collagénase n'ont pas montré d'effet du cycle œstral sur la motricité, la mémoire spatiale ou la mortalité. Les données de la littérature ainsi que l'absence d'effet du cycle œstral sur le succès de la chirurgie (lésion hémorragique induite) ont conforté le choix de ne pas le surveiller chez les femelles pour le reste de notre protocole.

Il est également intéressant de noter, que malgré l'absence d'effet du cycle œstral sur le succès de la chirurgie chez les femelles, le taux de réussite de la chirurgie sans lésion hémorragique induite pour constituer les groupes témoins était plus important chez les femelles que chez les mâles. D'autres mécanismes, indépendants de la concentration en œstrogènes pourraient donc être impliqués dans la faculté des femelles à moins saigner au moment de la chirurgie (passage de l'aiguille et injection de sérum physiologique).

### **1.3.Effets de la chirurgie**

Le choix d'un groupe témoin est toujours délicat. Dans ce modèle de microhémorragie, deux groupes témoins pouvaient être réalisés : le premier et le plus simple à mettre en place, un groupe naïf, exempt de toute procédure expérimentale ; le deuxième, un groupe sham permettant de mimer une procédure expérimentale et de séparer les effets de la chirurgie de ceux de la microhémorragie (Bate and Clark, 2014). Le choix a été fait dans ce travail de prendre pour témoin un groupe sham. Néanmoins, il faut aussi décider jusqu'où pousser la

procédure expérimentale dans le groupe sham : à l'anesthésie ; à l'incision du scalp ; à la craniectomie ; à l'introduction de l'aiguille ; à l'injection d'une substance véhicule ? Pour notre modèle, nous avons opté pour un groupe qui subissait exactement les mêmes conditions que le groupe lésé, sans l'injection de collagénase responsable de la lésion hémorragique mais avec une injection de sérum physiologique pour avoir les mêmes conséquences en termes de volume dans la structure cérébrale et d'œdème ou de phénomènes inflammatoires associés. Grâce à ce choix, nous avons pu mettre en évidence un effet de la chirurgie, chez les deux sexes, avec un œdème vasogénique à 24h chez les femelles et un recrutement de cellules neuroinflammatoires autour du site d'injection à 6 semaines chez les deux sexes. Ce dernier point avait d'ailleurs déjà été mis en évidence dans les travaux de Purushothuman et Stone (2015) dont l'objectif était d'évaluer l'effet du passage d'une aiguille (de diamètre légèrement supérieur à la nôtre) dans le cortex de rats. Ainsi, si nous avions pris un groupe témoin naïf, sans chirurgie, nous aurions attribué à tort à la microhémorragie, un œdème cytotoxique à 24h et un recrutement local de cellules neuroinflammatoires à 6 semaines. Dans notre travail et malgré les difficultés techniques rencontrées (50% de succès dans le groupe sham, les échecs présentant spontanément un saignement à l'injection), la réalisation du groupe sham dans les mêmes conditions exactement que le groupe avec lésion hémorragique a permis d'affirmer que les effets observés étaient bien induits par la microhémorragie.

#### **1.4.Effets sexe-spécifiques de la microhémorragie à 24 h**

Il a été choisi d'étudier l'effet de la microhémorragie dès 24h post-chirurgie de façon non invasive en utilisant une séquence de diffusion par IRM afin de conserver nos animaux pour le suivi à 6 semaines. Nous pensions que des réponses microvasculaires et tissulaires vraisemblablement différentes en fonction du sexe pouvaient déjà se mettre en place dès 24h post-chirurgie. La séquence de diffusion a ainsi permis de mettre en évidence ces différences entre les mâles et les femelles dès la constitution de la lésion. En effet, dès 24h, chez les mâles uniquement la microhémorragie induisait une augmentation de l'ADC dans le cortex possiblement en lien avec un œdème vasogénique et un phénomène inflammatoire comme suggéré par Tourdias et al. (2011). La cinétique de la réaction inflammatoire aiguë pourrait donc être différente en fonction du sexe. En effet, les travaux de Villapol, Loane, et Burns (2017) menés sur un modèle de traumatisme crânien réalisé au niveau du cortex sensorimoteur ont montré que 24h après l'opération, le nombre de cellules microgliales et de certaines cytokines proinflammatoires était supérieur chez les souris mâles comparé aux souris femelles. Dans notre modèle, le post-traitement de la séquence de diffusion nous a également permis

d'obtenir le coefficient de pseudo-diffusion  $D^*$ , augmenté uniquement chez les femelles autour de la microhémorragie. Selon Kuntz et al. (2014), l'augmentation de ce coefficient suggère une altération de l'intégrité de la BHE qui a été mise en évidence dans notre modèle d'un point de vue histologique par injection de FITC. D'un point de vue cinétique, la récupération fonctionnelle de la BHE suite à la formation d'une microhémorragie pourrait être différente en fonction du sexe comme l'évoque les travaux de Öztas, Çmurcu, et Kaya (1992) qui montraient dans un modèle d'épilepsie une diffusion de bleu d'Evans (indiquant une altération de la BHE) plus importante chez les rates que chez les rats.

Au total :

- La MHC a provoqué des altérations cognitives différentes en fonction du sexe, avec des effets locaux et à distance, précoces et à moyen terme, suggérant une atteinte du réseau cortico-hippocampique
- Chez les mâles, la MHC a induit des modifications, cellulaires, métaboliques et protéiques à l'origine d'une altération de la mémoire visuospatiale.
- Chez les femelles, la MHC a induit des modifications cellulaires, métaboliques, génomiques et protéiques sans retentissement cognitif. Des mécanismes neuroprotecteurs sont donc présents chez la femelle, peut-être en partie portés par les ER.
- L'atorvastatine a permis de prévenir la majorité des modifications sexe-spécifiques induites par la MHC et a en conséquence restauré la mémoire visuospatiale des mâles ayant une microhémorragie. Cet effet ne passe pas par la modulation des ER.



## **2. Perspectives : impact du sexe en recherche**

### **2.1. Recherche préclinique**

Convaincre les chercheurs de l'utilité de prendre en compte le sexe en tant que variable dans l'étude de la physiopathologie des maladies ou dans l'étude de l'efficacité d'un traitement reste encore aujourd'hui un défi, et ce malgré les recommandations émises par le National Institutes of Health (NIH, 2016). Dans la grande majorité des cas : les études ne rapportent pas le sexe des animaux, des cellules ou des tissus utilisés ; les études ne sont réalisées que chez les mâles ; si les études sont réalisées chez les 2 sexes, une analyse globale sans prise en compte du sexe est réalisée (Zakinaeiz et al., 2016). Dans le dernier cas, l'analyse peut masquer un effet qui serait dépendant du sexe ou diminuer la taille d'un effet observé (Karp and Reavey, 2019). A l'heure de la médecine de précision, il reste inconcevable que le « sexe » qui est la caractéristique la plus distinctive chez l'humain soit si peu étudié (Docherty et al., 2019). D'après Karp and Reavey, (2019), l'absence de sa prise en compte pourrait d'ailleurs être un des facteurs de l'échec de la transposition des résultats observés en préclinique. Ainsi, des revues comme le *British Journal of Pharmacology* recommandent maintenant que les travaux soumis pour publication soient réalisés chez les deux sexes, ou à défaut, que l'utilisation d'un seul sexe soit justifié (Docherty et al., 2019).

En préclinique, les chercheurs peuvent être réticents à inclure des animaux femelles dans leur protocole, notamment en raison du dogme établi qui porte à croire qu'il ne faut pas inclure des femelles puisque la variation de leur taux hormonal pourrait influencer sur les paramètres étudiés. Or, la complexité des problèmes scientifiques n'est pas une raison valable pour justifier l'absence d'étude sur un groupe en particulier. De plus, comme l'a montré la méta-analyse de Prendergast et al., (2014), il n'est pas forcément nécessaire de surveiller le cycle œstral lorsque le protocole inclut des femelles. Enfin, les variations des concentrations en œstrogènes et par extension la variation de leurs récepteurs, ne suffisent pas à résumer à eux seuls des différences observées en fonction du sexe comme le suggèrent nos résultats (notamment la modulation des récepteurs aux œstrogènes par l'atorvastatine sans effet sur la fonction cognitive chez les femelles).

Un autre argument exposé par les chercheurs est celui de la duplication des groupes et des expérimentations, résultant inévitablement en une diminution du rendement, de la productivité scientifique et en une augmentation du temps, et des moyens financiers utilisés (Zakinaeiz et al., 2016). Toujours d'après la revue de Zakinaeiz et al., (2016), certains chercheurs considéreraient même que réaliser des études sur les deux sexes serait une contrainte et une

entrave à l'innovation. Au contraire, d'après la revue de Klein et al., (2015), ce serait en réalité tout l'inverse. Par ailleurs, l'étude des différences liées au sexe dès les phases précliniques permettrait d'économiser du temps et des moyens financiers au moment des essais cliniques et ne nécessiterait pas beaucoup plus d'animaux comme le suggère l'étude de Buch et al., (2019). En effet, mettre en évidence des différences en fonction du sexe dès les phases précliniques permettrait de diminuer le coût des essais cliniques mais aussi potentiellement de diminuer le risque d'effets indésirables chez les femmes (en les identifiant *a priori*) et de ce fait le coût de leur prise en charge (sachant qu'un effet indésirable en milieu hospitalier augmente la durée d'hospitalisation et donc son coût (Bordet et al., 2001)). Deux exemples démontrent l'importance de prendre en compte le sexe dès la phase préclinique. Le plus marquant de cette dernière décennie est probablement celui du zolpidem, un hypnotique apparenté aux benzodiazépines indiqué en cas d'insomnie. En 2013, plus de vingt-ans après sa mise sur le marché, la « Food and Drug Administration » a émis une recommandation afin de diminuer la dose chez les femmes qui présentaient des concentrations élevées de zolpidem le lendemain de la prise, diminuant de ce fait leur vigilance, notamment lors de la conduite automobile (FDA, 2013). D'après la revue de Zakiniaez et al., (2016), les différences de clairance auraient pu être détectées dès la phase préclinique si les essais avaient été réalisés chez des animaux des deux sexes. Le deuxième exemple, qui a d'ailleurs marqué un tournant de la pharmacovigilance et celui du thalidomide. Ce médicament initialement indiqué dans le traitement des nausées était associé chez les femmes enceintes à de graves malformations congénitales. Toujours d'après la revue de Zakiniaez et al., (2016), le risque de tératogénèse aurait pu être détecté avant la mise sur le marché si des essais *in vitro* sur des tissus féminins avaient été réalisés.

Certains chercheurs se sont intéressés à l'impact des recommandations émises par le National Institutes of Health en 2016 (NIH, 2016) sur les articles publiés dans les journaux spécialisés dans les disciplines biomédicales. Woitowich et al., (2020) ont réalisé une comparaison sur la prise en compte du sexe dans les articles publiés en 2009 et 2019 dans des journaux de différentes disciplines (biologie générale, immunologie, neurosciences, physiologie, pharmacologie, reproduction, endocrinologie, physiologie comportementale et comportement). Toutes disciplines confondues, les auteurs ont montré une augmentation du nombre d'articles publiés qui incluaient les 2 sexes entre ces 2 périodes (29% en 2009 vs 49% en 2019). Les neurosciences par exemple étaient l'une des disciplines dont l'augmentation était la plus importante (29% en 2009 vs 63% en 2019). Cependant, seule la discipline de pharmacologie présentait une augmentation de la proportion d'analyse statistique basé sur le sexe (19% vs

48%). Les justifications des études publiées sur un seul sexe comprenaient entre autres, des effets sexe spécifiques, la possibilité d'une variabilité expérimentale accrue ou des conditions expérimentales qui limitaient l'utilisation des deux sexes. Les travaux de Woitowich et al., (2020) attestent d'une prise de conscience de la communauté scientifique quant à la nécessité de faire de la recherche en incluant les deux sexes tout en soulignant également un point majeur pour la plupart des disciplines (excepté la pharmacologie) : le manque d'analyse statistique basé sur le sexe.

L'inclusion systématique d'animaux femelles dans les protocoles de recherche préclinique mais également dans l'analyse des résultats, améliorera nos connaissances sur la spécificité des maladies et sur leurs traitements en fonction du sexe, comme en attestent nos résultats expérimentaux.

## **2.2. Recherche clinique**

En condition physiologique, il n'y a pas d'effet du sexe sur une majorité de fonctions cognitives (Hyde, 2016). Néanmoins, deux méta-analyses ont mis en évidence que les femmes présentaient une meilleure mémoire verbale que les hommes et inversement pour la mémoire visuospatiale (Hyde et al., 1988 ; Voyer et al., 2017). Or, ces fonctions cognitives sont celles qui sont altérées en présence de microhémorragies cérébrales (Ding et al., 2015; Paradise et al., 2018). En outre, les seules données disponibles sur un effet du sexe au niveau épidémiologique suggèrent une prévalence plus élevée des microhémorragies chez les hommes quel que soit l'âge (Jeerakathil et al., 2004; Ding et al., 2015; Vinke et al., 2018; Elmståhl et al., 2019). L'effet du sexe sur les fonctions cognitives impactées par les microhémorragies reste à caractériser.

Dans le contexte d'autres maladies neurovasculaires comme l'AVC, en raison d'un plus grand recul que pour les microhémorragies, des différences en fonction du sexe ont bien été identifiées. Ainsi, les facteurs de risque comme l'hypertension ou la fibrillation atriale sont prépondérants chez les femmes d'après la revue de Cordonnier et al., (2017). Le poids de ces facteurs de risque augmenterait après la ménopause avec la diminution de l'imprégnation œstrogénique. Ceci pourrait expliquer qu'avec l'âge, l'incidence des AVC (ischémiques ou hémorragiques) augmenterait chez les femmes pour dépasser celle des hommes comme le montre l'étude de Meirhaeghe et al., (2018) réalisée au centre hospitalier universitaire de Lille. Concernant les troubles cognitifs post-AVC, toujours d'après la revue de Cordonnier et al., (2017), les données disponibles à ce jour ne permettent pas de conclure formellement à un effet du sexe.

### **2.3.Modulation pharmacologique**

Longtemps négligée, l'influence du sexe dans la modulation de l'efficacité ou du risque d'un médicament est pourtant bien réelle et doit également être prise en compte. De façon historique, en recherche clinique, les femmes étaient exclues des protocoles de recherche en raison des risques potentiels pour celles en âge de procréer (Zucker and Prendergast, 2020). Deux exemples illustrent ce point. Le premier est celui d'un essai randomisé mené exclusivement sur 13000 hommes dont l'objectif était d'évaluer l'effet d'un programme sur la mortalité liée aux maladies coronariennes (Multiple Risk Factor Intervention Trial Research Group, 1982). Le deuxième est une étude de cohorte prospective, celle de Baltimore « Baltimore longitudinal study of aging », démarrée en 1958, qui est toujours en cours et dont le but est de caractériser les aspects du vieillissement (National Institute on Aging (NIA), 2020). Ce n'est qu'à partir de 1978, soit vingt ans après le début de cette étude que les femmes ont pu y participer.

Afin de pallier la faible représentation des femmes dans les essais cliniques, en 1993 la Food and Drug Administration a rendu obligatoire leur inclusion grâce à la « revitalization act » (Studies, Institute of Medicine (US) Committee on Ethical and Legal Issues Relating to the Inclusion of Women in Clinical et al., 1994). En 2005, l'agence européenne du médicament a elle aussi émis des recommandations pour augmenter l'inclusion des femmes dans les essais cliniques (European Medicines Agency, 2005). En 2017, le parlement européen a adopté le texte sur la promotion de l'égalité entre les hommes et les femmes en matière de santé mentale et de recherche clinique (European Parliament, 2017).

Au-delà d'augmenter leur représentation dans les essais cliniques, la proportion de femmes incluses devrait également être indexée sur les taux de prévalence des maladies en fonction du sexe observés dans la population. Il est en effet possible de calculer le « participation to prevalence ratio » (PPR), qui est la participation basée sur le taux de prévalence de la maladie dans une population donnée. Un PPR entre 0,8 et 1,2 indique que l'échantillon étudié est représentatif de la population réelle. En dehors de ces valeurs, l'échantillon est soit sous représenté soit surreprésenté par rapport à la population réelle. L'étude de Khan et al., (2020) a inclus 60 essais contrôlés randomisés menés sur les hypolipémiants entre 1990 et 2018. Parmi les 485000 sujets inclus sur la période totale et bien que la proportion de femmes incluses eût tendance à augmenter avec le temps, seul 28,5% étaient des femmes. Dans cette étude, le PPR mettait en évidence que les femmes étaient sous représentées dans les essais cliniques évaluant les hypolipémiants dans le diabète, le syndrome coronarien aigu et l'infarctus du myocarde.

Une autre étude de Jin et al., (2020) a montré que sur 87 essais contrôlés randomisés menés entre 2010 et 2017 sur les AVC, les femmes étaient légèrement sous représentées avec un PPR de 0,73.

Un essai clinique, bien qu'ayant prévu dans son protocole d'inclure des femmes peut également s'arrêter prématurément si le critère principal est atteint, sans prendre en compte le fait que la proportion de femmes incluses au moment de l'arrêt est insuffisante pour généraliser les résultats chez les deux sexes. C'est notamment le cas de l'essai contrôlé randomisé (SPRINT Research Group et al., 2015) qui évaluait l'effet d'un contrôle strict de la pression artérielle. D'après la revue de Roy-O'Reilly et McCullough (2018), dès l'atteinte du critère principal, l'essai a été arrêté, permettant de conclure à un effet significatif dans la population totale de l'essai mais également dans l'analyse en sous-groupe chez les hommes. Or, seulement 36% de femmes ont été incluses dans l'essai, une proportion insuffisante pour assurer une puissance nécessaire et conclure à une différence statistiquement significative.

Enfin, au-delà d'inclure un faible nombre de femmes dans les essais cliniques, la majorité des analyses statistiques ne sont pas conçues pour prendre en compte l'effet du sexe. En effet, l'article de Labots et al. (2018) s'est intéressé aux essais cliniques de 38 médicaments couramment prescrits aux Etats-Unis : seules 22% de femmes sont incluses dans les essais de phase I (évaluation de la tolérance) contre 47% de femmes dans les essais de phase II et III (recherche de dose et efficacité respectivement). De plus, dans 79% des cas, les essais cliniques ne rapportent soit pas d'analyse de sécurité, soit pas d'analyse d'efficacité en fonction du sexe. Toutefois, pour 82% des médicaments pour lesquels une analyse d'efficacité en fonction du sexe a été effectuée, aucune différence cliniquement significative n'a été constatée entre les hommes et les femmes, à l'exception du palanosétron qui était plus efficace chez les hommes (un antagoniste des récepteurs 5HT<sub>3</sub>, indiqué dans la prévention des nausées et vomissements chimioinduits). Enfin, pour 53% des médicaments pour lesquels une analyse en sous-groupe en fonction du sexe sur les données de sécurité a été effectuée, les femmes présentaient plus d'effets indésirables que les hommes. Cet article souligne donc que des différences en fonction du sexe peuvent être présentes tant sur l'efficacité que sur les effets indésirables d'un médicament et qu'elles sont insuffisamment prises en compte (Labots et al., 2018).

L'analyse de l'efficacité d'un médicament en fonction du sexe reste peu réalisée comme l'illustre également la revue systématique de Mehta et al. (2017). Les auteurs ont identifié 33 essais contrôlés randomisés réalisés sur les anticholinestérasiques dans la maladie d'Alzheimer. Parmi ces 33 essais, aucun ne mentionnait le mot « sexe » dans le titre, l'introduction, les limites

ou la conclusion. Trois essais mentionnaient le mot « sexe » dans l'abstract et 8 dans la méthode. Trente-deux essais le mentionnaient en tant que variable démographique dans les résultats. Seul un essai a réalisé une analyse statistique en fonction du sexe pour un critère secondaire. Concernant l'évaluation de l'efficacité des anticholinestérasiques en fonction du sexe dans la prise en charge de la démence, la revue de Honarpisheh and McCullough (2019) montre que les résultats des essais cliniques sont contradictoires. Deux essais contrôlés randomisés n'ont pas montré de différences d'efficacité du donépézil sur la cognition entre les hommes et les femmes. Au contraire un essai clinique comparatif suggère que le donépézil et la rivastigmine seraient plus efficaces chez les femmes que chez les hommes pour ralentir le déclin cognitif (Scacchi et al., 2014). La revue de Honarpisheh and McCullough (2019) souligne également l'absence d'études cliniques prenant en compte l'effet du sexe dans l'évaluation des antagonistes des récepteurs NMDA malgré des résultats précliniques suggérant des différences d'ordre pharmacodynamiques et pharmacocinétiques de ces médicaments en fonction du sexe. D'autres médicaments psychodysléptiques comme les antidépresseurs pourraient être soumis à des différences d'efficacité en fonction du sexe. Bien qu'il n'y ait pas de réel consensus, la revue de LeGates et al., (2019) suggère que les antidépresseurs tricycliques seraient plus efficaces chez les hommes et les inhibiteurs de la recapture de la sérotonine seraient plus efficaces chez les femmes. Concernant les antipsychotiques, peu de données sont disponibles mais d'après la revue de Usall et al., (2007) les femmes répondraient mieux à certains antipsychotiques que les hommes, notamment à l'olanzapine. Néanmoins, d'après l'étude de Nielsen et al., (2012), la réponse à la clozapine, pourrait être plus importante chez les hommes que chez les femmes.

Concernant le risque d'effets indésirables, celui-ci pourrait être plus important chez les femmes que chez les hommes, notamment lié à des différences d'ordres pharmacocinétiques. En effet, en comparaison aux hommes, les femmes présentent en moyenne un poids, un volume de distribution, une activité enzymatique, une motilité gastro-intestinale ainsi qu'un taux de filtration glomérulaire plus faibles (Whitley and Lindsey, 2009). Ainsi la modification de ces paramètres augmente inévitablement les concentrations plasmatiques et les demi-vies d'élimination des médicaments comme le montre la revue de Zucker et Prendergast (2020). Ces auteurs ont mis en évidence que les concentrations plasmatiques et les demi-vies d'élimination étaient plus importantes pour les femmes pour la plupart des médicaments mis sur le marché, les exposants par conséquent à un risque plus élevé d'effets indésirables. De ce fait, dans 96% des médicaments pour lesquels les femmes présentaient des paramètres pharmacocinétiques

plus importantes que les hommes, elles avaient aussi plus d'effets indésirables que les hommes. Ceci était notamment le cas pour la majorité des psycholeptiques et psychoanaleptiques étudiés. La revue de Karp and Reavey, (2019) illustre d'ailleurs que sur dix médicaments retirés du marché aux États-Unis entre 1997 et 2000, huit présentaient des risques plus importants chez les femmes que chez les hommes.

Au final, la prise en compte du sexe s'avère essentielle en pharmacologie pour identifier des différences en termes d'efficacité ou d'effets indésirables de certains médicaments. En terme d'efficacité, pour les statines et indépendamment du sexe, leurs effets procognitifs sont toujours débattus et aucun essai contrôlé randomisé n'a pu reproduire les résultats observés dans des études observationnelles (Barus et al., 2019). Dans ce travail préclinique nous avons mis en évidence un effet procognitif de l'atorvastatine uniquement chez les mâles dont la mémoire visuospatiale était altérée de façon sexe-spécifique. Ce résultat peut suggérer soit que l'effet bénéfique de l'atorvastatine ne s'exerce qu'en cas d'altération des fonctions cognitives soit qu'il ne s'exerce que chez les mâles. Ainsi, si l'on transpose ces observations en clinique, l'effet procognitif des statines dans les essais cliniques a pu être masqué lors des analyses ne prenant pas en compte le sexe, notamment chez les sujets ayant des troubles cognitifs dont l'évolution pourrait être différente en fonction du sexe. Réaliser des études cliniques sur l'effet procognitif des statines en fonction du sexe permettrait de répondre à cette hypothèse.

### 3. Conclusion

Les altérations cognitives et les mécanismes mis en place suite à la formation d'une microhémorragie corticale ont été caractérisés à l'aide d'une approche multimodale incluant des techniques d'imagerie *in vivo*, d'imagerie cellulaire, de biochimie ainsi que de biologie moléculaire. Les résultats obtenus suggèrent qu'une microhémorragie corticale peut induire des altérations cognitives différentes en fonction du sexe avec des effets au niveau cortical et au niveau hippocampique dont la majorité semble être contrebalancés par l'atorvastatine.

Au niveau mécanistique, de nombreuses pistes restent à explorer dans ce modèle notamment (i) évaluer l'effet d'une microhémorragie chez des souris femelles ovariectomisées ou ayant un traitement par tamoxifène afin de déterminer le rôle exact des œstrogènes dans les altérations cognitives induite par les MHC ; (ii) évaluer l'effet des androgènes et de leurs récepteurs ; l'effet du sexe n'a été abordé ici que par le prisme des œstrogènes et le rôle des androgènes reste à caractériser sachant qu'ils exercent suivant certaines conditions, des effets soit bénéfiques soit délétères (Boese et al., 2017) (iii) évaluer l'implication du fer relargué par l'hémoglobine suite à la formation de la microhémorragie. Le fer, issu de la dégradation de l'hémoglobine, pourrait être impliqué dans des processus neurodégénératifs et participer aux effets délétères de la microhémorragie (Masaldan et al., 2019). Cette dernière piste fait l'objet d'une candidature à un appel à projet « Joint Program Neurodegenerative Disease Research » dans lequel le rôle du fer dans ce modèle de microhémorragie sera étudié ainsi que sa modulation pharmacologique par un chélateur du fer type déféroxamine.

Au niveau clinique, ce travail s'inscrit dans une démarche d'étude transversale. Les résultats observés au niveau expérimental vont faire l'objet d'une étude clinique en collaboration avec d'autres laboratoires de recherche. A partir des données individuelles des patients provenant de plusieurs études de cohortes (dont la cohorte STROKDEM « Study of Factors Influencing Post-stroke Dementia » du laboratoire), une analyse groupée va être réalisée, afin de déterminer l'influence du sexe sur différentes fonctions cognitives et différents dosages protéiques chez les sujets (hommes et femmes) présentant des microhémorragies.

Au total, cette étude a montré, à partir d'un travail précis portant sur l'impact cognitif d'une microhémorragie, que la prise en compte du sexe dans un protocole préclinique s'avère indispensable, à l'heure de la médecine de précision, pour mieux élucider les mécanismes physiopathologiques de la maladie modélisée dans le but de développer des traitements les plus adaptés possibles.

# REFERENCES

Abdullah, K.M., Zakieldin, H.M., Bayomy, I.M., Awadallah, M.Y., and Wahid El Din, M.M. (2020). Do cerebral microbleeds affect cognition in patients with symptomatic small vessel disease? *Egypt. J. Neurol. Psychiatry Neurosurg.* 56: 7.

Acaz-Fonseca, E., Castelló-Ruiz, M., Burguete, M.C., Aliena-Valero, A., Salom, J.B., Torregrosa, G., et al. (2020). Insight into the molecular sex dimorphism of ischaemic stroke in rat cerebral cortex: Focus on neuroglobin, sex steroids and autophagy. *Eur. J. Neurosci.* 52: 2756–2770.

Acaz-Fonseca, E., Duran, J.C., Carrero, P., Garcia-Segura, L.M., and Arevalo, M.A. (2015). Sex differences in glia reactivity after cortical brain injury: Sex Differences in Reactive Gliosis. *Glia* 63: 1966–1981.

Acaz-Fonseca, E., Sanchez-Gonzalez, R., Azcoitia, I., Arevalo, M.A., and Garcia-Segura, L.M. (2014). Role of astrocytes in the neuroprotective actions of 17 $\beta$ -estradiol and selective estrogen receptor modulators. *Mol. Cell. Endocrinol.* 389: 48–57.

Acconcia, F., Ascenzi, P., Bocedi, A., Spisni, E., Tomasi, V., Trentalancia, A., et al. (2004). Palmitoylation-dependent Estrogen Receptor  $\alpha$  Membrane Localization: Regulation by 17 $\beta$ -Estradiol. *Mol. Biol. Cell* 16: 231–237.

Ahn, S.J., Anrather, J., Nishimura, N., and Schaffer, C.B. (2018). Diverse Inflammatory Response After Cerebral Microbleeds Includes Coordinated Microglial Migration and Proliferation. *Stroke* 49: 1719–1726.

Akoudad, S., Gurol, M.E., Fotiadis, P., Koudstaal, P.J., Hofman, A., Ikram, M.A., et al. (2016a). Cerebral Microbleeds and Cerebrovascular Reactivity in the General Population: The EDAN Study. *J. Alzheimers Dis. JAD* 53: 497–503.

Akoudad, S., Wolters, F.J., Viswanathan, A., Bruijn, R.F. de, Lugt, A. van der, Hofman, A., et al. (2016b). Association of Cerebral Microbleeds With Cognitive Decline and Dementia. *JAMA Neurol.* 73: 934–943.

Alsehli, A.M., Olivo, G., Clemensson, L.E., Williams, M.J., and Schiöth, H.B. (2020). The Cognitive Effects of Statins are Modified by Age. *Sci. Rep.* 10: 6187.

Arevalo, M.-A., Azcoitia, I., and Garcia-Segura, L.M. (2015). The neuroprotective actions of oestradiol and oestrogen receptors. *Nat. Rev. Neurosci.* 16: 17–29.

Bakeman, R. (2005). Recommended effect size statistics for repeated measures designs. *Behav. Res. Methods* 37: 379–384.

Barus, R., Béné, J., Deguil, J., Gautier, S., and Bordet, R. (2019). Drug interactions with dementia-related pathophysiological pathways worsen or prevent dementia. *Br. J. Pharmacol.* 176: 3413–3434.

Barus, R., Bergeron, S., Auger, F., Laloux, C., Skrobala, E., Bongiovanni, A., et al. (2020). Sex Differences in Cognitive Impairment Induced by Cerebral Microhemorrhage. *Transl. Stroke Res.*

Bate, S.T., and Clark, R.A. (2014). *The Design and Statistical Analysis of Animal Experiments* (Cambridge University Press).

Ben Haim, L., Carrillo-de Sauvage, M.-A., Ceyzãriat, K., and Escartin, C. (2015). Elusive roles for reactive astrocytes in neurodegenerative diseases. *Front. Cell. Neurosci.* 9: 278.

Bergeron, S. (2018). *Microhémorragies cérébrales et cognition : impact fonctionnel à court, moyen et long termes dans un modèle murin. thesis.* Lille 2.

Bergeron, S., Chen, Y., Auger, F., Deguil, J., Durieux, N., Skrobala, E., et al. (2018). Role of cortical microbleeds in cognitive impairment: In vivo behavioral and imaging characterization of a novel murine model. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 39: 1015–1025.

Bertoglio, D., Kosten, L., Verhaeghe, J., Thomae, D., Wyffels, L., Stroobants, S., et al. (2018). Longitudinal Characterization of mGluR5 Using <sup>11</sup>C-ABP688 PET Imaging in the Q175 Mouse Model of Huntington Disease. *J. Nucl. Med.* 59: 1722–1727.

Blurton-Jones, M., and Tuszynski, M.H. (2001). Reactive astrocytes express estrogen receptors in the injured primate brain. *J. Comp. Neurol.* 433: 115–123.

Boese, A.C., Kim, S.C., Yin, K.-J., Lee, J.-P., and Hamblin, M.H. (2017). Sex differences in vascular physiology and pathophysiology: estrogen and androgen signaling in health and disease. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* 313: H524–H545.

Bordet, R., Gautier, S., Le Louet, H., Dupuis, B., and Caron, J. (2001). Analysis of the direct cost of adverse drug reactions in hospitalised patients. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 56: 935–941.

Bos, D., Wolters, F.J., Darweesh, S.K.L., Vernooij, M.W., Wolf, F. de, Ikram, M.A., et al. (2018). Cerebral small vessel disease and the risk of dementia: A systematic review and meta-analysis of population-based evidence. *Alzheimers Dement. J. Alzheimers Assoc.* 11: 1482–1492.

Bouvy, W.H., Veluw, S.J. van, Kuijff, H.J., Zwanenburg, J.J., Kappelle, J.L., Luijten, P.R., et al. (2020). Microbleeds colocalize with enlarged juxtacortical perivascular spaces in amnesic mild cognitive impairment and early Alzheimer’s disease: A 7 Tesla MRI study. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 40: 739–746.

Brundel, M., Reijmer, Y.D., Veluw, S.J. van, Kuijff, H.J., Luijten, P.R., Kappelle, L.J., et al. (2014). Cerebral Microvascular Lesions on High-Resolution 7-Tesla MRI in Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes* 63: 3523–3529.

Bryant, D.N., and Dorsa, D.M. (2010). Roles of Estrogen Receptors Alpha and Beta in sexually dimorphic neuroprotection against glutamate toxicity. *Neuroscience* 170: 1261–1269.

Buch, T., Moos, K., Ferreira, F.M., Fröhlich, H., Gebhard, C., and Tresch, A. (2019). Benefits of a factorial design focusing on inclusion of female and male animals in one experiment. *J. Mol. Med.* 97: 871–877.

Cacciottolo, M., Christensen, A., Moser, A., Liu, J., Pike, C.J., Smith, C., et al. (2016). The APOE4 allele shows opposite sex bias in microbleeds and Alzheimer’s disease of humans and mice. *Neurobiol. Aging* 37: 47–57.

Caligioni, C. (2009). *Assessing Reproductive Status/Stages in Mice.* *Curr. Protoc. Neurosci.* Editor. Board Jacqueline N Crawley *AI APPENDIX: Appendix-4I.*

Carbonaro, V., Caraci, F., Giuffrida, M.L., Merlo, S., Canonico, P.L., Drago, F., et al. (2009). Enhanced expression of ER $\alpha$  in astrocytes modifies the response of cortical neurons to  $\beta$ -amyloid toxicity. *Neurobiol. Dis.* 33: 415–421.

Carrasquilla, G.D., Frumento, P., Berglund, A., Borgfeldt, C., Bottai, M., Chiavenna, C., et al. (2017). Postmenopausal hormone therapy and risk of stroke: A pooled analysis of data from population-based cohort studies. *PLOS Med.* 14: e1002445.

Cauca, M.R., Del Brutto, V., Gardener, H., Shah, N., Dequatre-Ponchelle, N., Cheung, Y.K., et al. (2016). Cerebral Microbleeds, Vascular Risk Factors, and Magnetic Resonance Imaging Markers: The Northern Manhattan Study. *J. Am. Heart Assoc. Cardiovasc. Cerebrovasc. Dis.* 5: e003477.

Chan, S., Brophy, M., Nishimura, N., and Schaffer, C.B. (2019). Aspirin treatment does not increase microhemorrhage size in young or aged mice. *PLoS One* 14: e0204295.

Chang, R., Castillo, J., Zambon, A.C., Krasieva, T.B., Fisher, M.J., and Sumbria, R.K. (2018). Brain Endothelial Erythrophagocytosis and Hemoglobin Transmigration Across Brain Endothelium: Implications for Pathogenesis of Cerebral Microbleeds. *Front. Cell. Neurosci.* 12: 279.

Charidimou, A., Imaizumi, T., Moulin, S., Biffi, A., Samarasekera, N., Yakushiji, Y., et al. (2017). Brain hemorrhage recurrence, small vessel disease type, and cerebral microbleeds: A meta-analysis. *Neurology* 89: 820–829.

Charidimou, A., Shams, S., Romero, J.R., Ding, J., Veltkamp, R., Horstmann, S., et al. (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). *Int. J. Stroke Off. J. Int. Stroke Soc.* 13: 454–468.

Chen, Q., Zhang, J., Feng, H., and Chen, Z. (2019). An update on statins: Pleiotropic effect performed in intracerebral hemorrhage. *Atherosclerosis* 284: 264–265.

Chen, T., Wang, C., Sha, S., Zhou, L., Chen, L., and Chen, L. (2016). Simvastatin Enhances Spatial Memory and Long-Term Potentiation in Hippocampal CA1 via Upregulation of  $\alpha 7$  Nicotinic Acetylcholine Receptor. *Mol. Neurobiol.* 53: 4060–4072.

Chen, T.-Y., Tsai, K.-L., Lee, T.-Y., Chiueh, C.C., Lee, W.-S., and Hsu, C. (2010). Sex-specific role of thioredoxin in neuroprotection against iron-induced brain injury conferred by estradiol. *Stroke* 41: 160–165.

Chen, Y. (2018). Maladie d'Alzheimer : influence des microhémorragies, du sexe et de la modulation pharmacologique : données cliniques et expérimentales. thesis. Lille 2.

Chen, Y.-K., Xiao, W.-M., Li, W., Ni, Z.-X., Liu, Y.-L., Xu, L., et al. (2018). Microbleeds in fronto-subcortical circuits are predictive of dementia conversion in patients with vascular cognitive impairment but no dementia. *Neural Regen. Res.* 13: 1913–1918.

Chowdhury, M.H., Nagai, A., Bokura, H., Nakamura, E., Kobayashi, S., and Yamaguchi, S. (2011). Age-related changes in white matter lesions, hippocampal atrophy, and cerebral microbleeds in healthy subjects without major cerebrovascular risk factors. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis. Off. J. Natl. Stroke Assoc.* 20: 302–309.

Chu, L.-W., Chen, J.-Y., Wu, P.-C., and Wu, B.-N. (2015). Atorvastatin Prevents Neuroinflammation in Chronic Constriction Injury Rats through Nuclear NF $\kappa$ B Downregulation in the Dorsal Root Ganglion and Spinal Cord. *ACS Chem. Neurosci.* 6: 889–898.

Cianchetti, F.A., Kim, D.H., Dimiduk, S., Nishimura, N., and Schaffer, C.B. (2013). Stimulus-Evoked Calcium Transients in Somatosensory Cortex Are Temporarily Inhibited by a Nearby Microhemorrhage. *PLoS ONE* 8: e65663.

Conijn, M.M.A., Hoogduin, J.M., Graaf, Y. van der, Hendrikse, J., Luijten, P.R., and Geerlings, M.I. (2012). Microbleeds, lacunar infarcts, white matter lesions and cerebrovascular reactivity -- a 7 T study. *NeuroImage* 59: 950–956.

Cora, M.C., Kooistra, L., and Travlos, G. (2015). Vaginal Cytology of the Laboratory Rat and Mouse: Review and Criteria for the Staging of the Estrous Cycle Using Stained Vaginal Smears. *Toxicol. Pathol.* 43: 776–793.

Cordonnier, C., Al-Shahi Salman, R., and Wardlaw, J. (2007). Spontaneous brain microbleeds: systematic review, subgroup analyses and standards for study design and reporting. *Brain J. Neurol.* 130: 1988–2003.

Cordonnier, C., Sprigg, N., Sandset, E.C., Pavlovic, A., Sunnerhagen, K.S., Caso, V., et al. (2017). Stroke in women — from evidence to inequalities. *Nat. Rev. Neurol.* 13: 521–532.

Corraini, P., Henderson, V.W., Ording, A.G., Pedersen, L., Horváth-Puhó, E., and Toft Sørensen, H. (2017). Long-Term Risk of Dementia Among Survivors of Ischemic or Hemorrhagic Stroke. *Stroke* 48: 180–186.

Cui, J.-J., Wang, D., Gao, F., and Li, Y.-R. (2012). Effects of atorvastatin on pathological changes in brain tissue and plasma MMP-9 in rats with intracerebral hemorrhage. *Cell Biochem. Biophys.* 62: 87–90.

Davis, J., Xu, F., Hatfield, J., Lee, H., Hoos, M.D., Popescu, D., et al. (2018). A Novel Transgenic Rat Model of Robust Cerebral Microvascular Amyloid with Prominent Vasculopathy. *Am. J. Pathol.* 188: 2877–2889.

de Montgolfier Olivia, Pinçon Anthony, Pouliot Philippe, Gillis Marc-Antoine, Bishop Jonathan, Sled John G., et al. (2019). High Systolic Blood Pressure Induces Cerebral Microvascular Endothelial Dysfunction, Neurovascular Unit Damage, and Cognitive Decline in Mice. *Hypertension* 73: 217–228.

Debette, S., Schilling, S., Duperron, M.-G., Larsson, S.C., and Markus, H.S. (2018). Clinical Significance of Magnetic Resonance Imaging Markers of Vascular Brain Injury: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Neurol.* 76: 81–94.

Di Mauro, M., Tozzi, A., Calabresi, P., Pettorossi, V.E., and Grassi, S. (2017). Different synaptic stimulation patterns influence the local androgenic and estrogenic neurosteroid availability triggering hippocampal synaptic plasticity in the male rat. *Eur. J. Neurosci.* 45: 499–509.

Ding, J., Sigurdsson, S., Garcia, M., Phillips, C.L., Eiriksdottir, G., Gudnason, V., et al. (2015). Risk Factors Associated With Incident Cerebral Microbleeds According to Location in Older People: The Age, Gene/Environment Susceptibility (AGES)-Reykjavik Study. *JAMA Neurol.* 72: 682–688.

Ding, J., Sigurdsson, S., Jónsson, P.V., Eiriksdottir, G., Meirelles, O., Kjartansson, O., et al. (2017). Space and location of cerebral microbleeds, cognitive decline, and dementia in the community. *Neurology* 88: 2089–2097.

Docherty, J.R., Stanford, S.C., Panattieri, R.A., Alexander, S.P.H., Cirino, G., George, C.H., et al. (2019). Sex: A change in our guidelines to authors to ensure that this is no longer an ignored experimental variable. *Br. J. Pharmacol.* 176: 4081–4086.

Dotson, A.L., Wang, J., Chen, Y., Manning, D., Nguyen, H., Saugstad, J.A., et al. (2016). Sex differences and the role of PPAR alpha in experimental stroke. *Metab. Brain Dis.* 31: 539–547.

Dubal, D.B., Rau, S.W., Shughrue, P.J., Zhu, H., Yu, J., Cashion, A.B., et al. (2006). Differential modulation of estrogen receptors (ERs) in ischemic brain injury: a role for ERalpha in estradiol-mediated protection against delayed cell death. *Endocrinology* 147: 3076–3084.

Dubal, D.B., Zhu, H., Yu, J., Rau, S.W., Shughrue, P.J., Merchenthaler, I., et al. (2001). Estrogen receptor  $\alpha$ , not  $\beta$ , is a

critical link in estradiol-mediated protection against brain injury. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98: 1952–1957.

Elkhatib, T.H.M., Elsaïd, A.F., Al-Molla, R.M., Khamis, M.E.M., and Fahmi, R.M. (2020). Prevalence and Associated Risk Factors of Cerebral Microbleeds in Egyptian Patients with Acute Ischemic Stroke and Atrial Fibrillation. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis. Off. J. Natl. Stroke Assoc.* 29: 104703.

Elmståhl, S., Ellström, K., Siennicki-Lantz, A., and Abul-Kasim, K. (2019). Association between cerebral microbleeds and hypertension in the Swedish general population “Good Aging in Skåne” study. *J. Clin. Hypertens.* 21: 1099–1107.

Espeland, M.A., Shumaker, S.A., Leng, I., Manson, J.E., Brown, C.M., LeBlanc, E.S., et al. (2013). Long-term effects on cognitive function of postmenopausal hormone therapy prescribed to women aged 50 to 55 years. *JAMA Intern. Med.* 173: 1429–1436.

European Medicines Agency (2005). ICH Gender considerations in the conduct of clinical trials-European Medicine Agency. 9.

European Parliament (2017). Promoting gender equality in mental health and clinical research - Tuesday, 14 February 2017.

Ewen, T., Qiuting, L., Chaogang, T., Tao, T., Jun, W., Liming, T., et al. (2013). Neuroprotective effect of atorvastatin involves suppression of TNF- $\alpha$  and upregulation of IL-10 in a rat model of intracerebral hemorrhage. *Cell Biochem. Biophys.* 66: 337–346.

Faubion, S.S., Kapoor, E., Moyer, A.M., Hodis, H.N., and Miller, V.M. (2019). Statin therapy: does sex matter? *Menopause* 26: 1425–1435.

FDA (2013). Risk of next-morning impairment after use of insomnia drugs; FDA requires lower recommended doses for certain drugs containing zolpidem (Ambien, AmbienCR, Edluar, and Zolpimist).

Finney, C.A., Shvetsov, A., Westbrook, R.F., Jones, N.M., and Morris, M.J. (2020). The role of hippocampal estradiol in synaptic plasticity and memory: A systematic review. *Front. Neuroendocrinol.* 56: 100818.

Fisher, M., Vasilevko, V., Passos, G.F., Ventura, C., Quiring, D., and Cribbs, D.H. (2011). Therapeutic Modulation of Cerebral Microhemorrhage in a Mouse Model of Cerebral Amyloid Angiopathy. *Stroke J. Cereb. Circ.* 42: 3300–3303.

Fracassi, A., Marangoni, M., Rosso, P., Pallottini, V., Fioramonti, M., Siteni, S., et al. (2019). Statins and the Brain: More than Lipid Lowering Agents? *Curr. Neuropharmacol.* 17: 59–83.

Gannon, O.J., Robison, L.S., Custozzo, A.J., and Zuloaga, K.L. (2018). Sex differences in risk factors for vascular contributions to cognitive impairment & dementia. *Neurochem. Int.* 127: 38–55.

Gleason, C.E., Dowling, N.M., Wharton, W., Manson, J.E., Miller, V.M., Atwood, C.S., et al. (2015). Effects of Hormone Therapy on Cognition and Mood in Recently Postmenopausal Women: Findings from the Randomized, Controlled KEEPS-Cognitive and Affective Study. *PLoS Med.* 12: e1001833; discussion e1001833.

Goetz, P., Blamire, A., Rajagopalan, B., Cadoux-Hudson, T., Young, D., and Styles, P. (2004). Increase in Apparent Diffusion Coefficient in Normal Appearing White Matter following Human Traumatic Brain Injury Correlates with Injury Severity. *J. Neurotrauma* 21: 645–654.

Gorenstein, C., Rennó, J., Vieira Filho, A.H.G., Gianfaldoni, A., Gonçalves, M.A., Halbe, H.W., et al. (2011). Estrogen replacement therapy and cognitive functions in healthy postmenopausal women: a randomized trial. *Arch. Womens Ment. Health* 14: 367–373.

Graff-Radford, J., Botha, H., Rabinstein, A.A., Gunter, J.L., Przybelski, S.A., Lesnick, T., et al. (2018). Cerebral microbleeds: Prevalence and relationship to amyloid burden. *Neurology* 92: e253–e262.

Greenberg, S.M., Vernooij, M.W., Cordonnier, C., Viswanathan, A., Al-Shahi Salman, R., Warach, S., et al. (2009). Cerebral microbleeds: a guide to detection and interpretation. *Lancet Neurol.* 8: 165–174.

Gregg, N.M., Kim, A.E., Guro, M.E., Lopez, O.L., Aizenstein, H.J., Price, J.C., et al. (2015). Incidental Cerebral Microbleeds and Cerebral Blood Flow in Elderly Individuals. *JAMA Neurol.* 72: 1021–1028.

Grosche, A., Grosche, J., Tackenberg, M., Scheller, D., Gerstner, G., Gumprecht, A., et al. (2013). Versatile and Simple Approach to Determine Astrocyte Territories in Mouse Neocortex and Hippocampus. *PLoS ONE* 8: e69143.

Hamel, E., Royea, J., Ongali, B., and Tong, X.-K. (2016). Neurovascular and Cognitive failure in Alzheimer’s Disease: Benefits of Cardiovascular Therapy. *Cell. Mol. Neurobiol.* 36: 219–232.

Han, B.H., Zhou, M., Johnson, A.W., Singh, I., Liao, F., Vellimana, A.K., et al. (2015). Contribution of reactive oxygen species to cerebral amyloid angiopathy, vasomotor dysfunction, and microhemorrhage in aged Tg2576 mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112: e881–e890.

Hashimoto, T., Yokota, C., Koshino, K., Shimomura, R., Hino, T., Moriguchi, T., et al. (2016). Cerebral blood flow and metabolism associated with cerebral microbleeds in small vessel disease. *Ann. Nucl. Med.* 30: 494–500.

Haussen Diogo C., Henninger Nils, Kumar Sandeep, and Selim Magdy (2012). Statin Use and Microbleeds in Patients With Spontaneous Intracerebral Hemorrhage. *Stroke* 43: 2677–2681.

He, X., Lan, Y., Zhang, Q., Liu, D., Wang, Q., Liang, F., et al. (2016). Deferoxamine inhibits microglial activation, attenuates blood–brain barrier disruption, rescues dendritic damage, and improves spatial memory in a mouse model of microhemorrhages. *J. Neurochem.* 138: 436–447.

Heringa, S.M., Reijmer, Y.D., Leemans, A., Koek, H.L., Kappelle, L.J., Biessels, G.J., et al. (2014). Multiple microbleeds are related to cerebral network disruptions in patients with early Alzheimer’s disease. *J. Alzheimers Dis. JAD* 38: 211–221.

Hoffmann, A., Kunze, R., Helluy, X., Milford, D., Heiland, S., Bendszus, M., et al. (2016). High-Field MRI Reveals a Drastic Increase of Hypoxia-Induced Microhemorrhages upon Tissue Reoxygenation in the Mouse Brain with Strong Predominance in the Olfactory Bulb. *PLOS ONE* 11: e0148441.

Holmberg, E., Zhang, S., Sarmiere, P.D., Kluge, B.R., White, J.T., and Doolen, S. (2008). Statins decrease chondroitin sulfate proteoglycan expression and acute astrocyte activation in central nervous system injury. *Exp. Neurol.* 214: 78–86.

Honaripisheh, P., and McCullough, L.D. (2019). Sex as a biological variable in the pathology and pharmacology of neurodegenerative and neurovascular diseases. *Br. J. Pharmacol.* bph.14675.

Hur, J., Mateo, V., Amalric, N., Babiak, M., Béréziat, G., Kanony-Truc, C., et al. (2018). Cerebrovascular  $\beta$ -amyloid deposition and associated microhemorrhages in a Tg2576 Alzheimer mouse model are reduced with a DHA-enriched diet.

FASEB J. 32: 4972–4983.

Hyde, J.S. (2016). Sex and cognition: gender and cognitive functions. *Curr. Opin. Neurobiol.* 38: 53–56.

Hyde, J.S., and Linn, P.C. (1988). Gender Differences in Verbal Ability: A Meta-Analysis. *Psychol. Bull.* 104: 53–69.

Jeerakathil, T., Wolf, P.A., Beiser, A., Hald, J.K., Au, R., Kase, C.S., et al. (2004). Cerebral microbleeds: prevalence and associations with cardiovascular risk factors in the Framingham Study. *Stroke* 35: 1831–1835.

Jesmin, S., Mowa, C.N., Sultana, S.N., Mia, S., Islam, R., Zaedi, S., et al. (2010). Estrogen receptor alpha and beta are both involved in the cerebral VEGF/Akt/NO pathway and cerebral angiogenesis in female mice. *Biomed. Res. Tokyo Jpn.* 31: 337–346.

Jiao, S.-S., Bu, X.-L., Liu, Y.-H., Zhu, C., Wang, Q.-H., Shen, L.-L., et al. (2016). Sex Dimorphism Profile of Alzheimer’s Disease-Type Pathologies in an APP/PS1 Mouse Model. *Neurotox. Res.* 29: 256–266.

Jin, X., Chandramouli, C., Allocco, B., Gong, E., Lam, C.S.P., and Yan, L.L. (2020). Women’s Participation in Cardiovascular Clinical Trials From 2010 to 2017. *Circulation* 141: 540–548.

Kanai, N., Lu, R., Bao, Y., Wolkoff, A.W., Vore, M., and Schuster, V.L. (1996). Estradiol 17 beta-D-glucuronide is a high-affinity substrate for oatp organic anion transporter. *Am. J. Physiol.-Ren. Physiol.* 270: F326–F331.

Karki, K., Knight, R.A., Han, Y., Yang, D., Zhang, J., Ledbetter, K.A., et al. (2009). Simvastatin and atorvastatin improve neurological outcome after experimental intracerebral hemorrhage. *Stroke* 40: 3384–3389.

Karp, N.A., and Reavey, N. (2019). Sex bias in preclinical research and an exploration of how to change the status quo. *Br. J. Pharmacol.* 176: 4107–4118.

Khan, S.U., Khan, M.Z., Subramanian, C.R., Riaz, H., Khan, M.U., Lone, A.N., et al. (2020). Participation of Women and Older Participants in Randomized Clinical Trials of Lipid-Lowering Therapies: A Systematic Review. *JAMA Netw. Open* 3: e205202–e205202.

Kim, K.J., Bae, Y.J., Kim, J.-M., Kim, B.J., Oh, E.S., Yun, J.Y., et al. (2018). The Prevalence of Cerebral Microbleeds in Non-Demented Parkinson’s Disease Patients. *J. Korean Med. Sci.* 33: e289.

Klein, S.L., Schiebinger, L., Stefanick, M.L., Cahill, L., Danska, J., Vries, G.J. de, et al. (2015). Opinion: Sex inclusion in basic research drives discovery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112: 5257–5258.

Kocoska-Maras, L., Zethraeus, N., Rådestad, A.F., Ellingsen, T., Schoultz, B. von, Johannesson, M., et al. (2011). A randomized trial of the effect of testosterone and estrogen on verbal fluency, verbal memory, and spatial ability in healthy postmenopausal women. *Fertil. Steril.* 95: 152–157.

Krafft, P.R., Altay, O., Rolland, W.B., Duris, K., Lekic, T., Tang, J., et al. (2012).  $\alpha 7$  Nicotinic Acetylcholine Receptor Agonism Confers Neuroprotection Through GSK-3 $\beta$  Inhibition in a Mouse Model of Intracerebral Hemorrhage. *Stroke* 43: 844–850.

Kuntz, M., Mysiorek, C., Pétrault, O., Pétrault, M., Uzbekov, R., Bordet, R., et al. (2014). Stroke-induced brain parenchymal injury drives blood–brain barrier early leakage kinetics: a combined in vivo/in vitro study. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 34: 95–107.

Kurata, T., Kawai, H., Miyazaki, K., Kozuki, M., Morimoto, N., Ohta, Y., et al. (2012). Statins have therapeutic potential for the treatment of Alzheimer’s disease, likely via protection of the neurovascular unit in the AD brain. *J. Neurol. Sci.* 322: 59–63.

Kureishi, Y., Luo, Z., Shiojima, I., Bialik, A., Fulton, D., Lefer, D.J., et al. (2000). The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nat. Med.* 6: 1004–1010.

Labots, G., Jones, A., Visser, S.J. de, Rissmann, R., and Burggraaf, J. (2018). Gender differences in clinical registration trials: is there a real problem? *Br. J. Clin. Pharmacol.* 84: 700–707.

Le Bihan, D. (2007). The ‘wet mind’: water and functional neuroimaging. *Phys. Med. Biol.* 52: R57–R90.

Le Bihan, D. (2019). What can we see with IVIM MRI? *NeuroImage* 187: 56–67.

LeGates, T.A., Kvarta, M.D., and Thompson, S.M. (2019). Sex differences in antidepressant efficacy. *Neuropsychopharmacology* 44: 140–154.

Lei, B., Mace, B., Bellows, S.T., Sullivan, P.M., Vitek, M.P., Laskowitz, D.T., et al. (2012). Interaction between sex and apolipoprotein e genetic background in a murine model of intracerebral hemorrhage. *Transl. Stroke Res.* 3: 94–101.

Lei, B., Wang, H., Jeong, S., Hsieh, J.T., Majeed, M., Dawson, H., et al. (2016). Progesterone Improves Neurobehavioral Outcome in Models of Intracerebral Hemorrhage. *Neuroendocrinology* 103: 665–677.

Lethaby, A., Hogervorst, E., Richards, M., Yesufu, A., and Yaffe, K. (2008). Hormone replacement therapy for cognitive function in postmenopausal women. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD003122.

Lewis, D.K., Johnson, A.B., Stohlgren, S., Harms, A., and Sohrabji, F. (2008). Effects of estrogen receptor agonists on regulation of the inflammatory response in astrocytes from young adult and middle-aged female rats. *J. Neuroimmunol.* 195: 47–59.

Li, B., Mahmood, A., Lu, D., Wu, H., Xiong, Y., Qu, C., et al. (2009). Simvastatin attenuates microglia, astrocyte activation and decreases IL-1 $\beta$  Level following traumatic brain injury. *Neurosurgery* 65: 179–186.

Li, G., Kukull, W.A., Peskind, E., McCormick, W., Bowen, J.D., Teri, L., et al. (2006). Differential Effect of Statins on Risk of AD by Age, Sex, and APOE Genotype: Findings From a Community-based Prospective Cohort Study. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 20: S103–S104.

Li, L., Wu, D.-H., Li, H.-Q., Tan, L., Xu, W., Dong, Q., et al. (2020). Association of Cerebral Microbleeds with Cognitive Decline: A Longitudinal Study. *J. Alzheimers Dis.* JAD 75: 571–579.

Li, X., Yuan, J., Yang, L., Qin, W., Yang, S., Li, Y., et al. (2017). The significant effects of cerebral microbleeds on cognitive dysfunction: An updated meta-analysis. *PLoS One* 12: e0185145.

Liu, Z., Li, R., Jiang, C., Zhao, S., Li, W., and Tang, X. (2018). The neuroprotective effect of lithium chloride on cognitive impairment through glycogen synthase kinase-3 $\beta$  inhibition in intracerebral hemorrhage rats. *Eur. J. Pharmacol.* 840: 50–59.

Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the

2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods San Diego Calif* 25: 402–408.

Lobo, A., Launer, L.J., Fratiglioni, L., Andersen, K., Di Carlo, A., Breteler, M.M., et al. (2000). Prevalence of dementia and major subtypes in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. *Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. Neurology* 54: S4-9.

López Rodríguez, A.B., Mateos Vicente, B., Romero-Zerbo, S.Y., Rodríguez-Rodríguez, N., Bellini, M.J., Rodríguez de Fonseca, F., et al. (2011). Estradiol decreases cortical reactive astrogliosis after brain injury by a mechanism involving cannabinoid receptors. *Cereb. Cortex N. Y. N 1991* 21: 2046–2055.

Lu, D., Qu, Y., Shi, F., Feng, D., Tao, K., Gao, G., et al. (2016). Activation of G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER-1) ameliorates blood-brain barrier permeability after global cerebral ischemia in ovariectomized rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 477: 209–214.

Macedo, A.F., Taylor, F.C., Casas, J.P., Adler, A., Prieto-Merino, D., and Ebrahim, S. (2014). Unintended effects of statins from observational studies in the general population: systematic review and meta-analysis. *BMC Med.* 12: 51.

Maki, P.M., Dennerstein, L., Clark, M., Guthrie, J., LaMontagne, P., Fornelli, D., et al. (2011). Perimenopausal Use of Hormone Therapy is Associated with Enhanced Memory and Hippocampal Function Later in Life. *Brain Res.* 1379: 232–243.

Marinescu, M., Sun, L., Fatar, M., Neubauer, A., Schad, L., Ryn, J. van, et al. (2017). Cerebral Microbleeds in Murine Amyloid Angiopathy: Natural Course and Anticoagulant Effects. *Stroke* 48: 2248–2254.

Marini, S. (2018). Sex differences in cerebrovascular disease and other complex disease. *Neurol. Neurosurg.*

Martí-Fàbregas, J., Medrano-Martorell, S., Merino, E., Prats-Sánchez, L., Marín, R., Delgado-Mederos, R., et al. (2018). Statins do not increase Markers of Cerebral Angiopathies in patients with Cardioembolic Stroke. *Sci. Rep.* 8: 1492.

Masaldan, S., Bush, A.I., Devos, D., Rolland, A.S., and Moreau, C. (2019). Striking while the iron is hot: Iron metabolism and ferroptosis in neurodegeneration. *Free Radic. Biol. Med.* 133: 221–233.

McFall, A., Hietamies, T.M., Bernard, A., Aimable, M., Allan, S.M., Bath, P.M., et al. (2020). UK consensus on pre-clinical vascular cognitive impairment functional outcomes assessment: questionnaire and workshop proceedings. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 40: 1402–1414.

McFarland, A., Anoopkumar-Dukie, S., Arora, D., Grant, G., McDermott, C., Perkins, A., et al. (2014). Molecular Mechanisms Underlying the Effects of Statins in the Central Nervous System. *Int. J. Mol. Sci.* 15: 20607–20637.

McGuinness, B., Craig, D., Bullock, R., Malouf, R., and Passmore, P. (2014). Statins for the treatment of dementia. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD007514.

McGuinness, B., Craig, D., Bullock, R., and Passmore, P. (2016). Statins for the prevention of dementia. In *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (John Wiley & Sons, Ltd), p.

Mechling, A.E., Hübner, N.S., Lee, H.-L., Hennig, J., Elverfeldt, D. von, and Harsan, L.-A. (2014). Fine-grained mapping of mouse brain functional connectivity with resting-state fMRI. *NeuroImage* 96: 203–215.

Mehta, N., Rodrigues, C., Lamba, M., Wu, W., Bronskill, S.E., Herrmann, N., et al. (2017). Systematic Review of Sex-Specific Reporting of Data: Cholinesterase Inhibitor Example. *J. Am. Geriatr. Soc.* 65: 2213–2219.

Meirhaeghe, A., Cotel, D., Cousin, B., Dumont, M.-P., Marécaux, N., Amouyel, P., et al. (2018). Sex Differences in Stroke Attack, Incidence, and Mortality Rates in Northern France. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* 27: 1368–1374.

Mendoza-Oliva, A., Zepeda, A., and Arias, C. (2014). The complex actions of statins in brain and their relevance for Alzheimer's disease treatment: an analytical review. *Curr. Alzheimer Res.* 11: 817–833.

Métais, C., Brennan, K., Mably, A.J., Scott, M., Walsh, D.M., and Herron, C.E. (2014). Simvastatin treatment preserves synaptic plasticity in AβPPsw/PS1dE9 mice. *J. Alzheimers Dis.* JAD 39: 315–329.

Miki, K., Natori, Y., Kai, Y., Yamada, T., Mori, M., Noguchi, N., et al. (2019). Absence of Microbleeds Reduces the Risk for Recurrent Intracerebral Hemorrhage. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis. Off. J. Natl. Stroke Assoc.* 29: 104585.

Miller, L.R., Marks, C., Becker, J.B., Hurn, P.D., Chen, W.-J., Woodruff, T., et al. (2016). Considering sex as a biological variable in preclinical research. *FASEB J.* 31: 29–34.

Mitaki, S., Takayoshi, H., Nakagawa, T., Nagai, A., Oguro, H., and Yamaguchi, S. (2018). Metabolic syndrome is associated with incidence of deep cerebral microbleeds. *PLOS ONE* 13: e0194182.

Mogi, M., and Horiuchi, M. (2011). Neurovascular Coupling in Cognitive Impairment Associated With Diabetes Mellitus. *Circ. J.* 75: 1042–1048.

Multiple Risk Factor Intervention Trial Research Group (1982). Multiple Risk Factor Intervention Trial: Risk Factor Changes and Mortality Results. *JAMA* 248: 1465–1477.

National Institute on Aging (NIA) (2020). The Baltimore Longitudinal Study of Aging (BLSA) ([clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov)).

Nielsen, J., Nielsen, R.E., and Correll, C.U. (2012). Predictors of clozapine response in patients with treatment-refractory schizophrenia: results from a Danish Register Study. *J. Clin. Psychopharmacol.* 32: 678–683.

NIH (2016). NIH Policy on Sex as a Biological Variable | Office of Research on Women's Health.

Noorbakhsh-Sabet, N., Pulakanti, V.C., and Zand, R. (2017). Uncommon Causes of Cerebral Microbleeds. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis. Off. J. Natl. Stroke Assoc.* 26: 2043–2049.

Oberlander, J.G., and Woolley, C.S. (2017). 17β-Estradiol Acutely Potentiates Glutamatergic Synaptic Transmission in the Hippocampus through Distinct Mechanisms in Males and Females. *J. Neurosci.* 37: 12314–12327.

O'Leary, O., and Nolan, Y. (2015). Glycogen Synthase Kinase-3 as a Therapeutic Target for Cognitive Dysfunction in Neuropsychiatric Disorders. *CNS Drugs* 29: 1–15.

Ott, B.R., Daiello, L.A., Dahabreh, I.J., Springate, B.A., Bixby, K., Murali, M., et al. (2015). Do statins impair cognition? A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J. Gen. Intern. Med.* 30: 348–358.

Ouk, T., Potey, C., Laprais, M., Gautier, S., Hanf, R., Darteil, R., et al. (2014). PPARα is involved in the multitargeted effects of a pretreatment with atorvastatin in experimental stroke. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 28: 294–302.

Overk, C.R., Lu, P.-Y., Wang, Y.-T., Choi, J., Shaw, J.W., Thatcher, G.R., et al. (2012). Effects of aromatase inhibition versus gonadectomy on hippocampal complex amyloid pathology in triple transgenic mice. *Neurobiol. Dis.* 45: 479–487.

Öztaş, B., Çmurcu, S., and Kaya, M. (1992). Influence of Sex on the Blood Brain Barrier Permeability During Bicuculline-Induced Seizures. *Int. J. Neurosci.* *65*: 131–139.

Pantoni, L. (2010). Cerebral small vessel disease: from pathogenesis and clinical characteristics to therapeutic challenges. *Lancet Neurol.* *9*: 689–701.

Paradise, M., Seruga, A., Crawford, J.D., Chaganti, J., Thalamuthu, A., Kochan, N.A., et al. (2018). The relationship of cerebral microbleeds to cognition and incident dementia in non-demented older individuals. *Brain Imaging Behav.* *13*: 750–761.

Pawlak, J., Brito, V., Küppers, E., and Beyer, C. (2005). Regulation of glutamate transporter GLAST and GLT-1 expression in astrocytes by estrogen. *Brain Res. Mol. Brain Res.* *138*: 1–7.

Paxinos, G., and Franklin, K.B.J. (2019). Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates (Academic Press).

Peng, W., Yang, J., Yang, B., Wang, L., Xiong, X., and Liang, Q. (2014). Impact of Statins on Cognitive Deficits in Adult Male Rodents after Traumatic Brain Injury: A Systematic Review. *BioMed Res. Int.* *2014*: 261409.

Pétrault, M., Casolla, B., Ouk, T., Cordonnier, C., and Bérézowski, V. (2019a). Cerebral microbleeds: Beyond the macroscope. *Int. J. Stroke* *14*: 468–475.

Pétrault, M., Ouk, T., Pétrault, O., Bastide, M., Bordet, R., and Bérézowski, V. (2019b). Safety of oral anticoagulants on experimental brain microbleeding and cognition. *Neuropharmacology* *155*: 162–172.

Platania, P., Seminara, G., Aronica, E., Troost, D., Vincenza Catania, M., and Angela Sortino, M. (2005). 17beta-estradiol rescues spinal motoneurons from AMPA-induced toxicity: a role for glial cells. *Neurobiol. Dis.* *20*: 461–470.

Poels, M.M.F., Ikram, M.A., Lugt, A. van der, Hofman, A., Niessen, W.J., Krestin, G.P., et al. (2012). Cerebral microbleeds are associated with worse cognitive function The Rotterdam Scan Study. *Neurology* *78*: 326–333.

Potey, C., Ouk, T., Pétrault, O., Pétrault, M., Berezowski, V., Salleron, J., et al. (2015). Early treatment with atorvastatin exerts parenchymal and vascular protective effects in experimental cerebral ischaemia. *Br. J. Pharmacol.* *172*: 5188–5198.

Power, M.C., Weuve, J., Sharrett, A.R., Blacker, D., and Gottesman, R.F. (2015). Statins, cognition, and dementia—systematic review and methodological commentary. *Nat. Rev. Neurol.* *11*: 220–229.

Prendergast, B.J., Onishi, K.G., and Zucker, I. (2014). Female mice liberated for inclusion in neuroscience and biomedical research. *Neurosci. Biobehav. Rev.* *40*: 1–5.

Purushothuman, S., and Stone, J. (2015). The reaction of cerebral cortex to a nearby lesion: damage, survival, self-protection. *Brain Res.* *1601*: 52–63.

Qian, Y., Zheng, K., Wang, H., You, H., Han, F., Ni, J., et al. (2020). Cerebral microbleeds and their influence on cognitive impairment in Dialysis patients. *Brain Imaging Behav.*

Qu, C., Lu, D., Goussev, A., Schallert, T., Mahmood, A., and Chopp, M. (2005). Effect of atorvastatin on spatial memory, neuronal survival, and vascular density in female rats after traumatic brain injury. *J. Neurosurg.* *103*: 695–701.

Reitz, C., Luchsinger, J.A., Tang, M.-X., Manly, J., and Mayeux, R. (2006). Stroke and Memory Performance in Elderly without Dementia. *Arch. Neurol.* *63*: 571–576.

Reuter, B., Venus, A., Grudzinski, S., Heiler, P., Schad, L., Staufenbiel, M., et al. (2016). Statin Therapy and the Development of Cerebral Amyloid Angiopathy—A Rodent in Vivo Approach. *Int. J. Mol. Sci.* *17*: 126.

Richardson, K., Schoen, M., French, B., Umscheid, C.A., Mitchell, M.D., Arnold, S.E., et al. (2013). Statins and cognitive function: a systematic review. *Ann. Intern. Med.* *159*: 688–697.

Robin, N.C., Agoston, Z., Biechele, T.L., James, R.G., Berndt, J.D., and Moon, R.T. (2014). Simvastatin Promotes Adult Hippocampal Neurogenesis by Enhancing Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling. *Stem Cell Rep.* *2*: 9.

Robison, L.S., Gannon, O.J., Salinero, A.E., and Zuloaga, K.L. (2019). Contributions of sex to cerebrovascular function and pathology. *Brain Res.* *1710*: 43–60.

Romero, J.R., Preis, S.R., Beiser, A., DeCarli, C., Viswanathan, A., Martinez-Ramirez, S., et al. (2014). Risk Factors, Stroke Prevention Treatments, and Prevalence of Cerebral Microbleeds in the Framingham Heart Study. *Stroke* *45*: 1492–1494.

Roque, C., and Baltazar, G. (2019). G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER) activation triggers different signaling pathways on neurons and astrocytes. *Neural Regen. Res.* *14*: 2069–2070.

Rosidi, N.L., Zhou, J., Pattanaik, S., Wang, P., Jin, W., Brophy, M., et al. (2011). Cortical Microhemorrhages Cause Local Inflammation but Do Not Trigger Widespread Dendrite Degeneration. *PLOS ONE* *6*: e26612.

Roy-O'Reilly, M., and McCullough, L.D. (2018). Age and Sex Are Critical Factors in Ischemic Stroke Pathology. *Endocrinology* *159*: 3120–3131.

Samuraki, M., Matsunari, I., Yoshita, M., Shima, K., Noguchi-Shinohara, M., Hamaguchi, T., et al. (2015). Cerebral Amyloid Angiopathy-Related Microbleeds Correlate with Glucose Metabolism and Brain Volume in Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers Dis.* *48*: 517–528.

Scacchi, R., Gambina, G., Broggio, E., and Corbo, R.M. (2014). Sex and ESR1 genotype may influence the response to treatment with donepezil and rivastigmine in patients with Alzheimer's disease. *Int. J. Geriatr. Psychiatry* *29*: 610–615.

Schreiber, S., Bueche, C.Z., Garz, C., Kropf, S., Angenstein, F., Goldschmidt, J., et al. (2012). The Pathologic Cascade of Cerebrovascular Lesions in SHRSP: Is Erythrocyte Accumulation an Early Phase? *J. Cereb. Blood Flow Metab.* *32*: 278–290.

Seyfried, D., Han, Y., Lu, D., Chen, J., Bydon, A., and Chopp, M. (2004). Improvement in neurological outcome after administration of atorvastatin following experimental intracerebral hemorrhage in rats. *J. Neurosurg.* *101*: 104–107.

Shansky, R.M. (2019). Are hormones a “female problem” for animal research? *Science* *364*: 825–826.

Sharma, P.K., and Thakur, M.K. (2006). Expression of estrogen receptor (ER)  $\alpha$  and  $\beta$  in mouse cerebral cortex: Effect of age, sex and gonadal steroids. *Neurobiol. Aging* *27*: 880–887.

Shin, J.A., Yoon, J.C., Kim, M., and Park, E.-M. (2016). Activation of classical estrogen receptor subtypes reduces tight junction disruption of brain endothelial cells under ischemia/reperfusion injury. *Free Radic. Biol. Med.* *92*: 78–89.

Shitara, Y., and Sugiyama, Y. (2006). Pharmacokinetic and pharmacodynamic alterations of 3-hydroxy-3-methylglutaryl

coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors: Drug–drug interactions and interindividual differences in transporter and metabolic enzyme functions. *Pharmacol. Ther.* *112*: 71–105.

Shoamanesh, A., Kwok, C.S., and Benavente, O. (2011). Cerebral Microbleeds: Histopathological Correlation of Neuroimaging. *Cerebrovasc. Dis.* *32*: 528–534.

Song, Y., Nie, H., Xu, Y., Zhang, L., and Wu, Y. (2013). Association of statin use with risk of dementia: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Geriatr. Gerontol. Int.* *13*: 817–824.

Späni, C.B., Braun, D.J., and Van Eldik, L.J. (2018). Sex-related responses after traumatic brain injury: Considerations for preclinical modeling. *Front. Neuroendocrinol.* *50*: 52–66.

Spence, R.D., Hamby, M.E., Umeda, E., Itoh, N., Du, S., Wisdom, A.J., et al. (2011). Neuroprotection mediated through estrogen receptor- $\alpha$  in astrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *108*: 8867–8872.

Spence, R.D., Wisdom, A.J., Cao, Y., Hill, H.M., Mongerson, C.R.L., Stapornkul, B., et al. (2013). Estrogen Mediates Neuroprotection and Anti-Inflammatory Effects during EAE through ER $\alpha$  Signaling on Astrocytes But Not through ER $\beta$  Signaling on Astrocytes or Neurons. *J. Neurosci.* *33*: 10924–10933.

Springo, Z., Toth, P., Tarantini, S., Ashpole, N.M., Tucsek, Z., Sonntag, W.E., et al. (2015). Aging impairs myogenic adaptation to pulsatile pressure in mouse cerebral arteries. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* *35*: 527–530.

SPRINT Research Group, Wright, J.T., Williamson, J.D., Whelton, P.K., Snyder, J.K., Sink, K.M., et al. (2015). A Randomized Trial of Intensive versus Standard Blood-Pressure Control. *N. Engl. J. Med.* *373*: 2103–2116.

Stirone, C., Chu, Y., Sunday, L., Duckles, S.P., and Krause, D.N. (2003). 17 $\beta$ -Estradiol increases endothelial nitric oxide synthase mRNA copy number in cerebral blood vessels: quantification by real-time polymerase chain reaction. *Eur. J. Pharmacol.* *478*: 35–38.

Studies, Institute of Medicine (US) Committee on Ethical and Legal Issues Relating to the Inclusion of Women in Clinical, Mastroianni, A.C., Faden, R., and Federman, D. (1994). NIH Revitalization Act of 1993 Public Law 103-43 (National Academies Press (US)).

Su, N., Liang, X., Yao, M., Zhou, L.-X., Wang, Q., Jin, Z.-Y., et al. (2019). Cerebral Microbleeds Correlated with White Matter and Hippocampal Volumes in Community-Dwelling Populations. *J. Alzheimers Dis.* *71*: 559–567.

Sudduth, T.L., Powell, D.K., Smith, C.D., Greenstein, A., and Wilcock, D.M. (2013). Induction of hyperhomocysteinemia models vascular dementia by induction of cerebral microhemorrhages and neuroinflammation. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* *33*: 708–715.

Sudduth, T.L., Weekman, E.M., Price, B.R., Gooch, J.L., Woolums, A., Norris, C.M., et al. (2017). Time-course of glial changes in the hyperhomocysteinemia model of vascular cognitive impairment and dementia (VCID). *Neuroscience* *341*: 42–51.

Sumbria, R.K., Grigoryan, M.M., Vasilevko, V., Krasieva, T.B., Scadeng, M., Dvornikova, A.K., et al. (2016). A murine model of inflammation-induced cerebral microbleeds. *J. Neuroinflammation* *13*: 218.

Sumbria, R.K., Grigoryan, M.M., Vasilevko, V., Paganini-Hill, A., Kilday, K., Kim, R., et al. (2018). Aging exacerbates development of cerebral microbleeds in a mouse model. *J. Neuroinflammation* *15*: 69.

Sumbria, R.K., Vasilevko, V., Grigoryan, M.M., Paganini-Hill, A., Kim, R., Cribbs, D.H., et al. (2017). Effects of phosphodiesterase 3A modulation on murine cerebral microhemorrhages. *J. Neuroinflammation* *14*: 114.

Swiger, K.J., Manalac, R.J., Blumenthal, R.S., Blaha, M.J., and Martin, S.S. (2013). Statins and cognition: a systematic review and meta-analysis of short- and long-term cognitive effects. *Mayo Clin. Proc.* *88*: 1213–1221.

Tarantini, S., Valcarcel-Ares, N.M., Yabluchanskiy, A., Springo, Z., Fulop, G.A., Ashpole, N., et al. (2017). Insulin-like growth factor 1 deficiency exacerbates hypertension-induced cerebral microhemorrhages in mice, mimicking the aging phenotype. *Aging Cell* *16*: 469–479.

Taylor, S., Mehina, E., White, E., Reeson, P., Yongblab, K., Doyle, K.P., et al. (2018). Suppressing interferon gamma stimulates microglial responses and repair of microbleeds in the diabetic brain. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *38*: 8707–8722.

Toth, P., Tarantini, S., Springo, Z., Tucsek, Z., Gautam, T., Giles, C.B., et al. (2015). Aging exacerbates hypertension-induced cerebral microhemorrhages in mice: role of resveratrol treatment in vasoprotection. *Aging Cell* *14*: 400–408.

Tourdias, T., Mori, N., Dragonu, I., Cassagno, N., Boiziau, C., Aussudre, J., et al. (2011). Differential aquaporin 4 expression during edema build-up and resolution phases of brain inflammation. *J. Neuroinflammation* *8*: 143.

Tucker, L.B., Winston, B.S., Liu, J., Velosky, A.G., Fu, A.H., Grillakis, A.A., et al. (2019). Sex differences in cued fear responses and parvalbumin cell density in the hippocampus following repetitive concussive brain injuries in C57BL/6J mice. *PLoS ONE* *14*: e0222153.

Tuladhar, A.M., Dijk, E. van, Zwiers, M.P., Norden, A.G.W. van, Laat, K.F. de, Shumskaya, E., et al. (2016). Structural network connectivity and cognition in cerebral small vessel disease: Structural Network and Cognition. *Hum. Brain Mapp.* *37*: 300–310.

Ungvari, Z.I., Tarantini, S., Kirkpatrick, A.C., Csiszar, A., and Prodan, C.I. (2017). Cerebral microhemorrhages: mechanisms, consequences and prevention. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *1128–1143*: H1128–H1143.

Usall, J., Suarez, D., and Haro, J.M. (2007). Gender differences in response to antipsychotic treatment in outpatients with schizophrenia. *Psychiatry Res.* *153*: 225–231.

Vegeto, E., Belcredito, S., Etteri, S., Ghisletti, S., Brusadelli, A., Meda, C., et al. (2003). Estrogen receptor- $\alpha$  mediates the brain antiinflammatory activity of estradiol. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *100*: 9614–9619.

Veluw, S.J., Scherlek, A.A., Freeze, W.M., Telgte, A., Kouwe, A.J., Bacskai, B.J., et al. (2019). Different microvascular alterations underlie microbleeds and microinfarcts. *Ann. Neurol.* *86*: 279–292.

Veluw, S.J. van, Jouvent, E., and Charidimou, A. (2020). Editorial: Cerebral Small Vessel Diseases: From Vessel Alterations to Cortical Parenchymal Injury. *Front. Neurol.* *11*: 92.

Veluw, S.J. van, Kuijff, H.J., Charidimou, A., Viswanathan, A., Biessels, G.J., Rozemuller, A.J.M., et al. (2017). Reduced

vascular amyloid burden at microhemorrhage sites in cerebral amyloid angiopathy. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 133: 409–415.

Villa, A., Vegeto, E., Poletti, A., and Maggi, A. (2016). Estrogens, Neuroinflammation, and Neurodegeneration. *Endocr. Rev.* 37: 372–402.

Villapol, S., Loane, D.J., and Burns, M.P. (2017). Sexual dimorphism in the inflammatory response to traumatic brain injury. *Glia* 65: 1423–1438.

Vinke, E.J., Groot, M. de, Venkatraghavan, V., Klein, S., Niessen, W.J., Ikram, M.A., et al. (2018). Trajectories of imaging markers in brain aging: the Rotterdam Study. *Neurobiol. Aging* 71: 32–40.

Voyer, D., Voyer, S.D., and Saint-Aubin, J. (2017). Sex differences in visual-spatial working memory: A meta-analysis. *Psychon. Bull. Rev.* 24: 307–334.

Wang, C., Chen, T., Li, G., Zhou, L., Sha, S., and Chen, L. (2015). Simvastatin prevents  $\beta$ -amyloid(25-35)-impaired neurogenesis in hippocampal dentate gyrus through  $\alpha$ 7nAChR-dependent cascading PI3K-Akt and increasing BDNF via reduction of farnesyl pyrophosphate. *Neuropharmacology* 97: 122–132.

Wang, T., Huang, Y., Zhang, M., Wang, L., Wang, Y., Zhang, L., et al. (2013). [Gly14]-Humanin offers neuroprotection through glycogen synthase kinase-3 $\beta$  inhibition in a mouse model of intracerebral hemorrhage. *Behav. Brain Res.* 247: 132–139.

Wang, Y., Chen, Q., Tan, Q., Feng, Z., He, Z., Tang, J., et al. (2018). Simvastatin accelerates hematoma resolution after intracerebral hemorrhage in a PPAR $\gamma$ -dependent manner. *Neuropharmacology* 128: 244–254.

Wang, Y., Jiang, Y., Suo, C., Yuan, Z., Xu, K., Yang, Q., et al. (2019). Deep/mixed cerebral microbleeds are associated with cognitive dysfunction through thalamocortical connectivity disruption: The Taizhou Imaging Study. *NeuroImage Clin.* 22: 101749.

Whitley, H.P., and Lindsey, W. (2009). Sex-Based Differences in Drug Activity. *Am. Fam. Physician* 80: 1254–1258.

Wilson, D., Ambler, G., Shakeshaft, C., Brown, M.M., Charidimou, A., Al-Shahi Salman, R., et al. (2018). 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.

Woerdeman, J., Duinkerken, E. van, Wattjes, M.P., Barkhof, F., Snoek, F.J., Moll, A.C., et al. (2014). Proliferative Retinopathy in Type 1 Diabetes Is Associated With Cerebral Microbleeds, Which Is Part of Generalized Microangiopathy. *Diabetes Care* 37: 1165–1168.

Woitowich, N.C., Beery, A., and Woodruff, T. (2020). A 10-year follow-up study of sex inclusion in the biological sciences. *ELife* 9: e56344.

Wong, W.B., Lin, V.W., Boudreau, D., and Devine, E.B. (2013). Statins in the prevention of dementia and Alzheimer's disease: a meta-analysis of observational studies and an assessment of confounding. *Pharmacoepidemiol. Drug Saf.* 22: 345–358.

Xie, Q., Xi, G., Keep, R.F., and Hua, Y. (2016). Effects of Gender and Estrogen Receptors on Iron-Induced Brain Edema Formation. *Acta Neurochir. Suppl.* 121: 341–345.

Xie, Y., Li, Y.-J., Lei, B., Kernagis, D., Liu, W.-W., Bennett, E.R., et al. (2019). Sex Differences in Gene and Protein Expression After Intracerebral Hemorrhage in Mice. *Transl. Stroke Res.* 10: 231–239.

Xiong, Y., Wong, A., Cavalieri, M., Schmidt, R., Chu, W.W.C., Liu, X., et al. (2014). Prestroke Statins, Progression of White Matter Hyperintensities, and Cognitive Decline in Stroke Patients with Confluent White Matter Hyperintensities. *Neurotherapeutics* 11: 606–611.

Yang, D., Han, Y., Zhang, J., Chopp, M., and Seyfried, D.M. (2012). Statins Enhance Expression of Growth Factors and Activate the PI3K/Akt-mediated Signaling Pathway after Experimental Intracerebral Hemorrhage. *World J. Neurosci.* 2: 74–80.

Yang, J., Lyu, Y., Ma, Y., and Chen, Y. (2018). Relationship between cerebral microbleeds location and cognitive impairment in patients with ischemic cerebrovascular disease. *Neuroreport* 29: 1209–1213.

Yatawara, C., Guevarra, A.C., Ng, K.P., Chander, R., Lam, B.Y.K., Wong, A., et al. (2020). The role of cerebral microbleeds in the incidence of post-stroke dementia. *J. Neurol. Sci.* 412: 116736.

Yates, P.A., Desmond, P.M., Phal, P.M., Steward, C., Szoek, C., Salvado, O., et al. (2014). Incidence of cerebral microbleeds in preclinical Alzheimer disease. *Neurology* 82: 1266–1273.

Yates, P.A., Sirisriro, R., Villemagne, V.L., Farquharson, S., Masters, C.L., Rowe, C.C., et al. (2011). Cerebral microhemorrhage and brain  $\beta$ -amyloid in aging and Alzheimer disease. *Neurology* 77: 48–54.

Yu, G., Sun, X., Li, L., Huang, L., Liu, H., Wang, S., et al. (2020). Cystatin C promotes cognitive dysfunction in rats with cerebral microbleeds by inhibiting the ERK/synapsin Ia/Ib pathway. *Exp. Ther. Med.* 19: 2282–2290.

Yubi, T., Hata, J., Ohara, T., Mukai, N., Hirakawa, Y., Yoshida, D., et al. (2018). Prevalence of and risk factors for cerebral microbleeds in a general Japanese elderly community. *Neurol. Clin. Pract.* 8: 223–231.

Yue, X., Lu, M., Lancaster, T., Cao, P., Honda, S.-I., Staufenbiel, M., et al. (2005). Brain estrogen deficiency accelerates Abeta plaque formation in an Alzheimer's disease animal model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102: 19198–19203.

Zakiniaciz, Y., Cosgrove, K.P., Potenza, M.N., and Mazure, C.M. (2016). Balance of the Sexes: Addressing Sex Differences in Preclinical Research. *Yale J. Biol. Med.* 89: 255–259.

Zeng, J., Zhào, H., Liu, Z., Zhang, W., and Huang, Y. (2018). Lipopolysaccharide Induces Subacute Cerebral Microhemorrhages with Involvement of Nitric Oxide Synthase in Rats. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis. Off. J. Natl. Stroke Assoc.* 27: 1905–1913.

Zhang, X., Wen, J., and Zhang, Z. (2018). Statins use and risk of dementia: A dose-response meta analysis. *Medicine (Baltimore)* 97: e11304.

Zhao, T.-Z., Ding, Q., Hu, J., He, S.-M., Shi, F., and Ma, L.-T. (2016). GPER expressed on microglia mediates the anti-inflammatory effect of estradiol in ischemic stroke. *Brain Behav.* 6: e00449.

Zhao, Y., Wei, Z.Z., Zhang, J.Y., Zhang, Y., Won, S., Sun, J., et al. (2017). GSK-3 $\beta$  Inhibition Induced Neuroprotection, Regeneration, and Functional Recovery after Intracerebral Hemorrhagic Stroke. *Cell Transplant.* 26: 395–407.

Zhou, D., Liu, H., Li, C., Wang, F., Shi, Y., Liu, L., et al. (2016). Atorvastatin ameliorates cognitive impairment, A $\beta$ 1-42 production and Tau hyperphosphorylation in APP/PS1 transgenic mice. *Metab. Brain Dis.* *31*: 693–703.

Zissimopoulos, J.M., Barthold, D., Brinton, R.D., and Joyce, G. (2017). Sex and Race Differences in the Association Between Statin Use and the Incidence of Alzheimer Disease. *JAMA Neurol.* *74*: 225–232.

Zucker, I., and Prendergast, B.J. (2020). Sex differences in pharmacokinetics predict adverse drug reactions in women. *Biol. Sex Differ.* *11*: 32.

# **ANNEXE**

**Tableau annexe : modèles de microhémorragies non transgéniques, disséminées ou localisées**

Mode d'induction	Auteur et année	Localisation	Animaux	Evaluation neuro	Modulation pharmaco	Suivi	Objectif	Résultats principaux
Aiguilles	(Yu et al., 2020)	Deux lésions corticales	Rats mâles, sprague dawley, âge inconnu	Oui	Non	5 jours	Évaluer l'implication de la cystatine	Altération de la mémoire de travail. Réduction de la phosphorylation de ERK1/2 et de la synapsine Ia/b. Diminution de la potentialisation à long terme
Hypertension	(Tarantini et al., 2017)	Multiples lésions corticales et profondes	Souris mâles, KO du gène IGF-1, âge inconnu	Troubles de la marche	Non	Qq jours	Évaluer l'implication de IGF-1 dans le développement de MHC	Augmentation de l'activité des MMP2 et 3 mais pas de MMP9. Augmentation de Timp1, 2 et 3. Altération précoce de la marche. Altération de l'adaptation des artérioles à l'hypertension.
Hypertension	(de Montgolfier Olivia et al., 2019)	Multiples lésions corticales	Souris mâles, APP/PS1 et WT, 4,5 mois	Oui	Non	6 sem	Évaluer l'implication de la pression pulsée dans le développement de démences vasculaires et mixtes.	Induction d'un stress mécanique sur les cellules endothéliales cérébrales et perturbation de la BHE chez les WT et APP/PS1. Altération de la mémoire de référence spatiale et de la mémoire de travail chez les WT et aggravation chez les APP/PS1. Altération de la densité microvasculaire, augmentation du nombre de cellules en apoptoses et du nombre de cellules microgliales chez les WT. Phénomène similaire chez les APP/PS1 et augmentation du nombre de plaques amyloïdes.
Hypertension	(Toth et al., 2015)	Multiples lésions corticales et profondes	Souris mâles, C57BL/6J, 3 et 24 mois	Oui	Resveratrol	10 jours	Influence de l'âge dans le développement des MHC	Exacerbation de l'activation des MMP et du stress oxydant induit par l'HTA avec l'âge, atténué par le resveratrol Augmentation du nombre de MHC induit par l'HTA chez des souris âgées comparées aux souris jeunes.
Inj. corticale de collagenase	(Bergeron et al., 2018)	Unique lésion corticales	Souris mâles, C57BL/6J, 10 semaines	Oui	Atorvastatine	6 sem	Mise en place d'un modèle de MHC unique	Altération de la mémoire visuospatiale, de la mémoire de référence spatiale et correction par l'atorvastatine.

**Tableau annexe : modèles de microhémorragies non transgéniques, disséminées ou localisées**

Mode d'induction	Auteur et année	Localisation	Animaux	Evaluation neuro	Modulation pharmaco	Suivi	Objectif	Résultats principaux
Inj de cyclodextrines	(Pétrault et al., 2019b)	Profondes et corticales	Souris mâles, C57BL/6J, 10 semaines	Oui	AOD et AVK	12 mois	Évaluer la sécurité des AOD et de l'AVK	Pas d'impact sur les fonctions locomotrices. Pas d'altération sur la mémoire de travail. Altération de la mémoire de reconnaissance à partir de 9 mois post-induction. Les AOD n'ont pas d'influence sur la transformation hémorragique des CMH en ICH.
Inj. IP de LPS	(Sumbria et al., 2016)	Multiples lésions corticales et profondes	Souris mâles et femelles, C57BL/6J, 10 à 12 semaines	Non	non	2 et 7 jours après injection	Évaluer l'influence de l'inflammation systémique dans la formation de MHC	Association entre le marquage de ICAM-1 et d'IgG et la présence de MHC. Augmentation de nombre d'astrocytes et de microglie dans le groupe LPS.
Inj. IP de LPS	(Sumbria et al., 2017)	Multiples lésions corticales et profondes	Souris (sexe non précisé), PDE3A KO âgées de 16 à 18 mois, APP Tg2576 âgées de 22 mois	Non	Non	26h, 48h et 7 jours	Évaluer l'implication de la PDE3A dans la formation des MHC	Pas d'effet de l'inhibition de la voie de la PDE3A sur le développement de MHC induit par un état inflammatoire ou par de l'angiopathie amyloïde cérébrale.
Inj. IP de LPS	(Zeng et al., 2018)	Multiples lésions corticales et profondes	Rats mâles, sprague dawley, 10 semaines	Non	Non	7 jours	Évaluer l'implication des isoformes de NOS dans la formation de MHC	Activation des astrocytes et de la microglie. Perte des pericytes et altération de la BHE. Augmentation des niveaux de NOS neuronaux et endothéliaux mais pas du NOS inducible (iNOS).

**Tableau annexe : modèles de microhémorragies non transgéniques, disséminées ou localisées**

Mode d'induction	Auteur et année	Localisation	Animaux	Evaluation neuro	Modulation pharmaco	Suivi	Objectif	Résultats principaux
Inj. IP de LPS	(Sumbria et al., 2018)	Multiples lésions corticales et profondes	Souris mâles et femelles, C57BL/6J, 3 mois et 18 mois	Non	Non	7 jours	Effet de l'âge sur le développement de MHC	Augmentation du nombre et de la taille des MHC, du nombre de microglies et d'astrocytes chez les souris âgées. Augmentation du nombre de MHC chez les souris mâles comparées aux souris femelles.
Laser biphoton	(Rosidi et al., 2011)	Multiples lésions corticales	Souris mâles et femelles, C57BL/6J, 5 mois et souris mutés CXCR3+/GFP	Non	Non	7 jours	Conséquences locales d'une MHC corticale	Compression du tissu autour du vaisseau rompu et déplacement des dendrites de façon temporaire. Absence de dégénérescence des dendrites autour de la MHC. Augmentation de la microglie et des macrophages dans une région de 100 micromètres de la lésion, débutant à 1 jour et persistant au-delà d'une semaine et activation astrocytaire.
Laser biphoton	(Cianchetti et al., 2013)	Multiples lésions corticales	Rats mâles, sprague dawley, 10 semaines Souris mâles, C57BL/6J, âge inconnu	Non	Non	30 min	Étudier les changements du fonctionnement cortical après une MHC	Altération puis rétablissement de la réponse calcique dans les corps des cellules neuronales avoisinant la MHC, 24h après la MHC. Aucune mort cellulaire dans les cellules avoisinantes.
Laser biphoton	(He et al., 2016)	Multiples lésions corticales	Souris mâles, C57BL/6J, âgées de 7 à 8 semaines	Oui	Deferoxamine	1 sem	Rôle du fer dans les mécanismes secondaires des MHC.	Altération de la mémoire spatiale induite par les MHC et restauration par la déféroxamine. Diminution de l'altération de la BHE par la déféroxamine. Augmentation du nombre de cellules microgliales chez les souris avec MHC. Pas d'effet sur le nombre de neurones avec la MHC. Augmentation de la perte de dendrites avec la MHC.

**Tableau annexe : modèles de microhémorragies non transgéniques, disséminées ou localisées**

Mode d'induction	Auteur et année	Localisation	Animaux	Evaluation neuro	Modulation pharmaco	Suivi	Objectif	Résultats principaux
Laser biphoton	(Ahn et al., 2018)	Lésion corticale	Souris transgéniques (sexe non précisé), âgées de 20 à 40 sem	Non	Non	2 sem	Réponse inflammatoire après une MHC	Présence de cellules CCR2+ Mo/MΦ pro inflammatoires suivi par des cellules anti-inflammatoires CX3CR1+ Mo/MΦ autour de la MHC. Migration et prolifération rapide des microglies autour de la MHC, diminution après 2 jours jusqu'à retourner à un état basal au bout de 2 semaines. Expression des astrocytes 2 jours après la MHC jusqu'à atteindre un pic à 7 jours puis diminution ne laissant aucune cicatrice gliale.
Laser biphoton	(Taylor et al., 2018)	Multiples lésions corticales	Souris mâles, C57BL/6J, 2 à 5 mois	Non	Non	30 min	Évaluer l'implication de l'INFγ dans la réponse microgliale à une MHC dans un modèle de souris diabétique	Augmentation de la réponse microgliale autour d'une MHC après diminution des taux sériques d'INFγ par la dexaméthasone.
Laser biphoton	(Chan et al., 2019)	Multiples lésions corticales	Souris mâles et femelles, C57BL/6J, 2 à 5 mois et 18-29 mois	Non	Acide acetylsalicylique (aspirine) et héparine	Quelques min	Effet de la prise d'aspirine sur la taille des MHC corticales et l'effet de l'âge	Pas d'effet de l'aspirine sur la taille des MHC chez les souris jeunes et âgées comparées aux contrôles. Augmentation de la taille des MHC chez les souris jeunes avec de l'héparine comparé aux souris jeunes avec de l'aspirine.
Régime hyperhomocystéinémique	(Sudduth et al., 2013)	Multiples lésions corticales et profondes	Souris (sexe non précisé), C57BL/6J, 3 mois	Oui	Non	11 sem	Effet d'un régime hyperhomocystéinique sur la survenue de démence vasculaire	Absence de déficit moteur. Altération de la mémoire spatiale. Augmentation des marqueurs microgliaux de type M1 (IL1-B, IL-6, IL-12 et TNFalpha). Pas de différences de marqueurs microgliaux de type M2 par rapport au groupe contrôle. Augmentation de certaines métalloprotéinases. Augmentation de CD11b dans le cortex et l'hippocampe.

**Tableau annexe : modèles de microhémorragies non transgéniques, disséminées ou localisées**

<b>Mode d'induction</b>	<b>Auteur et année</b>	<b>Localisation</b>	<b>Animaux</b>	<b>Evaluation neuro</b>	<b>Modulation pharmaco</b>	<b>Suivi</b>	<b>Objectif</b>	<b>Résultats principaux</b>
Régime hyperhomocysté inémique	(Sudduth et al., 2017)	Multiples lésions corticales et profondes	Souris (sexes non précisés), C57BL/6J, 3 mois	Oui	Non	6, à 14 sem	Effet d'un régime hyperhomocysté inémique	Inductions de MHC consécutives à un état inflammatoire par le régime avec mise en place d'un déclin cognitif.

