



# Étude translationnelle des interactions cerveau-foie dans les troubles de l'usage de l'alcool

Anastasia Lanquetin

## ► To cite this version:

Anastasia Lanquetin. Étude translationnelle des interactions cerveau-foie dans les troubles de l'usage de l'alcool. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2020. Français. NNT : 2020NORMC407 . tel-03283373

**HAL Id: tel-03283373**

**<https://theses.hal.science/tel-03283373>**

Submitted on 10 Jul 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.

## THÈSE

**Pour obtenir le diplôme de doctorat**  
**Spécialité SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**  
**Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie**

### **Etude translationnelle des interactions cerveau-foie dans les troubles de l'usage de l'alcool**

**Présentée et soutenue par**  
**Anastasia LANQUETIN**

**Thèse soutenue publiquement le 09/07/2020**  
**devant le jury composé de**

|                       |                                                       |                       |
|-----------------------|-------------------------------------------------------|-----------------------|
| M. PHILIPPE DE TIMARY | Professeur, Hôpital Universitaire de Bruxelles        | Rapporteur du jury    |
| M. ETIENNE QUERTEMONT | Professeur, Université de Liège - Belgique            | Rapporteur du jury    |
| Mme CARINE ALI        | Professeur des universités, Université Caen Normandie | Président du jury     |
| Mme SOPHIE LECLERCQ   | Chercheur, Université Catholique Louvain - Belgique   | Membre du jury        |
| Mme MARINA RUBIO      | Ingénieur HDR, Université Caen Normandie              | Directeur de thèse    |
| Mme ANNE-LISE PITEL   | Maître de conférences HDR, Université Caen Normandie  | Co-directeur de thèse |

**Thèse dirigée par MARINA RUBIO et ANNE-LISE PITEL, Physiopathologie et imagerie des troubles neurologiques**





## Remerciements

Je tiens d'abord à remercier le Pr. Vivien pour son accueil dans son unité et les moyens techniques et financiers que tu mets à disposition des étudiants.

Merci aux professeurs Philippe de Timary et Etienne Quertemont de me faire l'honneur de faire partie de mon jury et d'évaluer ce travail. Je remercie aussi Sophie Leclerc et Carine Ali d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse et pour les discussions toujours très enrichissantes.

Anne-Lise et Marina, merci pour ce double encadrement, j'ai beaucoup appris à vos côtés, et grâce à vous ça a été un plaisir de réaliser ce travail même quand les résultats n'étaient pas les plus évidents ! Vous m'avez toujours laissé exprimer mes idées et vous m'avez fait confiance tout au long de cette thèse (et du Master) et je vous en remercie.

Merci à l'ensemble de l'unité Phind, et aux personnes de Cyceron en général, notamment à celles et ceux qui ont participé à cette thèse que ce soit pour la partie clinique ou préclinique. Merci à Shail et Mikaël pour votre expertise en imagerie vous m'avez bien aidée.

Aux anciens collègues de la bibliothèque, et du premier étage en particulier Claire, Alice, Angéline Gwendoline et Edelweiss.

A l'ancien bureau des connards, Sophie, Antoine, Vincent, JF, (Rhéda), et Barbara, tu es la dernière de ce bureau, courage pour la dernière ligne droite, tu sais que même si je ne suis plus là je ne serai jamais très loin (si tu as besoin de relire un mail par exemple). Et au « nouveau » bureau, Damien, Celia, Alex, Florent, Audrey.

Merci au bureau d'à côté, Camille, Héloïse, (Rhéda), Matthieu, Sara, Audrey, Fanny, Elodie, Mervé, Sylvaine, vous avez été ma résidence secondaire, merci de m'avoir accueillie pour les mots fléchés, et autres divertissements.

Aux relecteurs de ma thèse, Rhéda, Carine, Marine, Angéline, Clémence (et Jazzie), et Fanny (merci pour non seulement le manuscrit mais pour tout le reste genre, m'avoir aidé à organiser mon bureau, et un peu ma vie quand même), votre soutien a été immense et important surtout pendant ce confinement !

A ma famille, merci de me soutenir dans ma vie professionnelle et personnelle, et d'avoir repoussé Noël cette année.

Merci à tous les copains, du labo et à l'extérieur, et surtout merci à mes amis, vous savez tout ce que vous représentez pour moi, Louis, Claire, bébé Romane, Joshua, Marine, Julien (tu as le droit à presque ta ligne pour toi tout seul j'espère que tu es content), Vincent, Aurélie, Clément, Carine.

Enfin à Clémence, aux bébées, et Jazzie, un immense merci pour tout et pour les années à venir.

## Liste des abréviations

ADH : Alcool Déshydrogénase

AMPA : Acide aminométhylphosphonique

ALAT : Alanine aminotransferase

ASAT : Aspartate aminotransferase

AVC : Accident vasculaire cérébral

BHE : Barrière hémato-encéphalique

CEH : Cellule étoilée hépatique

CFC : Circuit fronto-cérébelleux

CK : Cellule de Kupffer

CP : Circuit de Papez

DTI : Imagerie par tenseur de diffusion

DSM : Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux

EH : Encéphalopathie Hépatique

FA : Anisotropie Fractionnelle

GGT : Gamma-glutamyltranspeptidase

Iba1 : Ionized calcium-binding adapter molecule 1

IL : Interleukine

IRM : Imagerie par résonance magnétique

LCS : Liquide cérébro-spinal

LPS : Lipopolysaccharide

MCP-1 : Protéine chimio-attractante des monocytes-1

MIP : Protéine macrophage inflammatoire

MRS : Spectroscopie par résonance magnétique

NF- $\kappa$ B : Facteur nucléaire  $\kappa$ B

NMDA : N méthyl d aspartate

OMS : Organisation mondiale de la santé

PBS : Tampon phosphate salin

PRR : Récepteur de reconnaissance de motifs moléculaires

ROS : Radicaux libres oxygénés

SB : Substance blanche

SG : Substance grise

TEP : Tomographie par émission de positions

TLR : Recepteur de type Toll

TNF : Facteur de croissance transformant

TUAL : Trouble de l'usage de l'alcool

# Table des matières

|                                                                             |           |
|-----------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>INTRODUCTION .....</b>                                                   | <b>1</b>  |
| <b>I. L'ALCOOL : GENERALITES .....</b>                                      | <b>1</b>  |
| 1. <i>Historique .....</i>                                                  | 1         |
| 1.1 Depuis la nuit des temps .....                                          | 1         |
| 1.2 Les 19 <sup>e</sup> et 20 <sup>e</sup> siècle, un tournant décisif..... | 1         |
| 2. <i>Chiffres actuels .....</i>                                            | 3         |
| 3. <i>Le trouble de l'usage de l'alcool .....</i>                           | 4         |
| 3.1 Définition .....                                                        | 4         |
| 3.2 Les patients TUAL .....                                                 | 5         |
| 3.3 Facteur de risque et facteur aggravant .....                            | 6         |
| 4. <i>Modèles animaux (rongeurs) .....</i>                                  | 7         |
| 4.1 Les modèles d'alcoolisation chronique .....                             | 7         |
| 4.1.1 Souches préférentes .....                                             | 8         |
| 4.1.2 Souches non préférentes .....                                         | 8         |
| 4.2 Le « Binge Drinking » ou exposition intermittente.....                  | 9         |
| 5. <i>Pharmacocinétique de l'alcool .....</i>                               | 10        |
| 5.1 Absorption .....                                                        | 10        |
| 5.2 Distribution .....                                                      | 10        |
| 5.3 Métabolisme.....                                                        | 10        |
| 5.4 Élimination.....                                                        | 11        |
| 5.5 Condition pathologique .....                                            | 11        |
| <b>RESUME .....</b>                                                         | <b>12</b> |
| <b>II. ATTEINTES HEPATIQUES LIEES A L'ALCOOL.....</b>                       | <b>13</b> |
| 1. <i>Structure hépatique .....</i>                                         | 13        |
| 1.1 Anatomie .....                                                          | 13        |
| 1.2 Cellules non parenchymateuses.....                                      | 14        |
| 1.2.1 Cellules de Kupffer .....                                             | 14        |
| 1.2.2 Cellules étoilées hépatiques .....                                    | 15        |
| 2. <i>Mécanismes d'atteintes cellulaires du foie par l'alcool .....</i>     | 15        |
| 2.1 Stress oxydatif .....                                                   | 16        |
| 2.2 Stress du réticulum endoplasmique / Autophagie.....                     | 17        |

|       |                                                                |    |
|-------|----------------------------------------------------------------|----|
| 2.3   | Stéatose .....                                                 | 17 |
| 2.4   | Inflammation .....                                             | 18 |
| 2.4.1 | Inflammation aigüe et chronique.....                           | 18 |
| 2.4.2 | Origine de l'inflammation .....                                | 19 |
| 3.    | <i>Les atteintes hépatiques chez les patients TUAL</i> .....   | 20 |
| 3.1   | La maladie alcoolique du foie .....                            | 20 |
| 3.2   | Stéatose et fibrose hépatique .....                            | 21 |
| 3.3   | Biomarqueurs hépatiques .....                                  | 21 |
| 4.    | <i>L'atteinte hépatique dans les modèles de rongeurs</i> ..... | 22 |
|       | <b>RESUME</b> .....                                            | 23 |
| III.  | ATTEINTES CEREBRALES LIEES A L'ALCOOL.....                     | 24 |
| 1.    | <i>Atteintes cellulaires</i> .....                             | 24 |
| 1.1   | Atteinte neuronale et synaptiques.....                         | 24 |
| 1.2   | Neuroinflammation et microglie .....                           | 26 |
| 1.1   | Les astrocytes .....                                           | 28 |
| 2.    | <i>Atteintes structurales</i> .....                            | 29 |
| 2.1   | Travaux en neuroimagerie chez les patients TUAL.....           | 29 |
| 2.1.1 | Substance grise .....                                          | 29 |
| 2.1.2 | Substance blanche .....                                        | 30 |
| 2.1.3 | Spectroscopie par résonance magnétique .....                   | 32 |
| 2.1.4 | Le circuit fronto-cérébelleux et le circuit de Papez .....     | 32 |
| 2.2   | Travaux en neuroimagerie dans les modèles animaux .....        | 33 |
| 2.2.1 | Volumétrie .....                                               | 33 |
| 2.2.2 | DTI .....                                                      | 34 |
| 2.2.3 | Spectroscopie par résonance magnétique .....                   | 35 |
| 3.    | <i>Atteintes cognitives</i> .....                              | 35 |
| 3.1   | Études neuropsychologiques chez les patients TUAL.....         | 35 |
| 3.1.1 | Fonctions attentionnelles .....                                | 36 |
| 3.1.2 | Fonctions exécutives.....                                      | 36 |
| 3.1.3 | Mémoire épisodique.....                                        | 36 |
| 3.2   | Travaux comportementaux dans les modèles animaux.....          | 37 |
|       | <b>RESUME</b> .....                                            | 38 |
| IV.   | L'AXE FOIE-CERVEAU .....                                       | 39 |

|       |                                                                               |    |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.    | <i>L'encéphalopathie hépatique</i> .....                                      | 39 |
| 2.    | <i>Liens entre inflammation périphérique et cérébrale</i> .....               | 40 |
| 3.    | <i>Les voies de communication possibles</i> .....                             | 42 |
| 3.1.1 | Voie neurale .....                                                            | 42 |
| 3.1.2 | Voie humorale .....                                                           | 43 |
| 3.1.3 | Voie médiée par les cellules immunitaires .....                               | 43 |
| 4.    | <i>Rôle de l'intestin</i> .....                                               | 44 |
|       | <b>RESUME</b> .....                                                           | 45 |
|       | <b>OBJECTIFS</b> .....                                                        | 46 |
|       | <b>RESULTATS</b> .....                                                        | 48 |
|       | <b>ETUDE 1</b> .....                                                          | 49 |
|       | <b>MATERIELS &amp; METHODES</b> .....                                         | 50 |
| 1.    | <i>Animaux</i> .....                                                          | 51 |
| 2.    | <i>Protocole d'alcoolisation</i> .....                                        | 51 |
| I.    | <b>PROTOCOLE COMPORTEMENTAL</b> .....                                         | 51 |
| 1.    | <i>Tests comportementaux</i> .....                                            | 51 |
| 1.1   | Y-Maze .....                                                                  | 52 |
| 1.2   | Open field .....                                                              | 53 |
| 1.3   | Poutre d'équilibre .....                                                      | 53 |
| 1.4   | Fear conditioning .....                                                       | 53 |
| II.   | <b>PROTOCOLE D'IMAGERIE, PRELEVEMENTS SANGUINS ET IMMUNOHISTOCHIMIE</b> ..... | 55 |
| 1.    | <i>Imagerie par résonance magnétique cérébrale</i> .....                      | 55 |
| 1.1   | IRM anatomique .....                                                          | 55 |
| 1.2   | IRM de diffusion (DTI) .....                                                  | 56 |
| 1.3   | Spectroscopie par résonance magnétique .....                                  | 56 |
| 2.    | <i>Prélèvements sanguins et dosages</i> .....                                 | 57 |
| 2.1   | Prélèvement intracardiaque et perfusion intracardiaque .....                  | 57 |
| 2.2   | Dosage des niveaux d'alcool sanguins et des transaminases hépatiques .....    | 58 |
| 2.3   | Dosage des cytokines .....                                                    | 58 |
| 3.    | <i>Immunohistochimie</i> .....                                                | 58 |
| 3.1   | Anticorps primaires .....                                                     | 59 |



|      |                                                                               |     |
|------|-------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.2  | Anticorps secondaires .....                                                   | 60  |
| III. | PROTOCOLE MINOCYCLINE .....                                                   | 60  |
| IV.  | ANALYSES STATISTIQUES.....                                                    | 61  |
|      | RESULTATS .....                                                               | 62  |
| I.   | CARACTERISATION DU MODELE .....                                               | 62  |
| II.  | PROTOCOLE COMPORTEMENTAL .....                                                | 63  |
| 1.   | <i>Mémoire spatiale : Y maze</i> .....                                        | 63  |
| 2.   | <i>Activité locomotrice et anxiété : Open field</i> .....                     | 63  |
| 3.   | <i>Équilibre et motricité fine : Poutre d'équilibre</i> .....                 | 65  |
| 4.   | <i>Mémoire émotionnelle : Fear conditioning</i> .....                         | 67  |
| III. | PROTOCOLE D'IMAGERIE, DOSAGES SANGUINS ET IMMUNOHISTOCHIMIE.....              | 69  |
| 1.   | <i>Imagerie cérébrale</i> .....                                               | 69  |
| 1.1  | Volumétrie.....                                                               | 69  |
| 1.2  | Diffusion.....                                                                | 69  |
| 2.   | <i>Niveaux d'alcool sanguin</i> .....                                         | 70  |
| 3.   | <i>Enzymes hépatiques</i> .....                                               | 71  |
| 4.   | <i>Cytokines circulantes</i> .....                                            | 71  |
| 5.   | <i>Immunohistochimie</i> .....                                                | 72  |
| 5.1  | Immunohistochimie cérébrale .....                                             | 72  |
| 5.2  | Immunohistochimie hépatique .....                                             | 74  |
| IV.  | PROTOCOLE MINOCYCLINE .....                                                   | 75  |
| 1.   | <i>Évaluation comportementale</i> .....                                       | 75  |
| 2.   | <i>Impact de la minocycline sur la consommation volontaire d'alcool</i> ..... | 77  |
|      | DISCUSSION .....                                                              | 78  |
|      | <b>ETUDE 2</b> .....                                                          | 85  |
|      | <b>DISCUSSION</b> .....                                                       | 129 |
| 1.   | <i>Synthèse des résultats</i> .....                                           | 131 |
| 2.   | <i>Chronologie des atteintes liées à l'alcool</i> .....                       | 132 |
| 3.   | <i>Inflammation périphérique et altérations cérébrales</i> .....              | 133 |
| 4.   | <i>Activation microgliale, astrocytes, neurones et neutrophiles</i> .....     | 133 |

|                                          |                                                                              |            |
|------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 5.                                       | <i>L'axe intestin-foie-cerveau .....</i>                                     | <i>135</i> |
| 6.                                       | <i>Un rôle du sevrage ou de la déshydratation dans les atteintes ? .....</i> | <i>137</i> |
| 7.                                       | <i>Transposabilité des modèles .....</i>                                     | <i>138</i> |
| 8.                                       | <i>Conclusion générale .....</i>                                             | <i>139</i> |
| <b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b> |                                                                              | <b>141</b> |
| <b>ANNEXES .....</b>                     |                                                                              | <b>164</b> |

# INTRODUCTION

## I. L'ALCOOL : GENERALITES

### 1. Historique

#### 1.1 Depuis la nuit des temps

L'Homme consomme de l'alcool depuis des millénaires, pour des raisons hédonistes mais aussi pour ses propriétés mystiques. La première représentation d'un homme buvant une boisson alcoolisée daterait du Paléolithique avec la sculpture de la Vénus de Laussel retrouvée sur le mur d'une grotte. Quant à la production, elle plongerait ses racines dans le Néolithique : en Europe, l'Homme découvre et entame la production de vin après avoir consommé l'alcool issu de la fermentation des fruits de vignes sauvages. Tandis que dans le Croissant Fertile, l'essor de l'agriculture permet la production de céréales, qui sont alors brassées pour produire de la bière. À partir de l'Antiquité, l'alcool est associé aux cultes et à la religion. C'est ainsi que la Bible attribue à Noé la première plantation de vignes tandis que les Romains et les Grecs honorent Bacchus et Dionysos lors de cérémonies où l'alcool coule à flot. Alors consommé au quotidien, dans toutes les classes de la société, l'alcool trouve aussi bien sa place dans les tavernes que dans les maisons mais en fonction de sa qualité et de sa rareté, il devient rapidement un marqueur d'ascension sociale. Des mises en garde existent cependant déjà contre sa consommation excessive, en particulier contre l'ivresse. Ces invitations à la modération sont en revanche peu respectées, en particulier au Moyen-Âge où l'eau potable vient à manquer. Au XVIIe siècle, bien que la qualité de l'eau s'améliore, le développement des techniques de distillation permet d'accroître la place des spiritueux sur le marché de l'alcool. Deux siècles plus tard, la révolution industrielle va permettre une commercialisation de l'alcool accessible à toutes les classes de la société.

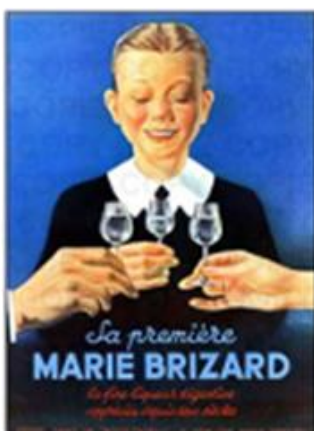
#### 1.2 Les 19<sup>e</sup> et 20<sup>e</sup> siècle, un tournant décisif

Depuis la révolution industrielle, le marché de l'alcool est prédominant dans toutes les classes sociales et la publicité est son meilleur allié. En effet, la consommation d'alcool, qu'elle soit festive ou régulière, est perçue différemment de l'ivresse alcoolique, qui elle, reste mal vue en société.

Au milieu du XIX<sup>e</sup> siècle, le médecin suédois Magnus Huss emploie pour la première fois le terme d'alcoolisme pour décrire les atteintes physiques et comportementales causées par la surconsommation d'alcool. En France, l'alcool est consommé quotidiennement, notamment chez les enfants où la consommation de vin est répandue. L'alcoolisme fait des ravages, particulièrement dans les classes ouvrières, entraînant le développement des premières ligues antialcooliques. Celles-ci se multiplient à partir de la fin du XIX<sup>e</sup> siècle. Outre-Atlantique, la Prohibition des années 1920 au milieu des années 1930 entraîne l'interdiction officielle de la vente de l'alcool. Un vaste marché noir approvisionne alors les consommateurs au moyen d'alcool de contrebande, et nous en retiendrons le célèbre nom d'Al Capone qui en tira profit pour installer et asseoir son empire.

En France, il faudra attendre le milieu du XX<sup>e</sup> siècle pour que le gouvernement prenne des mesures d'action publique de grande ampleur. Les campagnes de prévention se multiplient et la réglementation évolue. Dans les années 1950, l'alcool est interdit dans les cantines scolaires et les premières timides mesures contre l'alcool au volant apparaissent mais ne concernent que l'état d'ivresse manifeste. La publicité pour l'alcool n'est alors pas réglementée et vise toute la population (Illustration 1A). À la fin du XX<sup>e</sup> siècle, la tendance s'accroît : limite d'alcoolémie au volant, messages de prévention clairs (Illustration 1B). Pour la première fois le gouvernement vote pour un encadrement strict de la publicité quel que soit le support et notamment pour protéger la jeunesse grâce à la loi Evin de 1991. Les pouvoirs publics continuent en ce sens aujourd'hui : encadrement de la consommation, campagne de prévention ou encore sensibilisation sur les risques relatifs à l'alcool, qu'ils soient directs ou

A



B

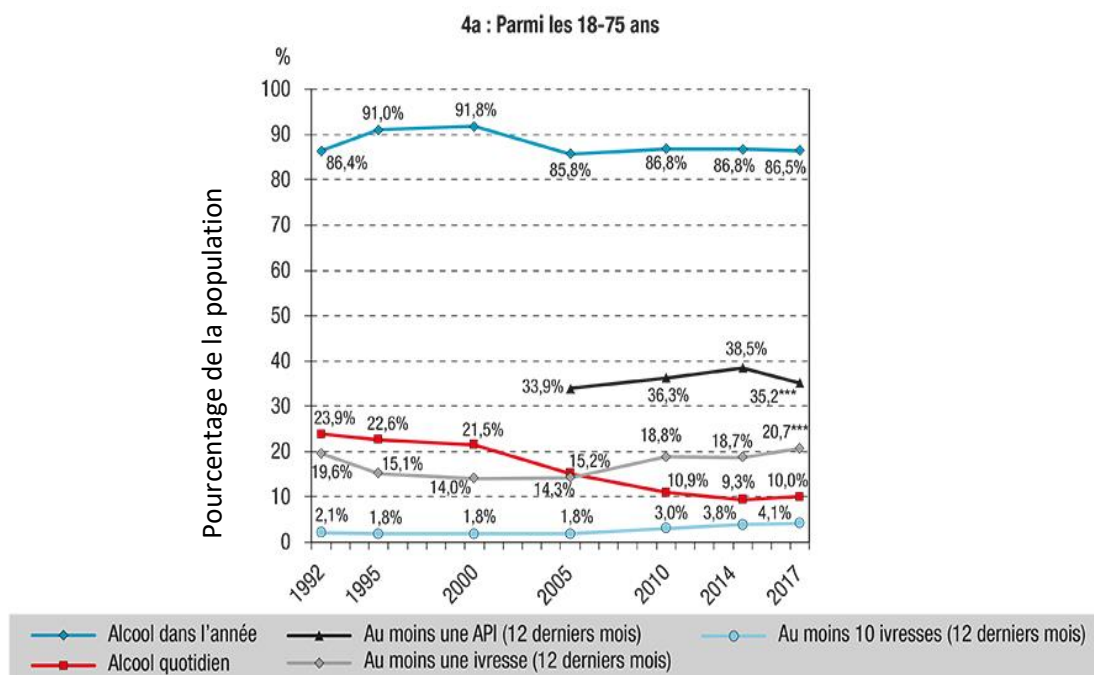


**Figure 1 : Exemple de campagnes publicitaires** A) Publicités pour l'alcool de la première moitié du 19<sup>e</sup> siècle. B) Campagne publicitaire du Comité Français d'Éducation pour la Santé (Cabu, 1984)

indirects (santé, mise en danger de soi et d'autrui, isolement). Cependant, l'influence des lobbies de l'alcool dans la sphère politique est un frein majeur à ces avancées. La loi Evin a été modifiée à plusieurs reprises et largement assouplie en 2016, la référence aux régions de production, à des indications géographiques ou au patrimoine culturel associé à une boisson alcoolisée les dissocie de la publicité. La loi qui visait à restreindre la publicité autour de l'alcool a finalement été étendue à plus de moyens de communications. Encore en 2019, une proposition de loi a été déposée pour rétablir la vente d'alcool dans les stades (qui avait été interdite dans le texte de 1991). Les messages transmis par le gouvernement ne sont pas toujours en adéquation avec les recommandations de santé publique. En début d'année 2019, les propos du ministre de l'agriculture M. Guillaume qui ne considérait pas le vin comme un alcool comme les autres ont provoqué un débat avec la ministre des Solidarités et de la Santé Mme. Buzyn, qui est publiquement engagée depuis des années contre les dangers de la consommation de vin. En effet, le vin est une boisson alcoolisée au même rang que les autres mais cette vision du vin comme un alcool « à part » est sans cesse relayée par des personnalités politique et appuyée par le Président de la République M. Macron qui refuse de durcir la loi Evin durant son mandat. Ceci montre la complexité de la problématique en France et qui reste d'actualité.

## 2. Chiffres actuels

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), chaque année plus de 3 millions de personnes meurent dans le monde des suites de consommation nocive d'alcool (consommation journalière de 40g pour les femmes et 60g pour les hommes ou intoxications récurrentes ; OMS, 2012). En France, depuis le lancement des campagnes de prévention il y a un demi-siècle, la consommation d'alcool annuelle moyenne a diminué de façon régulière (11,7 litres par habitant en 2017). Depuis 2013, elle reste cependant stable et 10% de la population consomment de l'alcool quotidiennement (Figure 2 ; [Andler et al., 2019](#)). Malgré cette baisse de la consommation, l'alcool reste la deuxième cause de mortalité évitable (49 000 morts par an) derrière le tabac ([Rehm, 2011](#)). Les recommandations en vigueur conseillent un maximum de 2 verres par jour dans la limite de 10 verres par semaine avec au moins un jour sans alcool (Santé publique France). Cependant, une étude récente montre que toute consommation d'alcool entraîne des risques pour la santé qui augmentent avec la



**Figure 2 : Évolution des indicateurs de consommation d'alcool entre 1992 et 2017 en France métropolitaine.** D'après Andler et al., 2019.

quantité d'alcool consommée (Griswold et al., 2018). L'alcool induit de nombreuses complications tant au niveau social, familial que professionnel. Il est surtout la cause directe de nombreuses pathologies (dépendance, syndrome d'alcoolisation fœtale, cirrhose, cancers, encéphalopathies) et contribue au développement et à l'apparition d'autres pathologies (cardio-vasculaires, digestives, pulmonaires et même à l'apparition de démence (Connor et al., 2016; Schwarzingier et al., 2018).

### 3. Le trouble de l'usage de l'alcool

#### 3.1 Définition

Le terme d'alcoolisme est resté associé à une image négative et souvent empreinte de jugement envers le patient. Ce terme est devenu l'alcoolodépendance qui cette fois-ci ajoute la notion pathologique de la dépendance et n'inclut plus uniquement le patient. Le trouble de l'usage de l'alcool (TUAL) est désormais défini comme une pathologie cérébrale chronique et récurrente caractérisée par son haut taux de rechute (Koob & Volkow, 2016). En 2013, la cinquième édition du Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux (en anglais

*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* ou DSM-5 ; (American Psychiatric Association, 2013) a proposé de ne plus considérer la consommation excessive d'alcool par une approche catégorielle (dépendance vs abus, DSM-IV, (Rabe-Jablonska & Bienkiewicz, 1994) mais comme un continuum de sévérité, allant de léger à modéré jusqu'à sévère selon le nombre de critères présentés (11 maximum) (Table 1).

| <b>Trouble de l'usage d'alcool (DSM 5) : critères et définitions</b> |                                                                            |
|----------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| Désir persistant                                                     | Apparition fréquente d'envies de consommer                                 |
| Poursuite malgré les conséquences physiques ou psychologiques        | Poursuite malgré des complications médicales (cirrhose, dépression, etc)   |
| Temps important consacré à l'utilisation                             | Centration du rythme de vie sur le produit                                 |
| Abandon des activités socio-professionnelles                         | Réduction des activités sociales ou professionnelles                       |
| Perte du contrôle de l'utilisation                                   | Consommations plus importantes ou fréquentes que prévues                   |
| Tolérance                                                            | Augmentation de la dose ou du temps consacré pour obtenir un même effet    |
| Symptômes de sevrage                                                 | Survenue de signes de « manque » à l'arrêt de la consommation              |
| Incapacité à remplir des obligations majeures                        | Incapacité à aller travailler, à aller chercher ses enfants à l'école      |
| Utilisation répétée malgré le danger physique                        | Conduite de machine ou de voiture en état d'alcoolisation, prise de risque |
| Utilisation malgré des problèmes interpersonnels                     | Remarques de la famille, de l'employeur                                    |
| Craving                                                              | Pensées envahies par le désir de consommer, source de souffrance           |

**Table 1 : Critères et définitions correspondantes du trouble de l'usage de l'alcool selon le DSM-5.**

### 3.2 Les patients TUAL

Le trouble de l'usage de l'alcool se caractérise par une prévalence de presque 14% dans la population mondiale (Grant *et al.*, 2015) et l'espérance de vie des patients avec une dépendance à l'alcool est diminuée de 20 ans (John *et al.*, 2013). Le TUAL est associé à des altérations motrices notamment de l'équilibre et à une variété de troubles cognitifs pour 50 à 80 % des patients (Ihara *et al.*, 2000; Oscar-Berman *et al.*, 2014). En plus des atteintes

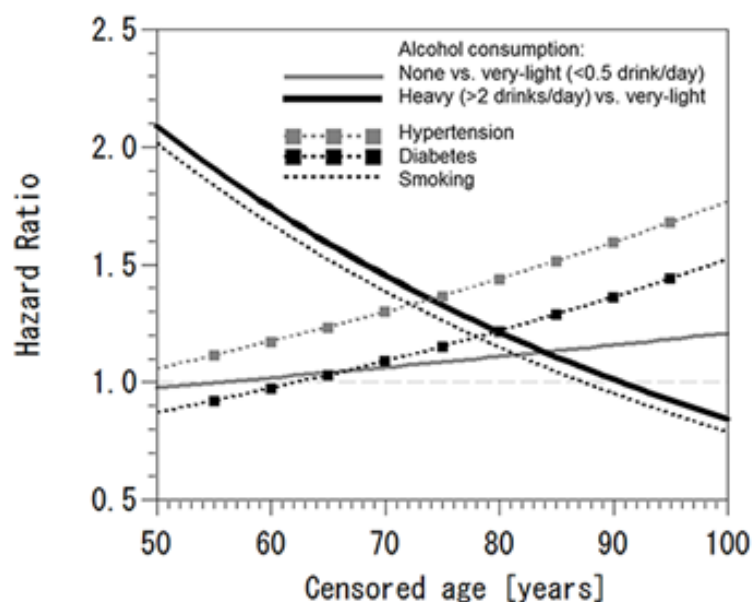


cérébrales et cognitives (voir III. Atteintes cérébrales), les patients TUAL présentent plus de risque de développer une maladie alcoolique du foie (voir II. 3 La maladie alcoolique du foie) dépendamment de la durée et de la quantité d'alcool consommée (Addolorato *et al.*, 2016).

### 3.3 Facteur de risque et facteur aggravant

#### *Facteur de risque*

La consommation d'alcool est un facteur de risque de développer de nombreuses pathologies, même de manière indirecte. Les consommateurs d'alcool augmentent leur risque de développer des maladies cardio-vasculaires, des accidents vasculaires cérébraux (AVC), des cancers, des maladies infectieuses (Rehm, 2011). Si nous prenons l'exemple de l'AVC, il a été montré que la relation entre consommation d'alcool et risque d'AVC suivait une allure de courbe en J avec un effet protecteur de faible consommation et une augmentation du risque avec une consommation plus importante (Sacco *et al.*, 1999). Cependant la consommation de deux verres d'alcool par jour augmente le risque d'AVC de façon âge dépendant plus importante que l'hypertension et le diabète, et diminue de 5 ans l'âge moyen de la survenue de l'AVC (Figure 3, (Kadlecová *et al.*, 2015)).



**Figure 3 :** Variation de l'influence de divers facteurs de risque d'AVC (consommation d'alcool, hypertension et diabète) en fonction de l'âge. D'après (Kadlecová *et al.*, 2015).

### *Facteur aggravant*

L'alcool est non seulement un facteur de risque mais peut aussi être un facteur aggravant de certaines pathologies. Ceci a été par exemple montré dans le cas de l'AVC : chez les patients ayant consommé de l'alcool, les lésions consécutives à l'AVC étaient plus graves (Ducroquet *et al.*, 2013). Cette notion de facteur aggravant nous a particulièrement intéressé au laboratoire, et en 2015 Lemarchand et collaborateurs ont trouvé, dans un modèle animal, que six semaines d'alcoolisation augmentaient le volume de lésion ischémique et annulaient le bénéfice de la fibrinolyse, seul traitement pharmacologique existant pour l'AVC (Lemarchand *et al.*, 2015). Nous avons alors montré, dans une étude translationnelle que l'aggravation des lésions ischémiques était médiée par un *priming* inflammatoire neurovasculaire (caractérisé par l'augmentation du nombre de macrophages périvasculaires accompagnée de l'activation de la microglie) causé par une exposition à l'alcool (Drieu *et al.*, 2020) ; Voir annexe).

## 4. Modèles animaux (rongeurs)

Pour comprendre la physiopathologie du TUAL et mettre au point des traitements, il est indispensable d'utiliser des modèles animaux. Il existe quelques modèles d'exposition chronique à l'alcool pour étudier le TUAL, mais aussi d'autres modes de consommation plus éloignés comme le « binge drinking ».

### 4.1 Les modèles d'alcoolisation chronique

Il existe plusieurs modèles pour étudier l'alcoolisation chronique chez le rongeur, que nous classerons ici selon qu'ils impliquent des modes d'administration volontaire (souches préférentes) ou forcée (souches non préférentes). Dans tous les cas, l'expérimentateur mesure une ou plusieurs fois par semaine l'ingestion d'alcool, mais ne contrôle pas l'instant précis où l'animal boit dans la journée. Dans les deux modalités, l'ajout d'un régime spécifique peut être mis en place afin de modéliser les déficits nutritionnels pouvant être observés chez les patients (Vetreno *et al.*, 2011).

#### 4.1.1 Souches préférantes

Les souches génétiquement sélectionnées pour leur préférence à l'alcool permettent de mimer la pathologie humaine de par l'administration volontaire d'alcool. Les principales souches utilisées sont : la cHAP (*crossed high alcohol preferring*) pour la souris, et les msP (pour *Marchigian Sardinian alcohol-preferring*) et les sP (pour *Sardinian alcohol-preferring*) pour les rats. Ces souches sont un bon modèle de TUAL compte tenu de leur mode de consommation volontaire, de la quantité d'alcool ingérée et des aspects comportementaux (Colombo *et al.*, 2006; Domi *et al.*, 2019). Ainsi, lorsque celles-ci sont exposées à un biberon contenant de l'alcool et un biberon contenant de l'eau, elles choisissent à 98% de consommer le biberon contenant de l'alcool (Colombo *et al.*, 2006). Nous avons utilisé les sP rats dans l'étude translationnelle sur le rôle de l'inflammation dans les atteintes cérébrales et hépatiques (article en soumission, voir étude 2). Cependant, elles semblent avoir des résistances aux atteintes hépatiques causées par l'alcool comparées aux souches sauvages (Thompson *et al.*, 2017).

#### 4.1.2 Souches non préférantes

Si les souches génétiquement sélectionnées font de bons modèles de TUAL, il est possible, avec des souris sauvages, d'atteindre les mêmes niveaux de consommation d'alcool en réalisant une exposition forcée. Ce type d'exposition est forcée (mais non-invasive) car durant les animaux n'ont accès, comme source de boisson, qu'à un biberon contenant de l'alcool. Ce modèle permet d'étudier une alcoolisation sur du plus ou moins long terme sans interférence avec le facteur génétique. Nous avons utilisé ce modèle dans l'étude du développement des atteintes cérébrales et hépatiques dans l'alcoolisation chronique (article en préparation, voir étude 1).

Dans la plupart des études la concentration d'alcool dans le biberon d'eau est comprise entre 5 et 20% (volume pour volume ; (Alfonso-Loeches *et al.*, 2010, 2013; Vetreno *et al.*, 2011; Ehrlich *et al.*, 2012). Ces méthodes non invasives et non traumatisantes permettent des expositions à l'alcool sur des périodes pouvant varier de plusieurs jours à plusieurs mois (Ehrlich *et al.*, 2012; Alfonso-Loeches *et al.*, 2012).

Il existe aussi des modèles d'exposition chronique à l'alcool via son administration intrapéritonéale ou intragastrique. Ces modèles, moins écologiques, car invasifs, présentent l'avantage de pouvoir contrôler le moment de l'ingestion d'alcool, et de pouvoir administrer

des fortes doses d'alcool en une seule fois dans la journée. Ces méthodes permettent aussi de mimer des sevrages répétés (Olsen *et al.*, 2005) ainsi que des atteintes hépatiques en combinaison avec des régimes alimentaires enrichis (Thompson *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017). L'injection intrapéritonéale a l'avantage d'être rapide et simple à réaliser. De plus, des faibles doses injectées permettent d'induire une intoxication à l'alcool sans l'effet sédatif de celui-ci tout en mettant en évidence des atteintes comportementales (Pascual *et al.*, 2012). Mais l'injection *per se* a de nombreuses limites du fait de son caractère douloureux, de l'induction d'un stress local pouvant s'accompagner d'une atteinte inflammatoire (Seth *et al.*, 2010).

#### 4.2 Le « Binge Drinking » ou exposition intermittente

L'OMS définit le « binge drinking » par la prise de 5 verres ou plus en une seule occasion (un verre = 10g d'alcool). Afin d'étudier les mécanismes physiopathologiques de cette pratique de consommation d'alcool, plusieurs modèles animaux ont été mis en place. Il est rare que l'épisode de « binge drinking » soit unique, c'est pourquoi la plupart des modèles ne miment pas un épisode unique d'intoxication à l'éthanol.

Pour s'affranchir des limites des méthodes invasives, l'exposition par *vapor chamber* est aussi couramment utilisée dans l'étude du « binge drinking ». Les animaux inhalent les vapeurs d'alcool qui pénètrent aussi la peau. La concentration d'alcool inhalée ainsi que le temps d'exposition est modulable et permet d'obtenir des hauts niveaux d'alcool sanguins. Cependant, cette approche ne permet pas d'étudier les comportements associés à la pratique du « binge drinking » (Jeanblanc *et al.*, 2019).

Il est aussi possible d'obtenir des modèles volontaires de « binge drinking » notamment en remplaçant le biberon d'eau par un biberon contenant de l'alcool pendant la période de la nuit la plus active pour les rongeurs ou certaines heures dans la journée (Fritz & Boehm, 2016). Des modèles de « binge drinking » ont également été développés par conditionnement opérant dans lesquels l'administration d'alcool se fait par un levier actionné par l'animal. Sur des courtes périodes, cette méthode a montré que les animaux atteignaient des hauts niveaux d'alcool dans le sang (Jeanblanc *et al.*, 2019).

## 5. Pharmacocinétique de l'alcool

### 5.1 Absorption

De par ses propriétés liposolubles, hydrosolubles et son faible poids moléculaire (46 Da), la molécule d'éthanol peut passer les barrières du corps humain comme la barrière hématoencéphalique. Bien que plusieurs voies d'administration de l'alcool existent, la principale est la voie orale, lorsque l'alcool est consommé dans une boisson. L'alcool passe alors par le tractus gastrointestinal pour être distribué dans le corps humain.

### 5.2 Distribution

Après son passage dans le tractus gastrointestinal, l'alcool parvient dans le foie par la veine porte, puis est distribué dans le cœur, les poumons, revient dans le cœur et enfin entre dans la circulation systémique. Par son hydrosolubilité, l'alcool se distribue dans la totalité de l'eau du corps humain (soit environ 50 à 60% de la masse). De fait, sa distribution est donc influencée par le poids, l'âge et le genre dont la proportion en eau dépend.

### 5.3 Métabolisme

Avant d'atteindre la circulation sanguine, l'effet de premier passage de l'alcool a lieu dans le foie ou dans l'estomac. Cependant, le principal lieu de métabolisation de l'alcool se trouve dans le foie, qui produira alors de l'énergie lors de ce processus. La première étape de métabolisation de l'alcool se déroule dans le cytosol des hépatocytes où l'éthanol est converti en acétaldéhyde par l'alcool déshydrogénase. L'acétaldéhyde produit est plus toxique que l'éthanol mais est ensuite dégradé dans les mitochondries en acide acétique - par l'aldéhyde déshydrogénase - et quitte le foie pour participer au cycle de Krebs. Le métabolisme de l'alcool entraîne un déséquilibre dans la balance  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  ainsi que lactate/pyruvate ce qui peut amener à une acidose.

Lorsque de grandes quantités d'alcool doivent être éliminées, une deuxième voie de métabolisation est engagée : la voie du cytochrome P450 2E1, responsable de l'oxydation de l'alcool. Ces deux voies métaboliques, d'une part par la production déséquilibrée de NADH et d'autre part de radicaux libres oxydants, ont des effets délétères notamment en augmentant

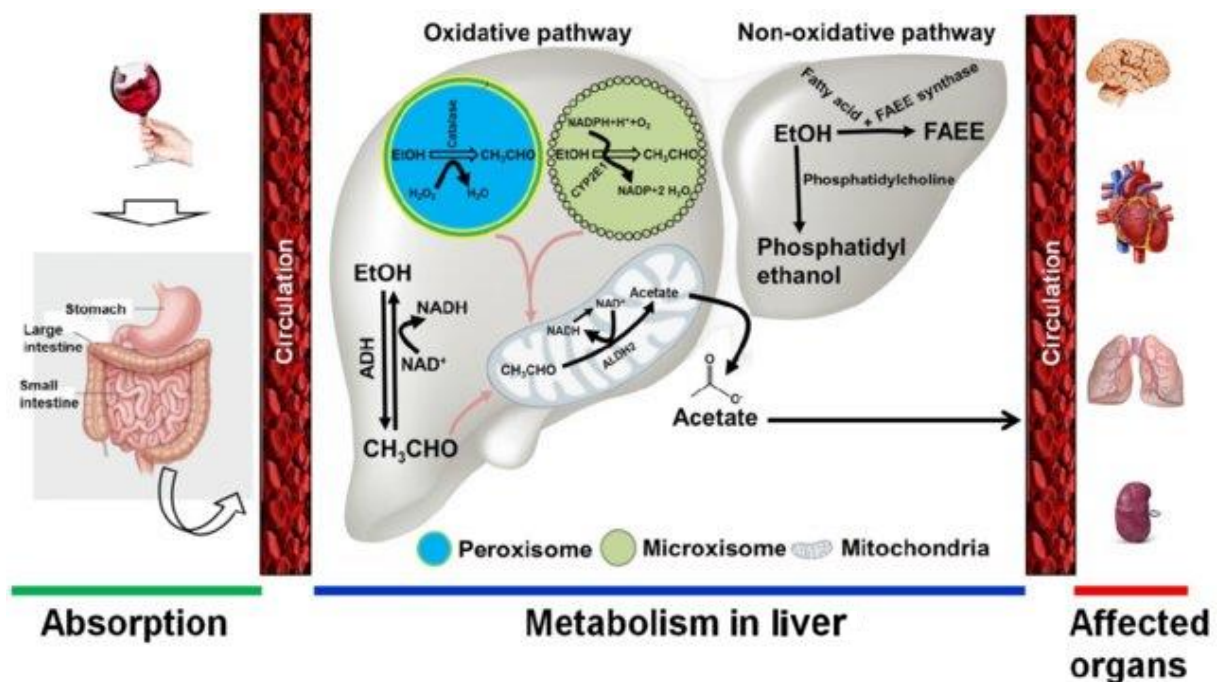
le stress oxydatif et la peroxydation lipidique, et provoquant des dommages à l'ADN. Il existe une dernière voie de métabolisation de l'alcool, non oxydative, par la production d'acide gras éthyl ester et de phosphatidyl ethanol. Ces différentes voies sont résumées dans la **Figure 4**.

#### 5.4 Élimination

L'élimination normale de l'alcool est réalisée à plus de 90% par le métabolisme oxydatif vu plus haut. La part restante est excrétée *via* les poumons (air expiré), les reins (urine), et la peau (sueur).

#### 5.5 Condition pathologique

Si la quantité d'alcool ingérée est trop importante, la capacité métabolique du foie est dépassée et l'alcool en excès passe alors dans la circulation sanguine générale. L'alcool est alors distribué dans l'ensemble de l'organisme dont le cerveau.



**Figure 4 : Schématisation de la pharmacocinétique de l'alcool après ingestion.** EtOH : Ethanol ; ADH : alcool déshydrogénase ; FAEE : acides gras éthyl ester. D'après (Mandal C, 2018)

## Résumé

L'alcool est intégré et banalisé comme un produit de consommation courant dans nos sociétés. Pourtant, il est la cause de nombreux décès et de pathologies tout autour du globe. Chez l'Homme, les comorbidités associées aux consommations d'alcool rendent difficile l'étude de l'alcool sans facteurs associés. Afin d'y remédier, des modèles animaux ont été développés pour représenter le large spectre des consommations d'alcool chez l'homme. Ceux-ci permettent non seulement de s'affranchir des comorbidités présentes chez l'homme afin d'explorer les mécanismes physiopathologiques de l'échelle moléculaire à comportementale mais aussi d'étudier les facteurs de l'hétérogénéité de la pathologie alcoolique ainsi que la temporalité des atteintes.

Avant d'être distribué dans l'organisme, l'alcool est métabolisé dans le foie, nous allons exposer dans la partie suivante les atteintes qu'il peut y provoquer.

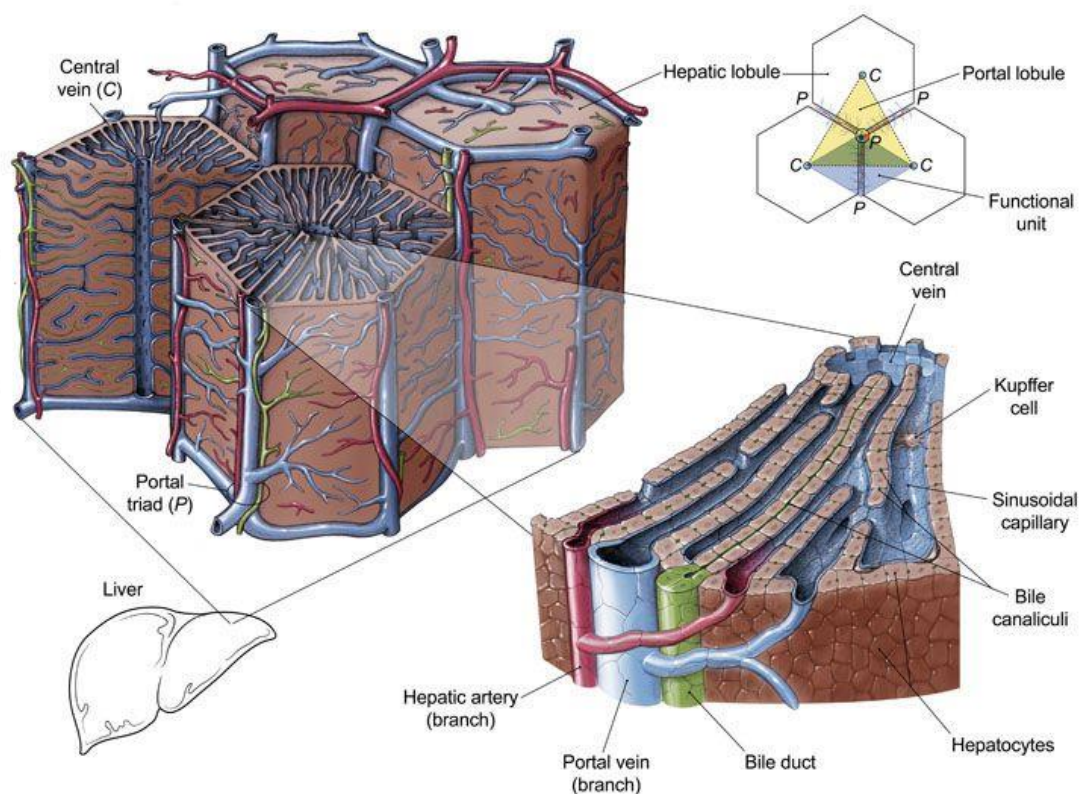


## II. ATTEINTES HEPATIQUES LIEES A L'ALCOOL

### 1. Structure hépatique

#### 1.1 Anatomie

Le foie est le plus gros organe du corps, que ce soit chez l'homme ou chez les rongeurs. Il est composé de plusieurs lobes (deux chez l'homme, cinq chez les rongeurs) qui sont structurellement divisés en lobules (**Figure 5**). Chaque lobule se caractérise par sa forme hexagonale et est limité à ses angles par les espaces portes (branche de la veine porte et de l'artère hépatique et du canal biliaire) et en son centre par la veine centrale. L'acinus hépatique est l'unité fonctionnelle, il est de forme losangique, ses limites sont définies dans sa longueur par les veines centrales et dans la largeur par les espaces portes (**Figure 5**). Le

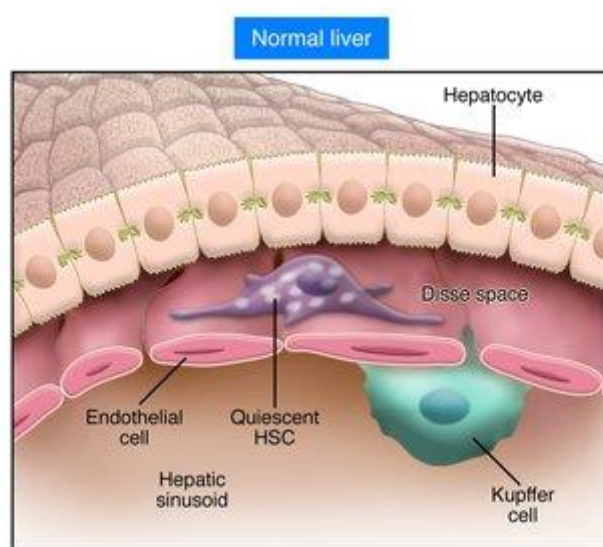


*Figure 5 Architecture hépatique : détails d'un lobule et de sa constitution*

parenchyme hépatique est composé d'hépatocytes séparés par des capillaires sinusoides très nombreux. Ces sinusoides sont bordés d'un épithélium fenestré et discontinu et sont



dépourvus de membrane basale, ce qui facilite le passage des solutés dans l'espace de Disse puis dans le parenchyme (**Figure 6**, (Zimmermann *et al.*, 2012)).



**Figure 6 : Représentation de l'espace de Disse hépatique.** Sinusoi hépatique, cellules endothéliales, cellule étoilée hépatique quiescente, cellule de Kupffer, hépatocyte. HSC : Cellule étoilée hépatique. D'après (Iredale, 2007)

## 1.2 Cellules non parenchymateuses

Les hépatocytes constituent 60% des cellules hépatiques, les 40% restant sont des cellules non parenchymateuses localisées dans les sinusoi. Les principaux types de cellules non parenchymateuses sont les cellules de Kupffer (CK), les cellules étoilées hépatiques (CEH) et les cellules endothéliales (**Figure 4**). Nous nous intéresserons ici particulièrement aux CK et CEH.

### 1.2.1 Cellules de Kupffer

Le foie a un rôle central dans la réponse immunitaire. Il a longtemps été caractérisé par un système réticuloendothélial très étendu (Ishibashi *et al.*, 2009) maintenant appelé système phagocytaire mononucléaire (Zimmermann *et al.*, 2012). En effet, les macrophages résidents hépatiques, aussi appelés CK constituent la plus grande proportion de macrophage résidents de l'organisme et 30% de la population cellulaire hépatique. Ce sont les principales cellules hépatiques phagocytiques, présentatrices d'antigènes et productrices de cytokines. Les CK sont situées dans la lumière des sinusoi. Elles sont les premières en contact avec les

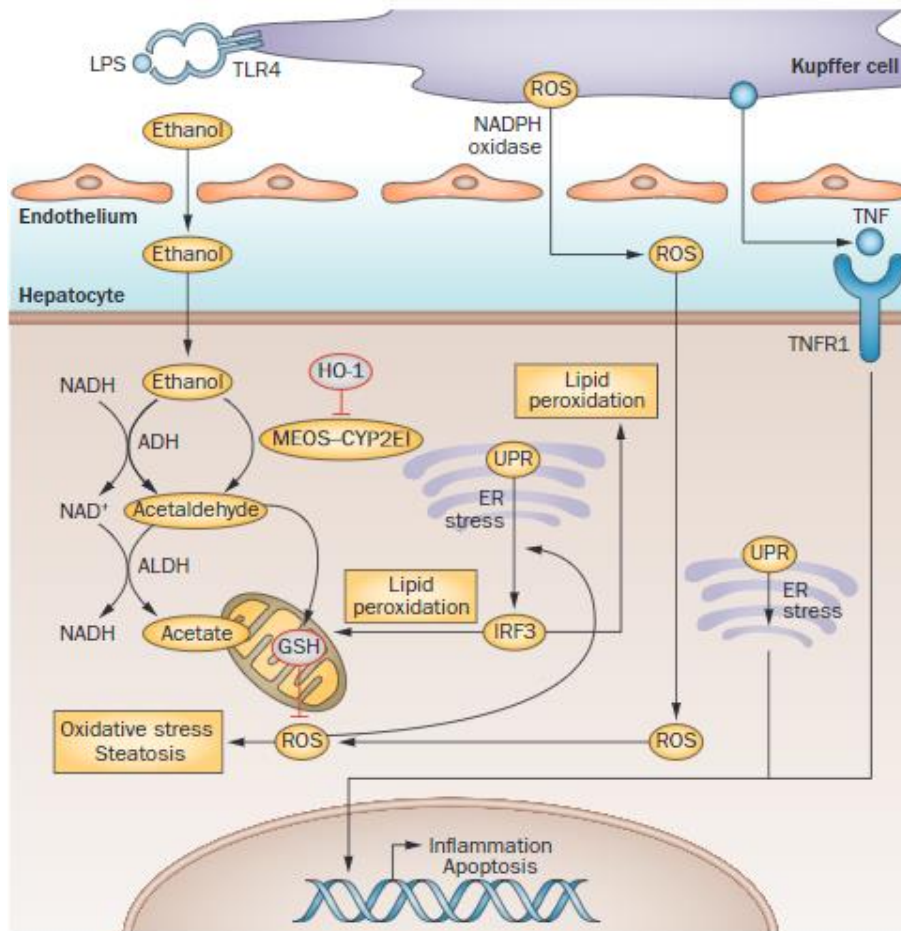
pathogènes provenant de la circulation sanguine et sont donc responsables de leur élimination (Ishibashi *et al.*, 2009).

### 1.2.2 Cellules étoilées hépatiques

Les CEH, aussi appelées cellules d'Ito, ou « *fat storing cells* » ont d'abord été décrite pour leur rôle de stockage de la vitamine A. Elles sont aussi responsables des mécanismes de mise en place de la fibrose hépatique (voir II.3 Les atteintes hépatiques chez les patients TUAL) (Hendricks *et al.*, 1985). Elles sont localisées dans l'espace de Disse, entre les cellules endothéliales et les hépatocytes. Elles sont la principale source de production de composants de la matrice extracellulaire en conditions physiologiques et pathologiques. Leur activation se caractérise par la perte de leur contenu en vitamine A et la transition vers un phénotype de type myofibroblastique améboïde (Blanc *et al.*, 1997).

## 2. Mécanismes d'atteintes cellulaires du foie par l'alcool

Nous avons vu précédemment que le lieu de la métabolisation de l'alcool se fait principalement dans le foie et plus particulièrement dans les hépatocytes (Voir I.5. Pharmacocinétique de l'alcool). La production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS pour *Reactive Oxygen Species*) provoque du stress oxydatif, du stress du réticulum endoplasmique et de la stéatose. Ces réactions peuvent mener à des phénomènes d'inflammation et d'apoptose au niveau du foie (Figure 7 ; (Louvet & Mathurin, 2015)).



**Figure 7: Métabolisme de l'alcool et atteintes cellulaires associées.**

ER stress : stress du réticulum endoplasmique, ROS : espèce réactives oxygénées. D'après (Louvet A, 2015).

## 2.1 Stress oxydatif

Comme nous l'avons déjà évoqué, la principale voie de métabolisation de l'éthanol est sa transformation en acétaldéhyde *via* des processus d'oxydation qui génèrent des ROS telles que le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ) (Louvet & Mathurin, 2015). Ces processus ayant majoritairement lieu dans les hépatocytes, ces derniers constituent les principales cellules affectées directement par la toxicité de l'alcool. Des cultures d'hépatocytes de rats alcoolisés ou non ont montré que la métabolisation de l'alcool augmentait la production de ROS, générant une atteinte hépatocytaire et induit de l'apoptose. De plus, ces atteintes étaient bloquées par l'administration d'antioxydants (Wu & Cederbaum, 2003). Une étude précédente sur des cultures d'hépatocytes traitées avec de l'alcool avait aussi montré une mort cellulaire, une augmentation du stress oxydatif avec des atteintes

mitochondriales. Ces atteintes étaient elles aussi prévenues par des antioxydants (Wu & Cederbaum, 1999). De façon chronique, l'exposition à l'alcool réduit le taux de glutathion (qui est le principal facteur antioxydant dans le foie) provoquant une augmentation de la sensibilité cellulaire au stress oxydatif (Louvet & Mathurin, 2015). Les ROS sont aussi produites par les CK par la NADPH oxydase dans les CK (Wheeler *et al.*, 2001), contribuant à l'augmentation de cytokines inflammatoires (Dixon *et al.*, 2013).

Dans des modèles animaux de maladie alcoolique du foie par administration intragastrique d'alcool, la sévérité de l'atteinte hépatique était associée à l'augmentation de la peroxydation lipidique et à la formation de radicaux lipidiques. Singulièrement, ces phénomènes étaient accompagnés d'une diminution des taux de glutathion d'antioxydants (Wu & Cederbaum, 2003). Avec un modèle similaire dont le régime alimentaire a été supplémenté en fer, -qui promeut le stress oxydatif - la sévérité de l'atteinte hépatique était plus importante (Tsukamoto *et al.*, 1985). L'ensemble de ces résultats *in vitro* et *in vivo* montrent l'importance du stress oxydatif dans le développement des atteintes hépatiques causées par l'alcool.

## 2.2 Stress du réticulum endoplasmique / Autophagie

Le réticulum endoplasmique permet la maturation des protéines et leur repliement. Le stress du réticulum endoplasmique peut être causé par différents types de stimuli induisant alors une maturation incomplète des protéines ou l'accumulation de protéines dépliées (Imrie & Sadler, 2012). Ce stress est partiellement causé par le stress oxydatif et joue un rôle dans l'inflammation notamment par l'activation de la voie NF- $\kappa$ B dans les hépatocytes et les CK (Petrasek *et al.*, 2013). De plus, il active les voies des caspases dans les hépatocytes causant leur apoptose. Enfin, de par l'inhibition de l'autophagie dans les CEH, celles-ci s'activent en cellules fibrogéniques participant au développement des dommages hépatiques (Hernández-Gea *et al.*, 2013).

## 2.3 Stéatose

La génération de métabolites toxiques, de ROS et le stress du réticulum endoplasmique causés par la consommation d'alcool induisent une stéatose (accumulation de gouttelettes lipidiques) au niveau des hépatocytes. L'acétaldéhyde ainsi produit entraîne l'inhibition de

l'expression de l'AMPK (protéine kinase AMP dépendante), diminuant la voie d'oxydation des acides gras et augmentant le stockage de vésicules lipidiques (Louvet & Mathurin, 2015). Le stress du réticulum endoplasmique cause l'activation des voies de lipogénèse par les protéines se liant à l'élément de régulation des stérols (SREBP). Ces mécanismes entraînent un dérèglement du métabolisme lipidique lors de la consommation chronique d'alcool. Dans les modèles animaux, l'administration d'alcool a aussi mis en évidence une réponse inflammatoire dans le tissu adipeux notamment une infiltration de macrophages ainsi que la production de cytokines proinflammatoires (Kang *et al.*, 2007). Cependant, il a été montré récemment que dans un modèle murin de régime alimentaire très enrichi en lipides accompagné d'administration d'alcool en « binge drinking », l'apparition de la stéatose pouvait se faire indépendamment de l'inflammation et particulièrement sans l'infiltration de neutrophiles (Wang *et al.*, 2017). Néanmoins, dans le cadre de la réponse inflammatoire liée à la consommation d'alcool les CK semblent avoir un rôle dans le développement de la stéatose (Barnes *et al.*, 2013).

## 2.4 Inflammation

### 2.4.1 Inflammation aigüe et chronique

Lors de l'atteinte hépatique aigüe ou chronique (même hors contexte d'alcool), le nombre de macrophages hépatiques augmente notamment par l'afflux de monocytes venant de la périphérie (Zimmermann *et al.*, 2012).

Une exposition aigüe à l'alcool augmente la production de Facteur de Nécrose Tumorale (TNF) par les monocytes circulants, et active les récepteurs de type Toll (TLR) et particulièrement TLR2 et TLR4 à la surface des CK et des CEH (Oak *et al.*, 2006). L'acétaldéhyde et l'acétate produits par la métabolisation de l'alcool activent la voie de signalisation NFκB et la production de TNF par les CK (Wang *et al.*, 2012). Les CK ainsi activées relarguent non seulement du TNF mais aussi des ROS, des chemokines et d'autres cytokines proinflammatoires telles que, IL-1 et IL-6 (Louvet & Mathurin, 2015). La libération de ces cytokines provoque l'infiltration de neutrophiles. Les neutrophiles ainsi infiltrés phagocytent les débris cellulaires provenant de la mort des hépatocytes et produisent des facteurs de croissance. Cependant, ces neutrophiles libèrent aussi des ROS, promouvant ainsi la réponse inflammatoire (Gao *et al.*, 2019). Dans le cas d'une consommation d'alcool ponctuelle, la

réponse inflammatoire permet d'éviter les dommages permanents hépatiques et la résolution de la stéatose. Cependant, si elle devient chronique, l'inflammation induit la transformation de la stéatose en stéatohépatite (stéatose s'accompagnant d'une inflammation hépatique) qui s'aggrave avec le temps d'exposition ([Gao et al., 2019](#)).

Les CK sont aussi capables d'adopter un phénotype anti-inflammatoire et de sécréter des cytokines anti-inflammatoires (majoritairement IL-10 ; [Louvet & Mathurin, 2015](#)). Les macrophages résidents et les monocytes circulants ont donc un rôle central dans la réponse inflammatoire aussi bien lors de son installation et lors de sa résolution. Les CEH sont aussi capables de sécréter des cytokines inflammatoires.

#### 2.4.2 Origine de l'inflammation

Dans la pathologie hépatique causée par l'alcool, il a été montré un rôle important de la translocation bactérienne de la barrière intestinale vers la circulation sanguine. Que ce soit dans les modèles animaux ou chez l'homme, l'exposition à l'alcool augmente les niveaux circulants de lipopolysaccharide (LPS) ([Yan et al., 2011](#); [Leclercq et al., 2014](#)). L'alcoolisation chronique entraînerait une perméabilisation de la barrière intestinale ayant donc pour conséquence la translocation du LPS dans la circulation sanguine ([Leclercq et al., 2014](#)). Ces niveaux circulants de LPS sont de plus corrélés avec la sévérité de l'atteinte hépatique ([Mathurin et al., 2000](#)). Le LPS peut en effet interagir au niveau du foie avec les récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR) des CK, induisant une réponse inflammatoire. Des débris de membranes bactériennes se retrouvent aussi dans la circulation sanguine et vont se lier aux TLR2 dans le foie suite à l'exposition à l'alcool ([Wang et al., 2012](#)). L'inflammation hépatique peut donc provenir non seulement de l'effet direct de l'alcool sur les cellules hépatiques mais aussi *via* l'atteinte de l'intégrité de la barrière hémato-intestinale (**Figure 8**).

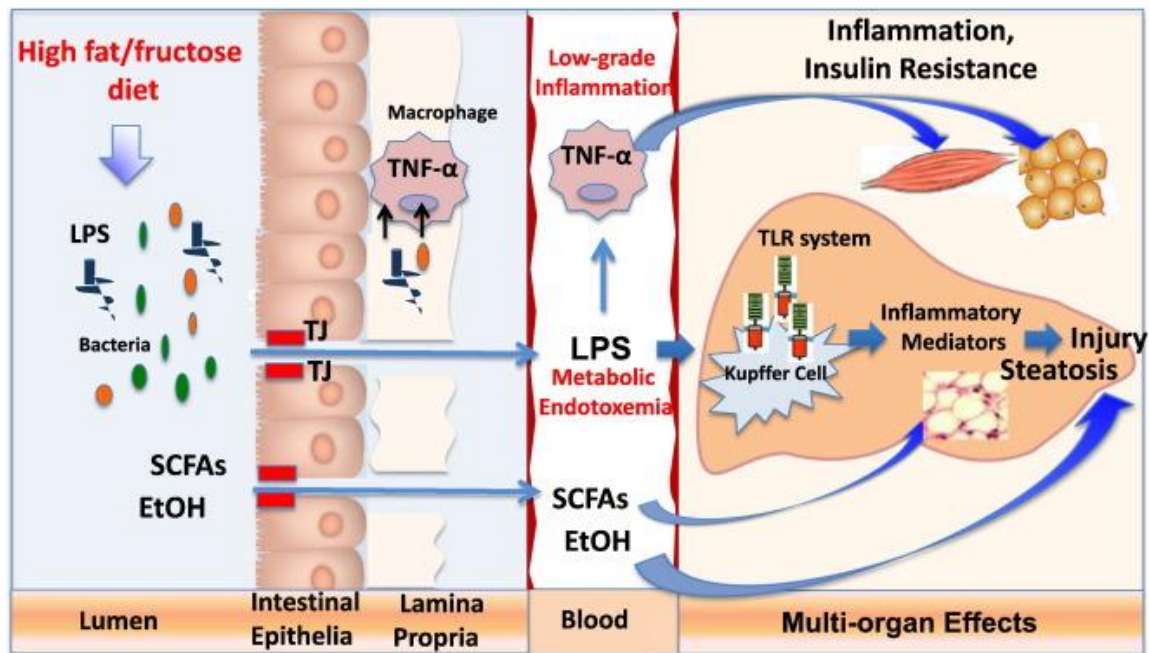


Figure 8 : Interactions entre le foie et les intestins dans le cas d'une perméabilisation de la barrière intestinale. D'après (Kirpich IA, 2015).

### 3. Les atteintes hépatiques chez les patients TUAL

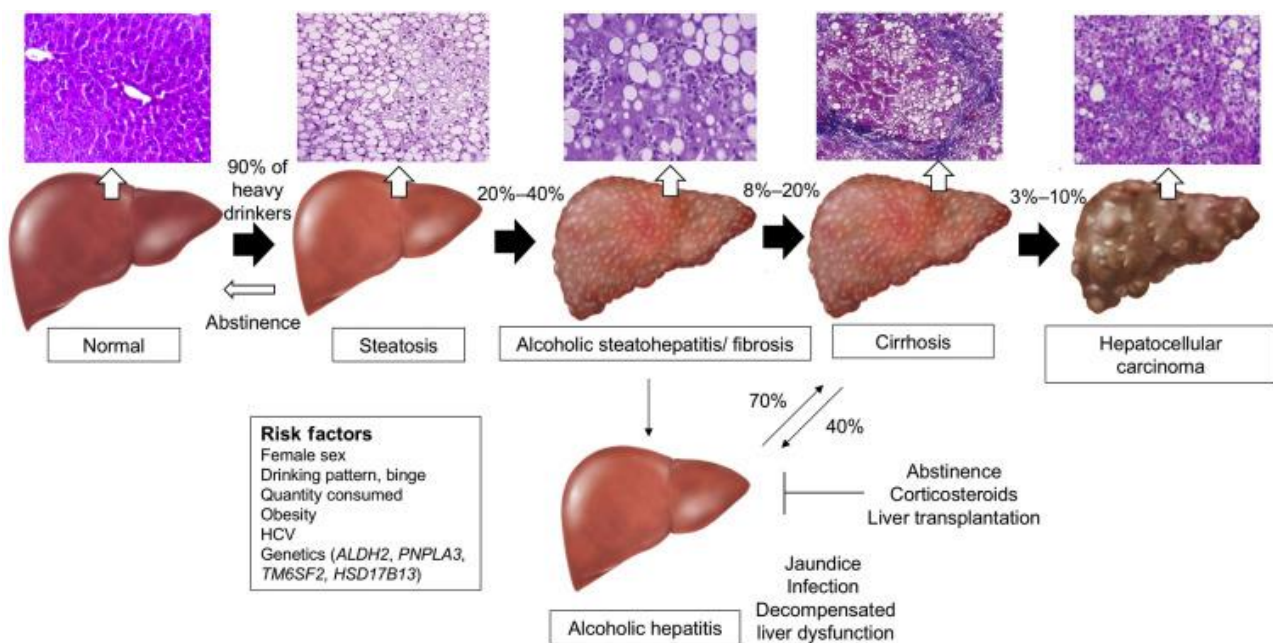
#### 3.1 La maladie alcoolique du foie

La complication du TUAL la plus fréquente est maladie alcoolique du foie (ALD pour *alcoholic liver disease* ; (Addolorato et al., 2016). La maladie alcoolique du foie est complexe et comprend un large spectre d'atteintes hépatiques allant de la stéatose et pouvant évoluer jusqu'à la cirrhose et au carcinome hépatocellulaire (**Figure 9**). Les facteurs que nous avons cités précédemment (atteintes cellulaires, stress oxydatif, inflammation, translocation bactérienne) sont déterminants dans l'évolution de la maladie vers une cirrhose irréversible. Sur l'ensemble des patients souffrant d'hépatite alcoolique (l'une des formes les plus sévères de la maladie), 70% vont en plus développer une cirrhose. Il est donc très important de prendre en compte ces facteurs dans l'étude des atteintes hépatiques causées par l'alcool (Louvet & Mathurin, 2015).



### 3.2 Stéatose et fibrose hépatique

Le premier stade de l'ALD est la stéatose, qui est réversible avec l'arrêt des consommations d'alcool. Celle-ci est observée chez la plupart des consommateurs d'alcool et n'entraîne pas de modifications majeures du fonctionnement hépatique. La fibrose hépatique est la dernière étape avant la cirrhose. Même si elle n'est pas réversible, l'arrêt des consommations permet de stopper la progression de la maladie. Il est donc important de pouvoir diagnostiquer ces stades de l'ALD chez les patients TUAL.



**Figure 9 : Progression de la maladie alcoolique du foie, de la stéatose, à la fibrose, à la cirrhose jusqu'au carcinome hépatocellulaire. D'après (Oh-Hashi K, 2018).**

### 3.3 Biomarqueurs hépatiques

Le dosage des enzymes hépatiques lors d'une prise de sang peut orienter le diagnostic vers un problème hépatique, visible notamment par les GGT (Gamma glutamyltransferase), les transaminases, la bilirubine, l'albumine, la prothrombine et l'alpha-2-macroglobuline (Calès *et al.*, 2008). Cependant, ces variables seules n'indiquent pas le stade de dommage hépatique.

Si l'examen histologique d'un échantillon de foie obtenu par biopsie reste une méthode de référence, l'émergence de nouvelles techniques de diagnostic non invasives sont



maintenant utilisées en clinique. Pour évaluer le stade de la fibrose hépatique, deux outils sont mis en place en clinique : la mesure de l'élasticité du foie par échographie (Fibroscan), et un test sanguin combinant plusieurs variables (alpha-2-macroglobuline, acide hyaluronique, taux de plaquette et prothrombine) qui peut être effectué en laboratoire de ville (Fibromètre).

#### 4. L'atteinte hépatique dans les modèles de rongeurs

Dans les modalités d'exposition à l'alcool précédemment abordées ([voir I.4. Les modèles animaux](#)), les atteintes hépatiques restent discrètes. Afin d'étudier la maladie alcoolique du foie, il faut utiliser des modèles spécifiques d'administration d'alcool afin de surpasser la capacité métabolique du foie des rongeurs ([Vogle et al., 2020](#)). Ces modèles associent un régime alimentaire particulier enrichi en lipides à une administration d'alcool intragastrique quelques jours par semaines en répétant ce processus. Bien que ces modèles ne soient pas écologiques et ne reflètent pas l'exacte pathologie humaine, ils réussissent à mimer certaines des atteintes hépatiques spécifiques ([Vogle et al., 2020](#)). Ainsi, l'exposition chronique à l'alcool chez le rat a entraîné une augmentation du nombre de CK comparé à des rats contrôles, parallèlement à une augmentation de la sécrétion de cytokines proinflammatoires par les CK et à l'infiltration de cellules immunitaires ([Zeng et al., 2016](#)).

Ces modèles restent donc indispensables pour comprendre la physiopathologie des différentes atteintes hépatiques causées par l'alcool.

## Résumé

La consommation d'alcool a de nombreuses conséquences au niveau hépatique : stress oxydatif, stress du réticulum endoplasmique, cytotoxicité des produits de sa métabolisation et inflammation. Ces processus entraînent un dérèglement du métabolisme lipidique induisant une stéatose. Dans le cas d'une consommation chronique, cette stéatose peut évoluer en fibrose et en hépatite alcoolique caractérisée par une infiltration importante de neutrophiles. L'hypothèse d'un lien entre cette inflammation et la perméabilisation de la barrière intestinale est également avancée.

La maladie alcoolique du foie est l'une des principales conséquences de l'alcoolisation chronique chez l'homme, et peut entraîner de graves atteintes hépatiques. Bien qu'elle soit complexe, les modèles animaux peuvent mimer certains aspects de la pathologie afin de l'étudier.

Avant l'arrivée des atteintes irréversibles comme la cirrhose et le carcinome hépatocellulaire, il est maintenant possible d'évaluer de façon non invasive les atteintes hépatiques et notamment la stéatose et la fibrose.

### III. ATTEINTES CEREBRALES LIEES A L'ALCOOL

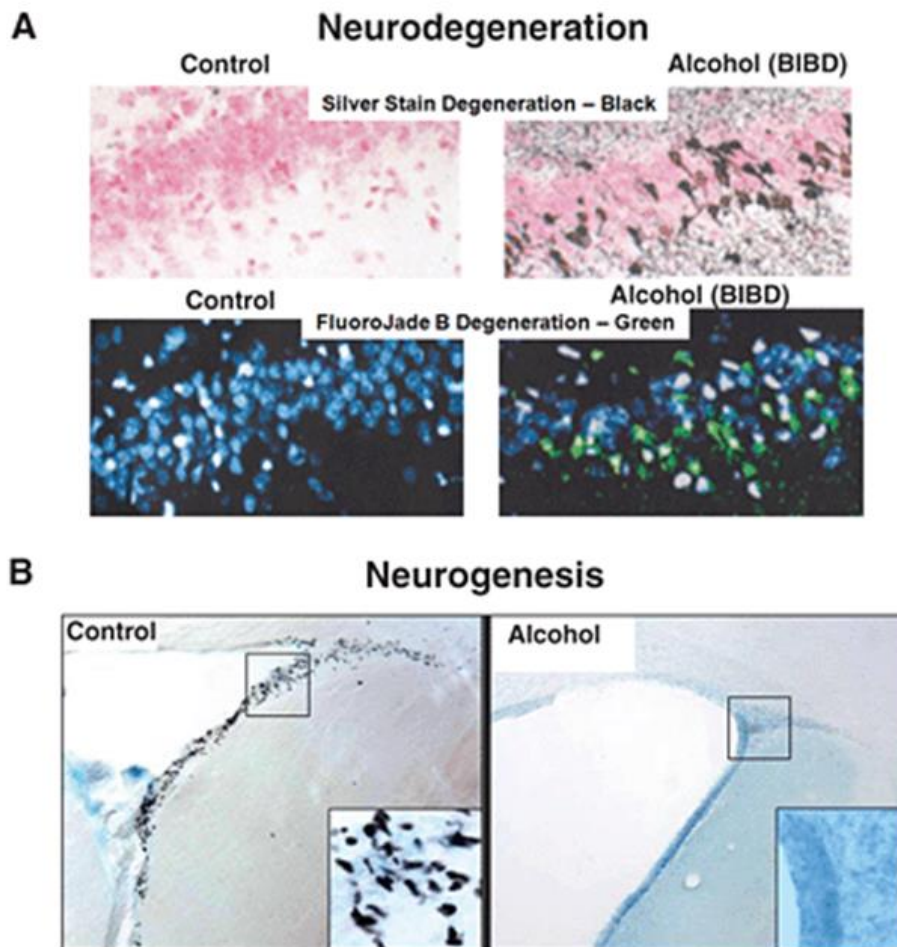
L'alcool a les propriétés nécessaires pour passer la barrière hémato-encéphalique (BHE) et peut donc diffuser librement dans le cerveau. Nous allons décrire dans ce chapitre les conséquences aux niveaux cellulaire, structural et cognitif lors d'une consommation chronique.

#### 1. Atteintes cellulaires

##### 1.1 Atteinte neuronale et synaptiques

Par les mêmes mécanismes qu'au niveau hépatique, la métabolisation de l'alcool au niveau cérébral engendre du stress oxydatif, dont le lien avec la neurodégénérescence a été largement mis en évidence ([Andersen, 2004](#)). Il a été montré dans un modèle murin de « binge drinking » répété 4 jours une neurodégénérescence au niveau hippocampique (**Figure 10**, ([Crews & Nixon, 2009](#))) qui pourrait être due à l'inhibition de l'autophagie ([Pla et al., 2016](#)), à laquelle s'ajoute l'inhibition de la neurogénèse ([Crews & Nixon, 2009](#)). Cependant, cette neurodégénérescence n'a pas été retrouvée après quatre semaines d'exposition à l'alcool ([Das et al., 2007](#)). Il existerait donc des mécanismes de neuroadaptation suite à l'exposition chronique à l'alcool.

L'alcool a une action directe sur les neurotransmissions glutamatergiques et GABAergiques ([Abraham et al., 2017](#)). L'exposition aiguë a une action inhibitrice sur les récepteurs au glutamate (NMDA et AMPA) principalement dans des régions sous-corticales. L'inhibition de ces récepteurs ne permet plus le passage du glutamate dans le neurone postsynaptique provoquant son accumulation dans le milieu extracellulaire. Cette hyperglutamatergie est excitotoxique ([Bell et al., 2016](#)). Dans l'exposition chronique à l'alcool, une neuroadaptation se met en place afin de réduire cette hyperglutamatergie, par exemple en augmentant le nombre de récepteurs NMDA et/ou leur taux de passage de molécules ([Clapp et al., 2008](#)).



**Figure 10 : Mort neuronale et inhibition de la neurogénèse induite par l'alcool.** (A) Deux marquages différents pour montrer la mort neuronale provenant de rats contrôles (gauche) et de rats exposés à l'alcool pendant 4 jours par un modèle de « binge drinking » (BIBD, droite). Les neurones en dégradation sont marqués en noir (première ligne) ou en vert (deuxième ligne). (B) Inhibition de la neurogénèse par l'alcoolisation aiguë (5 mg/kg), les cellules neurales souches qui se différencient en neurones sont marquées en noir. D'après (Crews FT, 2009).

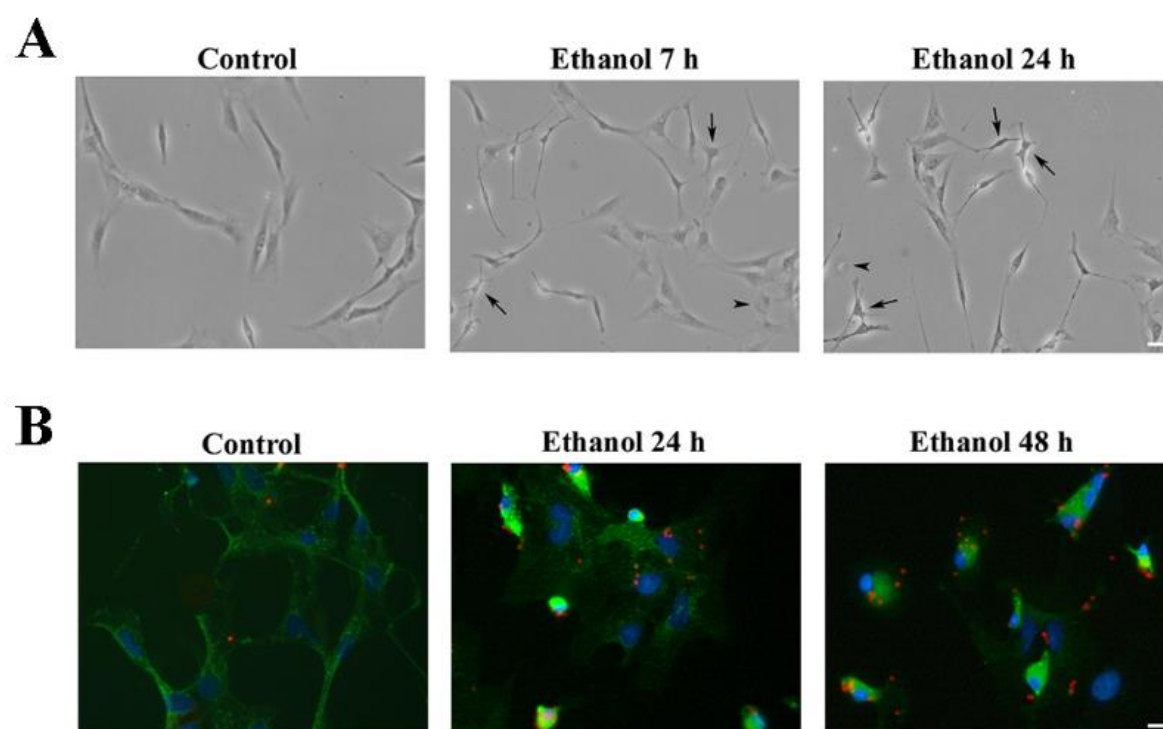
L'alcool augmente l'activité des récepteurs GABA (acide  $\gamma$  amino-butérique). L'activation de ces récepteurs a une action inhibitrice sur le système nerveux *via* l'influx d'ion chlore dans le neurone postsynaptique (Clapp *et al.*, 2008). Dans l'alcoolisation chronique, les mécanismes d'adaptation font diminuer cette inhibition, par une baisse de l'efficacité des récepteurs au GABA.

Si de nombreuses voies compensatoires s'installent lors de l'exposition chronique à l'alcool, l'arrêt brutal de l'alcool dérègle l'équilibre homéostatique et provoque un état d'hyperexcitabilité, sensibilisant à nouveau les neurones à une excitotoxicité (Rubio *et al.*, 2011).

## 1.2 Neuroinflammation et microglie

Le cerveau est un organe immunoprivilégié grâce à ses différentes barrières : hémato-encéphalique, sang-LCS, et qui modulent le passage dans le parenchyme cérébral des molécules présentes dans le sang. La réponse immunitaire est assurée par ses macrophages résidants, les cellules microgliales, et l'infiltration des cellules périphériques ne survient que dans le cas d'une atteinte cérébrale suffisamment sévère (AVC, infection bactérienne, maladie auto-immune, etc.).

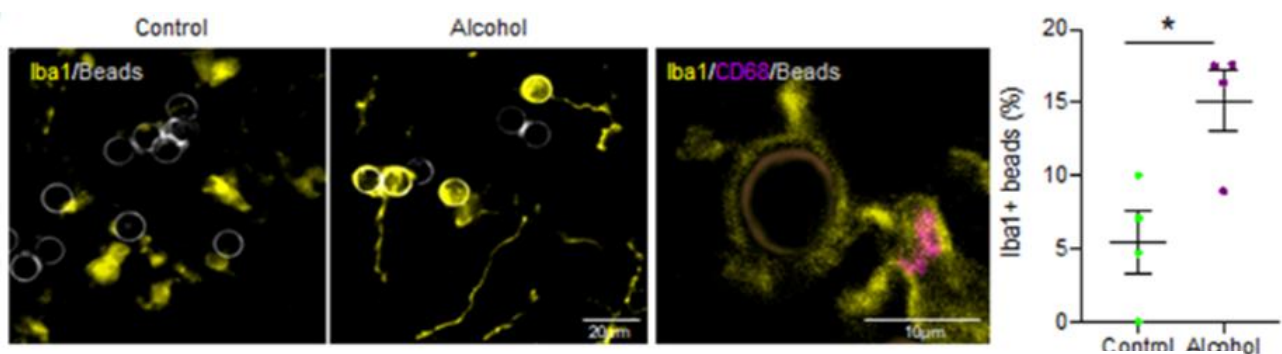
Les cellules microgliales composent environ 20% de la population cellulaire cérébrale totale. Elles peuvent proliférer et sécréter des cytokines lorsqu'elles sont activées (**Figure 11**). L'état d'activation microgliale peut se caractériser morphologiquement : dans leur état quiescent elles possèdent de nombreuses ramifications qui leur permettent de surveiller leur environnement. En cas d'activation, ce phénotype se transforme rapidement : leurs prolongements sont rétractés et les cellules deviennent améboïdes. Cette dernière étape d'activation donne à la microglie un caractère motile, migratoire et phagocytaire ainsi que la



**Figure 11 : Activation in vitro des cellules microgliales après exposition à l'alcool (A) :** Cellules microgliales in vitro traitées ou non à l'éthanol pendant 7h ou 24h : les flèches désignent les cellules améboïdes (barre d'échelle 10 $\mu$ m). (B) : Cellules microgliales traitées ou non à l'éthanol pendant 24h et 48h, exposées à des billes de latex marquées à la fluoresceine (30 minutes, en rouge). Barre d'échelle 20 $\mu$ m. D'après (Fernandez-Lizarbe S, 2009).

capacité d'exprimer des facteurs inflammatoires comme les cytokines, les ROS et le glutamate (Henriques *et al.*, 2018).

Cette activation microgliale et la cytokine proinflammatoire MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein 1*) qui régule la migration et l'infiltration des monocytes/macrophages (Deshmane *et al.*, 2009) ont notamment été retrouvées dans de nombreuses régions du cerveau *post mortem* de patients TUAL (Crews, 2008). L'activation et la prolifération microgliale semblent être dépendantes de la durée de la consommation d'alcool. Chez la souris, le pourcentage de microglie activée (capable de sécréter des cytokines) était supérieur aux souris contrôles seulement après 12 mois d'exposition (Pradier *et al.*, 2018). Dans une autre étude, utilisant des souris femelles uniquement, l'augmentation du nombre de cellules microgliales était significative dès 5 mois d'exposition à l'alcool, suggérant un effet du sexe ou de la dose (les femelles consommant plus d'alcool dans cette souche ; Alfonso-Loeches *et al.*, 2016). Certains auteurs ont montré une activation partielle de la microglie caractérisée par une augmentation de leur nombre et leur changement de phénotype mais non accompagnée de sécrétion des cytokines proinflammatoires d'une activation complète (Marshall *et al.*, 2013; Cruz *et al.*, 2017). Nous avons récemment mis en évidence un *priming* inflammatoire microglial causée par la consommation chronique d'alcool (1,5 mois) qui se caractérise, entre autres, par l'augmentation de la capacité phagocytaire microgliale sans changement significatif de leur nombre ni de leur morphologie (Figure 12 ; Drieu *et al.*, 2020). Avec l'abstinence, les cytokines et la réponse microgliale diminuent ainsi que les dommages neuronaux (Zhao *et al.*, 2013).



**Figure 12 : Augmentation de la capacité phagocytaire de la microglie activée après 1,5 mois d'exposition à l'alcool chez la souris.** En jaune : Iba1 marqueur microglial, en gris : les billes phagocytées ou non, et en rose CD68 : marqueur lysosomal, indiquant l'activité phagocytaire. A droite quantification du pourcentage de cellules microgliales ayant phagocyté les billes. D'après (Drieu A, 2020).

Même s'il n'y a pas de consensus quant à l'initiation ou l'amplification de la réponse inflammatoire par l'activation microgliale, celle-ci y joue un rôle central.

Tout comme dans le foie et les cellules de Kupffer, l'alcool va activer les cellules microgliales par la voie NF- $\kappa$ B. Une fois activées elles vont déclencher la réaction inflammatoire par la production de cytokines et l'activation des récepteurs TLR (Alfonso-Loeches *et al.*, 2010 ; Lippai *et al.*, 2013). Après une exposition chronique à l'alcool (5 mois, 10% (v/v)), les récepteurs TLR4 et la voie NF- $\kappa$ B sont activés, provoquant l'expression de cytokines et l'expression de gènes médiateurs de l'inflammation (iNOS et COX2 ; Alfonso-Loeches *et al.*, 2010). Cette activation des récepteurs TLR a été retrouvée dans des expositions à l'alcool aiguë, chronique (continues ou intermittentes) et pendant le sevrage, montrant l'importance de leur rôle dans la réponse inflammatoire à l'alcool (Toledo Nunes *et al.*, 2019).

La minocycline est une molécule inhibitrice de l'activation microgliale ainsi que la libération de cytokines et de chemokines (Dean *et al.*, 2012). Quelques études cliniques et précliniques se sont intéressées aux effets de la minocycline lors de la consommation chronique d'alcool. Dans des modèles murins d'exposition à l'alcool, la minocycline réduisait la prise quotidienne d'alcool (Agrawal *et al.*, 2011). Avec un traitement aigu (une seule prise) après 10 jours d'alcoolisation, la minocycline réduisait significativement l'activation microgliale (Qin & Crews, 2012). Cependant chez l'homme, sa prise ne diminuait pas les cytokines après une exposition chronique à l'alcool, possiblement à cause d'un traitement trop court (10 jours ; Petrakis *et al.*, 2019).

Des souches de souris déficientes en TLR2 ou TLR4 présentent moins d'effets délétères de l'activation microgliale et une protection neuronale comparées aux souris sauvages (Fernandez-Lizarbe *et al.*, 2013).

### 1.1 Les astrocytes

Support structurel et fonctionnel des neurones, les astrocytes participent activement au maintien de la condition physiologique cérébrale : régulateur du milieu extracellulaire et garant de l'intégrité de la BHE.

Le traitement à l'éthanol d'astrocytes en culture induit un changement d'expression génique similaire à celui d'une réponse à un choc thermique, produisant ainsi des ROS et du stress oxydatif (Miguel-Hidalgo, 2018). Dans certaines régions cérébrales, l'exposition à l'alcool réduit l'agglomération et le nombre d'astrocytes (Javier Miguel-Hidalgo, 2006).



L'éthanol active aussi les astrocytes par son action sur les récepteurs TLR4. Une fois activés, ils libèrent alors des vésicules extracellulaires promouvant l'inflammation (Ibáñez *et al.*, 2019). De plus, une étude a récemment montré, par RNAseq, que l'exposition chronique à l'alcool modifiait spécifiquement le transcriptome de la microglie et des astrocytes (Erickson *et al.*, 2019).

## 2. Atteintes structurales

### 2.1 Travaux en neuroimagerie chez les patients TUAL

Le développement des techniques d'imagerie et particulièrement de l'imagerie par résonance magnétique (IRM) a permis d'obtenir un outil non invasif permettant d'observer les changements structuraux, métaboliques et hémodynamiques du cerveau. L'IRM structurale met en évidence les atteintes macrostructurales et notamment les altérations des volumes de substance grise et de substance blanche. L'imagerie par tenseur de diffusion (DTI) permet la reconstruction des tractus de fibres de substance blanche et la spectroscopie par résonance magnétique (SRM) mesure les concentrations des métabolites.

#### 2.1.1 Substance grise

Des changements du volume de différentes structures cérébrales ont été décrites par des études histologiques sur des cerveaux post-mortem ou par des techniques d'imagerie. Ainsi, chez les patients TUAL récemment abstinents, la consommation chronique d'alcool est associée à une diminution du volume de substance grise (SG) et un élargissement ventriculaire, visible sur des cerveaux en *post mortem* et par IRM (Pfefferbaum *et al.*, 1993; Kril & Harper, 2012).

Certaines régions cérébrales sont plus vulnérables que d'autres aux atteintes causées par l'alcoolisation chronique dont le cortex frontal (Mackey *et al.*, 2019) et plus spécifiquement le cortex dorso-latéral, ventro-latéral, orbito-frontal et médian (Chanraud *et al.*, 2007; Le Berre *et al.*, 2014; Mackey *et al.*, 2019).

Bien que le cortex frontal soit particulièrement sensible aux effets de l'alcool, le cortex temporal, pariéto-occipital, insulaire (Mackey *et al.*, 2019) ainsi que le cervelet et les régions limbiques peuvent aussi être affectés.



L'hippocampe (Wilson *et al.*, 2017), les corps mamillaires, le gyrus cingulaire ainsi que les thalami sont aussi atrophiés (Figure 13, (Pitel *et al.*, 2012; Segobin *et al.*, 2019)).



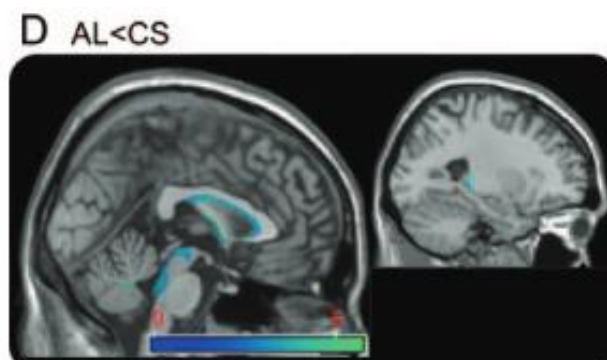
**Figure 13 : Profil d'atrophie du volume de substance grise chez les patients TUAL comparé aux sujets contrôles.** Ensemble des régions corticales, à gauche seuil non corrigé  $p < 0.001$ , à droite seuil corrigé family wise error  $p < 0.05$ . Adapté de (Pitel AL C. G., 2012).

Cependant, lors de l'arrêt de l'alcool pendant plusieurs semaines il est observé une récupération du volume cérébral (Segobin *et al.*, 2014; Durazzo & Meyerhoff, 2019). Il a été proposé que cette récupération pourrait être liée à la diminution de la neuroinflammation lors de l'abstinence de façon âge dépendante (Zhao *et al.*, 2013).

### 2.1.2 Substance blanche

#### *Volumétrie*

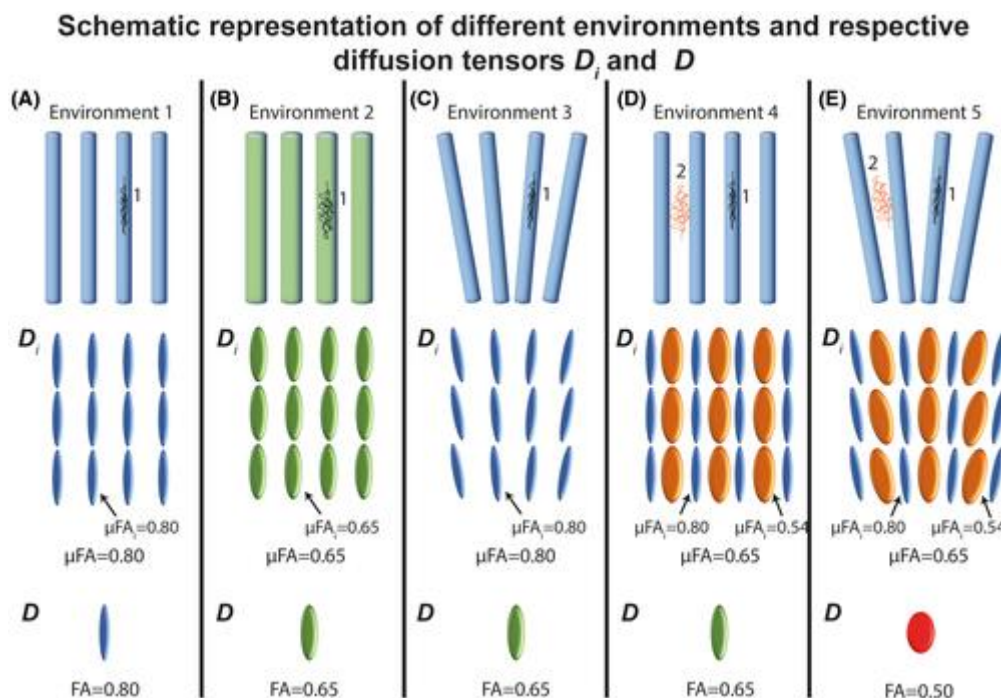
Comme pour la substance grise, chez les patients TUAL le volume de substance blanche (SB) est diminué dans l'ensemble du cerveau (Pfefferbaum *et al.*, 2001). Pour la SB aussi, certaines régions sont plus vulnérables à l'alcool : le pont (Mechtcheriakov *et al.*, 2007), le cervelet, le corps calleux surtout dans sa partie antérieure (Pitel *et al.*, 2012) et la SB du gyrus para-hippocampique (Jang & Harris, 2007) (Figure 14).



**Figure 14 : Profil d'atrophie de substance blanche chez les patients TUAL comparé aux sujets contrôles,** à gauche seuil non corrigé  $p < 0.001$ , à droite seuil corrigé family wise error  $p < 0.05$ . Adapté de (Pitel AL C. G., 2012).

### Microstructure

La DTI permet d'évaluer l'intégrité des faisceaux de SB et donc possiblement de détecter des changements très fins apparaissant avant les atteintes macrostructurales (Pfefferbaum *et al.*, 2006). La mesure la plus utilisée est l'anisotropie fractionnelle (FA) qui reflète l'orientation des fibres dans une direction principale (Figure 15). Cette valeur pourrait refléter l'intégrité axonale et de la gaine de myéline (Pfefferbaum *et al.*, 2006). Bien qu'elle soit très sensible pour différencier des sujets contrôle de sujets pathologiques, elle manque de spécificité et dépend notamment de l'environnement des fibres et de leur nombre (De Santis *et al.*, 2014).



**Figure 15: Représentation de l'orientation des fibres et la valeur de FA correspondante.** Plus les fibres sont alignées dans la même direction, plus la valeur de FA se rapproche de 1 (A). La FA est dépendante de la diffusion de l'eau et donc de la taille des fibres, de leur forme ou de leur orientation pour une même direction globale (B à E). D'après (Henriques RN, 2019).

Chez les patients TUAL, des altérations de l'intégrité des fibres de SB ont été décrites dans le corps calleux (Sullivan & Pfefferbaum, 2005), la capsule interne et externe, le fornix, le *cingulum*, le forceps frontal (Harris *et al.*, 2008), la *corona radiata*, le faisceau longitudinal et le cervelet (Segobin *et al.*, 2015; De Santis *et al.*, 2019). Ces dégradations dans les faisceaux de SB altèrent la connectivité structurale entre le diencéphale et le pont (Chanraud *et al.*, 2009) ainsi que dans les réseaux fronto-limbiques (Yeh *et al.*, 2009).

Comme pour la substance grise, une récupération des atteintes de la microstructure dès la première année d'abstinence a été décrite (De Santis *et al.*, 2019).

### 2.1.3 Spectroscopie par résonance magnétique

Les changements biochimiques par IRM *in vivo* peuvent s'observer en mesurant le taux des métabolites. L'un des métabolites les plus présents au niveau cérébral est le N-acétyl-aspartate, qui est considéré comme un marqueur de l'intégrité, de viabilité et de fonction neuronale (Moffett *et al.*, 2007). Des réductions de ce métabolite sont retrouvées chez les patients TUAL dans les lobes frontaux, temporaux, le thalamus et le cervelet (Fritz *et al.*, 2019). La choline est aussi fréquemment mesurée, cependant son interprétation est moins claire, et serait liée à des pathologies au stade préclinique comme la cirrhose hépatique (Zahr *et al.*, 2010). Les niveaux de choline sont diminués chez les patientes TUAL (Fritz *et al.*, 2019) puis se normalisent pendant l'abstinence (Zahr *et al.*, 2016). Ils semblent être dépendants de la dose et de la durée d'exposition à l'alcool (Bartsch *et al.*, 2007; Zahr *et al.*, 2009).

### 2.1.4 Le circuit fronto-cérébelleux et le circuit de Papez

Ces deux circuits fonctionnels sont les plus fréquemment atteints chez les patients TUAL, avec des conséquences au niveau cognitif.

#### *Le circuit fronto-cérébelleux*

Le circuit fronto-cérébelleux (CFC) (**Figure 16A**) est composé du cortex frontal, du thalamus, du cervelet et du pont (Kelly & Strick, 2003). On peut le diviser en deux boucles parallèles et indépendantes : une boucle motrice incluant le cervelet antérieur (vermis IV, V et VI) et les régions frontales motrices (Biswal *et al.*, 1995), et une boucle exécutive incluant le cervelet postérieur (lobules VII, VIII, Crus I et II) et le cortex préfrontal (aires de Brodmann 9 et 46). Dans ces deux boucles le pont et le thalamus servent de relais.

La boucle motrice aurait un rôle dans le contrôle de la marche et de l'équilibre (Sullivan *et al.*, 2010), tandis que la boucle exécutive serait impliquée dans le fonctionnement exécutif et de la mémoire de travail (Pfefferbaum *et al.*, 2001). De fait, des atteintes de ce circuit pourraient prédire l'atteinte exécutive des patients TUAL (Chanraud *et al.*, 2007).

#### *Le circuit de Papez*

Le circuit de Papez (**Figure 16B**), est composé de l'hippocampe, du thalamus, des corps mamillaires et du gyrus cingulaire. Le faisceau mamillo-thalamique relie les corps mamillaires à la partie antérieure du thalamus. La capsule interne sert de liaison entre le thalamus et le

gyrus cingulaire, puis le cingulum connecte le gyrus cingulaire au cortex entorhinal et à l'hippocampe. Enfin les informations reviennent aux corps mamillaires *via* le fornix. Ce circuit est principalement impliqué dans la mémoire, particulièrement la mémoire épisodique (Aggleton et al., 2016).

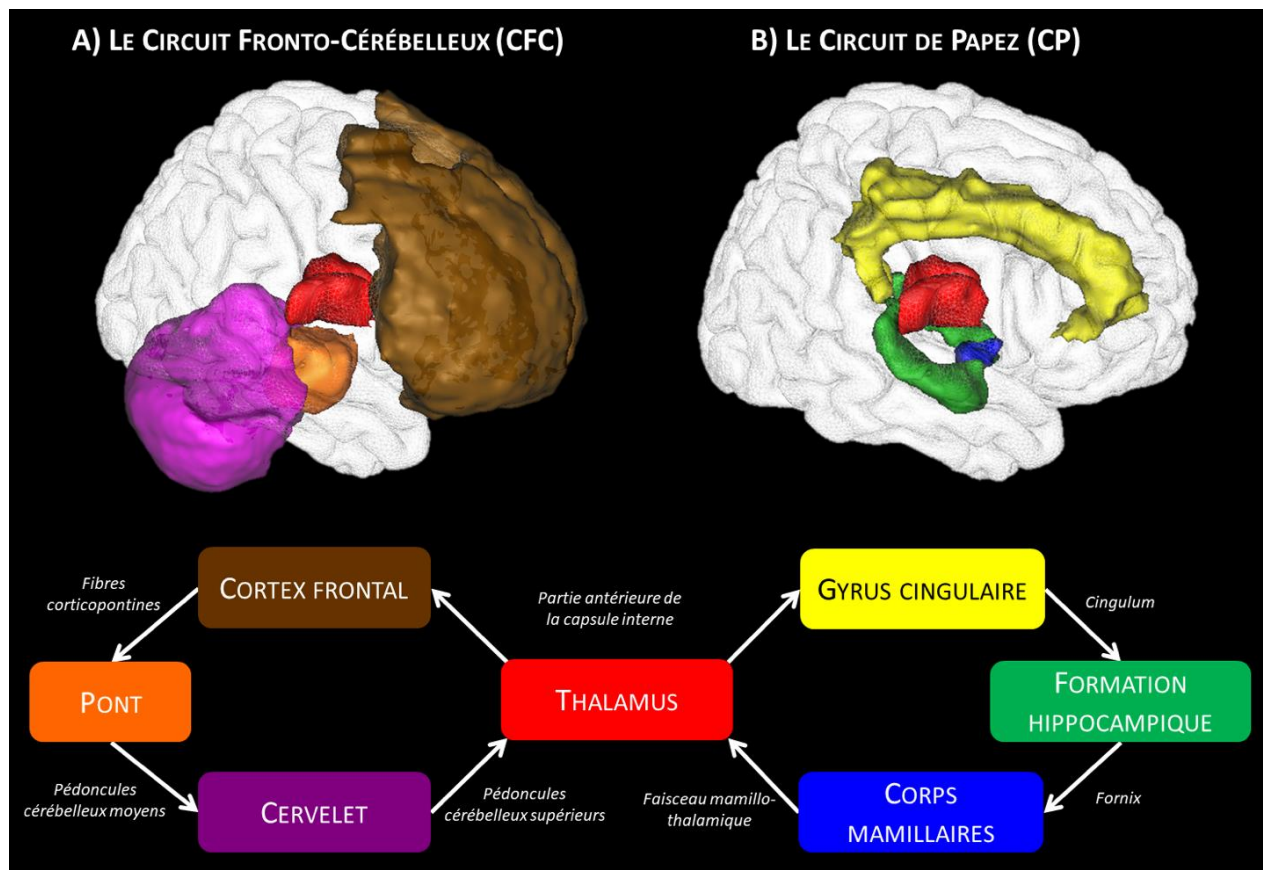


Figure 16: Illustration des régions et des fibres participant à l'organisation du circuit fronto-cérébelleux (A) et du circuit de Papez (B). Adaptée de (Pitel AL S. S., 2015).

Les atteintes de ce circuit ont donc des conséquences sur la mémoire épisodique (Chanraud et al., 2009), notamment par l'altération de l'intégrité du cingulum et du fornix (Pfefferbaum et al., 2009; Segobin et al., 2015).

## 2.2 Travaux en neuroimagerie dans les modèles animaux

### 2.2.1 Volumétrie

L'une des atteintes les plus fréquemment trouvées dans les études d'imagerie translationnelles est l'élargissement ventriculaire après l'exposition à l'alcool. Cet élargissement est dépendant de la durée et de la dose d'alcool, avec des élargissements plus importants retrouvés lors de protocole de gavage (Zahr et al., 2009, 2010, 2016) que lors

d'exposition chronique (Pfefferbaum *et al.*, 2008). Cet effet sur la taille des ventricules a aussi été retrouvé dans les modèles de *binge drinking* avec un retour à la normale après une semaine d'abstinence (Zahr *et al.*, 2014). Il a également été retrouvé une diminution du volume de l'hippocampe antéro-dorsal chez des rats exposés pendant quatre semaines à l'alcool comparés à des rats contrôles (Frischknecht *et al.*, 2017). Dans leur étude, Pfefferbaum et collaborateurs ont retrouvé une atteinte du corps calleux après 6 mois d'exposition à l'alcool par *vapor chambers* qui n'était pas visible après 4 mois d'exposition (Pfefferbaum *et al.*, 2008). Dans une étude précédente utilisant des rats ayant une préférence à l'alcool, une interaction entre la dose d'alcool et le volume du corps calleux avait été retrouvée au bout d'un an d'exposition à l'alcool (Pfefferbaum *et al.*, 2006). De plus dans l'ensemble des études les atteintes cérébrales dépendaient de la durée de l'exposition à l'alcool.

### 2.2.2 DTI

Les études en DTI ont montré des altérations transitoires de la FA dans le lobe frontal aussi bien sur des modèles d'intoxication aigüe (Chen *et al.*, 2017) que chez des patients TUAL (Kong *et al.*, 2012). Après une exposition chronique à l'alcool des atteintes de la microstructure ont aussi été retrouvées dans le corps calleux et le fornix (Pfefferbaum *et al.*, 2015; De Santis *et al.*, 2019), l'hippocampe, le cortex et le cervelet (Vetreno *et al.*, 2016) et le pont (Luo *et al.*, 2017). Une étude a récemment montré, pour la première fois en utilisant le DTI, que les changements de la microstructure de la substance blanche après une alcoolisation chronique chez des rats avec une préférence pour l'alcool reflétaient celles observées chez des patients TUAL (Figure 17 ; De Santis *et al.*, 2019). Cette étude souligne la validité des modèles et est en faveur des études translationnelles dans le TUAL.



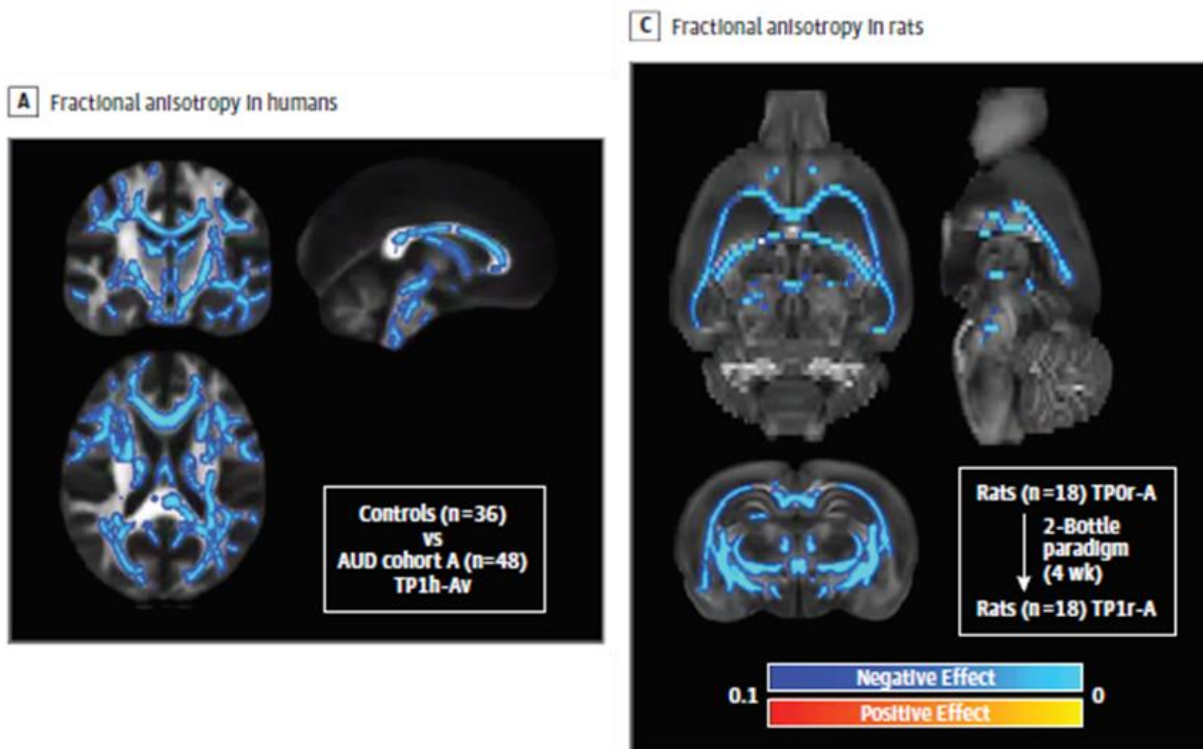


Figure 17: Analyse statistique par TBSS (Tract Bases Spatial Statistics) de la fraction d'anisotropie de la substance blanche après exposition chronique à l'alcool. Adapté de (De Santis et al., 2019).

### 2.2.3 Spectroscopie par résonance magnétique

Si les atteintes structurales sont difficiles à mettre en évidence, les changements dans les métabolites cérébraux ont été largement montrés chez l'homme et chez l'animal. Dans ces études, une diminution de l'acide N-acétylaspartique (NAA) et une augmentation de la choline ont été observées après des expositions aiguës ou chroniques à l'alcool (Zahr et al., 2009, 2010, 2014). Cette diminution du NAA se normalise après une période de 12 heures d'abstinence (Frischknecht et al., 2017).

## 3. Atteintes cognitives

### 3.1 Études neuropsychologiques chez les patients TUAL

Afin de s'affranchir des effets de l'alcoolisation aiguë et du sevrage, les atteintes cognitives décrites ici sont celles observées après le sevrage alcoolique. Cinquante à 80% des patients TUAL présentent des troubles cognitifs légers à modérés (Oscar-Berman & Marinković, 2007). Ces troubles cognitifs concernent les fonctions attentionnelles, exécutives,

mnésiques et les capacités de cognition sociale. Comme pour les altérations cérébrales, il existe une hétérogénéité importante entre les patients TUAL dans la nature et la sévérité des troubles.

### 3.1.1 Fonctions attentionnelles

Les atteintes des fonctions attentionnelles chez les patients TUAL ne font pas consensus. Certaines études démontrent une altération de la vitesse de traitement et d'autres une préservation de celle-ci (Noël *et al.*, 2001; Nowakowska-Domagala *et al.*, 2017). De même, les études ne rapportent pas toutes des déficits attentionnels, ce qui peut être expliqué par la présence ou non de troubles exécutifs chez les patients (Maurage *et al.*, 2014).

### 3.1.2 Fonctions exécutives

Les fonctions exécutives sont des fonctions cognitives de haut niveau qui permettent entre autres de s'adapter à des situations nouvelles (Godefroy, 2003). C'est aussi les fonctions les plus fréquemment atteintes chez les patients TUAL (Ihara *et al.*, 2000).

L'altération des fonctions exécutives comprend des atteintes de la flexibilité mentale (Oscar-Berman & Marinković, 2007), des capacités d'inhibition verbale et visuelle (Pitel *et al.*, 2007; Noel & Thomson, 2012), des capacités d'anticipation et de planification (Noël *et al.*, 2001), et de prise de décision face à un comportement à risque (Le Berre *et al.*, 2014).

Les fonctions exécutives sont également impliquées dans la mémoire de travail qui permet le stockage temporaire et la manipulation d'information (Baddeley & Hitch, 1974). A l'arrêt des consommations d'alcool, il y aurait une récupération au moins partielle des fonctions exécutives et de la mémoire de travail (Stavro *et al.*, 2013; Petit *et al.*, 2017).

### 3.1.3 Mémoire épisodique

La mémoire épisodique permet l'encodage, le stockage et la récupération d'évènements personnellement vécus, associés à un contexte spatiotemporel précis (Tulving, 2001). Chez un tiers des patients TUAL, il existe une atteinte de la mémoire épisodique concomitante à une atteinte exécutive (Ihara *et al.*, 2000). Ces atteintes concernent les capacités d'encodage et de récupération (Pitel *et al.*, 2007, 2009; Noel & Thomson, 2012), ainsi que le rappel du contexte d'acquisition des souvenirs et du niveau de conscience associé au souvenir (Pitel *et al.*, 2007). L'altération de la mémoire épisodique ne serait pas uniquement le reflet des atteintes exécutives mais existerait en tant que telle (Pitel *et al.*, 2007).

### 3.2 Travaux comportementaux dans les modèles animaux

Les modèles animaux d'exposition chronique à l'alcool ont mis en évidence des atteintes de la mémoire spatiale, de travail et de référence qui sont dépendantes de l'hippocampe (Madeira & Paula-Barbosa, 1999; Lukoyanov *et al.*, 2003; Santucci *et al.*, 2004; Abadi *et al.*, 2013; Vedder *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2018). Chez la souris l'atteinte de la mémoire spatiale n'a été décrite qu'à partir de 6 mois d'exposition à l'alcool et semble être dépendante de la durée d'exposition à l'alcool (Wang *et al.*, 2018). Les mêmes durées d'expositions ont été nécessaires pour observer une atteinte de la mémoire de travail (Vedder, 2005).

L'exposition à l'alcool dans les modèles animaux provoque aussi une altération de la discrimination non spatiale et de la capacité à s'adapter à un nouvel environnement après 6 à 8 mois d'exposition (Fernández *et al.*, 2016). Dans des études sur l'attention, après un temps identique d'exposition à l'alcool, les rats mettaient plus de temps à réussir la tâche attentionnelle que les rats contrôles (Birrell & Brown, 2000; Vedder *et al.*, 2015). Il a récemment été montré après une exposition chronique volontaire à l'alcool, que les déficits cognitifs observés (flexibilité, impulsivité et attention) étaient associés à une atteinte cellulaire et persistaient pendant au moins quatre semaines après l'arrêt de l'alcool (Charlton *et al.*, 2019).

Dans des modèles d'exposition intermittente à l'alcool, il a été observé des modifications cognitives, mais moins globales et plus transitoires que dans les modèles d'exposition chronique continue (Toledo Nunes *et al.*, 2019).



## Résumé

La consommation d'alcool a de nombreuses conséquences au niveau cérébral. Elle induit dans l'ensemble du cerveau un stress oxydatif et de la neuroinflammation caractérisée par une activation des cellules microgliales. Ces mécanismes peuvent mener à des phénomènes de neurodégénérescence.

Au niveau structural, deux principaux circuits sont atteints, le circuit fronto-cérébelleux et le circuit de Papez. Leur altération est visible en imagerie et a des conséquences au niveau cognitif avec notamment un dysfonctionnement des fonctions exécutives et de la mémoire épisodique.

Malgré certaines limites dans la reproductibilité des atteintes cérébrales des patients TUAL, l'utilisation des modèles animaux associée à de nouvelles méthodes d'imagerie et des protocoles de consommation chronique sur plusieurs mois montrent des résultats prometteurs et reflétant la pathologie humaine.

## IV. L'AXE FOIE-CERVEAU

Nous avons décrit depuis le début de cette introduction les atteintes hépatiques et cérébrales causées par une consommation d'alcool excessive et chronique. Une communication bidirectionnelle existe entre le cerveau et la périphérie. Des signaux immunitaires afférents au cerveau peuvent induire des désordres comportementaux. La consommation chronique d'alcool est un des facteurs pouvant provoquer une réponse immunitaire périphérique pouvant causer des altérations cérébrales. Mais l'alcool peut aussi avoir un effet direct sur l'immunité cérébrale notamment sur l'activation microgliale ([SP et al., 2016](#)). Dans cette section nous allons détailler les voies et les mécanismes de communication entre le foie et le cerveau dans le contexte de la consommation d'alcool.

### 1. L'encéphalopathie hépatique

Les métabolites de l'alcool produits par le foie, les cytokines et les débris bactériens se retrouvant dans la circulation sanguine génèrent un spectre de symptômes allant de la fatigue à l'altération de l'humeur jusqu'à l'encéphalopathie hépatique ([Azhari & Swain, 2018](#)).

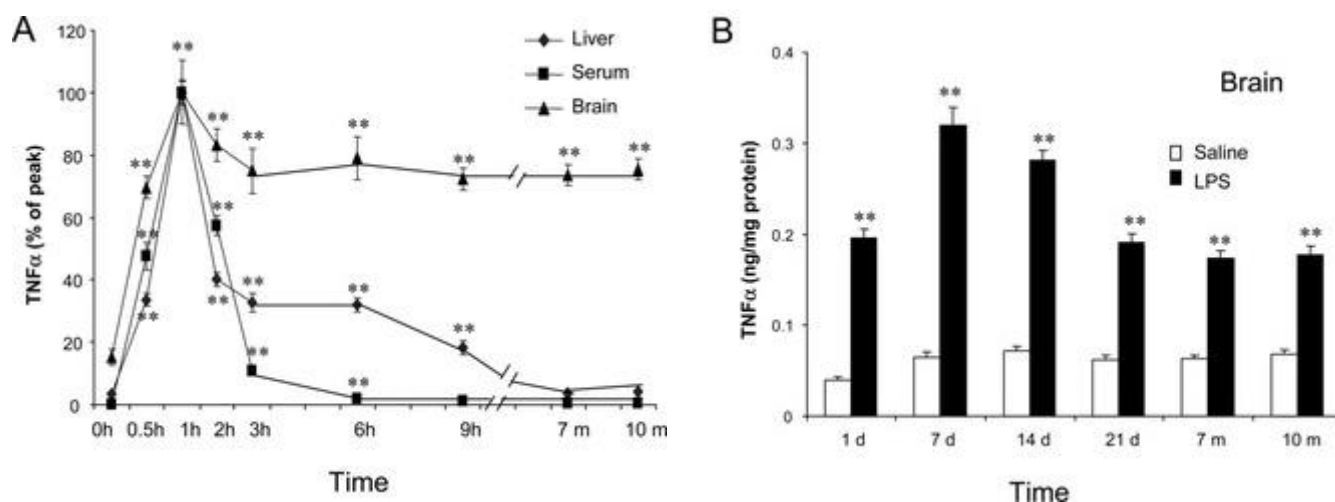
L'encéphalopathie hépatique se caractérise par une défaillance hépatique accompagnée de troubles cognitifs silencieux au début de la maladie (encéphalopathie hépatique minimale) puis pouvant évoluer jusqu'au coma si la pathologie n'est pas prise à temps. Il s'agit d'une complication fréquente dans les maladies hépatiques ; elle est cependant largement sous-diagnostiquée. L'alcool est un facteur étiologique dans 50% des encéphalopathies hépatiques avec cirrhose ([Bale et al., 2018](#)).

Il existe un lien fort entre la perméabilisation de la barrière intestinale (entraînant translocation bactérienne, perturbation du microbiote intestinal et endotoxémie), l'inflammation systémique, la neuroinflammation et le fonctionnement cérébral chez les patients atteints d'encéphalopathie hépatique. Il a été retrouvé chez ces patients une inflammation systémique accompagnée d'une activation microgliale dans l'ensemble du cerveau. Plus l'inflammation hépatique et systémique est importante, plus la neuroinflammation l'est aussi et plus l'encéphalopathie est sévère ([Azhari & Swain, 2018](#)).

## 2. Liens entre inflammation périphérique et cérébrale

Bien avant le développement de l'encéphalopathie hépatique, il existe des atteintes hépatiques chez les patients TUAL ([Voir III. 3 Atteintes hépatiques chez les patients TUAL](#)). Le foie est une source importante de production de cytokines proinflammatoires, par les CK, les hépatocytes et les leucocytes, après la consommation excessive et chronique d'alcool ([Wang et al., 2012; Louvet & Mathurin, 2015](#)). Celles-ci ont été retrouvées dans le sérum chez les patients TUAL ([Szabo & Lippai, 2014](#)). Or il a été décrit que lors d'une inflammation hépatique, des perturbations du système nerveux central existent. Elles se caractérisent par des « sickness behaviour » (signes comportementaux associés à la maladie) comprenant une fatigue, une perte de motivation et d'intérêt social, de l'anxiété et des malaises ([D'Mello & Swain, 2011](#)).

De nombreuses études ont montré un lien entre l'inflammation périphérique et des altérations cérébrales et cognitives. Après une seule injection de LPS intrapéritonéale, Qin et collaborateurs ont retrouvé une augmentation de TNF dans le sérum pendant 9h, dans le foie pendant une semaine, et jusqu'à 10 mois dans le cerveau ([Figure 18 ; Qin et al., 2007](#)).



**Figure 18 : Une seule injection de LPS (5mg/kg) entraîne une augmentation du taux de TNF dans le sérum, le foie et le cerveau. (A) Pourcentage de TNF retrouvé dans le foie, le sérum et le cerveau de 30 minutes à 10 mois post injection ; (B) Concentration de TNF dans le cerveau de 1 jour à 10 mois après une injection intrapéritonéale de sérum physiologique ou de LPS. D'après Qin et al 2007**

Dans cette même étude, les auteurs ont montré qu'une seule injection intrapéritonéale de TNF activait la microglie cérébrale et entraînait l'expression de facteurs proinflammatoires.

Cette activation microgliale causée par le TNF périphérique a aussi été retrouvée accompagnée par une activation des cellules endothéliales cérébrales (D'Mello *et al.*, 2009). L'injection aigüe de LPS entraîne aussi des atteintes comportementales notamment de symptômes s'apparentant à la dépression (de Paiva *et al.*, 2010). Elle provoque également une perméabilité transitoire de la BHE, qui devient continue en ajoutant un contexte d'alcoolisation chronique (Singh *et al.*, 2007). Après une seule injection de LPS intrapéritonéale (3mg/kg) une augmentation de cytokines proinflammatoires (TNF, MCP-1, IL6, IL1 $\beta$ ) dans le sérum, le cerveau et le foie est retrouvée comparé aux contrôles (Qin *et al.*, 2008). Les niveaux de ces cytokines dans ces trois régions sont d'autant plus augmentés lors d'une injection de LPS après dix jours d'injection intragastrique d'alcool par rapport à une injection de LPS seule sans exposition à l'alcool préalable (Qin *et al.*, 2008).

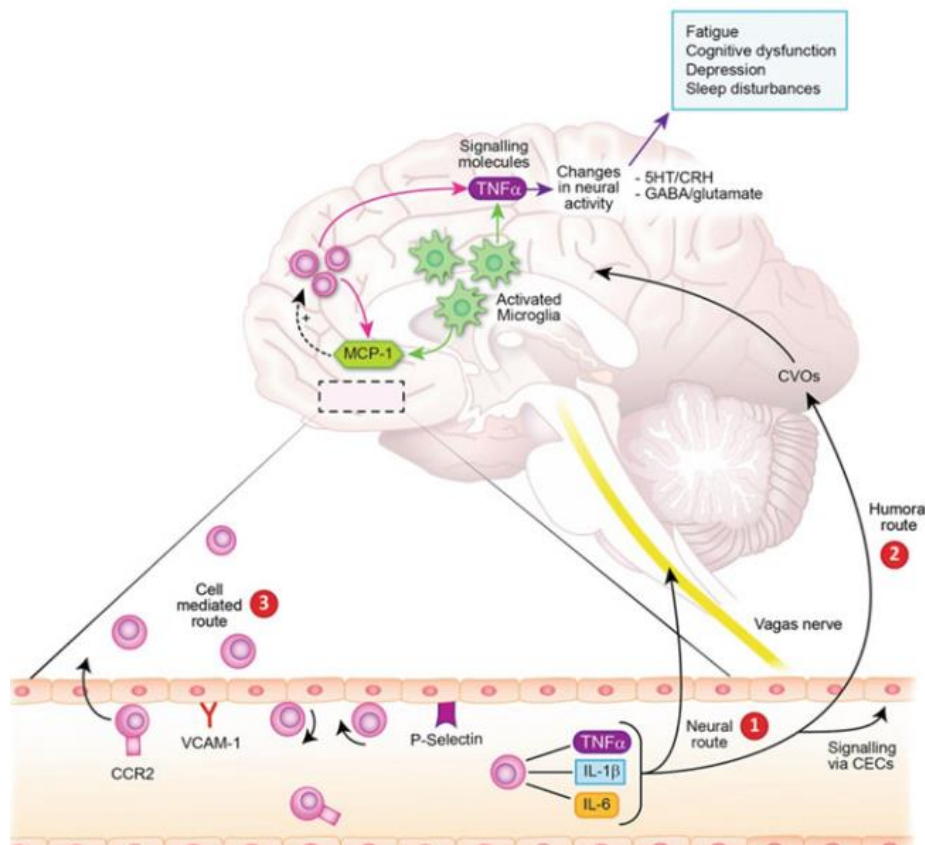
Ces exemples montrent bien que l'atteinte inflammatoire périphérique entraîne une réaction au niveau du cerveau. Cependant dans le cas de l'alcool, nous avons vu précédemment que la molécule pouvait non seulement interagir avec le milieu périphérique mais aussi directement avec le cerveau. Une étude très récente a montré que les produits de dégradation de l'alcool et en particulier l'acétate, parvenaient dans le cerveau et étaient incorporés dans les histones lors de l'acétylation au niveau de l'hippocampe et du cortex préfrontal (Mews *et al.*, 2019), et ainsi que l'atteinte périphérique de l'alcool pouvait rejoindre le cerveau.

La stéato-hépatite causée par l'alcool augmente la synthèse de céramides et de lipides toxiques et leur libération dans la circulation sanguine. Les céramides peuvent passer la BHE et initient une cascade de neurodégénérescence notamment au niveau du cervelet chez des rats exposés chroniquement à l'alcool (De La Monte *et al.*, 2009; de la Monte & Wands, 2010).

La communication entre le foie et le cerveau existe donc de façon réciproque entre ces deux organes. Ainsi par exemple l'injection d'IL1 $\beta$  dans le système nerveux central a pour conséquence une infiltration de neutrophiles et l'expression de facteurs proinflammatoires au niveau hépatique (Campbell & Oei, 2010; Lippai *et al.*, 2013).

### 3. Les voies de communication possibles

Il existe plusieurs voies de communication possibles entre le foie et le cerveau dans lesquelles les cytokines proinflammatoires (notamment IL6, IL1 $\beta$ , MCP-1 et TNF jouent un rôle clé. Dans ce contexte inflammatoire, D'Mello & Swain ont proposé trois grandes voies potentielles de communication (**Figure 19** ; D'Mello & Swain, 2011; D'Mello *et al.*, 2017).



**Figure 19: Schéma illustrant les 3 voies proposées par D'Mello & Swain pour la communication foie-cerveau.** 1 la voie neurale par les afférences du nerf vague. 2 la voie humorale par les cellules endothéliales cérébrales et les organes circumventriculaires et 3 la voie médiée par les cellules de l'immunité.

CECs : cellules cérébrales endothéliales CVOs : Organes circumventriculaires MCP-1 : Monocyte chemoattractant protein 1, CCR2 : récepteur de la protéine MCP-1, VCAM-1 : molécule d'adhésion aux cellules vasculaires 1,

#### 3.1.1 Voie neurale

Les organes viscéraux sont innervés par des afférences du nerf vagal réagissant aux cytokines. En effet, ces afférences expriment des récepteurs à certaines cytokines incluant l'IL1. Des macrophages sont localisés entre ces afférences et peuvent également répondre aux signaux des cytokines (Ek *et al.*, 1998). De plus, la vagotomie chez les rongeurs prévient le

développement de ces « sickness behaviour » notamment l'anxiété et la fatigue - causés par l'administration périphérique intrapéritonéale de LPS (Bluthé *et al.*, 1996). Paradoxalement, l'inhibition du « sickness behaviour » n'était pas retrouvée en cas d'administration intraveineuse de LPS.

### 3.1.2 Voie humorale

Les cytokines dans la circulation sanguine peuvent interagir avec leurs récepteurs présents sur les cellules cérébrales endothéliales (Nadeau & Rivest, 1999), et ainsi activer leurs voies de signalisation. Ces voies permettent la production de seconds messagers (prostaglandines et oxyde nitrique). Dans un modèle murin d'inflammation hépatique, l'injection de TNF intrapéritonéale augmentait l'expression de l'oxyde nitrique dans les cellules endothéliales, ce qui entraînait une activation microgiale (D'Mello & Swain, 2014).

Les cytokines peuvent aussi accéder directement au cerveau en contournant la BHE, par des régions cérébrales spécifiques : les organes circumventriculaires et les plexus choroïdes. Ces organes ont la particularité commune d'avoir une BHE plus perméable car les capillaires de ces régions sont fenestrées (Ransohoff *et al.*, 2003). Après une injection systémique de TNF, l'expression de c-fos (facteur de transcription, utilisé comme marqueur indirect d'activité neuronale, (VanElzakker *et al.*, 2008) a été observée dans ces organes (Nadeau & Rivest, 1999).

### 3.1.3 Voie médiée par les cellules immunitaires

Les cellules endothéliales cérébrales activées par l'inflammation hépatique et la présence de cytokines, expriment des molécules d'adhésion (comme P-sélectine, ICAM-1 ou VCAM-1). L'activation des cellules endothéliales cérébrales permet aussi l'activation des cellules microgliales (voir plus haut) qui expriment des chemokines promouvant l'infiltration monocytaire (MCP-1). Les molécules d'adhésion permettent alors aux monocytes circulants de traverser la BHE et pénétrer dans le parenchyme cérébral. A leur tour les monocytes infiltrés sécrètent des cytokines telles que TNF et IL-1 $\beta$  (D'Mello *et al.*, 2017). Bien que cette voie existe dans certaines pathologies, l'infiltration des cellules immunitaires périphériques dans le cerveau des patients TUAL ou dans les modèles animaux n'a pas été décrite.

#### 4. Rôle de l'intestin

L'intestin joue un rôle important dans les liens entre périphérie et cerveau. Comme décrit précédemment ([II. Origine de l'inflammation hépatique](#)), la consommation d'alcool chronique entraîne une perméabilisation de la barrière intestinale et une translocation bactérienne. En effet, chez certains patients TUAL, il a été montré un changement dans le microbiote et une augmentation de la perméabilité intestinale ([Mutlu \*et al.\*, 2012](#); [Leclercq \*et al.\*, 2014](#)), qui entraîne alors une augmentation des niveaux de LPS dans la circulation sanguine et une inflammation hépatique. Le lien intestin-foie-cerveau est ainsi de plus en plus évoqué dans la littérature ([Stärkel \*et al.\*, 2018](#)) avec un rôle prépondérant du microbiote intestinal.

## Résumé

L'encéphalopathie hépatique est une complication neurologique observée chez les patients TUAL présentant un dysfonctionnement sévère du foie. Mais bien avant le développement de cette pathologie, il existe déjà, chez les patients TUAL, des atteintes cognitives et cérébrales pour lesquelles l'inflammation hépatique pourrait être un acteur majeur. De nombreuses études chez l'animal et chez l'homme ont démontré des liens entre une inflammation périphérique et des altérations cérébrales. En préclinique, il a été montré qu'un terrain d'exposition à l'alcool empirait les atteintes provoquées par une inflammation périphérique seule. Cependant, peu d'études ont examiné les liens entre fonctionnement hépatique et atteintes cérébrales dans le TUAL.

Il est difficile de différencier les effets indirects de l'alcool sur la neuroinflammation via l'inflammation périphérique des effets directs de l'alcool sur le cerveau, la molécule pouvant impacter les deux systèmes.

Comprendre la mise en place et le développement de l'inflammation au niveau cérébral et hépatique dans le TUAL pourrait ainsi être une piste prometteuse pour développer des traitements thérapeutiques ciblant les atteintes cognitives et structurales chez les patients TUAL.



# OBJECTIFS

Chez les patients TUAL, les atteintes hépatiques et cérébrales sont fréquentes et variées dans leur nature et leur sévérité. Cette hétérogénéité est notamment due aux modalités de la consommation d'alcool, à la vulnérabilité individuelle notamment génétique et aux comorbidités. Nous avons également vu que l'inflammation pourrait jouer un rôle central dans le développement de ces atteintes, notamment dans la communication entre le foie et le cerveau.

Les objectifs de cette thèse sont donc (i) **d'étudier le décours temporel de développement des atteintes hépatiques et cérébrales causées par l'alcool**, et (ii) **d'étudier le rôle de l'inflammation dans ces atteintes. Dans une démarche la plus translationnelle possible, nous avons utilisé des données recueillies chez des patients TUAL ainsi que dans deux modèles animaux d'exposition chronique à l'alcool.**

Afin de répondre à ces objectifs, cette thèse a été divisée en deux principales études :

I) Une étude préclinique utilisant un modèle longitudinal d'alcoolisation chronique jusqu'à 12 mois afin d'examiner le décours temporel du développement des atteintes hépatiques, cérébrales et comportementales chez des souris non sélectionnées génétiquement pour leur consommation spontanée d'alcool. Des analyses sanguines, d'imagerie [comprenant des analyses volumétriques et d'intégrité des fibres de substance blanche (DTI)], d'immunohistochimie, ainsi que des tests comportementaux ont été réalisés périodiquement chez des souris chroniquement exposées à l'eau ou à l'alcool. Finalement, l'efficacité d'un traitement anti-inflammatoire (la minocycline) a également été testée pour limiter les effets comportementaux de la consommation chronique d'alcool et la consommation volontaire d'alcool. Les données de cette étude ont été intégralement recueillies et certaines analyses sont toujours en cours dans l'objectif d'un article scientifique qui est en préparation.

II) Une étude translationnelle pour préciser le rôle de l'inflammation sur les atteintes cérébrales et hépatiques après une exposition chronique à l'alcool. Des analyses neuroanatomiques, d'intégrité des fibres (DTI) et d'immunohistochimie ont été réalisées chez (i) des patients présentant un TUAL sévère et (ii) des rats génétiquement sélectionnés pour leur attirance spontanée pour l'alcool [*sardinian preferring* (sP) rats]. Les résultats issus de cette étude sont inclus dans un article intégré dans ce manuscrit de thèse, et qui sera prochainement soumis pour publication.

## RESULTATS

# ETUDE 1

## Étude longitudinale des atteintes hépatiques et cérébrales dans la consommation chronique d'alcool

Il existe des atteintes cérébrales et hépatiques causées par l'alcoolisation chronique chez les patients TUAL, mais la chronologie de leurs apparitions est encore méconnue. Les modèles animaux permettent de s'affranchir des nombreuses comorbidités associées à la pathologie, qui participent à l'hétérogénéité des atteintes des patients TUAL et une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques de l'échelle cellulaire à comportementale. Nous avons ainsi cherché à mieux comprendre l'apparition et le développement de ces atteintes grâce à un modèle murin de consommation chronique d'alcool à très long terme ([Lemarchand et al., 2015](#); [Drieu et al., 2020](#)). Nous nous sommes particulièrement intéressés au rôle et au développement de l'inflammation au niveau cérébral, hépatique et systémique au cours de l'alcoolisation chronique. Cette étude est en préparation car certains résultats sont actuellement toujours en cours d'analyse.

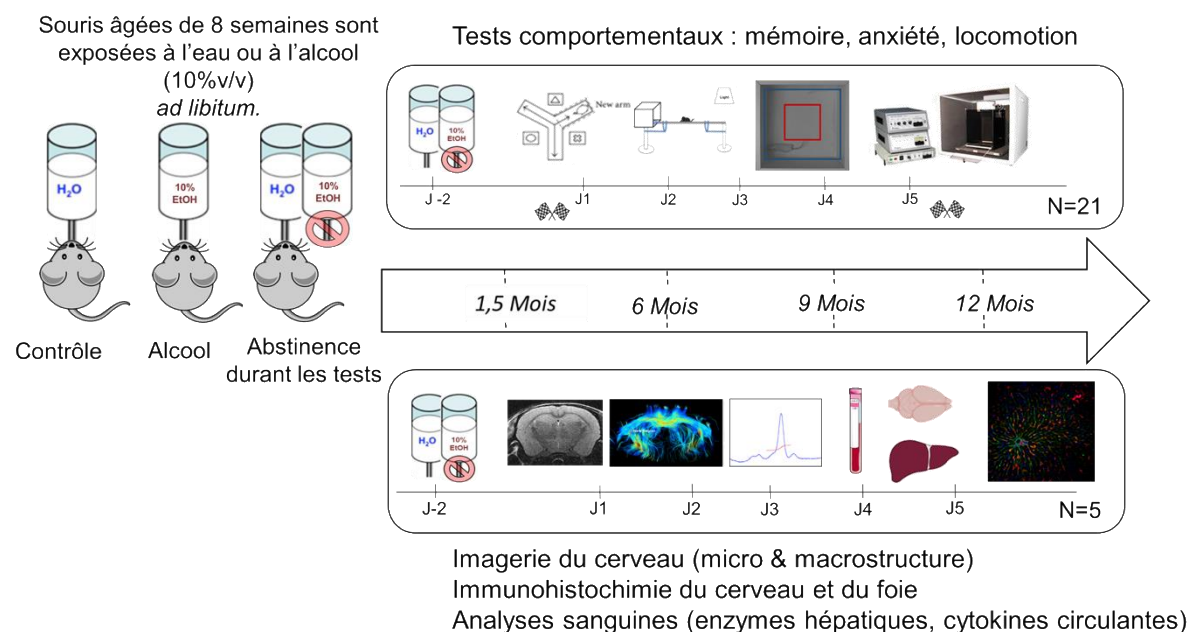
Les objectifs de cette étude étaient dans un premier temps de mettre en évidence la dynamique d'apparition des atteintes cérébrales et hépatiques et, dans un second temps, d'essayer de prévenir ces atteintes. Après avoir décrit le développement temporel des atteintes comportementales, cérébrales et hépatiques des souris après l'exposition à l'alcool pendant 1,5, 6, 9 et 12 mois, nous avons réalisé une étude pilote de traitement à la minocycline (molécule capable d'inhiber l'activation microgliale). Nous souhaitons étudier la capacité de cette molécule à (i) préserver les capacités cognitives affectées par la consommation chronique d'alcool, ainsi que (ii) sa capacité à diminuer la consommation volontaire d'alcool.

# Matériels & méthodes

Le design expérimental comprend des tests comportementaux, des examens en IRM cérébrale *in vivo*, des prélèvements cérébraux et hépatiques pour des analyses en immunohistochimie ainsi que des dosages sur échantillons sanguins. De plus, nous avons ajouté aux deux groupes classiquement utilisés dans la littérature (CONTROLE et ALCOOL) un groupe d'animaux qui n'était pas alcoolisé au moment des évaluations afin de s'affranchir des effets aigus de l'alcool (ABSTINENT). Ce groupe a été intégré afin de représenter au mieux les évaluations faites dans les protocoles cliniques, où les patients sont examinés après le sevrage alcoolique.

L'ensemble de ces tests a été réalisé à 6, 9 et 12 mois d'exposition à l'alcool [Sauf pour le protocole comportemental qui est aussi réalisé à 1,5 mois d'exposition à l'alcool (ou à l'eau pour le groupe contrôle) ; **Figure 20** : Schéma global du protocole]

## PROTOCOLE EXPERIMENTAL



**Figure 20 : Schéma global du protocole longitudinal concernant des analyses comportementales, d'imagerie, immunohistochimiques et sanguines chez les trois groupes expérimentaux (contrôle, alcool et abstinence).**

## 1. Animaux

L'ensemble des expériences menées *in vivo* a fait l'objet d'une demande d'autorisation de projet validée par le CENOMEXA (Comité d'Ethique NORMandie en Matière d'EXpérimentation Animale) et a reçu l'autorisation #11886 du Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation. Les expériences sont réalisées dans le respect du bien-être animal et en accord avec les réglementations française (décret 87/848) et européennes (2010/63/ EU). Pour toute cette étude, nous avons utilisé des souris mâles Swiss provenant soit de chez Janvier Labs soit du Centre Universitaire de Ressources Biologiques (CURB). L'animalerie où sont hébergés les animaux pendant toute la durée des protocoles n'a pas le statut « specific pathogen free ».

## 2. Protocole d'alcoolisation

Les souris âgées de 8 semaines ont été exposées à l'alcool par un protocole d'exposition forcée, avec un seul biberon à disposition contenant 10% d'alcool (volume/volume). Les souris sont 5 par cage et ont un biberon d'eau ou contenant de l'alcool ainsi que de la nourriture *ad libitum*. Elles sont hébergées en cycle inversé pour les études comportementales et en cycle normal pour les études d'imagerie. Les animaux sont surveillés quotidiennement et pesés à chaque étape du protocole. Pour le protocole comportemental, les biberons et la nourriture ont été pesés hebdomadairement.

Pour calculer la dose d'alcool consommée par les souris, nous avons multiplié le volume d'alcool consommée (10% du volume bu dans le biberon) par la densité de l'alcool (0,789) puis connaissant le poids moyen des souris rapporté au kg. Le calcul est le suivant : Dose = ((Volume bu mL) x densité (0,07893 g/mL)) / poids de l'animal (kg). Nous avons enlevé 2mL de la pesée du biberon comme évaluation de la perte de volume due à la manipulation.

### I. PROTOCOLE COMORTEMENTAL

#### 1. Tests comportementaux

Les tests sont réalisés à 1,5 mois, 6 mois, 9 mois et 12 mois d'exposition à l'alcool. Nous avons utilisé 21 souris par groupe soit un total de 63 souris. Afin de réaliser l'ensemble des tests sur l'ensemble des souris, nous avons fait 3 groupes de souris (7 souris par groupe par

semaine = 21 souris par semaine) avec une semaine de décalage d'exposition à l'alcool pour pouvoir effectuer les tests sur 3 semaines consécutives.

Pour l'ensemble des tests comportementaux, les souris sont habituées à la pièce du test pendant au moins 45 minutes avant le début du test. L'ordre des tests est randomisé chaque semaine (sauf pour le *fear conditioning* qui a toujours lieu les deux derniers jours). Voir schéma du protocole de l'étude. Les tests sont schématisés dans la **figure 21**.

### 1.1 Y-Maze

Le labyrinthe en Y permet de mesurer la mémoire spatiale des rongeurs. Il est constitué de trois bras identiques en plastique blanc (34x7x14,5 cm) desquels sont visibles des indices distaux disposés dans la pièce. Le protocole se divise en deux sessions séparées par un intervalle de 2h30 comme décrit précédemment ([Obiang et al., 2012](#)). Pendant la session d'acquisition, un bras du labyrinthe est fermé. La position du bras fermé est choisie aléatoirement. Lors de la phase d'acquisition, chaque souris est placée dans l'un des deux autres bras, avec sa tête vers l'extrémité du bras et non le centre du labyrinthe. Elle peut visiter librement les deux bras pendant 5 minutes. La souris retourne ensuite dans sa cage pendant les 2h30 d'intervalle entre les sessions. Elle passe ensuite la phase de test de rétention pendant laquelle elle peut visiter pendant 5 minutes les 3 bras ouverts du labyrinthe (**Figure 21 A**). Le nombre de visites dans chaque bras (considéré quand la souris a passé les 2/3 du bras) a été enregistré à chaque session. La mémoire spatiale est évaluée en comparant le pourcentage de visites dans chaque bras pendant la phase de test. En absence de déficit, le pourcentage de visites dans le nouveau bras est plus important que dans les anciens bras, et est supérieur à 33 % (qui est le seuil de visite dû au hasard). Les animaux faisant moins de 6 entrées totales durant la phase d'acquisition ou moins de 3 entrées durant la première minute de la phase de rappel sont exclus du test. Nous avons choisi de n'utiliser que les deux premières minutes de la phase de rappel pour les analyses, car après ces deux minutes, le nouveau bras n'est plus considéré comme nouveau et le nombre d'entrées est identique dans tous les bras.

## 1.2 Open field

L'*open field* est un test permettant de mesurer le niveau global d'activité, de locomotion, d'exploration et d'anxiété. Les souris sont placées au centre d'un dispositif carré de 31,5x31,5 cm et peuvent l'explorer librement pendant 10 minutes (Pruvost *et al.*, 2017). Les animaux sont suivis par vidéo (DMK 21AF04, The Imaging Source®) et les paramètres de locomotion (distance, vitesse, mouvement) sont analysés avec le logiciel Ethovision XT11.5 (Noldus). Une zone de 15x15 cm est définie au centre du dispositif et le pourcentage de temps passé dans cette zone est mesuré pour évaluer le comportement anxieux (**Figure 21 B**). Les souris passent typiquement plus de temps à explorer la périphérie en se déplaçant le long des murs (tigmotaxie) que dans la zone centrale (anxiogène).

## 1.3 Poutre d'équilibre

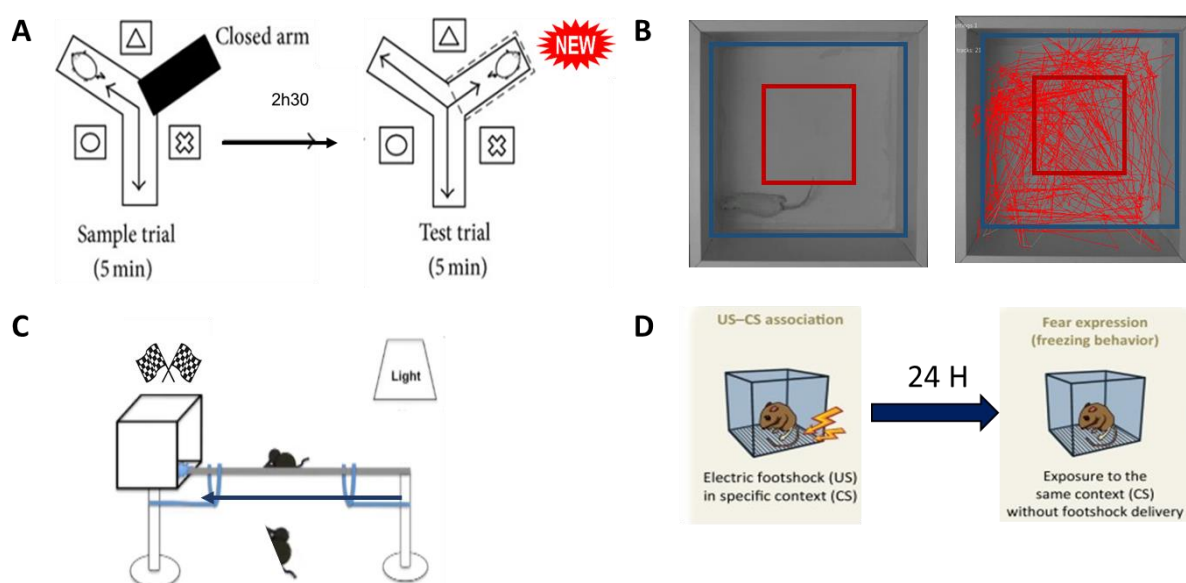
Ce test permet d'évaluer l'équilibre et les capacités motrices fines chez la souris. La poutre mesure 97 cm de longueur et 8mm de largeur et est disposée à 1 mètre du sol. La cage d'hébergement des souris est placée à une extrémité de ce dispositif pour attirer les souris sur le point d'arrivée. Une lampe est utilisée pour faire la lumière au-dessus du point de départ et sert de stimulus aversif (**Figure 21 C**). Le test se déroule sur deux jours, le premier jour d'apprentissage les souris sont habituées au dispositif en 4 essais. Lors du premier essai, la souris est placée à 10 cm de la plateforme à atteindre pour la rejoindre, pour le deuxième au milieu de la poutre, pour le 3<sup>e</sup> au milieu de la poutre mais de dos et enfin pour le dernier essai à l'extrémité opposée de la poutre. Aucun de ces essais n'est chronométré. Le deuxième jour est la phase de test, la souris est placée à l'extrémité de la poutre et doit rejoindre sa cage 4 fois de suite. Chaque essai est chronométré. L'évaluation de l'équilibre se fait sur le temps pour rejoindre la cage et le nombre de chutes du dispositif.

## 1.4 Fear conditioning

Ce test évalue la mémoire émotionnelle notamment médiée par l'amygdale et l'hippocampe. Le dispositif est constitué d'une chambre de conditionnement insonorisée (Panlab-Letica, Bioseb®, France) où la souris est initialement placée. Le sol est muni d'une grille métallique reliée à un capteur de pesée branché à un ordinateur. Ce dispositif mesure



l'évolution de la répartition du poids de la souris sur la grille en fonction du temps, ce qui permet de quantifier en temps réel le comportement d'immobilisation de l'animal. Le protocole consiste en l'association par le sujet de deux stimuli. Le premier stimulus (léger choc électrique non douloureux ; 0,4 mA), dit inconditionnel, déclenche une réponse innée et constante de peur : la réponse inconditionnelle. Le second stimulus (contexte particulier) est initialement neutre. L'appariement des deux stimuli lors d'une séance d'acquisition de 5 minutes permet au stimulus neutre de devenir prédictif d'une situation dangereuse et donc de devenir un stimulus conditionnel capable d'évoquer seul la réponse de peur, dite alors réponse conditionnée ou peur conditionnée. La peur conditionnée, chez les rongeurs, est bien caractérisée et classiquement mesurée dans ce type de test par le temps d'immobilisation, défini comme l'absence de tout mouvement excepté ceux liés à la respiration (**Figure 21 D**). La réponse émotionnelle (conditionnée) est mesurée grâce à un test de rappel de 4 minutes exposant les sujets au stimulus conditionnel au contexte (rappel au contexte).



**Figure 21 : Schémas des différents tests comportementaux utilisés dans le protocole comportemental.**  
A : Y-Maze ; B : Open Field ; C : Poutre d'équilibre ; D : Fear conditioning

Seuls les animaux du protocole comportemental ont été évalués à 1,5 mois d'exposition, les animaux du protocole imagerie et immunohistochimie ont été évalués à 6, 9 et 12 mois d'exposition. Un deuxième groupe de souris différent de celui du protocole comportemental est utilisé pour les études d'imagerie et d'immunohistochimie.

## II. PROTOCOLE D'IMAGERIE, PRELEVEMENTS SANGUINS ET IMMUNOHISTOCHEMIE

### 1. Imagerie par résonance magnétique cérébrale

Le protocole d'imagerie est réalisé sur deux jours afin de limiter de trop longues sessions d'exposition à l'agent anesthésique (les animaux exposés à l'alcool ont plus de difficultés à rester sous anesthésie et à garder un rythme respiratoire que les animaux non exposés). Nous avons utilisé 5 souris par groupe et par temps d'exposition à l'alcool. Chaque souris passe environ deux heures dans l'IRM sous anesthésie : le premier jour pour les séquences anatomiques et de DTI, et le deuxième jour pour les séquences de spectroscopie. Les acquisitions sont réalisées avec une IRM 7T Pharmascan (Bruker) et le logiciel Paravision 6.1. Les souris sont anesthésiées (induction sous 5% isoflurane,  $O_2/N_2O$  1/2, maintien sous 1-2% isoflurane,  $O_2/N_2O$  1/1) puis placées dans un berceau chauffé avec leur tête maintenue par des barres d'oreilles pour éviter tout artefact de mouvement. Leur température et leur respiration sont monitorées durant toute la durée des acquisitions. Avant chaque acquisition, une séquence de localisation est effectuée pour vérifier le bon placement de la souris et positionner correctement le champ d'acquisition de l'IRM.

#### 1.1 IRM anatomique

La séquence utilisée est une séquence T2 RARE 2D, TR/TE = 3000/48,6 ms, matrice 256x256x40, résolution 0,07x0,07 mm, nombre de coupes : 40, épaisseur de coupe : 0,3 mm pour une durée d'acquisition de 6 minutes. La séquence est répétée pour chaque orientation (axiale, coronale, sagittale) pour une durée totale d'acquisition de 18 minutes.

Pour les analyses volumétriques, nous avons tracé à la main les régions d'intérêt avec le logiciel ImageJ et un atlas de cerveau de souris ([Paxinos & Franklin, 2001](#)). Plus précisément, les régions ont été délimitées sur les coupes coronales : les ventricules sur la totalité des coupes où ils apparaissaient, l'hippocampe bilatéral sur 8 coupes, le corps calleux (comprenant la capsule interne et externe) sur 14 coupes, le volume total intracrânien sans le cervelet sur 20 coupes et le cervelet sur 4 coupes. La somme des aires des différentes coupes est multipliée par l'épaisseur de coupe pour obtenir le volume des régions d'intérêt.

## 1.2 IRM de diffusion (DTI)

La séquence est adaptée de McKenna et al 2016 (McKenna *et al.*, 2016), les paramètres sont les suivants : séquence IRM *echo planar* (EPI) 2D, avec 30 directions,  $b = 1000\text{m/s}^2$  et  $5b = 0\text{m/s}^2$ , TR/TE = 7500/24 ms, matrice 176x80x525, résolution 0,15x0,15 mm, nombre de coupes : 15, épaisseur de coupe : 0,6 mm pour une durée d'acquisition de 17 minutes. Pour améliorer la qualité d'acquisition, une homogénéisation du champ magnétique est appliquée avec le protocole de MapShim de Bruker. Le temps d'acquisition total est d'environ 20 minutes.

La tractographie du corps calleux a été réalisée avec le logiciel DSI Studio (<http://dsi-studio.labsolver.org>). Les cartes d'anisotropie fractionnelle sont reconstruites à partir des images 2dseq Bruker pour chaque animal et la qualité de ces cartes est vérifiée individuellement.

La tractographie du corps calleux est réalisée avec les paramètres suivants : FA > 20, angle minimum 45°, selon une approche déterministique (adapté de De Santis *et al.*, 2019). Le critère déterminant du tracé des fibres était de passer obligatoirement par les deux hémisphères. Pour chaque animal, les fibres du corps calleux étaient ainsi reconstruites. Le volume des fibres et les valeurs moyennes des paramètres de microstructure (Anisotropie fractionnelle FA, diffusivité moyenne MD, diffusivité radiale RD, diffusivité axiale AD) sont ainsi obtenus.

## 1.3 Spectroscopie par résonance magnétique

Afin de mesurer les changements dans les métabolites cérébraux au niveau hippocampique nous avons développé un protocole de spectroscopie par résonance magnétique. Celui-ci se déroule en deux phases consécutives. La première consiste à placer le voxel d'intérêt et corriger l'homogénéisation du champ magnétique autour et au sein de ce voxel. La première séquence est une séquence de localisation pour vérifier le placement de la souris dans l'IRM. Ensuite, avec une séquence T2 RARE 2D anatomique en axial et/ou en coronal (Résolution 0,1x0x1 mm), nous pouvons placer le voxel d'intérêt (1,2x1,2x2 mm) dans l'hippocampe. Une fois le voxel placé, nous utilisons une procédure d'homogénéisation du champ magnétique sur 3 niveaux, d'abord un shim de premier puis de second ordre et enfin avec le protocole MapShim de Bruker.

La deuxième phase comprend les séquences PRESS de spectroscopie, avec et sans suppression d'eau. Afin d'utiliser le signal de l'eau comme signal de référence, nous faisons d'abord une séquence PRESS sans suppression du signal de l'eau (durée environ 1min30), puis deux séquences PRESS successives avec suppression d'eau (technique VAPOR implémentée dans Bruker). Nous utilisons deux TE différents (TE= 17 et TE = 40 ms ; pour l'analyse future des résultats) et un TR = 2500 ms, nombre d'accumulation = 256. Chaque séquence a une durée de 17 minutes. Le temps total d'acquisition est d'environ une heure. Les deux temps d'écho utilisés (un court et un long) vont permettre de quantifier un large spectre de métabolite. Les spectres obtenus par ces acquisitions sont en cours de traitement à l'heure actuelle avec le logiciel Tarquin (<http://tarquin.sourceforge.net/>).

Nous avons envisagé de quantifier la stéatose hépatique par MRS *in vivo*, en quantifiant les macromolécules lipidiques dans un voxel du foie (5x5x5 mm). Malgré les développements méthodologiques mis au point dans la cadre de ma thèse, les deux groupes de souris exposées à l'alcool ne supportant pas une 3<sup>e</sup> session d'une heure d'imagerie, nous avons décidé de ne pas inclure cette technique dans le protocole.

## 2. Prélèvements sanguins et dosages

### 2.1 Prélèvement intracardiaque et perfusion intracardiaque

Après la dernière session d'imagerie, les animaux sont euthanasiés par perfusion intracardiaque après prélèvement de leur sang par voie intracardiaque.

Brièvement, les animaux seront maintenus sous anesthésie profonde (5% isoflurane, O<sub>2</sub> /N<sub>2</sub>O 1/1) en respiration spontanée pendant la perfusion intracardiaque. Nous pratiquons une laparotomie-thoracotomie pour accéder au cœur. Pour la ponction cardiaque, 1mL de sang est prélevé directement du cœur avec une seringue (aiguille 23G) citratée (évite l'hémolyse). Enfin, pour la perfusion, nous insérons une canule dans le ventricule gauche du cœur, en prenant soin d'inciser également l'oreillette droite. Ensuite, nous lançons une pompe qui va injecter environ 20 ml NaCl hépariné à 4°C avec un débit de 15mL/min pour rincer le système vasculaire. Nous faisons ensuite passer dans le système vasculaire 100mL de fixateur (2% acide picrique + 0,2% paraformaldéhyde ou 4% paraformaldéhyde, dans du tampon phosphate) afin de fixer les organes de l'animal. Enfin, nous récupérons le cerveau et le foie.

Afin d'obtenir le plasma, nous récupérons le surnageant après une première centrifugation (15 min, 3000g), puis nous le repassons dans une deuxième centrifugation afin d'éviter toute contamination (15min, 3000g). Le plasma obtenu est stocké à -80°C.

## 2.2 Dosage des niveaux d'alcool sanguins et des transaminases hépatiques

Les prélèvements sanguins étant faits à la suite du protocole d'imagerie, le sang est prélevé lorsque les souris ont arrêté de boire et de manger depuis au moins une heure (temps de l'imagerie) et entre 13h et 21h. Les dosages d'alcool sanguins sont réalisés au CHU de Caen dans le service de pharmacologie par le Dr. Lelong-Boulouard. Les dosages de transaminases (ASAT et ALAT) sont réalisés au CHU de Caen dans le service de biochimie par le Dr. Laurent Coulbault.

## 2.3 Dosage des cytokines

Pour évaluer la réponse inflammatoire dans notre modèle, nous avons choisi de mesurer la concentration dans le plasma de 23 cytokines reliées à l'inflammation en utilisant un kit luminex. Les 23 cytokines sont interleukine-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ), interleukine-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukine-2 (IL-2), interleukine-3 (IL-3), interleukine-4 (IL-4), interleukine-5 (IL-5), interleukine-6 (IL-6), interleukine-9 (IL-9), interleukine-10 (IL-10), interleukine-12 p40 (IL-12 p40), interleukine-12 p70 (IL-12 p70), interleukine-13 (IL-13), interleukine-17 (IL-17), *tumor necrosis factor* (TNF), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), CXCL1, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL11, G-CSF et GM-CSF.

Le dosage des cytokines circulantes est réalisé à l'université de Louvain par le Dr. Sophie Leclercq, par un kit de dosage multiplex avec lecteur de plaque Luminex (PRO Mouse Cytokine 23-PLEX, BioRad).

## 3. Immunohistochimie

Le cerveau et le foie prélevés sont postfixés pendant 18h à 4°C puis rincés avec une solution de 20% de sucrose pendant 48h à 4°C. Le cerveau et le cervelet sont dissociés, et un morceau de foie est prélevé pour congélation dans du Tissue-Tek O.C.T (Miles Scientific, Naperville, IL, USA) à -80°C. Le foie restant est stocké dans du PBS azide (0,01%) à 4°C.

Les échantillons sont coupés au cryostat (Leica 3500) à une épaisseur de 10µm sur des lames adhérentes Polilysine, les lames sont ensuite stockées à -80°C avant utilisation.

Le protocole d'immunohistochimie est le suivant : les lames sont décongelées à température ambiante (environ 45 minutes), ensuite elles sont réhydratées et rincées dans 3 bains de PBS (PH 7,4) successifs de chacun 15 minutes. Les anticorps primaires sont déposés sur les lames (450 µL dans du PBS avec 25% de Triton) et incubés en chambre humide à température ambiante sur la nuit. Les lames sont rincées par 3 bains successifs de PBS (environ 15 aller-retours par bain) puis les anticorps secondaires sont déposés (450 µL dans du PBS avec 25% de triton) et laissés à incuber pendant 1h30 en chambre humide à température ambiante. Les lames sont ensuite rincées par 3 bains successifs de PBS et directement montées avec du milieu de montage contenant du DAPI. Après environ 10 minutes de séchage, les lames sont stockées à 4°C (maximum une semaine) pour être visualisées au microscope.

### 3.1 Anticorps primaires

Nous avons utilisé des anticorps primaires dirigés contre la souris, pour marquer **dans le cerveau** : la microglie avec Iba1 (lapin polyclonal 1 :1000, Wako 019-19741 ou chèvre polyclonal 1 :1000, abcam ab5076), l'activation microgliale avec CD68 (rat monoclonal 1 :1000, abcam 53444 ou lapin polyclonal 1 :500, abcam ab125212), les astrocytes avec GFAP (poulet polyclonal, 1 : 2000, abcam ab4674), les vaisseaux sanguins avec Col-IV (chèvre polyclonal 1 : 1500, southern biotech 1340) ou laminine (lapin polyclonal 1 : 1500, abcam ab11575), les neutrophiles avec LY6G (rat monoclonal 1 : 500, Stem cell clone 1A8).

**Et dans le foie** : les cellules de Kupffer avec Iba1 (chèvre polyclonal 1 :1000, abcam ab5076), ou CD68 (lapin polyclonal 1 :500, abcam ab125212), les cellules étoilées hépatiques avec GFAP (lapin polyclonal 1 :1500, aligent Z033429), les vaisseaux avec Col-IV (chèvre polyclonal 1 : 1500, southern biotech 1340), les neutrophiles avec LY6G (rat monoclonal 1 : 500, Stem cell clone 1A8). Pour résumé, voir tableau récapitulatif des anticorps.

*Tableau 1: Récapitulatif des cibles des anticorps primaires utilisés*

| Anticorps utilisé | Cible au niveau cérébral | Cible au niveau hépatique    |
|-------------------|--------------------------|------------------------------|
| Iba1              | Microglie                | Cellules de Kupffer          |
| CD68              | Activation microgliale   | Cellules de Kupffer          |
| GFAP              | Astrocytes               | Cellules étoilées hépatiques |
| Collagène-IV      | Vaisseaux                | Vaisseaux                    |

|          |                           |                           |
|----------|---------------------------|---------------------------|
| Laminine | Lame basale des vaisseaux | Lame basale des vaisseaux |
| LY6G     | Neutrophiles              | Neutrophiles              |

### 3.2 Anticorps secondaires

Les anticorps primaires sont révélés en utilisant des fragments Fab'2 d'anticorps d'âne dirigé contre l'espèce de l'anticorps primaire (rat, lapin, chèvre, poulet) marqués par fluorescence FITC, CY5 ou CY3 (1 : 1000, Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA).

Les microphotographies sont prises avec un microscope à épifluorescence (Leica DM6000) couplé à une caméra coolsnap, et visualisées avec le logiciel Leica MM AF 2.2.0 (Molecular Devices, USA) puis analysées avec le logiciel ImageJ. Au moins 6 photos sont prises aléatoirement dans les régions d'intérêt par animal pour les quantifications.

## III. PROTOCOLE MINOCYCLINE

Les souris sont soit exposées à l'eau (N=30) soit exposées à l'alcool (N=30) pendant 5 mois puis dans chaque condition (eau et alcool) elles sont divisées en 3 groupes (N=10/groupe). Un groupe reçoit pendant 17 jours de la minocycline : groupe MINO-chronique (Sigma), 30 mg/kg, diluée dans son véhicule (300µL de sérum physiologique, pH final= 7,4). Un autre groupe reçoit le véhicule (sérum physiologique) pendant 15 jours puis 2 jours de minocycline : groupe MINO - aigu (même solution que précédemment). Enfin, le groupe contrôle reçoit uniquement le véhicule (sérum physiologique) pendant 17 jours en injection péritonéale : groupe VÉHICULE. Les injections sont faites avec une seringue à insuline (30G) et le côté de l'injection est alterné tous les jours. Les animaux sont pesés et suivis quotidiennement.

A la fin des 17 jours de traitement, le comportement des souris est évalué sur deux jours par Y-Maze, poutre d'équilibre et *open field* selon les protocoles décrits ci-dessus. A partir de cette date, les souris sont également mises en *free-choice* : elles sont isolées (un animal /cage) et un biberon d'eau est alors à disposition à côté du biberon contenant de l'alcool. Les souris et les biberons sont pesés 2 fois par semaine pour mesurer la quantité de boisson consommée spontanément par chaque animal ; la position des biberons est alternée pour éviter le développement de la préférence de place. Après 3 semaines de suivi, les souris sont euthanasiées ou réformées.

## IV. ANALYSES STATISTIQUES

Pour le protocole comportemental, les animaux ne sont pas suivis individuellement entre les temps d'exposition à l'alcool, les analyses statistiques sont donc faites sur des échantillons indépendants. Les comparaisons inter groupes (CONTROLE, ALCOOL et ABSTINENCE) sont faites avec une ANOVA non paramétrique de Kruskal-Wallis. Lorsque l'effet principal du groupe est significatif ( $p < 0,05$ ), des comparaisons post-hoc sont réalisées avec le test de Dunn. Pour les mesures répétées (notamment les essais pour la poutre d'équilibre), une ANOVA non paramétrique de Friedmann est réalisée suivie de comparaisons post hoc de Dunn pour échantillons appariés. Concernant le Y-Maze, pour comparer le nombre d'entrées à une valeur donnée, nous utilisons le test non paramétrique de Wilcoxon. Pour l'analyse de la poutre d'équilibre, le nombre de chutes est comparé entre les trois groupes par un test de chi-deux puis par un test exact de Fisher pour les comparaisons deux à deux.

Pour le protocole d'imagerie et d'immunohistochimie, les comparaisons inter groupes sont faites avec une ANOVA non paramétrique de Kruskal-Wallis, si l'effet principal du groupe est significatif ( $p < 0,05$ ), elle est suivie de comparaisons post-hoc avec le test de Dunn.

Pour le protocole minocycline, le suivi de consommation des boissons est analysé avec une ANOVA non paramétrique de Friedmann, suivie de tests de Dunnett.

Les statistiques sont réalisées avec le logiciel GraphPad8 (Prism).

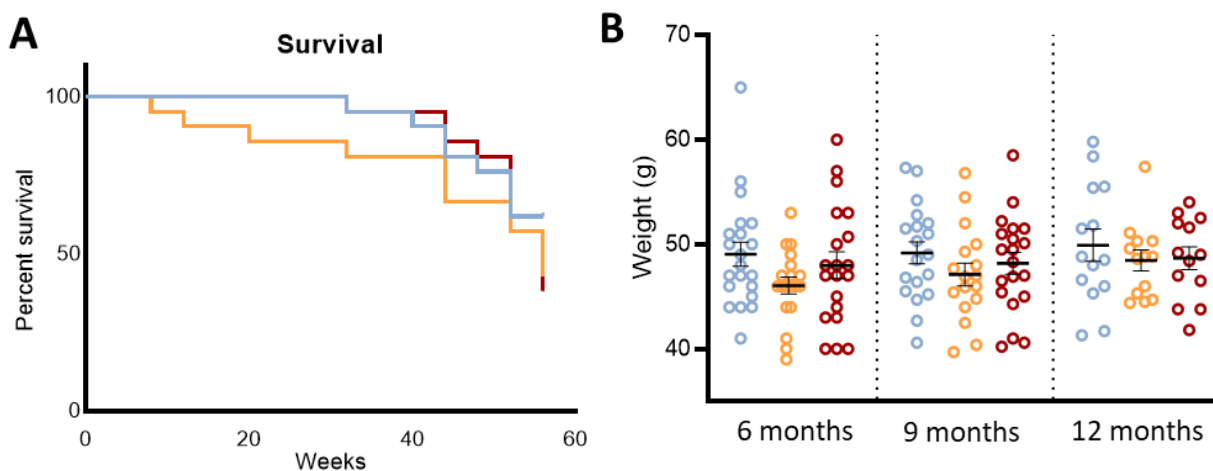


# Résultats

## I. CARACTÉRISATION DU MODÈLE

Le modèle d'exposition forcée à l'alcool n'a pas induit de mortalité significativement supérieure au groupe CONTROLE (**Figure 22 A**), ni de différence de poids entre les groupes et entre les différents temps d'exposition (**Figure 22 B**).

Les souris consommaient en moyenne après 1,5 mois d'exposition à l'alcool 4-5 mL de boisson par jour (soit 8-10 g/kg d'alcool) et les souris du groupe CONTROLE 5-6 mL d'eau. A partir de 6 mois d'exposition à l'alcool et jusqu'à la fin du protocole, les souris exposées à l'alcool consommaient environ 6 à 8 mL de boisson par jour (soit 10-13 g/kg d'alcool) et les souris du groupe CONTROLE 6 à 8 mL d'eau (données non présentées).

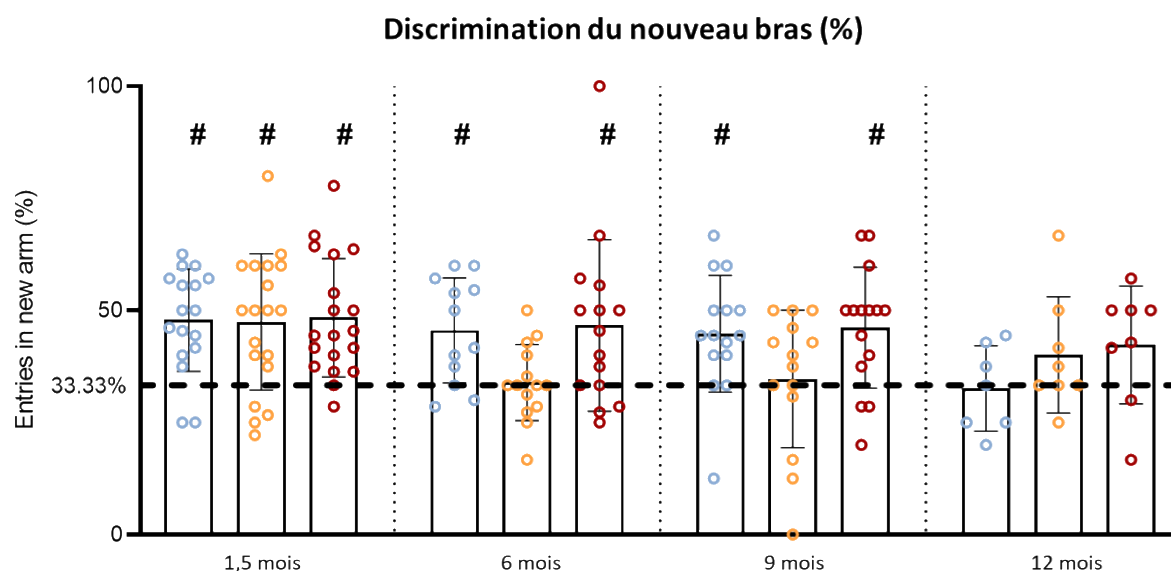


*Figure 22 : A) Courbe de survie des 3 groupes d'animaux pendant la durée du protocole comportemental ; B) Poids des 3 groupes d'animaux du protocole comportemental à 6, 9 et 12 mois d'exposition à l'alcool (eau pour les contrôles ; données manquantes à 1,5 mois d'exposition à l'alcool). Bleu : groupe Contrôle, Orange : groupe Alcool, Rouge : groupe Abstinence.*

## II. PROTOCOLE COMPORTEMENTAL

### 1. Mémoire spatiale : Y maze

Le groupe de souris ALCOOL ne discrimine pas le nouveau bras comparé au seuil de chance à partir de 6 mois d'exposition à l'alcool (33,91%  $\pm$  2,28 p=0,61 comparé à 33,33%) et persistant à 9 mois (34,71%  $\pm$  4,09 p = 0,42 comparé à 33,33% ; **Figure 23**) et 12 mois ; ce déficit de mémoire à 12 mois est commun aux trois groupes (CONTROLE, ALCOOL et ABSTINENCE ; respectivement 32,59%  $\pm$  3,6 p>0,99 ; 40,1%  $\pm$  4,59 p = 0,07 et 42,29  $\pm$  4,64 p=0,07 comparé à 33,33%).

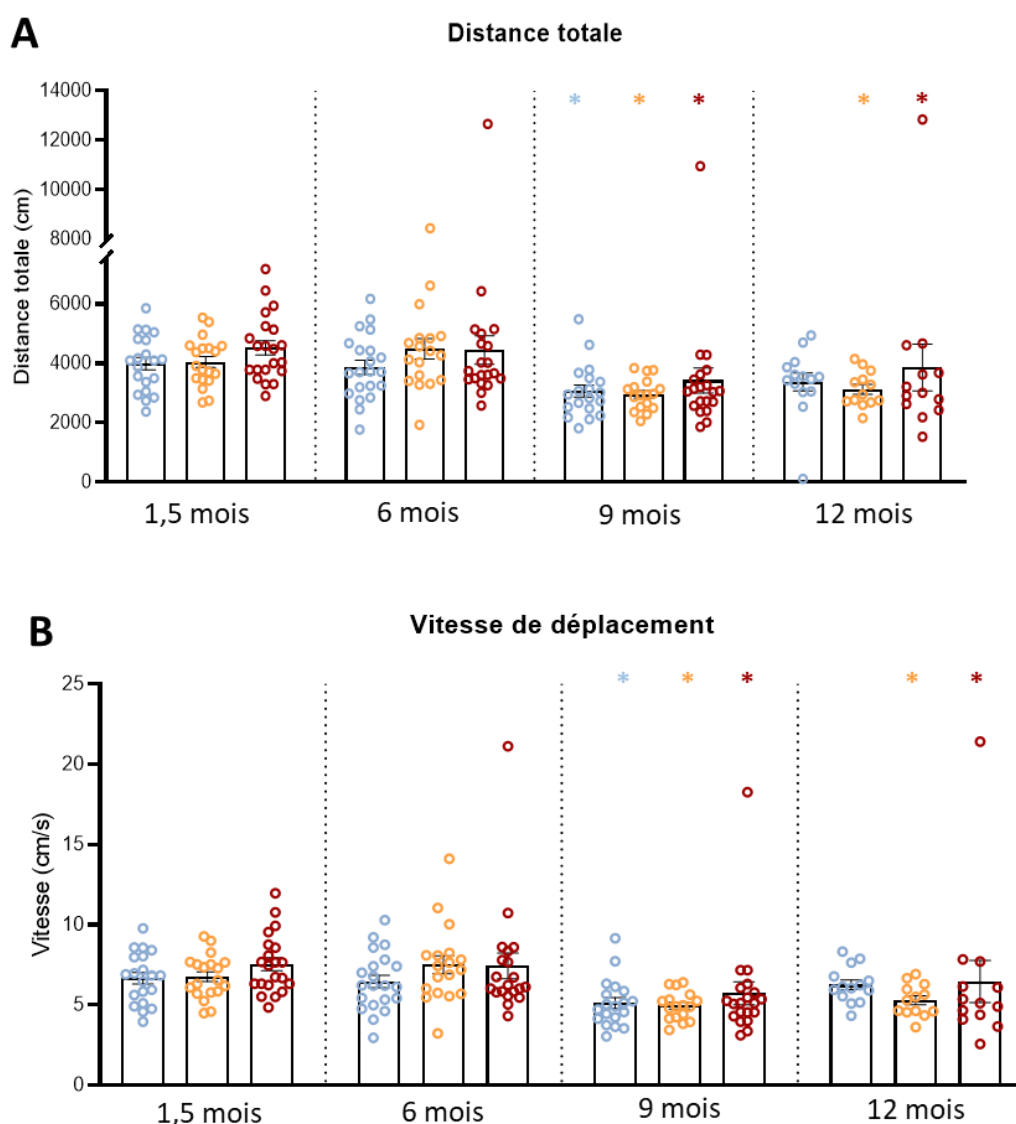


**Figure 23 : Discrimination du nouveau bras dans le test de Y-Maze par rapport au hasard, par temps d'exposition à l'alcool.** Ligne en pointillée : seuil de chance (33,33%). Bleu : groupe contrôle, orange : groupe alcool, rouge : groupe abstinence. # p<0,05 comparé à 33,33% ; Wilcoxon signed-ranked test.

### 2. Activité locomotrice et anxiété : Open field

Il n'y a pas d'effet du groupe concernant l'activité locomotrice, que ce soit en termes de distance parcourue ou de vitesse de déplacement, quel que soit le temps d'exposition à l'alcool (distance parcourue : p=0,30 à 1,5 mois, p=0,38 à 6 mois, p=0,79 à 9 mois, p=0,37 à 12 mois, vitesse p=0,31 à 1,5 mois, p=0,37 à 6 mois, p=0,79 à 9 mois, p=0,13 à 12 mois). Cependant, un effet du temps est observé dans tous les groupes (distance parcourue : ANOVA p=0,01 groupe CONTROLE, p<0,0001 groupe ALCOOL, p=0,0002 groupe ABSTINENCE ; vitesse : ANOVA p=0,01 groupe CONTROLE, p<0,0001 groupe ALCOOL, p=0,0002 groupe

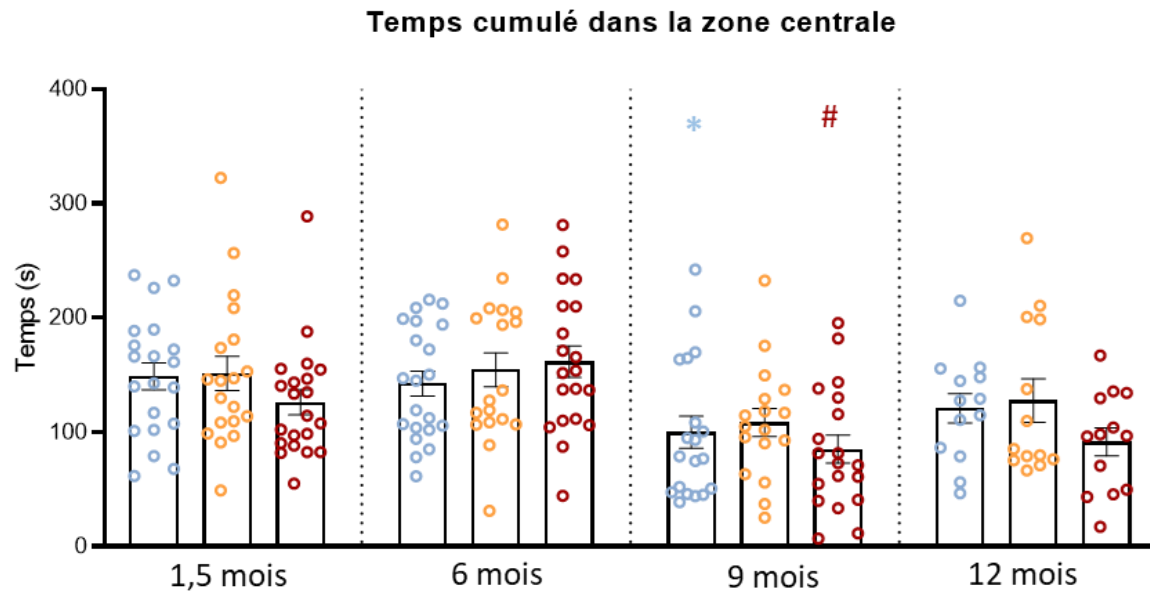
ABSTINENCE). Plus précisément, dans les groupes ALCOOL et ABSTINENCE, la distance parcourue et la vitesse de déplacement sont diminuées à 9 mois et 12 mois comparé à 1,5 mois d'exposition à l'alcool (**Figure 24 A B**) et pour le groupe CONTROLE, cet effet est présent à 9 mois ( $p=0,007$  comparé à 1,5 mois) mais pas à 12 mois ( $p=0,6$  comparé à 1,5 mois).



**Figure 24 : Distance parcourue et vitesse dans l'open field par groupe et par temps d'exposition à l'alcool.**  
A) Distance totale parcourue dans l'openfield, B) Vitesse moyenne pendant le test de l'open field. Bleu : groupe contrôle, orange : groupe alcool, rouge : groupe abstinence. \*  $p<0,05$  comparé à 1,5 mois d'exposition à l'alcool ; Dunn's test.

L'analyse sur l'anxiété (temps passé dans la zone centrale de l'open field) n'a pas montré d'effet du groupe quel que soit le temps d'exposition à l'alcool (ANOVA :  $p=0,19$  à 1,5 mois ;  $p=0,52$  à 6 mois,  $p=0,34$  à 9 mois ;  $p=0,28$  à 12 mois ; **Figure 25**). Il existe un effet du temps

d'exposition à 9 mois d'exposition comparé à 1,5 mois dans les groupes CONTROLE (ANOVA  $p=0,01$  ; Dunn's test  $p=0,01$ ) et ABSTINENCE (ANOVA  $p=0,0002$  ; Dunn's test  $p=0,05$ ) et une tendance dans le groupe ALCOOL (ANOVA  $p=0,07$ ).

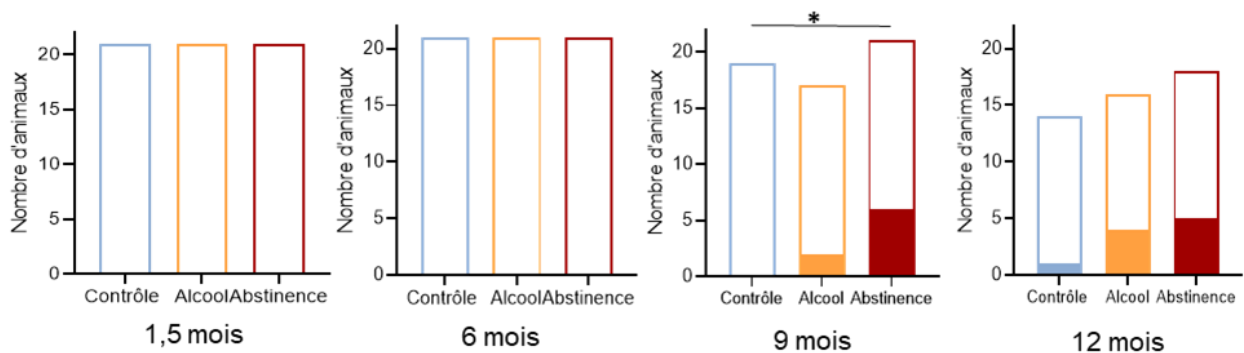


**Figure 25 : Temps cumulé passé dans la zone centrale (anxiogène) par temps d'exposition à l'alcool.** Bleu groupe contrôle, orange groupe alcool, rouge groupe abstinence. \*  $p<0,05$ , # $p=0,05$  comparé à 1,5 mois d'exposition à l'alcool ; Dunn's test.

### 3. Équilibre et motricité fine : Poutre d'équilibre

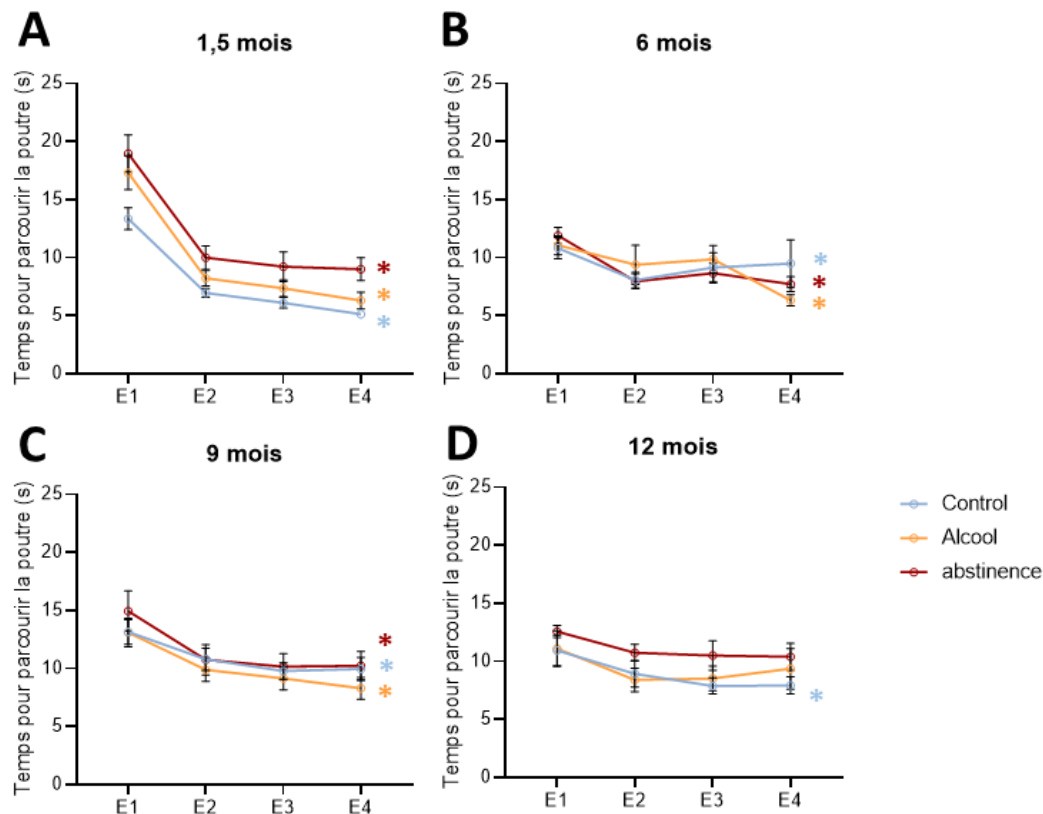
A partir de 9 mois d'exposition à l'alcool (eau pour CONTROLE), nous observons des chutes du dispositif chez des animaux des groupes ALCOOL et ABSTINENCE (**Figure 26**), avec significativement plus de chutes dans le groupe ABSTINENCE comparé au groupe CONTROLE ( $p=0,01$  comparé au contrôle ; Figure 7). A 12 mois, le nombre d'animaux chutant du dispositif ne diffère pas significativement entre les groupes ( $p=0,18$  ; **figure 26**).

## Distribution des chutes de la poutre d'équilibre



**Figure 26 : Distribution des chutes du dispositif de la poutre d'équilibre par temps d'exposition à l'alcool.** Bleu : groupe contrôle, orange : groupe alcool, rouge : groupe abstinence. Remplissage : nombre d'animaux qui chutent du dispositif, vide : nombre de souris qui ne chutent pas du dispositif \*  $p < 0,05$  comparé au groupe contrôle ; test exact de Fisher.

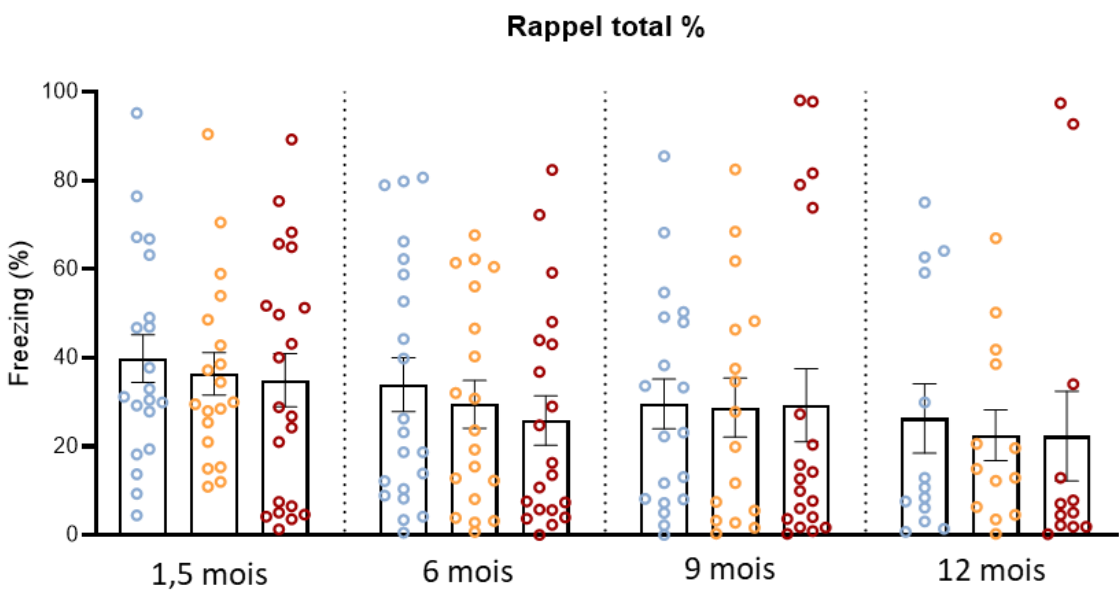
Concernant la motricité fine, elle est mesurée avec l'amélioration du temps à parcourir la poutre entre le premier essai (E1) et le quatrième essai (E4). Il est important de noter que les souris tombées du dispositif ne sont pas incluses dans l'analyse. Dans le groupe CONTROLE il y a une amélioration significative du temps entre E4 et E1 quel que soit le temps d'exposition à l'eau (**Figure 27 A-D**). A 1,5, 6 et 9 mois d'exposition à l'alcool, les souris des groupes ALCOOL et ABSTINENCE qui réussissent à ne pas tomber du dispositif améliorent aussi significativement leur temps à E4 comparé à E1 (**Figure 27 A-C**). A partir de 12 mois, il n'y a plus d'amélioration entre E4 et E1 dans les groupes ALCOOL ( $p = 0,60$  ; **figure 27 D**) et ABSTINENCE ( $p = 0,5$  ; **Figure 27 D**).



**Figure 27 : Temps pour parcourir la poutre d'équilibre par temps d'exposition à l'alcool.** Bleu : groupe contrôle, orange : groupe alcool et rouge : groupe abstinence, E : essai ; les moyennes avec les SEM sont représentées. \* $p < 0,05$  E4 comparé à E1 comparaison intra groupe de la couleur correspondante, ANOVA suivie d'un Dunn's test.

#### 4. Mémoire émotionnelle : Fear conditioning

Il n'y a pas de différence entre les groupes (ANOVA  $p=0,72$  à 1,5 mois,  $p=0,55$  à 6 mois,  $p=0,76$  à 9 mois,  $p=0,49$  à 12 mois) ou entre les temps d'exposition à l'alcool (ANOVA  $p=0,27$  groupe CONTROLE,  $p=0,31$  groupe ALCOOL,  $p=0,37$  groupe ABSTINENCE) dans la mémoire émotionnelle (mesurée par le temps d'immobilisation pendant la phase de rappel) (**Figure 28**). Nous n'avons pas non plus de différence entre les groupes, ni entre les temps d'exposition à l'alcool (eau pour CONTROLE) dans la phase d'acquisition du test (données non présentées).



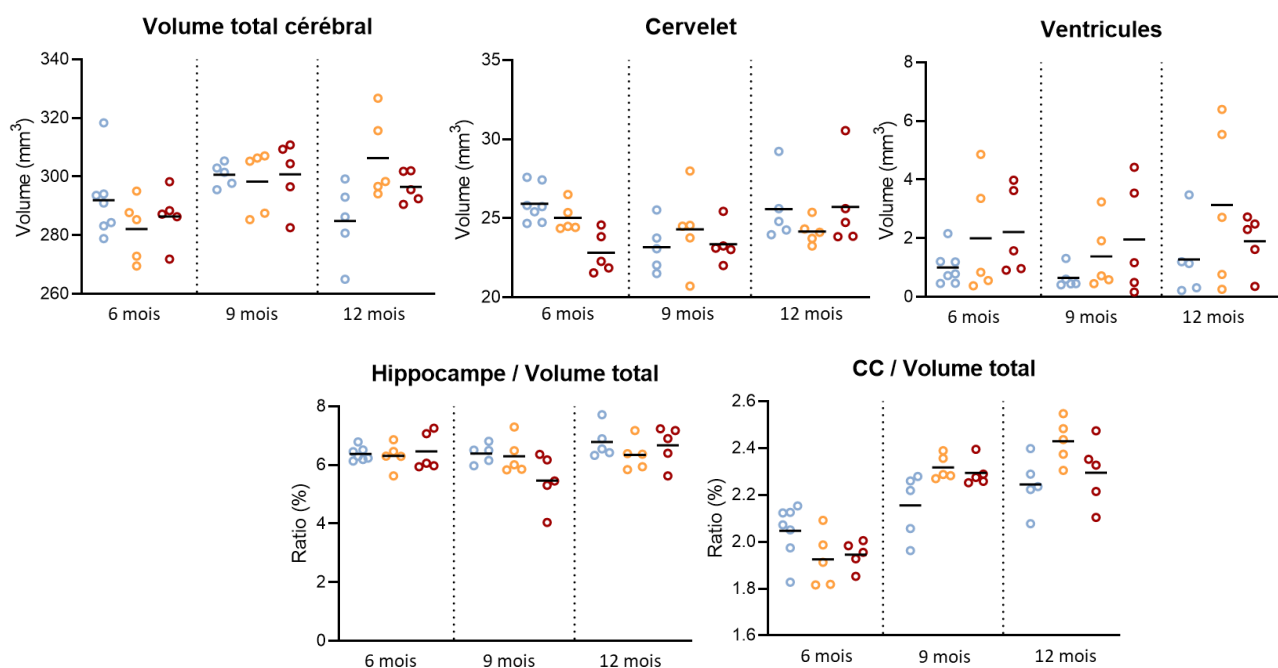
*Figure 28 : Temps d'immobilisation pendant la phase de rappel (24h après la phase d'acquisition) par temps d'exposition à l'alcool. Bleu groupe contrôle, orange groupe alcool, rouge groupe abstinence*

### III. PROTOCOLE D'IMAGERIE, DOSAGES SANGUINS ET IMMUNOHISTOCHIMIE

#### 1. Imagerie cérébrale

##### 1.1 Volumétrie

Il n'y a pas de différence de volume dans les différentes régions d'intérêt aux différents temps d'exposition à l'alcool (eau pour CONTROLE ; **Figure 29**).

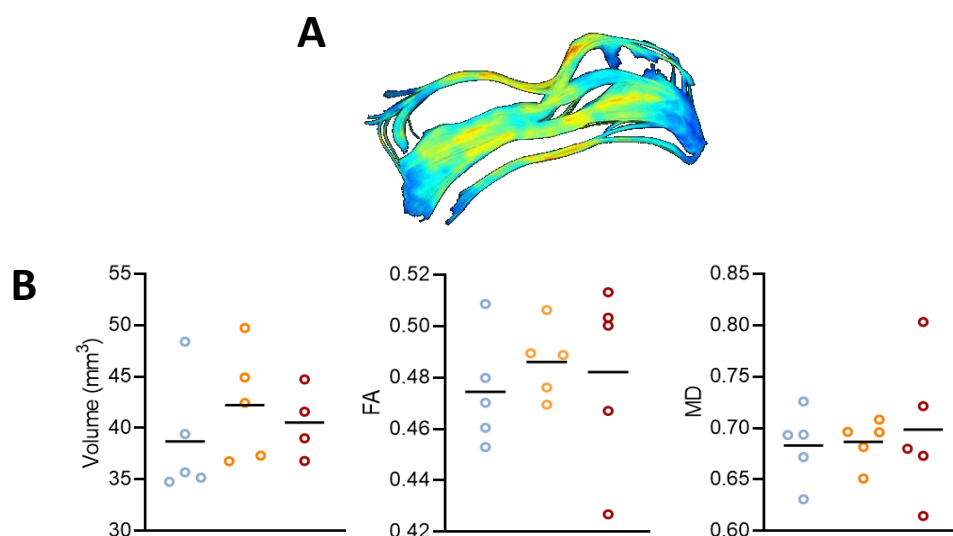


**Figure 29 : Volume des régions d'intérêt par région et par temps d'exposition à l'alcool. Bleu groupe contrôle, orange groupe alcool, rouge groupe abstinence**

##### 1.2 Diffusion

Les mesures de tractographie de la microstructure du corps calleux à 6 et 9 mois sont en cours d'analyse. A 12 mois, il n'y a pas de différence entre les groupes pour le volume de fibres ( $p=0,36$ ), l'anisotropie fractionnelle ( $p=0,73$ ) et la diffusivité moyenne ( $p=0,93$ ) (**Figure 30**).





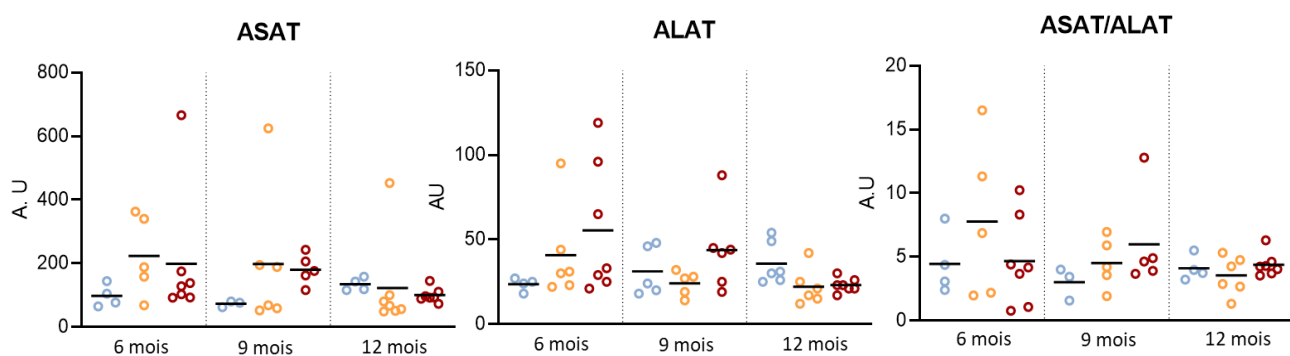
**Figure 30 : Paramètres de microstructure de substance blanche du corps calleux par groupe à 12 mois d'exposition à l'alcool.** A) Image représentative de la reconstruction du corps calleux ; B) Volume, anisotropie fractionnelle et diffusivité moyenne. Bleu ; groupe contrôle, orange ; groupe alcool, rouge ; groupe abstinence

## 2. Niveaux d'alcool sanguin

Pour mesurer les niveaux d'alcool sanguin des souris, nous avons prélevé leur sang après le protocole d'imagerie cérébrale, à des heures différentes de la journée (entre 13h et 21h). La limite de détection du test est de 0,1 g/L. Une souris sur les six échantillons du groupe ALCOOL à 6 mois présente une éthylémie supérieure au seuil de détection (0,35g/L) et une souris sur les sept échantillons à 12 mois (0,53g/L). Aucun des autres échantillons n'était supérieur à 0,1g/L d'alcool (données non présentées).

### 3. Enzymes hépatiques

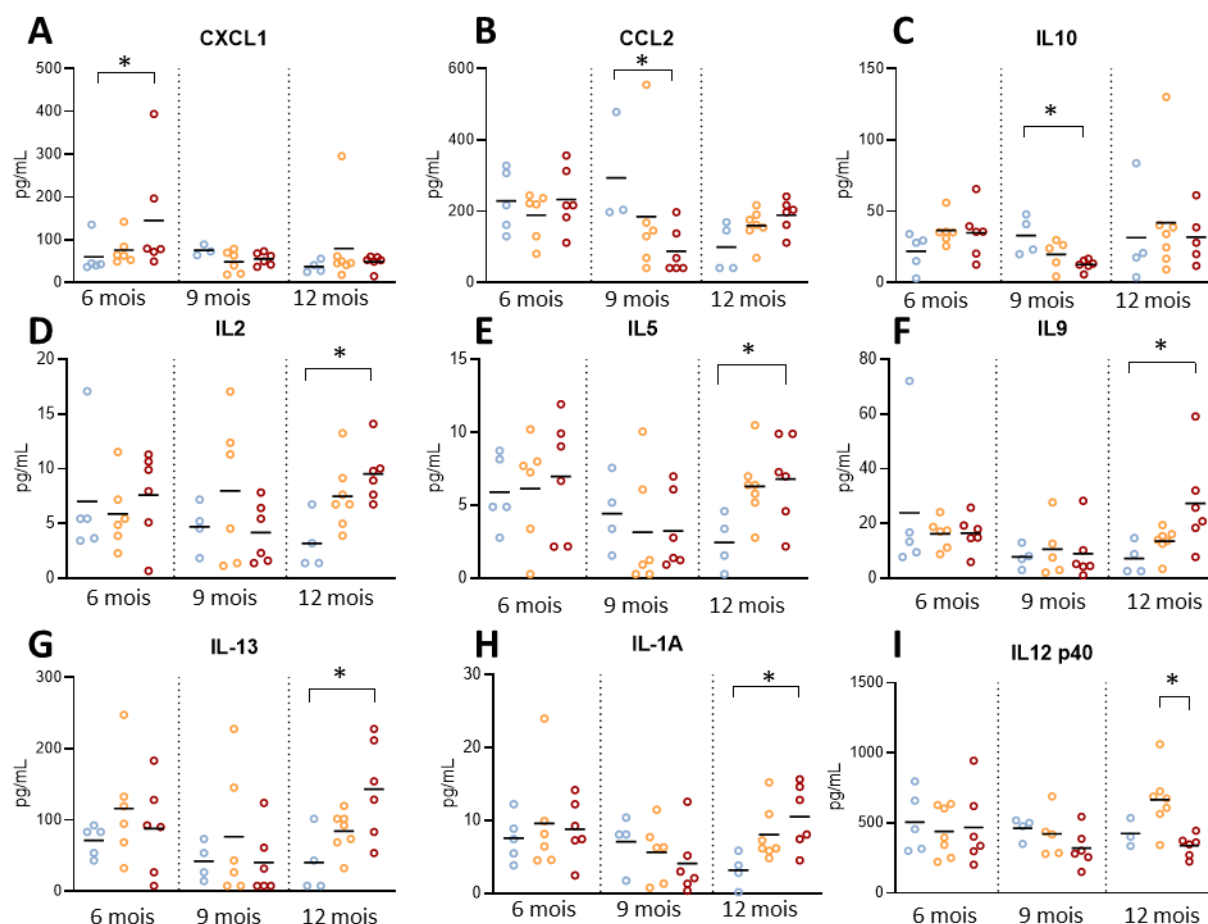
Nous n'avons pas trouvé de différence au niveau des enzymes hépatiques sanguines (ASAT, ALAT ou le ratio ASAT/ALAT) entre les groupes, quel que soit le temps d'exposition (**Figure 31**).



**Figure 31 : Taux sanguins des enzymes hépatiques par mesure et par temps d'exposition à l'alcool.** Bleu groupe contrôle, orange groupe alcool, rouge groupe abstinence.

### 4. Cytokines circulantes

Sur les 23 cytokines, aucune n'a montré de différence entre les groupes systématiquement aux trois temps de l'étude, mais 9 d'entre elles ont montré des différences entre les groupes à certains temps d'exposition à l'alcool (eau pour CONTROLE ; **Figure 32 A-H**). Plus précisément, le taux de CXCL1 est significativement plus élevé seulement dans le groupe ABSTINENCE comparé au groupe CONTROLE à 6 mois d'exposition à l'alcool (eau pour CONTROLES ; **Figure 32 A**). Les taux de CCL2 et IL10 sont significativement plus bas dans le groupe ABSTINENCE comparé au groupe CONTROLE à 9 mois d'exposition à l'alcool (eau pour CONTROLES ; **Figure 32 B-C**). Enfin, à 12 mois d'exposition à l'alcool (eau pour CONTROLE), les taux d'IL-2, IL-5, IL-9, IL-13 et IL-1A sont significativement plus élevés dans le groupe ABSTINENCE comparé au groupe CONTROLE (**Figure 32 D-H**) et le taux d'IL-12 p40 est plus élevé dans le groupe ALCOOL comparé au groupe ABSTINENCE (**figure 32 I**).



**Figure 32 : Altérations significatives dans le taux des cytokines plasmatiques par cytokine et par temps d'exposition à l'alcool.** Bleu groupe contrôle, orange groupe alcool, rouge groupe abstinence. ANOVA de Kruskal-Wallis, suivie d'un Dunn's test, \* $p < 0,05$

## 5. Immunohistochimie

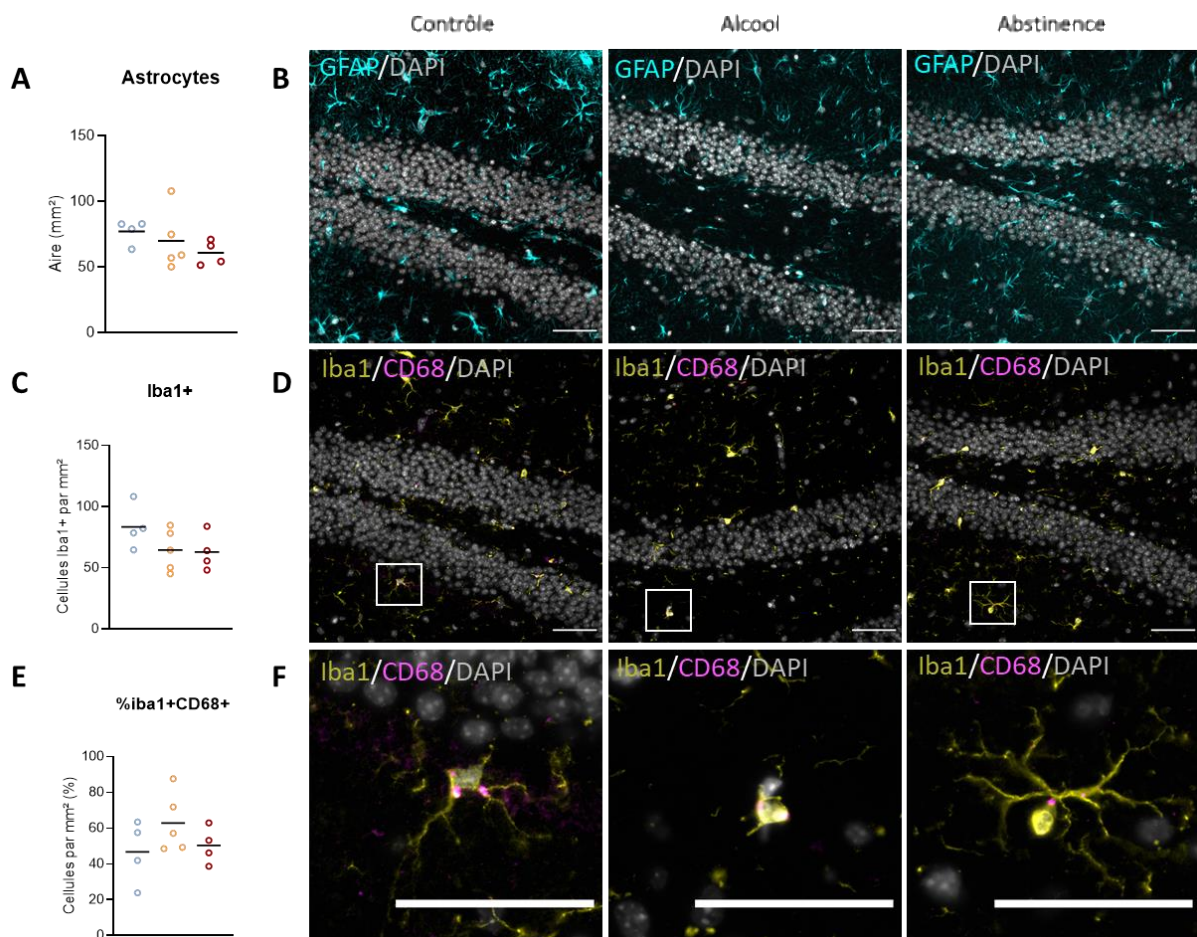
Ne sont présentés ici que les résultats après 6 mois d'exposition à l'alcool (eau pour CONTROLE) ; les résultats aux autres temps de l'étude sont encore en cours d'analyse.

### 5.1 Immunohistochimie cérébrale

Les cerveaux ont été co-marqués avec un marqueur astrocytaire (GFAP), un marqueur de la microglie (Iba1) et un marqueur lysosomal (CD68 ; caractéristique des phénomènes de phagocytose microgliaux). Au vu des résultats comportementaux montrant des déficits de mémoire spatiale dès 6 mois, nous avons décidé de commencer nos analyses au niveau de

l'hippocampe ; les autres régions d'intérêt (cortex et corps calleux) sont encore en cours d'analyse.

Nous n'avons pas observé de différence significative entre les groupes dans l'hippocampe pour l'aire des astrocytes (**Figure 33 A-B**), ni dans le nombre de cellules microgliales (**Figure 33 C-D**) ou le nombre de cellules double-positives pour Iba1 et CD68 (**Figure 33 E**). Nous avons cependant observé une modification morphologique dans la microglie double-positive pour Iba1 et CD68 dans le groupe ALCOOL, avec une perte du nombre de prolongements sortant du soma et montrant plutôt une morphologie amiboïde (**Figure 33 F**). Des analyses supplémentaires sont en cours pour quantifier le nombre des cellules microgliales amiboïdes dans chaque groupe.

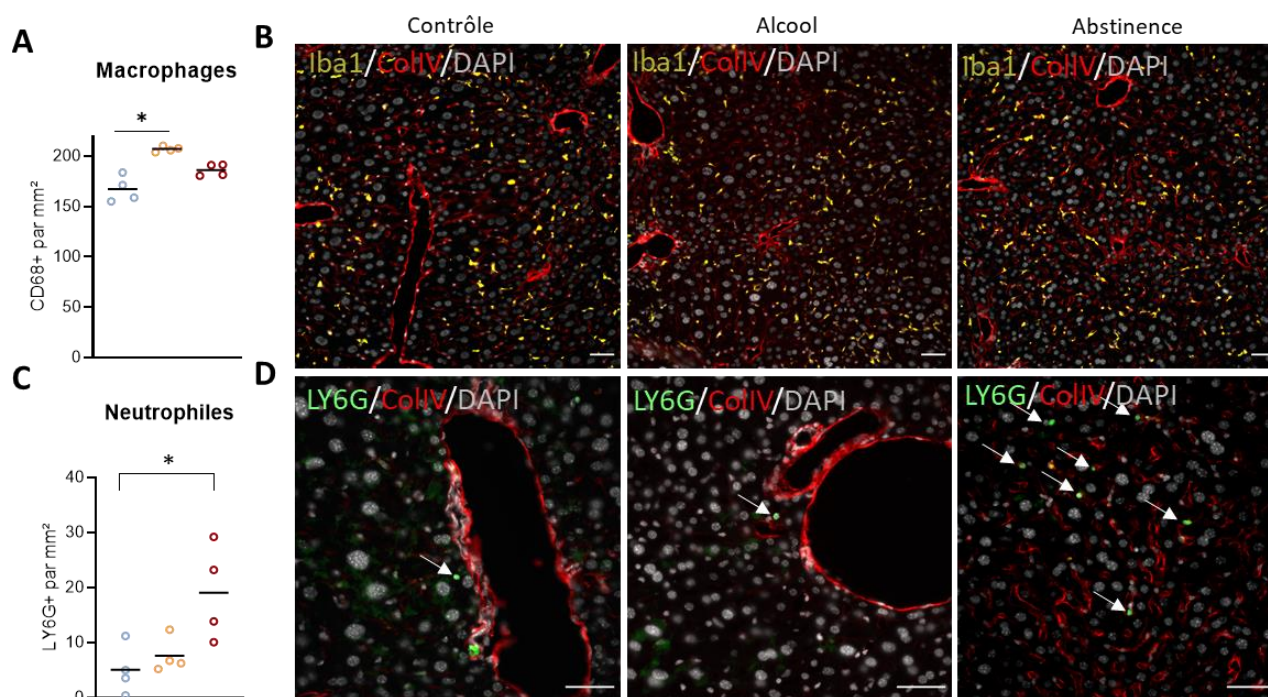


**Figure 33 : Astrocytes et microglie dans l'hippocampe dans les groupes contrôle, alcool et abstinence après 6 mois d'exposition à l'alcool (eau pour les contrôles).** A, C et E : Quantification de l'aire marquée par les astrocytes (A), du nombre de cellules Iba1+ (C) et du pourcentage de cellules double-positives pour Iba1+ et CD68+ (sur le nombre de cellules Iba1+ (E)). B, D et F : Microphotographies représentatives du marquages astrocytaire (B) de la microglie et de CD68 (D) et grossissement sur la morphologie d'une cellule microgliale marquée à Iba1 ET à CD68 (F). Barre d'échelle 50µm. Bleu groupe contrôle, orange groupe alcool, rouge groupe abstinence.

Nous avons aussi marqué les cerveaux avec un marqueur de neutrophiles (LY6G). Aucune infiltration de neutrophile n'a été détectée dans les 3 groupes (Données non présentées).

## 5.2 Immunohistochimie hépatique

Les foies ont été co-marqués avec un marqueur des macrophages (CD68), un marqueur des neutrophiles (LY6G) et un marqueur des vaisseaux (Col-IV). Dans le groupe ALCOOL, le nombre de macrophages était significativement plus élevé que dans le groupe CONTROLE (**Figure 34 A, B**). De manière intéressante, le nombre de neutrophiles était significativement plus élevé dans le groupe ABSTINENCE comparé au groupe CONTROLE (**Figure 34 C, D**).



**Figure 34 : Quantification du nombre de macrophages et infiltration de neutrophiles au niveau hépatique après 6 mois d'exposition à l'alcool.** A) et B) Augmentation significative des macrophages hépatiques dans le groupe alcool comparé au contrôle et microphotographies représentatives. C) et D) Infiltration des neutrophiles au niveau hépatique significative dans le groupe abstinence comparé au groupe contrôle et microphotographies représentatives. Les flèches pointent vers les neutrophiles infiltrés. Barre d'échelle 50µm. Bleu groupe contrôle, orange groupe alcool, rouge groupe abstinence

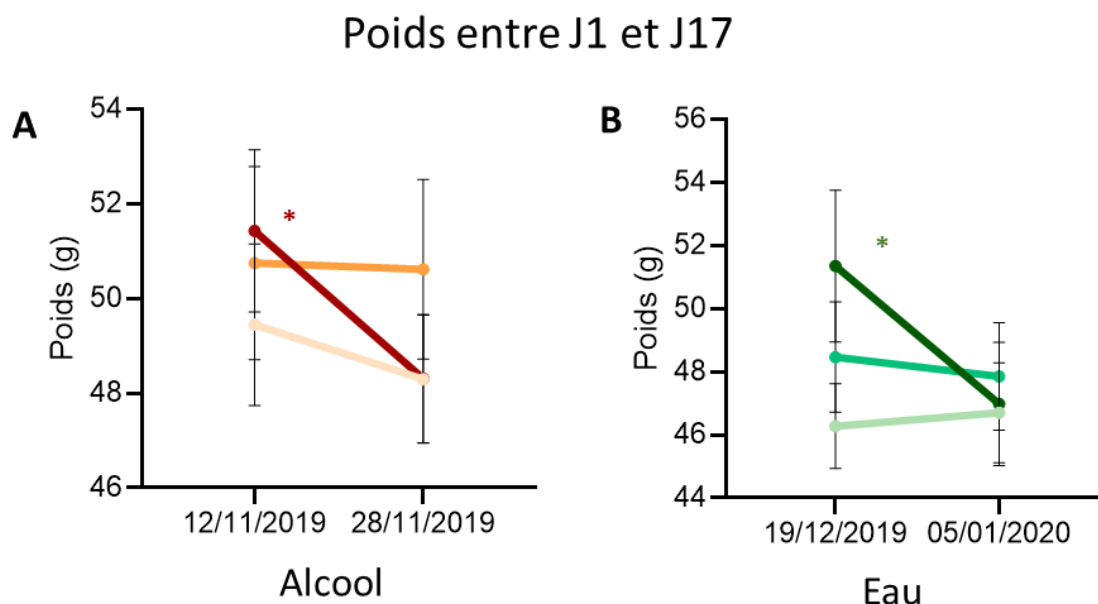
Les cellules étoilées hépatiques ont également été marquées (GFAP) ; les analyses sont actuellement en cours.



## IV. PROTOCOLE MINOCYCLINE

Le but de cette expérience était de déterminer si l'administration d'une molécule capable de bloquer la neuroinflammation induite par la consommation chronique d'alcool pourrait prévenir les déficits comportementaux et/ou biologiques observés chez les souris exposées à l'alcool de manière chronique. Puisque les résultats précédents ont montré l'apparition des premiers déficits de mémoire à 6 mois d'exposition à l'alcool, nous avons choisi de commencer le traitement à la minocycline au bout de 5 mois de consommation d'alcool.

Nous avons observé une perte de poids significative chez les souris des groupes MINO-chronique, que ce soit dans les groupes de souris exposées à l'alcool ou à l'eau (**Figure 35 A-B**).



**Figure 35 : Suivi du poids des souris pendant le protocole de traitement à la minocycline.** A) Souris exposées à l'alcool et B) exposées à l'eau pendant 5 mois. Rose pâle et vert pâle : véhicule (sérum physiologique), orange et vert : 15 jours de véhicule (sérum physiologique) et 2 jours de minocycline (30mg/kg), Rouge et vert foncé : minocycline chronique 30mg/kg. \*p<0,05 entre le premier et le dernier jour, Sidak test.

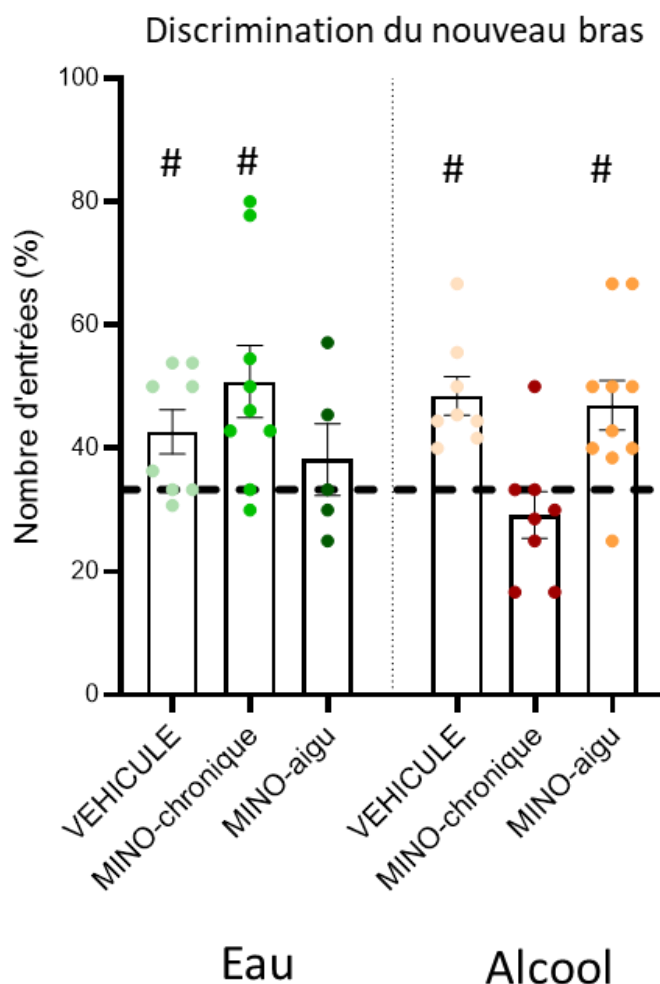
### 1. Évaluation comportementale

Comme les souris exposées à l'alcool pendant 6 mois présentaient des déficits de mémoire évalués par le Y-Maze, nous avons choisi d'utiliser cette épreuve après le traitement à la minocycline. En complément, nous avons testé l'activité locomotrice globale et plus fine

avec l'*open field* et la poutre d'équilibre qui n'ont pas révélé de différence entre les groupes lors de ce nouveau protocole (données non présentées).

Chez les souris exposées à l'eau, le traitement à la minocycline chronique n'a pas altéré leurs capacités à discriminer le nouveau bras (Groupe MINO chronique, **Figure 36**). Cependant, les souris MINO-aigu ne discriminaient pas le nouveau bras du labyrinthe par rapport à la chance, ceci pouvant être expliqué par le faible effectif (animaux exclus du test selon les critères d'exclusion) et sa distribution (**Figure 36**).

Chez les souris exposées à l'alcool, les souris des groupes VEHICULE et MINO-aigu parvenaient à discriminer le nouveau bras comparé au seuil de chance, contrairement aux souris du groupe MINO-chronique (**Figure 36**).

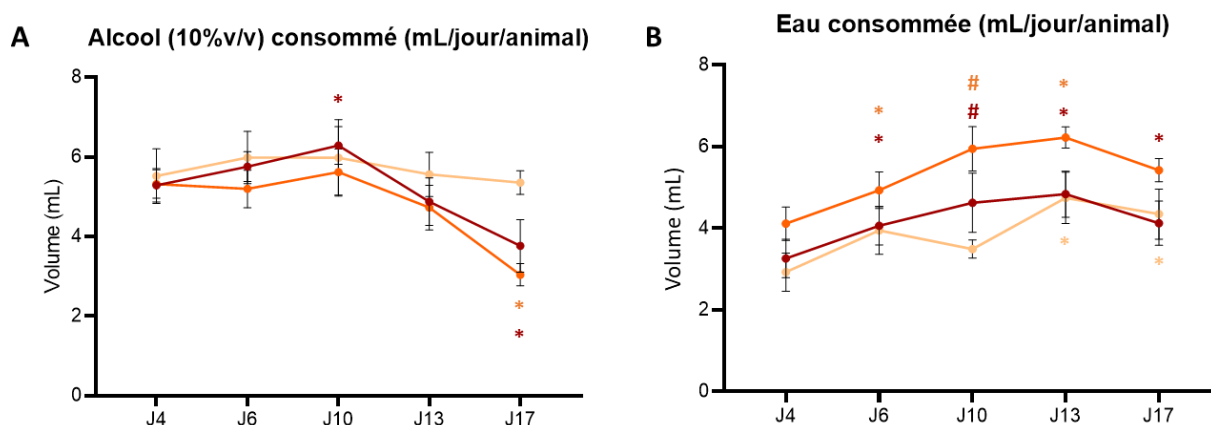


**Figure 36 : Discrimination du nouveau bras comparé au seuil de chance (33,33%, ligne en pointillés) dans le test du Y maze.** Vert pâle et rose pâle : véhicule (sérum physiologique); vert clair et orange : minocycline aiguë (15 jours de véhicule et 2 jours de minocycline 30mg/kg); vert foncé et rouge : minocycline chronique 30mg/kg. #  $p < 0,05$  Wilcoxon-signed ranked test comparé au seuil de chance (33,33%).

## 2. Impact de la minocycline sur la consommation volontaire d'alcool

Les souris exposées à l'alcool ont été mises en cages individuelles et un deuxième biberon contenant de l'eau a été mis à disposition en parallèle de celui contenant de l'alcool. Avec notre protocole d'alcoolisation, les souris continuent à boire de l'alcool de manière volontaire même quand une bouteille d'eau est disponible (groupe alcool-véhicule représenté avec un tracé rose pâle, **Figure 37 A**). De manière intéressante, cette consommation volontaire d'alcool diminue de manière significative à partir du 17<sup>ème</sup> jour quand on administre la minocycline (que ce soit de manière aiguë ou chronique ; **Figure 37 A**).

Concernant la consommation d'eau, les souris du groupe alcool-véhicule augmentent spontanément leur consommation au bout de 13 jours de « free-choice ». Le traitement à la minocycline (que ce soit aigu ou chronique) écourte ce temps de plus de la moitié, puisque ces souris augmentent leur consommation d'eau à partir du 6<sup>ème</sup> jour après avoir accès à l'eau (**Figure 37 B**).



**Figure 37 : Suivi de la consommation des boissons des souris après 6 mois d'exposition à l'alcool et traitement à la minocycline.** Consommation d'alcool (A) et d'eau (B) par mL par jour et par animal (N=10 pour les groupes minocycline et N=9 pour le groupe véhicule). \* $p < 0,05$  # $p < 0,1$  comparé au J4, Two-way ANOVA puis post hoc Dunnett test. Rose pâle : véhicule, orange : minocycline aiguë (15 jours de véhicule et 2 jours de minocycline 30mg/kg) ; rouge : minocycline chronique 30mg/kg.

La consommation totale de liquide était augmentée au 6<sup>e</sup> jour dans le groupe MINO-chronique puis retrouvait dès le 10<sup>e</sup> jour un niveau identique au 4<sup>e</sup> jour (Données non présentées).



## Discussion

Les résultats de cette étude longitudinale ont montré que l'exposition chronique à l'alcool provoquait un déficit de mémoire spatiale apparaissant à 6 mois d'exposition à l'alcool, ainsi que des déficits d'équilibre et coordination au bout de 9 mois. Ces déficits comportementaux n'étaient pas associés à des altérations détectables en IRM (ni macrostructurale en volumétrie ni microstructurale concernant l'intégrité des fibres du corps calleux). Les niveaux des cytokines circulantes ont montré quelques altérations chez les animaux exposés à l'alcool. De plus, nous avons observé une activation microgliale dans l'hippocampe et une inflammation hépatique à partir de 6 mois d'exposition à l'alcool. Les enzymes hépatiques mesurées n'ont pas montré d'altération significative. Le traitement à la minocycline (ciblant l'inhibition de l'activation microgliale) n'a pas montré de bénéfice dans l'amélioration des déficits de mémoire mais a permis de réduire significativement la consommation volontaire d'alcool.

### *Atteintes comportementales*

Nos résultats concernant le déficit cognitif en mémoire spatiale observé au bout de 6 mois d'exposition à l'alcool sont en accord avec une étude récente ([Wang et al., 2018](#)). L'atteinte de la mémoire spatiale pourrait être causée par une vulnérabilité de l'hippocampe et du cortex frontal à l'alcool ([Nunes et al., 2019](#)). Ainsi, il a été décrit chez le rat que 5 mois d'exposition à l'alcool (20% v/v) induisaient une atrophie du cortex frontal et des déficits de mémoire ([Savage et al., 2000](#)). Il a également été montré que 3 semaines d'exposition à l'alcool pouvaient induire des altérations de la plasticité cérébrale au niveau de l'hippocampe ([Stragier et al., 2015](#)).

Nos résultats ont montré que l'équilibre était également affecté à partir de 9 mois. Une étude chez la souris utilisant le même mode d'exposition que dans notre expérience (10% d'alcool v/v *ad libitum*) a décrit une atteinte de l'équilibre et de la coordination fine par test du rotarod présente dès 3 mois d'exposition à l'alcool et associée à une perte de cellules de Purkinje au niveau cérébelleux ([Mitra & Nagaraja, 2008](#)). Nous ne retrouvons pas d'atteinte de l'équilibre avant 9 mois, le test et les mesures que nous utilisons étant peut être moins

sensibles ou spécifique que dans l'étude précédente (Mitra & Nagaraja, 2008). La perte cellulaire cérébelleuse a aussi été retrouvée accompagnée d'une réduction du cortex cérébelleux chez des souris après 3 mois d'exposition à l'alcool (15%v/v *ad libitum* ; Zhu *et al.*, 2011). Bien que le volume du cervelet ne soit pas affecté par l'exposition à l'alcool dans notre étude, il serait intéressant d'explorer les atteintes cellulaires au niveau cérébelleux pouvant expliquer l'altération de l'équilibre. Quel que soit le temps d'exposition, la consommation chronique d'alcool n'entraînait pas d'anxiété, ni d'altérations de la mémoire émotionnelle ou de l'activité motrice globale. Les résultats de la littérature sur l'activité motrice et l'anxiété après l'exposition chronique à l'alcool sont hétérogènes et souvent très dépendants du mode d'exposition, de la durée et de la dose d'alcool administrée (Kliethermes, 2005; Wscieklica *et al.*, 2016; Hansen *et al.*, 2017). Ainsi, par exemple, de fortes doses peuvent entraîner un effet sédatif et induire une hypoactivité.

#### *Atteintes cérébrales structurales*

Globalement, nos résultats montrent que les atteintes cérébrales induites par 6 mois d'exposition à l'alcool restent modérées. Dans le protocole d'imagerie, nous n'avons pas observé d'atteintes cérébrales volumétriques (ni en imagerie de diffusion mais avec des résultats analysés à 12 mois uniquement) pouvant expliquer les déficits cognitifs et moteurs présents dès 6 mois d'exposition à l'alcool. Ces déficits pourraient alors être expliqués par une part inflammatoire, cérébrale et/ou périphérique, invisible avec les méthodes d'imagerie utilisée dans cette étude (D'Mello & Swain, 2011; Zhao *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2014; Crews & Vetreno, 2016; Erickson *et al.*, 2019).

#### *Inflammation cérébrale et hépatique*

Des analyses immunohistochimiques ont donc été réalisées pour étudier le nombre (et, le cas échéant, la morphologie) des astrocytes, cellules microgliales, et neutrophiles dans l'hippocampe au bout de 6 mois d'exposition à l'alcool. D'autres analyses seront réalisées au niveau du cortex cérébral et du corps calleux à 9 et 12 mois d'exposition à l'alcool.

Au niveau cérébral, à 6 mois d'exposition à l'alcool, nous n'avons pas trouvé de différence significative entre les souris exposées à l'alcool et les souris contrôles concernant le nombre de cellules microgliales et d'astrocytes au niveau de l'hippocampe. Chez les souris exposées à l'alcool, il n'y avait pas non plus d'infiltration de neutrophiles au niveau cérébral.

Cependant, dans ce groupe, la microglie positive au CD68 (Iba1+/CD68+) avait un phénotype amiboïde non retrouvé dans les autres groupes. Ces résultats, encore en cours d'analyse, confirment ceux d'une étude récente à laquelle j'ai participé, montrant un *priming* inflammatoire après 2 mois d'exposition à l'alcool caractérisé, entre autre, par une activation microgliale (Drieu *et al.*, 2020 ; voir annexe). L'activation microgliale provoque une libération de cytokines pro inflammatoires et celles-ci ont été retrouvées *post mortem* au niveau cérébral chez des patients TUAL (He & Crews, 2008) ainsi que dans des modèles animaux (Qin *et al.*, 2008). Cette activation microgliale pourrait donc expliquer les déficits de mémoire (Donzis & Tronson, 2014).

Au niveau hépatique, après 6 mois d'exposition à l'alcool, nous avons montré une réponse inflammatoire dans le groupe ALCOOL avec un nombre significativement plus important de cellules de Kupffer comparé au groupe contrôle. Dans de précédentes études, il a été montré une augmentation du nombre de macrophages hépatiques suite à l'alcoolisation chronique (Karakucuk *et al.*, 1989; Shiratori *et al.*, 1989). De plus, l'alcoolisation chronique induit une augmentation des taux de cytokines secrétées par les cellules de Kupffer (Kamimura & Tsukamoto, 1995; Lin *et al.*, 1998), participant ainsi à la réaction inflammatoire. L'ensemble de ces résultats suggérerait que le foie serait particulièrement sensible aux effets pro-inflammatoires de l'alcool chronique et que les atteintes hépatiques précéderaient celles du cerveau, au moins dans ce modèle d'exposition à l'alcool.

De manière intéressante, dans le groupe ABSTINENCE, au niveau hépatique, nous avons trouvé un nombre de neutrophiles infiltrés significativement plus important que dans les groupes CONTROLE et ALCOOL, ce qui suggère une sensibilité inflammatoire supérieure après l'arrêt non progressif de la consommation d'alcool, pouvant être dû à un effet résiduel du sevrage. L'activation des cellules de Kupffer dans la réponse inflammatoire peut induire l'infiltration de neutrophiles et finalement causer une atteinte hépatique plus importante (Zeng *et al.*, 2016). En effet, l'un des marqueurs de l'hépatite alcoolique est l'infiltration de neutrophiles (Jaeschke, 2002). Cependant, il a été proposé récemment que cette infiltration de neutrophiles contribuait à la réponse inflammatoire aigüe avec un rôle anti inflammatoire sur les cellules de Kupffer et les cellules étoilées hépatiques (Calvente *et al.*, 2019). Les cellules étoilées hépatiques sont aussi des acteurs majeurs dans la réponse inflammatoire par la sécrétion de cytokines ainsi que dans la fibrose par la sécrétion de composants de la matrice extracellulaire (Louvet & Mathurin, 2015; Koyama & Brenner, 2017).

Concernant les cytokines circulantes, en accord avec les résultats sur l'inflammation hépatique, à partir de 6 mois d'exposition à l'alcool, et jusqu'à 12 mois d'exposition à l'alcool, le taux de certaines cytokines périphériques est supérieur dans le groupe ABSTINENCE comparé au groupe CONTROLE. Les sevrages répétés semblent donc entraîner une inflammation périphérique plus importante que l'alcoolisation chronique, qui peut s'expliquer par un effet *per se* du sevrage, même s'il est asymptomatique dans notre modèle (Achur *et al.*, 2010). Les cytokines circulantes sont altérées lors de la consommation chronique d'alcool dans les modèles animaux en association à la présence d'inflammation hépatique (Achur *et al.*, 2010). L'infiltration de neutrophiles et l'inflammation hépatique sont aussi plus importantes dans le groupe ABSTINENCE à 6 mois d'exposition à l'alcool comparé au groupe CONTROLE. Le nombre des cytokines augmentées dans le groupe ABSTINENCE est le plus important après 12 mois d'exposition à l'alcool, suggérant une aggravation de l'inflammation avec le temps d'exposition à l'alcool et le nombre d'épisodes d'abstinence. Il est important de souligner que dans notre étude, les animaux ne sont pas hébergés dans une animalerie « specific pathogen free », pouvant produire un niveau inflammatoire basal, chez les animaux contrôles ou exposés à l'alcool mais exacerbé chez les animaux exposés à des sevrages répétés. D'autres sources d'inflammation (agents pathogènes venant de l'air ou d'autres animaux) pourraient masquer une inflammation liée à l'exposition chronique à l'alcool concernant certaines cytokines.

### *Effet de la minocycline*

Nous avons utilisé la minocycline pour ses propriétés neuroprotectrices et anti-inflammatoires (action inhibitrice de l'activation microgliale, sécrétion de cytokines, expression des récepteur TLR ; Yrjänheikki *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 2002; Garrido-Mesa *et al.*, 2013). En effet, l'activation microgliale hippocampique peut être en partie la cause des déficits de mémoire chez la souris après injection de LPS (Tanaka *et al.*, 2006). De plus, l'administration de minocycline diminue la sécrétion de cytokines pro inflammatoires et l'activation microgliale provoquées par le LPS, notamment au niveau de l'hippocampe (Henry *et al.*, 2008).

Les résultats du protocole minocycline sont intéressants mais nécessitent des expériences supplémentaires. Tout d'abord, l'administration de minocycline (aussi bien aiguë que chronique) a un effet bénéfique sur la consommation spontanée d'alcool, puisque les souris arrêtent d'elles-mêmes leur consommation d'alcool (alors que les souris du groupe

VEHICULE continuent de boire de l'alcool spontanément). Ces résultats sont en accord avec de précédentes études montrant l'intérêt d'utiliser des anti-inflammatoires dans le traitement du TUAL (Agrawal *et al.*, 2011; Lainiola & Linden, 2017).

De manière intéressante et à l'encontre des résultats attendus (Choi *et al.*, 2007; Budni *et al.*, 2016; Garcez *et al.*, 2017), nous avons observé, chez les souris exposées à l'alcool traitées à la minocycline de façon chronique, non pas un effet bénéfique de l'inhibition de l'activation microgliale mais, au contraire, un effet délétère sur les performances cognitives des animaux. Ces résultats suggèrent que la neuroinflammation serait un mécanisme neuroprotecteur mis en place pour contrer les effets délétères de l'exposition chronique à l'alcool. Plusieurs études ont proposé que l'activation microgliale est nécessaire dans les processus de neuroprotection et de régénération axonale (Wainwright *et al.*, 2009; Shokouhi *et al.*, 2010).

Les résultats des souris du groupe ALCOOL-VEHICULE, qui ont reçu une injection de sérum physiologique pendant 17 jours, sont surprenants puisque les souris n'ont pas montré les déficits de mémoire attendus par rapport à ceux observés dans le protocole comportemental où les souris sont exposées à l'alcool pendant la même durée mais sans sérum physiologique. Ces résultats paradoxaux suggèreraient que les atteintes de mémoire observées à 6 mois pourraient être dues à un phénomène de déshydratation chronique. Plusieurs arguments vont toutefois à l'encontre de cette hypothèse : (i) la pesée des animaux ne va pas dans le sens d'une déshydratation car les poids sont similaires entre les souris exposées à l'alcool et les souris contrôles (données du protocole expérimental ; **Figure 22**). (ii) Le groupe alcool-minocycline chronique reçoit le même volume de sérum physiologique (en tant que véhicule de la minocycline) que le groupe alcool-véhicule et montre pourtant des déficits de mémoire. Une hypothèse serait que la réhydratation sans l'activation microgliale (qui apparaît lors de la consommation chronique d'alcool et aurait été bloquée chroniquement par la minocycline dans ce groupe) n'est pas suffisante pour améliorer les déficits de mémoire. Des expériences supplémentaires sont prévues pour mieux comprendre les relations entre déshydratation, activation microgliale et déficits cognitifs induits par l'alcool.

### *Conclusion*

L'ensemble de ces résultats va dans le sens d'une communication entre le foie et la circulation sanguine dans la réponse inflammatoire, qui pourrait aussi atteindre le système nerveux central ([Leclercq et al., 2017](#)). Le microbiote intestinal pourrait aussi jouer un rôle clé dans le développement de l'inflammation hépatique, l'exposition à l'alcool favorisant notamment la translocation de produits bactériens (et de LPS) au foie par la veine porte ([Leclercq et al., 2017](#)).



# ETUDE 2

## Rôle de l'inflammation dans les atteintes cérébrales causées par l'alcool : une étude translationnelle

Malgré les nombreuses études focalisées sur les effets de l'alcool sur le cerveau ou le foie, peu d'études ont examiné de manière simultanée les liens entre fonctionnement hépatique et atteintes cérébrales dans le TUAL en dehors de l'encéphalopathie hépatique. Chez des patients TUAL non-cirrhotiques, les liens entre un taux sanguin d'enzymes hépatiques (GGT) anormal et des atrophies cérébrales ont été décrits, au niveau du volume global cérébral et du volume des substances grise et blanche (Junghanns, 2004; Chen *et al.*, 2012), ainsi que spécifiquement au niveau des lobes pariétal et occipital (De Bruin *et al.*, 2012). Cependant, Pfefferbaum et collaborateurs (Pfefferbaum *et al.*, 2004) ne sont pas parvenus à reproduire ces résultats avec le même type d'analyse en régions d'intérêt. Les taux élevés de GGT ont aussi été associés à des troubles cognitifs (Junghanns, 2004). Récemment, il a été montré qu'un dysfonctionnement hépatique (fibrose) est un facteur de risque de développement de troubles exécutifs et moteurs chez des patients TUAL (Ritz *et al.*, 2016). Les modèles animaux permettent de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques notamment inflammatoires de l'échelle moléculaire à comportementales.

Dans cette étude, nous avons d'une part examiné les atteintes cérébrales et hépatiques et leurs liens avec l'inflammation mesurée par les cytokines circulantes chez les patients TUAL non cirrhotiques. D'autre part, nous avons exploré les altérations structurales cérébrales ainsi que les réponses inflammatoires au niveau cérébral et hépatique dans un modèle animal validé de TUAL, les *sardinian preferring rats* (sP rats).

Nous avons observé que le niveau de fibrose hépatique est lié au volume des putamen et que le taux de cytokines périphérique est également associé au volume cérébral chez les patients TUAL, en faveur d'un rôle de l'inflammation périphérique dans les atteintes cérébrales de ces patients. Dans le modèle animal, nous avons montré que les atteintes cérébrales correspondaient à celles des patients TUAL et s'observaient en parallèle à une réponse inflammatoire aux niveaux cérébral et hépatique.



## **Role of inflammation in alcohol-related brain abnormalities: a translational study**

**Authors:** Anastasia Lanquetin<sup>1</sup>, Sophie Leclercq<sup>2</sup>, Shailendra Segobin<sup>3</sup>, Mikaël Naveau<sup>4</sup>, Laurent Coulbault<sup>5</sup>, Paola Maccioni<sup>6</sup>, Irene Lorrai<sup>6</sup>, Giancarlo Colombo<sup>6</sup>, Denis Vivien<sup>1,7</sup>, Marina Rubio<sup>1\*</sup>, Anne-Lise Pitel<sup>3,8\*</sup>

### **Affiliations:**

- (1) Normandie Univ, UNICAEN, INSERM, PhIND "Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders", Institut Blood and Brain @ Caen-Normandie, Cyceron, 14000 Caen, France
- (2) Institute of Neuroscience and Louvain Drug Research Institute, UCLouvain, Université Catholique de Louvain, Brussels, Belgium
- (3) Normandie Univ, UNICAEN, PSL Université Paris, EPHE, INSERM, U1077, CHU de Caen, GIP Cyceron, Neuropsychologie et Imagerie de la Mémoire Humaine, 14000 Caen, France
- (4) Normandie Univ UNICAEN, CNRS, UMS 3408, GIP Cyceron, Caen, France
- (5) Caen University Hospital, Biochemistry Department, Normandie University, UNICAEN, France
- (6) Neuroscience Institute, Section of Cagliari, National Research Council of Italy, 09042 Monserrato (CA), Italy
- (7) Department of Clinical Research, CHU Côte de Nacre, Caen, France
- (8) Institut Universitaire de France (IUF)

## Abstract

Brain abnormalities observed in AUD (Alcohol Use Disorder) are highly heterogeneous in nature and severity, possibly because chronic alcohol consumption also affects peripheral organs leading to comorbidities that can result in exacerbated brain alterations. Despite numerous studies focusing on the effects of alcohol on the brain or liver, few studies have simultaneously examined liver function and brain damage in AUD, and even fewer investigated the relationship between them except in hepatic encephalopathy. And yet, liver dysfunction may be a risk factor for the development of alcohol-related neuropsychological deficits and brain damage well before the development of liver cirrhosis and potentially through inflammatory responses. The use of animal models enables a better understanding of the pathophysiological mechanisms underlying liver-brain relationships in AUD, and more particularly of the inflammatory response at the tissue, cerebral and hepatic levels.

The objective of this translational study was to investigate, both in AUD patients and in a validated animal model of AUD, the links between peripheral inflammation, liver damage and brain alterations. To do this, we conducted *in vivo* neuroimaging examination and biological measures to evaluate liver fibrosis and peripheral cytokines in AUD patients. In *Sardinian-preferring* (sP) rats, we carried out *ex vivo* neuroimaging examination and immunohistochemistry to evaluate brain and liver inflammatory responses.

In recently abstinent and non-cirrhotic AUD patients, the level of circulating proinflammatory cytokines correlated with regional brain volumes and liver fibrosis. In sP rats, we found macrostructural brain damage and microstructural white matter abnormalities similar to those found in AUD patients. In addition, in agreement with the results of peripheral inflammation observed in the patients, we revealed inflammatory responses in the brain and liver caused by chronic alcohol consumption.

Since the liver is the main source of cytokines in the human body, these results suggest a relationship between liver dysfunction and brain damage in AUD patients, even in the absence of major liver disease. These findings encourage considering new therapeutic strategies aiming at treating peripheral organs to limit alcohol-related brain damage.

## INTRODUCTION

Alcohol use disorder (AUD) is a chronic relapsing brain disease, which represents a major public health problem affecting millions of people around the world (Rehm *et al.*, 2015). The most recent version of the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-5) no more considers AUD as a categorical disease (abuse versus dependence, DSM-IV) but offers a dimensional approach with a spectrum of severity ranging from mild, moderate to severe AUD. DSM-5 also acknowledges alcohol-related neurocognitive disorders in agreement with the literature that frequently reports altered brain structure in AUD patients (Pitel *et al.*, 2015).

Chronic alcohol consumption is indeed associated with brain alterations that can be revealed *in vivo* by magnetic resonance imaging (MRI). In AUD patients, gray matter (GM) structural abnormalities can affect cortical and subcortical regions. The frontal cortex seems to be more sensitive to chronic and heavy alcohol consumption (Mackey *et al.*, 2019), but shrinkage has also been observed in temporal, parieto-occipital cortex and in the cerebellum (Pitel *et al.*, 2012). In subcortical regions, atrophy of the hippocampus (Wilson *et al.*, 2017), mammillary bodies, cingulate cortex and thalami (Pitel *et al.*, 2012; Segobin *et al.*, 2019) have been reported.

Regarding white matter (WM), MRI studies revealed a thinning of the corpus callosum (Pfefferbaum *et al.*, 1996; Pitel *et al.*, 2010). Diffusion tensor imaging (DTI) is a specific technique of MRI to explore noninvasively WM microstructure. Fractional anisotropy (FA) measures obtained with DTI reflects WM integrity (myelination or axonal integrity; Harper & Kril, 1988; Koike *et al.*, 2001). DTI studies conducted in AUD patients have shown microstructural alterations in the fornix and corpus callosum (Pfefferbaum & Sullivan, 2005; Pfefferbaum *et al.*, 2009; De Santis *et al.*, 2019), even when the corpus callosum seemed to be normal according to structural MRI (Pfefferbaum *et al.*, 2000; Pfefferbaum & Sullivan, 2002). While the profile of structural brain abnormalities is now relatively well described in AUD

patients, the physiopathology remains unclear and animal models are required to better understand the mechanisms leading to this pattern of brain damage.

From a preclinical point of view, some studies have focused on neuroimaging after chronic alcohol consumption by using alcohol-preferring rats, genetically selected for high alcohol preference and consumption. These rats represent a good tool to study excessive alcohol consumption and alcohol seeking behavior (Colombo *et al.*, 2006; Domi *et al.*, 2019). These studies have shown ventricular expansion and hippocampus shrinkage (Pfefferbaum *et al.*, 2006a; Frischknecht *et al.*, 2017), and recently a decrease in volume and FA in fiber tracts of the corpus callosum and fornix (De Santis *et al.*, 2019) in alcohol-exposed rats compared to control.

Brain abnormalities observed in AUD are highly heterogeneous in nature and severity, possibly because chronic alcohol consumption is also associated with damage of peripheral organs (digestive tract, liver, heart, pancreas, kidneys and lungs), which can result in exacerbated brain alterations (Leclercq *et al.*, 2014; Ritz *et al.*, 2016). Hepatic encephalopathy (HE) induced by chronic alcohol consumption is the extreme example of brain and liver interaction. But long before the development of a full-blown HE, altered liver function may affect brain structure and function. Ritz *et al.*'s results (2016) indicated that liver fibrosis may partially explain executive dysfunction in AUD patients without clinically detectable HE. In agreement, Junghanns *et al.* (2004) showed that the GGT level was related to mental flexibility abilities. These results indicate that liver dysfunction may predict the severity of executive impairments in AUD patients. The liver-brain communication pathway may involve peripheral inflammation with a release of cytokines that could contribute to neuroinflammation (Leclercq *et al.*, 2014; D'Mello & Swain, 2017).

Preclinical and human *post-mortem* studies have suggested that neuroinflammation could be one of the pathogenic processes leading to alcohol-induced brain damage (Qin *et al.*, 2008),

with a pivotal role of microglial activation (Zhao *et al.*, 2013; Montesinos *et al.*, 2016; Alfonso-Loeches *et al.*, 2016). However, the study of neuroinflammation in AUD patients by positron emission tomography (PET) using TSPO ligand (used to evaluate microglial activation *in vivo*) has shown controversial results, with either lower or equal levels of neuroinflammation in AUD patients compared to controls (Kalk *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2018; Tyler *et al.*, 2019). Circulating cytokines can be used to evaluate the inflammatory state in AUD patients. Cytokines are considered important mediators of the systemic-brain communication, as they can reach the central nervous system and induce neuroinflammation that is associated with changes in mood, cognition and drinking behavior (Leclercq *et al.*, 2017 for review).

The objectives of this translational study were to investigate, both in AUD patients and in alcohol-preferring rats, the links between peripheral inflammation, liver damages and brain alterations. To do this, we have examined a cohort of AUD patients and *sardinian-preferring* (sP) rats and analyzed (i) grey matter and white matter brain abnormalities, (ii) liver damage and (iii) peripheral cytokines levels.

Our results show that alcohol provokes liver and brain inflammatory responses that are correlated with brain abnormalities in the absence of advanced liver damages in both AUD patients and alcohol-preferring sP rats chronically exposed to alcohol.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Clinical data**

#### ***Participants***

Forty-one participants were included in this study: 25 patients with AUD and 16 healthy controls (HC). None of them had a history of neurological pathology, endocrinal nor other infectious diseases, depression (assessed using the Beck Depression Inventory [BDI]; Beck *et al.*, 1961) nor other forms of substance use disorder (except tobacco). All participants were informed about the study approved by the local ethics committee of Caen University Hospital (CPP Nord Ouest III, no. IDRCB: 2011-A00495-36) prior to their inclusion and provided their written informed consent.

Clinicians recruited AUD patients while they were receiving withdrawal treatment as inpatients at Caen University Hospital. AUD patients met “alcohol dependence” criteria according to the DSM-IV-TR (American Psychiatric Association., 1994) and “AUD” criteria according to the DSM-5 (American Psychological Association (APA), 2013) for at least 5 years. At inclusion and evaluation, none of them presented physical symptoms of alcohol withdrawal as assessed by Cushman's scale (Cushman *et al.*, 1985) and were under medication by benzodiazepines. Alcohol history of the AUD patients is described in Table 1.

HC were recruited locally and to match the demographics of the AUD patients. They were interviewed with the Alcohol Use Disorders Identification Test (AUDIT) to ensure that they did not meet the criteria for alcohol abuse (AUDIT < 7 for men and <6 for women; Gache *et al.*, 2005). None of the controls had a BDI score > 29 and a score <136 on the (Dementia Rating Scale, DRS-2; (Jurica, P. J., Leitten, C. L., & Mattis, 2001).

AUD patients and HC were age-, sex-, and education-matched (Table 1).

#### ***Biological assessment***

Blood samples were collected for all participants, either at inclusion (HC) or the day after admission to hospital (AUD) (24h) to ensure that patients were free from alcohol. For all participants, blood samples were collected when they were on an empty stomach.

Liver function was assessed using the level of GGT and the ASAT/ALAT ratio (a ratio > 1 suggested alcoholic liver disease (Halvorson *et al.*, 1993)). We used the FibroMeter® for the non-invasive diagnosis of alcoholic liver fibrosis based on the measure of 4 blood markers: alpha 2-macroglobulin, platelets, prothrombin ratio and hyaluronic acid (Calès *et al.*, 2005). This yielded a fibrosis score (ranging from 0 to 1) and a percentage of fibrosis area (ranging from 0 to 100%).

Serum cytokines including tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), interleukin-8 (IL-8) monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) and macrophage inflammatory protein 1b (MIP-1b) were assayed in duplicate with a multiplex immunoassay (HCYTOMAG-60k, Merck Chemicals, Overijse, Belgium) and Luminex xMap technology (Bio-Rad Laboratories) following the manufacturer's instructions

### ***Magnetic Resonance Imaging Data Acquisition***

Brain imaging examinations were conducted in 16 HC and 25 AUD patients.

A high-resolution T1-weighted anatomical image was acquired for each subject on a Philips Achieva 3T scanner (Philips Healthcare/Philips Medical Systems International B.V., Eindhoven, the Netherlands) using a 3-dimensional fast-field echo sequence (sagittal; repetition time, 20 ms; echo time, 4.6 ms; flip angle, 10°; 180 slices; slice thickness: 1 mm; field of view, 256 × 256 mm<sup>2</sup>; matrix, 256 × 256).

Regarding diffusion tensor imaging (DTI), 70 slices (thickness: 2 mm, no gap) were acquired axially using a diffusion-weighted imaging spin echo sequence (32 directions at b = 1,000 s/mm<sup>2</sup>, repetition time = 10,000 ms, echo time = 82 ms, flip angle = 90°, field of view =



224 × 224 mm<sup>2</sup>, matrix = 112 × 112, and in-plane resolution = 2 × 2 mm<sup>2</sup>; 1 no-diffusion-weighted image [DWI] at b = 0 s/mm<sup>2</sup> was also acquired).

### ***Magnetic Resonance Imaging Data Processing***

The volumetric MRI data of gray and white matter were analyzed using the Statistical Parametric Mapping software (SPM12; Wellcome Department of Cognitive Neurology, Institute of Neurology, London, UK). Preprocessing steps included segmentation of the MRI data into GM, WM and CSF, and spatial normalization to the Montreal Neurological Institute (MNI) template (voxel size = 1.5 mm<sup>3</sup>, matrix = 121 × 145 × 121). The resulting images were smoothed by a Gaussian kernel of 8 mm full width at half maximum (FWHM). GM (and WM) measures reflect cerebral macrostructure and numerically corresponds to the mean GM (or WM) signal per unit volume for each significant cluster.

The DTI data were first preprocessed to create fractional anisotropy (FA) images using the FSL Diffusion Toolbox (<http://fsl.fmrib.ox.ac.uk/fsl/fslwiki/FDT>) that is part of FSL 5.0 toolbox for medical image analysis (Smith *et al.*, 2004). Briefly, for each subject, the 32 DWIs were first corrected for distortions due to Eddy currents and aligned to the b = 0 s/mm<sup>2</sup> image using rigid-body registration for motion correction (Jenkinson *et al.*, 2002). FA images were then created by fitting a tensor model to the diffusion images. Individual FA data were aligned into MNI space using the non-linear registration tool (FNIRT), which uses a b-spline representation of the registration warp field (Rueckert, D. Sonoda, L.I. Hayes, C. Hill, D. Leach, M. Hawkes, 1999). The resulting FA maps were resliced to matrix size of 182 × 218 × 182 and voxel size of 1 mm<sup>3</sup> and smoothed to 6 mm FWHM prior to voxel-based statistical analyses. Numerically, FA values vary between 0 and 1. Generally, the higher the FA value, the better the microstructural integrity of the fiber within that voxel. FA is assumed to be a structural

biomarker that depicts white matter (WM) disruption involving myelin, cytoskeleton, and the axons' microtubule system (Pfefferbaum *et al.*, 2006b).

A GM mask was obtained taking the unmodulated GM images of HC normalized to the MNI space, averaging them, and thresholding the resultant mean image at 0.5. We obtained a WM mask with the same procedure. The WM mask for DTI analysis was obtained by taking the FA maps of HC normalized to the MNI space, averaging them, and thresholding the resultant mean image at 0.3. The resulting GM and WM masks were applied, respectively, to GM and WM volumes and WM integrity data analyses.

### ***Statistical analysis***

#### *Biological assessment of the AUD patients*

The normality of the distribution of the laboratory measures for the AL and HC groups was examined using the Shapiro-Wilk test. Mann-Whitney tests were then used to compare the two groups for measures of liver function and inflammatory cytokines.

#### *Pattern of Brain Alterations and Correlations with biological variables*

Voxel-based t-tests were conducted in SPM12 to compare HC and AUD on GM volume, WM volume and WM integrity (FA values). Results are reported at  $p < 0.05$  (FWE-corrected) and at  $p < 0.001$  (uncorrected for multiple comparisons) with a minimal cluster size (k) of 60 voxels (200 mm<sup>3</sup>),

Voxel-based multiple linear regressions were then conducted in SPM12 to examine, in AUD patients, the relationships between GM volume, WM volume and WM integrity (FA values) on the one hand, and Fibrosis (score and area) and elevated levels of cytokines on the other hand. Results are reported at  $p < 0.001$  (uncorrected for multiple comparisons) with a minimal cluster size (k) of 60 voxels (200 mm<sup>3</sup>).

Significant clusters of GM were labelled using the Harvard–Oxford cortical and subcortical structural atlases implemented in FSL (<https://fsl.fmrib.ox.ac.uk/fsl/fslwiki/Atlases>). WM regions and tracts were manually labelled using the MRI Atlas of Human White Matter (Oishi et al., 2011).

## **Preclinical data**

### ***Animal Subjects***

Experiments on sP rats were performed in the Istituto de Neuroscienze (National Research Council) of Cagliari, in accordance with the protocols validated by the Università Cattolica del Sacro Cuore of Rome Institutional Center of Experimental Research (No. 7783/15-CE) and approved by the Italian Ministry of Health (No. 724/2015-PR).

We used male, 95th-generation sP rats that were approximately 75 days old at the start of the study. Rats were individually housed in standard plastic cages with wood chip bedding. Single-cage housing started 15 days before exposure to alcohol. The animal facility was under an inverted 12:12-hour light/dark cycle (lights on at 9:30 pm) at a constant temperature of  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  and a relative humidity of approximately 60%. Regular food pellets (carbohydrate 46.3%, protein 18.5%, fiber 6.0%, and fat 3.0%—total metabolizable energy 2.67 kcal/g; 4RF21, Mucedola, Settimo Milanese, Italy) were always available. Of fatty acids composing the dietary fats provided with the diet, 0.5% were saturated, 0.5% monounsaturated, and 1.5% polyunsaturated (the majority of which [1.3% in total] were from soy oil). Despite higher percent of unsaturated fatty acids, the overall amount of fatty acids per gram of food was relatively low. Alcohol was offered under the standard, home-cage 2-bottle choice regimen between an EtOH solution (10% in tap water, v/v) and tap water with unlimited access for 24 h/d. Under this procedure, sP rats tend to fraction their daily alcohol intake into 3 to 4 distinct episodes, rather regularly distributed over the dark phase of the light/dark cycle (Agabio *et al.*,

1996). Corresponding with each of these drinking episodes, alcohol intake (i) peaks up to 1.5 g/kg/h, (ii) results in psychopharmacologically relevant blood EtOH levels (50 to 100 mg/dl) (Agabio *et al.*, 1996; Loi *et al.*, 2014), and (iii) produces measurable behavioral effects, including anxiolysis (Colombo *et al.*, 1995; Lobina *et al.*, 2013).

To minimize alcohol fluid spillage and evaporation, special drinking bottle spouts provided with an extremely small hole (0.8 mm diameter; Tecniplast, Buguggiate, Varese, Italy) were used. The left–right position of the 2 bottles was randomly interchanged to avoid the development of position preference. Alcohol and water intake were recorded once weekly. Alcohol-exposed rats ( $n = 6$ ) were exposed to alcohol for 12 consecutive months. We chose the *ad libitum* “alcohol versus water” choice regimen to purposely mimicking the human condition of excessive alcohol consumption (i.e., exceeding 40 to 80 g/d) over an extended period of time (Addolorato *et al.*, 2016). Conversely, control rats ( $n = 6$ ) were exposed to 2 bottles containing tap water.

Subsequently, rats were killed by guillotine. Heads (after removal of the skin and muscles) and liver samples were immediately fixed in a solution of 2% paraformaldehyde and 0.2% picric acid phosphate buffer for 48h. Samples were then individually placed in 50mL falcon and rinsed with a solution of PBS with 20% sucrose followed by PBS with azide (0.01%) and stored at 4°C for further analysis.

### ***Ex vivo brain MRI acquisitions***

Imaging was carried out on a Pharmascan 7T/12 cm system using surface coils (Bruker, Germany). Anatomical images were acquired with high resolution sequence T2 RARE (Rapid acquisition with repetition enhancement) in 3D with the following parameters: TE 40 ms, TR 4500ms, resolution 0.1x0.1x0.1 mm<sup>3</sup>, thickness 0.1 mm, field of view 3.2x3.2x2.56, acquisition time 3h50. DTI data were acquired with the following parameters: TR 3500 ms, TE

23 ms, 64 horizontal slices were planned for every subject (field of view = 32x32 mm<sup>2</sup>, in-plane resolution = 0.2 x 0.2 mm<sup>2</sup>, slice thickness = 0.4 mm).

### ***MRI processing***

Volumetric analyses were performed using ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij>), with manual delimitation of regions of interest (ROI) and automatic calculation of these regional areas. To correctly delimit ROIs, we used the Paxinos-Watson rat brain atlas (Paxinos & Watson, 2013).

DTI analyses were conducted with the software DSI Studio (<http://dsi-studio.labsolver.org>). For each subject, the following parameter maps were computed: fractional anisotropy (FA), mean diffusivity (MD), axial diffusivity (AD), radial diffusivity (RD). Whole brain tractography was calculated using a deterministic, tensor-based approach with the following parameters: FA>20 and angle threshold 45°.

### ***Immunohistochemistry***

Brain and liver portions were frozen in Tissue-Tek (Miles Scientific, Naperville, IL, USA). Cryostat-cut sections (10µm) were collected on poly-lysine slides and stored at -80°C before processing.

Sections were co-incubated overnight with goat anti-rat Iba1 (1:1000, abcam ab5076), , chicken anti-rat GFAP (1:2000, abcam ab4674), goat anti-rat collagen-IV (1:1000, Southern biotech 1340), rabbit anti-rat cleaved caspase 3 (1:1000, Cell signaling 9664-5), rabbit anti-rat myeloperoxidase (1:200, abcam ab9535). Primary antibodies were revealed using Fab'2 fragments of donkey anti-goat linked to CY3 or FITC, anti-rabbit linked to CY3 or FITC, anti-chicken linked to CY5 (1:600 Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA). Washed sections were coverslipped with antifade medium containing DAPI. Epifluorescence images were

digitally captured using a LEICA DM6000 epifluorescence microscope-coupled coolsnap camera, visualized with Leica MM AF 2.2.0 software (Molecular devices, USA) and further processed using ImageJ. Specificity controls were performed by not adding primary antibodies.

Fluorochrome C staining protocol was performed as previously described (Drieu et al, 2020).

### ***Statistical analysis***

Preclinical data were analyzed using Mann-Whitney's tests to compare alcohol-exposed sP rats versus control (i.e., water-exposed) sP rats. P values  $<0.05$  were considered statistically significant.

## RESULTS

### **Clinical data**

#### ***Pattern of Brain Alterations in AUD patients***

##### *GM Volume*

Compared to HC, AUD patients had significantly lower GM volume in frontal and prefrontal areas, insula, lateral, and medial temporal cortices, cingulate and occipital cortices, but also in subcortical regions including the thalamus, putamen, and caudate nuclei, and in the cerebellum ( $p < 0.001$ , uncorrected,  $k = 60$ ). These results remained significant after correction for multiple comparisons but with smaller cluster size (family-wise error [FWE],  $p < 0.05$ ; Fig. 1D).

##### *WM Volume*

Compared to HC, AUD patients had significantly lower WM volume of the entire corpus callosum (genu, body and splenium), corona radiata, cingulum, thalamus, and cerebellum ( $p < 0.001$ , uncorrected,  $k = 60$ ). These results (except for the cerebellum) remained significant after correction for multiple comparisons but with smaller cluster size (family-wise error [FWE],  $p < 0.05$ ; Fig. 1D).

##### *WM integrity*

Compared to HC, AUD patients had significantly lower FA values in a large set of fibers including the corpus callosum, the anterior corona radiata, the anterior limb of the internal capsule, the cingulum, the middle cerebellar peduncle, and the fornix. These results remained significant after correction for multiple comparisons but with smaller cluster size (FWE,  $p < 0.05$ ; Fig. 1E).

#### ***Biological and inflammatory profiles of AUD***

Compared to HC, AUD patients had liver dysfunction with elevated levels of GGT and higher ASAT/ALAT ratio (Fig1A). Fibrometer analysis revealed liver fibrosis in AUD patients with higher fibrosis score and area compared to HC (Fig1B).

AUD patients also had elevated levels of TNF and IL8 (respectively  $p=0.02$  and  $p=0.009$ ; Fig1C).

### ***Relationships between liver fibrosis and brain structure***

Significant negative correlations ( $p < 0.001$ , uncorrected,  $k = 60$ ) were found between the fibrosis score and grey matter volume in the putamen (Left and right) and cerebellum (lobules 4-5 and the vermis) (Fig2A). A significant negative correlation ( $p < 0.001$ , uncorrected,  $k = 60$ ) was also found with the white matter volume in the angular gyrus and occipital cortices (Fig 2B). No significant positive correlation was found and there was no significant correlation between liver function and FA values. There was no significant correlation between fibrosis area and brain structure.

### ***Relationships between circulating cytokines, brain structure and liver function***

Given the fact that only the levels of IL8 and TNF were elevated in AUD compared with HC, we conducted correlations between brain structure and these cytokines only.

A significant negative correlation ( $p < 0.001$ , uncorrected,  $k = 60$ ) was found between IL8 levels and grey matter volume in the orbitofrontal region (Fig 2C). No significant positive correlation was found. Significant positive correlations ( $p < 0.001$ , uncorrected,  $k = 60$ ) were found between TNF levels and grey matter volume in the prefrontal and temporal cortices and in the cerebellum (Fig 2C). No significant negative correlation was found. There was no significant correlation between these cytokines and WM volume and integrity.

We found a positive correlation between IL8 levels and fibrosis score ( $r=0,64$ ;  $p=0,006$ ) and fibrosis area ( $r=0,73$ ;  $p<0,001$ ; data not shown).



## **Preclinical data**

### ***Alcohol consumption***

After 12 months of alcohol exposure, weekly alcohol intake was 36 g/kg [range: 32-44] that corresponds to a daily intake of approximately 5g/kg [range: 4.6-6.3] of ethanol as previously described (Colombo et al. 2006).

### ***Impact of 12 months alcohol exposure on brain structure***

The entire corpus callosum (genu, body, splenium) had significantly smaller volume in alcohol-exposed rats compared to control rats ( $p=0.031$ ; Fig. 3C). There was no difference of volume in other brain regions (hippocampus, cerebellum, and total brain volume; Fig 3D).

Region-based tractography revealed microstructural alterations of the corpus callosum and fornix in alcohol-exposed rats compared to control rats. Fibers volume of the entire corpus callosum and more precisely in the body and splenium was significantly lower in alcohol-exposed rats compared to control rats (Fig 4B; F; G). Fractional anisotropy (FA) in the genu of the corpus callosum was decreased in alcohol-exposed rats, although the difference did not reach statistical significance ( $p=0.06$ ; Fig 4D). In the fornix, the volume of fibers was significantly lower in alcohol-exposed rats ( $p=0.004$ ) and there was a trend for a higher of medial diffusivity (MD) ( $p=0.08$ ; Fig 4J).

### ***Impact of 12 months alcohol exposure on brain inflammation***

We measured microglial (Iba1<sup>+</sup> staining, Fig. 5A) and astrocytic (GFAP<sup>+</sup> staining, Fig. 5E) density in the corpus callosum, cortex and hippocampus by immunohistochemistry (IHC). The density of microglial cells (Iba1<sup>+</sup> cells) was significantly higher in alcohol-exposed rats in all these regions (Fig 5B). The number of GFAP<sup>+</sup> cells was also higher in alcohol-exposed rats. In the cortex and the hippocampus, the difference was statistically significant ( $p<0.05$ ; Fig 5F); only a trend was found in the corpus callosum ( $p<0.1$ ; Fig 5F).

Fluorochrome C staining and caspase 3 did not reveal any neurodegeneration and apoptosis in alcohol-exposed and control rats (data not shown).

### ***Impact of 12 months alcohol exposure on liver inflammation***

We measured the number of Kupffer cells (resident macrophages in the liver) (Iba 1<sup>+</sup> cells; Fig 6A) and of hepatic stellate cells (GFAP<sup>+</sup> cells; Fig 6C). We found a higher number of Kupffer cells in the liver of alcohol-exposed rats compared to control rats ( $p < 0.05$ ; Fig 6B).

The number of hepatic stellate cells (HSC) (main effectors of liver fibrosis) was similar in both groups (Fig 6D). However, the morphology of HSC was different in the two conditions: control rats showed ramified HSC cells (corresponding to a quiescent phenotype), whereas alcohol-exposed rats showed more amoeboid HSC, suggestive of activated HSC (Fig 6D). When cells were ramified there was no difference in the number of ramifications per cell (Fig 6D).

Hematoxylin & Eosin staining revealed no major difference in the liver structure and indicated an absence of fibrosis, steatosis or neutrophil infiltration (Supplementary Fig. 1).

## Discussion

The objective of the present study was to gain a better understanding of the contribution of inflammation and liver fibrosis to alcohol-related cerebral damages. The main novelty was to use a translational approach including a biological and neuroimaging investigation of AUD patients as well as an ex-vivo imaging and immunohistological examination of sP rats.

### Brain and liver abnormalities, and systemic inflammation in AUD patients

In accordance with previous studies, we showed that AUD patients had macrostructural brain abnormalities in both GM and WM in cortical and subcortical regions (Pitel *et al.*, 2012; Segobin *et al.*, 2019). We also found widespread microstructural alterations in AUD patients consistent with recent investigations (Segobin *et al.*, 2019; De Santis *et al.*, 2019). Even in the absence of cirrhosis, AUD patients had alcohol-related liver dysfunction (Mancinelli & Ceccanti, 2009; Ritz *et al.*, 2016).

Regarding inflammation, we did not find any difference in the circulating levels of the proinflammatory cytokines MCP-1 and MIP-1b between controls and AUD patients, in contrast to previous studies (Afford *et al.*, 1998; Fisher *et al.*, 1999; Leach *et al.*, 2016; Grzegorzewska *et al.*, 2017). It is worthwhile mentioning that these previous studies were conducted in patients with alcoholic advanced liver disease, hepatitis or non-alcoholic steatohepatitis, whereas patients included in the present study did not exhibit any ostensible clinical signs of liver disease. Our data suggest that increased circulating levels of MCP-1 in general could be a good biomarker of liver disease but is not related to early or discrete liver dysfunction in AUD patients.

In accordance with previous studies (Laso *et al.*, 2007; Leclercq *et al.*, 2014), we found higher plasmatic levels of the pro-inflammatory cytokines IL-8 and TNF in AUD patients compared to HC. Serum TNF concentration was reported to be higher in AUD patients than in

the general population, regardless of the level of alcohol consumption (Gonzalez-Quintela *et al.*, 2008; Heberlein *et al.*, 2014) and to decrease within the first days of abstinence (Umhau *et al.*, 2014; Girard *et al.*, 2019). By contrast, IL-8, which is not primarily associated with acute inflammation and rather acts as a potential angiogenic factor and chemotactic attractor for all known types of migratory immune cells, remains increased at least for the first 6 months after alcohol withdrawal (Girard *et al.*, 2019).

### **Liver impairment and systemic inflammation are associated with regional brain volume**

While systemic inflammation is known to be associated with cognitive impairments and cerebral damage in cirrhotic patients with encephalic encephalopathy, the study of these relationships in non-cirrhotic patients are scarce. Some findings suggest that systemic inflammation and liver fibrosis were correlated with behavioral impairments in non-cirrhotic patients (Leclercq *et al.*, 2012; Ritz *et al.*, 2016) but, to our knowledge, there is no study on the potential relationship between systemic inflammation and structural brain damage.

The present results showed that circulating proinflammatory cytokines and liver fibrosis correlated with brain macrostructure in recently detoxified AUD patients without ostensible liver damage. We found a specific vulnerability of putamen to liver fibrosis. Accordingly, the basal ganglia volume, including the putamen, is altered in severe liver disease (Lin *et al.*, 2012). Liver function have also been related to brain atrophy (Chen *et al.*, 2012). However, a major limitation of that previous study was that liver function was only assessed with GGT and transaminases levels, which are not specific to liver fibrosis or alcohol-related liver damage. In addition to a clear relationship between liver function and specific regional brain volume, we show here that levels of circulating proinflammatory cytokines were associated with brain volumes. Proinflammatory cytokines could come from the liver (Gao *et al.*, 2019) and in

particular from activated Kupffer cells, (KC). One possible mechanistic hypothesis is that alcohol could directly (or indirectly) activate KC, which would initiate the synthesis of proinflammatory cytokines that would be released to the bloodstream and reach the brain.

In previous studies, chronic alcohol consumption induced increased levels of LPS in the serum of sP rats and altered intestinal microbiota composition (Posteraro *et al.*, 2018). These results have also been shown in non-preferring rats and AUD patients (Leclercq *et al.*, 2014). Several studies have shown that increased LPS circulating levels induced by alcohol stimulate KCs to generate ROS and cytokines (Lamas-Paz *et al.*, 2018). These inflammatory mediators subsequently activate HSCs via a Toll-like receptor 4 (TLR4) signaling pathway, which eventually results in enhanced, chronic production of ECM proteins - and promotion of fibrogenesis (Seki *et al.*, 2007; Jagavelu *et al.*, 2010). Additionally, HSCs are also enriched with TLR4 to which LPS directly binds, and can thus activate through LPS signaling (Inokuchi *et al.*, 2011).

### **Chronic alcohol exposure induced similar brain abnormalities in a model of AUD**

The present results, obtained in a validated experimental model of AUD (Sardinian-preferring (sP) rats; Colombo *et al.*, 2006; Lobina *et al.*, 2013), were similar to those observed in AUD patients in terms of macrostructural and microstructural brain alterations, in line with previous preclinical investigations (Pfefferbaum *et al.*, 2006a; De Santis *et al.*, 2019). We also show lower WM volume in the fornix and corpus callosum of rats exposed to alcohol for 12 months, potentially reflecting myelin and/or axonal damage or glial/cellular reaction during neuroinflammation phenomenon (De Santis *et al.*, 2019).

### **Chronic alcohol exposure induces brain and liver inflammatory responses**

We describe here, for the first time, an alcohol-induced inflammatory response in the brain of sP rats after 12 months of alcohol exposure. Importantly, this inflammatory response

was not accompanied by signs of neurodegeneration or apoptosis. Chronic ethanol exposure induces innate immune signaling cascades through the activation of the proinflammatory transcription factor, NF- $\kappa$ B (Crews *et al.*, 2006, 2011; Vallés *et al.*, 2006). We found a significant higher number in microglia and astrocytes in all the brain regions studied (cortex, corpus callosum and hippocampus). In addition, microglial cells in alcohol-exposed rats showed morphological alterations characterized by a transition from a resting and ramified morphology, to an amoeboid phenotype compatible with a partially activated state. Several studies have proposed that partially activated microglia is necessary in neuroprotection and axonal regeneration (Wainwright *et al.*, 2009; Shokouhi *et al.*, 2010), an assumption compatible with the absence of neurodegeneration observed in the present study.

Twelve months of alcohol exposure provoked a series of inflammatory responses in the liver of sP rats, including Kupffer cell proliferation and hepatic stellate cell (HSC) activation. These responses were not accompanied by clear signs of liver damage (no significant steatosis, fibrosis or neutrophil infiltration). These results indicate that chronic alcohol consumption induces inflammatory responses in the liver even in absence of hepatitis or cirrhosis, with activation of HSC. These cells, in addition of playing a role in the development of steatosis and fibrosis, are major producers of cytokines and chemokines that are released to the bloodstream. Chronic alcohol consumption may thus provoke inflammatory responses in the brain that could be triggered by peripheral cytokines reaching the brain. In agreement with this hypothesis, we found a correlation between peripheral cytokine levels and brain volumes in AUD patients as well as microglial activation in a rodent model of AUD.

### **Limitations and future perspectives**

One major limitation of this study is the absence of information about cytokines levels in the serum or in the brain of sP rats. A recent study using these same rats (Posteraro *et al.*,

2018) described similar levels of TNF in the serum of control and alcohol-exposed rats, which would suggest an independent effect of alcohol on the brain and liver in terms of inflammatory responses.

Also, other factors, such as genetics, dietary status, gut permeability, and the intestinal biome could play a role on liver inflammation and the development of neuroinflammation and neurodegeneration (Kirpich *et al.*, 2008; Leclercq *et al.*, 2012). It has been shown that in alcohol-preferring strains, the expression of neuropeptides and microglia activation were altered in several brain regions compared to non-preferring strains, indicating preexisting genetic differences in alcohol-induced responses (Rossetti *et al.*, 2019).

Our results show that alcohol provokes liver and brain inflammatory responses that are correlated with brain abnormalities in the absence of advanced liver damages in both AUD patients and alcohol-preferring sP rats chronically exposed to alcohol. Future studies are needed to elucidate causality links regarding the brain-liver interactions (i.e., whether alcohol-induced liver and brain inflammatory responses arise independently or whether liver and brain inflammatory responses are related), in order to find new therapeutic strategies aiming at blocking brain damages linked to alcohol-used disorder.

### Figure legends

#### **Figure 1: Hepatic dysfunction, liver fibrosis, peripheral inflammation and brain alterations in AUD patients.**

(A) AUD patients had hepatic dysfunction with elevated levels of serum GGT and ASAT/ALAT ratio compared to HC. (B) Fibrometer® parameters showed liver fibrosis only in AUD patients. (C) AUD patients had significant elevated serum cytokine (TNF and IL8) compared to HC (D) AUD patients show significant gray matter (GM), and white matter (WM), shrinkage, as well as altered WM integrity (E) compared to healthy controls (HC). Larger images indicate a p-value of  $p < 0.001$  uncorrected, and smaller images display the results using a restrictive  $p < 0.05$  corrected for few to highlight the most significant regions. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  Mann-Whitney's test (or t-test only for log GGT)

#### **Figure 2: Links between brain alterations, liver fibrosis and inflammation in AUD patients**

In AUD, negative correlations between the fibrosis score and GM volume (A), WM volume (B) at  $p < 0.001$  uncorrected. In AUD, negative correlations between cytokines (negative for IL8 in purple and positive for TNF in blue) and GM volume (C) and an absence of correlation with WM volume (D) at  $p < 0.001$ . Cluster size:  $>60$  voxels.

#### **Figure 3: Chronic alcohol consumption specifically reduces the volume of the corpus callosum in sP rats.**

(A) Representative scan of brain MRI (coronal view) with total brain, corpus callosum and hippocampus (delimited respectively in blue, red, and yellow). (B) Representative scan of brain MRI (sagittal view) used to measure cerebellum volume (delimited in yellow). Total volume of the corpus callosum (C), hippocampus (D), total brain (E) and cerebellum (F) in control and alcohol-exposed rats. \*  $p < 0.05$ , Mann-Whitney's test.



**Figure 4: Chronic alcohol impairs both corpus callosum volume and fiber integrity in sP rats.**

(A) Individual reconstruction of fiber tracts in the entire corpus callosum. (B) White matter (WM) microstructure parameters in the entire corpus callosum of control and alcohol-exposed sP rats.

(C) Individual reconstruction of fiber tracts in the genu of the corpus callosum. (D) WM microstructure parameters in the genu of the corpus callosum of control and alcohol-exposed sP rats.

(E) Individual reconstruction of fiber tracts in the body of the corpus callosum. (F) WM microstructure parameters in the body of the corpus callosum of control and alcohol-exposed sP rats.

(G) Individual reconstruction of fiber tracts in the splenium of the corpus callosum. (H) WM microstructure parameters in the splenium of the corpus callosum of control and alcohol-exposed sP rats.

(I) Individual reconstruction of fiber tracts in the entire fornix (left and right). (J) WM microstructure parameters in the entire fornix of control and alcohol-exposed sP rats.

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , Mann-Whitney test.

**Figure 5: Neuroinflammatory responses to chronic alcohol in sP rats: microgliosis and astrogliosis in the corpus callosum, brain cortex and hippocampus, in the absence of neuronal death.**

(A) Representative photomicrographs of microglia (Iba1+ cells) in the corpus callosum (delimited with dotted line), cortex and hippocampus in control and alcohol-exposed sP rats. Scale bar 50 $\mu$ m. (B) Quantification of microglial density. (C) Representative photomicrographs of microglial cell morphology in control and alcohol-exposed sP rats. Note the decreased process density (arrows) in alcohol-exposed rats. Scale bar 10 $\mu$ m. (D) Representative

photomicrographs of astrocytes (GFAP+ cells) in the corpus callosum (delimited with dotted line), cortex and hippocampus of control and alcohol-exposed sP rats. Scale bar 50µm. (E) Quantification of astrocytic density. (F) Representative photomicrographs of fluorojade staining in control and alcohol-exposed sP rats. Scale bar 100µm #  $p < 0.1$ , \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , Mann-Whitney test.

**Figure 6: Chronic alcohol provokes liver inflammation in sP rats.**

(A) Representative photomicrographs of Kupffer cells (Iba1+) in the liver of control and alcohol-exposed sP rats. Scale bar 100µm. (B) Quantification of Kupffer cell density. (C) Representative photomicrograph of hepatic stellate cells (HSC) (GFAP+) in the liver of control and alcohol-exposed sP rats. Scale bar 100µm. (D) Detail of HSC. Note the ameboid shape in the alcohol-exposed condition, characteristic of the activated state of HSC. Scale bar 10µm. (E) Quantification of HSC density. (F) Percentage of ameboid HSC in the liver of alcohol-exposed and control sP rats. \*  $p < 0.05$ , Mann-Whitney test.

**Supplementary figure 1: Hematoxylin & Eosin staining in liver of control and alcohol-exposed sP rats.**

(A) Representative photomicrographs of liver after hematoxylin & eosin staining. Scale bar 100µm.

|                    |                                   | AUD N=25                   | HC N=16       | P value           |
|--------------------|-----------------------------------|----------------------------|---------------|-------------------|
| Demography         | Age (years)                       | 46.84 (8.586)              | 46.38 (6.531) | 0.8543            |
|                    | Men/Women Ratio                   | 20/5                       | 13/3          | 0.8718*           |
|                    | Education (years of schooling)    | 12.04 (1.881)              | 11.69 (2.33)  | 0.5816            |
| Clinical variables | DRS (total score /144)            | 135.4 (8.675)              | 141.4 (2.159) | <b>0.0021</b>     |
|                    | BDI                               | 10.68 (7.454)              | 3.625 (3.008) | <b>0.0006</b>     |
|                    | STAI-A                            | 29.74 (10.69) <sup>b</sup> | 27.50 (7.220) | 0.6555            |
|                    | STAI-B                            | 43.39 (12.07) <sup>b</sup> | 33.88 (6.365) | <b>0.0174</b>     |
|                    | AUDIT                             | 29.08 (6.788)              | 2.875 (1.668) | <b>&lt;0.0001</b> |
|                    | Alcohol misuse (number of years)  | 19.667 (8.91)              | NA            | /                 |
|                    | Daily alcohol consumption (units) | 19.864 (8.91)              | NA            | /                 |
|                    | Length of sobriety (days)         | 11.42 (4.94)               | NA            | /                 |

\*: chi2  
a: 1 missing data  
b: 2 missing datas

DRS, Mattis Dementia Rating Scale; BDI, Beck Depression Inventory; STAI, State-Trait Anxiety; AUDIT, Alcohol Use Disorders Identification Test; GGT, Gamma-glutamyl transferase; ASAT/ALAT, transaminases

Table 1: Demographical and clincical description of the Healthy Controls (HC) and Alcohol Use Disorder patients (AUD)

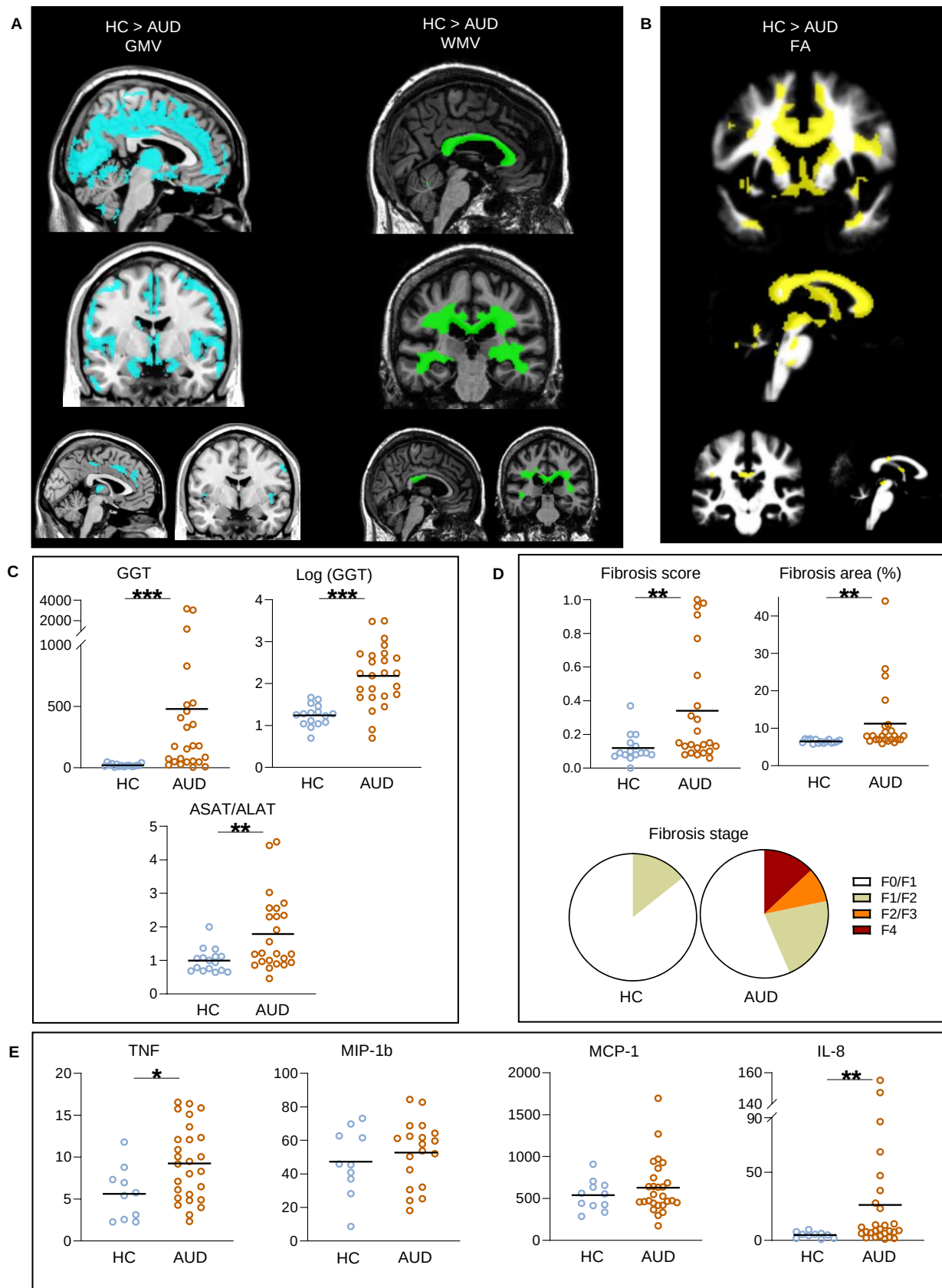


Figure 1

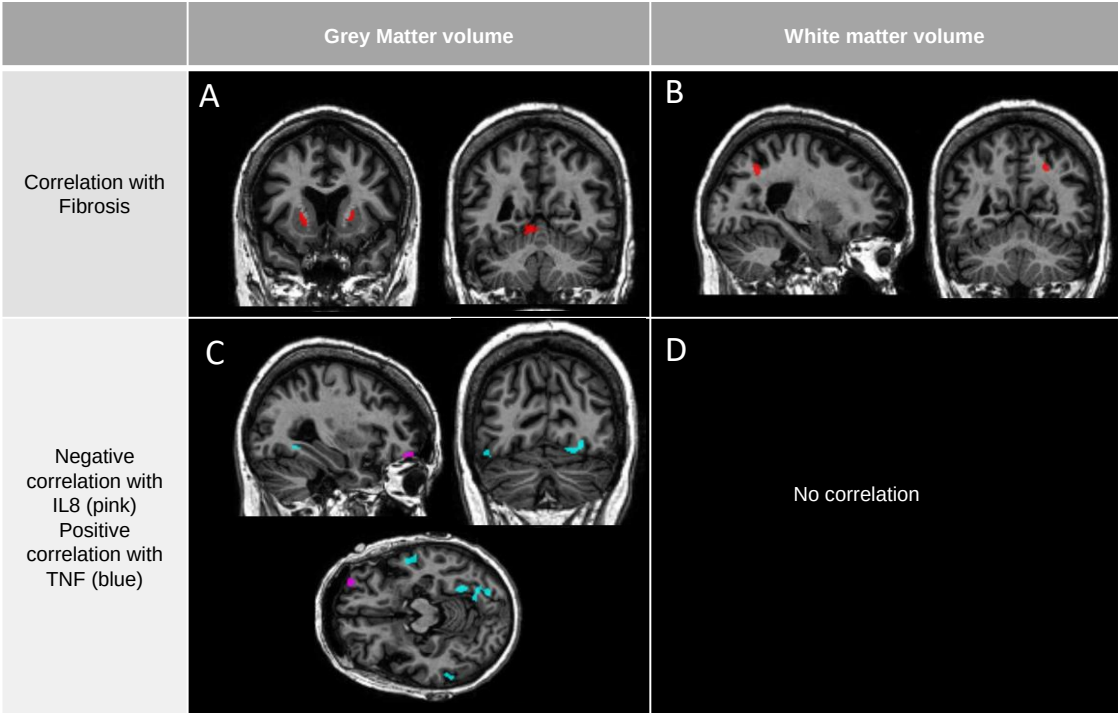


Figure 2

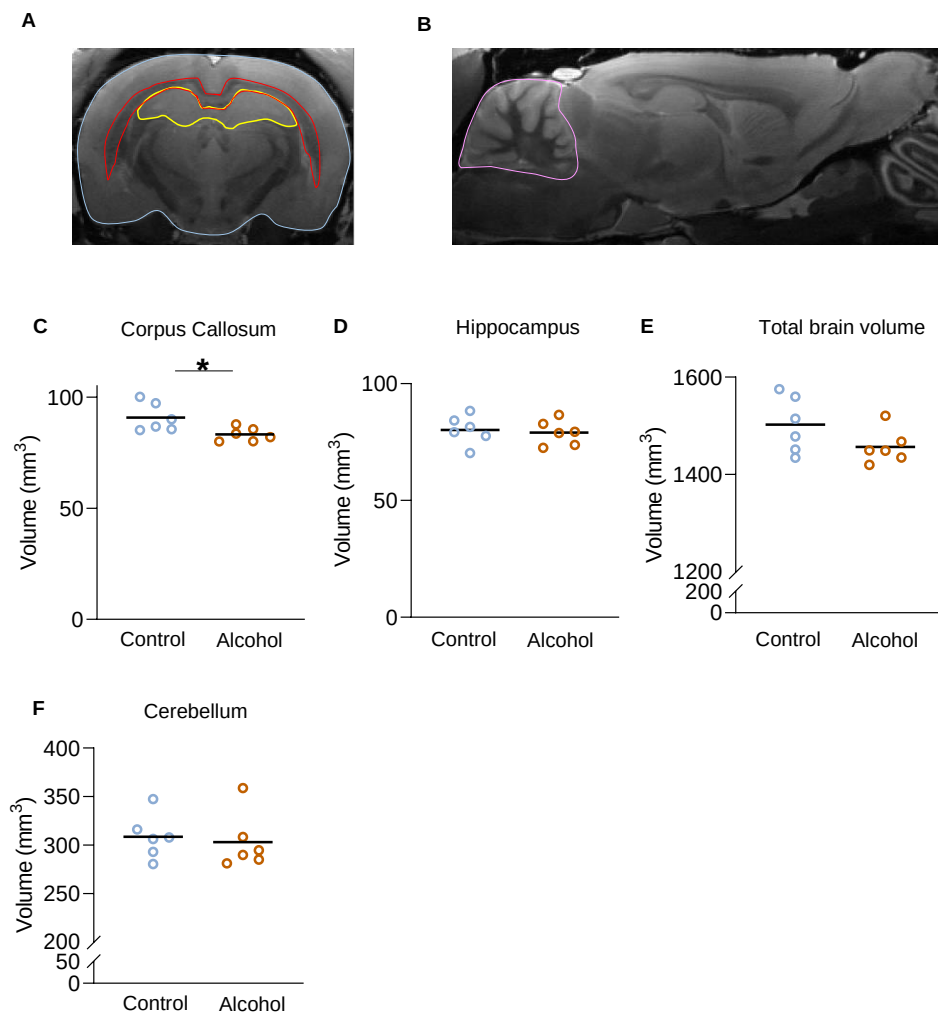


Figure 3

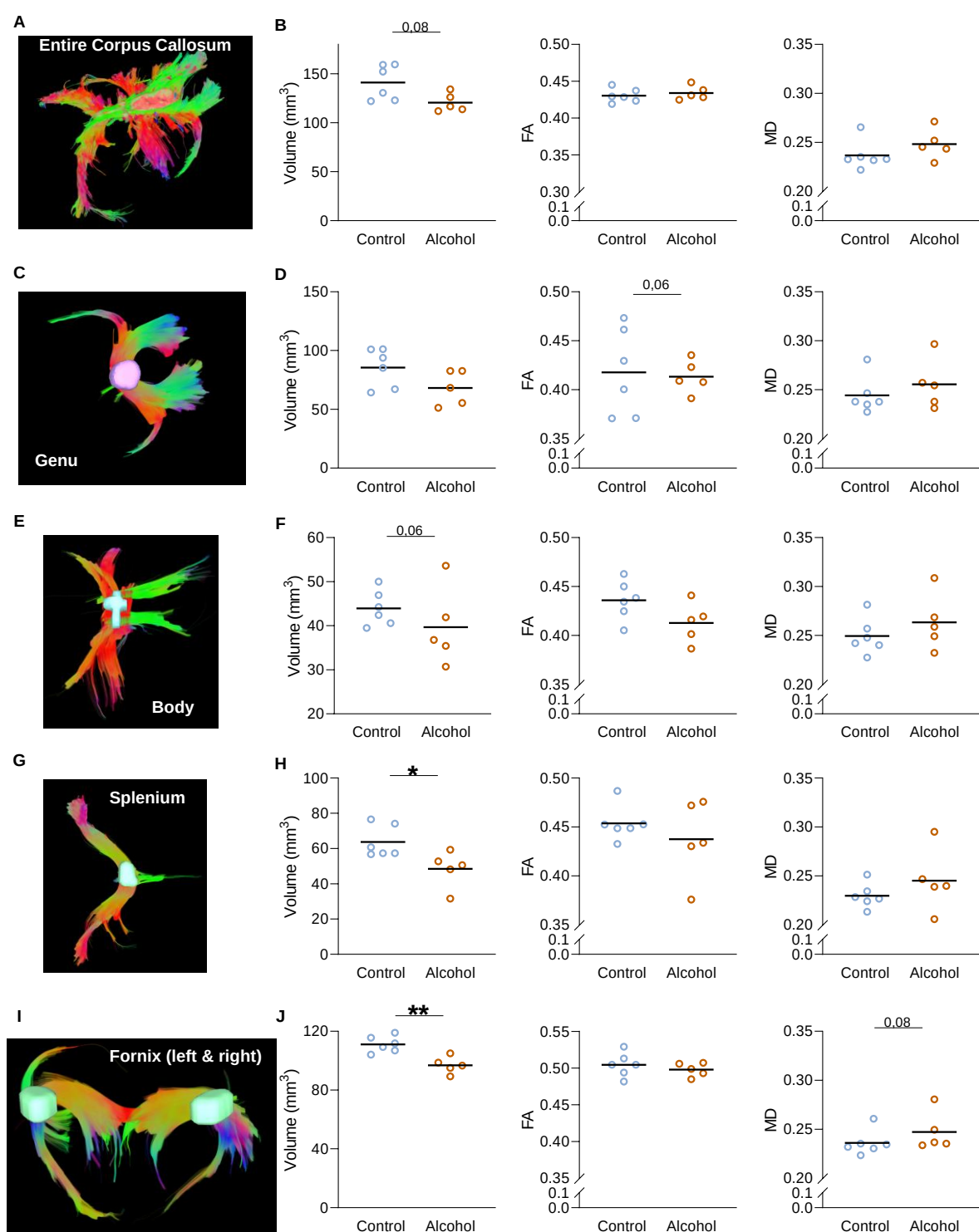


Figure 4

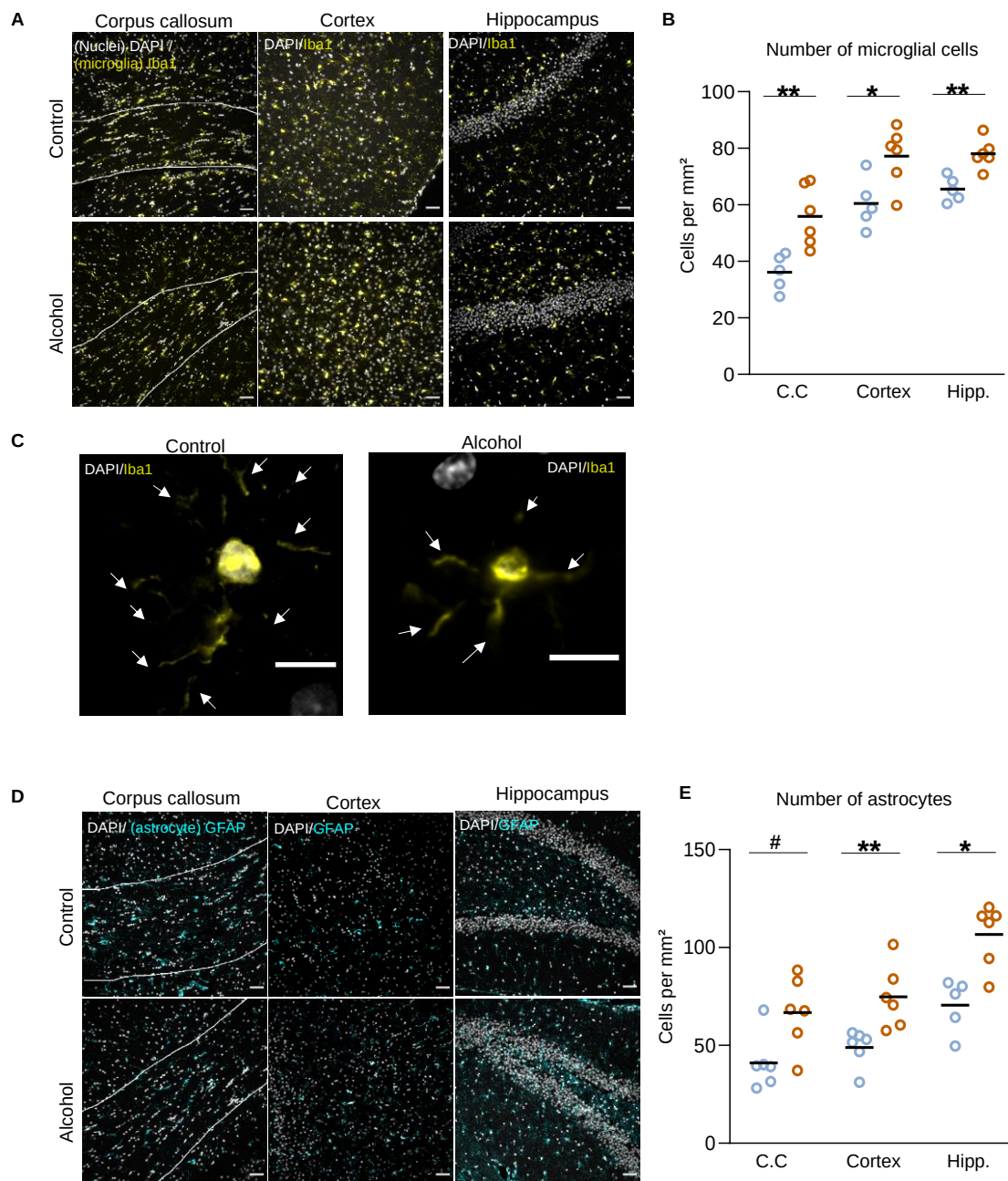


Figure 5



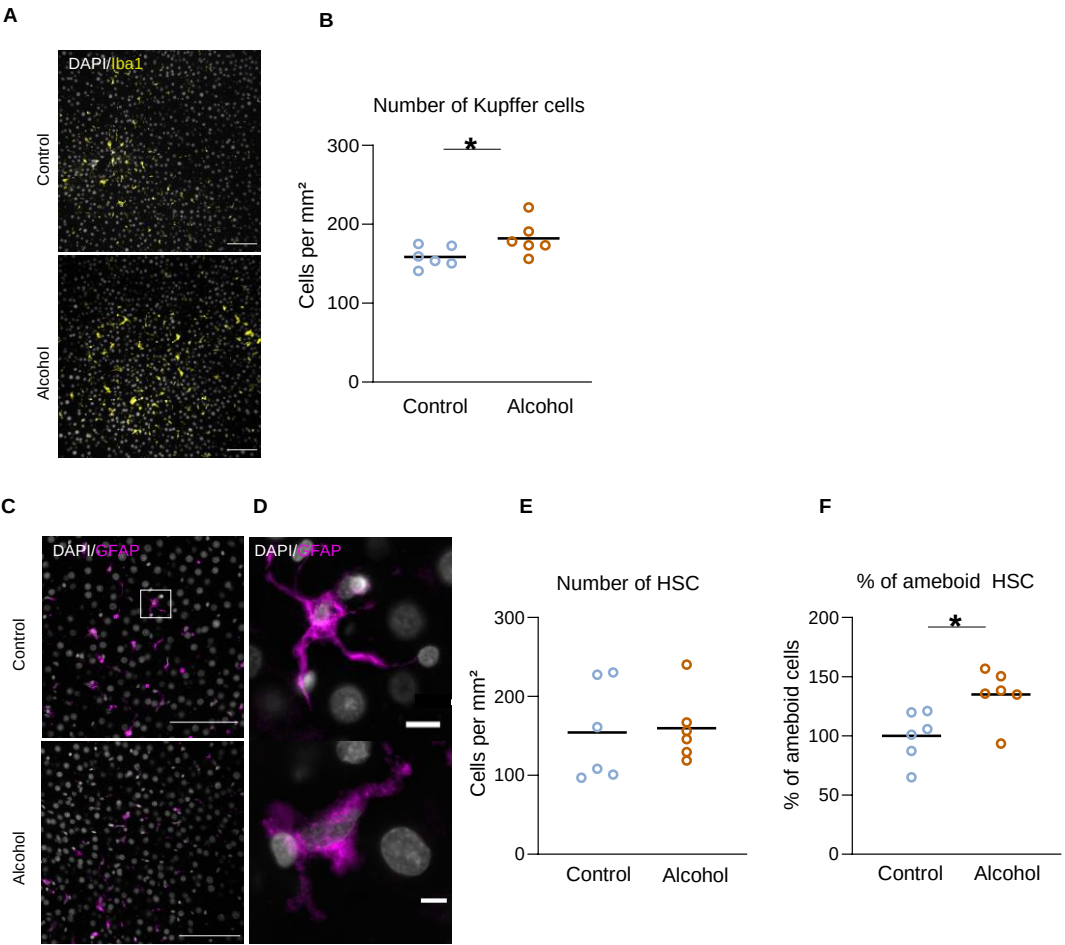
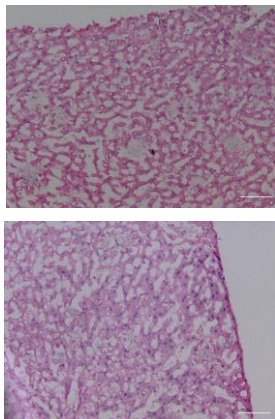


Figure 6

A



Supplementary figure 1

## References:

Addolorato G, Mirijello A, Barrio P & Gual A (2016). Treatment of alcohol use disorders in patients with alcoholic liver disease. *J Hepatol* **65**, 618–630.

Afford SC, Fisher NC, Neil DAH, Fear J, Brun P, Hubscher SG & Adams DH (1998). Distinct patterns of chemokine expression are associated with leukocyte recruitment in alcoholic hepatitis and alcoholic cirrhosis. *J Pathol* **186**, 82–89.

Agabio R, Cortis G, Fadda F, Gessa GL, Lobina C, Reali R & Colombo G (1996). Circadian drinking pattern of sardinian alcohol-preferring rats. *Alcohol Alcohol* **31**, 385–388.

Alfonso-Loeches S, Ureña-Peralta J, Morillo-Bargues MJ, Gómez-Pinedo U & Guerri C (2016). Ethanol-induced TLR4/NLRP3 neuroinflammatory response in microglial cells promotes leukocyte infiltration across the BBB. *Neurochem Res* **41**, 193–209.

American Psychiatric Association. (1994). *Diagnostic criteria from DSM-IV*. The Association.

American Psychological Association (APA) (2013). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders: Depressive Disorders*. American Psychiatric Publishing, Inc. Available at: <http://dsm.psychiatryonline.org//content.aspx?bookid=556&sectionid=41101760> [Accessed May 7, 2020].

Beck AT, Ward CH, Mendelson M, Mock J & Erbaugh J (1961). An Inventory for Measuring Depression. *Arch Gen Psychiatry* **4**, 561–571.

Calès P, Oberti F, Michalak S, Hubert-Fouchard I, Rousselet MC, Konaté A, Gallois Y, Ternisien C, Chevallier A & Lunel F (2005). A novel panel of blood markers to assess the degree of liver fibrosis. *Hepatology* **42**, 1373–1381.

Chen CH, Walker J, Momenan R, Rawlings R, Heilig M & Hommer DW (2012). Relationship Between Liver Function and Brain Shrinkage in Patients with Alcohol Dependence. *Alcohol Clin Exp Res* **36**, 625–632.

Colombo G, Agabio R, Lobina C, Reali R, Zocchi A, Fadda F & Gessa GL (1995). Sardinian alcohol-preferring rats: A genetic animal model of anxiety. *Physiol Behav* **57**, 1181–1185.

Colombo G, Lobina C, Carai MAM & Gessa GL (2006). Phenotypic characterization of genetically selected Sardinian alcohol-preferring (sP) and -non-preferring (sNP) rats. *Addict Biol* **11**, 324–338.

Crews FT, Bechara R, Brown LA, Guidot DM, Mandrekar P, Oak S, Qin L, Szabo G, Wheeler M & Zou J (2006). Cytokines and Alcohol. *Alcohol Clin Exp Res* **30**, 720–730.

Crews FT, Zou J & Qin L (2011). Induction of innate immune genes in brain create the neurobiology of addiction. *Brain Behav Immun*; DOI: 10.1016/j.bbi.2011.03.003.

Cushman P, Lerner W & Cramer M (1985). Adrenergic agonist therapy in alcohol withdrawal states in man. *Psychopharmacol Bull* **21**, 651–656.

D'Mello C & Swain MG (2017). Immune-to-brain communication pathways in inflammation-associated sickness and depression. In *Current Topics in Behavioral Neurosciences*, pp. 73–94. Springer Verlag.

Domi A, Stopponi S, Domi E, Ciccocioppo R & Cannella N (2019). Sub-dimensions of alcohol use disorder in alcohol preferring and non-preferring rats, a comparative study. *Front Behav Neurosci*; DOI: 10.3389/fnbeh.2019.00003.

Fisher NC, Neil DAH, Williams A & Adams DH (1999). Serum concentrations and peripheral secretion of the beta chemokines monocyte chemoattractant protein 1 and macrophage inflammatory protein 1  $\alpha$  in alcoholic liver disease. *Gut* **45**, 416–420.

Frischknecht U, Hermann D, Tunc-Skarka N, Wang GY, Sack M, van Eijk J, Demirakca T, Falfan-Melgoza C, Krumm B, Dieter S, Spanagel R, Kiefer F, Mann KF, Sommer WH, Ende G & Weber-Fahr W (2017). Negative Association Between MR-Spectroscopic Glutamate Markers and Gray Matter Volume After Alcohol Withdrawal in the Hippocampus: A

Translational Study in Humans and Rats. *Alcohol Clin Exp Res* **41**, 323–333.

Gache P, Michaud P, Landry U, Accietto C, Arfaoui S, Wenger O & Daeppen JB (2005). The alcohol use disorders identification test (AUDIT) as a screening tool for excessive drinking in primary care: Reliability and validity of a french version. *Alcohol Clin Exp Res* **29**, 2001–2007.

Gao B, Ahmad MF, Nagy LE & Tsukamoto H (2019). Inflammatory pathways in alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* **70**, 249–259.

Girard M, Malauzat D & Nubukpo P (2019). Serum inflammatory molecules and markers of neuronal damage in alcohol-dependent subjects after withdrawal. *World J Biol Psychiatry* **20**, 76–90.

Gonzalez-Quintela A, Alende R, Gude F, Campos J, Rey J, Meijide LM, Fernandez-Merino C & Vidal C (2008). Serum levels of immunoglobulins (IgG, IgA, IgM) in a general adult population and their relationship with alcohol consumption, smoking and common metabolic abnormalities. *Clin Exp Immunol* **151**, 42–50.

Grzegorzewska AE, Świdarska MK, Mostowska A, Warchoń W & Jagodziński PP (2017). Polymorphisms of T helper cell cytokine-associated genes and survival of hemodialysis patients - a prospective study. *BMC Nephrol*; DOI: 10.1186/s12882-017-0582-x.

Halvorson MR, Campbell JL, Sprague G, Slater K, Noffsinger JK & Peterson CM (1993). Comparative Evaluation of the Clinical Utility of Three Markers of Ethanol Intake: The Effect of Gender. *Alcohol Clin Exp Res* **17**, 225–229.

Harper CG & Kril JJ (1988). Corpus callosal thickness in alcoholics. *Br J Addict* **83**, 577–580.

Heberlein A, Schuster R, Ziert Y, Opfermann B, Bleich S & Hillemacher T (2014). The implications for the biological and sociodynamic causal explanations of attitudes toward alcohol-dependent patients. *Psychiatry Res* **215**, 766–770.

Inokuchi S, Tsukamoto H, Park E, Liu ZX, Brenner DA & Seki E (2011). Toll-like receptor 4 mediates alcohol-induced steatohepatitis through bone marrow-derived and endogenous liver cells in mice. *Alcohol Clin Exp Res* **35**, 1509–1518.

Jagavelu K, Routray C, Shergill U, O'Hara SP, Faubion W & Shah VH (2010). Endothelial cell toll-like receptor 4 regulates fibrosis-associated angiogenesis in the liver. *Hepatology* **52**, 590–601.

Jenkinson M, Bannister P, Brady M & Smith S (2002). Improved optimization for the robust and accurate linear registration and motion correction of brain images. *Neuroimage* **17**, 825–841.

Junghanns K (2004). Mildly disturbed hepatic and pancreatic function during early abstinence from alcohol is associated with brain atrophy and with disturbed psychometric performance. *Alcohol Alcohol* **39**, 113–118.

Jurica, P. J., Leitten, C. L., & Mattis S (2001). Dementia Rating Scale—2 professional manual. *Psychol Assess Resour*.

Kalk NJ, Guo Q, Owen D, Cherian R, Erritzoe D, Gilmour A, Ribeiro AS, McGonigle J, Waldman A, Matthews P, Cavanagh J, McInnes I, Dar K, Gunn R, Rabiner EA & Lingford-Hughes AR (2017). Decreased hippocampal translocator protein (18kDa) expression in alcohol dependence: A [11C]PBR28 PET study. *Transl Psychiatry*; DOI: 10.1038/tp.2016.264.

Kim SW et al. (2018). Influence of alcoholism and cholesterol on TSPO binding in brain: PET [ 11 C]PBR28 studies in humans and rodents. *Neuropsychopharmacology* **43**, 1832–1839.

Kirpich IA, Solovieva N V., Leikhter SN, Shidakova NA, Lebedeva O V., Sidorov PI, Bazhukova TA, Soloviev AG, Barve SS, McClain CJ & Cave M (2008). Probiotics restore bowel flora and improve liver enzymes in human alcohol-induced liver injury: a pilot study. *Alcohol* **42**, 675–682.

Koike H, Mori K, Misu K, Hattori N, Ito H, Hirayama M & Sobue G (2001). Painful

alcoholic polyneuropathy with predominant small-fiber loss and normal thiamine status. *Neurology* **56**, 1727–1732.

Lamas-Paz A, Hao F, Nelson LJ, Vázquez MT, Canals S, del Moral MG, Martínez-Naves E, Nevzorova YA & Cubero FJ (2018). Alcoholic liver disease: Utility of animal models. *World J Gastroenterol* **24**, 5063–5075.

Laso FJ, Vaquero JM, Almeida J, Marcos M & Orfao A (2007). Production of inflammatory cytokines by peripheral blood monocytes in chronic alcoholism: Relationship with ethanol intake and liver disease. *Cytom Part B - Clin Cytom* **72**, 408–415.

Leach N V., Dronca E, Craciun EC & Crisan D (2016). High levels of serum homocysteine in non-alcoholic steatohepatitis. *Eur J Intern Med* **35**, e38–e39.

Leclercq S, Cani PD, Neyrinck AM, Stärkel P, Jamar F, Mikolajczak M, Delzenne NM & De Timary P (2012). Role of intestinal permeability and inflammation in the biological and behavioral control of alcohol-dependent subjects. *Brain Behav Immun* **26**, 911–918.

Leclercq S, Matamoros S, Cani PD, Neyrinck AM, Jamar F, Stärkel P, Windey K, Tremaroli V, Bäckhed F, Verbeke K, De Timary P & Delzenne NM (2014). Intestinal permeability, gut-bacterial dysbiosis, and behavioral markers of alcohol-dependence severity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, E4485–E4493.

Leclercq S, De Timary P, Delzenne NM & Stärkel P (2017). The link between inflammation, bugs, the intestine and the brain in alcohol dependence. *Transl Psychiatry*; DOI: 10.1038/tp.2017.15.

Lin WC, Chou KH, Chen CL, Chen CH, Chen HL, Feekes JA, Hsu NW, Li SH, Cheng YF & Lin CP (2012). Significant volume reduction and shape abnormalities of the basal ganglia in cases of chronic liver cirrhosis. *Am J Neuroradiol* **33**, 239–245.

Lobina C, Gessa GL & Colombo G (2013). Anxiolytic Effect of Voluntarily Consumed Alcohol in Sardinian Alcohol- Preferring Rats Exposed to the Social Interaction Test. *J Alcohol*

*Drug Depend*; DOI: 10.4172/2329-6488.1000132.

Loi B, Colombo G, Maccioni P, Carai MAM, Franconi F & Gessa GL (2014). High alcohol intake in female Sardinian alcohol-preferring rats. *Alcohol* **48**, 345–351.

Mackey S et al. (2019). Mega-analysis of gray matter volume in substance dependence: General and substance-specific regional effects. *Am J Psychiatry* **176**, 119–128.

Mancinelli R & Ceccanti M (2009). Biomarkers in Alcohol Misuse: Their Role in the Prevention and Detection of Thiamine Deficiency. *Alcohol Alcohol* **44**, 177–182.

Montesinos J, Alfonso-Loeches S & Guerri C (2016). Impact of the Innate Immune Response in the Actions of Ethanol on the Central Nervous System. *Alcohol Clin Exp Res* **40**, 2260–2270.

Paxinos G & Watson C (2013). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates : Hard Cover Edition*. Elsevier Science.

Pfefferbaum A, Adalsteinsson E, Sood R, Mayer D, Bell R, McBride W, Li TK & Sullivan E V. (2006a). Longitudinal brain magnetic resonance imaging study of the alcohol-preferring rat. Part II: Effects of voluntary chronic alcohol consumption. *Alcohol Clin Exp Res* **30**, 1248–1261.

Pfefferbaum A, Adalsteinsson E & Sullivan E V. (2006b). Dysmorphology and microstructural degradation of the corpus callosum: Interaction of age and alcoholism. *Neurobiol Aging* **27**, 994–1009.

Pfefferbaum A, Lim KO, Desmond JE & Sullivan E V. (1996). Thinning of the Corpus Callosum in Older Alcoholic Men: A Magnetic Resonance Imaging Study. *Alcohol Clin Exp Res* **20**, 752–757.

Pfefferbaum A, Rosenbloom M, Rohlfing T & Sullivan E V. (2009). Degradation of Association and Projection White Matter Systems in Alcoholism Detected with Quantitative Fiber Tracking. *Biol Psychiatry* **65**, 680–690.



Pfefferbaum A & Sullivan E V. (2002). Microstructural but not macrostructural disruption of white matter in women with chronic alcoholism. *Neuroimage* **15**, 708–718.

Pfefferbaum A & Sullivan E V. (2005). Disruption of brain white matter microstructure by excessive intracellular and extracellular fluid in alcoholism: Evidence from diffusion tensor imaging. *Neuropsychopharmacology* **30**, 423–432.

Pfefferbaum A, Sullivan E V., Hedehus M, Adalsteinsson E, Lim KO & Moseley M (2000). In vivo detection and functional correlates of white matter microstructural disruption in chronic alcoholism. *Alcohol Clin Exp Res* **24**, 1214–1221.

Pitel AL, Chanraud S, Sullivan E V. & Pfefferbaum A (2010). Callosal microstructural abnormalities in Alzheimer's disease and alcoholism: Same phenotype, different mechanisms. *Psychiatry Res - Neuroimaging* **184**, 49–56.

Pitel AL, Chételat G, Le Berre AP, Desgranges B, Eustache F & Beaunieux H (2012). Macrostructural abnormalities in Korsakoff syndrome compared with uncomplicated alcoholism. *Neurology* **78**, 1330–1333.

Pitel AL, Segobin SH, Ritz L, Eustache F & Beaunieux H (2015). Thalamic abnormalities are a cardinal feature of alcohol-related brain dysfunction. *Neurosci Biobehav Rev* **54**, 38–45.

Posteraro B, Paroni Sterbini F, Petito V, Rocca S, Cubeddu T, Graziani C, Arena V, Vassallo GA, Mosoni C, Lopetuso L, Lorrain I, Maccioni P, Masucci L, Martini C, Gasbarrini A, Sanguinetti M, Colombo G & Addolorato G (2018). Liver Injury, Endotoxemia, and Their Relationship to Intestinal Microbiota Composition in Alcohol-Preferring Rats. *Alcohol Clin Exp Res* **42**, 2313–2325.

Qin L, He J, Hanes RN, Pluzarev O, Hong JS & Crews FT (2008). Increased systemic and brain cytokine production and neuroinflammation by endotoxin following ethanol treatment. *J Neuroinflammation* **5**, 10.

Rehm J et al. (2015). People with Alcohol Use Disorders in Specialized Care in Eight

Different European Countries. *Alcohol Alcohol* **50**, 310–318.

Ritz L, Coulbault L, Lannuzel C, Boudehent C, Segobin S, Eustache F, Vabret F, Pitel AL & Beaunieux H (2016). Clinical and Biological Risk Factors for Neuropsychological Impairment in Alcohol Use Disorder. *PLoS One*; DOI: 10.1371/journal.pone.0159616.

Rossetti I, Zambusi L, Maccioni P, Sau R, Provini L, Paola Castelli M, Gonciarz K, Colombo G & Morara S (2019). Predisposition to alcohol drinking and alcohol consumption alter expression of calcitonin gene-related peptide, neuropeptide Y, and microglia in bed nucleus of stria terminalis in a subnucleus-specific manner. *Front Cell Neurosci*; DOI: 10.3389/fncel.2019.00158.

Rueckert, D. Sonoda, L.I. Hayes, C. Hill, D. Leach, M. Hawkes D. (1999). Nonrigid registration using free-form deformations: Application to breast mr images. *IEEE Trans Med Imaging* **18**, 712–721.

De Santis S, Bach P, Pérez-Cervera L, Cosa-Linan A, Weil G, Vollstädt-Klein S, Hermann D, Kiefer F, Kirsch P, Ciccocioppo R, Sommer WH & Canals S (2019). Microstructural White Matter Alterations in Men with Alcohol Use Disorder and Rats with Excessive Alcohol Consumption during Early Abstinence. *JAMA Psychiatry* **76**, 749–758.

Segobin S, Laniepce A, Ritz L, Lannuzel C, Boudehent C, Cabé N, Urso L, Vabret F, Eustache F, Beaunieux H & Pitel AL (2019). Dissociating thalamic alterations in alcohol use disorder defines specificity of Korsakoff's syndrome. *Brain* **142**, 1458–1470.

Seki E, De Minicis S, Österreicher CH, Kluwe J, Osawa Y, Brenner DA & Schwabe RF (2007). TLR4 enhances TGF- $\beta$  signaling and hepatic fibrosis. *Nat Med* **13**, 1324–1332.

Shokouhi BN, Wong BZY, Siddiqui S, Lieberman AR, Campbell G, Tohyama K & Anderson PN (2010). Microglial responses around intrinsic CNS neurons are correlated with axonal regeneration. *BMC Neurosci*; DOI: 10.1186/1471-2202-11-13.

Smith SM, Jenkinson M, Woolrich MW, Beckmann CF, Behrens TEJ, Johansen-Berg H,

Bannister PR, De Luca M, Drobnjak I, Flitney DE, Niazy RK, Saunders J, Vickers J, Zhang Y, De Stefano N, Brady JM & Matthews PM (2004). Advances in functional and structural MR image analysis and implementation as FSL. In *NeuroImage*. Neuroimage.

Tyler RE, Kim SW, Guo M, Jang YJ, Damadzic R, Stodden T, Vendruscolo LF, Koob GF, Wang GJ, Wiers CE & Volkow ND (2019). Detecting neuroinflammation in the brain following chronic alcohol exposure in rats: A comparison between in vivo and in vitro TSPO radioligand binding. *Eur J Neurosci* **50**, 1831–1842.

Umhau JC, Schwandt M, Solomon MG, Yuan P, Nugent A, Zarate CA, Drevets WC, Hall SD, George DT & Heilig M (2014). Cerebrospinal fluid monocyte chemoattractant protein-1 in alcoholics: Support for a neuroinflammatory model of chronic alcoholism. *Alcohol Clin Exp Res* **38**, 1301–1306.

Vallés SL, Blanco AM, Pascual M & Guerri C (2006). Chronic Ethanol Treatment Enhances Inflammatory Mediators and Cell Death in the Brain and in Astrocytes. *Brain Pathol* **14**, 365–371.

Wainwright DA, Xin J, Mesnard NA, Beahrs TR, Politis CM, Sanders VM & Jones KJ (2009). Exacerbation of Facial Motoneuron Loss after Facial Nerve Axotomy in CCR3-Deficient Mice. *ASN Neuro* **1**, AN20090017.

Wilson J, Tay RY, McCormack C, Allsop S, Najman J, Burns L, Olsson CA, Elliott E, Jacobs S, Mattick RP & Hutchinson D (2017). Alcohol consumption by breastfeeding mothers: Frequency, correlates and infant outcomes. *Drug Alcohol Rev* **36**, 667–676.

Zhao YN, Wang F, Fan YX, Ping GF, Yang JY & Wu CF (2013). Activated microglia are implicated in cognitive deficits, neuronal death, and successful recovery following intermittent ethanol exposure. *Behav Brain Res* **236**, 270–282.

## DISCUSSION



## 1. Synthèse des résultats

Il existe des liens entre le système nerveux central et périphérique qui sont particulièrement visibles chez les patients TUAL développant une encéphalopathie hépatique. Dans cette thèse, nous avons montré qu'avant le développement de cette complication neurologique, il existe des atteintes cérébrales et hépatiques et que les liens entre ces atteintes peuvent être expliqués par l'inflammation. Grâce au caractère translationnel et longitudinal de ce travail, nous avons pu étudier l'inflammation au niveau périphérique, cérébral et hépatique et analyser la temporalité de l'apparition de ces atteintes. Le tableau ci-après contient le récapitulatif des résultats. Brièvement, il existe des atteintes comportementales et cérébrales chez les patients TUAL et nous avons montré que les atteintes comportementales sans atteintes cérébrales détectables à l'IRM existaient chez les souris non préférentes à partir de 6 mois d'exposition à l'alcool, mais que les atteintes cérébrales étaient présentes chez les rats avec une préférence génétique pour l'alcool après 12 mois d'exposition à l'alcool. Nous avons montré des modifications hépatiques légères à modérées chez les patients TUAL et les sP rats. Dans les deux modèles d'exposition chronique à l'alcool (rat et souris), nous avons montré une inflammation cérébrale et hépatique. Chez les patients TUAL et dans les deux modèles précliniques, une inflammation systémique révélée par le taux de cytokines circulantes a été retrouvée.

**Tableau 3 : Récapitulatif des résultats en fonction des trois modèles utilisés dans cette thèse #non-cirrhétiques récemment abstinents \*Mesuré à 12 mois d'exposition à l'alcool**

|                                             | Dose d'alcool par jour | Atteintes comportementales   | Atteintes cérébrales |     | Atteintes hépatiques   | Inflammation cérébrale                                      | Inflammation hépatique              | Inflammation systémique (cytokines) |
|---------------------------------------------|------------------------|------------------------------|----------------------|-----|------------------------|-------------------------------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
|                                             |                        |                              | Volume               | DTI |                        |                                                             |                                     |                                     |
| Patients TUAL <sup>#</sup>                  | 19 unités              | OUI                          | OUI                  | OUI | OUI légères à modérées | Non mesurée                                                 | Non mesurée mais pas d'hépatite     | OUI TNF et IL-8                     |
| sP rats (préférence génétique) <sup>*</sup> | 8-10 g/kg              | Non mesuré                   | OUI                  | OUI | OUI légères            | OUI                                                         | OUI                                 | OUI TNF                             |
| Souris Swiss (pas de préférence spontanée)  | 8-13 g/kg              | OUI 6 et 9 mois d'exposition | NON                  | NON | En cours d'analyse     | OUI activation microgliale à partir d'1,5 mois d'exposition | OUI à partir de 6 mois d'exposition | OUI                                 |

2. Chronologie des atteintes liées à l'alcool

Dans l'étude 1, nous avons étudié la mise en place et le développement des atteintes cérébrales et hépatiques. Ainsi, dans notre modèle murin d'exposition chronique à l'alcool, les atteintes comportementales ne sont présentes qu'à partir de 6 mois d'exposition à l'alcool. A 6 mois d'exposition à l'alcool ces atteintes ne concernent que la mémoire spatiale, mais à partir de 9 mois d'exposition à l'alcool, des atteintes de la motricité fine (équilibre et coordination) apparaissent. Durant toute la durée d'exposition à l'alcool, les comportements d'anxiété, de mémoire émotionnelle et l'activité globale sont préservés (Figure 38).

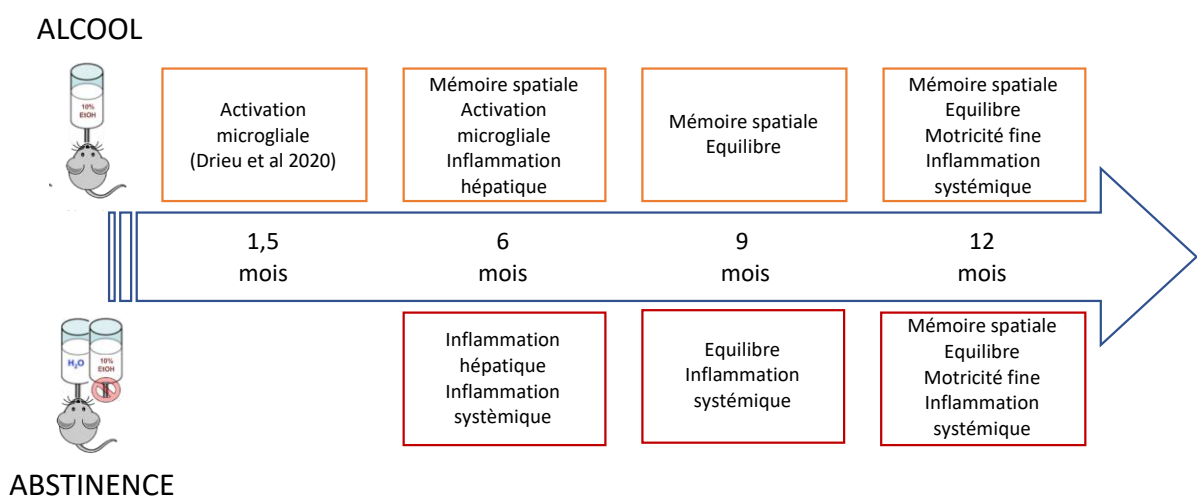


Figure 38 : Schéma récapitulatif des atteintes en fonction du temps d'exposition à l'alcool dans l'étude 1 dans le groupe alcool (en haut en orange) et dans le groupe ABSTINENCE (en bas en rouge) comparé au groupe contrôle. Les cadres indiquent les altérations observées.

Ces atteintes comportementales ont été mises en évidence indépendamment d'altérations anatomiques visibles par IRM. Cependant, elles pourraient être dues à des altérations au niveau cellulaire, et notamment par des processus inflammatoires. Dans une étude précédente (Drieu et al., 2020) une activation microgliale a été mise en évidence après 1,5 mois d'exposition à l'alcool. Dans les analyses faites à 6 mois d'exposition à l'alcool, nous retrouvons le même type de profil d'activation microgliale au niveau hippocampique que dans cette étude. L'atteinte comportementale étant absente à 1,5 mois d'exposition, il semblerait donc que la durée de l'exposition à l'alcool et donc de l'activation microgliale soit un facteur majeur pour observer des atteintes comportementales dans ce modèle. Les résultats d'immunohistochimie sont actuellement en cours d'analyse, il sera alors intéressant d'étudier non seulement l'activation microgliale, mais aussi, les autres cellules de l'immunité avec

lesquelles la microglie peut interagir et particulièrement les astrocytes et les neutrophiles ainsi que l'éventuelle activation endothéliale en fonction du temps d'alcoolisation.

Au niveau hépatique, nous avons retrouvé une augmentation du nombre de CK après 6 mois d'exposition chronique à l'alcool sans infiltration de neutrophile associée, en accord avec la littérature ([Karakucuk et al., 1989](#); [Shiratori et al., 1989](#); [Bertola et al., 2013](#); [Ducroquet, 2015](#)). C'est aussi à ce temps d'exposition à l'alcool que nous observons les premières atteintes comportementales, soulignant le parallèle entre la chronologie des altérations hépatiques et cérébrales en appuyant l'existence d'interactions entre le foie et le cerveau.

### 3. Inflammation périphérique et altérations cérébrales

Nous avons ainsi mis en évidence que chez les patients TUAL récemment abstinentes et non cirrhotiques, le taux de cytokines proinflammatoires circulantes est corrélé avec le volume cérébral et avec la fibrose hépatique (**Étude 2**). Le foie étant la principale source de cytokines dans le corps humain, ces résultats suggèrent l'existence d'un lien entre les altérations hépatiques et cérébrales chez les patients TUAL, même en absence d'atteinte hépatique majeure. Ces résultats sont en accord avec ceux de la littérature montrant une association entre la fibrose hépatique et les déficits cognitifs chez les patients TUAL ([Ritz et al., 2016](#)). Afin d'évaluer la réponse inflammatoire au niveau tissulaire, cérébral et hépatique, nous avons utilisé un modèle animal validé de TUAL ([Colombo et al., 2006](#)). Dans ce modèle, nous avons montré pour la première fois des atteintes cérébrales macrostructurales et microstructurales de la substance blanche similaires à celles des patients TUAL. De plus, en accord avec les résultats de l'inflammation périphérique obtenus en clinique, nous avons mis en évidence des réponses inflammatoires aux niveaux cérébral et hépatique causées par la consommation chronique d'alcool.

### 4. Activation microgliale, astrocytes, neurones et neutrophiles

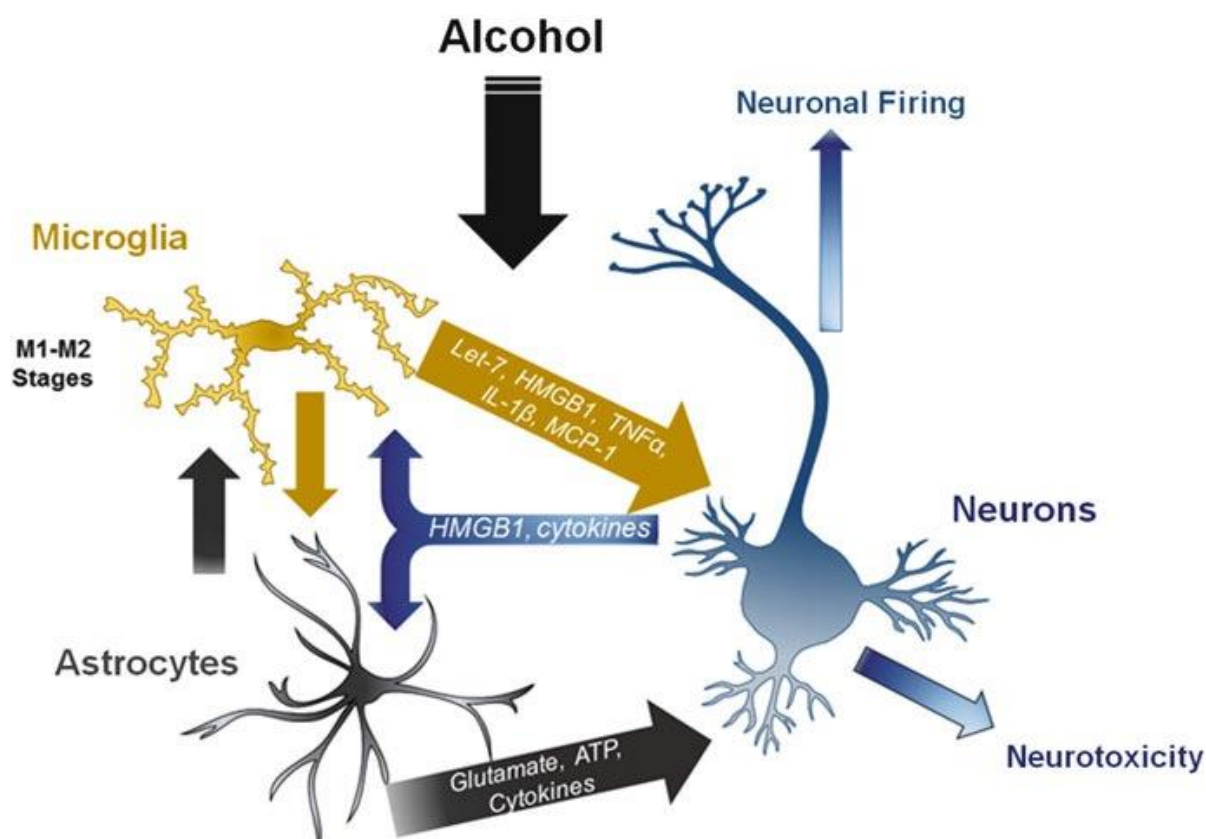
Nos résultats ont montré que le traitement à la minocycline réduit la prise spontanée d'alcool dans notre modèle (**étude 2** ; [Agrawal et al., 2011](#)). Mais l'inhibition de l'activation microgliale ne permet pas de prévenir les déficits de mémoire spatiale causés par l'alcoolisation chronique. A contrario, nos résultats suggèreraient un effet protecteur de



l'activation microgliale face aux déficits de mémoire. Des expériences supplémentaires sont nécessaires pour vérifier cette hypothèse.

Il a été montré que l'exposition à l'alcool peut entraîner l'activation des astrocytes (Alfonso-Loeches *et al.*, 2010). De plus, les astrocytes expriment aussi des récepteurs de l'immunité dont les TLR4 et les TLR2 qui sont activés par le LPS. Une fois activés, ils peuvent libérer des cytokines (Figure 20). Les astrocytes des régions préfrontales et hippocampiques semblent être plus sensibles aux effets de l'exposition à l'alcool (Miguel-Hidalgo, 2018), et pourraient ainsi participer aux déficits cognitifs observés. De par leur rôle de composant de la barrière hématoencéphalique (BHE), ils pourraient participer à la perméabilisation de la BHE observée dans un contexte inflammatoire systémique et d'alcoolisation chronique (Singh *et al.*, 2007). Une étude récente dans laquelle j'ai pu participer a montré que l'exposition chronique à l'alcool provoque non seulement une activation microgliale mais aussi une augmentation du nombre de macrophages périvasculaires (Drieu *et al.*, 2020). Ces cellules, situées elles aussi au sein de la BHE (entre les pieds astrocytaires et les cellules endothéliales cérébrales), participent aussi à la réponse inflammatoire et aux processus d'ouverture de barrière dans des conditions pathologiques (pour revue, voir Faraco *et al.*, 2017)

Les neurones ont aussi un rôle important dans les réponses immunitaires (Figure 20 ; Coleman & Crews, 2018). Ils ont en effet la capacité de réguler les réponses gliales et expriment des récepteurs aux cytokines sécrétées par la microglie et les astrocytes (Khairova *et al.*, 2009). Bien que les effets directs de l'alcool sur les neurones, en culture ou sur tranche, dépendent du type neuronal et de la région étudiée, il est clair que directement ou indirectement l'alcool interagit avec les neurones (Abrahao *et al.*, 2017). Ainsi, les neurones dopaminergiques de la région ventrale tegmentale semblent particulièrement sensibles à l'alcool chronique et au sevrage avec une activité augmentée ou diminuée suivant les études (Abrahao *et al.*, 2017).



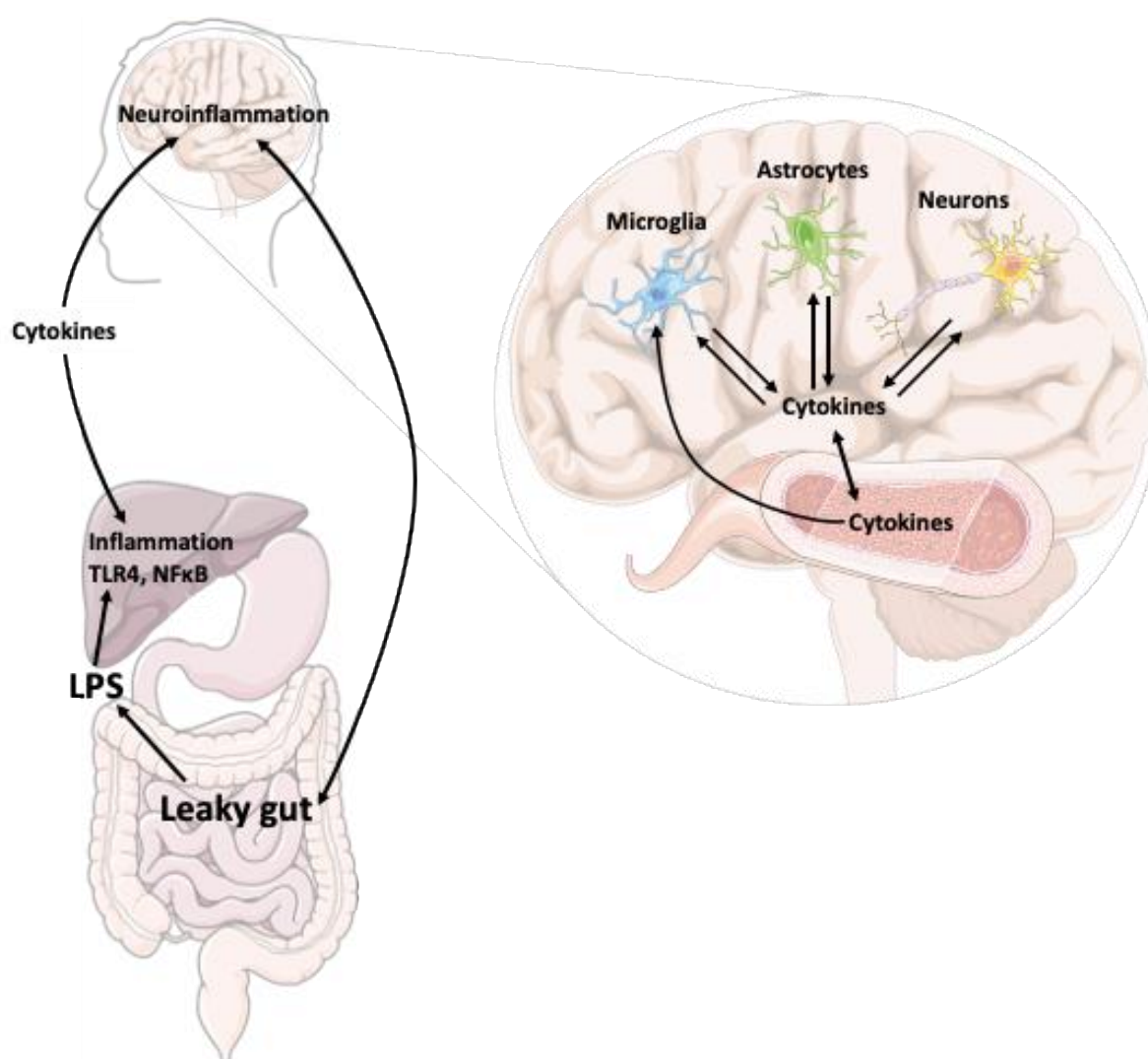
**Figure 39 : Interactions entre les neurones, microglie et astrocytes dans les réponses immunitaires à l'alcool.** Les interactions entre les neurones et les cellules gliales sous-tendent la signalisation immunitaire dans les TUAL. La microglie et les astrocytes libèrent des facteurs qui peuvent activer les deux types cellulaires et les neurones peuvent aussi libérer des facteurs pouvant moduler l'activation astrocytaire et microgliale. D'après Coleman et al 2018.

Chez les patients TUAL, le nombre de polynucléaire neutrophiles est augmenté dans la circulation sanguine et au niveau du foie en cas de pathologie hépatique associée (Gao et al., 2019) mais aucune étude n'a mis en évidence d'infiltration au niveau cérébral. Dans des modèles d'atteinte cérébrale secondaire, comme l'AVC, les réponses inflammatoires, dont l'activation endothéliale et l'infiltration des neutrophiles, associée à un terrain d'exposition à l'alcool est augmentée par rapport à l'absence d'exposition à l'alcool (Ducroquet, 2015; Drieu et al., 2020). La consommation chronique d'alcool provoque donc un état de priming inflammatoire cérébral, promouvant la réponse inflammatoire exacerbée en cas d'atteinte cérébrale secondaire.

## 5. L'axe intestin-foie-cerveau

Ces dernières années, de nombreuses études se sont intéressées au rôle de l'intestin dans l'axe périphérie-cerveau. Ainsi, l'augmentation des cytokines circulantes que nous avons

montrée dans nos deux études, chez les patients TUAL (**Étude 2**) et dans un modèle animal (**Étude 1**) pourrait venir, du moins en partie, de l'intestin. Il est important de souligner que les cellules gliales (microglie et astrocytes) peuvent être activées à la fois par les cytokines provenant du cerveau et de la circulation sanguine. L'éthanol a de plus la propriété d'induire la libération de LPS provenant de l'intestin dans le sang ([Mandrekar & Szabo, 2009](#)). Le LPS active alors les cellules de Kupffer et les cellules étoilées hépatiques *via* les TLR4, qui sécrètent des cytokines qui sont libérées dans la circulation sanguine (**Figure 40** ; [Leclercq et al., 2017](#)).



**Figure 40 : L'axe intestin-foie-cerveau, rôle de l'inflammation et du LPS.** La consommation d'alcool chronique peut causer une perméabilisation de la barrière intestinale (« leaky gut ») induisant une translocation du LPS dans la circulation et dans le foie. Le LPS peut alors causer une inflammation hépatique provoquant une libération des cytokines dans la circulation sanguine. Les cytokines peuvent atteindre le cerveau et interagir avec les cellules cérébrales dans des processus inflammatoires.

Les cytokines peuvent passer la barrière hémato-encéphalique par transport actif ou passif ou en cas d'altération de la barrière ([Rubio-Araiz et al., 2017](#)). Les mécanismes par lesquels

l'alcool induit une perméabilisation de la barrière intestinale et ainsi la translocation de LPS dans le foie ne sont pas encore totalement élucidés. Toutefois, la perméabilisation de la barrière intestinale a été observée après seulement deux semaines d'exposition à l'alcool, et la dysbiose intestinale après 8 à 10 semaines ([Leclercq et al., 2017](#)).

La transplantation du microbiote intestinal de patient TUAL avec une maladie hépatique associée dans des souris augmente la translocation bactérienne et induit une inflammation hépatique plus sévère que chez les souris ayant reçu du microbiote de patients sans maladie hépatique ([Llopis et al., 2016](#)). Dans les deux modèles animaux de TUAL nous avons montré une activation des cellules de Kupffer (**Étude 1 et 2**) et des cellules étoilées hépatiques (**Étude 2, en cours d'analyse pour l'étude 1**) compatible avec cette hypothèse ; nous avons aussi prévu de doser le LPS plasmatique dans l'étude 1 dans de futures analyses.

Ces résultats montrent une interaction importante dans l'axe intestin-foie et la nécessité de prendre en compte les organes de la périphérie dans les futures études portant sur le système nerveux central.

## 6. Un rôle du sevrage ou de la déshydratation dans les atteintes ?

Nous observons une augmentation du nombre de neutrophiles au niveau hépatique dans **l'étude 1** une semaine après l'arrêt de l'alcool. De plus, nous montrons une augmentation des cytokines pro inflammatoires circulantes, qui sont fortement impliquées dans le recrutement des neutrophiles. Dans l'étude de Bertola et collaborateurs ([Bertola et al., 2013](#)), l'augmentation de neutrophiles au niveau hépatique est retrouvée après l'association entre exposition chronique et épisode de binge par gavage. Cependant, le prélèvement des organes est effectué 9 heures après l'épisode de gavage, ce qui n'exclut pas un effet aigu du sevrage plutôt que de l'épisode de binge. Dans notre étude, nous n'avons pas observé de signes évidents de sevrage chez les souris lors de l'arrêt de l'exposition à l'alcool. L'étude par spectroscopie des métabolites hippocampiques pourra révéler si des changements cellulaires cérébraux typiques du sevrage ont tout de même lieu (augmentation du glutamate). Il est en effet possible que le cerveau des animaux subisse les effets neurotoxiques légers ou modérés d'un sevrage infraclinique lors du retrait de l'alcool.

Notre étude indique également que le sevrage cause une infiltration de neutrophiles toujours visible 7 jours après l'arrêt de la consommation d'alcool. Cette infiltration de

neutrophiles, caractéristique de l'hépatite chez le patient TUAL, indique une sensibilité particulière du foie au sevrage d'alcool. L'arrêt de l'alcool cause aussi une augmentation des cytokines circulantes visible dans notre modèle à partir de 6 mois d'exposition chronique et particulièrement après 12 mois d'exposition à l'alcool. Cette aggravation à 12 mois peut être liée à l'âge mais aussi à la répétition des arrêts des consommations, montrant une fois encore un effet délétère du sevrage sur le foie qui est le principal producteur de cytokines (Louvet & Mathurin, 2015).

Nous avons observé dans le protocole minocycline de **l'étude 1** que les souris exposées à l'alcool pendant 5 mois puis injectées pendant 17 jours avec du sérum physiologique ne présentaient pas de déficit de mémoire spatiale contrairement aux résultats du protocole comportemental (sans injection de sérum physiologique). De plus, dans le protocole comportemental, le groupe abstinence (**Étude 1**) augmente le volume de boisson consommée lors de la semaine de mise à disposition du biberon d'eau dès 1,5 mois d'exposition à l'alcool (données non présentées et en cours d'analyse pour les temps 9 et 12 mois d'exposition). Bien qu'il n'y ait pas d'autres signes de déshydratation (absence de différence de poids des souris à tous les temps d'exposition à l'alcool, ni des organes « frais » après 1,5 mois d'exposition à l'alcool), d'autres analyses à des temps plus tardifs seraient nécessaires.

## 7. Transposabilité des modèles

Dans la modélisation de l'exposition à l'alcool, la question clé porte sur la translation de la préclinique à la clinique. A quelle dose d'alcool consommé cela correspond-il chez l'homme ? Comment modéliser une pathologie psychiatrique ? Quels sont les signes de sevrage à l'alcool chez le rongeur ? Plusieurs études se sont penchées sur ces questions depuis les premiers travaux précliniques. En effet, certains facteurs pouvant moduler l'expression du TUAL ou ses conséquences sont impossibles à modéliser en préclinique comme les facteurs socio-économiques et psychoaffectifs.

Il existe des limites importantes aux modèles rongeurs dans les études sur l'alcool. La plupart des rongeurs ont une aversion naturelle pour l'alcool et ont tendance à ne consommer de l'alcool que pour les calories que celui-ci contient. De plus, le métabolisme de l'alcool des rongeurs est différent de celui de l'humain, environ 5 fois plus rapide (Holmes *et al.*, 1986). Ces caractéristiques peuvent expliquer la résistance des rongeurs aux effets de l'alcool malgré

des très longs temps d'exposition comparé à l'homme. Les différences entre les souches de rongeurs quant à leur consommation spontanée d'alcool, et la pharmacocinétique de l'alcool suivant la voie d'administration ont été étudiées dans de nombreuses études, ayant aboutie à des équivalences entre les doses en préclinique et en clinique (Nair & Jacob, 2016).

S'il n'est pas possible de représenter l'ensemble des critères du DSM-5 dans les modèles précliniques, des comportements d'addiction comme la consommation volontaire (observée ici dans l'**Étude 1**) et son besoin irrépressible ont été modélisés par exemple chez les sP rats (**Étude 2**; Colombo *et al.*, 2006). Certains troubles cognitifs (attention, apprentissage, mémoire) ainsi que moteurs (coordination, ataxie, équilibre) liés à l'exposition prolongée et excessive d'alcool sont retrouvés dans les modèles rongeurs (Crabbe *et al.*, 2010) et ont été observés dans notre modèle chez la souris (**Étude 1**). Après l'arrêt d'une exposition à l'alcool ayant duré plusieurs jours/semaines/mois, il a été montré une augmentation de la consommation de l'alcool par rapport à avant l'arrêt des consommations dans des modèles de rechute (Vengeliene *et al.*, 2014). Cet effet de privation de l'alcool n'a pas été observé dans notre modèle (**Étude 1**) même après des épisodes répétés d'abstinence.

Dans nos deux modèles, les rats et les souris consomment la même dose d'alcool soit environ 8-13 g/kg d'éthanol par jour. Cela correspondrait à environ une dizaine d'unités d'alcool par jour chez l'homme (Colombo *et al.*, 2006 ; Nair & Jacob, 2016). Cette consommation, bien que largement en dessous de celle des patients TUAL de l'**étude 2** (en moyenne 19 unités d'alcool par jour), est aussi bien au-dessus des recommandations de santé publique (pas plus de 2 unités d'alcool par jour et pas tous les jours).

## 8. Conclusion générale

Les troubles de l'usage de l'alcool sont associés à de nombreuses pathologies causées directement ou indirectement par la molécule d'alcool. Les comorbidités souvent présentes chez les patients TUAL rendent difficile dans les études cliniques l'interprétation des effets directs de l'alcool. Les modèles animaux sont indispensables pour mieux comprendre la physiopathologie du TUAL dans une perspective multi-échelle et systémique et intégrée. En effet, la consommation chronique d'alcool entraîne des atteintes aux niveaux central et

périphérique, impactant de nombreux organes du corps humain. L'objectif de cette thèse était d'étudier l'axe foie-cerveau de manière translationnelle dans les TUAL.

Dans ce travail, nous avons montré que :

- i) Dans un modèle murin sans préférence spontanée pour l'alcool, l'exposition chronique d'alcool entraîne des atteintes cognitives et motrices sans anomalie détectable en IRM. Les expériences répétées d'arrêt de l'alcool entraînent une inflammation périphérique particulièrement importante.
- ii) L'inhibition de l'activation microgliale ne prévient pas les déficits cognitifs causés par la consommation chronique d'alcool, mais favorise l'arrêt de la consommation volontaire d'alcool.
- iii) Chez les patients TUAL, la fibrose hépatique est associée à une diminution du volume cérébral et l'inflammation systémique est liée à la fibrose et au volume cérébral, indiquant un potentiel lien inflammatoire entre le fonctionnement hépatique et cérébrale.
- iv) Dans un modèle expérimental de rats avec une préférence génétique pour l'alcool (modèle validé de TUAL), les atteintes cérébrales et hépatiques étaient aussi associées à une réponse inflammatoire locale dans ces deux organes.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES





- Abadi MFD, Mehrabian S, Asghari B, Namvar AE, Ezzatifar F & Lari AR (2013). Silver nanoparticles as active ingredient used for alcohol-free mouthwash. *GMS Hyg Infect Control* **8**, Doc05.
- Abrahao KP, Salinas AG & Lovinger DM (2017). Alcohol and the Brain: Neuronal Molecular Targets, Synapses, and Circuits. *Neuron* **96**, 1223–1238.
- Achur RN, Freeman WM & Vrana KE (2010). Circulating cytokines as biomarkers of alcohol abuse and alcoholism. *J Neuroimmune Pharmacol* **5**, 83–91.
- Addolorato G, Mirijello A, Barrio P & Gual A (2016). Treatment of alcohol use disorders in patients with alcoholic liver disease. *J Hepatol* **65**, 618–630.
- Aggleton JP, Pralus A, Nelson AJD & Hornberger M (2016). Thalamic pathology and memory loss in early Alzheimer's disease: Moving the focus from the medial temporal lobe to Papez circuit. *Brain* **139**, 1877–1890.
- Agrawal RG, Hewetson A, George CM, Syapin PJ & Bergeson SE (2011). Minocycline reduces ethanol drinking. *Brain Behav Immun*; DOI: 10.1016/j.bbi.2011.03.002.
- Alfonso-Loeches S, Pascual-Lucas M, Blanco AM, Sanchez-Vera I & Guerri C (2010). Pivotal role of TLR4 receptors in alcohol-induced neuroinflammation and brain damage. *J Neurosci* **30**, 8285–8295.
- Alfonso-Loeches S, Pascual M, Gómez-Pinedo U, Pascual-Lucas M, Renau-Piqueras J & Guerri C (2012). Toll-like receptor 4 participates in the myelin disruptions associated with chronic alcohol abuse. *Glia* **60**, 948–964.
- Alfonso-Loeches S, Pascual M & Guerri C (2013). Gender differences in alcohol-induced neurotoxicity and brain damage. *Toxicology* **311**, 27–34.
- Alfonso-Loeches S, Ureña-Peralta J, Morillo-Bargues MJ, Gómez-Pinedo U & Guerri C (2016). Ethanol-induced TLR4/NLRP3 neuroinflammatory response in microglial cells promotes leukocyte infiltration across the BBB. *Neurochem Res* **41**, 193–209.
- American Psychiatric Association (2013). American Psychiatric Association explains DSM-5. *BMJ*; DOI: <https://doi.org/10.1176/appi.books.9780890425596.744053>.
- Andersen JK (2004). Oxidative stress in neurodegeneration: Cause or consequence? *Nat Rev Neurosci* **10**, S18.

- Andler R, Richard J-B, Palle C, Spilka S, Quatremère G & Nguyen-Thanh V (2019). [Alcohol consumption in France in 2017]. *Rev Prat* **69**, 886–891.
- Azhari H & Swain MG (2018). Role of Peripheral Inflammation in Hepatic Encephalopathy. *J Clin Exp Hepatol* **8**, 281–285.
- Baddeley AD & Hitch G (1974). Working memory. *Psychol Learn Motiv - Adv Res Theory* **8**, 47–89.
- Bale A, Pai CG, Shetty S, Balaraju G & Shetty A (2018). Prevalence of and Factors Associated With Minimal Hepatic Encephalopathy in Patients With Cirrhosis of Liver. *J Clin Exp Hepatol* **8**, 156–161.
- Barnes GM, Welte JW, Tidwell MCO & Hoffman JH (2013). Effects of neighborhood disadvantage on problem gambling and alcohol abuse. *J Behav Addict* **2**, 82–89.
- Bartsch AJ, Rgy Homola G, Biller A, Smith SM, Weijers H-G, Wiesbeck GA, Jenkinson M, De Stefano N, Solymosi L & Bendszus M (2007). Manifestations of early brain recovery associated with abstinence from alcoholism. *Brain* **130**, 36–47.
- Bell RL, Hauser SR, McClintick J, Rahman S, Edenberg HJ, Szumlinski KK & McBride WJ (2016). Ethanol-Associated Changes in Glutamate Reward Neurocircuitry: A Minireview of Clinical and Preclinical Genetic Findings. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, pp. 41–85. Elsevier B.V.
- Le Berre AP, Rauchs G, La Joie R, Mézenge F, Boudehent C, Vabret F, Segobin S, Viader F, Allain P, Eustache F, Pitel AL & Beaunieux H (2014). Impaired decision-making and brain shrinkage in alcoholism. *Eur Psychiatry* **29**, 125–133.
- Bertola A, Park O & Gao B (2013). Chronic plus binge ethanol feeding synergistically induces neutrophil infiltration and liver injury in mice: A critical role for E-selectin. *Hepatology* **58**, 1814–1823.
- Birrell JM & Brown VJ (2000). Medial frontal cortex mediates perceptual attentional set shifting in the rat. *J Neurosci* **20**, 4320–4324.
- Biswal B, Zerrin Yetkin F, Haughton VM & Hyde JS (1995). Functional connectivity in the motor cortex of resting human brain using echo-planar mri. *Magn Reson Med* **34**, 537–541.
- Blanc JF, Bioulac-Sage P & Rosenbaum J (1997). [Stellate cells of the liver and hepatic

fibrogenesis]. *Gastroenterol Clin Biol* **21**, 869–879.

Bluthé RM, Michaud B, Kelley KW & Dantzer R (1996). Vagotomy blocks behavioural effects of interleukin-1 injected via the intraperitoneal route but not via other systemic routes. *Neuroreport* **7**, 2823–2827.

De Bruin EA, Lemmens PHHM, Hulshoff Pol HE, Verbaten MN & Kenemans JL (2012). Relationship between carbohydrate-deficient transferrin, gamma-glutamyl transferase, and mean corpuscular volume levels and alcohol-related brain volume decreases in male drinkers. *Hum Psychopharmacol* **27**, 559–565.

Budni J, Garcez ML, Mina F, Bellettini-Santos T, Schiavo GL, Andrighetti MS, Scheid MG, Batista da Silva H, Pereira da Luz A, de Mattos Trevisol Y & Quevedo J (2016). P4-019: Minocycline Improves Memory and Reduces the Neuroinflammation of Mice Subject to Amyloid b (1-42) Peptide Administration. *Alzheimer's Dement* **12**, P1022–P1022.

Calès P, Veillon P, Konaté A, Mathieu E, Ternisien C, Chevailler A, Godon A, Gallois Y, Joubaud F, Hubert-Fouchard I, Oberti F, Réaud S, Hunault G, Mauriat F & Lunel-Fabiani F (2008). Reproducibility of blood tests of liver fibrosis in clinical practice. *Clin Biochem* **41**, 10–18.

Calvente CJ, Tameda M, Johnson CD, Del Pilar H, Lin YC, Adronikou N, De Mollerat Du Jeu X, Llorente C, Boyer J & Feldstein AE (2019). Neutrophils contribute to spontaneous resolution of liver inflammation and fibrosis via microRNA-223. *J Clin Invest* **129**, 4091–4109.

Campbell JM & Oei TP (2010). A cognitive model for the intergenerational transference of alcohol use behavior. *Addict Behav* **35**, 73–83.

Chanraud S, Martelli C, Delain F, Kostogianni N, Douaud G, Aubin HJ, Reynaud M & Martinot JL (2007). Brain morphometry and cognitive performance in detoxified alcohol-dependents with preserved psychosocial functioning. *Neuropsychopharmacology* **32**, 429–438.

Chanraud S, Reynaud M, Wessa M, Penttilä J, Kostogianni N, Cachia A, Artiges E, Delain F, Perrin M, Aubin HJ, Cointepas Y, Martelli C & Martinot JL (2009). Diffusion tensor tractography in mesencephalic bundles: Relation to mental flexibility in detoxified alcohol-dependent subjects. *Neuropsychopharmacology* **34**, 1223–1232.

Charlton AJ, May C, Luikinga SJ, Burrows EL, Hyun Kim J, Lawrence AJ & Perry CJ (2019). Chronic voluntary alcohol consumption causes persistent cognitive deficits and cortical cell loss in a rodent model. *Sci Rep*; DOI: 10.1038/s41598-019-55095-w.

- Chen CH, Walker J, Momenan R, Rawlings R, Heilig M & Hommer DW (2012). Relationship Between Liver Function and Brain Shrinkage in Patients with Alcohol Dependence. *Alcohol Clin Exp Res* **36**, 625–632.
- Chen XR, Zeng JY, Shen ZW, Kong LM & Zheng W Bin (2017). Diffusion Kurtosis Imaging Detects Microstructural Changes in the Brain after Acute Alcohol Intoxication in Rats. *Biomed Res Int*; DOI: 10.1155/2017/4757025.
- Choi Y, Kim HS, Shin KY, Kim EM, Kim M, Kim HS, Park CH, Jeong YH, Yoo J, Lee JP, Chang KA, Kim S & Suh YH (2007). Minocycline attenuates neuronal cell death and improves cognitive impairment in Alzheimer's disease models. *Neuropsychopharmacology* **32**, 2393–2404.
- Clapp P, Bhav S V & Hoffman PL (2008). How adaptation of the brain to alcohol leads to dependence: a pharmacological perspective. *Alcohol Res Health* **31**, 310–339.
- Coleman LG & Crews FT (2018). Innate Immune Signaling and Alcohol Use Disorders. In *Handbook of Experimental Pharmacology*, pp. 369–396. Springer New York LLC.
- Colombo G, Lobina C, Carai MAM & Gessa GL (2006). Phenotypic characterization of genetically selected Sardinian alcohol-preferring (sP) and -non-preferring (sNP) rats. *Addict Biol* **11**, 324–338.
- Connor JP, Haber PS & Hall WD (2016). Alcohol use disorders. *Lancet* **387**, 988–998.
- Crabbe JC, Bell RL & Ehlers CL (2010). Human and laboratory rodent low response to alcohol: is better consilience possible? *Addict Biol* **15**, 125–144.
- Crews FT (2008). Alcohol-related neurodegeneration and recovery: mechanisms from animal models. *Alcohol Res Health* **31**, 377–388.
- Crews FT & Nixon K (2009). Mechanisms of neurodegeneration and regeneration in alcoholism. *Alcohol Alcohol* **44**, 115–127.
- Crews FT & Vetreno RP (2016). Mechanisms of neuroimmune gene induction in alcoholism. *Psychopharmacology (Berl)* **233**, 1543–1557. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25787746> [Accessed May 14, 2020].
- Cruz C, Meireles M & Silva SM (2017). Chronic ethanol intake induces partial microglial activation that is not reversed by long-term ethanol withdrawal in the rat hippocampal formation. *Neurotoxicology* **60**, 107–115.

- D'Mello C, Almishri W, Liu H & Swain MG (2017). Interactions Between Platelets and Inflammatory Monocytes Affect Sickness Behavior in Mice With Liver Inflammation. *Gastroenterology* **153**, 1416-1428.e2.
- D'Mello C, Le T & Swain MG (2009). Cerebral microglia recruit monocytes into the brain in response to tumor necrosis factor signaling during peripheral organ inflammation. *J Neurosci* **29**, 2089–2102.
- D'Mello C & Swain MG (2011). Liver-brain inflammation axis. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol*; DOI: 10.1152/ajpgi.00184.2011.
- D'Mello C & Swain MG (2014). Liver-brain interactions in inflammatory liver diseases: Implications for fatigue and mood disorders. *Brain Behav Immun* **35**, 9–20.
- Das SK, Hiran KR, Mukherjee S & Vasudevan DM (2007). Oxidative stress is the primary event: Effects of ethanol consumption in brain. *Indian J Clin Biochem* **22**, 99–104.
- Dean OM, Data-Franco J, Giorlando F & Berk M (2012). Minocycline: Therapeutic potential in psychiatry. *CNS Drugs* **26**, 391–401.
- Deshmane SL, Kremlev S, Amini S & Sawaya BE (2009). Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): An overview. *J Interf Cytokine Res* **29**, 313–325.
- Dixon LJ, Flask CA, Papouchado BG, Feldstein AE & Nagy LE (2013). Caspase-1 as a Central Regulator of High Fat Diet-Induced Non-Alcoholic Steatohepatitis. *PLoS One*; DOI: 10.1371/journal.pone.0056100.
- Domi A, Stopponi S, Domi E, Ciccocioppo R & Cannella N (2019). Sub-dimensions of alcohol use disorder in alcohol preferring and non-preferring rats, a comparative study. *Front Behav Neurosci*; DOI: 10.3389/fnbeh.2019.00003.
- Donzis EJ & Tronson NC (2014). Modulation of learning and memory by cytokines: Signaling mechanisms and long term consequences. ; DOI: 10.1016/j.nlm.2014.08.008.
- Drieu A, Lanquetin A, Levard D, Glavan M, Campos F, Quenault A, Lemarchand E, Naveau M, Pitel AL, Castillo J, Vivien D & Rubio M (2020). Alcohol exposure-induced neurovascular inflammatory priming impacts ischemic stroke and is linked with brain perivascular macrophages. *JCI Insight*; DOI: 10.1172/jci.insight.129226.
- Ducroquet A (2015). Impact de la consommation chronique d'éthanol sur l'ischémie

cérébrale : aspect clinique et aspect expérimental chez le rat. <http://www.theses.fr>.

Ducroquet A, Leys D, Saabi A Al, Richard F, Cordonnier C, Girot M, Deplanque D, Casolla B, Allorge D & Bordet R (2013). Influence of chronic ethanol consumption on the neurological severity in patients with acute cerebral ischemia. *Stroke* **44**, 2324–2326.

Durazzo TC & Meyerhoff DJ (2019). Changes of frontal cortical subregion volumes in alcohol dependent individuals during early abstinence: associations with treatment outcome. *Brain Imaging Behav*; DOI: 10.1007/s11682-019-00089-5.

Ehrlich RI, Woolf DCS & Kibel DA (2012). Disulfiram reaction in an artist exposed to solvents. *Occup Med (Chic Ill)* **62**, 64–66.

Ek M, Kurosawa M, Lundeborg T & Ericsson A (1998). Activation of vagal afferents after intravenous injection of interleukin-1 $\beta$ : Role of endogenous prostaglandins. *J Neurosci* **18**, 9471–9479.

Erickson EK, Blednov YA, Harris RA & Mayfield RD (2019). Glial gene networks associated with alcohol dependence. *Sci Rep*; DOI: 10.1038/s41598-019-47454-4.

Faraco G, Park L, Anrather J & Iadecola C (2017). Brain perivascular macrophages: characterization and functional roles in health and disease. *J Mol Med* **95**, 1143–1152.

Fernandez-Lizarbe S, Montesinos J & Guerri C (2013). Ethanol induces TLR4/TLR2 association, triggering an inflammatory response in microglial cells. *J Neurochem* **126**, 261–273.

Fernández MS, Fabio MC, Miranda-Morales RS, Virgolini MB, De Giovanni LN, Hansen C, Wille-Bille A, Nizhnikov ME, Spear LP & Pautassi RM (2016). Age-related effects of chronic restraint stress on ethanol drinking, ethanol-induced sedation, and on basal and stress-induced anxiety response. *Alcohol* **51**, 89–100.

Frischknecht U, Hermann D, Tunc-Skarka N, Wang GY, Sack M, van Eijk J, Demirakca T, Falfan-Melgoza C, Krumm B, Dieter S, Spanagel R, Kiefer F, Mann KF, Sommer WH, Ende G & Weber-Fahr W (2017). Negative Association Between MR-Spectroscopic Glutamate Markers and Gray Matter Volume After Alcohol Withdrawal in the Hippocampus: A Translational Study in Humans and Rats. *Alcohol Clin Exp Res* **41**, 323–333.

Fritz BM & Boehm SL (2016). Rodent models and mechanisms of voluntary binge-like ethanol consumption: Examples, opportunities, and strategies for preclinical research. *Prog Neuro-*

*Psychopharmacology Biol Psychiatry* **65**, 297–308.

Fritz M, Klawonn AM & Zahr NM (2019). Neuroimaging in alcohol use disorder: From mouse to man. *J Neurosci Res*; DOI: 10.1002/jnr.24423.

Gao B, Ahmad MF, Nagy LE & Tsukamoto H (2019). Inflammatory pathways in alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* **70**, 249–259.

Garcez ML, Mina F, Bellettini-Santos T, Carneiro FG, Luz AP, Schiavo GL, Andrighetti MS, Scheid MG, Bolfe RP & Budni J (2017). Minocycline reduces inflammatory parameters in the brain structures and serum and reverses memory impairment caused by the administration of amyloid  $\beta$  (1-42) in mice. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry* **77**, 23–31.

Garrido-Mesa N, Zarzuelo A & Gálvez J (2013). Minocycline: Far beyond an antibiotic. *Br J Pharmacol* **169**, 337–352.

Godefroy O (2003). Frontal syndrome and disorders of executive functions. *J Neurol* **250**, 1–6.

Grant BF, Goldstein RB, Saha TD, Patricia Chou S, Jung J, Zhang H, Pickering RP, June Ruan W, Smith SM, Huang B & Hasin DS (2015). Epidemiology of DSM-5 alcohol use disorder results from the national epidemiologic survey on alcohol and related conditions III. *JAMA Psychiatry* **72**, 757–766.

Griswold MG et al. (2018). Alcohol use and burden for 195 countries and territories, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet* **392**, 1015–1035.

Hansen AW, Almeida FB, Bandiera S, Pulcinelli RR, Fragoso ALR, Schneider R, Barros HMT & Gomez R (2017). Taurine restores the exploratory behavior following alcohol withdrawal and decreases BDNF mRNA expression in the frontal cortex of chronic alcohol-treated rats. *Pharmacol Biochem Behav* **161**, 6–12.

Harris RA, Trudell JR & Mihic SJ (2008). Ethanol's molecular targets. *Sci Signal*; DOI: 10.1126/scisignal.128re7.

He J & Crews FT (2008). Increased MCP-1 and microglia in various regions of the human alcoholic brain. *Exp Neurol* **210**, 349–358.

Hendricks JD, Meyers TR, Shelton DW, Casteel JL & Bailey GS (1985). Hepatocarcinogenicity of benzo[a]pyrene to rainbow trout by dietary exposure and intraperitoneal injection. *J Natl*



*Cancer Inst* **74**, 839–851.

Henriques JF, Portugal CC, Canedo T, Relvas JB, Summavielle T & Socodato R (2018). Microglia and alcohol meet at the crossroads: Microglia as critical modulators of alcohol neurotoxicity. *Toxicol Lett* **283**, 21–31.

Henry CJ, Huang Y, Wynne A, Hanke M, Himler J, Bailey MT, Sheridan JF & Godbout JP (2008). Minocycline attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced neuroinflammation, sickness behavior, and anhedonia. *J Neuroinflammation* **5**, 15.

Hernández-Gea V, Hilscher M, Rozenfeld R, Lim MP, Nieto N, Werner S, Devi LA & Friedman SL (2013). Endoplasmic reticulum stress induces fibrogenic activity in hepatic stellate cells through autophagy. *J Hepatol* **59**, 98–104.

Holmes RS, Duley JA, Algar EM, Mather PB & Rout UK (1986). Biochemical and genetic studies on enzymes of alcohol metabolism: the mouse as a model organism for human studies. *Alcohol Alcohol* **21**, 41–56.

Ibáñez F, Montesinos J, Ureña-Peralta JR, Guerri C & Pascual M (2019). TLR4 participates in the transmission of ethanol-induced neuroinflammation via astrocyte-derived extracellular vesicles. *J Neuroinflammation*; DOI: 10.1186/s12974-019-1529-x.

Ihara H, Berrios GE & London M (2000). Group and case study of the dysexecutive syndrome in alcoholism without amnesia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **68**, 731–737.

Imrie D & Sadler KC (2012). Stress management: How the unfolded protein response impacts fatty liver disease. *J Hepatol* **57**, 1147–1151.

Ishibashi H, Nakamura M, Komori A, Migita K & Shimoda S (2009). Liver architecture, cell function, and disease. *Semin Immunopathol* **31**, 399–409.

Jaeschke H (2002). Neutrophil-mediated tissue injury in alcoholic hepatitis. In *Alcohol*, pp. 23–27.

Jang GR & Harris RZ (2007). Drug interactions involving ethanol and alcoholic beverages. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **3**, 719–731.

Javier Miguel-Hidalgo J (2006). WITHDRAWAL FROM FREE-CHOICE ETHANOL CONSUMPTION RESULTS IN INCREASED PACKING DENSITY OF GLUTAMINE SYNTHETASE-IMMUNOREACTIVE ASTROCYTES IN THE PRELIMBIC CORTEX OF ALCOHOL-PREFERRING RATS. ; DOI:

10.1093/alcalc/agl006.

Jeanblanc J, Rolland B, Gierski F, Martinetti MP & Naassila M (2019). Animal models of binge drinking, current challenges to improve face validity. *Neurosci Biobehav Rev* **106**, 112–121.

John U, Rumpf HJ, Bischof G, Hapke U, Hanke M & Meyer C (2013). Excess Mortality of Alcohol-Dependent Individuals After 14 Years and Mortality Predictors Based on Treatment Participation and Severity of Alcohol Dependence. *Alcohol Clin Exp Res* **37**, 156–163.

Junghanns K (2004). MILDLY DISTURBED HEPATIC AND PANCREATIC FUNCTION DURING EARLY ABSTENTION FROM ALCOHOL IS ASSOCIATED WITH BRAIN ATROPHY AND WITH DISTURBED PSYCHOMETRIC PERFORMANCE. *Alcohol Alcohol* **39**, 113–118.

Kadlecová P, Andel R, Mikulík R, Handing EP & Pedersen NL (2015). Alcohol consumption at midlife and risk of stroke during 43 years of follow-up cohort and twin analyses. *Stroke* **46**, 627–633.

Kamimura S & Tsukamoto H (1995). Cytokine gene expression by kupffer 4cells in experimental alcoholic liver disease. *Hepatology* **22**, 1304–1309.

Kang L, Sebastian BM, Pritchard MT, Pratt BT, Previs SF & Nagy LE (2007). Chronic ethanol-induced insulin resistance is associated with macrophage infiltration into adipose tissue and altered expression of adipocytokines. *Alcohol Clin Exp Res* **31**, 1581–1588.

Karakucuk I, Dilly SA & Maxwell JD (1989). Portal tract macrophages are increased in alcoholic liver disease. *Histopathology* **14**, 245–253.

Kelly RM & Strick PL (2003). Cerebellar loops with motor cortex and prefrontal cortex of a nonhuman primate. *J Neurosci* **23**, 8432–8444.

Khairova RA, MacHado-Vieira R, Du J & Manji HK (2009). A potential role for pro-inflammatory cytokines in regulating synaptic plasticity in major depressive disorder. *Int J Neuropsychopharmacol* **12**, 561–578.

Kliethermes CL (2005). Anxiety-like behaviors following chronic ethanol exposure. *Neurosci Biobehav Rev* **28**, 837–850.

Kong LM, Zheng WB, Lian GP & Zhang HD (2012). Acute effects of alcohol on the human brain: Diffusion tensor imaging study. *Am J Neuroradiol* **33**, 928–934.

Koob GF & Volkow ND (2016). Neurobiology of addiction: a neurocircuitry analysis. *The Lancet*

*Psychiatry* **3**, 760–773.

Koyama Y & Brenner DA (2017). Liver inflammation and fibrosis. *J Clin Invest* **127**, 55–64.

Kril JJ & Harper CG (2012). Neuroanatomy and neuropathology associated with Korsakoff's syndrome. *Neuropsychol Rev* **22**, 72–80.

De La Monte SM, Longato L, Tong M, Denucci S & Wands JR (2009). The liver-brain axis of alcohol-mediated neurodegeneration: Role of toxic lipids. *Int J Environ Res Public Health* **6**, 2055–2075.

de la Monte SM & Wands JR (2010). Role of central nervous system insulin resistance in fetal alcohol spectrum disorders. *J Popul Ther Clin Pharmacol*.

Lainiola M & Linden AM (2017). Alcohol intake in two different mouse drinking models after recovery from the lipopolysaccharide-induced sickness reaction. *Alcohol* **65**, 1–10.

Leclercq S, Matamoros S, Cani PD, Neyrinck AM, Jamar F, Stärkel P, Windey K, Tremaroli V, Bäckhed F, Verbeke K, De Timary P & Delzenne NM (2014). Intestinal permeability, gut-bacterial dysbiosis, and behavioral markers of alcohol-dependence severity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, E4485–E4493.

Leclercq S, De Timary P, Delzenne NM & Stärkel P (2017). The link between inflammation, bugs, the intestine and the brain in alcohol dependence. *Transl Psychiatry*; DOI: 10.1038/tp.2017.15.

Lemarchand E, Gauberti M, Martinez De Lizarrondo S, Villain H, Repessé Y, Montagne A, Vivien D, Ali C & Rubio M (2015). Impact of Alcohol Consumption on the Outcome of Ischemic Stroke and Thrombolysis: Role of the Hepatic Clearance of Tissue-Type Plasminogen Activator. *Stroke* **46**, 1641–1650.

Lin HZ, Yang SQ, Zeldin G & Diehl AM (1998). Chronic Ethanol Consumption Induces the Production of Tumor Necrosis Factor-alpha and Related Cytokines in Liver and Adipose Tissue. *Alcohol Clin Exp Res* **22**, 231.

Lippai D, Bala S, Petrasek J, Csak T, Levin I, Kurt-Jones EA & Szabo G (2013). Alcohol-induced IL-1 $\beta$  in the brain is mediated by NLRP3/ASC inflammasome activation that amplifies neuroinflammation. *J Leukoc Biol* **94**, 171–182.

Llopis M et al. (2016). Intestinal microbiota contributes to individual susceptibility to alcoholic

liver disease. *Gut* **65**, 830–839.

Louvet A & Mathurin P (2015). Alcoholic liver disease: Mechanisms of injury and targeted treatment. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **12**, 231–242.

Lukoyanov N V., Pereira PA, Paula-Barbosa MM & Cadete-Leite A (2003). Nerve growth factor improves spatial learning and restores hippocampal cholinergic fibers in rats withdrawn from chronic treatment with ethanol. *Exp Brain Res* **148**, 88–94.

Luo J, Shen Z, Chen G, Wang D & Yu X (2017). Pontine Changes in Metabolites and Axonal Fibres of Rats Following Four-week Alcohol Exposure: In Vivo Diffusion Tensor Imaging and 1h-magnetic Resonance Spectroscopy Study at 7.0 T. *Alcohol Alcohol* **52**, 145–150.

Mackey S et al. (2019). Mega-analysis of gray matter volume in substance dependence: General and substance-specific regional effects. *Am J Psychiatry* **176**, 119–128.

Madeira MD & Paula-Barbosa MM (1999). Effects of alcohol on the synthesis and expression of hypothalamic peptides. *Brain Res Bull* **48**, 3–22.

Mandrekar P & Szabo G (2009). Signalling pathways in alcohol-induced liver inflammation. *J Hepatol* **50**, 1258–1266.

Marshall SA, McClain JA, Kelso ML, Hopkins DM, Pauly JR & Nixon K (2013). Microglial activation is not equivalent to neuroinflammation in alcohol-induced neurodegeneration: The importance of microglia phenotype. *Neurobiol Dis* **54**, 239–251.

Mathurin P, Deng QG, Keshavarzian A, Choudhary S, Holmes EW & Tsukamoto H (2000). Exacerbation of alcoholic liver injury by enteral endotoxin in rats. *Hepatology* **32**, 1008–1017.

Maurage P, de Timary P, Billieux J, Collignon M & Heeren A (2014). Attentional alterations in alcohol dependence are underpinned by specific executive control deficits. *Alcohol Clin Exp Res* **38**, 2105–2112.

McKenna BS et al. (2016). Microstructural changes to the brain of mice after methamphetamine exposure as identified with diffusion tensor imaging. *Psychiatry Res - Neuroimaging* **249**, 27–37.

Mechtcheriakov S, Brenneis C, Egger K, Koppelstaetter F, Schocke M & Marksteiner J (2007). A widespread distinct pattern of cerebral atrophy in patients with alcohol addiction revealed by voxel-based morphometry. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **78**, 610–614.

- Mews P, Egervari G, Nativio R, Sidoli S, Donahue G, Lombroso SI, Alexander DC, Riesche SL, Heller EA, Nestler EJ, Garcia BA & Berger SL (2019). Alcohol metabolism contributes to brain histone acetylation. *Nature* **574**, 717–721.
- Miguel-Hidalgo JJ (2018). Molecular neuropathology of astrocytes and oligodendrocytes in alcohol use disorders. *Front Mol Neurosci*; DOI: 10.3389/fnmol.2018.00078.
- Mitra NK & Nagaraja HS (2008). Effect of chronic ethanol exposure on the count of cerebellar Purkinje cells and motor coordination in adult mice. *Eur J Anat* **12**, 67–71.
- Moffett JR, Ross B, Arun P, Madhavarao CN & Namboodiri AMA (2007). N-Acetylaspartate in the CNS: From neurodiagnostics to neurobiology. *Prog Neurobiol* **81**, 89–131.
- Mutlu EA, Gillevet PM, Rangwala H, Sikaroodi M, Naqvi A, Engen PA, Kwasny M, Lau CK & Keshavarzian A (2012). Colonic microbiome is altered in alcoholism. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol*; DOI: 10.1152/ajpgi.00380.2011.
- Nadeau S & Rivest S (1999). Regulation of the gene encoding tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) in the rat brain and pituitary in response to different models of systemic immune challenge. *J Neuropathol Exp Neurol* **58**, 61–77.
- Nair A & Jacob S (2016). A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *J Basic Clin Pharm* **7**, 27.
- Noel JG & Thomson NR (2012). Children's alcohol cognitions prior to drinking onset: Discrepant patterns from implicit and explicit measures. *Psychol Addict Behav* **26**, 451–459.
- Noël X, Van Der Linden M, Schmidt N, Sferrazza R, Hanak C, Le Bon O, De Mol J, Kornreich C, Pelc I & Verbanck P (2001). Supervisory attentional system in nonamnesic alcoholic men. *Arch Gen Psychiatry* **58**, 1152–1158.
- Nowakowska-Domagala K, Jabłkowska-Górecka K, Mokros Ł, Koprowicz J & Pietras T (2017). Differences in the verbal fluency, working memory and executive functions in alcoholics: Short-term vs. long-term abstainers. *Psychiatry Res* **249**, 1–8.
- Nunes PT, Kipp BT, Reitz NL & Savage LM (2019). Aging with alcohol-related brain damage: Critical brain circuits associated with cognitive dysfunction. In *International Review of Neurobiology*, pp. 101–168. Academic Press Inc. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31733663> [Accessed May 13, 2020].

- Oak S, Mandrekar P, Catalano D, Kodys K & Szabo G (2006). TLR2- and TLR4-Mediated Signals Determine Attenuation or Augmentation of Inflammation by Acute Alcohol in Monocytes. *J Immunol* **176**, 7628–7635.
- Obiang P, Macrez R, Jullienne A, Bertrand T, Lesept F, Ali C, Maubert E, Vivien D & Agin V (2012). GluN2D subunit-containing NMDA receptors control tissue plasminogen activator-mediated spatial memory. *J Neurosci* **32**, 12726–12734.
- Olsen RW, Liang J, Cagetti E & Spigelman I (2005). Plasticity of GABAA receptors in brains of rats treated with chronic intermittent ethanol. *Neurochem Res* **30**, 1579–1588.
- Oscar-Berman M & Marinković K (2007). Alcohol: Effects on neurobehavioral functions and the brain. *Neuropsychol Rev* **17**, 239–257.
- Oscar-Berman M, Valmas MM, Sawyer KS, Ruiz SM, Luhar RB & Gravitz ZR (2014). Profiles of impaired, spared, and recovered neuropsychologic processes in alcoholism. In *Handbook of Clinical Neurology*, pp. 183–210. Elsevier B.V.
- de Paiva VN, Lima SNP, Fernandes MM, Soncini R, Andrade CAF & Giusti-Paiva A (2010). Prostaglandins mediate depressive-like behaviour induced by endotoxin in mice. *Behav Brain Res* **215**, 146–151.
- Pascual M, Do Couto BR, Alfonso-Loeches S, Aguilar MA, Rodriguez-Arias M & Guerri C (2012). Changes in histone acetylation in the prefrontal cortex of ethanol-exposed adolescent rats are associated with ethanol-induced place conditioning. *Neuropharmacology* **62**, 2309–2319.
- Paxinos G & Franklin KBJ (2001). *Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*.
- Petit G, Luminet O, Cordovil de Sousa Uva M, Monhonval P, Leclercq S, Spilliaert Q, Zammit F, Maurage P & de Timary P (2017). Gender Differences in Affects and Craving in Alcohol-Dependence: A Study During Alcohol Detoxification. *Alcohol Clin Exp Res* **41**, 421–431.
- Petrakis IL, Ralevski E, Gueorguieva R, Sloan ME, Devine L, Yoon G, Arias AJ & Sofuoglu M (2019). Targeting neuroinflammation with minocycline in heavy drinkers. *Psychopharmacology (Berl)* **236**, 3013–3021.
- Petrasek J, Iracheta-Vellve A, Csak T, Satishchandran A, Kodys K, Kurt-Jones EA, Fitzgerald KA & Szabo G (2013). STING-IRF3 pathway links endoplasmic reticulum stress with hepatocyte

- apoptosis in early alcoholic liver disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 16544–16549.
- Pfefferbaum A, Adalsteinsson E, Sood R, Mayer D, Bell R, McBride W, Li TK & Sullivan E V. (2006). Longitudinal brain magnetic resonance imaging study of the alcohol-preferring rat. Part II: Effects of voluntary chronic alcohol consumption. *Alcohol Clin Exp Res* **30**, 1248–1261.
- Pfefferbaum A, Rosenbloom M, Deshmukh A & Sullivan E V. (2001). Sex differences in the effects of alcohol on brain structure. *Am J Psychiatry* **158**, 188–197.
- Pfefferbaum A, Rosenbloom M, Rohlfing T & Sullivan E V. (2009). Degradation of Association and Projection White Matter Systems in Alcoholism Detected with Quantitative Fiber Tracking. *Biol Psychiatry* **65**, 680–690.
- Pfefferbaum A, Rosenbloom MJ, Serventi KL & Sullivan E V. (2004). Brain volumes, RBC status, and hepatic function in alcoholics after 1 and 4 weeks of sobriety: Predictors of outcome. *Am J Psychiatry* **161**, 1190–1196.
- Pfefferbaum A, Sullivan E V., Rosenbloom MJ, Shear PK, Mathalon DH & Lim KO (1993). Increase in brain cerebrospinal fluid volume is greater in older than in younger alcoholic patients: A replication study and CT/MRI comparison. *Psychiatry Res Neuroimaging* **50**, 257–274.
- Pfefferbaum A, Zahr NM, Mayer D, Rohlfing T & Sullivan E V. (2015). Dynamic responses of selective brain white matter fiber tracts to binge alcohol and recovery in the rat. *PLoS One*; DOI: 10.1371/journal.pone.0124885.
- Pfefferbaum A, Zahr NM, Mayer D, Vinco S, Orduna J, Rohlfing T & Sullivan E V. (2008). Ventricular expansion in wild-type Wistar rats after alcohol exposure by vapor chamber. *Alcohol Clin Exp Res* **32**, 1459–1467.
- Pitel AL, Beaunieux H, Witkowski T, Vabret F, Guillery-Girard B, Quinette P, Desgranges B & Eustache F (2007). Genuine episodic memory deficits and executive dysfunctions in alcoholic subjects early in abstinence. *Alcohol Clin Exp Res* **31**, 1169–1178.
- Pitel AL, Chételat G, Le Berre AP, Desgranges B, Eustache F & Beaunieux H (2012). Macrostructural abnormalities in Korsakoff syndrome compared with uncomplicated alcoholism. *Neurology* **78**, 1330–1333.
- Pitel AL, Rivier J, Beaunieux H, Vabret F, Desgranges B & Eustache F (2009). Changes in the

episodic memory and executive functions of abstinent and relapsed alcoholics over a 6-month period. *Alcohol Clin Exp Res* **33**, 490–498.

Pla A, Pascual M & Guerri C (2016). Autophagy constitutes a protective mechanism against ethanol toxicity in mouse astrocytes and neurons. *PLoS One*; DOI: 10.1371/journal.pone.0153097.

Pradier B, Erxleben E, Markert A & Rácz I (2018). Microglial IL-1 $\beta$  progressively increases with duration of alcohol consumption. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **391**, 455–461.

Pruvost M, Lépine M, Leonetti C, Etard O, Naveau M, Agin V, Docagne F, Maubert E, Ali C, Emery E & Vivien D (2017). ADAMTS-4 in oligodendrocytes contributes to myelination with an impact on motor function. *Glia* **65**, 1961–1975.

Qin L & Crews FT (2012). NADPH oxidase and reactive oxygen species contribute to alcohol-induced microglial activation and neurodegeneration. *J Neuroinflammation*; DOI: 10.1186/1742-2094-9-5.

Qin L, He J, Hanes RN, Pluzarev O, Hong JS & Crews FT (2008). Increased systemic and brain cytokine production and neuroinflammation by endotoxin following ethanol treatment. *J Neuroinflammation* **5**, 10.

Qin L, Wu X, Block ML, Liu Y, Breese GR, Hong JS, Knapp DJ & Crews FT (2007). Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia* **55**, 453–462.

Rabe-Jablonska J & Bienkiewicz W (1994). Anxiety disorders in the fourth edition of the classification of mental disorders prepared by the American Psychiatric Association - diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM - IV - options book). *Psychiatr Pol* **28**, 255–268.

Ransohoff RM, Kivisäkk P & Kidd G (2003). Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nat Rev Immunol* **3**, 569–581.

Rehm J (2011). The risks associated with alcohol use and alcoholism. *Alcohol Res Heal* **34**, 135–143.

Ritz L, Coulbault L, Lannuzel C, Boudehent C, Segobin S, Eustache F, Vabret F, Pitel AL & Beaunieux H (2016). Clinical and Biological Risk Factors for Neuropsychological Impairment in Alcohol Use Disorder. *PLoS One*; DOI: 10.1371/journal.pone.0159616.



- Rubio-Araiz A, Porcu F, Pérez-Hernández M, García-Gutiérrez MS, Aracil-Fernández MA, Gutierrez-López MD, Guerri C, Manzanares J, O'Shea E & Colado MI (2017). Disruption of blood–brain barrier integrity in postmortem alcoholic brain: preclinical evidence of TLR4 involvement from a binge-like drinking model. *Addict Biol* **22**, 1103–1116.
- Rubio M, Villain H, Docagne F, Roussel BD, Ramos JA, Vivien D, Fernandez-Ruiz J & Ali C (2011). Pharmacological Activation/Inhibition of the Cannabinoid System Affects Alcohol Withdrawal-Induced Neuronal Hypersensitivity to Excitotoxic Insults ed. Mattson MP. *PLoS One* **6**, e23690.
- Sacco RL, Elkind M, Boden-Albala B, Lin IF, Kargman DE, Hauser WA, Shea S & Paik MC (1999). The protective effect of moderate alcohol consumption on ischemic stroke. *J Am Med Assoc* **281**, 53–60.
- De Santis S, Bach P, Pérez-Cervera L, Cosa-Linan A, Weil G, Vollstädt-Klein S, Hermann D, Kiefer F, Kirsch P, Ciccocioppo R, Sommer WH & Canals S (2019). Microstructural White Matter Alterations in Men with Alcohol Use Disorder and Rats with Excessive Alcohol Consumption during Early Abstinence. *JAMA Psychiatry* **76**, 749–758.
- De Santis S, Drakesmith M, Bells S, Assaf Y & Jones DK (2014). Why diffusion tensor MRI does well only some of the time: Variance and covariance of white matter tissue microstructure attributes in the living human brain. *Neuroimage* **89**, 35–44.
- Santucci AC, Mercado M, Bettica A, Cortes C, York D & Moody E (2004). Residual behavioral and neuroanatomical effects of short-term chronic ethanol consumption in rats. *Cogn Brain Res* **20**, 449–461.
- Savage LM, Candon PM & Hohmann HL (2000). Alcohol-Induced Brain Pathology and Behavioral Dysfunction: Using an Animal Model To Examine Sex Differences. *Alcohol Clin Exp Res* **24**, 465–475.
- Schwarzinger M, Pollock BG, Hasan OSM, Dufouil C, Rehm J, Baillot S, Guibert Q, Planchet F & Luchini S (2018). Contribution of alcohol use disorders to the burden of dementia in France 2008–13: a nationwide retrospective cohort study. *Lancet Public Heal* **3**, e124–e132.
- Segobin S, Laniepe A, Ritz L, Lannuzel C, Boudehent C, Cabé N, Urso L, Vabret F, Eustache F, Beaunieux H & Pitel AL (2019). Dissociating thalamic alterations in alcohol use disorder defines specificity of Korsakoff's syndrome. *Brain* **142**, 1458–1470.
- Segobin S, Ritz L, Lannuzel C, Boudehent C, Vabret F, Eustache F, Beaunieux H & Pitel AL (2015).

Integrity of white matter microstructure in alcoholics with and without Korsakoff's syndrome. *Hum Brain Mapp* **36**, 2795–2808.

Segobin SH, Chételat G, Le Berre AP, Lannuzel C, Boudehent C, Vabret F, Eustache F, Beaunieux H & Pitel AL (2014). Relationship between brain volumetric changes and interim drinking at six months in alcohol-dependent patients. *Alcohol Clin Exp Res* **38**, 739–748.

Seth D et al. (2010). Alcohol, signaling, and ECM turnover. *Alcohol Clin Exp Res* **34**, 4–18. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19860812> [Accessed May 4, 2020].

Shiratori Y, Teraoka H, Matano S, Matsumoto K, Kamii K & Tanaka M (1989). Kupffer cell function in chronic ethanol-fed rats. *Liver* **9**, 351–359.

Shokouhi BN, Wong BZY, Siddiqui S, Lieberman AR, Campbell G, Tohyama K & Anderson PN (2010). Microglial responses around intrinsic CNS neurons are correlated with axonal regeneration. *BMC Neurosci*; DOI: 10.1186/1471-2202-11-13.

Singh AK, Jiang Y, Gupta S & Benlhabib E (2007). EFFECTS OF CHRONIC ETHANOL DRINKING ON THE BLOOD-BRAIN BARRIER AND ENSUING NEURONAL TOXICITY IN ALCOHOL-PREFERRING RATS SUBJECTED TO INTRAPERITONEAL LPS INJECTION. *Alcohol Alcohol* **42**, 385–399.

SP N, A S, KR S, HC A & JG B (2016). Cytokine Changes Following Acute Ethanol Intoxication in Healthy Men: A Crossover Study. *Mediators Inflamm*; DOI: 10.1155/2016/3758590.

Stärkel P, Leclercq S, de Timary P & Schnabl B (2018). Intestinal dysbiosis and permeability: The yin and yang in alcohol dependence and alcoholic liver disease. *Clin Sci* **132**, 199–212.

Stavro K, Pelletier J & Potvin S (2013). Widespread and sustained cognitive deficits in alcoholism: A meta-analysis. *Addict Biol* **18**, 203–213.

Stragier E, Martin V, Davenas E, Poilbout C, Mongeau R, Corradetti R & Lanfumey L (2015). Brain plasticity and cognitive functions after ethanol consumption in C57BL/6J mice. *Transl Psychiatry* **5**, e696.

Sullivan E V., Harris RA & Pfefferbaum A (2010). Alcohol's effects on brain and behavior. *Alcohol Res Heal* **33**, 127–143.

Sullivan E V. & Pfefferbaum A (2005). Neurocircuitry in alcoholism: A substrate of disruption and repair. *Psychopharmacology (Berl)* **180**, 583–594.

- Szabo G & Lippai D (2014). Converging actions of alcohol on liver and brain immune signaling. In *International Review of Neurobiology*, pp. 359–380. Academic Press Inc.
- Tanaka S, Ide M, Shibutani T, Ohtaki H, Numazawa S, Shioda S & Yoshida T (2006). Lipopolysaccharide-induced microglial activation induces learning and memory deficits without neuronal cell death in rats. *J Neurosci Res* **83**, 557–566.
- Thompson KJ, Nazari SS, Jacobs WC, Grahame NJ & Mckillop IH (2017). Use of a crossed high alcohol preferring (cHAP) mouse model with the NIAAA-model of chronic-binge ethanol intake to study liver injury. *Alcohol Alcohol* **52**, 629–637.
- Toledo Nunes P, Vedder LC, Deak T & Savage LM (2019). A Pivotal Role for Thiamine Deficiency in the Expression of Neuroinflammation Markers in Models of Alcohol-Related Brain Damage. *Alcohol Clin Exp Res* **43**, 425–438.
- Tsukamoto H, French SW, Benson N, Delgado G, Rao GA, Larkin EC & Largman C (1985). Severe and progressive steatosis and focal necrosis in rat liver induced by continuous intragastric infusion of ethanol and low fat diet. *Hepatology* **5**, 224–232.
- Tulving E (2001). Episodic memory and common sense: How far apart? In *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, pp. 1505–1515. Royal Society.
- VanElzakker M, Fevurly RD, Breindel T & Spencer RL (2008). Environmental novelty is associated with a selective increase in Fos expression in the output elements of the hippocampal formation and the perirhinal cortex. *Learn Mem* **15**, 899–908.
- Vedder J (2005). Constructing prevention: Fetal alcohol syndrome and the problem of disability models. *J Med Humanit* **26**, 107–120.
- Vedder LC, Hall JM, Jabrouin KR & Savage LM (2015). Interactions Between Chronic Ethanol Consumption and Thiamine Deficiency on Neural Plasticity, Spatial Memory, and Cognitive Flexibility. *Alcohol Clin Exp Res* **39**, 2143–2153.
- Vengeliene V, Bilbao A & Spanagel R (2014). The alcohol deprivation effect model for studying relapse behavior: A comparison between rats and mice. *Alcohol* **48**, 313–320. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0741832914000512> [Accessed May 18, 2020].
- Vetreno RP, Hall JM & Savage LM (2011). Alcohol-related amnesia and dementia: Animal models have revealed the contributions of different etiological factors on neuropathology,

- neurochemical dysfunction and cognitive impairment. *Neurobiol Learn Mem* **96**, 596–608.
- Vetreno RP, Yaxley R, Paniagua B & Crews FT (2016). Diffusion tensor imaging reveals adolescent binge ethanol-induced brain structural integrity alterations in adult rats that correlate with behavioral dysfunction. *Addict Biol* **21**, 939–953.
- Vogle A, Qian T, Zhu S, Burnett E, Fey H, Zhu Z, Keshavarzian A, Shaikh M, Hoshida Y, Kim M & Aloman C (2020). Restricted immunological and cellular pathways are shared by murine models of chronic alcohol consumption. *Sci Rep*; DOI: 10.1038/s41598-020-59188-9.
- Wainwright DA, Xin J, Mesnard NA, Beahrs TR, Politis CM, Sanders VM & Jones KJ (2009). Exacerbation of Facial Motoneuron Loss after Facial Nerve Axotomy in CCR3-Deficient Mice. *ASN Neuro* **1**, AN20090017.
- Wang HJ, Gao B, Zakhari S & Nagy LE (2012). Inflammation in Alcoholic Liver Disease. *Annu Rev Nutr* **32**, 343–368.
- Wang W, Xu MJ, Cai Y, Zhou Z, Cao H, Mukhopadhyay P, Pacher P, Zheng S, Gonzalez FJ & Gao B (2017). Inflammation is independent of steatosis in a murine model of steatohepatitis. *Hepatology* **66**, 108–123.
- Wang X, Yu H, You J, Wang C, Feng C, Liu Z, Li Y, Wei R, Xu S, Zhao R, Wu X & Zhang G (2018). Memantine can improve chronic ethanol exposure-induced spatial memory impairment in male C57BL/6 mice by reducing hippocampal apoptosis. *Toxicology* **406–407**, 21–32.
- Wheeler MD, Nakagami M, Bradford BU, Uesugi T, Mason RP, Connor HD, Dikalova A, Kadiiska M & Thurman RG (2001). Overexpression of Manganese Superoxide Dismutase Prevents Alcohol-induced Liver Injury in the Rat. *J Biol Chem* **276**, 36664–36672.
- Wilson J, Tay RY, McCormack C, Allsop S, Najman J, Burns L, Olsson CA, Elliott E, Jacobs S, Mattick RP & Hutchinson D (2017). Alcohol consumption by breastfeeding mothers: Frequency, correlates and infant outcomes. *Drug Alcohol Rev* **36**, 667–676.
- Wscieklica T, de Barros Viana M, Le Sueur Maluf L, Pouza KCP, Spadari RC & Céspedes IC (2016). Alcohol consumption increases locomotion in an open field and induces Fos-immunoreactivity in reward and approach/withdrawal-related neurocircuitries. *Alcohol* **50**, 73–82.
- Wu D & Cederbaum AI (1999). Ethanol-Induced Apoptosis to Stable HepG2 Cell Lines

Expressing Human Cytochrome P-4502E1. *Alcohol Clin Exp Res* **23**, 67–76.

Wu D & Cederbaum AI (2003). Alcohol, Oxidative Stress, and Free Radical Damage. *Alcohol Res Heal* **27**, 277.

Wu DC, Jackson-Lewis V, Vila M, Tieu K, Teismann P, Vadseth C, Choi DK, Ischiropoulos H & Przedborski S (2002). Blockade of microglial activation is neuroprotective in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson disease. *J Neurosci* **22**, 1763–1771.

Yan AW, Fouts DE, Brandl J, Stärkel P, Torralba M, Schott E, Tsukamoto H, Nelson KE, Brenner DA & Schnabl B (2011). Enteric dysbiosis associated with a mouse model of alcoholic liver disease. *Hepatology* **53**, 96–105.

Yang JY, Xue X, Tian H, Wang XX, Dong YX, Wang F, Zhao YN, Yao XC, Cui W & Wu CF (2014). Role of microglia in ethanol-induced neurodegenerative disease: Pathological and behavioral dysfunction at different developmental stages. *Pharmacol Ther* **144**, 321–337.

Yeh MY, Che HL & Wu SM (2009). An ongoing process: A qualitative study of how the alcohol-dependent free themselves of addiction through progressive abstinence. *BMC Psychiatry*; DOI: 10.1186/1471-244X-9-76.

Yrjänheikki J, Keinänen R, Pellikka M, Hökfelt T & Koistinaho J (1998). Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 15769–15774.

Zahr NM, Mayer D, Rohlfing T, Hsu O, Vinco S, Orduna J, Luong R, Bell RL, Sullivan E V. & Pfefferbaum A (2014). Rat strain differences in brain structure and neurochemistry in response to binge alcohol. *Psychopharmacology (Berl)* **231**, 429–445.

Zahr NM, Mayer D, Vinco S, Orduna J, Luong R, Sullivan E V. & Pfefferbaum A (2009). In vivo evidence for alcohol-induced neurochemical changes in rat brain without protracted withdrawal, pronounced thiamine deficiency, or severe liver damage. *Neuropsychopharmacology* **34**, 1427–1442.

Zahr NM, Pitel AL, Chanraud S & Sullivan E V. (2010). Contributions of studies on alcohol use disorders to understanding cerebellar function. *Neuropsychol Rev* **20**, 280–289.

Zahr NM, Sullivan E V., Rohlfing T, Mayer D, Collins AM, Luong R & Pfefferbaum A (2016).

Concomitants of alcoholism: differential effects of thiamine deficiency, liver damage, and food deprivation on the rat brain in vivo. *Psychopharmacology (Berl)* **233**, 2675–2686.

Zeng T, Zhang CL, Xiao M, Yang R & Xie KQ (2016). Critical roles of kupffer cells in the pathogenesis of alcoholic liver disease: From basic science to clinical trials. *Front Immunol* **7**, 538.

Zhao YN, Wang F, Fan YX, Ping GF, Yang JY & Wu CF (2013). Activated microglia are implicated in cognitive deficits, neuronal death, and successful recovery following intermittent ethanol exposure. *Behav Brain Res* **236**, 270–282.

Zhu QF, Zhang CZ & Hua TM (2011). Ethanol induces a reduction in cortical thickness, neuronal density and somatic shrinkage in the cerebellar cortex of adult mice. *Neurochem J* **5**, 133–137.

Zimmermann HW, Trautwein C & Tacke F (2012). Functional role of monocytes and macrophages for the inflammatory response in acute liver injury. *Front Physiol*; DOI: 10.3389/fphys.2012.00056.

## ANNEXES







# CANDIDATURE PASSERELLE 3<sup>ÈME</sup> ANNÉE MÉDECINE

**LANQUETIN Anastasia**

Née le 12.09.1992

**55, rue des Boutiques**

14000 Caen, FRANCE

+33 2 31 47 01 68

[anastasia.lanquetin@gmail.com](mailto:anastasia.lanquetin@gmail.com)

## DIPLÔMES

2017 - 2019

DOCTORAT SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

Étude translationnelle de l'axe foie-cerveau dans le trouble de l'usage de l'alcool. (Clinique et préclinique)

Dirigée par Marina RUBIO et Anne-Lise PITEL, INSERM U1237, Caen (Directeur : Pr. Vivien). Financement de la Région Normandie.

*Université de Caen Normandie, France*

2018

D.U EXPÉRIMENTATION ANIMALE APPLIQUÉE À LA RECHERCHE BIOMÉDICALE

Conception des projets utilisant des rongeurs à des fins scientifiques

*Université de Caen Normandie, France*

2015 - 2017

MASTER RECHERCHE EN SCIENCES BIOMÉDICALES PARCOURS NEUROSCIENCES ET SCIENCES DU COMPORTEMENT - Mention Assez Bien

*Université de Caen Normandie, France.*

2011 - 2015

LICENCE DE BIOLOGIE, SANTÉ PARCOURS NEUROSCIENCES

*Université de Caen Normandie, France.*

2009 - 2011

PREMIÈRE ANNÉE COMMUNE AUX ETUDES DE SANTÉ - Classement 593/1563

Premier Cycle d'Etudes Médicales 1 - Classement 558/906

*Université Paris Sud, Orsay, France*

2009

BACCALAURÉAT SCIENTIFIQUE

Spécialité mathématiques - Mention Bien

*Lycée Napoléon, L'Aigle, France*

## STAGES ET FORMATIONS

2020

Journées d'observation de la pratique clinique - CHU de Caen

Urgences, Anesthésie gynécologique obstétrique, Anesthésie pédiatrique, Addictologie

Jan – Juin 2017

**Stage de master 2** - INSERM U1077, Caen

Étude translationnelle de l'axe foie-cerveau dans le trouble de l'usage de l'alcool. Imagerie cérébrale préclinique, histologie et immunohistochimie hépatique d'un modèle de rat ayant une préférence à l'alcool (Sp Rats), données cliniques chez les patients TUAL.

**Encadrement : Dr. Pitel**, (Directeur : Dr. Eustache)

Mai – Juin 2016

**Stage de master 1** - INSERM U1077, Caen

Dysfonctionnement cérébral dans l'alcool-dépendance : rôle des organes périphériques.

Analyses en imagerie volumétrique de la substance grise et des variables biologiques hépatiques de patients alcool-dépendant.

**Encadrement : Dr. Pitel**, (Directeur : Dr. Eustache)

2014

**Stage d'observation de licence** - UMS 3408, GIP Cyceron, Caen

Découverte de l'imagerie préclinique

**Encadrement : Dr. Pro**

2017 - 2019

### **Formations doctorales**

Intégrité scientifique, Financement et management des projets de recherche, Règles et usages de publication d'un article scientifique

Mars 2019

### **Médiation et vulgarisation scientifique**

Fête de la science, Organisation des Journées de l'école doctorale (150 doctorants)

## **PUBLICATIONS**

Lanquetin, A., Segobin, S., Naveau, M., Coulbault, L., Lelong Boulouard, V., Leclercq, S., Colombo, G., Maccioni, P., Lorrai, I., Vivien, D., Rubio, M., Pitel, A-L. Role of inflammation in alcohol-related brain abnormalities: a translational study. *En préparation*.

Drieu, A., Lanquetin, A., Levard, D., Glavan, M., Campos, F., Quenault, A., Lemarchand, E., Naveau, M., Pitel, A.L., Castillo, J., Vivien, D., Rubio, M. Alcohol exposure-induced neurovascular inflammatory priming impact ischemic stroke and is linked with brain perivascular macrophages. *JCI Insight*, 26 février 2020.

Drieu, A., Lanquetin, A., Gulhan, Z., Vegliante, G., Rubio, M., Zanier R., E., Chalon, S., Tolomeo, D., Vivien, D., Ali, C. Relevance of sensitive imaging of neuro-inflammation to explain neurological deficits after mild traumatic brain injury in mice. *En préparation*.

## **COMMUNICATIONS ORALES**

Sept 2019

*In vivo* longitudinal study of risky alcohol consumption effects on the brain.

Lanquetin, A., Drieu, A., Freyssainge, C., Vivien, D, Pitel, A.L., Rubio, M *European Society for Biomedical Research on Alcoholism*, Lille, France

Juin 2018

Translational study of brain-liver interactions in alcohol use disorder.

Lanquetin, A., Drieu, A., Vivien, D, Pitel, A.L., Rubio, M.

Invités : Edith Sullivan & Adolf Pfefferbaum

*Séminaire Cyceron*, Caen, France.

## **POSTERS**

Oct 2019

Society for Neurosciences, Chicago, États-Unis

Risky alcohol consumption and its effects on the brain: an *in vivo* longitudinal study in mice.

Lanquetin, A., Drieu, A., Freyssainge, C., Vivien, D., Pitel, A-L., Rubio, M.

Sept 2019

European Society for Biomedical Research on Alcoholism, Lille, France

Chronic alcohol exposure in alcohol- preferring (SP) rats provokes mild brain and liver inflammatory responses and a specific atrophy of the corpus callosum.

Lanquetin, A., Naveau, M., Maccioni, P., Lorrai, I., Colombo, G., Vivien, D., Pitel, A-L., Rubio, M.

European Society for Biomedical Research on Alcoholism, Lille, France

Relationships between hepatic function, cognitive status and cerebral macrostructure in alcohol use disorder (AUD) patients.

Lanquetin, A., Segobin, S., Laniepe, A., Féricot, M., Wilson, S., Vabret, F., Cabé, N., Coulbault, L., Eustache, F., Vivien, D., Rubio, M., Pitel, A-L.

Mars 2018

Journées de l'École Doctorale, Rouen, France

Translational study of brain-liver interactions in alcohol use disorder.

Lanquetin, A., Drieu, A., Vivien, D., Pitel, A.L., Rubio, M.

## ENCADREMENT D'ÉTUDIANTS

|                  |                                                                                                                                                                                                             |
|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2018 - 2020      | Encadrement des Master 1 neurosciences dans le cadre de leur Travaux Pratiques au laboratoire (3 semaines par an)                                                                                           |
| Jan – Juin 2019  | Étudiant en double cursus Master neurosciences (1 <sup>ère</sup> année) - L3 médecine<br>Projet : Évaluation macrostructurale du cerveau et du foie dans un modèle murin de consommation d'alcool à risque. |
| Mai – Juill 2018 | Étudiante en double cursus Master neurosciences (1 <sup>ère</sup> année) - DFASM2<br>Projet : Inflammation du cerveau et du foie chez des rats ayant une préférence à l'alcool.                             |

## COMPÉTENCES TECHNIQUES

### PHYSIOLOGIE CHEZ LA SOURIS

Injection stéréotaxique, imagerie de fenêtre hépatique et crânienne, perfusion intracardiaque, prélèvement d'organes, collection d'échantillons de sang, voies d'abord.  
Tests comportementaux chez la souris  
Y-Maze, open-field, *balance beam* test, *fear conditioning*, actimétrie, catwalk, grip test, logiciel d'analyse : Ethovision.

### IMAGERIE PRÉCLINIQUE ET CLINIQUE

IRM 7T petit animal (Bruker, Allemagne) : Acquisition et mise au point de séquences avec le logiciel Paravision 6.0 (anatomique, diffusion, spectroscopie par résonance magnétique).  
Application cérébrale et hépatique (*in vivo* et *ex vivo*), traitement d'image : ImageJ, DSI Studio (tractographie), Tarquin, TopSpin (spectroscopie).

IRM 3T (Phillips) : Analyse d'imagerie volumétrique et cartes de corrélations en imagerie.  
Logiciels utilisés : MATLAB, MRICRON, SPM12

Histologie, immunohistochimie, colorations (HES), microscopie à fluorescence, microscopie inversée, microscopie biphotonique, NIRF (*Near-Infrared Fluorescence*). Logiciels utilisés : ImageJ, Leica MM Fluor, Metamorph

### DONNÉES CLINIQUES

Analyse de données épidémiologiques, neuropsychologiques, biologiques (cohorte ALCOBRAIN)

### LOGICIELS STATISTIQUES

Statistica, JASP, GraphPad

## AUTRES EXPÉRIENCES

|                  |                                                                                                                                                            |
|------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2015 – 2017      | Aide aux devoirs quotidienne à domicile pour un collégien avec des troubles dys niveaux 5 <sup>ème</sup> et 4 <sup>ème</sup> , <i>Bretteville sur Odon</i> |
| 2012 - 2015      | Equipière polyvalente Mc Donald's (25h/semaine), <i>Hérouville St Clair</i>                                                                                |
| Étés 2009 - 2011 | Garde de deux enfants de -10 ans, <i>Dreux</i>                                                                                                             |

## LOISIRS

Tennis amateur, compétition en quatrième série (classement 30/5)  
Lecture (Fantasy, policier)  
Jeux vidéo (Rétrogaming, MMORPG, RPG, stratégie)

# Alcohol exposure–induced neurovascular inflammatory priming impacts ischemic stroke and is linked with brain perivascular macrophages

Antoine Drieu, ... , Denis Vivien, Marina Rubio

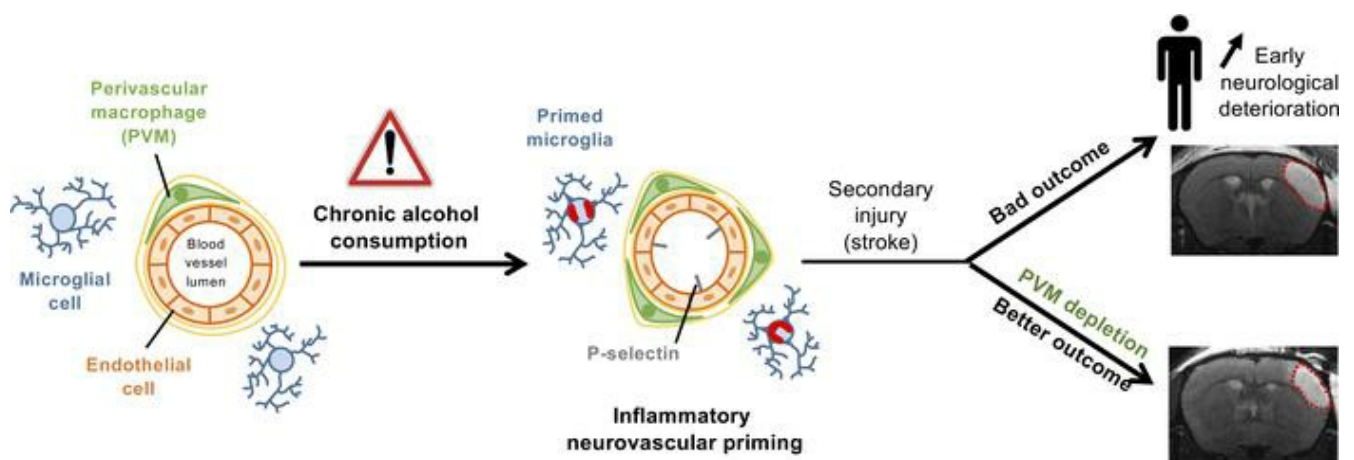
*JCI Insight.* 2020;5(4):e129226. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.129226>.

Research Article

Inflammation

Neuroscience

## Graphical abstract



Find the latest version:

<https://jci.me/129226/pdf>



# Alcohol exposure–induced neurovascular inflammatory priming impacts ischemic stroke and is linked with brain perivascular macrophages

Antoine Drieu,<sup>1</sup> Anastasia Lanquetin,<sup>1</sup> Damien Levard,<sup>1</sup> Martina Glavan,<sup>1</sup> Francisco Campos,<sup>2</sup> Aurélien Quenault,<sup>1</sup> Eloïse Lemarchand,<sup>1</sup> Mikaël Naveau,<sup>3</sup> Anne Lise Pitel,<sup>4</sup> José Castillo,<sup>2</sup> Denis Vivien,<sup>1</sup> and Marina Rubio<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INSERM, Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders, UMR-S 1237, Normandie Université, Caen, France.

<sup>2</sup>Clinical Neurosciences Research Laboratory, Health Research Institute of Santiago de Compostela (IDIS), Santiago de Compostela, Spain. <sup>3</sup>CNRS, UMR-S 3408, GIP Cyceron, Normandie Université, Caen, France. <sup>4</sup>INSERM, Neuropsychologie et Imagerie de la Mémoire Humaine, UMR-S 1077, Université Paris Sciences et Lettres, Caen, France.

Alcohol abuse is a major public health problem worldwide, causing a wide range of preventable morbidity and mortality. In this translational study, we show that heavy drinking (HD) ( $\geq 6$  standard drinks/day) is independently associated with a worse outcome for ischemic stroke patients. To study the underlying mechanisms of this deleterious effect of HD, we performed an extensive analysis of the brain inflammatory responses of mice chronically exposed or not to 10% alcohol before and after ischemic stroke. Inflammatory responses were analyzed at the parenchymal, perivascular, and vascular levels by using transcriptomic, immunohistochemical, in vivo 2-photon microscopy and molecular MRI analyses. Alcohol-exposed mice show, in the absence of any other insult, a neurovascular inflammatory priming (i.e., an abnormal inflammatory status including an increase in brain perivascular macrophages [PVM]) associated with exacerbated inflammatory responses after a secondary insult (ischemic stroke or LPS challenge). Similar to our clinical data, alcohol-exposed mice showed larger ischemic lesions. We show here that PVM are key players on this aggravating effect of alcohol, since their specific depletion blocks the alcohol-induced aggravation of ischemic lesions. This study opens potentially new therapeutic avenues aiming at blocking alcohol-induced exacerbation of the neurovascular inflammatory responses triggered after ischemic stroke.

## Introduction

Alcohol abuse is a major public health problem worldwide, causing a wide range of preventable morbidity and mortality. In the European Union, 89% of men and 82% of women are current drinkers; among them, 15.3% of men and 3.4% of women are heavy drinkers ( $>6$  drinks/day) (1). In the United States, excessive alcohol use is known to kill about 88,000 people each year, and the cost of excessive alcohol use reached \$249 billion in 2010 (<http://www.cdc.gov/features/costsofdrinking>). Alcohol modifies the risk of stroke: light and moderate alcohol consumption (0–2 drinks/day) are associated with a lower risk of ischemic stroke, whereas higher doses of alcohol are associated with an increased risk (2). Importantly, stroke risk associated with high and heavy drinking (HD) in midlife ( $<75$  years) predominates over well-known stroke risk factors like hypertension and diabetes (3). However, the impact of alcohol consumption on stroke outcome is less known. Current clinical studies are controversial and have described either an aggravating effect (4) or no effect of HD (5) on stroke severity. Preclinical reports have also described either a protective effect of low alcohol consumption on ischemic stroke (6, 7) or larger infarcts in rodents exposed to higher alcohol dose (6, 8). However, the mechanisms mediating this aggravation are not well understood. Our previous results on the impact of alcohol consumption on ischemic stroke, obtained in a clinically relevant thromboembolic model of stroke (9, 10), have shown that the aggravating effect of excessive drinking is not due to alcohol-induced changes in hemodynamic

**Conflict of interest:** The authors have declared that no conflict of interest exists.

**Copyright:** © 2020, American Society for Clinical Investigation.

**Submitted:** March 29, 2019

**Accepted:** January 15, 2020

**Published:** February 27, 2020.

**Reference information:** *JCI Insight*. 2020;5(4):e129226.

<https://doi.org/10.1172/jci.insight.129226>.

parameters (clot formation, stability, or sensitivity to fibrinolysis) (8). On the other hand, clinical and preclinical data have shown that alcohol consumption may have an impact on inflammation (11–13).

Perivascular macrophages (PVM) are a subpopulation of myeloid cells residing in the CNS. PVM surround brain blood vessels and are located at the perivascular space (14, 15). In physiological conditions, PVM have scavenger functions, revealing a role of clearing debris from the CNS (16–18), and can also present antigens to lymphocytes (19). Recent data implicate PVM in several pathological contexts, including brain infections, immune activation, Alzheimer's disease, or multiple sclerosis, suggesting that PVM are a key component of the brain-resident immune system, with broad implications for the pathogenesis of major brain diseases (20). PVM can produce reactive oxygen species and cytokines, linking them to the inflammatory response (21). Due to the major role of inflammation in stroke pathobiology and outcome (22), in this translational study, we aimed at investigating the role of inflammation in the aggravating effect of chronic alcohol drinking on ischemic stroke.

## Results

*HD stroke patients show higher stroke baseline severity and worse neurological outcome.* A total of 3,645 ischemic stroke patients were included in the retrospective analysis (Figure 1A). HD stroke patients ( $n = 424$ , 11.6%; drinking  $\geq 6$  drinks/day in the last 5 years) were significantly younger, were more frequently men, and presented a history of hypertension and higher smoking habits than non-HD stroke patients. In addition, HD stroke patients had more severe ischemic strokes, with a higher infarct volume, higher mortality during hospitalization, worse prognosis at 3 months, and higher levels of markers associated with the inflammatory response. Mortality during hospitalization was significantly increased in HD stroke patients (11.7% vs. 9.7%,  $P < 0.0001$ ; Table 1).

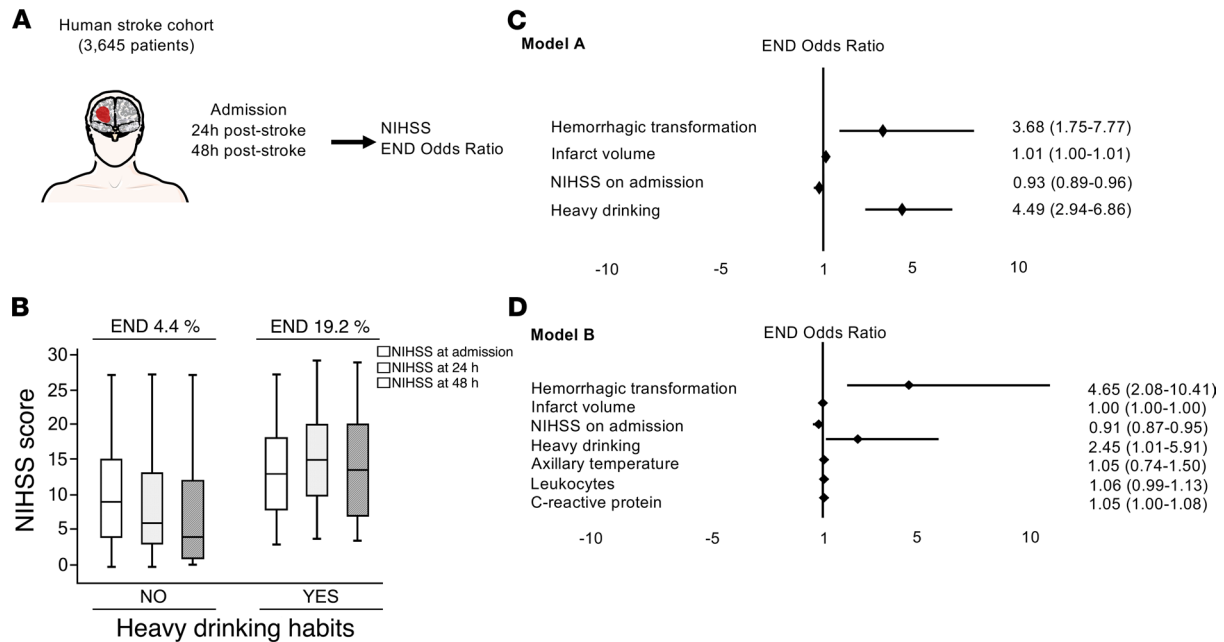
The NIH Stroke Scale (NIHSS) scores at admission, 24 hours, and 48 hours after stroke onset were significantly higher in HD stroke patients (Figure 1B and Table 1). Interestingly, significantly more HD stroke patients presented early neurological deterioration (END), defined as the increase of NIHSS in 4 or more points in the first 48 hours after admission (19.2% vs. 4.4%; Table 1 and Figure 1B).

*HD is independently associated with an increased risk of END.* Based on the first univariate analysis, END was used as the main variable to analyze the cohort of stroke patients included in this study (Table 2). In this second univariate analysis, a total 3352 patients were included (3146 without END and 206 with END; 293 fewer patients than for the descriptive analysis, since NIHSS data were not recorded or were lost between the admission and the 48 hours). As expected, patients with END showed significantly higher hemorrhagic transformation, higher infarct volume, and worse prognosis at 3 months. Moreover, patients with END presented higher inflammatory response at admission, characterized by higher leukocyte numbers, as well as C-reactive protein (CRP) levels. Interestingly, significantly more END patients had HD habits (36.9% vs. 10.2%,  $P < 0.0001$ ; Table 2).

*The inflammatory response is associated with the risk of END in HD stroke patients.* We then performed multivariate analysis of END adjusted by HD (Model A, Figure 1C and Supplemental Table 1; supplemental material available online with this article; <https://doi.org/10.1172/jci.insight.129226DS1>) or by HD and inflammatory markers (Model B, Figure 1D and Supplemental Table 1). Model A showed that HD is independently associated with an increased risk of END (OR = 4.49; 95% CI, 2.94–6.86;  $P < 0.0001$ ) (Figure 1C and Supplemental Table 1). When inflammatory markers (axillary temperature, leukocyte numbers and CRP) were included in the analysis (Model B, Figure 1D and Supplemental Table 1), the impact of HD on the END OR decreased from 4.49 (obtained on the Model A) to 2.45 (OR = 2.45; 95% CI, 1.01–5.91;  $P < 0.0001$ ), showing that the inflammatory response is associated with the risk of END in HD stroke patients. Age and sex do not have a relevant impact on END (Supplemental Table 2).

Finally, we studied the effect of HD on infarct volume. After adjusting for those variables that can interfere with the variable “infarct volume” (age, sex, axillary temperature, leukocyte levels, fibrinogen levels, CRP levels, tissue-type plasminogen activator (tPA) treatment, thrombectomy, hemorrhagic transformation, NIHSS on admission, END, Trial of ORG 10172 in Acute Stroke Treatment (TOAST) classification, and HD; Supplemental Table 3), linear regression analysis of infarct volume showed that the predictor value of HD was 19.66 ( $B = 19.66$  rate of change; 95% CI, 8.03–31.30;  $P < 0.001$ ; Supplemental Table 4).

*HD patients without stroke show high levels of inflammatory markers.* Data from the independent cohort of HD patients without stroke showed that the levels of circulating monocytes are significantly increased compared with control healthy subjects ( $0.73 \pm 0.27$  vs.  $0.2 \pm 0.17$ , respectively,  $P = 0.003$ ; Table 3). In addition to this, 61.8% of HD showed increased high-sensitivity CRP (hs-CRP) levels (Table 3).



**Figure 1. Heavy drinking (HD) aggravates ischemic stroke baseline severity and outcome, and it increases early neurological deterioration (END) risk.** Inflammatory markers are independently associated to the alcohol-induced increased risk of END. (A) Schema of the study. (B) Representation of neurological stroke severity determined by the NIH Stroke Scale (NIHSS) at admission and 24 and 48 hours in stroke patients with and without heavy drinking habits. Early neurological deterioration (END) is defined as an increase of NIHSS in 4 or more points in the first 48 hours after admission. (C) Forest plot of the multivariate analysis including variables predicting END ( $n = 206$ ) such as hemorrhagic transformation, infarct volume, NIHSS on admission, and HD habits (Model A). (D) Forest plot of the multivariate analysis of the variables included in the Model A and inflammatory biomarkers (axillary temperature, number of leukocytes levels, and C-reactive protein levels) (Model B).

*Alcohol exposure induces a neurovascular inflammatory priming in mice.* The first set of experiments aimed to analyze the inflammatory status in the brain of mice drinking 10% alcohol for 6 weeks (~5 g/kg/day), in the absence of any other insult (Figure 2A). To study microglial cells, brain samples were stained with Iba1, a constitutive marker of microglial cells, and with the lysosomal marker CD68, present in activated microglial cells (23). We found that, whereas the total number of activated microglial (Iba1<sup>+</sup>CD68<sup>+</sup>) cells remained unchanged (Figure 2, B–D), the total area of CD68<sup>+</sup> staining was significantly increased in alcohol-exposed mice ( $P < 0.05$  vs. control; Figure 2, C and E), suggestive of an alcohol-induced increase in microglial activation. Alcohol exposure did not change microglial cell numbers (total number of Iba1<sup>+</sup> cells) (Figure 2, B and F;  $n = 4$  mice/group). In terms of microglial morphology, alcohol exposure did not change the number of main processes (starting from the soma) (Figure 2, C and G) or the mean area of microglial cells (Figure 2, C and H).

The alcohol-induced increase in microglial activation was demonstrated by an *in vivo* functional measurement of microglial phagocytosis after the injection of nonionic latex beads in the brain cortex of control and alcohol-exposed mice (Figure 2, I–L). Eight hours after the intracortical injection of the beads, alcohol-exposed mice showed significantly more phagocytosed beads (surrounded by Iba1<sup>+</sup> staining) than control mice (Figure 2, I–K and M;  $n = 4$  mice/group;  $P < 0.05$  vs. control), demonstrating that microglia in alcohol-exposed mice is more prone for phagocytosis. These results show an alcohol-induced microglial priming characterized by a morphological “resting” state — accompanied, however, by an increase in both microglial activation status and phagocytic capacity.

In this study, we also wanted to examine potential inflammatory effects of alcohol exposure on the brain vasculature (Figure 3, A and B). For this reason, we analyzed the endothelial levels of the adhesion molecule P-selectin (CD62P marker), responsible of leukocyte tethering and rolling on the vessel wall. At the vascular level, alcohol-exposed mice showed significantly increased P-selectin<sup>+</sup> blood vessels (152% increase;  $1.03 \pm 0.31$  CD62P<sup>+</sup> blood vessels/mm<sup>2</sup>;  $n = 4$  mice/group;  $P < 0.05$  vs. control; Figure 3B), whereas, in control mice, very low levels of P-selectin ( $0.31 \pm 0.11$  CD62P<sup>+</sup> blood vessels/mm<sup>2</sup>) were detected, demonstrating an alcohol-induced endothelial activation in the absence of any other brain injury.



**Table 1. Univariate analysis of stroke patients with and without heavy drinking habits (>6 standard drinks/day)**

|                                                 | Heavy drinking        |                       |         |
|-------------------------------------------------|-----------------------|-----------------------|---------|
|                                                 | No<br><i>n</i> = 3221 | Yes<br><i>n</i> = 424 |         |
| Age (years)                                     | 72.60 ± 14.06         | 66.79 ± 11.87         | <0.0001 |
| Men (%)                                         | 50.5                  | 85.8                  | <0.0001 |
| History of hypertension (%)                     | 64.6                  | 52.4                  | <0.0001 |
| History of diabetes (%)                         | 24.7                  | 22.6                  | 0.368   |
| History of smoking (%)                          | 12.5                  | 56.1                  | <0.0001 |
| History of dyslipemia (%)                       | 34.0                  | 32.3                  | 0.513   |
| History of ischemic heart disease (%)           | 11.5                  | 11.3                  | 0.491   |
| Axillary temperature at admission (°C)          | 36.3 ± 0.6            | 36.6 ± 0.6            | <0.0001 |
| Leukocytes on admission (× 10 <sup>3</sup> /mL) | 8.8 ± 3.1             | 9.9 ± 3.2             | 0.135   |
| Fibrinogen on admission (mg/dL)                 | 416.9 ± 97.6          | 439.5 ± 87.1          | <0.0001 |
| C-reactive protein on admission (mg/L)          | 2.7 ± 4.2             | 3.5 ± 3.1             | <0.0001 |
| Sedimentation rate (mm)                         | 21.9 ± 23.6           | 24.1 ± 23.5           | 0.05    |
| tPA treatment (%)                               | 22.9                  | 21.0                  | 0.206   |
| Trombectomy (%)                                 | 3.2                   | 1.4                   | 0.025   |
| Hemorrhagic transformation (%)                  | 8.8                   | 10.5                  | 0.147   |
| Infarct volume (mL), <i>n</i> = 2121            | 40.1 ± 70.4           | 46.9 ± 64.8           | 0.021   |
| NIHSS on admission, <i>n</i> = 3645             | 9 (5–15 NIHSS)        | 14 (11–19 NIHSS)      | <0.0001 |
| NIHSS at 24 hours, <i>n</i> = 3277              | 6 (3–10 NIHSS)        | 18 (9–20 NIHSS)       | <0.0001 |
| NIHSS at 48 hours, <i>n</i> = 3352              | 4 (1–10 NIHSS)        | 14 (7–20 NIHSS)       | <0.0001 |
| END (%), <i>n</i> = 3352                        | 4.4                   | 19.2                  | <0.0001 |
| mRS at 3 months, <i>n</i> = 2935                | 2 (1–4 mRS)           | 3 (2–4 mRS)           | <0.0001 |
| Poor outcome at 3 months (%), <i>n</i> = 2935   | 53.6                  | 65.1                  | <0.0001 |
| TOAST                                           |                       |                       | 0.286   |
| Atherothrombotic (%)                            | 23.2                  | 26.7                  |         |
| Cardioembolic (%)                               | 37.1                  | 32.8                  |         |
| Small vessel disease (%)                        | 7.3                   | 6.1                   |         |
| Indeterminate (%)                               | 31.2                  | 33.3                  |         |
| Others (%)                                      | 1.1                   | 1.2                   |         |
| Mortality during hospitalization (%)            | 9.1                   | 11.7                  | <0.0001 |

Analyses were retrospectively performed from data of the stroke registry at the Stroke Unit of the University Clinical Hospital of Santiago de Compostela (Spain). tPA, tissue-type plasminogen activator; NIHSS, National Institute of Health Stroke Scale; mRS, modified Rankin Scale; END, Early Neurological Deterioration (defined as the increase of NIHSS in ≥4 points in the first 48 hours after admission); TOAST, Trial of ORG 10172 in Acute Stroke Treatment classification.

To determine the functional impact of the increase in P-selectin expression, we performed *in vivo* 2-photon microscopy analyses to measure venular leukocyte adhesion and rolling in mice exposed or not to alcohol, after the *i.v.* injection of FITC-Dextran (allowing blood vessels visualization) and Rhodamine-6G (staining leukocytes). Alcohol-exposed mice showed significantly more adherent (Figure 3, C and D) and rolling (Figure 3, E and F) leukocytes compared with control mice (317% and 724% increase, respectively; *n* = 6 mice/group; *P* < 0.05 vs. control).

Concerning mRNA expression of inflammatory markers, alcohol-exposed mice showed a significant increase in TGF-β mRNA levels (*P* < 0.05; *n* = 6 mice/group) compared with control mice that was not accompanied by changes in proinflammatory cytokines such as IL-1β, TNF, IL-6, P-selectin, TLR4, or VCAM1 (Table 4).

We also studied blood-brain barrier (BBB) integrity after alcohol exposure by using 3 different methods. Our results showed that chronic alcohol exposure does not seem to alter BBB integrity, since neither Evans Blue extravasation measured by near-infrared fluorescence (NIRF) imaging (Supplemental Figure 1, A–D; *n* = 4 mice/group), positive signals of gadolinium extravasation measured by T1-weighted (T1-w) MRI (Supplemental Figure 1, E–H; *n* = 4 mice/group) or fibrinogen deposits (Supplemental Figure 1I; *n* = 4 mice/group) were found in alcohol-exposed mice.

Concerning the potential alcohol-induced neuronal death, we did not find any fluoro-jade C-positive staining in alcohol-exposed mice (Supplemental Figure 1B; *n* = 4 mice/group).



**Table 2. Univariate analysis of stroke patients with and without early neurological deterioration**

|                                                 | Early neurological deterioration |                       |         |
|-------------------------------------------------|----------------------------------|-----------------------|---------|
|                                                 | No<br><i>n</i> = 3146            | Yes<br><i>n</i> = 206 |         |
| Age (years)                                     | 72.1 ± 13.4                      | 73.8 ± 11.9           | 0.977   |
| Men (%)                                         | 54.7                             | 59.2                  | 0.219   |
| History of hypertension (%)                     | 62.8                             | 62.6                  | 0.509   |
| History of diabetes (%)                         | 24.5                             | 23.3                  | 0.384   |
| History of smoking (%)                          | 17.4                             | 20.2                  | 0.193   |
| History of dyslipemia (%)                       | 33.8                             | 35.4                  | 0.339   |
| History of ischemic heart disease (%)           | 11.3                             | 14.1                  | 0.135   |
| Axillary temperature at admission (°C)          | 36.3 ± 0.6                       | 36.4 ± 0.8            | 0.005   |
| Leukocytes on admission (× 10 <sup>3</sup> /mL) | 8.9 ± 3.3                        | 10.4 ± 4.2            | 0.019   |
| Fibrinogen on admission (mg/dL)                 | 426.7 ± 102.8                    | 422.8 ± 120.5         | 0.255   |
| C-reactive protein on admission (mg/L)          | 3.2 ± 4.3                        | 4.6 ± 4.9             | <0.0001 |
| Sedimentation rate (mm)                         | 27.7 ± 25.6                      | 28.5 ± 26.1           | 0.695   |
| tPA treatment (%)                               | 23.5                             | 22.3                  | 0.389   |
| Trombectomy (%)                                 | 2.7                              | 3.9                   | 0.210   |
| Hemorrhagic transformation (%)                  | 9.4                              | 17.1                  | <0.0001 |
| Infarct volume (mL)                             | 50.3 ± 77.1                      | 107.7 ± 107.8         | <0.0001 |
| NIHSS at admission                              | 12 (NIHSS 7–17)                  | 13 (NIHSS 8–15)       | 0.017   |
| mRS at 3 months                                 | 3 (mRS 1–4)                      | 5 (mRS 3–6)           | <0.0001 |
| Poor outcome at 3 months (%)                    | 51.0                             | 81.2                  | <0.0001 |
| TOAST                                           |                                  |                       | 0.613   |
| Atherothrombotic (%)                            | 24.3                             | 25.2                  |         |
| Cardioembolic (%)                               | 35.8                             | 38.3                  |         |
| Small vessel disease (%)                        | 7.2                              | 4.4                   |         |
| Indeterminate (%)                               | 31.6                             | 31.1                  |         |
| Others (%)                                      | 1.1                              | 1.0                   |         |
| Heavy drinking (%)                              | 10.2                             | 36.9                  | <0.0001 |

*Alcohol exposure exacerbates brain neurovascular inflammatory reactions after an acute systemic insult.* Alcohol-exposed mice showed a global exacerbated inflammatory response in the brain 24 hours after an acute i.p. injection of LPS compared with control mice (Figure 4A). At the parenchymal level, alcohol-exposed mice receiving LPS showed a significant increase in (a) total microglial cells (Iba1<sup>+</sup> cells) (Figure 4, B and C; *n* = 5 mice/group; *P* < 0.05 vs. control), (b) activated microglia (Iba1<sup>+</sup>CD68<sup>+</sup> cells) (Figure 4, B and D; *n* = 5 mice/group; *P* < 0.05 vs. control), and (c) CD68<sup>+</sup>Iba1<sup>+</sup> cells that we considered as macrophages (Figure 4, B and E) compared with LPS-injected control mice.

At the vascular level, P-selectin immunostaining (Figure 4, F and G) was significantly increased in alcohol-exposed mice receiving LPS compared with control mice (*n* = 5 mice/group; *P* < 0.05 vs. control). Molecular MRI also showed a significantly increased number of P-selectin-coupled micro-sized particles of iron oxide-positive (MPIO<sup>+</sup>) blood vessels in alcohol-exposed mice receiving LPS (Figure 4, H and I; *n* = 5 mice/group; *P* < 0.05 vs. control). Consequently, venular leukocyte adhesion (Figure 4, J and K) and rolling (Figure 4, L and M), measured by intravital 2-photon microscopy, were significantly increased in alcohol-exposed mice receiving LPS compared with control mice (*n* = 5 mice/group; *P* < 0.05 vs. control).

*Alcohol exposure aggravates stroke lesions and exacerbates neurovascular inflammatory responses after ischemic stroke in mice.* Alcohol-exposed mice showed significantly larger ischemic lesions than control mice (drinking only water) 24 hours after stroke onset (Figure 5, A–C; *n* = 8 mice/group; *P* < 0.05 vs. control) (8). These data on lesion volume are part of a previously published figure (8). No hemorrhagic transformation was detected in any mice (data not shown).

**Table 3. Heavy drinkers have higher levels of inflammatory markers, in the absence of any other injury**

|                            | Control subjects<br><i>n</i> = 21          | Heavy drinkers<br><i>n</i> = 34 | <i>P</i> |
|----------------------------|--------------------------------------------|---------------------------------|----------|
| Age                        | 43.8 ± 7.4<br>(29–55 years)                | 45.7 ± 9.2<br>(33–66 years)     | 0.29     |
| Women/Men Ratio            | 5/21                                       | 9/34                            | 0.83     |
| BMI                        | 25.3 ± 4.4 <sup>A</sup><br>(19.5–35.5 BMI) | 23.9 ± 4.4<br>(17.3–39.8 BMI)   | 0.32     |
| AUDIT                      | 2.9 ± 1.6<br>(scores 0–6)                  | 28.9 ± 7.7<br>(scores 4–40)     | <0.001   |
| Leucocytes (g/L)           | 6.4 ± 1.7<br>(3.7–9.7 g/L)                 | 7.0 ± 2.1<br>(3.5–12.3 g/L)     | 0.24     |
| Neutrophils (g/L)          | 3.6 ± 1.4<br>(1.7–7.2 g/L)                 | 4.1 ± 1.7<br>(1.7–8.6 g/L)      | 0.28     |
| Eosinophils (g/L)          | 0.17 ± 0.08<br>(0.04–0.31 g/L)             | 0.18 ± 0.13<br>(0–0.53 g/L)     | 0.80     |
| Basophils (g/L)            | 0.03 ± 0.02<br>(0.01–0.07 g/L)             | 0.04 ± 0.02<br>(0.01–0.1 g/L)   | 0.09     |
| Lymphocytes (g/L)          | 1.95 ± 0.72<br>(1.03–3.85 g/L)             | 1.93 ± 0.75<br>(0.93–3.88 g/L)  | 0.96     |
| Monocytes (g/L)            | 0.52 ± 0.17<br>(0.27–0.99 g/L)             | 0.73 ± 0.27<br>(0.11–1.42 g/L)  | 0.003    |
| C Reactive protein >3 mg/L |                                            | 61.8% (21 of 34)                |          |

Demographic and clinical characteristics, leukocyte cell counting, and C-reactive Protein (CRP) levels in an independent cohort of healthy control participants and heavy drinkers recruited in the Addiction Unit of the University Hospital of Caen (Normandy, France) while they were receiving withdrawal treatment as inpatients. Data are expressed as mean ± SD; parenthesis data correspond to interval. AUDIT, Alcohol Use Disorders Identification Test.

<sup>A</sup>Missing data. *N* = 20.

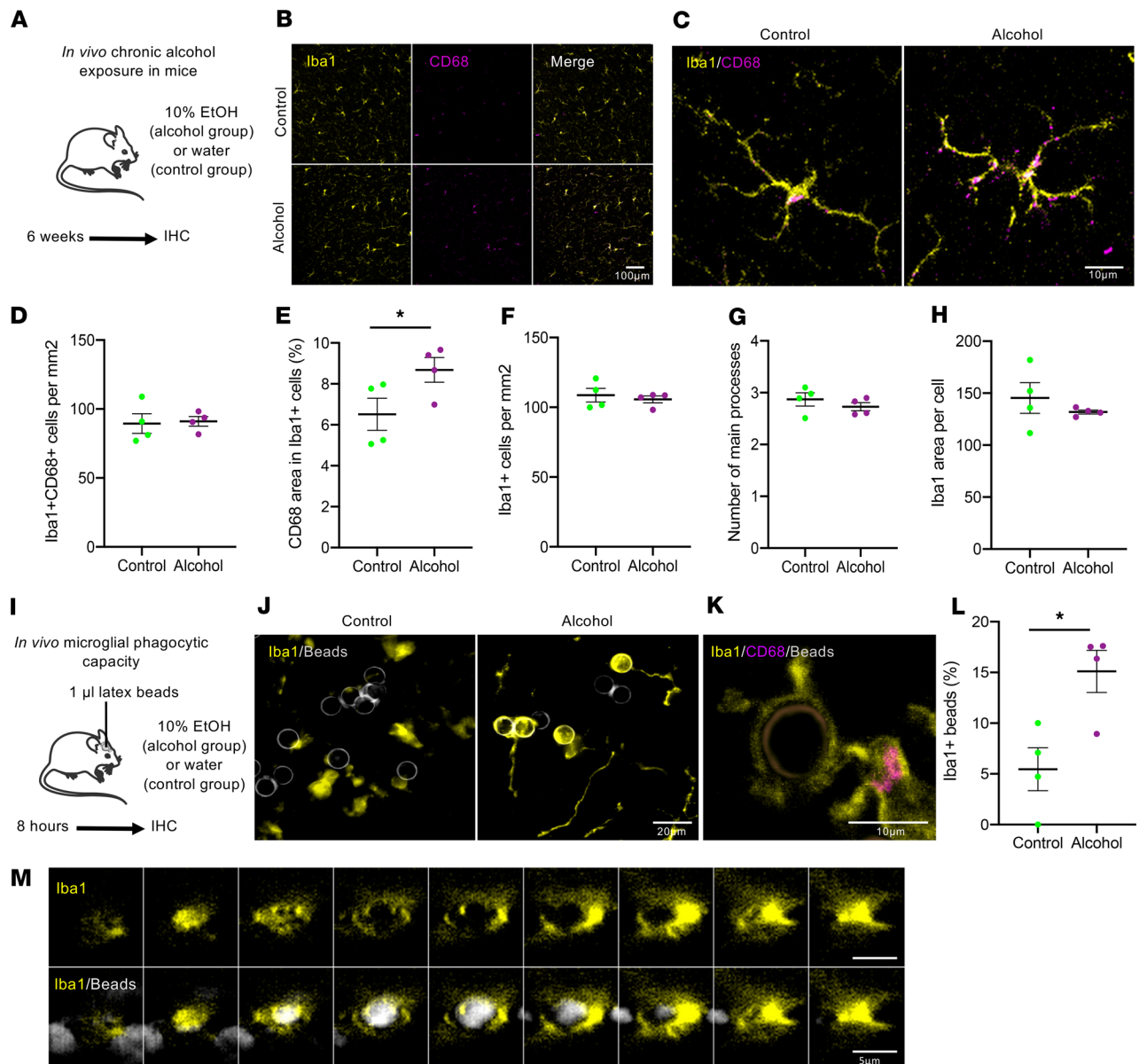
Microglial/macrophage reaction after stroke (Figure 5, D–K) was exacerbated in the ipsilateral cortex of alcohol-exposed mice, with significant increases in (a) the total number of Iba1<sup>+</sup> cells in the peri-infarct area (Figure 5F; *n* = 3 mice/group; *P* < 0.05 vs. control), (b) the number of CD68<sup>+</sup>Iba1<sup>+</sup> cells in the peri-infarct area and the ischemic core (Figure 5G; *n* = 3 mice/group; *P* < 0.05 vs. control), and (c) the area of lysosomal CD68 staining in the ipsilateral hemisphere of alcohol-exposed mice compared with control (Figure 5H; *n* = 3 mice/group; *P* < 0.05 vs. control). The number of processes starting from the soma was significantly decreased in the ipsilateral cortex of alcohol-exposed mice compared with control mice (Figure 5I; *n* = 3 mice/group; *P* < 0.05 vs. control), suggestive of an increased microglial phagocytic phenotype induced by alcohol exposure. Whole cell area of Iba1<sup>+</sup> cells remained unchanged between groups (Figure 5J; *n* = 3 mice/group). The number of CD68<sup>+</sup>Iba1<sup>+</sup> cells was significantly increased in the peri-infarct area of alcohol-exposed mice 24 hours after stroke onset (Figure 5K; *n* = 3 mice/group; *P* < 0.05 vs. control).

Vascular activation was exacerbated in alcohol-exposed mice after stroke (Figure 6, A–F). The area of P-selectin in blood vessels was significantly increased in alcohol-exposed mice 24 hours after stroke onset (Figure 6C; *n* = 3 mice/group; *P* < 0.05 vs. control), although the number of P-selectin<sup>+</sup> blood vessels showed no changes between groups (Figure 6B). Similarly, molecular MRI (Figure 6D) showed significantly increased hyposignals corresponding to P-selectin–coupled MPIOs adhering to blood vessels in the ipsilateral cortex of alcohol-exposed mice 24 hours after stroke onset (Figure 6E; *n* = 5–6 mice/group; *P* < 0.05 vs. control), with no changes in the total number of P-selectin MPIO<sup>+</sup> blood vessels (Figure 6F).

Venular leukocyte adhesion (Figure 6, H and I) and rolling (Figure 6, J and K) were both significantly increased in alcohol-exposed mice compared with control mice (317% and 724% increase, respectively; *n* = 6 mice/group; *P* < 0.05 vs. control) 24 hours after stroke. Schemas in Figure 6G show the relative position of the middle cerebral artery (MCA) occlusion site and the thinned-skull cranial window where in vivo 2-photon imaging was performed.

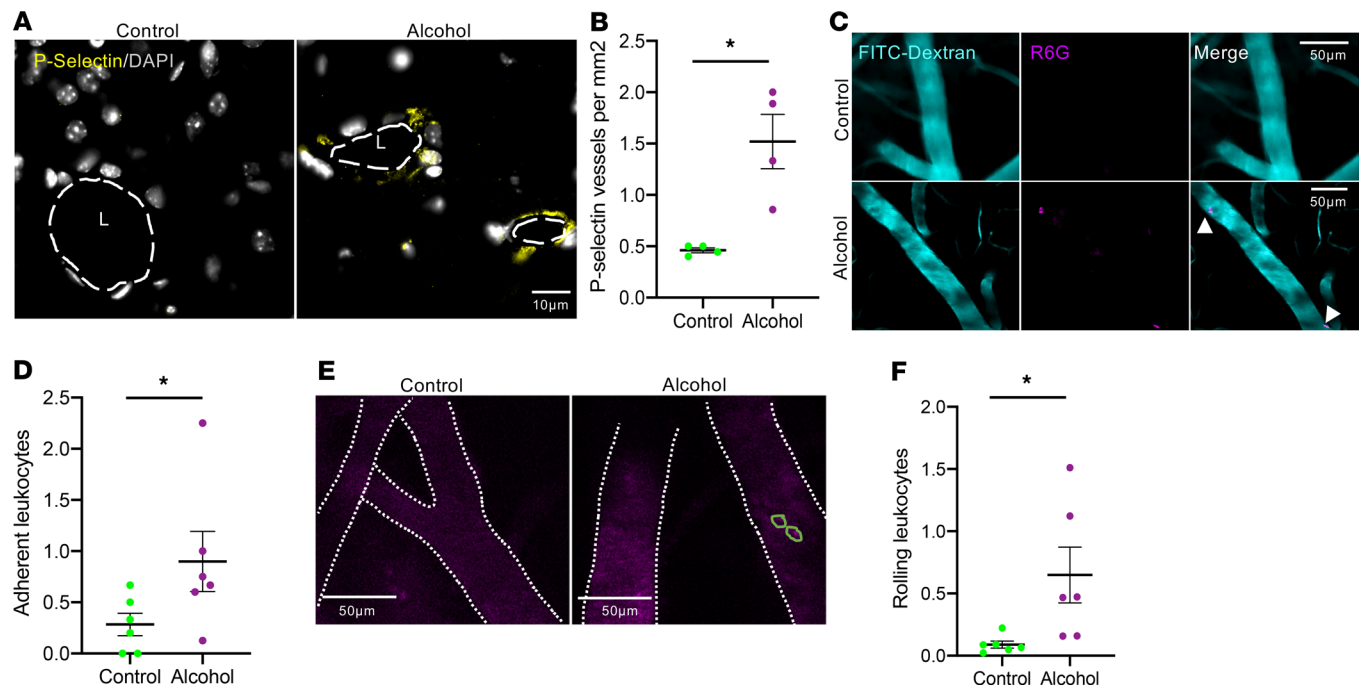
mRNA levels of IL-1β, P-selectin, and TNF were significantly increased in alcohol-exposed mice in the ipsilateral cortex 24 hours after stroke onset compared with control mice (*P* < 0.05; *n* = 6 mice/group; Table 4).

*PVM depletion prevents the aggravating effect of chronic alcohol consumption on ischemic stroke.* In addition to the neurovascular priming profile found in alcohol-exposed mice, we also detected a significant increase in



**Figure 2. Alcohol exposure provokes a microglial priming in mice.** (A) Experimental design to study the effects of chronic alcohol exposure on microglia. (B) Representative photomicrographs of microglial cells stained with Iba1 and CD68. Scale bar: 100 µm. (C) High-magnification representative photomicrographs of microglial cells in control and alcohol-exposed mice. Scale bar: 10 µm. (D) Quantification of Iba1<sup>+</sup>CD68<sup>+</sup> cells. (E) Quantification of CD68 area on Iba1<sup>+</sup> microglial cells. (F) Quantification of Iba1<sup>+</sup> cells. (G) Quantification of the number of processes starting from the soma. (H) Quantification of the area of microglial cells.  $n = 4$  mice per group. (I) Experimental design to in vivo study the microglial phagocytic capacity: 1 µL of latex beads were injected in the cortex of control and alcohol-exposed mice. Eight hours later, phagocytosed latex beads were quantified by immunohistochemical analyses. (J) Representative photomicrographs of Iba1<sup>+</sup> microglial cells and latex beads. Scale bar: 20 µm. (K) Detail of a latex bead phagocytosed by a microglial cell in an alcohol-exposed mouse. Note the lysosomal activation (CD68, red) at the apex of microglial process. Scale bar: 10 µm. (L) Quantification of phagocytosed latex beads/total number of beads.  $n = 4$  mice per group; \* $P < 0.05$  versus Control, Mann-Whitney  $U$  test. (M) Sequential confocal photomicrographs of a phagocytosed latex bead.

the number of brain PVM (Figure 7, A–C;  $n = 4$  mice/group;  $P < 0.05$  vs. control). PVM are a subpopulation of resident brain macrophages located at the perivascular space (Supplemental Figures 2, A–E). In this study, we have measured only submeningeal signals on IHC and in vivo imaging experiments to focus on PVM and no other border-associated macrophages. In addition to their specific shape and location surrounding brain blood vessels (Supplemental Figure 2), in naive conditions, PVM can be distinguished from microglia since they are very low positive for Iba1. PVM can be stained with both CD68 and CD206 (Supplemental Figure 2 and Figure 7, B and C). Concerning the origin of the increased number of PVM



**Figure 3. Alcohol exposure provokes endothelial activation in the brain.** (A) Representative photomicrographs of P-selectin<sup>+</sup> vessels in control and alcohol-exposed mice (note the absence of positive staining in control mice). Dotted lines represent the lumen (L) of the blood vessel. Scale bar: 10  $\mu$ m. (B) Quantification of P-selectin signal in the brain cortex of control and alcohol-exposed mice.  $n = 4$  mice per group. (C) Compilation of in vivo time-lapse images obtained by 2-photon microscopy showing Rhodamine-6G (R6G)<sup>+</sup> leukocyte adhesion (arrowheads) in control and alcohol-exposed mice (note the absence of R6G<sup>+</sup> cells in control mice). Scale bars: 50  $\mu$ m. (D) Quantification of adherent leukocytes. (E) Representative time-lapse images of leukocyte rolling (green circles). Scale bars: 50  $\mu$ m. (F) Quantification of rolling leukocytes per second.  $n = 4$  mice per group. \* $P < 0.05$  versus control, Mann-Whitney  $U$  test.

after alcohol exposure, the longitudinal study of peripheral macrophage accumulation in the brain suggest the absence of a marked peripheral PVM recruitment (Supplemental Figure 3, A–F). Proliferation measurements by Ki67 staining were performed in harvested brains at the end of the alcohol exposure and have not shown positive signals of PVM proliferation (Supplemental Figure 3, G and H), perhaps because the measurements have been done at a single time point at the end of the alcohol exposure period.

To determine the specific role of brain PVM on ischemic stroke outcome in both healthy (naïve) and primed mice (chronically exposed to alcohol), we depleted PVM by injecting clodronate-encapsulated (CLO-encapsulated) liposomes to mice exposed or not to 10% ethanol for 6 weeks (Figure 7D); control mice received PBS-encapsulated liposomes. In the adult brain, the i.c.v. injection of CLO depletes PVM (as well as meningeal macrophages) without affecting microglial cells or peripheral mononuclear cells (21), except for a transient reduction in the number of Kupffer cells in the liver (24). In our study, we have observed that the i.c.v. injection of CLO efficiently depletes PVM, but also provokes a series of inflammatory responses per se. Our data show that CLO acutely induced, per se, an inflammatory response in the ventricle area at 2 days after injection, which was not visible anymore at 6 days by molecular MRI imaging (P-selectin-coupled MPIOs) (Supplemental Figure 4, A and B;  $n = 4$  mice/group). Our IHC data, focused on the injection site (the ventricle area), confirmed the data obtained by MRI and showed the absence of P-selectin<sup>+</sup> staining (Supplemental Figure 4C), as well as no neutrophil infiltration (Ly6G<sup>+</sup> staining) at that time (Supplemental Figure 4D). Microglia was not affected by the injection of CLO (Supplemental Figure 4D;  $n = 4$  mice/group).

Flow cytometry experiments were performed at 5 days after injection, to respect the same timing profile as the one used in the stroke study. Our data show that there were no differences in the numbers of CD45<sup>lo</sup>/CD11b<sup>+</sup> cells (considered as resting microglia; Supplemental Figure 5B), CD45<sup>hi</sup>/CD11b<sup>+</sup> cells (considered as infiltrated macrophages; Supplemental Figure 5C), CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> cells (considered as DCs; Supplemental Figure 5E), or Ly6G<sup>+</sup> cells (considered as granulocytes; Supplemental Figure 5F) between PBS- and CLO-treated mice. However, the numbers of CD45<sup>int</sup>CD11b<sup>+</sup> cells (considered as activated microglia; Supplemental Figure 5D), CD3<sup>+</sup> (considered as total lymphocytes; Supplemental Figure 5G), CD4<sup>+</sup> (Supplemental Figure 5H), and CD8<sup>+</sup> (Supplemental Figure 5I) lymphocytes were increased in CLO-treated mice 5 days after CLO injection.

**Table 4. Alcohol exposure alters the gene expression of inflammatory markers in the brain of mice, both in the absence of any other insult and after ischemic stroke**

|                 |        | IL-1b       | IL-6                           | P-selectin   | TGF-β                           | TLR4        | TNF         | VCAM1                          |
|-----------------|--------|-------------|--------------------------------|--------------|---------------------------------|-------------|-------------|--------------------------------|
| Basal           | C      | 0.19 ± 0.05 | 0.67 ± 0.28                    | 1.89 ± 1.38  | 0.69 ± 0.11                     | 0.80 ± 0.20 | 0.44 ± 0.18 | 0.78 ± 0.15                    |
|                 | A      | 0.54 ± 0.22 | 1.25 ± 0.33                    | 0.44 ± 0.14  | <b>1.00 ± 0.14<sup>A</sup></b>  | 1.27 ± 0.24 | 0.19 ± 0.01 | 1.02 ± 0.21                    |
| MCAo + 24 hours | Contro | C           | 0.14 ± 0.03                    | 0.22 ± 0.06  | 0.99 ± 0.20                     | 0.77 ± 0.18 | 0.06 ± 0.02 | 0.97 ± 0.24                    |
|                 |        | A           | 0.15 ± 0.05                    | 0.11 ± 0.03  | 0.13 ± 0.07                     | 0.82 ± 0.14 | 0.64 ± 0.12 | 0.73 ± 0.13                    |
|                 | Ipsi   | C           | 3.01 ± 0.99                    | 14.00 ± 4.04 | 9.32 ± 1.93                     | 1.90 ± 0.17 | 1.77 ± 0.28 | 1.45 ± 0.23                    |
|                 |        | A           | <b>5.51 ± 0.94<sup>A</sup></b> | 20.54 ± 3.11 | <b>17.52 ± 2.21<sup>A</sup></b> | 2.17 ± 0.26 | 2.31 ± 0.21 | <b>2.51 ± 0.38<sup>A</sup></b> |

Gene expression was calculated using 2 housekeeping genes. The increase of the inflammatory markers expression was exacerbated in alcohol-exposed mice after thromboembolic stroke (basal,  $n = 4$  mice per group; MCAo + 24 hours,  $n = 5$  mice per group; <sup>A</sup> $P < 0.05$  vs. Control basal by Mann-Whitney  $U$  test). MCAo, middle cerebral artery occlusion.

The depletion of PVM was confirmed in vivo 24 hours after the i.c.v. injection of TRITC-Dextran (Figure 7, E–J). To assess the harmlessness of CLO injection on microglial cell numbers, we used CX3CR1-GFP<sup>+/−</sup> mice in which TRITC-Dextran<sup>+</sup> PVM can be distinguished in vivo from GFP<sup>+</sup> microglial cells, since PVM are very low-positive for GFP (Figure 7, E and G). PVM depletion did not alter microglial cell numbers (GFP<sup>+</sup> cells, Figure 7J). The phagocytosis of TRITC-Dextran by PVM was confirmed by IHC; the TRITC-Dextran<sup>+</sup> cells were costained with CD206 (Figure 7F). PVM depletion was confirmed in vivo by 2-photon imaging (Figure 7, E and H;  $P < 0.01$  vs. PBS) and by IHC analyses (CD206 staining; Figure 7, G and I;  $P < 0.01$  vs. PBS).

The specific depletion of PVM by CLO prevented the aggravating effect of chronic alcohol exposure on ischemic lesions (Figure 7, K and L;  $P < 0.05$  vs. PBS;  $n = 5$ –6 mice/group), whereas CLO treatment did not modify ischemic lesions in control mice (not exposed to alcohol) (Figure 7, K and L;  $n = 5$ –6 mice/group).

In order to explore the mechanisms of the beneficial effect of PVM depletion on stroke in alcohol-exposed mice, we studied the immune responses triggered 24 hours after stroke ( $n = 4$  mice/group). We analyzed microglial/macrophage cell numbers (Iba1<sup>+</sup> staining; Figure 8, A and B) and neutrophil infiltration (Figure 8, C and D) in PBS- and CLO-injected mice (PVM-depleted) exposed or not to alcohol. Microglial/macrophage numbers (Figure 8B), P-selectin protein levels (Figure 8, E and F), and VCAM1 protein levels (Figure 8, G and H) were significantly increased after stroke in PBS alcohol-exposed mice compared with PBS-control mice (Figures 8, A and B;  $P < 0.05$  vs. PBS-treated control mice;  $n = 4$  mice/group).

The effects of PVM depletion were different between control and alcohol-exposed mice. PVM-depleted control mice showed significantly more microglia/macrophages (Figure 8B;  $P < 0.05$  vs. PBS control;  $n = 4$  mice/group), as well as more neutrophils (Figure 8D;  $P < 0.05$  vs. naive PBS;  $n = 4$  mice/group) and increased VCAM1 protein levels (Figure 8H,  $P < 0.05$  vs. naive PBS;  $n = 4$  mice/group) in the ipsilateral hemisphere compared with PBS-treated control mice. By contrast, in PVM-depleted alcohol-exposed mice, microglia/macrophage (Figure 8B) and neutrophil (Figure 8D) infiltration — as well as VCAM levels (Figure 8H) — remained unchanged. We only found a significant decrease in P-selectin protein levels between PBS- and CLO-treated alcohol-exposed mice (Figure 8, E and F;  $P < 0.05$  vs. PBS alcohol-exposed mice;  $n = 4$  mice/group).

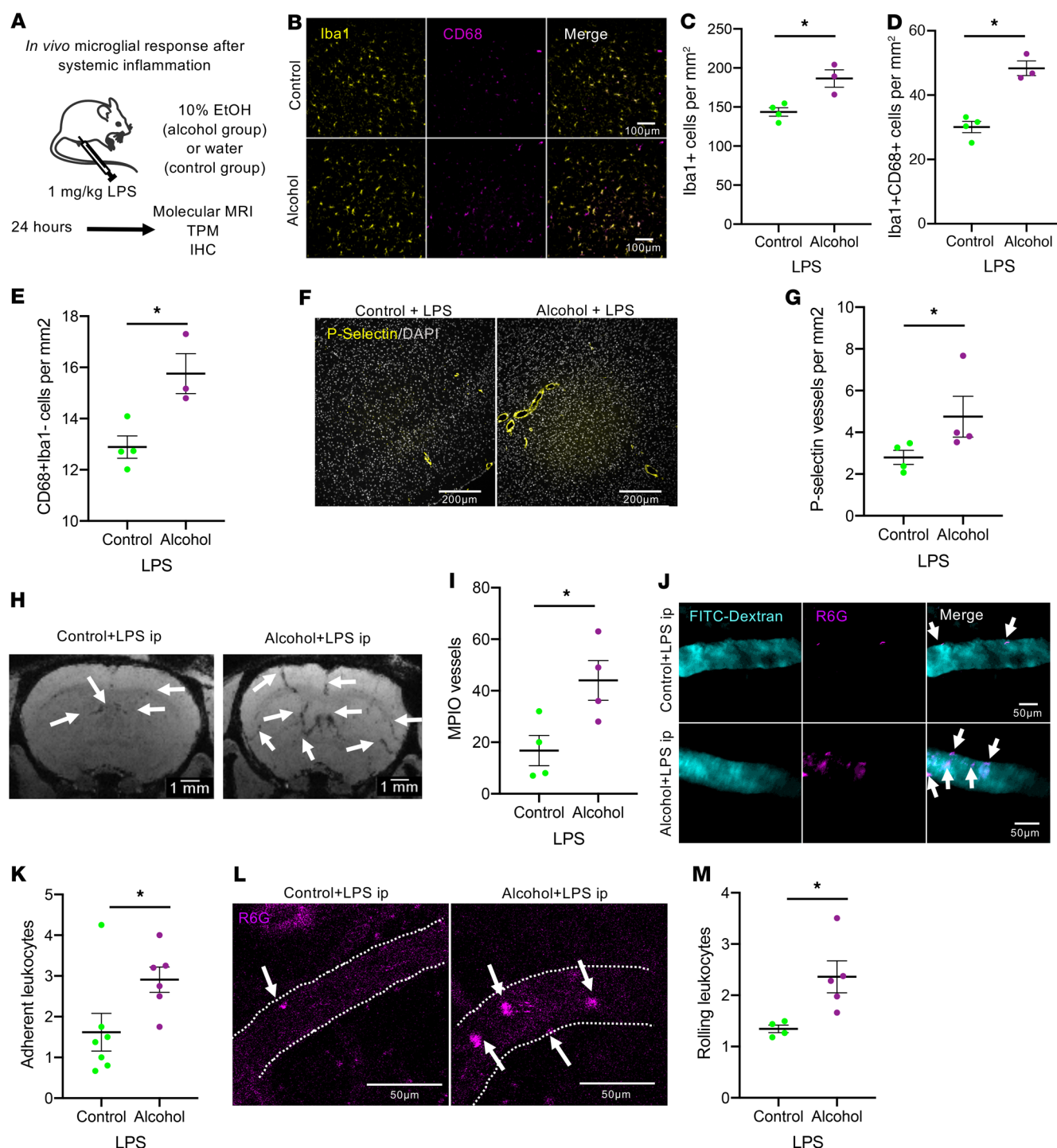
Interestingly, by intravital 2-photon microscopy, we observed that the number of adherent leukocytes was significantly decreased in PVM-depleted mice, independently of alcohol exposure (Figure 8, I, J, L, and M;  $P < 0.05$  vs. PBS-treated mice;  $n = 4$  mice/group). This effect was specific of leukocyte adhesion, since no difference was detected in the number of rolling or circulating leukocytes in any of the groups (Figure 8, K and N).

## Discussion

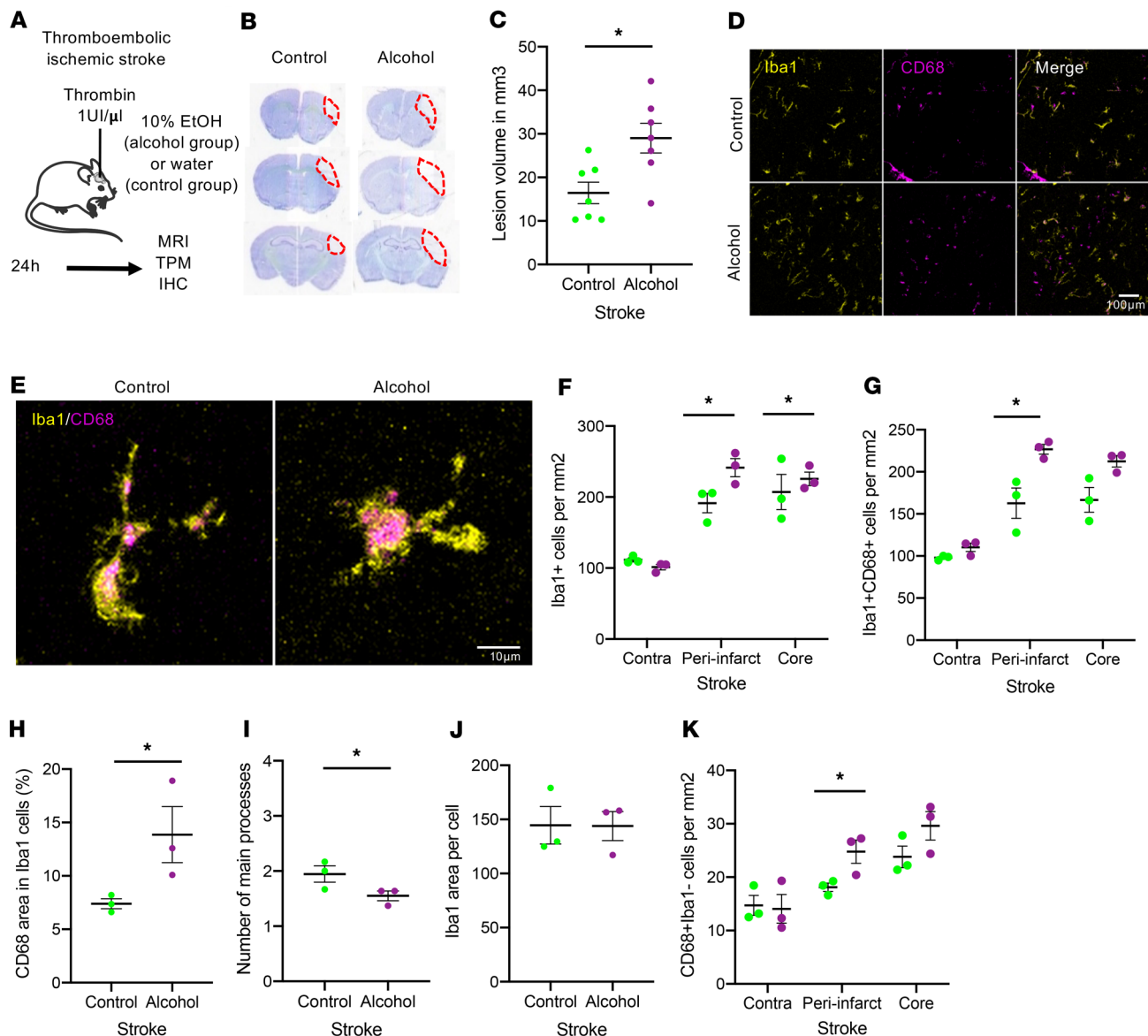
We have performed here a translational study to investigate the effects of chronic alcohol consumption on ischemic stroke outcome. Our clinical results show that HD ( $\geq 6$  drinks/day in the last 5 years) is independently associated (a) to END, (b) to stroke severity baseline, and (c) to higher infarct volume in stroke patients. The baseline characteristics of the study population, and outcomes at 3 months, were similar to those of large multicenter registries, suggesting good external validity of our results (25).

Our results show that the inflammatory response is associated with the risk of END in HD stroke patients. In order to elucidate the role of inflammation on the deleterious effect of HD after stroke, we





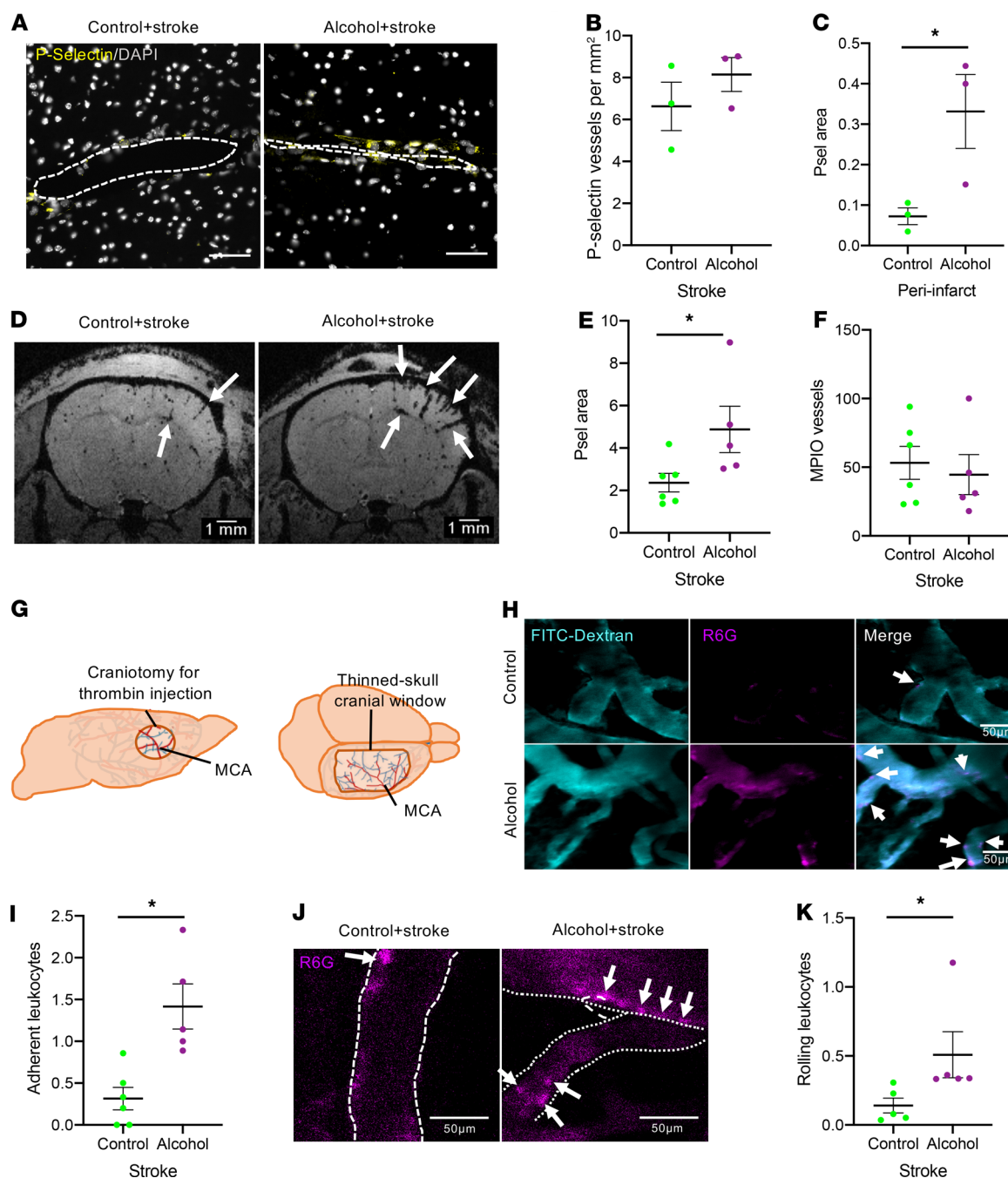
**Figure 4. Alcohol exposure exacerbates brain neurovascular inflammatory reactions after an acute systemic insult in mice.** (A) Experimental design to study whether chronic alcohol exposure provokes exacerbated inflammatory responses after a secondary injury (peripheral acute LPS injection). (B) Representative photomicrographs of the brain cortex of control and alcohol-exposed mice 24 hours after the acute systemic injection of LPS. Scale bars: 100  $\mu$ m.  $n = 5$ –6 mice per group. (C) Quantification of total microglia (Iba1<sup>+</sup> cells). (D) Quantification of activated microglia (Iba1<sup>+</sup>/CD68<sup>+</sup> cells). (E) Quantification of macrophages (CD68<sup>+</sup>/Iba1<sup>+</sup> cells). (F) Representative photomicrographs of P-selectin staining in control and alcohol-exposed mice 24 hours after the acute systemic injection of LPS. Scale bars: 200  $\mu$ m. (G) Quantification of the number of P-selectin<sup>+</sup> blood vessels. (H) Representative T2\*-weighted images showing P-selectin-coupled MPIO in vivo accumulation in the brain of control and alcohol-exposed mice after the acute injection of LPS. Arrows show positive MPIO signals. (I) Quantification of MPIO + blood vessels. (J) Compilation of time-lapse images showing representative in vivo leukocyte adhesion (arrows) obtained by 2-photon microscopy. Scale bars: 50  $\mu$ m. (K) Quantification of leukocyte adhesion. (L) Representative time-lapse images of in vivo leukocyte rolling (see also Supplemental Videos 1 and 2). Scale bars: 50  $\mu$ m. (M) Quantification of rolling leukocytes per second. \* $P < 0.05$  versus control, Mann-Whitney  $U$  test.



**Figure 5. Alcohol exposure increases lesion volume and parenchymal inflammatory responses after ischemic stroke in mice.** (A) Experimental design to study whether chronic alcohol exposure worsens ischemic stroke outcome. (B and C) Representative brain lesions (B) and corresponding quantifications (C) in control and alcohol-exposed mice 24 hours after stroke onset ( $n = 8$  mice/group; \* $P < 0.05$  vs. control mice). (D) Representative photomicrographs of microglial cells and infiltrated macrophages in the ipsilateral cortex 24 hours after stroke onset. Scale bar: 100  $\mu$ m.  $n = 4$  mice per group. (E) High-magnification photomicrographs of microglial cells at the peri-infarct area. Scale bar: 10  $\mu$ m. (F) Quantification of Iba1<sup>+</sup> cells. (G) Quantification of Iba1<sup>+</sup>CD68<sup>+</sup>. (H) Quantification of CD68 area in Iba1<sup>+</sup> cells. (I) Quantification of the number of processes starting from the soma. (J) Quantification of the mean whole cell area of Iba1<sup>+</sup> cells. (K) Quantification of CD68<sup>+</sup>Iba1<sup>+</sup> cells. \* $P < 0.05$ . Mann-Whitney  $U$  test.

performed preclinical experiments in mice exposed to 10% ethanol in drinking water during 6 weeks. Our preclinical findings show that chronic alcohol consumption by itself provokes a neurovascular inflammatory priming. The term “priming” is used to describe the propensity of a particular cell type to make an exaggerated response to a secondary stimulus (26) such as intracerebral or systemic LPS injection (27). Microglial priming was first described in the ME7 model of prion disease (28) but has been replicated in other models of chronic neuroinflammatory pathologies, including Alzheimer’s disease (29) and Parkinson’s disease (30).

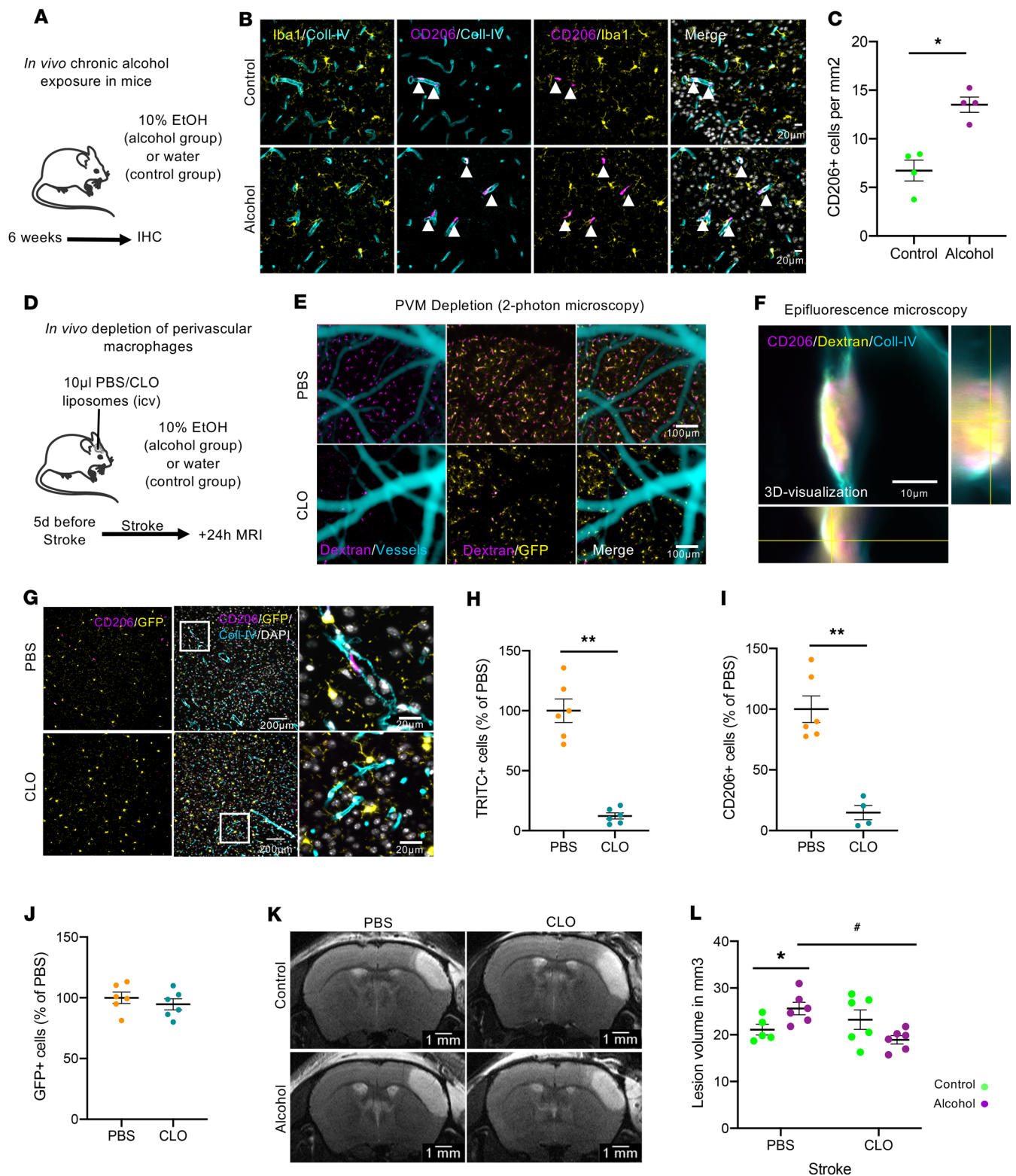
To our knowledge, this is the first study defining a neurovascular inflammatory priming induced by chronic alcohol consumption. This alcohol-driven priming affects the brain parenchyma, as well as the perivascular and vascular compartments. In the parenchyma, it is characterized by (a) an unconventional activation profile of microglial cells, in accordance with results described by Cruz et al. (31), and (b) an increase in the expression of TGF- $\beta$  mRNA not accompanied by changes in proinflammatory



**Figure 6. Alcohol exposure increases vascular inflammatory responses after ischemic stroke in mice.** (A) Representative photomicrographs of P-selectin immunostaining in control and alcohol-exposed mice 24 hours after stroke onset. Scale bars: 50  $\mu$ m. (B) Quantification of the number of P-selectin<sup>+</sup> vessels. (C) Quantification of P-selectin<sup>+</sup> immunostaining area. (D) Representative T2\*-weighted images of in vivo P-selectin molecular imaging. Arrows show MPIO<sup>+</sup> blood vessels ( $n = 5-6$  mice/group). (E) Quantification of MPIO<sup>+</sup> area. (F) Quantification of MPIO<sup>+</sup> blood vessels. (G) Schematic view of the craniotomy performed for thrombin injection, which leads to the occlusion of the MCA and the thinned-skull window for intravital 2-photon imaging. (H) Compilation of representative time-lapse images showing in vivo leukocyte adhesion (arrows) obtained by 2-photon microscopy. Scale bars: 50  $\mu$ m. (I) Quantification of leukocyte adhesion. (J) Representative time-lapse images of in vivo leukocyte rolling. Scale bars: 50  $\mu$ m. (K) Quantification of leukocyte rolling (see also Supplemental Videos 3 and 4).  $n = 4$  mice per group. \* $P < 0.05$  versus control, Mann-Whitney  $U$  test.

cytokines, thus following a similar profile as in priming-driving diseases such as prion disease (32). At the brain perivascular compartment, alcohol provokes an increase in the number of PVM. Finally, at the vascular level, alcohol-induced priming is characterized by increased levels of P-selectin at the endothelial surface, accompanied by an increase in the number of adherent and rolling leukocytes in the brain blood vessels.





**Figure 7. Perivascular macrophages (PVM) mediate the aggravating effect of chronic alcohol consumption on ischemic stroke in mice.** (A) Experimental design to study the effects of chronic alcohol exposure on PVM. (B) Representative photomicrographs of PVM CD206<sup>+</sup>Iba1<sup>+</sup> (arrowheads) cells in control and alcohol-exposed mice. (C) Quantification of PVM (CD206<sup>+</sup> cells). Scale bars: 20  $\mu$ m. (D) Experimental design to deplete PVM in control and alcohol-exposed mice. (E) Representative in vivo Z stack of CX3CR1<sup>GFP+/-</sup> PBS/CLO-injected mice. Blood vessels are visualized through the i.v. injection of FITC-Dextran. Twenty-four hours after the i.c.v. injection of TRITC-Dextran, PVM can be in vivo visualized (note the absence of TRITC-Dextran signals in CLO-treated mice). Microglia are positive for GFP in CX3CR1<sup>GFP+/-</sup> mice. Scale bar: 100  $\mu$ m. (F) Colocalization of CD206 and phagocytosed TRITC-Dextran in PVM (epifluorescence microscopy). Three-dimensional visualization of a double-positive TRITC-Dextran and CD206 PVM for. Scale bar: 10  $\mu$ m. (G) Representative photomicrographs of GFP<sup>+</sup> microglial cells and CD206<sup>+</sup> PVMs in PBS- and CLO-treated mice.

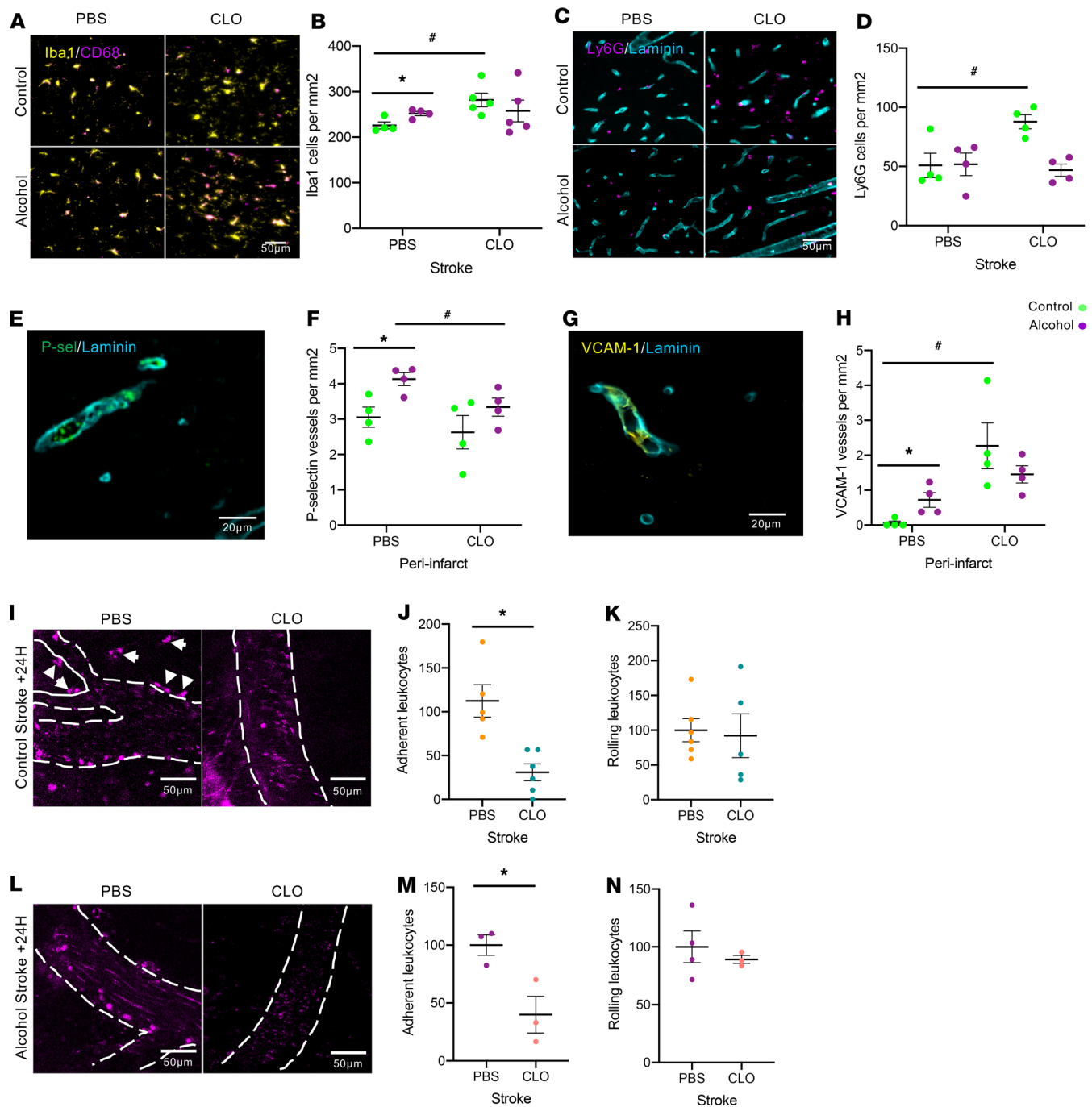
Scale bar: 20  $\mu\text{m}$ . **(H and I)** Quantification of PVM depletion by TRITC<sup>+</sup> cell counting **(H)** and CD206<sup>+</sup> counting **(I)**. **(J)** The number of microglial cells remained unchanged after CLO treatment. **(K)** Representative T2-weighted MRI images showing ischemic lesions in PBS- and CLO-treated naive and alcohol-exposed mice 24 hours after stroke onset. **(L)** Quantification of lesion volumes.  $n = 5\text{--}6$  mice per group; \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$  versus PBS; \* $P < 0.05$  versus control. Mann-Whitney  $U$  test.

We demonstrate here that alcohol provokes a brain inflammatory priming in mice by using 2 different approaches. First, we intracortically injected inert latex beads to control and alcohol-exposed mice. Eight hours after the injection, alcohol-exposed mice showed significantly more phagocytosed beads than control mice, thus demonstrating that chronic alcohol exposure makes microglia more prone to phagocytosis. Second, we systemically injected a single dose of LPS to control and alcohol-exposed mice and studied the subsequent parenchymal, perivascular, and vascular inflammatory responses 24 hours later. In accordance with our priming hypothesis, mice exposed to alcohol showed increased total microglial and activated microglial cell numbers; increased levels of P-selectin in the brain vasculature, characteristic of increased endothelial activation; and significantly increased rolling and adhering leukocyte numbers after the injection of LPS. Previous studies have reported that the exposure of C57BL/6J mice to 10 daily doses of ethanol followed by a LPS or Poly I:C challenge results in a sustained increase of proinflammatory cytokines in the brain compared with control-challenged animals (33, 34).

In accordance with our inflammatory priming hypothesis, our data show that inflammatory responses at the parenchymal, perivascular, and vascular levels were exacerbated in alcohol-exposed mice also after stroke. More precisely, microglial numbers and phagocytic capacity, brain PVM/infiltrated macrophages numbers, P-selectin levels at the brain endothelium, and leukocyte rolling and adhesion to brain vasculature were all exacerbated in alcohol-exposed mice after stroke. Inflammatory responses participate in the progression of ischemic lesions (35), but the causality or consequence relationship between the exacerbation of inflammatory responses and the increased lesion volume is difficult to determine. For this reason, our data on the inflammatory status before the ischemic injury are crucial and show that, even in the absence of stroke, HD alters the inflammatory status in both humans and mice. It has been proposed that inflammatory priming could have significant implications for acute sterile inflammatory insults, such as stroke and traumatic brain injury occurring on a background of aging or neurodegeneration (26). Our data show that chronic HD triggered a similar generalized heightened inflammatory sensitivity than in the aforementioned models of neurodegenerative diseases, and that alcohol-induced inflammatory priming had extremely deleterious consequences in stroke, not only in mice, but also in humans.

Importantly, we show here that PVM are determinant for the exacerbation of ischemic lesions, since their specific depletion by CLO blocks the aggravating effect of chronic alcohol exposure on stroke. Interestingly, the beneficial effect of PVM depletion on lesion volume is exclusive of alcohol-exposed mice, in which PVM numbers are significantly increased. Indeed, PVM accumulation at the perivascular space seems to be deleterious for ischemic stroke outcome, as it has been described in other neurological pathologies such as multiple sclerosis or Alzheimer's disease (for review, see ref. 20). It is also possible that alcohol exposure provokes not only an increase in PVM numbers, but also a shift of PVM phenotype and function from a scavenger, "buffer" cell (16, 17) to a proinflammatory, ROS-producing cell in "primed" conditions (36). In accordance with this hypothesis, it has recently been described that homeostatic subsets of CNS endogenous tissue macrophages are able to quickly change their phenotypes and generate context- and time-dependent subsets (37). An additional question that deserves future studies is whether PVM could drive microglial priming during chronic alcohol exposure, or instead, if microglial cells are responsible for the accumulation of PVM, at the perivascular spaces and the activation of brain endothelial cells.

Concerning the hypothesis of a role of PVM on mediating the stroke-induced inflammatory responses, our data show that, in naive mice, PVM do modulate stroke-induced inflammatory responses such as microglial activation/macrophage infiltration, neutrophil infiltration, endothelial activation, and leukocyte rolling/adhesion *in vivo*. It is important to take into account the effects of CLO, *per se*, found in our study, especially concerning lymphoid cells, which could also modify the post-stroke inflammatory responses. Surprisingly, these altered inflammatory responses are not associated with changes in the final lesion volume between PBS- and CLO-treated naive mice. These data are in accordance with the results reported by Pedragosa et al. (38), in which modifications of granulocyte infiltration in PVM-depleted mice are observed but are not accompanied by changes in final lesion volume in a model of ischemia/reperfusion. These results are in agreement with previous studies showing



**Figure 8. PVM modulate inflammatory responses to stroke in naive mice but not in alcohol-exposed mice.** (A) Representative photomicrographs of different subsets of microglia/macrophages 24 hours after stroke onset at the core of the lesion. Scale bar: 50  $\mu$ m. (B) Quantification of Iba1<sup>+</sup> cells. (C) Representative photomicrographs of Ly6G<sup>+</sup> neutrophils at the core of the lesion. Scale bar: 50  $\mu$ m. (D) Quantification of neutrophil numbers. (E) Representative photomicrographs of P-selectin staining 24 hours after stroke onset. Scale bar: 20  $\mu$ m. (F) Quantification of P-selectin<sup>+</sup> blood vessels. (G) Representative photomicrograph of VCAM1<sup>+</sup> blood vessel 24 hours after stroke onset. Scale bar: 20  $\mu$ m. (H) Quantification of VCAM1<sup>+</sup> blood vessels. (I) Representative photomicrographs obtained by 2-photon microscopy of leukocytes (in magenta, Rhodamine-6G) in PBS- and CLO-treated mice (not exposed to alcohol) 24 hours after stroke onset. Scale bars: 50  $\mu$ m. (J) Quantification of adherent leukocytes. (K) Quantification of circulating/rolling leukocytes. (L) Representative photomicrographs obtained by 2-photon microscopy of leukocytes (in magenta, Rhodamine-6G) in PBS- and CLO-treated mice (exposed to alcohol) 24 hours after stroke onset. Scale bars: 50  $\mu$ m. (M) Quantification of adherent leukocytes. (N) Quantification of circulating/rolling leukocytes.  $n = 4$  mice per group, \* $P < 0.05$  versus PBS; # $P < 0.05$  versus control PBS (B, D, H) and versus alcohol PBS (F). Mann-Whitney  $U$  test.

no impact of leukocyte recruitment on ischemic stroke volume (39, 40). Further studies are needed to better understand the links between final lesion volume and leukocyte infiltration at the ischemic area.

Our data suggest that the previous inflammatory status is critical for the ischemic stroke outcome. In the context of alcohol-induced inflammatory priming, PVM are linked to the aggravating effects of alcohol on stroke lesion volumes, since PVM-depleted mice show smaller lesion volumes. This aggravating effect of alcohol in lesion volume is associated with an increased inflammatory response in which PVM seem to play a critical role, since PVM-depleted mice show an attenuated inflammatory response compared with alcohol-exposed mice with intact PVM. One possible hypothesis to explain this differential role of PVM upon naive conditions and alcohol exposure could be a phenotypic change in PVM during alcohol exposure, as it has been described for other neuroinflammatory conditions (37), that could be crucial in case of a secondary CNS injury such as ischemic stroke.

Although research on PVM has intensified in recent times, we still have many unanswered questions concerning PVM phenotype and origin in pathological contexts. Also, since CLO depletes both meningeal macrophages and PVM, the observed effects cannot be attributed exclusively to PVM. In any case, PVM seem to be potential therapeutic targets for limiting the aggravating effects of risk factors on stroke outcome.

A potential limitation of this study is that we cannot exclude an impact of alcohol withdrawal on the worsening outcome of HD stroke patients and mice. Alcohol-withdrawn neurons are more sensitive to excitotoxic injuries (41) characteristic of early phases of ischemic stroke. Indeed, we cannot exclude that this mechanism also participates to the aggravation of stroke lesions observed in our study, making the exacerbated inflammatory responses observed after stroke the consequence and not the cause of the aggravated stroke outcome. However, our preclinical data obtained on mice not subjected to alcohol withdrawal (the intracortical latex bead-injected mice and the systemic LPS-injected mice) demonstrate that the exacerbated inflammatory response to both latex beads and acute LPS is present even in the absence of alcohol withdrawal. Other mechanisms that could contribute to the aggravation of stroke severity could be an endothelial dysfunction induced by chronic alcohol consumption (42, 43), which could have an impact by itself on microglial priming and PVM accumulation.

Interestingly, our data and the recently published data on the beneficial effect of low-dose alcohol consumption on inflammation following transient focal cerebral ischemia in rats (7) suggest that, similarly to the biphasic effects of alcohol on the risk of ischemic stroke (2), alcohol consumption also could have a biphasic effect on the consequences of ischemic stroke. These data, thus, help to clarify the apparently controversial clinical results found on the impact of alcohol consumption on stroke (4, 5).

In conclusion, we show that chronic alcohol consumption provokes, by itself, a neurovascular inflammatory priming in mice and inflammatory responses in HD patients. We experimentally demonstrate that this priming, notably involving PVM, drives the exacerbation of the damages provoked by a secondary insult such as an ischemic stroke. Our study opens potentially new avenues for the study of strategies targeting the alcohol-induced inflammatory priming before any neurological insult, in order to prevent a worsened neurological outcome in heavy drinkers.

## Methods

*Stroke cohort study population and patient characteristics.* We retrospectively analyzed a cohort of 3,645 ischemic stroke patients from the stroke registry of the Stroke Unit of the Neurology Department of the University Clinical Hospital of Santiago de Compostela (Spain) included from January 2010 to December 2016. Acute management (diagnostic and treatment) of patients with stroke was performed according to the protocol described by the European Stroke Organization.

*Stroke outcome variables.* To evaluate the influence of chronic alcohol consumption on the outcome of stroke patients, the following primary outcomes variables were considered: (a) neurological stroke severity determined by the NIHSS at admission, 24 hours, and 48 hours; (b) END; (c) infarct volume determined by CT scan between the 4th and 7th day after admission; (d) degree of disability at 3 months assessed by modified Rankin scale (mRS); and (e) percentage of patients with good outcome at 3 months (mRS  $\leq$  2).

To determine the association between chronic alcohol consumption and inflammatory response, the following biological variables were included in the analysis: (a) leukocyte numbers, (b) fibrinogen, (c) CRP, and (d) sedimentation rate. Axillary temperature over 37.5°C at admission was also considered as a marker of hyperthermia.

History of arterial hypertension was considered when the blood pressure was more than 140/90 mmHg at least 2 different days before stroke onset, if the patient was diagnosed for hypertension, or when



the patient was under antihypertensive treatment. History of diabetes disease was defined as serum glucose levels of 7.0 or more mmol/L, if the patient was diagnosed of diabetes, or when the patients was under diabetic medication. Smoking patients were defined as those patients who presented smoking habits in the last 5 years. HD habits were defined as a daily alcohol consumption of 6 or more drinks/day in the last 5 years.

Stroke cohort statistical analyses are detailed in the Supplementary Methods.

*HD patients without stroke.* We retrospectively analyzed data from an independent cohort including 34 patients with a DSM-5 (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th edition) diagnostic of severe Alcohol Use Disorder (AUD) (HD patients) and 21 healthy control subjects. All the participants were informed about the study, approved by the local ethics committee (CPP Nord Ouest III, IDRCB: 2011-A00495-36), and provided their written informed consent before their inclusion.

Blood samples were collected from fasted participants, either at inclusion (control subjects) or the day after admission to hospital (HD patients). Immune cell counts (leukocytes, neutrophils, eosinophils, basophils, lymphocytes, and monocytes) were measured in all participants. CRP levels were measured only in HD patients.

Additional information about this cohort and statistical analyses are detailed in the Supplemental Methods.

*Experimental study design.* The goal of this study was to investigate the impact of HD on stroke outcome and describe the underlying mechanisms in an experimental model of ischemic stroke in mice.

Animals were randomized to treatment groups, and all analyses were performed by investigators blinded to group allocation. Unblinding was performed after completion of statistical analysis. All animal experiments were performed and reported in accordance with the Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments (ARRIVE) guidelines (<http://www.nc3rs.org.uk>).

*Animals.* Two-month-old male Swiss mice (35–45 g) (Centre Universitaire de Ressources Biologiques, Normandy University, Caen, France) were housed at 21°C in a 12-hour light/dark cycle with food and water (control group) or a 10% (v/v) alcohol solution (alcohol group) with ad libitum access for 6 weeks. All mice were checked daily for fluid consumption, health, and abnormal behavior. The average daily liquid intake and weight gain were similar between both groups (~6 mL of liquid intake/mouse/day and a weight gain of ~6 g between the beginning and the end of the alcohol exposure period; final weight ~40 g in both groups). Blood alcohol levels (BAL) were measured at the pharmacology unit of Caen University Hospital (Caen, France) in mice at the end of the 6 weeks of alcohol exposure ( $n = 10$  mice). At the moment of the blood extraction, only 3 of 10 mice showed positive BAL values (0.39, 0.54, and 0.63 g/L); the rest of the mice showed nondetectable values ( $<0.1$  g/L).

For intravital 2-photon imaging of PVM, male C57BL/6J CX3CR1-GFP<sup>+/−</sup> mice (The Jackson Laboratory and in-house) were used ( $n = 6$  mice/group).

All the procedures needing anesthesia of the mice were performed by an initial exposure to 5% isoflurane, followed by a maintaining phase of 1.5%–2% isoflurane 30%O<sub>2</sub>/70%N<sub>2</sub>O.

*Thromboembolic focal cerebral ischemia.* We used the in situ thromboembolic stroke model consisting of the injection of thrombin directly into the middle cerebral artery as described before (9). In order to mimic clinical conditions, alcohol solutions were changed by water after stroke onset and until killing. Additional information is provided in the Supplementary Methods.

*I.p. LPS injection.* A subset of control and alcohol-exposed mice ( $n = 5$ –6 mice per group) were i.p. injected with a single dose of the bacterial endotoxin LPS (1 mg/kg) (Sigma-Aldrich) (44) and underwent 2-photon imaging and molecular MRI 24 hours after the injection of LPS. Alcohol-exposed mice maintained free access to the alcohol solution after LPS injection and until killing.

*In vivo microglial phagocytic capacity measurement.* The protocol consisted of the injection of 1  $\mu$ L of nonionic latex beads in the brain cortex and was modified from Hughes et al. (45). Details are provided in the Supplemental Methods.

*Vascular adhesion molecular imaging.* MPIOs (diameter 1.08  $\mu$ m) (Invitrogen) covalently conjugated to purified polyclonal goat anti-mouse antibodies for P-selectin (R&D Systems, clone AF737) were prepared as previously described (46). Details are provided in the Supplemental Methods.

*In vivo detection of BBB leakage.* Three-dimensional T1 FLASH sequences (spatial resolution 70  $\mu$ m  $\times$  70  $\mu$ m; Echo time/repetition time (TE/TR) 4.46/15; 3 averages; 4 minutes, 2 seconds) were used before and 15 minutes after the i.v. injection of 200  $\mu$ L of a solution containing 50  $\mu$ L of Gadolinium chelate (DOTAREM) diluted in saline, as previously described (47). Additional information is provided in the Supplemental Methods.

*Near-infrared detection of BBB leakage.* NIRF imaging experiments were performed using a PhotonIMAGER (Biospace), as previously described (48). Additional information is provided in the Supplemental Methods.

**Depletion of PVM.** A total of 10  $\mu$ L of PBS-liposomes (PBS group) or CLO-encapsulated liposomes (CLO group) were injected in the left lateral ventricle. Additional information is provided in the Supplemental Methods.

In order to minimize the proinflammatory effects of CLO, *per se*, the i.c.v. injection of CLO was performed 5 days before the stroke.

**In vivo macrophage labeling for the follow-up study of macrophage accumulation in the brain.** A total of 200  $\mu$ L of 2 mg Fe/kg of nude MPIOs were injected i.v. to naive mice and T2\*-w acquisitions were performed at different times after its injection to detect peripheral macrophage accumulation at the brain perivascular spaces. Additional details are provided in the Supplemental Methods.

**Intravital 2-photon microscopy.** Intravital 2-photon microscopy was performed through a thin-skull cranial window to measure leukocyte rolling and adhesion, as well as PVM visualization. Details are provided in the Supplemental Methods.

**Flow cytometry analysis.** Five days after the i.c.v. injection of PBS or CLO, mice were deeply anesthetized with isoflurane 5% and intracardially perfused with 1 $\times$  PBS (Sigma-Aldrich). Cell isolation from brains (without the cerebellum) and flow cytometry acquisition were performed as previously described (47) to obtain 2 separate panels for myeloid cells or lymphoid cells (see Supplemental Table 6 and Supplemental Figure 5A). Data were analyzed with the FlowJo 7.6.5 software (TreeStar Inc.). Data are expressed as total cell count for each sample.

**Quantitative PCR analyses.** Details on the methods for quantitative PCR (qPCR) analyses are provided in the Supplemental Methods. Primers used for this study are detailed in Supplemental Table 5.

**IHC.** Epifluorescence and confocal microscopy analyses were performed in brain sections and isolated brain vessels. Details on the protocol and methods are provided in the Supplemental Methods.

**Statistics.** Results are the mean  $\pm$  SEM. Statistical analyses were performed by the Mann-Whitney *U* test using the Statview software.

**Study approval.** Stroke patient registry was approved by the Ethics Committee of Galicia (CEIC) (Spain, protocol code 201/516). Signed informed consent was obtained from patients or a relative before study inclusion. Experimental studies were approved by the French ministry of education and research (Project 3748; Center agreement D14118001). All the participants were informed about the study, approved by the local ethics committee (CPP Nord Ouest III, IDRCB 2011-A00495-36) and provided their written informed consent before their inclusion. All animal experiments were performed and reported in accordance with the Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments (ARRIVE) guidelines (<http://www.nc3rs.org.uk>), in accordance with French laws (act no. 87-848; Ministère de l'Agriculture et de la Forêt) and European Communities Council Directives of November 24, 1986 (86/609/EEC) guidelines, and they have been approved by the ethical committee (affiliation 3748).

## Author contributions

MR designed and coordinated the study and was responsible for stroke model surgeries. AD and DL performed histological and transcriptional analyses, as well as in vivo functional analyses of microglial phagocytosis. AD, DL, AQ, and EL were responsible for molecular MRI. AD and MR were responsible for 2-photon microscopy. AD, DL, and MN analyzed immunohistochemical samples. MG and MR analyzed flow cytometry. AL and ALP analyzed data from the ALCOBRAIN cohort of HD patients. FC and JC analyzed data and writing of results from the stroke cohort of patients. DV supervised the study. MR wrote the manuscript with the revision and approval of all authors.

## Acknowledgments

The authors are grateful to Carine Ali and Fabian Docagne for their valuable scientific suggestions, as well as Laurent Coulbaut for the analyses of human samples from the ALCOBRAIN cohort. The authors thank Véronique Lelong-Boulouard for the BAL measurements. This study was funded by the Fondation pour la Recherche en Alcoologie (MR), the AXA Research Found (MR), INSERM, Caen-Normandy University, the Regional Council of Normandy, the ANR grant RHU MARVELOUS (ANR-16-RHUS-0009) (DV), and ANR "Retour jeune chercheur" (ALP).

Address correspondence to: Marina Rubio, PHIND Boulevard Henri Becquerel 14074 Caen Cedex, Caen, France. Phone: 33.2.31.47.01.55; Email: [rubio@cyceron.fr](mailto:rubio@cyceron.fr).

1. Rehm J, et al. Defining substance use disorders: do we really need more than heavy use? *Alcohol Alcohol*. 2013;48(6):633–640.
2. Larsson SC, Wallin A, Wolk A, Markus HS. Differing association of alcohol consumption with different stroke types: a systematic review and meta-analysis. *BMC Med*. 2016;14(1):178.
3. Kadlecová P, Andel R, Mikulík R, Handing EP, Pedersen NL. Alcohol consumption at midlife and risk of stroke during 43 years of follow-up: cohort and twin analyses. *Stroke*. 2015;46(3):627–633.
4. Ducroquet A, et al. Influence of chronic ethanol consumption on the neurological severity in patients with acute cerebral ischemia. *Stroke*. 2013;44(8):2324–2326.
5. Gatttringer T, et al. IV thrombolysis in patients with ischemic stroke and alcohol abuse. *Neurology*. 2015;85(18):1592–1597.
6. Zhao H, Mayhan WG, Arrick DM, Xiong W, Sun H. Dose-related influence of chronic alcohol consumption on cerebral ischemia/reperfusion injury. *Alcohol Clin Exp Res*. 2011;35(7):1265–1269.
7. McCarter KD, et al. Effect of Low-Dose Alcohol Consumption on Inflammation Following Transient Focal Cerebral Ischemia in Rats. *Sci Rep*. 2017;7(1):12547.
8. Lemarchand E, et al. Impact of alcohol consumption on the outcome of ischemic stroke and thrombolysis: role of the hepatic clearance of tissue-type plasminogen activator. *Stroke*. 2015;46(6):1641–1650.
9. Orset C, et al. Mouse model of in situ thromboembolic stroke and reperfusion. *Stroke*. 2007;38(10):2771–2778.
10. Orset C, et al. Efficacy of Alteplase in a Mouse Model of Acute Ischemic Stroke: A Retrospective Pooled Analysis. *Stroke*. 2016;47(5):1312–1318.
11. Imhof A, Froehlich M, Brenner H, Boeing H, Pepys MB, Koenig W. Effect of alcohol consumption on systemic markers of inflammation. *Lancet*. 2001;357(9258):763–767.
12. Alho H, Sillanaukee P, Kalela A, Jaakkola O, Laine S, Nikkari ST. Alcohol misuse increases serum antibodies to oxidized LDL and C-reactive protein. *Alcohol Alcohol*. 2004;39(4):312–315.
13. He J, Crews FT. Increased MCP-1 and microglia in various regions of the human alcoholic brain. *Exp Neurol*. 2008;210(2):349–358.
14. Goldmann T, et al. Origin, fate and dynamics of macrophages at central nervous system interfaces. *Nat Immunol*. 2016;17(7):797–805.
15. He H, et al. Perivascular Macrophages Limit Permeability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2016;36(11):2203–2212.
16. Kida S, Steart PV, Zhang ET, Weller RO. Perivascular cells act as scavengers in the cerebral perivascular spaces and remain distinct from pericytes, microglia and macrophages. *Acta Neuropathol*. 1993;85(6):646–652.
17. Mendes-Jorge L, et al. Scavenger function of resident autofluorescent perivascular macrophages and their contribution to the maintenance of the blood-retinal barrier. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50(12):5997–6005.
18. Mato M, et al. Involvement of specific macrophage-lineage cells surrounding arterioles in barrier and scavenger function in brain cortex. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93(8):3269–3274.
19. Fabrick BO, et al. CD163-positive perivascular macrophages in the human CNS express molecules for antigen recognition and presentation. *Glia*. 2005;51(4):297–305.
20. Faraco G, Park L, Anrather J, Iadecola C. Brain perivascular macrophages: characterization and functional roles in health and disease. *J Mol Med*. 2017;95(11):1143–1152.
21. Faraco G, et al. Perivascular macrophages mediate the neurovascular and cognitive dysfunction associated with hypertension. *J Clin Invest*. 2016;126(12):4674–4689.
22. Anrather J, Iadecola C. Inflammation and Stroke: An Overview. *Neurotherapeutics*. 2016;13(4):661–670.
23. Perego C, Fumagalli S, De Simoni MG. Temporal pattern of expression and colocalization of microglia/macrophage phenotype markers following brain ischemic injury in mice. *J Neuroinflammation*. 2011;8:174.
24. Polfliet MM, Goede PH, van Kesteren-Hendriks EM, van Rooijen N, Dijkstra CD, van den Berg TK. A method for the selective depletion of perivascular and meningeal macrophages in the central nervous system. *J Neuroimmunol*. 2001;116(2):188–195.
25. Dávalos A et al. Citicoline in the treatment of acute ischaemic stroke: an international, randomised, multicentre, placebo-controlled study (ICTUS trial). *Lancet*. 2012;380(9839):349–357.
26. Hennessy E, Griffin ÉW, Cunningham C. Astrocytes Are Primed by Chronic Neurodegeneration to Produce Exaggerated Chemokine and Cell Infiltration Responses to Acute Stimulation with the Cytokines IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ . *J Neurosci*. 2015;35(22):8411–8422.
27. Cunningham C, Wilcockson DC, Campion S, Lunnon K, Perry VH. Central and systemic endotoxin challenges exacerbate the local inflammatory response and increase neuronal death during chronic neurodegeneration. *J Neurosci*. 2005;25(40):9275–9284.
28. Perry VH, Cunningham C, Boche D. Atypical inflammation in the central nervous system in prion disease. *Curr Opin Neurol*. 2002;15(3):349–354.
29. Sly LM, et al. Endogenous brain cytokine mRNA and inflammatory responses to lipopolysaccharide are elevated in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Brain Res Bull*. 2001;56(6):581–588.
30. Pott Godoy MC, Tarelli R, Ferrari CC, Sarchi MI, Pitossi FJ. Central and systemic IL-1 exacerbates neurodegeneration and motor symptoms in a model of Parkinson's disease. *Brain*. 2008;131(Pt 7):1880–1894.
31. Cruz SA, et al. Loss of IRF2BP2 in Microglia Increases Inflammation and Functional Deficits after Focal Ischemic Brain Injury. *Front Cell Neurosci*. 2017;11:201.
32. Cunningham C, Boche D, Perry VH. Transforming growth factor beta1, the dominant cytokine in murine prion disease: influence on inflammatory cytokine synthesis and alteration of vascular extracellular matrix. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2002;28(2):107–119.
33. Qin L, He J, Hanes RN, Pluzarev O, Hong JS, Crews FT. Increased systemic and brain cytokine production and neuroinflammation by endotoxin following ethanol treatment. *J Neuroinflammation*. 2008;5:10.
34. Qin L, Crews FT. Chronic ethanol increases systemic TLR3 agonist-induced neuroinflammation and neurodegeneration. *J Neuroinflammation*. 2012;9:130.
35. Iadecola C, Anrather J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat Med*. 2011;17(7):796–808.
36. Capone C, Faraco G, Park L, Cao X, Davisson RL, Iadecola C. The cerebrovascular dysfunction induced by slow pressor doses of angiotensin II precedes the development of hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;300(1):H397–H407.
37. Jordão MJC, et al. Single-cell profiling identifies myeloid cell subsets with distinct fates during neuroinflammation. *Science*.

- 2019;363(6425):eaat7554.
38. Pedragosa J, et al. CNS-border associated macrophages respond to acute ischemic stroke attracting granulocytes and promoting vascular leakage. *Acta Neuropathol Commun.* 2018;6(1):76.
  39. Harris AK, Ergul A, Kozak A, Machado LS, Johnson MH, Fagan SC. Effect of neutrophil depletion on gelatinase expression, edema formation and hemorrhagic transformation after focal ischemic stroke. *BMC Neurosci.* 2005;6:49.
  40. Schmidt A, et al. Targeting Different Monocyte/Macrophage Subsets Has No Impact on Outcome in Experimental Stroke. *Stroke.* 2017;48(4):1061–1069.
  41. Rubio M, et al. Pharmacological activation/inhibition of the cannabinoid system affects alcohol withdrawal-induced neuronal hypersensitivity to excitotoxic insults. *PLoS ONE.* 2011;6(8):e23690.
  42. Mayhan WG. Responses of cerebral arterioles during chronic ethanol exposure. *Am J Physiol.* 1992;262(3 Pt 2):H787–H791.
  43. Sun H, Patel KP, Mayhan WG. Tetrahydrobiopterin, a cofactor for NOS, improves endothelial dysfunction during chronic alcohol consumption. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001;281(5):H1863–H1869.
  44. Montagne A, et al. Ultra-sensitive molecular MRI of cerebrovascular cell activation enables early detection of chronic central nervous system disorders. *Neuroimage.* 2012;63(2):760–770.
  45. Hughes MM, Field RH, Perry VH, Murray CL, Cunningham C. Microglia in the degenerating brain are capable of phagocytosis of beads and of apoptotic cells, but do not efficiently remove PrPSc, even upon LPS stimulation. *Glia.* 2010;58(16):2017–2030.
  46. Quenault A, et al. Molecular magnetic resonance imaging discloses endothelial activation after transient ischaemic attack. *Brain.* 2017;140(1):146–157.
  47. Drieu A et al. Immune Responses and Anti-inflammatory Strategies in a Clinically Relevant Model of Thromboembolic Ischemic Stroke with Reperfusion. *Transl Stroke Res.* September 2019.
  48. Marcos-Contreras OA, et al. Hyperfibrinolysis increases blood-brain barrier permeability by a plasmin- and bradykinin-dependent mechanism. *Blood.* 2016;128(20):2423–2434.



## **Supplementary Materials**

1. Supplementary Methods
2. Supplementary Tables
3. Supplementary Figures

## **Supplementary Methods**

### **Stroke cohort statistical analyses**

Results were expressed as percentages for categorical variables and as mean ( $\pm$ SD) or median and range [25th and 75th percentiles] for continuous variables depending on whether their distribution was normal or not. The Kolmogorov-Smirnov test was used to assess normality. Proportions were compared using the chi-square or Fisher test, while the continuous variables between groups were compared with the Student's t or the Mann-Whitney test depending on whether their distribution was normal or not. Bivariate correlations were performed using Pearson's coefficient (normally distributed variables) or Spearman's coefficient (variables without normal distribution).

The association between heavy drinking and early neurological deterioration (END) was assessed using logistic regression analysis; the influence on infarct volume was assessed by multiple linear regression models. Both logistic regression analysis and multivariate linear regression models were adjusted for those variables which showed biological relevance for each endpoint in order to avoid spurious associations. Results were expressed as adjusted odds ratios (ORs) or B estimate with the corresponding 95% confidence intervals (95% CI). Statistical significance was set at  $P < 0.05$ . The statistical analysis was conducted in SPSS 20.0 (IBM, Chicago, IL, USA) for Mac.

## **Heavy drinking (HD) patients without stroke**

HD patients were recruited in the Addiction Unit of the University Hospital of Caen (Normandy, France) while they were receiving withdrawal treatment as inpatients. They all met alcohol-dependence criteria according to the DSM-IV and AUD according to the DSM-V for at least 5 years. Control subjects were interviewed with the Alcohol Use Disorders Identification Test (AUDIT; (1)), in order to verify that they were not at risk for alcohol misuse or alcohol dependence (score <6 for women and <7 for men). Participants were matched for age, sex and body mass index (BMI).

Exclusion criteria for all the participants were: neurological diseases, active infectious disease, cardiovascular or psychiatric diseases, cancer, depression [Beck questionnaire, (2)], anxiety [State-Trait Anxiety Inventory scale, STAI A et B parts, (3)], or misuse of any other substance than alcohol (excepting tobacco) [misuse and/or dependence measured by the Fagerström score (4)].

The normality of the distribution of the laboratory measures for the HD and control groups was examined using the Shapiro Wilk test. *Student's t* tests were used to compare the two groups for measures of immune cell counts and CRP.

## **Thromboembolic Focal Cerebral Ischemia**

Anesthetized mice were placed in a stereotaxic device, a small craniotomy was performed, the dura was excised, and the middle cerebral artery (MCA) was exposed. A pulled glass micropipette was introduced into the lumen of the MCA and 1  $\mu$ L (1 UI/ $\mu$ L) of purified murine alpha-thrombin (Enzyme Research Labs, USA) was pneumatically injected to induce MCA occlusion (MCAo) by the *in situ* formation of a clot. Lesion volumes were quantified on Image J 24 hours after stroke onset by regular thionin staining or T2-w MRI scans.

## ***In vivo* microglial phagocytic capacity measurement**

One  $\mu\text{l}$  of nonionic latex beads ( $6\text{ }\mu\text{m}$ ) (1:50, Molecular Probes, Life Technologies, USA) were gently injected in the brain cortex (2.2 mm lateral, -1.6 mm ventral to bregma) of anesthetized mice ( $N=4$  mice/group) with a glass micropipette (angle  $335^\circ$ ). The micropipette was left *in situ* for 2 min before slow withdrawal and then mice were sutured. Eight hours after the injection, mice were terminally anesthetized and prepared for immunohistochemical analyses. Alcohol-exposed mice kept free access to the alcohol solution after beads injection and until killing. The number of latex beads completely surrounded by Iba1<sup>+</sup> staining was counted in the ipsilateral cortex of control and alcohol-exposed mice. All beads forming clusters of more than 20 beads were omitted (tight clusters might prevent access of microglial cells to individual beads). The total number of beads phagocytosed was divided by the total not phagocytosed to calculate a ratio for each animal and these ratios were averaged for four animals in each treatment group.

### **Vascular adhesion molecular imaging**

The quality of conjugated MPIOs was systematically checked in a naive mouse, by stereotaxic injection of LPS ( $1\mu\text{l}$ ,  $1\text{mg/kg}$ ) in the striatum (0.5mm anterior, 2.0mm lateral, -3mm ventral to the Bregma).

Three-dimensional high resolution T2\*- weighted gradient echo imaging with flow compensation (spatial resolution of  $70\text{ mm} \times 70\text{ mm} \times 70\text{ mm}$  interpolated to an isotropic resolution of  $70\text{ }\mu\text{m}$ ), TE/TR 13.2ms/200 ms and a flip angle of  $21^\circ$  was performed to visualize MPIOs. MRI acquisitions started immediately after the intravenous injection of MPIOs ( $200\text{ }\mu\text{l}$  of  $2\text{ mg Fe/kg}$  of conjugated MPIOs). All T2\*-weighted images presented are minimum intensity projections of six consecutive slices. For the ischemic stroke study, signal void quantification on 3D T2\*-weighted images was measured by using automatic triangle threshold in ImageJ software and results presented as MPIOs-induced signal void on the contralateral cortex divided by the signal void on the structure of interest (in percent). For the LPS study,

only cortical blood vessels (which were identified as straight lines in hyposignal on T2\*-weighted images) were counted.

### **In vivo detection of blood-brain barrier (BBB) leakage**

Analyses were performed on ImageJ by comparing the same brain area before and after gadolinium injection in control and alcohol-exposed mice (n=4/group). A positive control was performed on a stroke mouse (5 days after stroke) (Supplementary Figures 1G, H).

### **Near-infrared detection of BBB leakage**

To allow the detection of Evan's blue (EB) at 650 nm, 4 mice per group were intravenously injected with 200  $\mu$ L of 2% EB. EB was allowed to circulate for 60 minutes, and then deeply anesthetized mice were transcardially perfused with cold heparinized saline (15 mL/min; 75 mL) before organ removal. The brain was placed in a photon-imager (Biospace, France) and images were acquired with excitation filter set at 600 nm and emission filter at 700 nm. The photon count of the whole brain was measured ex vivo and normalized at 100% for control animal using M3 vision software (Biospace). A positive control was performed on a stroke mouse (24h after stroke) (Supplementary Figures 1C, D).

### **Depletion of perivascular macrophages (PVM)**

Anesthetized mice were placed in a stereotaxic device. Then the skin was removed and a small craniotomy was performed (coordinates: -0.2mm anteroposterior; +1mm lateral; -2mm depth from the Bregma). A glass micropipette containing 10 $\mu$ l PBS-liposomes (PBS group) or clodronate-encapsulated liposomes (CLO group) (purchased at [clodronateliposomes.com](http://clodronateliposomes.com)) was inserted and the product was gently injected in the left lateral ventricle during 20 minutes. CLO liposomes injected into the cerebral ventricles are phagocytized by PVM and, once in the cytosol, CLO acts as a cytotoxic ATP analog, which impairs mitochondrial oxygen consumption leading to cell death (11).

### ***In vivo* fluorescent PVM labelling for intravital microscopy**

Three days after the injection of liposomes, a glass micropipette was inserted at the aforementioned coordinates and 3  $\mu$ l of TRITC-Dextran (4.4 kDa, Sigma Aldrich, France) were gently injected.

### ***In vivo* macrophage labelling for the follow-up study of macrophage accumulation in the brain**

Two hundred microliters of 2 mg Fe/kg of nude Micro-sized Particles of Iron Oxide (MPIOs) (diameter 1.08  $\mu$ m) (Invitrogen) were injected iv to naïve mice. The day after, a first 3D T2\*-weighted (T2\*-w) gradient echo imaging of flow compensation (spatial resolution 70  $\mu$ m<sup>3</sup> isotropic, TE/TR 13.2ms/200ms and a flip angle of 21°) acquisition was performed to control the absence of MPIOs signal. Mice were then exposed to alcohol during 6 weeks, and 3D T2\*-w acquisitions were performed at 2 and 6 weeks after exposure. Control mice were subjected to the same experimental protocol but were given access only to tap water. A positive control was performed by intracortically injecting a single dose of LPS.

### **Thin-skull cranial window**

Anesthetized mice used for two-photon experiments underwent thin-skull cranial window for the cortical *in vivo* detection of leukocyte rolling and adhesion. The head skin was opened to expose the skull and the right parietal bone was completely polished with a drill to leave only a thin layer of bone enabling the visualization of cortical cerebral blood vessels by transparency. The imaged area corresponds to the right somatosensory cortex (see Figure 6G).

### **Intravital two-photon microscopy**

Anesthetized mice were placed in a stereotaxic device and aqueous medium was deposited between the thin-skull window and the X25 immersive objective. One hundred  $\mu$ l of

Rhodamine 6G (1mg/kg) and 100  $\mu$ l of 70kDa FITC-Dextran (5mg/ml) (Sigma Aldrich, France) were injected in the tail vein to stain circulating leukocytes and to visualize the lumen of blood vessels, respectively. Acquisitions were performed using a Leica TCS SP5 MP microscope at 840 nm two-photon excitation wavelength (Coherent Chameleon, USA). Photomultiplier (PMT) 2 (recorded capacity: 500-550nm; gain 850V; offset 0) and PMT3 (recorded capacity: 565-605nm; gain 850V; offset 0) were used. The pulsing laser characteristics were: gain 23%; trans 17%; offset 50%.

#### *Leukocyte rolling/adhesion counting*

Leukocyte adhesion and rolling to venular endothelium were measured after the intravenous injection of 100  $\mu$ l of Rhodamine 6G (1mg/kg) and 100  $\mu$ l of 70kDa FITC-Dextran (5mg/ml) (Sigma Aldrich, France) to stain circulating leukocytes and visualize the lumen of blood vessels, respectively.

For adherent leukocyte quantification, the images obtained by time-lapse (2 minutes, 7.7 frames per second, 256x256 pixel resolution, 1000Hz frequency) were compiled and red spots, corresponding to adherent leukocytes, were counted for each group (N=4-5 mice per group). For rolling leukocytes, we used the Kymograph plugin on ImageJ software (developed by **J. Rietdorf** and **A. Seitz**) (line width perpendicular to vessel lumen: 10; size pixel<sup>2</sup> after threshold: (2-5)-infinity). Leukocytes that were too fast were considered as background and not counted as rolling leukocytes.

#### *Two-photon in vivo PVM visualization*

In a separate subset of mice, TRITC<sup>+</sup> (PVM labelled) and GFP<sup>+</sup> (microglial cells from CX3CR1<sup>GFP+/-</sup>) signals were evaluated two days after PBS/CLO-encapsulated liposomes (N=6 mice per group). Z stacks (60-80  $\mu$ m depth) were acquired from sub-meningeal regions to avoid

any fluorescent signal coming from the meninges. PVM depletion was confirmed both *in vivo* (2-photon imaging) and by IHC (CD206<sup>+</sup> staining).

### **Quantitative PCR analyses**

Terminally anesthetized mice (N=6/group) were transcardially perfused with cold heparinized saline (15 mL) and brains were excised. Cortex were dissected and maintained at −80 °C until messenger RNA (mRNA) extraction. Tissues were dissociated in TRI reagent (Sigma; Lyon, France), and RNA was isolated by the addition of chloroform. Total RNA was washed by ethanol and treated with TURBO DNase (Ambion; Saint Aubin, France). Total RNA was quantified by spectrophotometry (NanoDrop Technologies; Wilmington, USA). Reverse transcription from 1 µg of total RNA (or water as an internal control) was performed with the iScript Select cDNA Synthesis kit (Bio-Rad; Marnes-la-Coquette, France) in a total volume of 20 µL with the following cycle conditions: 42 °C (90 min); 85 °C (5 min). The cDNA products were then stored at −20 °C until their use.

Quantitative PCR was performed with 1 µL of 1:20 diluted cDNA, water and the RT-qPCR internal control), that were analyzed in 15 µL total of a 1× solution of iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad; Marnes-la-Coquette, France) containing 200 nM of each primer. Based on mRNA coding sequences ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)), mouse-specific primers were designed by using the Primer3Plus software (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) (Supplementary table 5). Two housekeeping genes (Hmbs and Ppib) were used. Assays were run in triplicate on the CFX96 real-time system c1000 thermal cycler (Bio-Rad; Marnes-la-Coquette, France), with the following cycle conditions: 95 °C (3 min); [95 °C (2 s), 60 °C (20 s)] × 39; 70 °C (30 s).

### **Immunohistochemistry**

Terminally anesthetized mice were transcardially perfused with cold heparinized saline (15 mL) and fixed with 100 mL of 2% paraformaldehyde and 0.2% picric acid phosphate buffer (pH 7.4) (N=4 mice/group). Brains were post-fixed with 2% paraformaldehyde and 0.2% picric acid phosphate buffer (18 hours; 4°C) and cryoprotected (sucrose 20% in PBS; 24 hours; 4°C) before freezing in Tissue-Tek (Miles Scientific, Naperville, IL, USA). Cryostat-cut sections (10 µm excepting latex beads experiment, where 20 µm sections were used) were collected on polylysine slides and stored at – 80°C before processing.

Sections were co-incubated overnight with rabbit anti-mouse Iba1 (1:1000, Wako 019-19741), rat anti-mouse CD68 (1:800, Abcam 53444), rat anti-mouse CD206 (1:200, Serotec, clone MR5D3), goat anti-mouse P-selectin (1:1000, RD System AF737), goat anti-mouse Collagen-IV (1:1000, SouthernBiotech 1340), rabbit anti-mouse Aquaporin 4 (sc 20812, Santa Cruz), rabbit anti-mouse Ki67 (1:1000, Abcam 15580). Primary antibodies were revealed by using Fab'2 fragments of Donkey anti-rabbit linked to FITC, anti-rat linked to Cy3, anti-goat IgG linked to Cy5 (1:600, Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA). Washed sections (5 sections/mouse) were coverslipped with antifade medium containing DAPI. Epifluorescence images (~10 images/section) were digitally captured using a Leica DM6000 epifluorescence microscope coupled coolsnap camera, visualized with Leica MM AF 2.2.0 software (Molecular Devices, USA) and further processed using ImageJ 1.51k software. Studied regions were always located at the brain cortex [ipsi (peri-infarct and core) and contralateral cortices for stroke experiments]. Specificity controls were performed by not adding primary antibodies.

#### *Confocal microscopy analysis of microglial activation*

Microglial morphology and activation were analyzed on confocal images taken on a Leica TCS SP5 MP microscope. Using the X40 oil immersive objective, images were randomly taken using LAS AF Leica Software and analyses were performed using ImageJ 1.51k software. Iba1 analyses allowed the quantification of microglial cell numbers, soma area and number of main



processes starting from the soma. CD68 staining in Iba1<sup>+</sup> cells allowed the quantification of the activation of microglial cells. For this latter analysis, after thresholding CD68 and Iba1 channels, we used the Image Calculator ImageJ plugin to collect the mask of CD68 only in Iba1<sup>+</sup> cells. After that, we measured the area of Iba1 mask cell per cell, and the area of CD68 inside each cell in both groups (N=800-1000 cells/group; N=4 mice per group).

#### *Microscopy of isolated brain vessels*

Terminally anesthetized mice were transcardially perfused with cold heparinized saline (15 mL/min). Brain were then dissociated in a solution of HEPES and HBSS and then centrifuged at 2000g at 4°C during 10 min. Most of myelin is eliminated at this step, and vessels form a pellet. The pellet was then suspended in a solution of HEPES/HBSS and Dextran (Dextran from Leuconostoc spp. Mr ~70,000 kDa, Sigma-Aldrich) and centrifuged at 4400g at 4°C during 15 min. Remaining myelin is eliminated here. Vessels were then suspended in a solution of HEPES/HBSS and BSA 1% and filtrated on a 20µm mesh filter. After that, vessels stay on the filter. Vessels were then detached from the filter in a PBS solution. Vessels were then put on a poly-lysine coated slides, cryoprotected overnight in a 20% sucrose PBS solution and fixed during 15 min with PBS 0.1 M, pH 7.4 containing 2% paraformaldehyde and 0.2% picric acid. Slide were stored at -80°C before processing.

## **Supplementary Tables**

Supplementary Table 1: Multivariate analysis of early neurological deterioration adjusted by heavy drinking (HD) (Model A) and by HD and inflammatory markers (Model B).

Supplementary Table 2: Multivariate analysis of early neurological deterioration adjusted by age or gender (Model A) and by age or gender and inflammatory markers (Model B).

Supplementary Table 3: Bivariate correlations: Infarct volume.

Supplementary Table 4: Linear regression analysis of infarct volume.

Supplementary Table 5: Detailed sequences of mouse primers used for qPCR analyses.

Supplementary Table 6: List of antibodies used for flow cytometry analyses.

**Supplementary Table 1:** Multivariate analysis of early neurological deterioration adjusted by heavy drinking (HD) (Model A) and by HD and inflammatory markers (Model B).

Model A

|                            | <b>OR</b> | <b>CI 95%</b> | <b>p</b> |
|----------------------------|-----------|---------------|----------|
| Hemorrhagic transformation | 3.68      | 1.75 - 7.77   | 0.001    |
| Infarct volume             | 1.01      | 1.00 - 1.01   | < 0.0001 |
| NIHSS on admission         | 0.93      | 0.89 - 0.96   | < 0.0001 |
| Heavy drinking             | 4.49      | 2.94 - 6.86   | < 0.0001 |

Model B

|                            | <b>OR</b> | <b>CI 95%</b> | <b>p</b> |
|----------------------------|-----------|---------------|----------|
| Hemorrhagic transformation | 4.65      | 2.08 - 10.41  | < 0.0001 |
| Infarct volume             | 1.00      | 1.00 - 1.00   | < 0.0001 |
| NIHSS on admission         | 0.91      | 0.87 - 0.95   | < 0.0001 |
| Heavy drinking             | 2.45      | 1.01 - 5.91   | < 0.0001 |
| Axillary temperature       | 1.05      | 0.74 - 1.50   | 0.756    |
| Leukocytes                 | 1.06      | 0.99 - 1.13   | 0.066    |
| C-reactive protein         | 1.05      | 1.00 - 1.08   | 0.019    |

**Supplementary Table 2:** Multivariate analysis of early neurological deterioration adjusted by age or gender (Model A) and by age or gender and inflammatory markers (Model B)

| Model A                    |      |              |         |
|----------------------------|------|--------------|---------|
|                            | OR   | CI 95%       | p       |
| Age                        | 1.00 | 0.99 - 1.02  | 0.287   |
| Women                      | 1.56 | 0.98 - 2.12  | 0.075   |
| Hemorrhagic transformation | 3.53 | 1.46 - 8.13  | 0.001   |
| Infarct volume             | 1.01 | 1.00 - 1.01  | <0.0001 |
| NIHSS on admission         | 0.96 | 0.85 - 0.99  | <0.0001 |
| Heavy drinking             | 5.22 | 2.18 - 7.35  | <0.0001 |
| Model B                    |      |              |         |
|                            | OR   | CI 95%       | p       |
| Age                        | 1.00 | 0.99 - 1.02  | 0.309   |
| Women                      | 1.35 | 0.95 - 2.93  | 0.092   |
| Hemorrhagic transformation | 4.19 | 1.97 - 12.13 | 0.001   |
| Infarct volume             | 1.01 | 1.00 - 1.01  | <0.0001 |
| NIHSS on admission         | 0.94 | 0.82 - 0.99  | 0.001   |
| Heavy drinking             | 3.19 | 1.86 - 8.13  | <0.0001 |
| Axillary temperature       | 1.00 | 0.53 - 2.18  | 0.804   |
| Leukocytes                 | 1.03 | 0.92 - 1.28  | 0.175   |
| C-reactive protein         | 1.08 | 1.05 - 1.12  | <0.0001 |

**Supplementary Table 3:** Bivariate correlations: Infarct volume

|                                   | <b>Pearson or Spearman</b> |          |
|-----------------------------------|----------------------------|----------|
|                                   | <b>coefficient</b>         | <b>P</b> |
| Age                               | 0.099                      | < 0.0001 |
| Sex                               | 0.072                      | 0.001    |
| History of hypertension           | 0.040                      | 0.077    |
| History of diabetes               | 0.009                      | 0.688    |
| History of smoking                | - 0.039                    | 0.095    |
| History of dyslipemia             | - 0.009                    | 0.677    |
| History of ischemic heart disease | 0.040                      | 0.074    |
| Axillary temperature              | 0.117                      | < 0.0001 |
| Leukocytes                        | 0.139                      | < 0.0001 |
| Fibrinogen                        | 0.074                      | 0.003    |
| C-reactive protein                | 0.191                      | < 0.0001 |
| tPA treatment                     | - 0.135                    | < 0.0001 |
| Trombectomy                       | - 0.045                    | 0.043    |
| Hemorrhagic transformation        | 0.167                      | < 0.0001 |
| NIHSS on admission                | 0.426                      | < 0.0001 |
| Early neurological deterioration  | 0.176                      | < 0.0001 |
| TOAST                             | - 0.090                    | < 0.0001 |
| Heavy drinking                    | 0.052                      | 0.021    |

**Supplementary Table 4:** Linear regression analysis of infarct volume

|                                  | <b>B</b> | <b>CI 95 %</b>    | <b>p</b> |
|----------------------------------|----------|-------------------|----------|
| Age                              | - 0.13   | - 0.41 to 0.15    | 0.359    |
| Sex                              | 3.42     | - 4.23 to 11.08   | 0.381    |
| Axillary temperature             | 12.28    | 6.25 to 18.31     | < 0.0001 |
| Leukocytes                       | 0.89     | - 0.29 to 2.08    | 0.141    |
| Fibrinogen                       | 0.01     | - 0.03 to 0.05    | 0.721    |
| C-reactive protein               | 1.27     | 0.32 to 2.22      | 0.009    |
| tPA treatment                    | - 8.07   | - 16.11 to - 0.02 | 0.049    |
| Trombectomy                      | - 10.87  | - 31.68 to 9.94   | 0.306    |
| Hemorrhagic transformation       | 5.03     | - 0.26 to 10.32   | 0.062    |
| NIHSS on admission               | 5.56     | 4.91 to 6.20      | < 0.0001 |
| Early neurological deterioration | 40.40    | 25.17 to 55.63    | < 0.0001 |
| TOAST                            | - 2.25   | - 5.25 to 0.75    | 0.142    |
| Heavy drinking                   | 19.66    | 8.03 to 31.30     | 0.001    |

**Supplementary Table 5:** Detailed sequences of mouse primers used for qPCR analyses

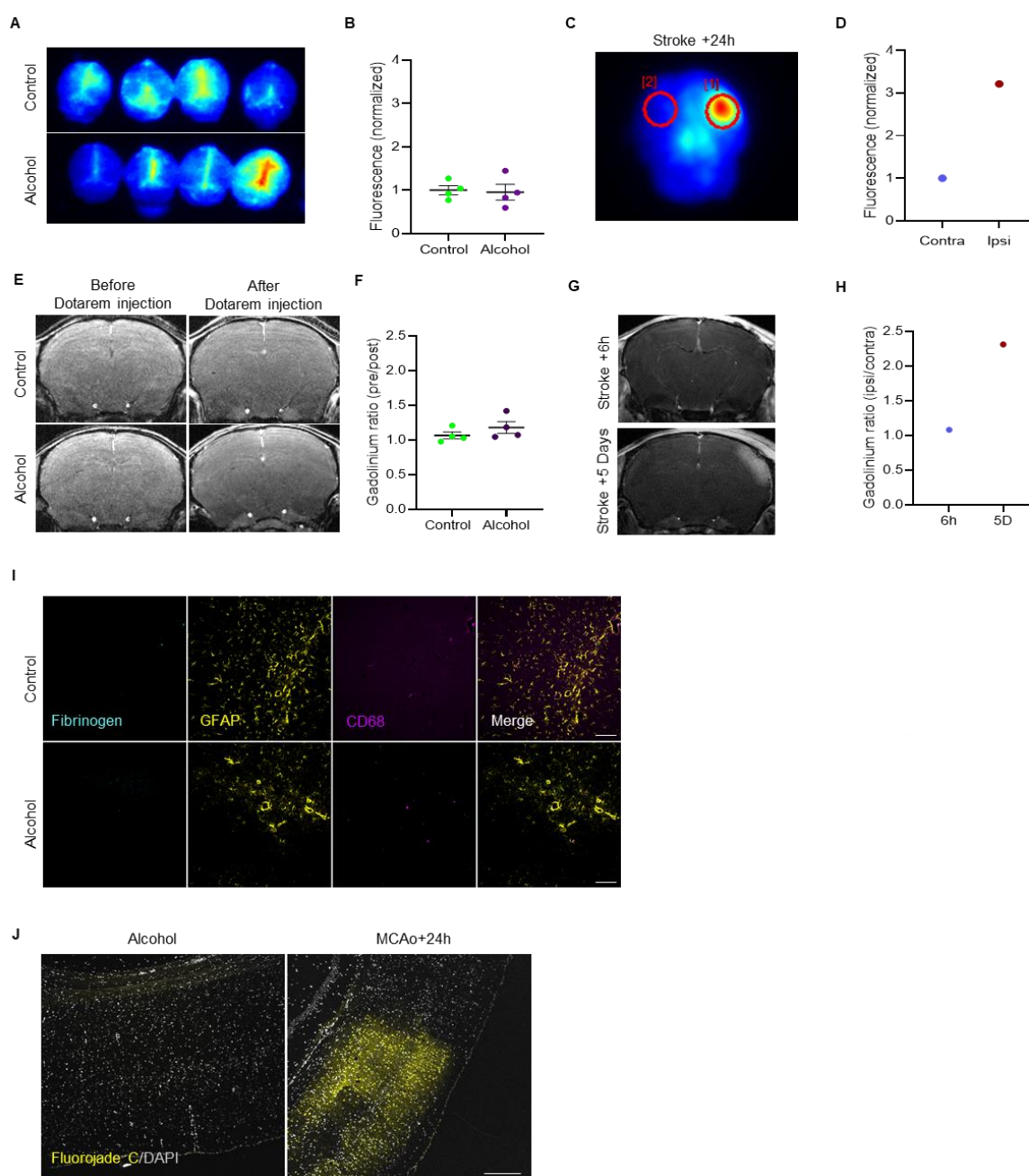
| Gene         | Forward sequence       | Reverse sequence       |
|--------------|------------------------|------------------------|
| TNF $\alpha$ | TCTACTGAACTTCGGGGTGA   | AGGGTCTGGGCCATAGAACT   |
| IL-1 $\beta$ | GACCTTCCAGGATGAGGACA   | AGGCCACAGGTATTTTGTCG   |
| IL-6         | GACAAAGCCAGAGTCCTTCAG  | GCCACTCCTTCTGTGACTCC   |
| TGF $\beta$  | GGCTACCATGCCAACTTCTG   | TGGTTGTAGAGGGCAAGGAC   |
| VCAM-1       | GAACCCAAACAGAGGCAGAG   | TGAGCAGGTCAGGTTACAG    |
| ICAM         | AGGGCTGGCATTGTTCTCTA   | CTTTGGGATGGTAGCTGGAA   |
| P-selectin   | GGCAAGTGGAATGATGAACC   | CCATAGAAGCCTGGGTAGCA   |
| Hmbs         | GAAATCATTGCTATGTCCACCA | GGGTTTTCTAGCTCCTTGGTAA |
| Ppib         | CAAGACCTCCTGGCTAGACG   | TTCTCCACCTTCCGTACCAC   |

**Supplementary Table 6: List of antibodies used for flow cytometry analyses.**

| <b>Antibody<br/>-Lymphoid cell panel-</b>             | <b>Clone</b> | <b>Isotype</b>            | <b>Quantity per test</b> | <b>Supplier / Reference</b> |
|-------------------------------------------------------|--------------|---------------------------|--------------------------|-----------------------------|
| BV510 Hamster anti-mouse CD3e                         | 145-2C11     | Armenian hamster IgG1, κ  | 0.6 µg                   | BD Biosciences /563024      |
| APC Rat anti mouse CD4                                | RM4-5        | Rat (DA) IgG2a, κ         | 0.6 µg                   | BD Biosciences /553051      |
| PE-Cy7 Rat anti-mouse CD8a                            | 53-6.7       | Rat (LOU) IgG2a, κ        | 0.6 µg                   | BD Biosciences /552877      |
| <b>Antibody<br/>-Myeloid cell panel -</b>             | <b>Clone</b> | <b>Isotype</b>            | <b>Quantity per test</b> | <b>Supplier / Reference</b> |
| BV510 Hamster anti-mouse CD3e                         | 145-2C11     | Armenian hamster IgG1, κ  | 0.6 µg                   | BD Biosciences /563024      |
| BV421 Rat anti-mouse CD11b                            | M1/70        | Rat (DA) IgG2b, κ         | 0.6 µg                   | BD Biosciences /562605      |
| APC Rat anti-mouse CD11c                              | HL3          | Armenian Hamster IgG1, λ2 | 0.6 µg                   | BD Biosciences /550261      |
| PE-Cy7 Rat anti-mouse CD45                            | 30-F11       | Rat (LOU) IgG2b, κ        | 0.6 µg                   | BD Biosciences /561868      |
| FITC Rat anti-mouse Ly-6G                             | 1A8          | Rat (LEW) IgG2a, κ        | 1 µg                     | BD Biosciences /551460      |
| <b>Antibody<br/>-Fc Blocking-</b>                     | <b>Clone</b> | <b>Isotype</b>            | <b>Quantity per test</b> | <b>Supplier / Reference</b> |
| Purified Rat anti-mouse CD16/CD32 (Mouse BD Fc Block) | 2.4G2        | Rat IgG2b, κ              | 0.5 µg                   | BD Biosciences /553142      |



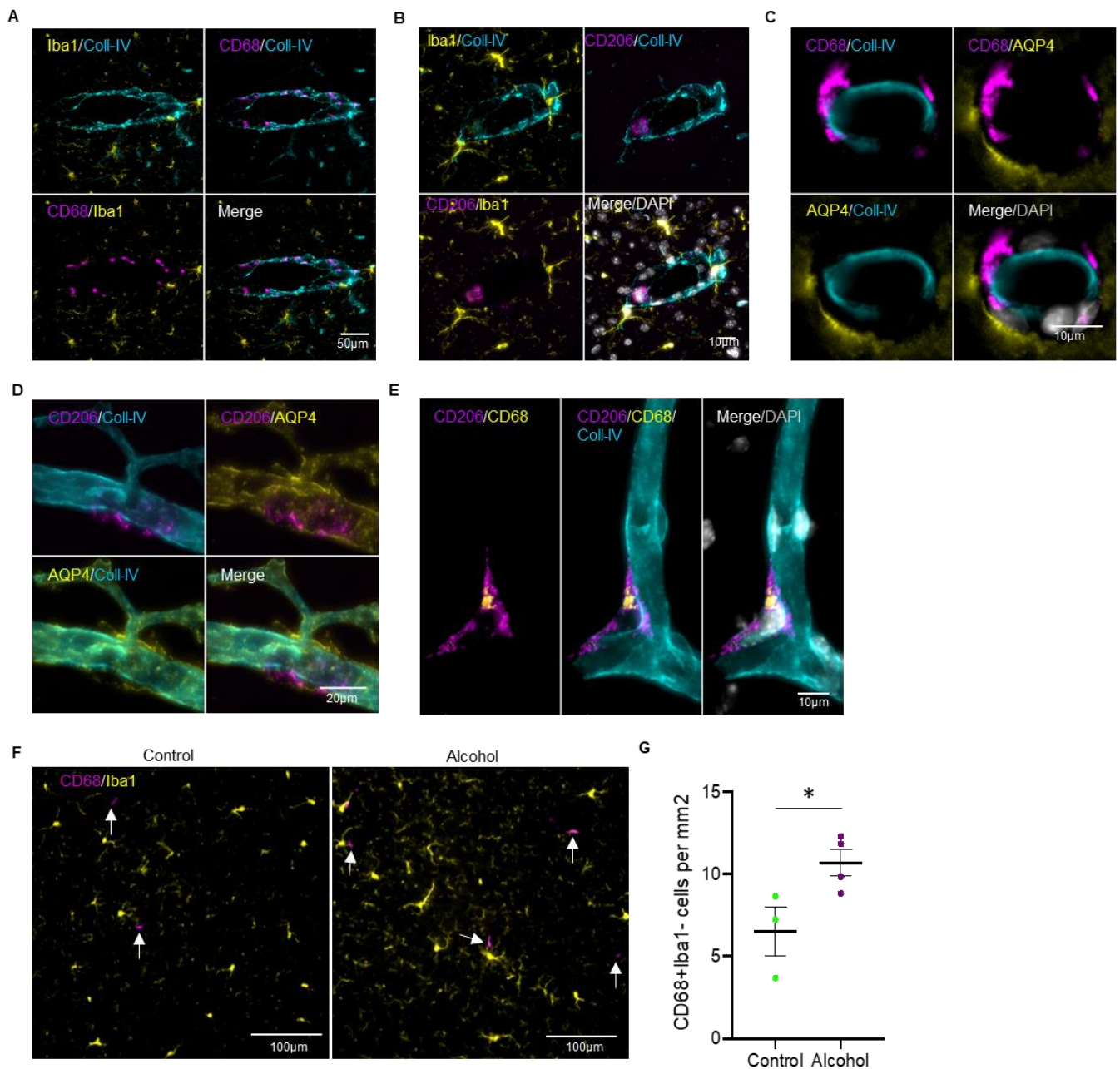
## Supplementary Figures



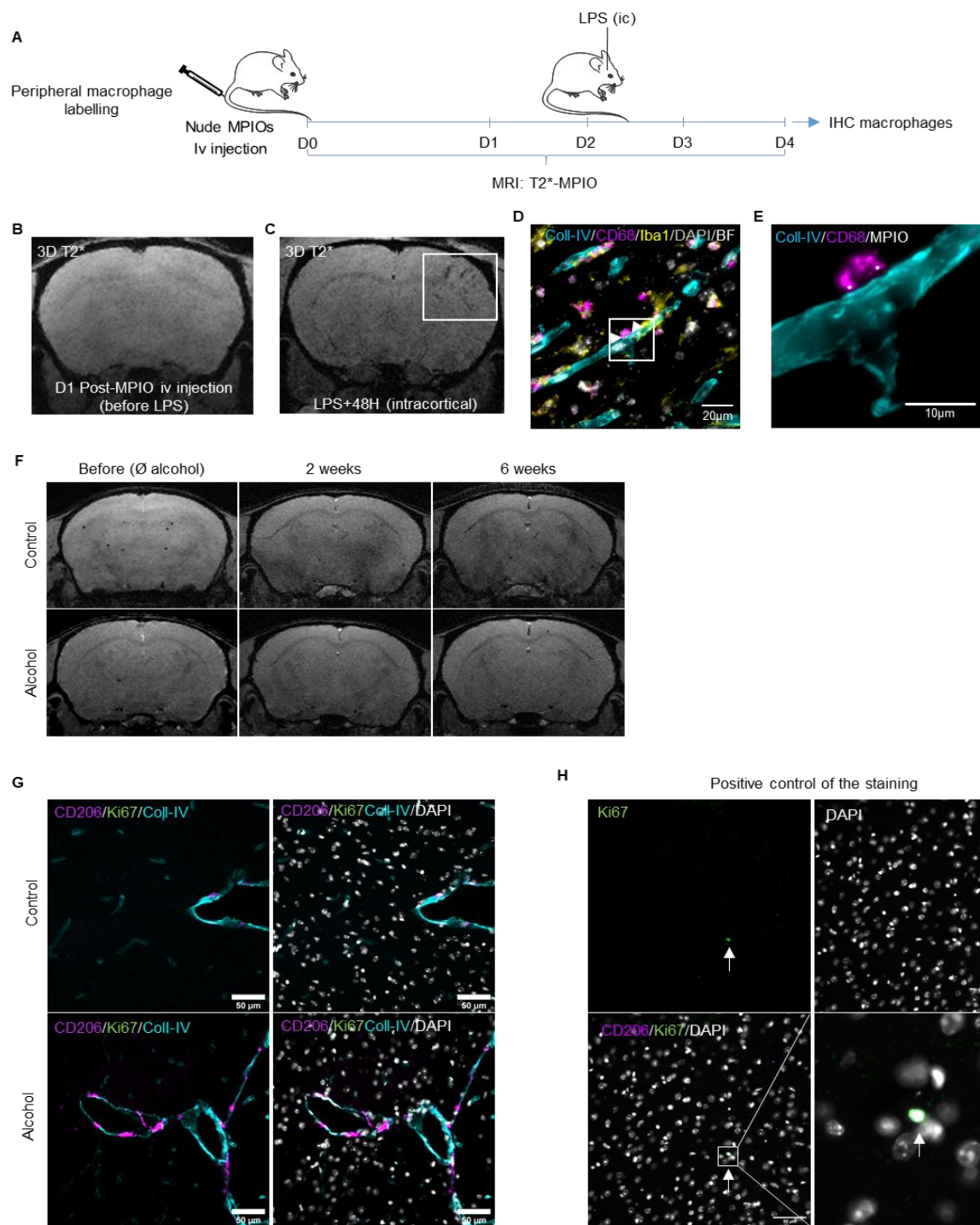
### Supplementary figure 1: Lack of BBB leakage or neuronal degeneration after alcohol

**consumption.** A) Photographs of Evan's blue (EB) extravasation measurement by near infrared imaging (NIRF) 60 min after EB iv injection in control and alcohol-exposed mice. B) Quantification of EB fluorescence in control and alcohol-exposed mice. C) Positive control of the technique: brain from mouse subjected to stroke 24h before the measurement of EB

extravasation. D) Quantification of the fluorescence detected in the contralateral and ipsilateral hemispheres shown in C. E) Representative T1-w images of control and alcohol-exposed mice before and after the injection of Dotarem (gadolinium chelate). F) Quantification of E. G) Positive control showing the parenchymal extravasation of Dotarem in the ipsilateral cortex of a mouse subjected to stroke (6h and 5 days after stroke onset). H) Quantification of G. I) Lack of fibrin(ogen) deposits in the brain parenchyma of control and alcohol-exposed mice. J) Lack of fluorojade C-positive staining after chronic alcohol exposure (right); right: positive control of fluorojade C staining performed 24h after MCAo by thrombin injection.



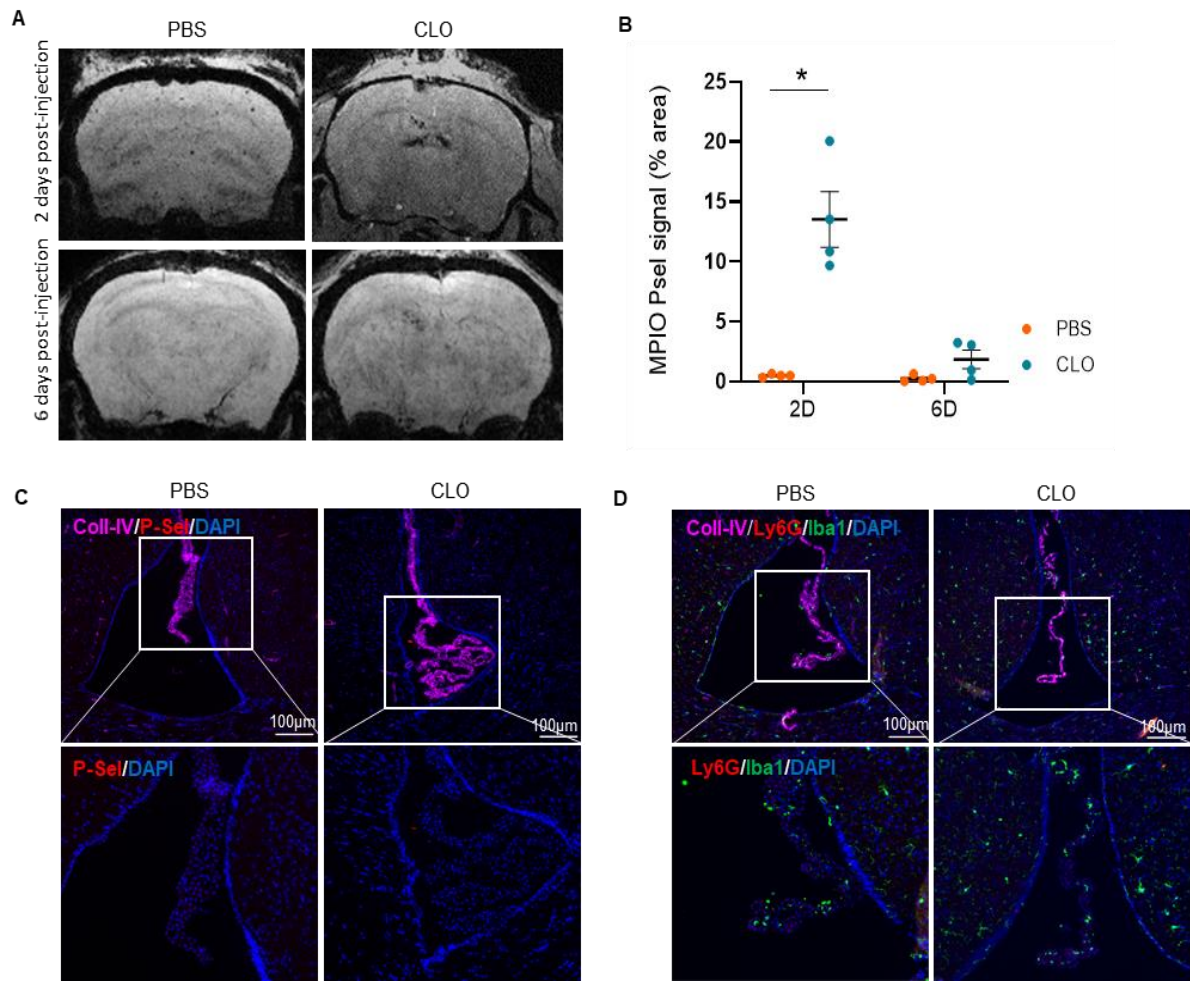
**Supplementary figure 2: Immunohistological characterisation of PVM.** PVM are positive for the lysosomal marker CD68 (A, C, E, F) and the membrane marker CD206 (B, D, E). PVM are negative for Iba1 (A, B, F). PVM are located surrounding brain blood vessels, between the blood vessel wall (Coll-IV) and astrocytic endfeet (AQP4) (C, D). Alcohol-induced increase in PVM numbers detected by CD68+/Iba1- counting (F, G).



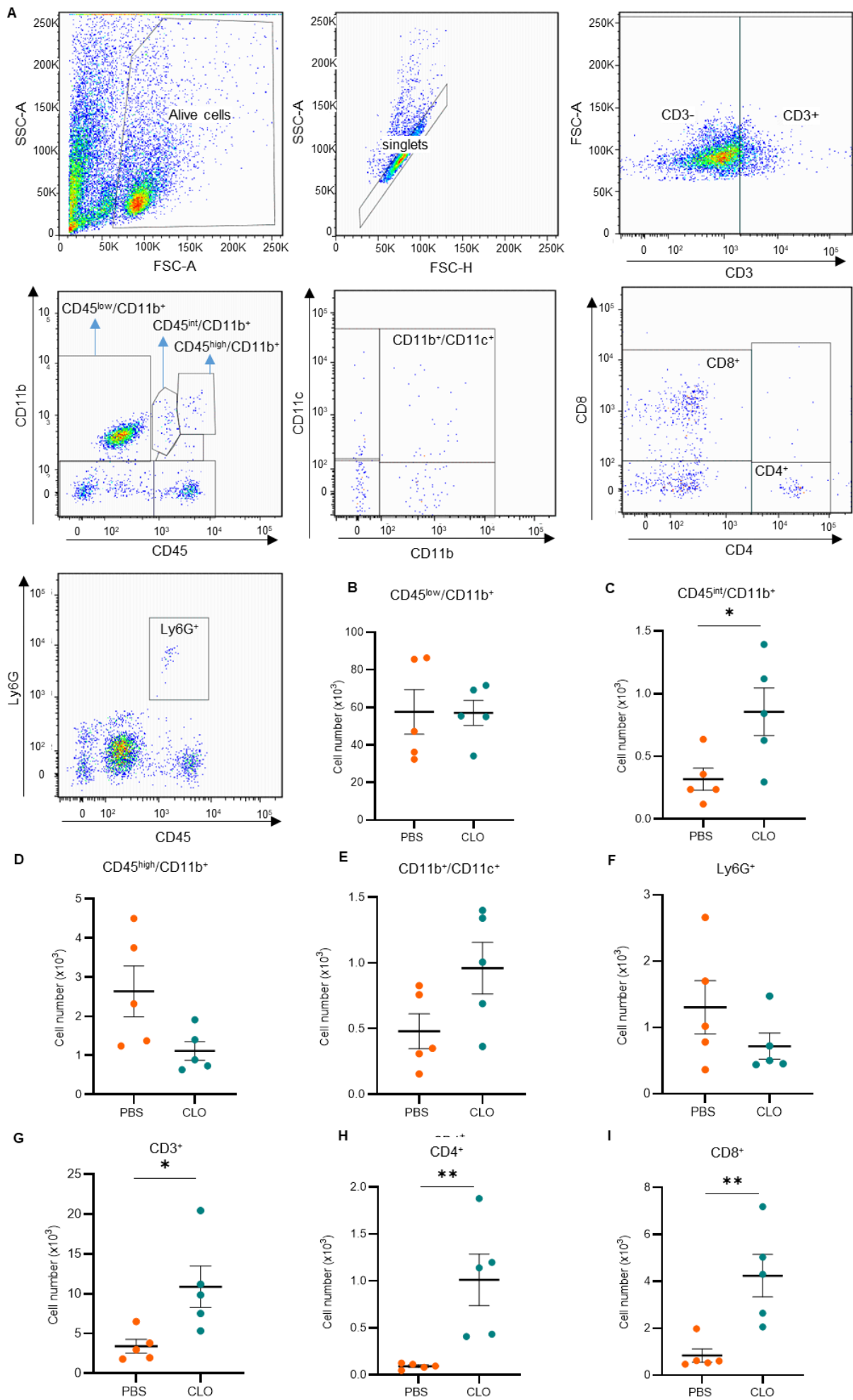
**Supplementary figure 3:** Lack of peripheral macrophage recruitment in mice chronically exposed to alcohol. A) Study design (positive control of the technique). Nude MPIOs were intravenously injected to naïve mice. B) The day after, a first 3D T2\*-w acquisition was performed to control the absence of unspecific MPIOs signal. C) Two days after MPIOs IV injection, mice were subjected to a single intracortical LPS injection and, 48h later, MPIO+

macrophages were visible at the ipsilateral cortex. D) Representative photomicrographs of MPIO<sup>+</sup> infiltrated macrophages (MPIO<sup>+</sup>/CD68<sup>+</sup>/Iba1<sup>-</sup>). E) Higher magnification of D, showing phagocytosed MPIOs (white dots, arrows) in the cytoplasm of infiltrated macrophages. F) Representative T2\*-w MRI scans of control and alcohol-exposed mice previously injected with MPIOs. T2\*-w MRI acquisitions were performed before, after 2 weeks and after 6 weeks of alcohol exposure. No MPIO<sup>+</sup> macrophages were detected in the brain at any time. G) Absence of Ki67 positive PVM in control and alcohol-exposed mice. H) Positive nucleus shown as a positive control of Ki67 staining.





**Supplementary Figure 4:** The intracerebroventricular (icv) injection of clodronate induces visible inflammatory responses in the brain ventricles 2 days after its injection, but they disappear at 6 days post-injection. (A) Representative T2\*-GEFC acquisitions in PBS or CLO injected mice after 2 or 6 days post-injection. Note that MPIO- $\alpha$ P-selectin accumulation in the ventricles is detected exclusively 2 days after the injection of CLO. (B) Quantification of MPIO/ $\alpha$ P-selectin positive area. (C, D) Representative photomicrographs of ventricles and choroid plexus 6 days after PVM depletion by CLO icv injection, stained for P-selectin (shown in panel C), microglia (Iba-1) and neutrophils (Ly6G) (shown in panel D). N=4 mice/group; \* $p < 0.05$  vs PBS, Mann-Whitney test.



**Supplementary Figure 5:** Flow cytometry analyses of the inflammatory responses in the brain 5 days after the icv injection of PBS or clodronate (CLO). A) Illustration of the gating strategy, taken from a representative CLO-injected mouse. B) Quantification of CD45<sup>low</sup>/CD11b<sup>+</sup> cells (considered as resting microglia). C) Quantification of CD45<sup>int</sup>/CD11b<sup>+</sup> cells (considered as activated microglia). D) Quantification of CD45<sup>high</sup>/CD11b<sup>+</sup> cells (considered as macrophages). E) Quantification of CD11b<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup> cells (considered as dendritic cells). F) Quantification of Ly6G<sup>+</sup> cells (considered as granulocytes). G) Quantification of CD3<sup>+</sup> cells (total lymphocytes). H) Quantification of CD4<sup>+</sup> lymphocytes. I) Quantification of CD8<sup>+</sup> lymphocytes. N=5 mice/group; \*p<0.05 vs PBS, Mann-Whitney test.



## Supplementary materials and methods bibliography

1. Gache P et al. The Alcohol Use Disorders Identification Test (AUDIT) as a screening tool for excessive drinking in primary care: reliability and validity of a French version. *Alcohol Clin Exp Res*. 2005;29(11):2001-2007.
2. Beck AT, Steer RA. *BDI, Beck Depression Inventory: Manual*. San Antonio, Tex.; New York: Psychological Corp. ; Harcourt Brace Jovanovich; 1987.
3. Spielberger CD. *Manual for the State-Trait Anxiety Inventory (Form Y) ("self-Evaluation Questionnaire")*. Consulting Psychologists Press; 1983.
4. Heatherton TF, Kozlowski LT, Frecker RC, Fagerström KO. The Fagerström Test for Nicotine Dependence: a revision of the Fagerström Tolerance Questionnaire. *Br J Addict*. 1991;86(9):1119-1127.
5. Orset C et al. Mouse Model of In Situ Thromboembolic Stroke and Reperfusion. *Stroke*. 2007;38(10):2771-2778. doi:10.1161/STROKEAHA.107.487520
6. Montagne A et al. Ultra-sensitive molecular MRI of cerebrovascular cell activation enables early detection of chronic central nervous system disorders. *NeuroImage*. 2012;63(2):760-770. doi:10.1016/j.neuroimage.2012.07.018
7. Hughes MM, Field RH, Perry VH, Murray CL, Cunningham C. Microglia in the degenerating brain are capable of phagocytosis of beads and of apoptotic cells, but do not efficiently remove PrPSc, even upon LPS stimulation. *Glia*. 2010;58(16):2017-2030. doi:10.1002/glia.21070
8. Quenault A et al. Molecular magnetic resonance imaging discloses endothelial activation after transient ischaemic attack. *Brain*. 2017;140(1):146-157. doi:10.1093/brain/aww260
9. Drieu A et al. Immune Responses and Anti-inflammatory Strategies in a Clinically Relevant Model of Thromboembolic Ischemic Stroke with Reperfusion. *Transl Stroke Res*. September 2019. doi:10.1007/s12975-019-00733-8
10. Marcos-Contreras OA et al. Hyperfibrinolysis increases blood-brain barrier permeability by a plasmin- and bradykinin-dependent mechanism. *Blood*. 2016;128(20):2423-2434. doi:10.1182/blood-2016-03-705384
11. Lehenkari PP et al. Further insight into mechanism of action of clodronate: inhibition of mitochondrial ADP/ATP translocase by a nonhydrolyzable, adenine-containing metabolite. *Mol Pharmacol*. 2002;61(5):1255-1262.

**Long-lasting neuroinflammation and behavioural deficits in a radiologically silent model of single mild traumatic brain injury.**

Antoine Drieu<sup>1</sup>, Anastasia Lanquetin<sup>1</sup>, Zuhail Gulhan<sup>2</sup>, Gloria Vegliante<sup>3</sup>, Daniele Tolomeo<sup>3</sup>, Sophie Sérrière<sup>2</sup>, Laurent Galineau<sup>2</sup>, Clovis Tauber<sup>2</sup>, Bertrand Kuhnast<sup>4</sup>, Marina Rubio<sup>1</sup>, Elisa R. Zanier<sup>4</sup>, Sylvie Chalon<sup>2</sup>, Denis Vivien<sup>1,5</sup>, Carine Ali<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Normandie Univ, UNICAEN, INSERM, INSERM UMR-S U1237, Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders, Institut Blood and Brain @ Caen-Normandie, Cyceron, Caen, 14000, France.

<sup>2</sup>UMR 1253, iBrain, Université de Tours, INSERM, Tours, France.

<sup>3</sup>Department of Neuroscience, Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri, IRCCS, Milan, Italy.

<sup>4</sup>IMIV, Service Hospitalier Frédéric Joliot, CEA, Inserm, Université Paris Sud, CNRS, Université Paris-Saclay, Orsay, France.

<sup>5</sup>Department of clinical research, Caen-Normandie Hospital (CHU), Caen, France

Corresponding author: Pr. Carine Ali

INSERM U1237, GIP Cyceron, boulevard Becquerel, 14074 Caen, France.

Tel: +33231470265; email: ali@cyceron.fr

## Abstract

Traumatic brain injury (TBI) is a leading cause of disability worldwide. In the milder cases, MRI or CT scan (if performed) is often normal. However, despite an apparently silent imaging, some patients with mild TBI experience cognitive dysfunctions, which may persist chronically. Brain changes responsible for these neurological dysfunctions are not clear and these injuries are commonly overlooked. It is thus crucial to increase our understanding of the mechanisms linking the initial event to the functional deficits, and to provide objective evidence of brain tissue alterations underpinning these deficits.

We first set up a murine model of closed-head controlled cortical impact, which provoked persistent cognitive and sensorimotor deficits (Y-maze, open field), despite no evidence of brain contusion or bleeding on conventional MRI (T2 and T2\* sequences), thus recapitulating features of mild TBI.

Based on recent promising developments in molecular imaging, we first sought to detect cerebrovascular inflammation in these animals. Molecular MRI for P-selectin, a key adhesion molecule, clearly detected strong signals after severe TBI, but revealed no signs of endothelial activation after mild TBI. Interestingly, immunohistochemical analyses confirmed these differential patterns of P-selectin expression and also showed a robust parenchymal inflammatory response after mild TBI, with evident astrogliosis and microgliosis in both the cortex and hippocampus. Cortical ipsilateral neuroinflammation increased at least up to 3 weeks post-injury, while hippocampal neuroinflammation peaked at one week and remained up-regulated up to 3 weeks. These spatio-temporal profiles were confirmed first by *in vitro* autoradiography using the TSPO ligand [<sup>3</sup>H]DPA-714 and second by *in vivo* PET imaging with [<sup>18</sup>F]DPA-714.

We show that even a single mild TBI induces a long-lasting neuro-inflammatory status that might explain the long-term behavioural deficits. In line with our *in vivo*  $\mu$ PET imaging results, we propose that imaging of TSPO should be performed in mild TBI patients with persistent deficits to clarify the pathogenic participation of neuroinflammation and possibly, to design targeted therapies.

**Key words: mild traumatic brain injury, neuroinflammation, TSPO microPET imaging, molecular MRI imaging, persisting deficits.**

## Introduction

Each year, 69 million people suffer a traumatic brain injury (TBI), which is the leading cause of mortality in young adults and a major cause of death and disability across all ages worldwide (Maas et al., 2017; Dewan et al., 2018). Various triggers (penetrating objects, blast injury or mechanical impact) can induce TBI, of which short-term functional consequences can result in hospitalization. The classification of TBI can be etiological, symptomatologic, prognostic or pathoanatomic. Practice guidelines include structural imaging and neurological scoring, including the 15-point Glasgow Coma Scale, in their criteria for classifying injury severity. Patients with a score of 3-8 are classified as severe, 9-12 as moderate, and those between 13-15 as mild TBI (Teasdale et al., 1974). Clinical research has mainly been directed toward moderate and severe TBI, but the majority (70–90%) of patients suffer from mild TBI (miTBI). Patients with miTBI are in general excluded from epidemiological and economical studies. Their individual impact (severity of damages and cost) is lower than moderate to severe cases, but obviously, as a whole, this group of patients should not be neglected as they represent the largest contribution to the global burden of TBI (Maas et al., 2017).

After the initial biomechanical injury, TBI induces a progressive secondary injury. Thus, cumulative epidemiological data show that moderate or severe TBI, and very likely mild TBI, are important risk factors for disabilities (the so-called “silent epidemic”), including neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis (Maas et al., 2017; Gardner et al., 2015; Perry et al., 2016; Cruz-Haces et al., 2017). The sparse quantitative estimations vary greatly, but patients with mild TBI often have anxiety, depression, post-traumatic stress disorder, and clinically relevant symptoms, including physical symptoms, behavioural disturbances, and cognitive dysfunctions, that risk to interfere with professional or social life (Maas et al., 2017). Mild TBI is thus a serious condition (Maas et al., 2017; Hanten et al., 2013; McCauley et al., 2014; Madsen et al., 2018) and it is important to predict who are at risk patients and to understand the underlying pathogenic mechanisms.

Long ago, a TBI workshop stated that “Our current armamentarium is insufficient, and there is a need for better, more sophisticated tools to measure extent of injury and occurrence of specific pathophysiologic mechanisms” (Saatman et al., 2008). This is still true, and imaging, or multimodal imaging is likely a key to success for this goal. Inflammation is a hallmark of most neurological disorders, including TBI (Donat et al., 2017), so that monitoring the neuro-inflammatory response can have major diagnostic/prognostic implications for TBI. Interestingly, beside plasma/CSF biomarkers of inflammation, some brain biomarkers can be targeted in humans by molecular imaging such as single photon emission computed tomography (SPECT) and positron emission tomography (PET). In this context, highly sensitive imaging of neuroinflammation is available using translocator protein (TSPO) PET ligands. Indeed, brain imaging of TSPO is now recognized as a relevant index of active microglia and is increasingly used in acute brain injury such as stroke (Zinnhardt et al., 2018) and neurodegenerative diseases like Alzheimer's disease (Dani et al., 2018; Edison et al., 2018) and multiple sclerosis (Hagens et al., 2018). In parallel, molecular magnetic resonance imaging (MRI) to study endothelial activation has recently emerged as a promising axis of research (Gauberti et al., 2018). Molecular MRI may have some advantages over nuclear medicine modalities, although it has remained limited to proof-of-concept studies in animal models. The recently developed contrast agents called micro-sized particles of iron oxide (MPIO) has significantly improved molecular MRI sensitivity and specificity, compared to the historical intraparenchymal

imaging of myeloperoxidase or of extravasation of targeted ultra-small particles of iron oxide (USPIO). MPIOs harboring antibodies against adhesion molecules recruited at the endothelial luminal membrane (including VCAM-1 and P-selectin), have proven as highly relevant MRI tools to detect neuroinflammation in various conditions, including stroke, ageing, multiple sclerosis and severe TBI (McAteer et al., 2010; Montagne et al., 2012; Gauberti et al., 2013, Fournier et al., 2017; Quenault et al., 2017; Vegliante et al., 2019). Interestingly, we have previously found in a model of transient ischemic attack that MPIOs targeted against P-selectin can detect an area of neuroinflammation, while conventional MRI shows no evidence of brain infarction (Quenault et al., 2017). Here, we tailored the biomechanical injury down to a level associated to selective cognitive deficits but below any detectable damage by conventional MRI, to test whether advanced translatable imaging of inflammation by molecular MRI or PET may inform on functional post-TBI sequelae.

## **Material and Methods:**

### ***Animals***

Experiments were performed on two months-old male Swiss mice (35-45g; Centre Universitaire de Ressources Biologiques, Normandy University, Caen, France) or on male C57BL/6J mice (9-10 weeks old, 20-24 g) from Envigo (Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri). Animals were housed at 21° C in a 12 h light/dark cycle with food and water with *ad libitum* free access. None of the experimental procedures induced mortality. Mouse weight was monitored before each behavioural assessment, the day and the day after the surgical procedure.

### ***Surgical procedure for traumatic brain injury***

For surgeries, mice were anesthetized with isoflurane 5% and maintained under anaesthesia with 1.5-2.5% isoflurane in a 70%/30% gas mixture (N<sub>2</sub>O/O<sub>2</sub>). The rectal temperature was maintained at 37±0.5°C throughout using a feedback-regulated heating system. Breathing was constantly checked and adjusted with anesthesia level. A sagittal incision (not midline to avoid major bleeding) was made to discover the skull. Then, the left parietal skull was cleaned with a cotton bud. Close-head controlled cortical impact (CCI) brain injury was induced using a 3 mm diameter rigid impactor driven by an electromagnetic controlled impact device (ImpactOne, Leica; Brody et al., 2007) rigidly mounted at an angle of 20° from the vertical plane and applied vertically between the bregma and lambda of the left exposed skull (deformation depth was either 1.5 mm for mild TBI (miTBI) and 2 mm for moderate TBI (modTBI); velocity: 5.0 m/s; time of impact: 0.2 s). Mice were sutured and placed in a recovery box until recovery (*ie*, restoration of a normal gait).

As a control of molecular imaging, a series of mice was also subjected to severe TBI, induced by a 1 mm depth impact after craniectomy, as described earlier (Zanier et al., 2018).

### ***MRI of brain lesions***

Mice were deeply anesthetized with 5% isoflurane in 30/70% O<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>O and then maintained under anaesthesia during all the experiment with 1.5-2.5% anaesthesia in 30/70% O<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>O. Imaging was carried out on a Pharmascan 7 T/12 cm system using surface coils (Bruker, Germany; Gauberti et al., 2013). T2-weighted

images to visualize oedema formation were acquired 1, 7 and 21 days post-TBI using MSME sequences (multi-spin multi-echo): TE/TR: 51ms/2500ms TE/TR 33 ms/2500 ms with a 70 $\mu$ m\*70 $\mu$ m\*500 $\mu$ m spatial resolution. Haemorrhage was assessed using T2\* imaging sequences (TE/TR: 7.7ms/500ms TE/TR 8.7064ms/500ms). Lesion size was calculated using Image J (v1.52k, NIH).

### ***Behavioural assessments***

#### **Place recognition test.**

Spatial memory was tested 7 days before and 7 and 21 days after mild TBI (n=10 mice/group) in a white plastic Y-maze with three identical arms (34 x 7 x 14.5 cm). Mice were tested after a two-session procedure with a 2h30 intersession interval, as previously described (Obiang et al., 2012). During the acquisition session, one arm was randomly closed with a guillotine door. The position of the closed arm was chosen randomly among the three arms. Each mouse was placed in one of the two other arms (arms A and B), with its head facing away from the center of the maze) and allowed to visit the two accessible arms for 5 min. Mice were then returned to their home cage for 2h30, before being subjected to the retention test, in which they had free access to all three arms for 5 min. The number of visits to each arm (considered only when the mouse passed two-thirds of the arm) was recorded for each session. Spatial memory was assessed through the comparison of the percentage of visits in each arm for the 5 min of the retention test. In the absence of deficit, the percentage of visits in the new arm is higher than 33% (the threshold of random visit).

#### **Open field**

The open field task is a sensorimotor test used to determine general activity levels, gross locomotor activity, and exploration habits. It was performed 7 days before and 7 and 21 days after mild TBI (n=10 mice/group), in a squared box (31.5 x 31.5 cm) during 10 minutes as previously described (Pruvost et al., 2017). Animals were videotracked (DMK 21AF04, The Imaging Source®) and distance and velocity were analyzed with EthoVision XT 11.5 software (Noldus). Additionally, a central region of 15 x 15 cm was defined and the percentage of time spent in the center area was measured to assess anxiety-like behaviour. Rodents typically spend more time exploring the periphery of the arena by walking along the walls (thigmotaxis) than the central area (Prut et al., 2003).

#### ***Targeting-moiety conjugation to MPIOs and molecular imaging***

Microparticles of iron oxide (MPIOs; diameter 1.08  $\mu$ m) with p-toluenesulphonyl reactive surface groups (Invitrogen) were used for peptide conjugation (Montagne et al., 2012). Purified polyclonal goat anti-mouse antibodies for P-selectin (R&D Systems, clone AF737) were covalently conjugated to MPIOs in borate buffer with ammonium sulphate (pH 9.5), by incubation at 37°C for 48 h. The specificity of these MPIOs targeting P-selectin has been previously published (Quenault et al., 2016). MPIOs were then washed in phosphate buffered saline (PBS) containing 0.5% bovine serum albumin (BSA) at 4°C and incubated for 24 h at room temperature, to block the remaining active groups. MPIOs were rinsed in PBS (0.1% BSA) and stored at 4°C.

Imaging was carried out at Cyceron on a Pharmascan 7 T/12 cm system using surface coils (Bruker) or at IRFMN on a 7T Bruker Biospec (Ettlingen, Germany) running ParaVision 6.01 and equipped with a quadrature cryogenic

surface coil as transmitter and receiver. Three-dimensional T2\*- weighted gradient echo imaging with flow compensation (GEFC) (spatial resolution of 70x70x70  $\mu\text{m}$ ), TE/TR 13.2 ms/200 ms and a flip angle (FA) of 21° was performed to visualize MPIOs with the Pharmascan 7 T/12 cm system. Specifications with the 7T Bruker Biospec system were: resolution of 80x80x80  $\mu\text{m}^3$ , TE/TR = 7.5 ms/50ms, FA = 14°. A baseline GEFC image was acquired before MPIOs injection and another one after to evaluate the percentage of signal variation.

MRI acquisitions started immediately after the intravenous injection of MPIOs (200  $\mu\text{l}$  of 2 mg Fe/kg of conjugated MPIOs) and lasted 17-20 min. The quality of conjugated MPIOs was systematically checked in a naive mouse, by stereotaxic injection of lipopolysaccharide (1 $\mu\text{l}$ , 1mg/kg) in the striatum (0.5mm anterior, 2.0mm lateral, -3mm ventral to the Bregma).

Furthermore, a high-resolution angiography (Figure S1) was performed using a 3D FLASH sequence suppressing signals from static tissue (FOV = 30x16x8.4mm<sup>3</sup>; MTX = 300x160x84; Resolution 100x100x100 $\mu\text{m}^3$ ; FA = 80°; TE/TR=3.1/16ms; Number of average (NA) = 6; scantime 16 min) in mice subjected to the severe TBI.

### ***[<sup>3</sup>H]DPA-714 autoradiography***

Seven days (n=7 mice/group) or 21 days (n=6 mice/group) after mild TBI, brains were harvested, frozen in isopentane cooled at -35°C and stored at -80°C. Coronal brain sections 20- $\mu\text{m}$  thick (coordinates: Bregma -2.30 mm according to Franklin & Paxinos) were sliced using a cryostat at -20°C (CM 3050S™, Leica, Germany), dropped off on gelatinized slides and stored at -80°C for at least 4 days. The density of TSPO binding sites was measured by *in vitro* autoradiographic experiments using [<sup>3</sup>H]DPA-714 (Prepared according to (Damont et al., 2015); Molar activity 2.01 GBq/ $\mu\text{mol}$ ) according to the method used in Foucault-Fruchard and colleagues (2017). Brain sections were allowed to equilibrate at RT for 3 hours and then incubated with 1 nmol/L of [<sup>3</sup>H]DPA-714 in 50 mmol/L Tris-HCl buffer pH 7.4 at room temperature for 60 minutes. The non-specific binding was measured in the presence of 1  $\mu\text{mol/L}$  PK-11195 (Sigma Aldrich, Lyon, France). Sections were rinsed twice in ice cold buffer (4°C) for 5 minutes, then briefly in distilled water at 4°C and dried at room temperature. Acquisitions were compiled over a period of 4 hours using the  $\beta$ -imager™ 2000 (Biospace Lab, Paris, France). Four sections were analyzed per mouse. ROIs were manually drawn on the hippocampus and frontal cortex in the intact and lesioned sides of the brain. The level of bound radioactivity was directly determined by counting the number of  $\beta$ -particles emitted from the delineated area using the  $\beta$ -vision software (Biospace Lab, France). The radioligand signal in the ROIs was expressed as counts per minute per square millimeter (cpm/mm<sup>2</sup>). Specific binding was determined by subtracting nonspecific binding from total binding.

### ***MicroPET experiments***

PET experiments were conducted 21 days post mild TBI (5 mice). [<sup>18</sup>F]DPA-714 was prepared as described elsewhere (Serrière et al., 2015) and obtained with a molar activity of 96 GBq/ $\mu\text{mol}$  at the time of injection. Mice were anesthetized with isoflurane (Baxter, France), at 4-5% in O<sub>2</sub> for induction and then 1.5-2% during scanning, and placed on a thermo-regulated bed (Minerve, France) in the prone position with a nose cone. Acquisitions were made on a microPET-CT SuperArgus system (Sedecal, Madrid, Spain) which has an effective axial/transaxial field of view (FOV) of 4.8/6.7 cm, a spatial resolution less than 2 mm and a sensitivity above 2.5% in the whole FOV. Before PET acquisition, a 5-minute computed tomography (CT) scan was acquired for attenuation correction.

[<sup>18</sup>F]DPA-714 was administered into the tail vein as a bolus (22±1 MBq). During the 50 minutes of PET acquisition, the respiratory rate and body temperature were monitored and kept as constant as possible.

The PET list-mode scans were rebinned into 27 frames: 4 frames of 10-seconds followed by 4 of 20-seconds, 4 of 60-seconds, 14 of 180-seconds, and 1 of 120-seconds. Each scan was corrected for randoms, scatter and attenuation, and the images were reconstructed using a 2D OSEM algorithm (GE Healthcare, France) into voxels of 0.3875 × 0.3875 × 0.775 mm<sup>3</sup>. Dynamic PET images were corrected for partial volume effect using a Reblurred Van Cittert approach (Carasso, 1999). The estimation of the system point spread function (PSF) was slightly narrowed to avoid Gibbs ringing artifacts. Data summed over the entire acquisition were used for image registration. Since brain anatomy is very similar for mice of similar weight relatively to PET resolution, registration was accomplished as a rigid body transformation, with no warping or scaling. Each summed scan was individually smoothed with a Gaussian filter to improve the signal-to-noise ratio and to reduce the bias of misregistration into Mirrione template space. For this smoothing, a kernel of 0.6 x 0.6 x 0.6 mm<sup>3</sup> FWHM was used. Each scan was coregistered using PMOD v3.4 software (PMOD Technologies Ltd, Switzerland) to a <sup>18</sup>FDG PET template in Mirrione coordinates using a mutual information similarity function with Powell's convergence optimization method (Mirrione et al., 2007). The registered images were then used to create a template that was also registered to Mirrione space. Finally, all initial PET images were registered again to this template. The results were visually checked for misregistration. To normalize the [<sup>18</sup>F]DPA-714 uptake, tissue activity was divided by the average whole brain activity. Each voxel of the 3D volume was paired with its corresponding contralateral voxel. Individual differences were calculated between paired voxels and 3D z-scores maps were calculated using a paired Wilcoxon non-parametric test. The statistical threshold was set at  $p < 0.01$ . Based on the Mirrione's template, regions of interest of at least 50 contiguous significant voxels were drawn from the z-score map using PMOD v3.2 software (PMOD Technologies Ltd, Switzerland). These regions of interest were then applied to individual [<sup>18</sup>F]DPA-714 images to retrieve [<sup>18</sup>F]DPA-714 uptake values in each brain.

### ***Immunohistochemistry***

Seven or 21 days post-TBI, deeply anesthetized mice were transcardially perfused with cold heparinized saline (15 mL) and fixed with 100 mL of 2% paraformaldehyde and 0.2% picric acid phosphate buffer (pH 7.4) (n=6 mice/group). Brains were post-fixed with 2% paraformaldehyde and 0.2% picric acid phosphate buffer (18 hours; 4°C) and cryoprotected (sucrose 20% in PBS; 24 hours; 4°C) before freezing in Tissue-Tek (Miles Scientific, Naperville, IL, USA). Cryostat-cut sections (10 µm) were collected on poly-lysine slides and stored at – 80°C before processing.

Sections were co-incubated overnight with rabbit polyclonal anti-mouse Iba1 (1:1000, Wako 019-19741), rat polyclonal anti-mouse CD68 (1:1000, Abcam 53444), goat polyclonal anti-mouse P-selectin (1:1000, RD System AF737), chicken polyclonal anti-mouse GFAP (1:2000, Abcam 4674) and rabbit polyclonal anti-mouse Laminin (1:1500, Abcam 11575). Primary antibodies were revealed by using Fab'2 fragments of Donkey anti-rabbit linked to FITC or Cy5, anti-rat linked to Cy3, anti-goat IgG linked to FITC (1:600, Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA). Washed sections were coverslipped with antifade medium containing DAPI. Epifluorescence images were digitally captured using a Leica DM6000 epifluorescence microscope-coupled coolsnap camera,



visualized with Leica MM AF 2.2.0 software (Molecular Devices, USA) and further processed using ImageJ 1.52k software.

### ***Statistical analyses***

Results are the mean  $\pm$  SEM. For immunohistochemical analyses, cell counts were compared between ipsilateral versus contralateral regions of interest by the nonparametric Wilcoxon paired test (Statview software). For cognitive functions, to compare the new arm discrimination and to compare the open field variables between each time we performed Friedman ANOVA followed by Wilcoxon paired test (Statistica). For autoradiography, comparisons between the binding both sides were performed using the 2-way ANOVA and Bonferroni post-hoc test. The level of significance was  $p < 0.05$  (GraphPad Prism software v5, San Diego, Calif., USA). The intra-animal comparison of [ $^{18}\text{F}$ ]DPA-714 uptake between the ipsi and contralateral sides in a brain area was performed using a Student *t*-test (GraphPad Prism software v. 5, San Diego, Calif., USA).

## **Results**

### ***Despite the lack apparent lesion on conventional MRI, a single mild TBI induces long-term functional deficits***

We first characterized our model of closed-head CCI to tailor the biomechanical injury to a degree not associated with brain damage on conventional MRI, thus mimicking single mild TBI. Two depths of CCI (Figure 1A) were analyzed by 7T MRI 24h after TBI (Figure 1B). CCI at 1.5 mm depth did not induce any skull fracture and did not translate into measurable parenchymal lesion or bleeding on MRI (Figure 1C-1D). By contrast, CCI at 2.0 mm depth lead to a skull fracture, bleeding in the brain in some animals, and to a 6 mm<sup>3</sup> edematous lesion (n=7-8 mice/group; Figure 1C-1D). We thus selected CCI at 1.5 mm as a model of mild TBI (miTBI) and CCI at 2 mm as a model of moderate-to-severe TBI (modTBI). In both groups, mice lost weight 24h after surgical procedure. Interestingly, miTBI mice recovered their weight at 7 days, while modTBI mice did not (Figure 1E).

Spatial memory was evaluated using the Y maze 7 days before, then 7 and 21 days post-miTBI (Figure 2A). As expected in this test, mice were initially able to differentiate the new arm and the two familiar arms (Figure 2B). However, mice were no longer able to discriminate arm A and the newly open arm 7 days after miTBI (Figure 2B). Interestingly, this deficit was transient, since mice were able again to discriminate the new arm and the two familiar arms 21 days after miTBI (Figure 2B).

We also evaluated the general activity of mice using the open field test (Figure 2C). We found an important decrease in the velocity (-38% vs before surgery; Figure 2D), the total distance (-35% vs before surgery; Figure 2E), and the time in movement (-27% vs before surgery; Figure 2F) in miTBI animals 7 and 21 days after miTBI. We did not detect anxiety-like behaviour, since animals did not reduce their time spent in the center of the open field after surgery (Figure 2G).

### ***Mild TBI does not induce cerebrovascular inflammation***

In the absence of macroscopic lesion, we suspected that subtle tissue alterations may explain these behavioural deficits. In a previous study, we found in a mouse model of transient ischemic attack, that while conventional MRI

detects no damage, molecular MRI, using MPIOs targeting the adhesion molecule P-selectin, allows a sensitive detection of an area of cerebrovascular inflammation (Quenault et al., 2016). We postulated that miTBI could as well induce an activation of the cerebral endothelium, and we thus transposed molecular imaging of P-selectin to our model of miTBI, 7 or 21 days post miTBI (Figure 3D). MPIOs coated with antibodies against P-selectin (Figure 3A; n=5 mice/time) were indeed able to bind the cerebral endothelium challenged by LPS-induced inflammation in the striatum (Figure 3B for immunohistochemistry and Figure 3C for molecular MRI). However, ultrasensitive MRI after administration of  $\alpha$ P-selectin MPIOs in miTBI mice did not detect any positive signal on MRI 7 nor 21 days post miTBI (Figure 3E). This was confirmed by an immunohistochemistry analysis, showing no P-selectin expression in brain blood vessels after miTBI (Figure 3F; n=6 mice/time). These data coincide with the absence of any leukocyte infiltration into the brain parenchyma after miTBI (data not shown). In addition, we confirmed that the lack of MRI signal was not due to a failure of the technique: in a model of severe TBI,  $\alpha$ P-selectin MPIOs induced a strong signal in the ipsilateral hemisphere, which coincides with the analysis of P-selectin expression by immunohistochemistry (Figure S1). The specificity of the signal was also confirmed by injecting MPIOs conjugated to isotopic immunoglobulins, which induced no signal visible by MRI (Figure S1).

#### ***Mild TBI induces a long-lasting astrogliosis in both the cortex and hippocampus***

We also performed immunohistochemical analyses 7 and 21 days post miTBI to assess astroglial activation as an index of neuro-inflammation (Figure S2, n=6 mice/group). We checked astrocytic reactivity by GFAP staining and found, in the ipsilateral cortex, an increase in the number of GFAP positive astrocytes 7 days after miTBI (+385% vs contralateral hemisphere), which was even more pronounced 21 days after miTBI (+1218% vs contralateral hemisphere). Interestingly, we found evidence of neuroinflammation at distance compared to the impact. There was a notable astrocytic reactivity in the hippocampus of mice 7 days after miTBI (see dotted rectangles in Figure S2; +123% vs contralateral hemisphere). Hippocampal astrocyte numbers also increased 21 days after miTBI, but less than 7 days after miTBI (+119% vs contralateral hemisphere).

#### ***Mild TBI induces a strong microglial/macrophage activation in both the cortex and hippocampus***

Seven days after miTBI, the number of microglial cells also increased in the ipsilateral cortex (Figure 4B-C, +148% vs contralateral hemisphere), as did the number of activated microglial cells (Figure 4B-C, +774% vs contralateral hemisphere). We also found an increased number of CD68 positive but Iba1 negative cells located near blood vessels, which we identified as macrophages/perivascular macrophages (Figure 4B-C, +233% vs contralateral hemisphere). Interestingly, microglial activation as well as the proportion of macrophages/perivascular macrophages markedly increased 21 days after miTBI (Figure 4D-4E, respectively +219, +755 and +239% vs contralateral hemisphere).

Microglial cell number also markedly increased 7 days after miTBI in the ipsilateral hippocampus, as well as activated microglia and macrophages/perivascular macrophages (Figure 5A-5B, respectively +163, +379 and +230% vs contralateral hemisphere). This increase persisted up to 21 days after miTBI, but to a lesser degree than at 7 days for all cell types (Figure 5C-5D, respectively +123, +278 and +152% vs contralateral hemisphere).

#### ***MicroPET imaging of TSPO unmasks neuroinflammation after mild TBI***

The long-lasting activation of microglia observed after mTBI opened interesting avenues. Aiming at providing a detection tool transferable to the clinic, we took advantage of the development of radiolabeled ligands of TSPO, a marker of microglial activation. First, autoradiography was performed with [ $^3\text{H}$ ]DPA-714 (Figure 6A shows representative images). In the cortex, a significantly higher specific binding of [ $^3\text{H}$ ]DPA-714 was measured in the ipsilateral vs contralateral hemisphere both at 7 days ( $8.90 \pm 1.00$  vs  $4.64 \pm 0.22$  cpm/mm $^2$ ,  $p < 0.001$ , two-way ANOVA) and 21 days ( $8.73 \pm 0.57$  vs  $5.52 \pm 0.34$  cpm/mm $^2$ ,  $p < 0.001$ , two-way ANOVA) after mTBI (Figure 6A). In the hippocampus a significantly higher specific binding of [ $^3\text{H}$ ]DPA-714 was measured in the ipsi vs contralateral hemisphere both at 7 days ( $10.14 \pm 0.51$  vs  $6.14 \pm 0.32$  cpm/mm $^2$ ,  $p < 0.001$ , two-way ANOVA) and 21 days ( $10.04 \pm 0.23$  vs  $6.78 \pm 0.25$  cpm/mm $^2$ ,  $p < 0.001$ , two-way ANOVA) after mTBI (Figure 6A).

These positive *in vitro* autoradiography studies prompted us to explore TSPO imaging *in vivo* using the fluor-18 labeled analog of DPA-714. Analyses of microPET acquisitions thus showed that the average images of [ $^{18}\text{F}$ ]DPA-714 uptake detect an increased binding of the tracer in the cortex 21 days after mTBI ( $n=5$  mice/group; Fig.6B). The Z-score maps revealed a significant increased uptake of [ $^{18}\text{F}$ ]DPA-714 in the ipsilateral vs. contralateral cortex with a z-score value of  $6.05 \pm 1.86$  (Figure 6C;  $p=0.0015$ ). A small but significant increase in the ipsilateral uptake of [ $^{18}\text{F}$ ]DPA-714 was also observed in a group 50 voxels located in the hippocampus (Figure 6D) with a z-score value of  $5.74 \pm 1.32$  ( $p=0.0022$ ).

## Discussion

In the clinical setting, the vast majority (70–90%) of TBI patients suffer from mild TBI. For these patients, there is limited medical intervention, for both diagnosis and acute therapy, and even less at the mid- and long-terms. However, a significant portion of this population suffers persisting neurocognitive dysfunctions (Maas et al., 2017).

The most studied populations of patients with mTBI are pediatric individuals, soldiers and sports players, who can all be exposed to repeated mTBI (which can result in a pathology known as chronic traumatic encephalopathy). There is compelling evidence showing that these patients develop brain abnormalities that likely explain long-term deficits (Fehily et al., 2017). A better knowledge of potential pathogenic mechanisms, even after a single event of mTBI, is mandatory for patients, but clinical observations are sparse and animal models not always relevant to the clinical situation.

We thus chose to investigate pathogenic mechanisms in a murine model of mTBI, the closed-head controlled cortical impact, and adopted an imaging-guided strategy, compatible with the clinical setting. This model has several advantages, including preservation of the skull and dura, and the fact that injury severity can be graded by adjusting impact depth and/or velocity (Ren et al., 2013). Accordingly, we show that under a specific threshold of impact depth, conventional MRI detects neither contusion nor bleeding. Yet, animals in this case acutely lost weight, but more importantly, exhibited transient deficits in spatial memory and deficits in general activity persisting at least after 21 days. This highlights the importance of considering patients with a single event of mTBI as patients with potentially invalidating disabilities later in life.

We thus sought to adopt a problem-solving approach, in which translatable imaging modalities could provide evidence of tissue damage in mTBI patients. Formerly, we found that in experimental transient ischemic attack, a condition with no infarction on conventional imaging, molecular MRI targeting endothelial activation can uncover an area of inflammation, with a high sensitivity [21]. However, this strategy has not proven efficiency in the present model of mTBI, concordant with immunohistological analyses. In contrast, no signal was observed in the present model of mTBI, concordant with immunohistological analyses of p-selectin expression. These findings indicate that in case of subthreshold injury endothelial damage is a key event in stroke but not TBI and suggest that therapeutic interventions focusing on leukocyte recruitment may be relevant to moderate-severe TBI (Needham et al., 2019; Vegliante et al., 2019) but not be adequate in mTBI patients.

By contrast, we found a marked parenchymal inflammatory response, which concerned all glial cell types involved in inflammation (astrocytes, microglia and macrophages). We found that a single mTBI induces a persistent neuro-inflammatory response up to 3 weeks post injury. This is consistent with histological observations in a small sized study on human biopsies (Engel et al., 2000). Tracking this neuro-inflammatory response could serve both diagnostic and therapeutic purposes.

Nuclear imaging has to date not paid much attention to patients with mTBI. SPECT and PET studies have mostly been performed to investigate perfusion and metabolic disturbances (Raji et al., 2018). Alternative imaging biomarkers should be helpful such as TSPO imaging for which a great number of radiotracers are available, and which is already used in several human neurodegenerative (Werry et al., 2019) and non-neurodegenerative (Ghadery et al., 2019) disorders. With TSPO imaging, Coughlin and colleagues have provided alarming data showing that repetitive mTBI in NFL players induce a significant neuro-inflammatory response, which may relate to brain dysfunctions (Coughlin et al., 2015). Higher TSPO signals have also been reported and also long after single events of moderate and severe TBI (Folkersma et al., 2011; Ramlackhansingh et al., 2011). To our knowledge, no data is available for patients after a single mild TBI.

SPECT and PET TSPO imaging has also been used to show microglial activation in several animal models of moderate and severe TBI (Venneti et al., 2007; Cao et al., 2012; Grossman et al., 2012; Donat et al., 2016; Israel et al., 2016). Our data add to a previous microPET study, in which however mTBI was not associated with a higher brain uptake of [ $^{18}\text{F}$ ]DPA-714 (Israel et al., 2016). In our mild TBI model, we first explored TSPO expression using *in vitro* quantitative autoradiography with [ $^3\text{H}$ ]DPA-714 because it is known that the spatial resolution of autoradiograms is higher with [ $^3\text{H}$ ]-labeled than [ $^{18}\text{F}$ ]-labeled tracers (Strome et al., 2005). This allowed us to detect an increased signal in the ipsi-lateral cortex and hippocampus both at 7 and 21 days post-injury, which was also visible by [ $^{18}\text{F}$ ]DPA-714 *in vivo* PET imaging at 21 days post-injury. These data successfully corroborated immunohistological analyses and unmasked the spatio-temporal development of a parenchymal inflammatory response after a single mTBI. The cell origin of TSPO expression can be multiple, as microglia, astrocytic and endothelial cells can be involved (Lavis et al., 2012 ; Guilarte et al., 2019). As no cerebrovascular inflammation was detected by P-selectin MPIOs in our experimental conditions, it can be assumed that the TSPO increased density that we observed was related to glial cells. It would be of high value to more precisely assess if this glial activation was related to the pro-inflammatory M1, the anti-inflammatory M2 or intermediate phenotypes. Indeed, conflicting findings are reported on the extent to which TSPO overexpression is associated to a pro- or anti-inflammatory phenotype (Owen et al., 2017 ; Beckers et al., 2018) although very recent

data demonstrated that it was selective for pro-inflammatory polarized astrocytes and microglia (Pannell et al., 2020). Concurrently, a very recent study with the TSPO tracer [<sup>18</sup>F]PBR111 has suggested that combining PET and DTI could help predicting long term functional outcome found after moderate TBI (Missault et al., 2019). It would be interesting to evaluate this prognosis value after mild TBI.

The neuroinflammatory response can participate in the functional deficits we observed. Indeed, this inflammatory response to mTBI occurred not only immediately underneath the biomechanical impact (*ie*, at the cortical level), but also deeper in the brain, in the hippocampus, a structure well-known to control key memory processes. The inflammatory response peaked at 7 days in the hippocampus, but increased for at least 21 days in the cortex. It is reasonable to associate this long-lasting and expanded parenchymal neuroinflammation to functional deficits, since neuroinflammation has already been associated with cognitive deficits in obesity (Miller et al., 2014), Alzheimer's disease (Bettcher et al., 2014), sepsis (Schwalm et al., 2014) and depression (Hermida et al., 2012).

It is tempting to speculate that preventing the neuro-inflammatory response after mTBI could limit long-term disabilities. However, the actual positive or negative contribution of this response has to be clarified, and may well be time- and phenotype-dependent (*i.e.*, early vs late response, M1 vs M2 phenotype; Needham et al., 2019). It could be interesting also to determine whether microglial/astrocytic activation and macrophage infiltration illustrate an inflammatory *priming* (Hughes et al., 2010; Ramaglia et al., 2012; Norden et al., 2015). Nevertheless, it is important to highlight here that all of our immunohistological analyses were performed comparing ipsi- and contralateral hemispheres. The differences that we found might underestimate the power of the neuroinflammatory reaction that occurred in our model of mild TBI since neuroinflammatory processes can also occur in the contralateral hemisphere after TBI (ref).

In conclusion, we provide a solid proof of concept that one single mild TBI can induce a long-lasting behavioural deficits, as well as a neuroinflammatory response, despite no lesion detectable by conventional imaging techniques. As revealed by our microPET study, we propose that patients with mTBI and persistent cognitive abnormalities could be subjected to TSPO imaging, and then evaluate whether inflammatory changes might be responsible for functional sequelae extending our findings and possibly opening new therapeutic avenues.

## Abbreviations

CCI: controlled cortical impact; CSF: cerebrospinal fluid; GFAP: glial fibrillary acid protein; Iba1: Iodonized calcium-binding adapter molecule-1; LPS: lipopolysaccharide; MPIO: Microparticle of iron oxide; PET: positron emission tomography; MRI: magnetic resonance imaging; MSME: multi-spin multi-echo; mTBI: mild traumatic brain injury; PET: positron emission tomography; SPECT: single photon emission computed tomography; TBI: traumatic brain injury; TSPO: translocator protein; USPIO: ultra-small particles of iron oxide; VCAM-1: vascular cell adhesion molecule-1

## Declarations

**Ethics approval and consent to participate:** All experiments were performed and reported in accordance with the Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments (ARRIVE) guidelines (<http://www.nc3rs.org.uk>), in accordance with French laws (act no. 87–848; Ministère de l’Agriculture et de la Forêt) and European Communities Council Directives of November 24, 1986 (86/609/EEC) guidelines, and have been approved by the ethical committee (affiliation number #15301). The Mario Negri Institute adheres to the principles set out in the following laws, regulations, and policies governing the care and use of laboratory animals: Italian Governing Law (D.lgs 26/2014; Authorization no.19/2008-A issued March 6, 2008 by Ministry of Health); They were reviewed and approved by the Mario Negri Institute Animal Care and Use Committee which includes ad hoc members for ethical issues, and by the Italian Ministry of Health (Decreto no. D/07/2013-B and 301/2017-PR).

**Consent for publication:** does not apply

**Availability of data and materials:** does not apply

**Competing interests:** none to declare

**Funding:** This work was supported by Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (INSERM), Caen Normandy University (UNICAEN), Institut pour la Recherche sur la Moelle épinière et l’Encéphale (IRME), Union Nationale des Associations de Familles de Traumatisés crâniens et de Cérébro-lésés (UNAFTC), and by Labex IRON (ANR-11-LABX-18-01).

**Acknowledgements:** We are grateful to Julie Busson for technical assistance.

## References

- Beckers L, Ory D, Geric I, et al. Increased Expression of Translocator Protein (TSPO) Marks Pro-inflammatory Microglia but Does Not Predict Neurodegeneration. *Mol Imaging Biol.* 2018;20(1):94–102. doi:10.1007/s11307-017-1099-1
- Bettcher BM, Kramer JH (2014) Longitudinal inflammation, cognitive decline, and Alzheimer’s disease: a mini-review. *Clin Pharmacol Ther* 96:464–469. doi: 10.1038/clpt.2014.147
- Brody DL, Mac Donald C, Kessens CC, Yuede C, Parsadanian M, Spinner M, Kim E, Schwetye KE, Holtzman DM, Bayly PV (2007) Electromagnetic controlled cortical impact device for precise, graded experimental traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 24:657–673. doi: 10.1089/neu.2006.0011
- Cao T, Thomas TC, Ziebell JM, Pauly JR, Lifshitz J (2012) Morphological and genetic activation of microglia after diffuse traumatic brain injury in the rat. *Neuroscience* 225:65–75. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.08.058
- Carasso A (1999) Linear and Nonlinear Image Deblurring: A Documented Study. *SIAM J Numer Anal* 36:1659–1689. doi: 10.1137/S0036142997320413
- Coughlin JM, Wang Y, Munro CA, Ma S, Yue C, Chen S, Airan R, Kim PK, Adams AV, Garcia C, Higgs C, Sair HI, Sawa A, Smith G, Lyketsos CG, Caffo B, Kassiou M, Guilarte TR, Pomper MG (2015) Neuroinflammation and brain atrophy in former NFL players: An in vivo multimodal imaging pilot study. *Neurobiol Dis* 74:58–65. doi: 10.1016/j.nbd.2014.10.019

Cruz-Haces M, Tang J, Acosta G, Fernandez J, Shi R (2017) Pathological correlations between traumatic brain injury and chronic neurodegenerative diseases. *Transl Neurodegener* 6:20. doi: 10.1186/s40035-017-0088-2

Damont A, Garcia-Argote S, Buisson D-A, Rousseau B, Dollé F (2015) Efficient tritiation of the translocator protein (18 kDa) selective ligand DPA-714. *J Labelled Comp Radiopharm* 58:1–6. doi: 10.1002/jlcr.3252

Dani M, Wood M, Mizoguchi R, Fan Z, Walker Z, Morgan R, Hinz R, Biju M, Kuruvilla T, Brooks DJ, Edison P (2018) Microglial activation correlates in vivo with both tau and amyloid in Alzheimer's disease. *Brain* 141:2740–2754. doi: 10.1093/brain/awy188

Dewan MC, Rattani A, Gupta S, Baticulon RE, Hung Y-C, Punchak M, Agrawal A, Adeleye AO, Shrinie MG, Rubiano AM, Rosenfeld JV, Park KB (2018) Estimating the global incidence of traumatic brain injury. *J Neurosurg* 1–18. doi: 10.3171/2017.10.JNS17352

Donat CK, Gaber K, Meixensberger J, Brust P, Pinborg LH, Hansen HH, Mikkelsen JD (2016) Changes in Binding of [(123)I]CLINDE, a High-Affinity Translocator Protein 18 kDa (TSPO) Selective Radioligand in a Rat Model of Traumatic Brain Injury. *Neuromolecular Med* 18:158–169. doi: 10.1007/s12017-016-8385-y

Donat CK, Scott G, Gentleman SM, Sastre M (2017) Microglial Activation in Traumatic Brain Injury. *Front Aging Neurosci* 9:208. doi: 10.3389/fnagi.2017.00208

Edison P, Brooks DJ (2018) Role of Neuroinflammation in the Trajectory of Alzheimer's Disease and in vivo Quantification Using PET. *J Alzheimers Dis* 64:S339–S351. doi: 10.3233/JAD-179929

Engel S, Schluesener H, Mittelbronn M, Seid K, Adjodah D, Wehner H-D, Meyermann R (2000) Dynamics of microglial activation after human traumatic brain injury are revealed by delayed expression of macrophage-related proteins MRP8 and MRP14. *Acta Neuropathol* 100:313–322. doi: 10.1007/s004019900172

Fehily B, Fitzgerald M (2017) Repeated Mild Traumatic Brain Injury: Potential Mechanisms of Damage. *Cell Transplant* 26:1131–1155. doi: 10.1177/0963689717714092

Folkersma H, Boellaard R, Yaqub M, Kloet RW, Windhorst AD, Lammertsma AA, Vandertop WP, van Berckel BNM (2011) Widespread and prolonged increase in (R)-[(11)C]-PK11195 binding after traumatic brain injury. *J Nucl Med* 52:1235–1239. doi: 10.2967/jnumed.110.084061

Foucault-Fruchard L, Doméné A, Page G, Windsor M, Emond P, Rodrigues N, Dollé F, Damont A, Buron F, Routier S, Chalon S, Antier D (2017) Neuroprotective effect of the alpha 7 nicotinic receptor agonist PHA 543613 in an in vivo excitotoxic adult rat model. *Neuroscience* 356:52–63. doi: 10.1016/j.neuroscience.2017.05.019

Fournier AP, Quenault A, Martinez de Lizarrondo S, Gauberti M, Defer G, Vivien D, Docagne F, Macrez R (2017) Prediction of disease activity in models of multiple sclerosis by molecular magnetic resonance imaging of P-selectin. *Proc Natl Acad Sci USA* 114:6116–6121. doi: 10.1073/pnas.1619424114

Gardner RC, Yaffe K (2015) Epidemiology of mild traumatic brain injury and neurodegenerative disease. *Mol Cell Neurosci* 66:75–80. doi: 10.1016/j.mcn.2015.03.001

Gauberti M, Fournier AP, Docagne F, Vivien D, Martinez de Lizarrondo S (2018) Molecular Magnetic Resonance Imaging of Endothelial Activation in the Central Nervous System. *Theranostics* 8:1195–1212. doi: 10.7150/thno.22662

Gauberti M, Montagne A, Marcos-Contreras OA, Le Béhot A, Maubert E, Vivien D (2013) Ultra-sensitive molecular MRI of vascular cell adhesion molecule-1 reveals a dynamic inflammatory penumbra after strokes. *Stroke* 44:1988–1996. doi: 10.1161/STROKEAHA.111.000544

Ghadery C, Best LA, Pavese N, Tai YF, Strafella AP. PET Evaluation of Microglial Activation in Non-neurodegenerative Brain Diseases. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2019;19(7):38. Published 2019 May 28. doi:10.1007/s11910-019-0951-x

Grossman R, Paden CM, Fry PA, Rhodes RS, Biegon A (2012) Persistent region-dependent neuroinflammation, NMDA receptor loss and atrophy in an animal model of penetrating brain injury. *Future Neurol* 7:329–339. doi: 10.2217/fnl.12.25

Guilarte TR. TSPO in diverse CNS pathologies and psychiatric disease: A critical review and a way forward. *Pharmacol Ther.* 2019;194:44–58. doi:10.1016/j.pharmthera.2018.09.003

Hagens MH, Killestein J, Yaqub MM, van Dongen GA, Lammertsma AA, Barkhof F, van Berckel BN (2018) Cerebral rituximab uptake in multiple sclerosis: A 89Zr-immunoPET pilot study. *Mult Scler* 24:543–545. doi: 10.1177/1352458517704507

Hanten G, Li X, Ibarra A, Wilde EA, Barnes A, McCauley SR, McCarthy J, Hoxhaj S, Mendez D, Hunter JV, Levin HS, Smith DH (2013) Updating memory after mild traumatic brain injury and orthopedic injuries. *J Neurotrauma* 30:618–624. doi: 10.1089/neu.2012.2392

Hermida AP, McDonald WM, Steenland K, Levey A (2012) The association between late-life depression, mild cognitive impairment and dementia: is inflammation the missing link? *Expert Rev Neurother* 12:1339–1350. doi: 10.1586/ern.12.127

Hughes MM, Field RH, Perry VH, Murray CL, Cunningham C (2010) Microglia in the degenerating brain are capable of phagocytosis of beads and of apoptotic cells, but do not efficiently remove PrPSc, even upon LPS stimulation. *Glia* 58:2017–2030. doi: 10.1002/glia.21070

Israel I, Ohsiek A, Al-Momani E, Albert-Weissenberger C, Stetter C, Mencl S, Buck AK, Kleinschnitz C, Samnick S, Sirén A-L (2016) Combined [(18)F]DPA-714 micro-positron emission tomography and autoradiography imaging of microglia activation after closed head injury in mice. *J Neuroinflammation* 13:140. doi: 10.1186/s12974-016-0604-9

Lavis S, Guillemier M, Hérard AS, et al. Reactive astrocytes overexpress TSPO and are detected by TSPO positron emission tomography imaging. *J Neurosci.* 2012;32(32):10809–10818. doi:10.1523/JNEUROSCI.1487-12.2012

Maas AIR, Menon DK, Adelson PD, Andelic N, Bell MJ, Belli A, Bragge P, Brazinova A, Büki A, Chesnut RM, Citerio G, Coburn M, Cooper DJ, Crowder AT, Czeiter E, Czosnyka M, Diaz-Arrastia R, Dreier JP, Duhaime A-C, Ercole A, van Essen TA, Feigin VL, Gao G, Giacino J, Gonzalez-Lara LE, Gruen RL, Gupta D, Hartings JA, Hill S, Jiang J-Y, Ketharanathan N, Kompanje EJO, Lanyon L, Laureys S, Lecky F, Levin H, Lingsma HF, Maegele M, Majdan M, Manley G, Marsteller J, Mascia L, McFadyen C, Mondello S, Newcombe V, Palotie A, Parizel PM, Peul W, Piercy J, Polinder S, Puybasset L, Rasmussen TE, Rossaint R, Smielewski P, Söderberg J, Stanworth SJ, Stein MB, von Steinbüchel N, Stewart W, Steyerberg EW, Stocchetti N, Synnot A, Te Ao B, Tenovuo O, Theadom A, Tibboel D, Videtta W, Wang KKW, Williams WH, Wilson L, Yaffe K, InTBIR Participants and Investigators (2017) Traumatic brain injury: integrated approaches to improve prevention, clinical care, and research. *Lancet Neurol* 16:987–1048. doi: 10.1016/S1474-4422(17)30371-X

Madsen T, Erlangsen A, Orlovskaya S, Mofaddy R, Nordentoft M, Benros ME (2018) Association Between Traumatic Brain Injury and Risk of Suicide. *JAMA* 320:580–588. doi: 10.1001/jama.2018.10211



McAteer MA, Akhtar AM, von Zur Muhlen C, Choudhury RP (2010) An approach to molecular imaging of atherosclerosis, thrombosis, and vascular inflammation using microparticles of iron oxide. *Atherosclerosis* 209:18–27. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2009.10.009

McCauley SR, Wilde EA, Barnes A, Hanten G, Hunter JV, Levin HS, Smith DH (2014) Patterns of early emotional and neuropsychological sequelae after mild traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 31:914–925. doi: 10.1089/neu.2012.2826

Miller AA, Spencer SJ (2014) Obesity and neuroinflammation: a pathway to cognitive impairment. *Brain Behav Immun* 42:10–21. doi: 10.1016/j.bbi.2014.04.001

Mirrione MM, Schiffer WK, Fowler JS, Alexoff DL, Dewey SL, Tsirka SE (2007) A novel approach for imaging brain-behavior relationships in mice reveals unexpected metabolic patterns during seizures in the absence of tissue plasminogen activator. *Neuroimage* 38:34–42. doi: 10.1016/j.neuroimage.2007.06.032

Missault S, Anckaerts C, Blockx I, Deleze S, Van Dam D, Barriche N, De Pauw G, Aertgeerts S, Valkenburg F, De Deyn PP, Verhaeghe J, Wyffels L, Van der Linden A, Staelens S, Verhoye M, Dedeurwaerdere S (2019) Neuroimaging of Subacute Brain Inflammation and Microstructural Changes Predicts Long-Term Functional Outcome after Experimental Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma* 36:768–788. doi: 10.1089/neu.2018.5704

Montagne A, Gauberti M, Macrez R, Jullienne A, Briens A, Raynaud J-S, Louin G, Buisson A, Haelewyn B, Docagne F, Defer G, Vivien D, Maubert E (2012) Ultra-sensitive molecular MRI of cerebrovascular cell activation enables early detection of chronic central nervous system disorders. *NeuroImage* 63:760–770. doi: 10.1016/j.neuroimage.2012.07.018

Morganti-Kossmann MC, Semple BD, Hellewell SC, Bye N, Ziebell JM (2019) The complexity of neuroinflammation consequent to traumatic brain injury: from research evidence to potential treatments. *Acta Neuropathol* 137:731–755. doi: 10.1007/s00401-018-1944-6

Needham EJ, Helmy A, Zanier ER, Jones JL, Coles AJ, Menon DK (2019) The immunological response to traumatic brain injury. *J Neuroimmunol* 332:112–125. doi: 10.1016/j.jneuroim.2019.04.005

Norden DM, Muccigrosso MM, Godbout JP (2015) Microglial priming and enhanced reactivity to secondary insult in aging, and traumatic CNS injury, and neurodegenerative disease. *Neuropharmacology* 96:29–41. doi: 10.1016/j.neuropharm.2014.10.028

Obiang P, Macrez R, Jullienne A, Bertrand T, Lesept F, Ali C, Maubert E, Vivien D, Agin V (2012) GluN2D subunit-containing NMDA receptors control tissue plasminogen activator-mediated spatial memory. *J Neurosci* 32:12726–12734. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6202-11.2012

Owen DR, Narayan N, Wells L, et al. Pro-inflammatory activation of primary microglia and macrophages increases 18 kDa translocator protein expression in rodents but not humans. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2017;37(8):2679–2690. doi:10.1177/0271678X17710182

Pannell M, Economopoulos V, Wilson TC, et al. Imaging of translocator protein upregulation is selective for pro-inflammatory polarized astrocytes and microglia. *Glia*. 2020;68(2):280–297. doi:10.1002/glia.23716

Perry DC, Sturm VE, Peterson MJ, Pieper CF, Bullock T, Boeve BF, Miller BL, Guskiewicz KM, Berger MS, Kramer JH, Welsh-Bohmer KA (2016) Association of traumatic brain injury with subsequent neurological and psychiatric disease: a meta-analysis. *J Neurosurg* 124:511–526. doi: 10.3171/2015.2.JNS14503

Prut L, Belzung C (2003) The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol* 463:3–33. doi: 10.1016/s0014-2999(03)01272-x

Pruvost M, Lépine M, Leonetti C, Etard O, Naveau M, Agin V, Docagne F, Maubert E, Ali C, Emery E, Vivien D (2017) ADAMTS-4 in oligodendrocytes contributes to myelination with an impact on motor function. *Glia* 65:1961–1975. doi: 10.1002/glia.23207

Quenault A, Martinez de Lizarrondo S, Etard O, Gauberti M, Orset C, Haelewyn B, Segal HC, Rothwell PM, Vivien D, Touzé E, Ali C (2017) Molecular magnetic resonance imaging discloses endothelial activation after transient ischaemic attack. *Brain* 140:146–157. doi: 10.1093/brain/aww260

Raji CA, Henderson TA (2018) PET and Single-Photon Emission Computed Tomography in Brain Concussion. *Neuroimaging Clin N Am* 28:67–82. doi: 10.1016/j.nic.2017.09.003

Ramaglia V, Hughes TR, Donev RM, Ruseva MM, Wu X, Huitinga I, Baas F, Neal JW, Morgan BP (2012) C3-dependent mechanism of microglial priming relevant to multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:965–970. doi: 10.1073/pnas.1111924109

Ramlackhansingh AF, Brooks DJ, Greenwood RJ, Bose SK, Turkheimer FE, Kinnunen KM, Gentleman S, Heckemann RA, Gunanayagam K, Gelosa G, Sharp DJ (2011) Inflammation after trauma: microglial activation and traumatic brain injury. *Ann Neurol* 70:374–383. doi: 10.1002/ana.22455

Ren Z, Iliff JJ, Yang L, Yang J, Chen X, Chen MJ, Giese RN, Wang B, Shi X, Nedergaard M (2013) “Hit & Run” model of closed-skull traumatic brain injury (TBI) reveals complex patterns of post-traumatic AQP4 dysregulation. *J Cereb Blood Flow Metab* 33:834–845. doi: 10.1038/jcbfm.2013.30

Saatman KE, Duhaime A-C, Bullock R, Maas AIR, Valadka A, Manley GT, Workshop Scientific Team and Advisory Panel Members (2008) Classification of traumatic brain injury for targeted therapies. *J Neurotrauma* 25:719–738. doi: 10.1089/neu.2008.0586

Schwalm MT, Pasquali M, Miguel SP, Dos Santos JPA, Vuolo F, Comim CM, Petronilho F, Quevedo J, Gelain DP, Moreira JCF, Ritter C, Dal-Pizzol F (2014) Acute brain inflammation and oxidative damage are related to long-term cognitive deficits and markers of neurodegeneration in sepsis-survivor rats. *Mol Neurobiol* 49:380–385. doi: 10.1007/s12035-013-8526-3

Sérrière S, Tauber C, Vercouillie J, Mothes C, Pruckner C, Guilloteau D, Kassiou M, Doméné A, Garreau L, Page G, Chalon S (2015) Amyloid load and translocator protein 18 kDa in APPswePS1-dE9 mice: a longitudinal study. *Neurobiol Aging* 36:1639–1652. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.11.023

Strome EM, Jivan S, Doudet DJ. Quantitative in vitro phosphor imaging using [3H] and [18F] radioligands: the effects of chronic desipramine treatment on serotonin 5-HT2 receptors [published correction appears in *J Neurosci Methods*. 2005 Aug 15;146(2):205]. *J Neurosci Methods*. 2005;141(1):143–154. doi:10.1016/j.jneumeth.2004.06.008

Teasdale G, Jennett B (1974) Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale. *Lancet* 2:81–84

Venneti S, Wagner AK, Wang G, Slagel SL, Chen X, Lopresti BJ, Mathis CA, Wiley CA (2007) The high affinity peripheral benzodiazepine receptor ligand DAA1106 binds specifically to microglia in a rat model of traumatic brain injury: implications for PET imaging. *Exp Neurol* 207:118–127. doi: 10.1016/j.expneurol.2007.06.003

Vegliante G, Tolomeo D, Drieu A, et al. Longitudinal Molecular Magnetic Resonance Imaging of Endothelial Activation after Severe Traumatic Brain Injury. *J Clin Med*. 2019;8(8):1134. Published 2019 Jul 30. doi:10.3390/jcm8081134

Werry EL, Bright FM, Piguet O, et al. Recent Developments in TSPO PET Imaging as A Biomarker of Neuroinflammation in Neurodegenerative Disorders. *Int J Mol Sci.* 2019;20(13):3161. Published 2019 Jun 28. doi:10.3390/ijms20133161

Zanier ER, Bertani I, Sammali E, Pischiutta F, Chiaravalloti MA, Vegliante G, Masone A, Corbelli A, Smith DH, Menon DK, Stocchetti N, Fiordaliso F, De Simoni M-G, Stewart W, Chiesa R (2018) Induction of a transmissible tau pathology by traumatic brain injury. *Brain* 141:2685–2699. doi: 10.1093/brain/awy193

Zinnhardt B, Wiesmann M, Honold L, Barca C, Schäfers M, Kiliaan AJ, Jacobs AH (2018) In vivo imaging biomarkers of neuroinflammation in the development and assessment of stroke therapies - towards clinical translation. *Theranostics* 8:2603–2620. doi: 10.7150/thno.24128

### Figures legends:

**Figure 1.** Mild TBI does not induce brain damage detectable with conventional MRI, while moderate TBI does. (A) Experimental design showing that two depths of impact have been compared in the CCI model. (B) Representative T2-weighted and T2\*-weighted MRI acquisitions in mice 24 hours after mild or moderate TBI. (C) Corresponding quantifications of contusion (C) and hemorrhage (D) volumes measured with T2-weighted and T2\*-weighted MRI acquisitions, respectively. N=7/8 mice per group. \*  $p<0.05$  vs mild TBI; \*\* $p<0.01$  vs mild TBI; \*\*\* $p<0.001$  vs mild TBI, Mann-Whitney test; #  $p<0.05$  vs d0; ##  $p<0.01$  vs d0, Wilcoxon test. Red arrows indicate the site of impact.

**Figure 2.** Mild TBI induces long term behavioural deficits. (A) Schematic representation of Y maze behavioral test. (B) Quantification of the percentage of entries in the new arm 7 days before and 1 and 3 weeks after mild TBI. (C) Representative sample traces (upper panels) and merged heatmaps (bottom panels) in the open field of mild TBI mice 7 days before, 7 and 21 days after mild TBI. Corresponding quantification of the velocity (D, in m/s), total distance moved (E, in cm), time in movement (F) and time spent in the center (G). N=10 mice per group, # $p<0.05$  vs new arm, Wilcoxon paired-test; ##  $p<0.01$  vs d-7 Wilcoxon paired-test.

**Figure 3.** Mild TBI does not induce cerebrovascular inflammation. (A) Schematic representation of a targeted MPIO. (B) Representative photomicrographs of  $\alpha$ P-selectin MPIOs (arrows) along P-selectin positive (green) brain vessels stained with laminin (cyan). (C) Representative T2\*-GEFC  $\alpha$ P-selectin MPIO acquisition in a mouse subjected to an intrastriatal injection of LPS as a positive control. (D) Experimental design showing that 7 or 21 days after mild TBI, mice were subjected to molecular imaging and immunohistochemical (IHC) analyses of P-selectin expression. (E) Representative T2\*-GEFC  $\alpha$ P-selectin MPIO acquisitions 1 week (upper panel) and 3 weeks after mild TBI (N=6 mice per time). (F) Representative photomicrographs of P-selectin immunostaining 1 and 3 weeks after mild TBI (for additional controls, see supplementary figure 1).

**Figure 4.** Mild TBI provokes a long lasting cortical inflammation. (A) High magnification of an activated microglial cell, expressing both Iba1 and CD68. (B) Representative photomicrographs of microglial cells, as well as activated microglia and macrophages in the cortex 1 week (C) or 3 weeks (D) after mTBI. Corresponding quantification of total microglial cell numbers, activated microglia and macrophages 1 week (C) and 3 weeks (E) after mTBI. N=6 mice per group,  $p<0.05$  vs contralateral cortex, Wilcoxon test.

**Figure 5.** Mild TBI provokes a long lasting hippocampal inflammation. Representative photomicrographs of microglial cells, as well as activated microglia and macrophages in the hippocampus 1 week (A) and 3 weeks (C) after mTBI. Corresponding quantification of total microglial cell numbers, activated microglia and macrophages 1 week (B) and 3 weeks (D) after mTBI. N=6 mice per group,  $p<0.05$  vs contralateral hippocampus, Wilcoxon test.

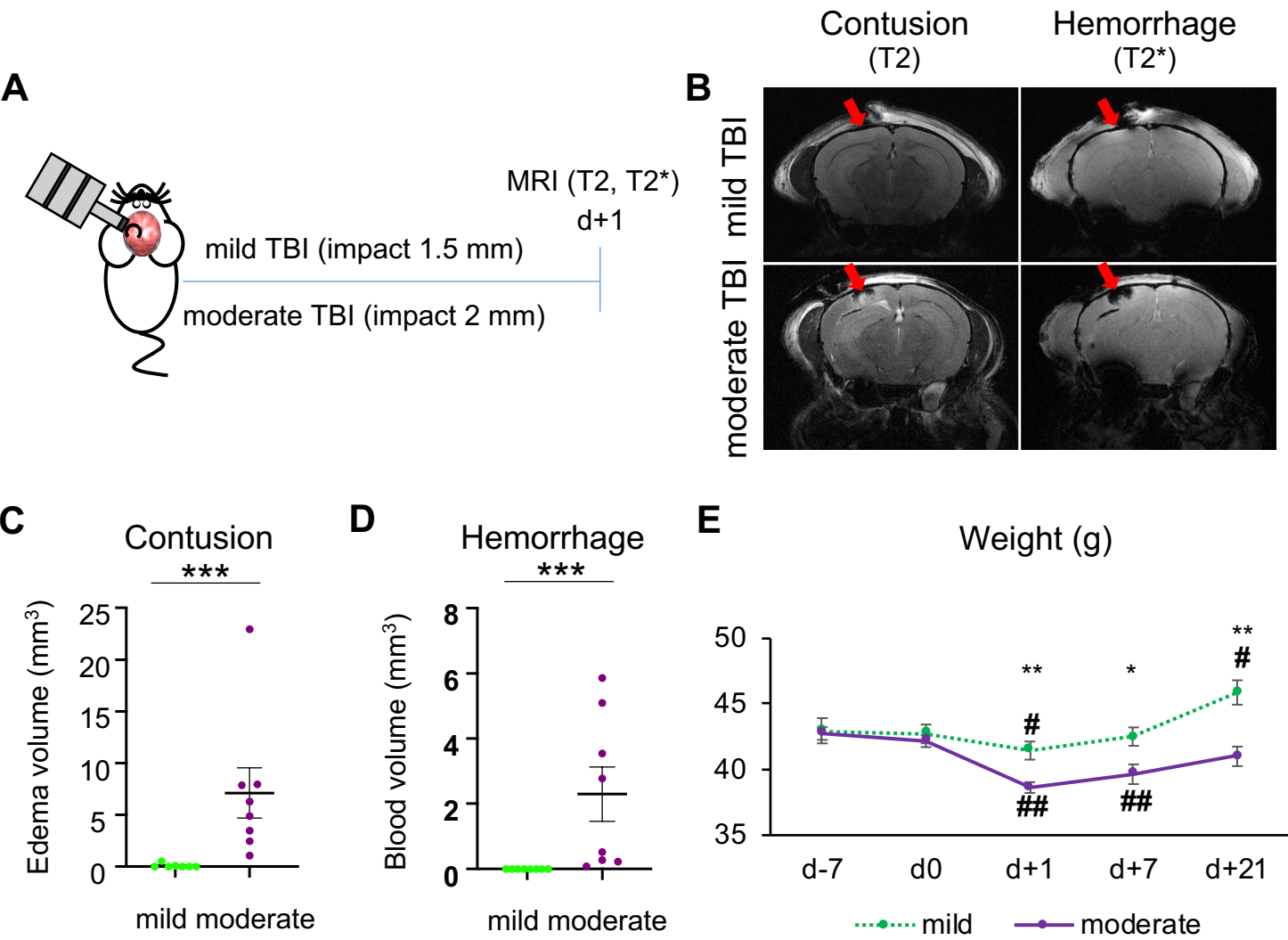
**Figure 6.** Neuroinflammation after mild TBI provokes is detectable by PET imaging. (A) TSPO expression investigated by *in vitro* autoradiographic experiment. Representative brain sections of [ $^3\text{H}$ ]DPA-714 autoradiography 1 week and 3 weeks after mTBI (upper panel). The specific binding of [ $^3\text{H}$ ]DPA-714 was quantified (lower panel) in the cortex and hippocampus of coronal brain sections in the lesioned (ipsi-) and contralateral (intact) side. \*\*\* $p<0.001$ ; 2-way ANOVA;  $n=7/\text{group}$ . (B) TSPO expression investigated by *in vivo* PET experiments. (left panel) Fusion images between a MRI template and images of averaged uptake of [ $^{18}\text{F}$ ]DPA-714 with from left to right 2 coronal images corresponding to coronal plates of the Franklin and Paxinos atlas at -1.94 mm and -2.92 mm from the bregma, along with a sagittal plate showing an increased uptake of [ $^{18}\text{F}$ ]DPA-714 in the retrosplenial cortical area. (right panel) Example of a coronal image of Z-score maps fused with a MRI template showing in red the significant increased uptake in [ $^{18}\text{F}$ ]DPA-714 in the ipsilateral vs. contralateral hemisphere ( $p<0.01$ ).  $n=5$ . (C) The Z-score maps revealed a significant increased uptake of [ $^{18}\text{F}$ ]DPA-714 in the ipsilateral vs. contralateral cortex with a z-score value of  $6.05 \pm 1.86$  ( $p=0.0015$ ). (D) The uptake of [ $^{18}\text{F}$ ]DPA-714 was also increased in the hippocampus with a z-score value of  $5.74 \pm 1.32$  ( $p=0.0022$ ).

## Supplementary legends

**Figure S1.** Controls for molecular MRI. (A) Schematic representation of the experimental design showing that severe TBI was induced after craniectomy. (B) Representative T2-weighted and T2\*-weighted MRI acquisitions in mice 24 hours after severe TBI. (C) Representative projection of signal obtained with MPIOs coupled to either an antibody against P-selectin, or a control immunoglobulin. Signals are mapped on a template and on the corresponding angiography. (D) Representative T2\*-GEFC  $\alpha$ P-selectin MPIO acquisition in a mouse subjected to severe TBI and corresponding quantification in the lesioned (ipsi-lateral) and contra-lateral sides.  $**p<0.01$ ; t-test,  $n=3$ . (E) Representative ICH patterns of P-Selectin in the lesioned area.

**Figure S2.** Mild TBI provokes a long lasting astrogliosis. (A) GFAP positive astrocytes were found in the cortical layer 1 week after miTBI. (B) Quantification of astrocyte numbers 1 week after miTBI. (C) Astrocytes were found abundantly in the cortex 3 weeks after miTBI. (D) Quantification of astrocyte numbers 3 weeks after miTBI. (A) GFAP positive astrocytes were found abundantly in the hippocampus 1 week after miTBI. (B) Quantification astrocyte numbers 1 week after miTBI. (C) Astrocytes were found in the hippocampus 3 weeks after miTBI. (D) Quantification of astrocyte numbers 3 weeks after miTBI.

Fig 1.



**Fig 2.**

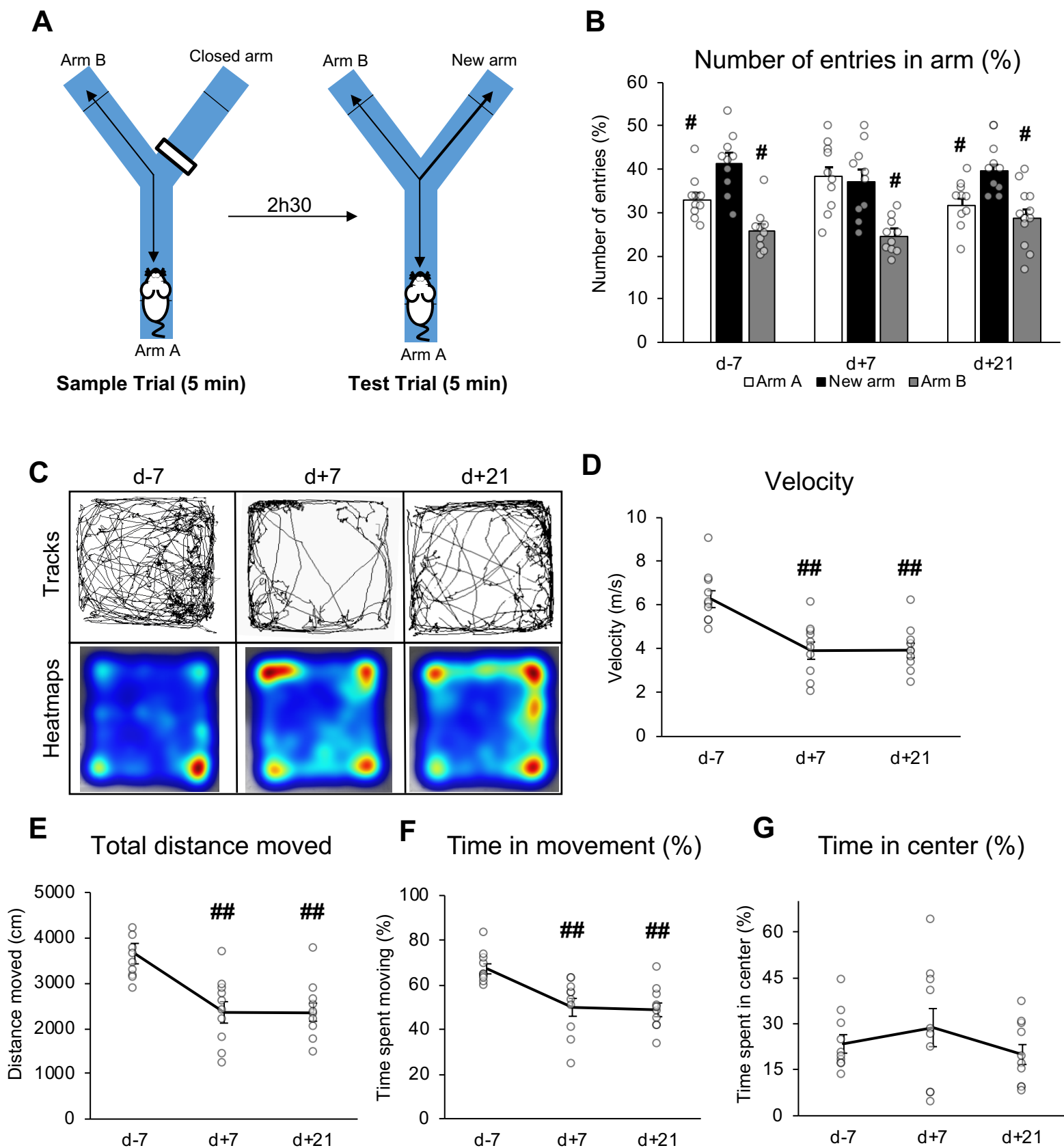


Fig 3.

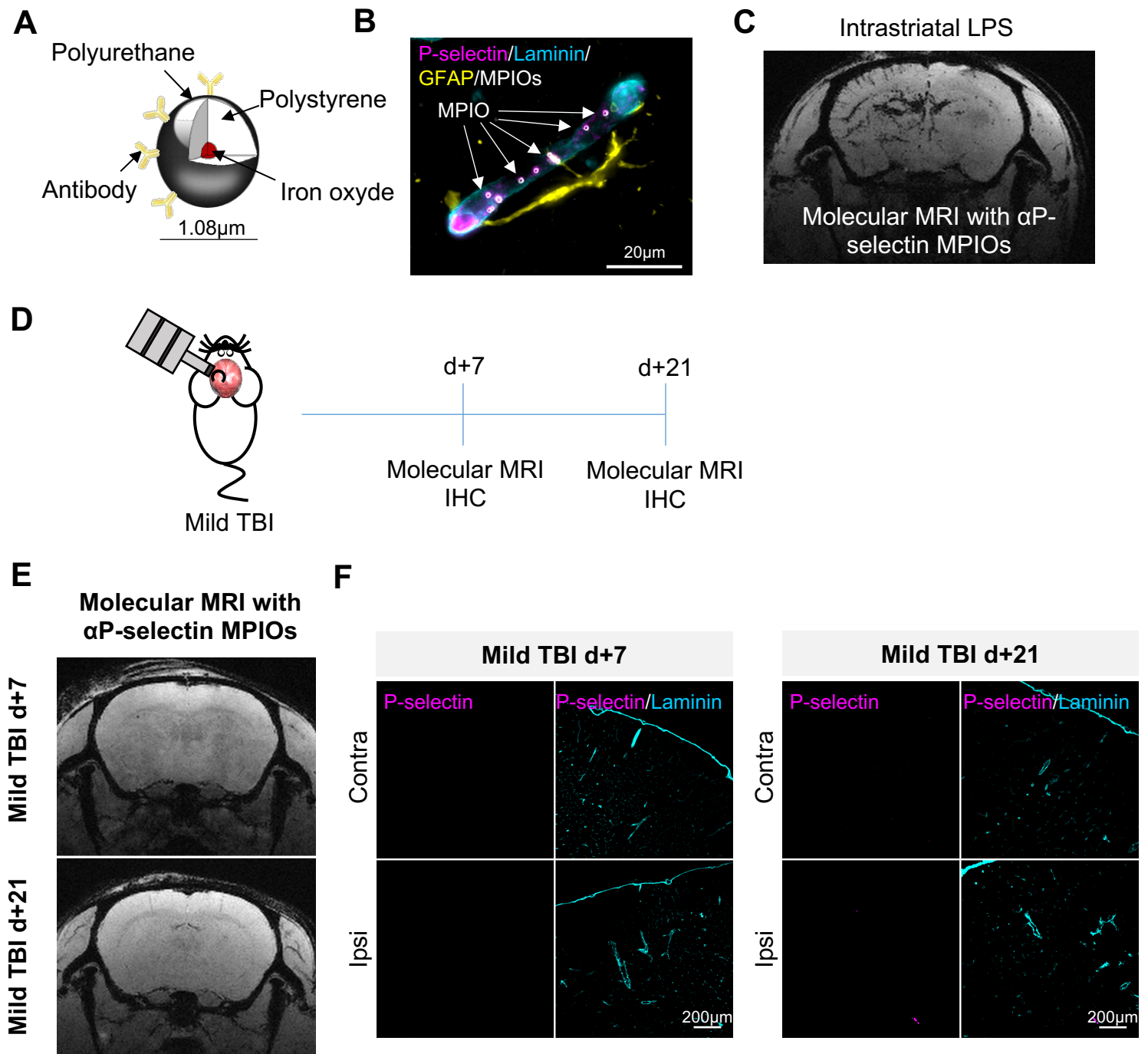
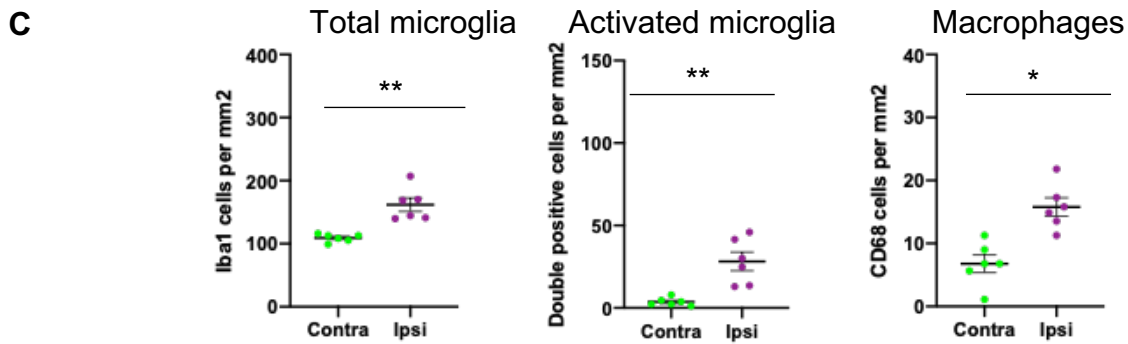
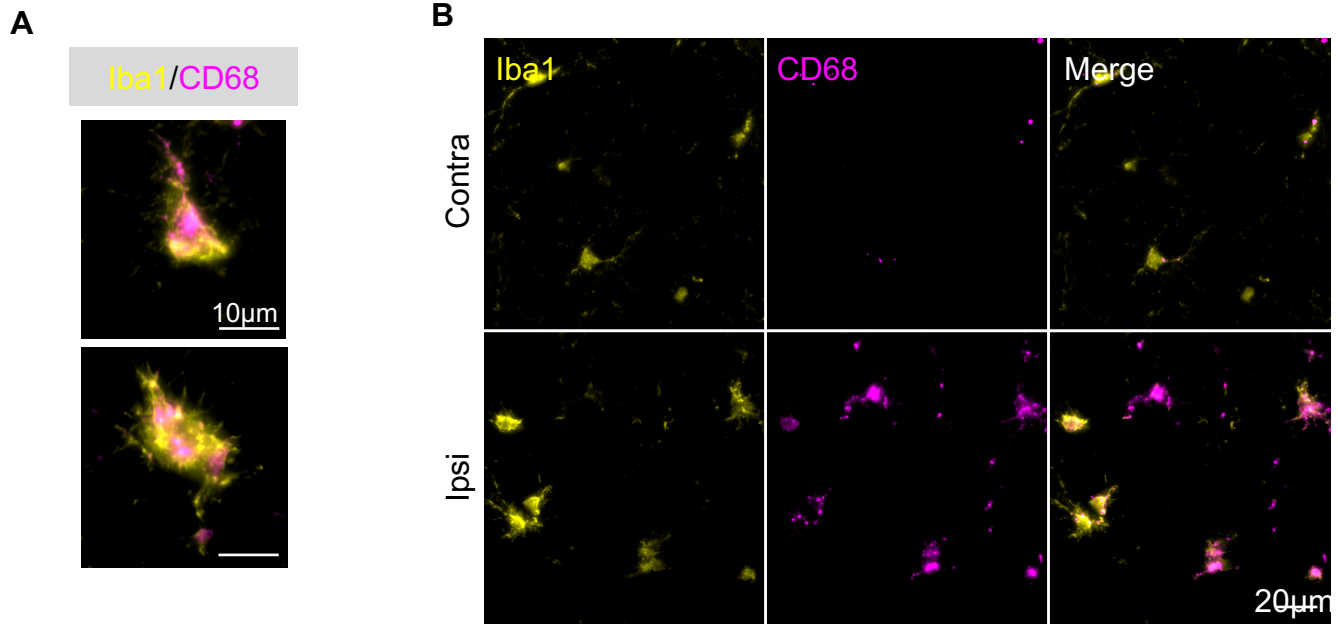




Fig 4.

Mild TBI d+7 (cortex)



Mild TBI d+21 (cortex)

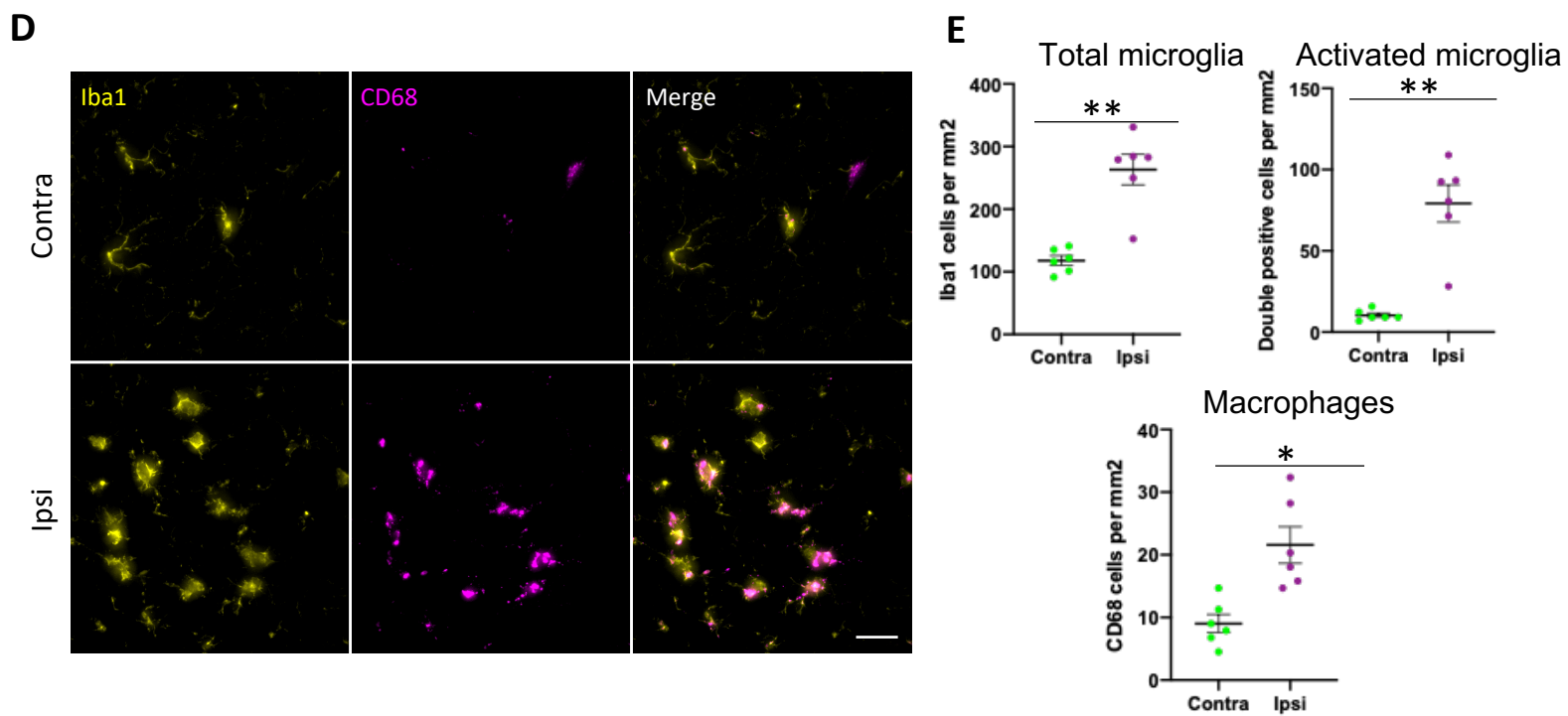
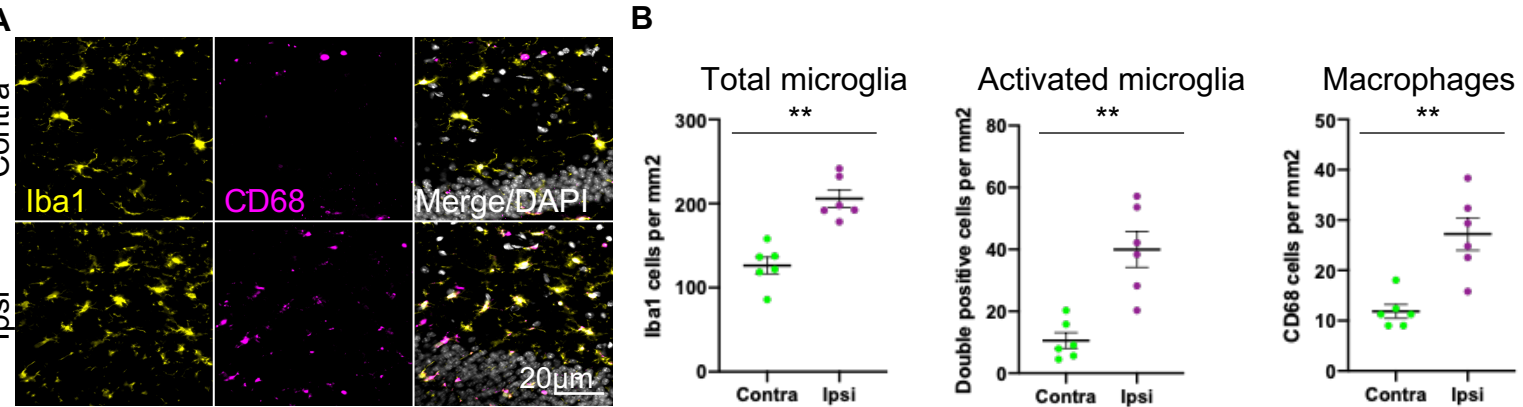


Fig 5.

Mild TBI d+7 (hippocampus)



Mild TBI d+21 (hippocampus)

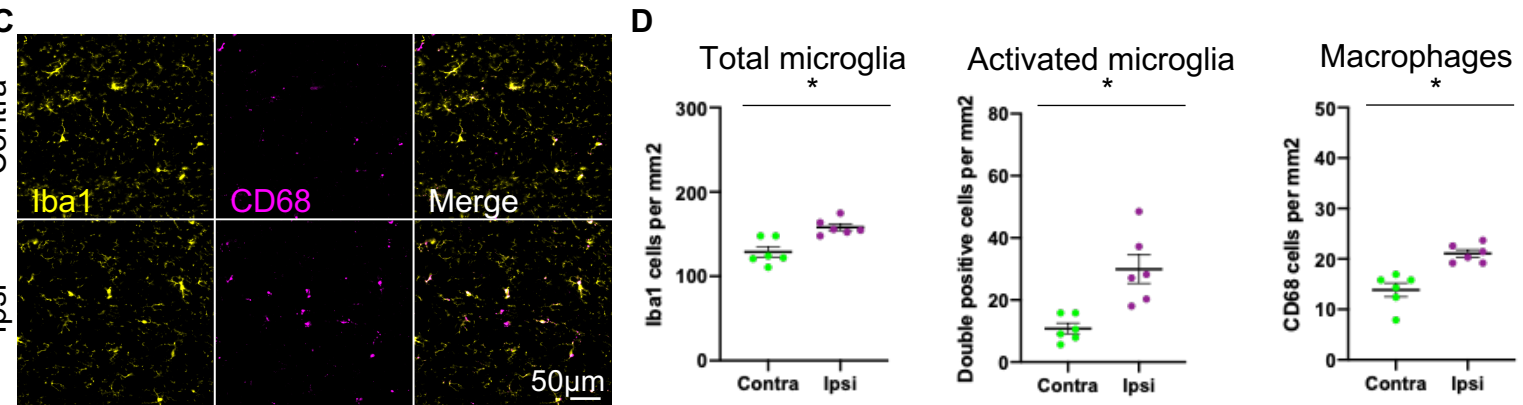
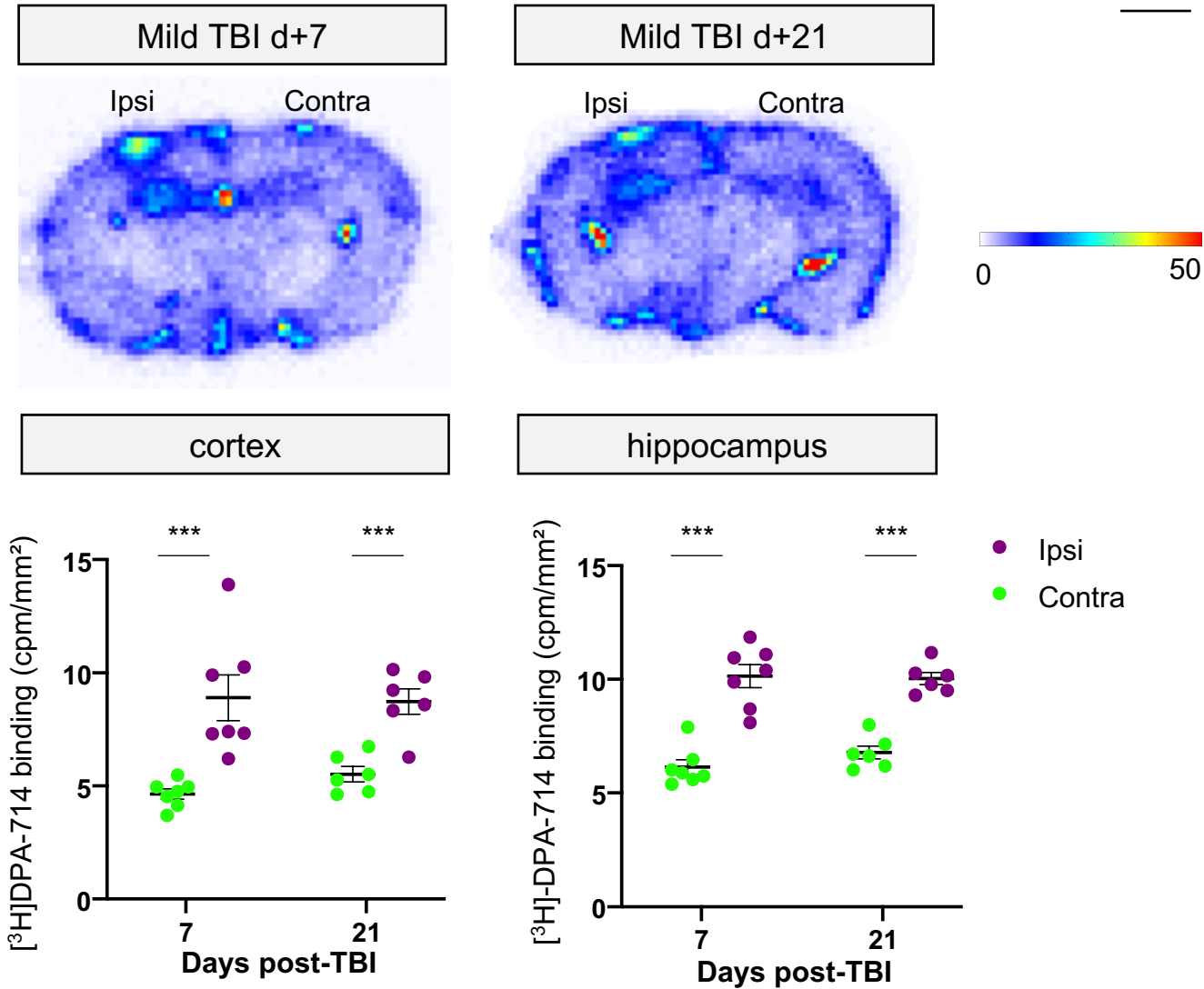
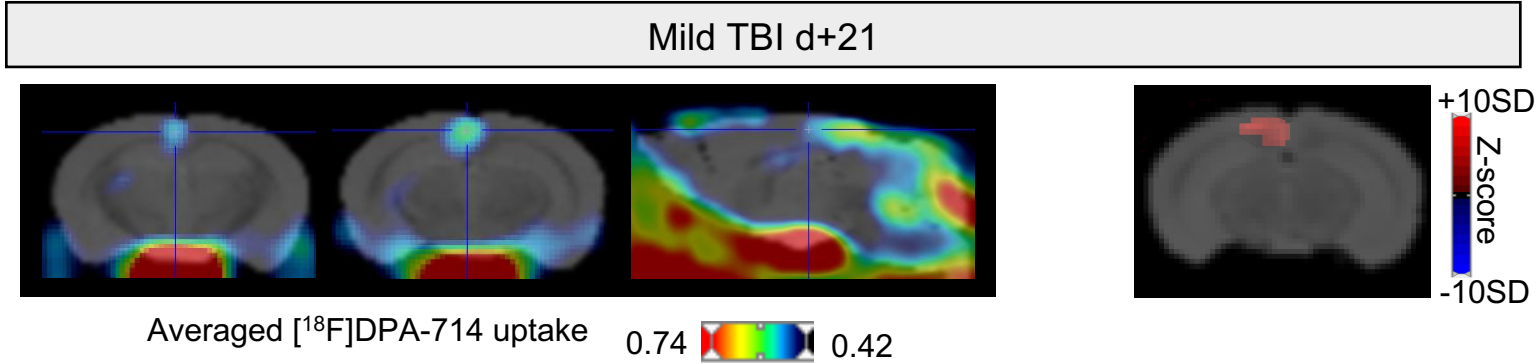


Fig 6.

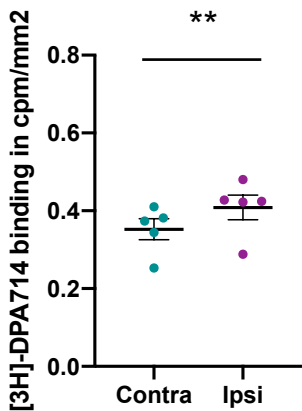
**A** [<sup>3</sup>H]DPA-714 autoradiography



**B** [<sup>18</sup>F]DPA-714 PET-Scan



**C** cortex



**D** hippocampus

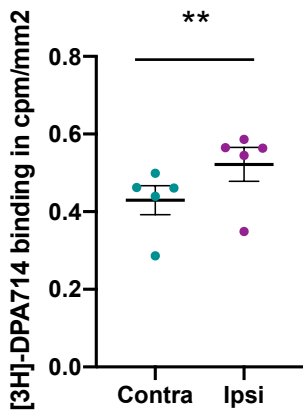


Fig S1.

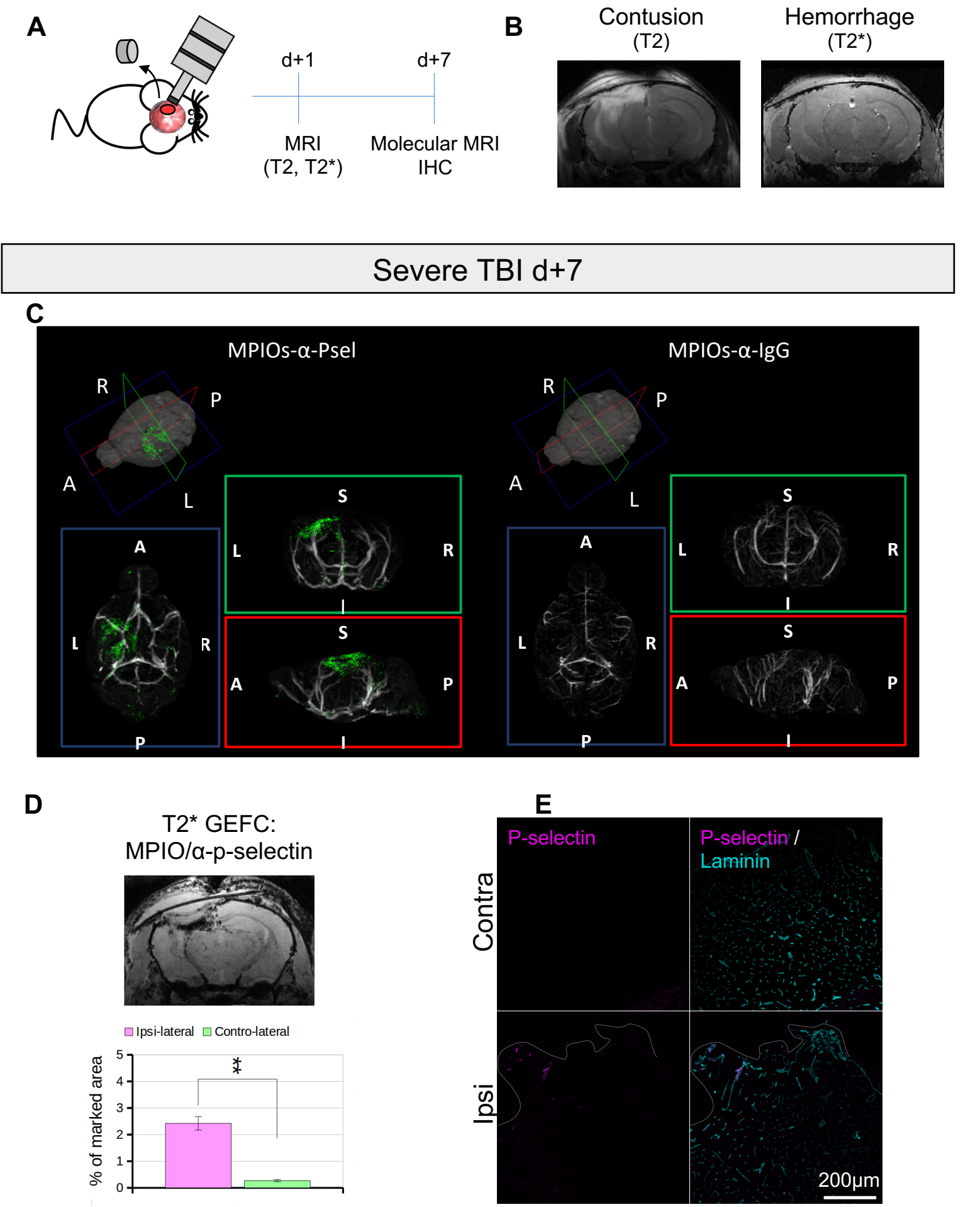
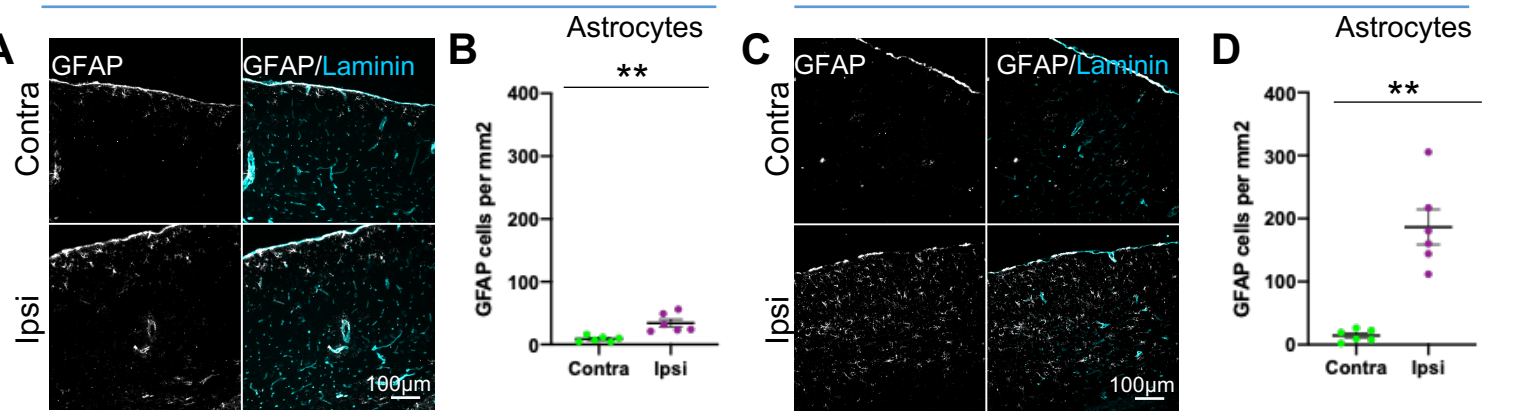


Fig S2.

cortex

Mild TBI d+7

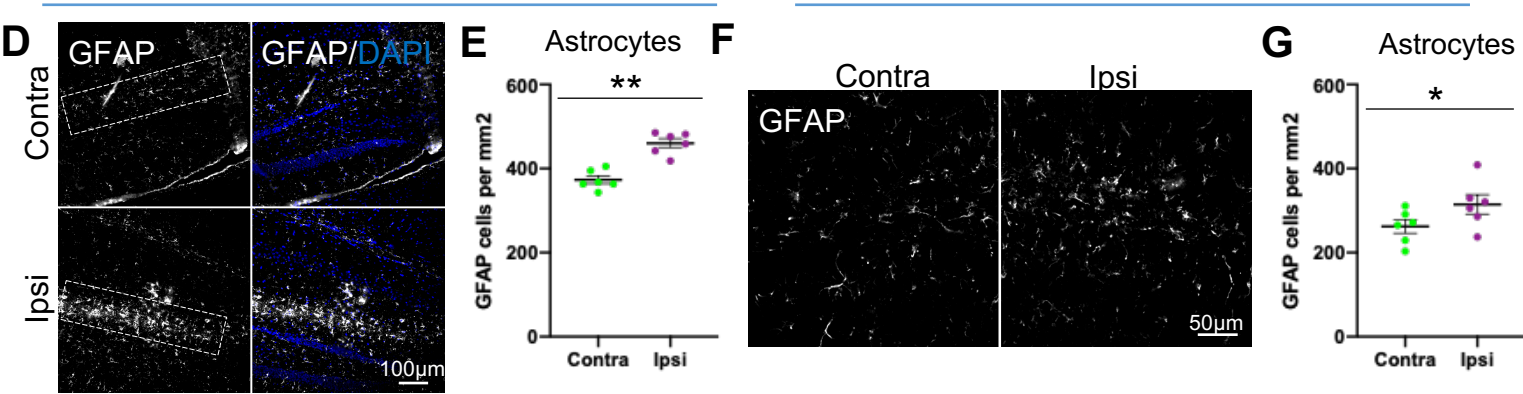
Mild TBI d+21



hippocampus

Mild TBI d+7

Mild TBI d+21



# Étude translationnelle des interactions cerveau-foie dans les troubles de l'usage de l'alcool

## Résumé

Chez les patients avec un trouble de l'usage de l'alcool (TUAL), les atteintes hépatiques et cérébrales sont fréquentes et variées dans leur nature et leur sévérité. Cette hétérogénéité est notamment due aux modalités de la consommation d'alcool, au terrain génétique et aux comorbidités. L'inflammation pourrait jouer un rôle central dans le développement de ces atteintes, notamment dans la communication entre le foie et le cerveau. L'objectif de cette thèse est donc **d'étudier le développement des atteintes hépatiques et cérébrales ainsi que le rôle de l'inflammation chez les patients TUAL et dans deux modèles animaux d'exposition chronique à l'alcool**. Nous avons ainsi montré que chez les patients TUAL, l'inflammation systémique est corrélée à la fibrose hépatique et au volume cérébral. Dans un modèle de rat avec une préférence génétique pour l'alcool, une réponse inflammatoire locale est observée au niveau cérébral et hépatique et accompagne les atteintes cérébrales (volumiques et d'intégrité des fibres, similaires à celles des patients TUAL), après 12 mois d'exposition à l'alcool. L'étude longitudinale dans un modèle murin sans prédisposition génétique à l'alcool, a montré qu'une consommation chronique d'alcool (aux mêmes doses que pour la souche préférente) cause des atteintes cognitives et motrices en l'absence d'anomalies cérébrales détectables à l'IRM, mais accompagnées en revanche d'inflammation hépatique et une activation microgliale au niveau cérébral. Les périodes répétées d'abstinence entraînent une inflammation périphérique plus sévère et s'aggravant avec l'âge. L'inhibition de la réponse inflammatoire cérébrale à travers l'injection de minocycline favorise la diminution spontanée de la consommation d'alcool, mais n'a pas d'effet bénéfique sur les déficits cognitifs. L'inflammation semble être un facteur primordial dans la communication entre le foie et le cerveau, et il est nécessaire de cibler les bons acteurs des processus inflammatoires dans les potentiels traitements pour diminuer non seulement la consommation d'alcool mais aussi les déficits comportementaux et cérébraux chez les patients TUAL.

Mots-clés : alcool, cerveau, foie, inflammation, translationnel.

## Abstract

In AUD patients, hepatic and cerebral lesions are frequent and varied in their nature and severity. This heterogeneity is notably due to the parameters of alcohol consumption, genetic background and comorbidities. Inflammation could play a central role in the development of these disorders, especially in the communication between the liver and the brain. The objective of this thesis was **to study the development of liver and brain damage as well as the role of inflammation in AUD patients and in two animal models of chronic exposure to alcohol**. We have shown that in AUD patients, systemic inflammation is correlated with hepatic fibrosis and brain volume. In a rat model with a genetic preference for alcohol, a local inflammatory response is observed in the brain and liver and accompanies brain damage (volume and fiber integrity, similar to that of AUD patients), after 12 months exposure to alcohol. The longitudinal study in a mouse model without genetic predisposition to alcohol, showed that chronic alcohol consumption (at the same doses as for the alcohol-preferring strain) causes cognitive and motor damage in the absence of detectable brain abnormalities on MRI, but was accompanied by liver inflammation and microglial activation in the brain. Repeated periods of cessation lead to more severe peripheral inflammation, which worsens with age. The inhibition of the brain inflammatory response through the injection of minocycline promoted the spontaneous decrease in alcohol consumption, but had no beneficial effect on cognitive deficits. Inflammation seems to be a primary factor in the communication between the liver and the brain, and it is necessary to target the right actors of the inflammatory processes in the potential treatments to reduce not only the consumption of alcohol but also the behavioral and cerebral deficits in AUD patients.

Key words: alcohol, brain, liver, inflammation, translational