



HAL
open science

Diversité clinico-radiologique des microangiopathies cérébrales : Etude phénotypique et génétique de l'angiopathie amyloïde cérébrale et des calcifications cérébrales primaires

Lou Grangeon

► **To cite this version:**

Lou Grangeon. Diversité clinico-radiologique des microangiopathies cérébrales : Etude phénotypique et génétique de l'angiopathie amyloïde cérébrale et des calcifications cérébrales primaires. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2022. Français. NNT : 2022NORMR093 . tel-04622048

HAL Id: tel-04622048

<https://theses.hal.science/tel-04622048>

Submitted on 24 Jun 2024

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.



Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

Diversité clinico-radiologique des microangiopathies cérébrales : Etude phénotypique et génétique de l'angiopathie amyloïde cérébrale et des calcifications cérébrales primaires

Présentée et soutenue par
LOU GRANGEON

Thèse soutenue le 16/12/2022
devant le jury composé de

MME SONIA ALAMOWITCH	PROFESSEUR DES UNIV - PRATICIEN HOSP., SORBONNE UNIVERSITE	Rapporteur du jury
M. YANNICK BEJOT	PROFESSEUR DES UNIV - PRATICIEN HOSP., UNIVERSITE DE BOURGOGNE	Rapporteur du jury
M. GAEL NICOLAS	PROFESSEUR DES UNIV - PRATICIEN HOSP., Université de Rouen Normandie	Membre du jury
MME ELISABETH TOURNIER-LASSERVE	PROFESSEUR DES UNIV - PRATICIEN HOSP., UNIVERSITE PARIS 7 PARIS DIDEROT	Membre du jury
M. EMMANUEL TOUZE	PROFESSEUR DES UNIV - PRATICIEN HOSP., Université de Caen Normandie	Président du jury
M. DAVID WALLON	PROFESSEUR DES UNIV - PRATICIEN HOSP., Université de Rouen Normandie	Directeur de thèse

Thèse dirigée par DAVID WALLON (CANCER AND BRAIN GENOMICS)

Résumé

L'angiopathie amyloïde cérébrale (AAC) et les calcifications cérébrales primaires (CCP) sont deux types de microangiopathie cérébrale caractérisées par des dépôts au niveau de la paroi des petits vaisseaux (respectivement dépôts de peptide A β ou dépôts phosphocalciques). Ces entités recouvrent une importante hétérogénéité clinique malgré une convergence sur le plan physiopathologique vers des altérations de l'unité neuro-vasculaire dans les deux cas. Une meilleure caractérisation des phénotypes cliniques, radiologiques et biologiques permettrait d'améliorer la précision du diagnostic et la connaissance des facteurs pronostiques de l'AAC et des CCP. De plus une meilleure compréhension des facteurs génétiques impliqués contribueraient à l'identification des mécanismes sous-jacents impliqués, étape nécessaire pour identifier de futures cibles thérapeutiques. Les deux objectifs généraux de ce travail ont été l'étude de la diversité clinico-radiologique de plusieurs formes de ces microangiopathies et l'étude de leur déterminisme génétique.

Dans un premier temps, nous avons pu identifier un phénotype bien reconnaissable, incluant des signes moteurs au premier plan avec dysarthrie initiale, atrophie cérébelleuse et un pattern de calcifications sévères avec atteinte pontique du tronc cérébral dans une forme autosomique récessive de CCP liée à des mutations nouvellement décrites de *MYORG* (n= 16 patients). Concernant ensuite les AAC, une étude visant à mieux caractériser un phénotype particulier d'AAC, les formes inflammatoires et concernant 48 patients, a permis de les intégrer comme un sous-type d'AAC notamment favorisé par la présence d'un génotype *APOE ϵ 4*. À l'inverse, une importante hétérogénéité clinique et radiologique a pu être décrite chez 24 porteurs de duplications du gène *APP*, une forme héréditaire de maladie d'Alzheimer et d'AAC. La recherche de variations génétiques impliquant le gène *APP* ou les gènes adjacents n'a pas permis d'expliquer cette variabilité d'expression qui semble donc potentiellement liée à d'autres modulateurs d'expression clinique. Pour palier cette importante hétérogénéité, il était important de rechercher d'autres marqueurs, non cliniques, contribuant à établir un diagnostic précoce et de précision. Ainsi les biomarqueurs du liquide cérébro-spinal(LCS) et plus particulièrement le dosage du peptide A β 40 chez n=63 patients, ont montré une altération dans plus de 85% des cas d'AAC et pourraient améliorer les performances des critères radiologiques modifiés de Boston qui à ce jour ne tiennent pas compte de cette information. De plus certaines caractéristiques d'un hématome lobaire, visibles déjà sur le scanner sans injection comme l'extension en doigt de gant et l'hémorragie sous-arachnoïdienne aigue associée contribuent également au diagnostic d'AAC comme le montre le travail réalisé chez 102 patients aux urgences avec hémorragie intracérébrale. Par ailleurs, le déterminisme génétique de l'AAC est actuellement insuffisamment investigué. L'identification pour la première fois d'une triplication du gène *APP* souligne l'importance de la recherche systématique de mutations causales mais aussi d'anomalie du nombre de copies de ce gène en cas d'AAC précoce. Néanmoins, ces formes exceptionnelles ne sauraient expliquer l'ensemble des formes d'AAC, majoritairement sporadiques. Dans l'objectif d'explorer l'hypothèse d'une contribution polygénique dans l'AAC, avec intervention de facteurs de risque génétiques, un premier travail a permis de connaître la distribution des variants pathogènes concernant *SORL1*, *TREM2*, *ABCA7*, *ABCA1* et *ATP8B4*, tous liés à la voie amyloïde (production ou clairance du peptide A β) et déjà identifiés dans la maladie d'Alzheimer.

A l'avenir, une étude cas-témoin avec l'objectif de recruter une cohorte de 100 patients permettra de préciser l'impact des variants rares au sein de ces gènes et définir les risques qu'ils confèrent. En outre, la poursuite d'analyses pangénomique de cas d'AAC très précoce, notamment par comparaison du cas index avec ces 2 parents indemnes (n=4 actuellement disponibles) constitueront une opportunité d'identifier de nouveaux gènes et potentiellement de nouveaux mécanismes physiopathologiques de l'AAC.

Abstract

Cerebral amyloid angiopathy (CAA) and primary brain calcifications (PBC) are two types of cerebral microangiopathy characterized by deposits in the wall of small vessels ($A\beta$ peptide deposits or phosphocalcic deposits). These entities are related to an important clinical heterogeneity despite a convergence on the pathophysiological level as the alterations of the neuro-vascular unit in both cases. A better characterization of the clinical, radiological and biological phenotype would improve the accuracy of the diagnosis and the knowledge of prognostic factors in CAA and PBC. Furthermore, a better understanding of the genetic factors would contribute to the identification of the underlying mechanisms involved, a necessary step to future therapeutic targets. To contribute to this goal, the two general aims of this work were to study the clinical-radiological diversity of several forms of these microangiopathies and to study their genetic determinism. First, we were able to identify a distinct phenotype, including major motor signs with initial dysarthria, cerebellar atrophy and extensive calcifications, notably pontine in an autosomal recessive PCC linked to *MYORG* mutations (n=16 patients). A study focusing on CAA inflammatory forms gathered 48 patients and has integrated them as a subtype of CAA, possibly promoted by the presence of an *APOE* ϵ 4 genotype. Conversely, significant clinical and radiological heterogeneity was described in 24 patients carrying duplication of the *APP* gene, an inherited form of Alzheimer's disease and CAA. The search for genetic variations involving the *APP* gene or adjacent genes did not explain this variability in expression, which therefore seems to be potentially linked to other modulators of clinical expression. To overcome this significant heterogeneity, it was important to search for other, non-clinical, markers to help in early and accurate diagnosis. Thus, cerebrospinal fluid (CSF) biomarkers, and more particularly the determination of $A\beta$ 40 peptide in n=63 patients, showed an alteration in more than 85% of CAA cases and could improve the performance of the modified Boston radiological criteria which to date do not take this information into account. In addition, certain characteristics of a lobar hematoma, already seen on the non-contrast CT scan, such as finger-like extension and associated subarachnoid hemorrhage also contribute to the diagnosis of CAA, as shown by the study of 102 emergency patients with intracerebral hemorrhage. Furthermore, the genetic determinism of CAA is currently insufficiently investigated. The identification for the first time of a triplication of the *APP* gene underlines the importance of systematically searching for punctual mutations but also for copy number variation of this gene in early-onset CAA. Nevertheless, these rare cases cannot explain the majority of sporadic forms of CAA. We therefore studied the polygenic hypothesis with the involvement of several genetic risk factors in CAA. In order to explore the hypothesis of a polygenic contribution in CAA, with the intervention of genetic risk factors, a first work was performed to know the distribution of pathogenic variants within *SORL1*, *TREM2*, *ABCA7*, *ABCA1* and *ATP8B4* genes, all of them linked to the amyloid pathway (production or clearance of $A\beta$ peptide) and already identified in Alzheimer's disease. In the future, a case-control study with the objective of recruiting a cohort of 100 patients should allow to specify the impact of rare variants within these genes and to better define the risks they confer. In addition, the pursuit of genome-wide analyses of very early CAA cases, in particular by comparing the index case with its two unaffected relatives (n=4 currently available), will provide an opportunity to identify new genes and potentially new pathophysiological mechanisms of CAA

Liste des principales abréviations

AAC : Angiopathie Amyloïde Cérébrale
APP : Amyloid Precursor Protein
A β : Peptide amyloïde- β
APOE : Apolipoprotéine E
BHE: Barrière hémato-encéphalique
CADASIL : cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy
CCP : Calcifications Cérébrales Primaires
MB : Cerebral microbleeds
CSS: Cortical Superficial Siderosis
CGH : Comparative Genomic Hybridization
CNV : Copy Number Variation
DNF : Dégénérescences Neuro-Fibrillaires
EOAD : Early Onset Alzheimer Disease
GWAS : Genome-Wide Association Study
ICH : Intracerebral Hemorrhage
IRM : Imagerie par Résonance Magnétique
JAM2 : Junctional Adhesion Molecule 2
LCS : Liquide cérébro-spinal
MA : Maladie d'Alzheimer
MYORG : Myogenesis-Regulating Glycosidase
NGS : New / Next Generation Sequencing
NVU : Unité Neurovasculaire
OR : Odds Ratio
PS : Plaques Séniles
PDGF-B : Platelet-Derived Growth Factor B
PDGFR β : Platelet-Derived Growth Factor Receptor β
QMPSF : Quantitative Multiplex PCR of Short Fluorescent fragments
SLC20A2 : Solute Carrier Family 20 (Phosphate transporter), Member 2
SPECT : Single-Photon Emission Computerized Tomography
TDM : Tomodensitométrie
TEP : Tomographie par Emission de Positons
UTR : Untranslated Region
WES: Whole-exome sequencing
XPR1 : Xenotropic and Polytopic Retrovirus Receptor 1

TABLE DES MATIERES

1. LISTE DES FIGURES	3
2. LISTE DES TABLEAUX	4
3. LISTE DES PUBLICATIONS ASSOCIÉES AU TRAVAIL DE THÈSE	4
4. PRÉAMBULE : MICROANGIOPATHIES CÉRÉBRALES - HÉTÉROGÉNÉITÉ PHYSIOPATHOLOGIQUE ET EXPRESSIONS CLINIQUES MULTIPLES.....	6
5. INTRODUCTION GÉNÉRALE : LES CALCIFICATIONS CÉRÉBRALES PRIMAIRES.....	10
5.1. MANIFESTATIONS CLINIQUES	11
5.2. MANIFESTATIONS RADIOLOGIQUES	12
5.3. DÉMARCHE DIAGNOSTIQUE.....	15
5.4. ANATOMOPATHOLOGIE	17
5.5. DÉTERMINISME GÉNÉTIQUE	18
5.5.1. Mutations de SLC20A2.....	19
5.5.2. Mutations de PDGFRB	20
5.5.3. Mutations de PDGFB	21
5.5.4. Mutations de XPR1	22
5.5.5. Mutations de MYORG	22
5.5.6. Mutations de JAM2	23
5.5.7. Nombreux cas sans diagnostic génétique	24
6. INTRODUCTION GÉNÉRALE : L'ANGIOPATHIE AMYLOÏDE CÉRÉBRALE.....	26
6.1. MANIFESTATIONS CLINIQUES	27
6.1.1. Hématomes spontanés lobaires	27
6.1.2. Auras amyloïdes	28
6.1.3. Déclin cognitif	28
6.1.4. Formes inflammatoires : ABRA et CAA-ri	29
6.2. MANIFESTATIONS RADIOLOGIQUES	31
6.2.1. Micro-saignements ou microbleeds (MBs).....	31
6.2.2. Sidérose corticale superficielle (SCS)	32
6.2.3. Hémorragie sous-arachnoïdienne (HSA) de la convexité	33
6.2.4. Lésions de substance blanche	33
6.2.5. Micro-infarctus corticaux	34
6.2.6. Espaces péri-vasculaires dilatés	35
6.2.7. L'atrophie corticale	36
6.3. CRITÈRES DIAGNOSTIQUES RÉVISÉS DE BOSTON	37
6.4. PREUVES DE DÉPÔTS AMYLOÏDES :	39
6.4.1. Imagerie PET amyloïde :.....	39
6.4.2. Biomarqueurs du LCS.....	40
6.5. ANATOMOPATHOLOGIE ET PHYSIOPATHOLOGIE	42
6.5.1. Métabolisme normal et pathologique du peptide A β	42
6.5.2. Dysfonction vasculaire	47
6.5.3. Autres mécanismes impliqués	48

6.5.4. Lésions anatomopathologiques -----	48
6.5.5. Deux types histopathologiques décrits -----	49
6.6. DÉTERMINISME GÉNÉTIQUE DE L'AAC À A β -----	50
6.6.1. APP, le seul gène causal connu-----	51
6.6.2. Mutations PSEN1 et PSEN2 -----	56
6.6.3. APOE, le seul gène de susceptibilité identifié -----	57
6.7. AUTRES FORMES D'AAC -----	58
6.7.1. Amyloïdose oculoleptoméningée familiale ou amylose à transthyréline :-----	58
6.7.2. Amyloïdose à cystatine C (ou forme Islandaise) ou HCHWA-I (hémorragie cérébrale héréditaire avec amyloïdose de type islandais):-----	59
6.7.3. Amyloïdose à Gelsoline (ou forme Finlandaise) :-----	59
6.7.4. ITM2B : Démence familiale britannique et danoise -----	60
6.7.5. AAC liée à la protéine prion : -----	61
6.8. GRAND NOMBRE D'AAC PRÉCOCE SANS DIAGNOSTIC GÉNÉTIQUE -----	64
6.9. PRISE EN CHARGE ET CIBLES THÉRAPEUTIQUES POTENTIELLES -----	66
6.9.1. Contrôle des facteurs de risque vasculaires -----	66
6.9.2. Gestion des traitements antiagrégant et anticoagulant -----	68
6.9.3. Gestion en urgence de l'hémorragie lobaire spontanée liée à une AAC-----	69
6.9.4. Développement des nouvelles thérapeutiques spécifiques -----	70
7. RÉSULTATS : PHENOTYPES DE MICROANGIOPATHIES GÉNÉTIQUEMENT DÉTERMINÉES OU PHÉNOTYPE EXTRÊME -----	74
7.1. Caractérisation d'un nouveau syndrome clinico-radiologique associé aux mutations bi-alléliques de MYORG dans les Calcifications Cérébrales Primaires -----	74
7.2. Hétérogénéité clinique et radiologique des patients porteurs de duplications du gène APP-----	107
7.3. Les formes inflammatoires d'AAC : Un phénotype particulier à considérer comme un sous-groupe d'AAC ou une entité indépendante ? -----	145
8. RÉSULTATS : AIDE À LA PRÉCISION DIAGNOSTIQUE DANS L'AAC -----	165
8.1. Apport des biomarqueurs du LCS-----	165
8.2. Apport de la tomodensitométrie (TDM) en urgence -----	180
9. RÉSULTATS : APPROCHES GÉNOMIQUES POUR IDENTIFIER DE NOUVELLES CAUSES- 216	
9.1. Anomalie du nombre de copies : Identification d'une triplication du gène APP ----	218
9.2. Recherche dans l'AAC de facteurs de risque récemment identifiés dans la MA: les variants rares exomiques prédits délétères de SORL1, TREM2, ABCA7, ABCA1 et ATP8B4 229	
10. DISCUSSION ET PERSPECTIVES -----	265
11. CONCLUSION-----	277
12. LISTE DES ANNEXES -----	278
13. RÉFÉRENCES -----	306

1. LISTE DES FIGURES :

Figure 1 - Différentes topographies des calcifications chez un porteur de mutation *SLC20A2*

Figure 2 – Données d'imagerie des 517 patients rapportés dans la littérature avec CPP et mutation génétique identifiée.

Figure 3- Grille de cotation de 0 (absent) à 5 de chaque site présentant des calcifications selon le score de calcification proposé par Nicolas et al

Figure 4 – Bilan étiologique à réaliser devant des calcifications intracérébrales

Figure 5 - Examen anatomopathologique de calcifications vasculaires chez un patient porteur de mutation *SLC20A2*

Figure 6 – Manifestations cliniques liées aux CCP rapportées en fonction du gène impliqué selon méta-analyse

Figure 7 – Gènes impliqués dans les CCP et convergence vers l'unité neuro-vasculaire

Figure 8 - Images représentatives des différentes manifestations radiologiques de l'AAC

Figure 9 - Lésions hémorragiques et non hémorragiques associées à l'AAC

Figure 10 – Profil des biomarqueurs Alzheimer dans la MA

Figure 11 - Voies de clivage de la protéine APP

Figure 12 - Principales voies de clairance du peptide A β à travers la barrière hémato-encéphalique

Figure 13 – Caractérisation immunohistochimique des dépôts vasculaires d'AAC et des plaques séniles parenchymateuses sur autopsie d'un patient porteur de duplication du gène *APP*

Figure 14 - Classement anatomopathologique en fonction du degré d'infiltration amyloïde dans la paroi des vaisseaux d'après Thal et al

Figure 15– Représentation du gène *APP* et mutations connues

Figure 16– Images représentatives de l'imagerie liées aux formes monogéniques d'AAC

Figure 17 – Potentielles cibles thérapeutiques dans l'AAC et mode d'action

Figure 18 – Phénotype reconnaissable des patients porteurs de mutations *MYORG*

Figure 19 – Critères d'Edimbourg avec TDM représentatifs

Figure 20 - Gene-based collapsing tests

Figure 21 – Recherche de facteurs de risque génétiques dans l'AAC précoce et tardive

2. LISTE DES TABLEAUX :

Table 1 – Formes autosomiques dominantes et récessives de CCP

Table 2 – Les nouveaux critères diagnostiques révisés de Boston v2.0

Table 3 – Six mutations faux-sens au sein du gène *APP* impliquées dans l'AAC

Table 4 – Revue des duplications du gène *APP* rapportées dans la littérature

Table 5 – Récapitulatif des formes familiales d'AAC hors A β

Table 6 – Revue des résultats de GWAS dans l'AAC

3. LISTE DES PUBLICATIONS ASSOCIÉES AU TRAVAIL DE THÈSE :

(1) **Grangeon L**, Wallon D, Charbonnier C, Quenez O, Richard AC, Rousseau S, Budowski C, Lebouvier T, Corbille AG, Vidailhet M, Méneret A, Roze E, Anheim M, Tranchant C, Favrole P, Antoine JC, Defebvre L, Ayrignac X, Labauge P, Pariente J, Clanet M, Maltête D, Rovelet-Lecrux A, Boland A, Deleuze JF; French PFBC study group , Frebourg T, Hannequin D, Campion D, Nicolas G. Biallelic MYORG mutation carriers exhibit primary brain calcification with a distinct phenotype. *Brain*. 2019 Jun 1;142(6):1573-1586.

(2) **Grangeon L**, C Charbonnier, A Zarea, S Rousseau, A Rovelet-Lecrux, D Bendetowicz, M Lemaitre, C Malrain, M Quillard-Muraine , K Cassinari, J Pariente, O Moreaud, E Magnin, B Cretin, D Maltête, M Mackowiak, A Rollin Sillaire, M Vercelletto, E Dionet, O Felician, P Rod-Olivieri, C Thomas-Anterion, G Godeneche, M Sauvee, L Cartz-Piver, I Le Ber, V Chauvire, T Jonveaux, A Balageas, A Laquerrière, C Duyckaerts, A Vital, A Maues de Paula, D Meyronet, L Guyant, D Hannequin, E Tournier-Lasserre, D Campion, G Nicolas , and D Wallon. Phenotype and imaging features associated with APP duplications: a 15-year retrospective study. *Alzheimer's research and therapy* (en révision)

(3) **Grangeon L**, G Quesney, M Verdalle-Cazes, S Coulette, D Renard , A Wacogne, T Allou, N Olivier, Y Boukriche, G Blanchet-Fourcade, P Labauge, C Arquizan , S Canaple , O Godefroy , O Martinaud, P Verdure, M Quillard-Muraine, J Pariente, E Magnin , G Nicolas ,C Charbonnier, D Maltête , M Formaglio , N Raposo , X Ayrignac, D Wallon. Different clinical outcomes between cerebral amyloid angiopathy-related inflammation and non-inflammatory form. *J Neurol*. 2022 Jun 26

(4) **Grangeon L**, Paquet C, Guey S, Zarea A, Martinaud O, Rotharmel M, Maltête D, Quillard-Muraine M, Nicolas G, Charbonnier C, Chabriat H, Wallon D. Cerebrospinal Fluid

Profile of Tau, Phosphorylated Tau, A β 42, and A β 40 in Probable Cerebral Amyloid Angiopathy. *J Alzheimers Dis.* 2022;87(2):791-802.

(5) **Grangeon L**, Roussel M, Gillibert A, Verdalle-Cazes M, Dolores M, Ozkul-Wermester O, Gilard V, Derrey S, Maltête D, Gerardin E, Joly LM, Wallon D, Magne N. Applicability of the Edinburgh CT criteria for lobar intra-cerebral hemorrhage associated with cerebral amyloid angiopathy. *Clinical Neuroradiology* (accepté le 18/09/2022)

(6) **Grangeon L**, Kevin Cassinari, Stéphane Rousseau, Bernard Croisile, Maité Formaglio, Olivier Moreaud, Jean Boutonnat, Nathalie Le Meur, Manuele Mine, Thibault Coste, Eva Pipiras, Elisabeth Tournier Lasserre, Anne Rovelet-Lecrux, Dominique Campion, David Wallon, Gael Nicolas. Early-onset cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer disease related to an exceptional APP locus triplication. *Neurology Genetics*, 2021

(7) **Grangeon L**, Charbonnier C, Rousseau S, Richard AC, Quenez O, Zarea A, Maltête D, Boland A, Tournier-Lasserre E, CAA Genetics French Study group, Nicolas G, Wallon D. Input of Exome Sequencing in Early-Onset Cerebral Amyloid Angiopathy (en cours)

En annexe :

(8) Nicolas G, **Grangeon L**, Wallon D. Reply: New homozygous indel in MYORG linked to brain calcification, thyroidopathy and neuropathy. *Brain.* 2019 Sep 1;142(9):e52.

(9) Nicolas G, **Grangeon L**, Wallon D. Primary brain calcification due to a homozygous MYORG mutation causing isolated paroxysmal kinesigenic dyskinesia. *Brain.* 2020 May 1;143(5):e37.

(10) Helven C, Burel J, Vannier M, Maltête D, Ozkul-Wermester O, Wallon D, Hermary C, **Grangeon L**. Impact of previous statin use on first intracerebral hemorrhage in cerebral amyloid angiopathy. Soumis 09/2022 à la Revue Neurologique

4. PRÉAMBULE : MICROANGIOPATHIES CÉRÉBRALES - HÉTÉROGÉNÉITÉ PHYSIOPATHOLOGIQUE ET EXPRESSIONS CLINIQUES MULTIPLES

On désigne sous le nom de microangiopathies cérébrales, les lésions de la paroi des artères cérébrales de petit calibre, sans préjuger de leur nature. Il s'agit d'un terme générique qui regroupe plusieurs entités très hétérogènes. Elles peuvent être d'origine génétique, auto-immune ou inflammatoire mais aussi liées au vieillissement ou à l'hypertension artérielle (HTA). L'HTA est la première cause de microangiopathie cérébrale. Une classification de ces maladies des petites artères a été proposée en 2010 (1) mais de nombreuses publications récentes ont foncièrement enrichi nos connaissances sur le sujet. La prédilection cérébrale des microangiopathies s'explique par certaines caractéristiques inhérentes à la vascularisation cérébrale, comparativement aux vaisseaux périphériques. En effet, les vaisseaux cérébraux comportent moins de cellules musculaires lisses, une moindre circulation collatérale et l'absence de limitante élastique externe. Les microangiopathies prédominent souvent au niveau de la substance blanche, où la densité vasculaire est moins importante que dans la substance grise. Le type de lésion vasculaire peut être en revanche variable.

Sur le plan histologique, on peut retrouver des modifications structurelles comme la lipohyalinose et artériosclérose de la microangiopathie hypertensive, une atteinte du collagène, constituant essentiel des membranes basales de l'endothélium vasculaire dans le cadre de mutations des gènes *COL4A1* et *COL4A2*, ou encore un dédoublement de cette même membrane basale liée à une protéine anormalement tronquée dans le cadre de mutation du gène *TREX1*. Des altérations liées à une inflammation transmurale de la paroi vasculaire sont présentes dans les vascularites des petits vaisseaux. Ces entités ne seront pas abordées dans ce travail de thèse.

D'autres microangiopathies sont en revanche liées directement à la présence de dépôts ou accumulation au sein de la paroi des petits vaisseaux. Ces dépôts peuvent être de nature très différente. Dans le *CADASIL (cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy)*, du matériel granuleux appelé GOM (granular osmiophilic material) s'accumule au contact des cellules musculaires lisses. Dans l'angiopathie amyloïde cérébrale (AAC), on retrouve des dépôts vasculaires de protéine amyloïde (le plus souvent A β) et dans les calcifications cérébrales primaires

(CCP), on retrouve des dépôts phosphocalciques dans les parois des capillaires et dans les espaces périvasculaires à l'origine de ces calcifications.

La topographie des lésions est variable, touchant de façon préférentielle les artères perforantes profondes dans la microangiopathie hypertensive ou dans le *CADASIL*, et ne touchant exclusivement que les artères corticales et leptoméningées de petit calibre dans l'AAC. Les artères leptoméningées ont peu de ramifications et surtout des rapports très importants avec les pieds astrocytaires. Les astrocytes font partie de l'unité neurovasculaire et leurs pieds entourent le vaisseau. L'unité neurovasculaire (NVU) est composée par certains éléments cellulaires adjacents aux capillaires et régule l'interface sang/parenchyme cérébral. L'élément central de la NVU est la barrière hémato-encéphalique avec la cellule endothéliale, les pieds astrocytaires, les péricytes et la microglie qui régulent sa perméabilité. Globalement, tous les composants de la NVU (sauf la microglie) participent au couplage neurovasculaire et une altération de la NVU peut conduire ou participer à une microangiopathie. La NVU participe par exemple au drainage des peptides amyloïdes, qui est altéré dans l'AAC du sujet âgé et ce sont principalement des altérations des péricytes et astrocytes qui sont à l'origine des dépôts phosphocalciques dans les CCP.

Variation d'expression des microangiopathies : Spectre clinico-radiologique commun et spécifique

Un phénotype commun est retrouvé au sein de ce groupe hétérogène de microangiopathies cérébrales ou leuco encéphalopathies vasculaires au sens large.

Des marqueurs radiologiques sont en effet partagés par plusieurs entités : La leucopathie est un élément majeur dans le *CADASIL*, la microangiopathie hypertensive mais aussi dans l'AAC. Des lésions ischémiques profondes de type lacunaire sont retrouvés dans le *CADASIL* et la microangiopathie hypertensive alors que les manifestations hémorragiques sont au premier plan dans l'AAC et les mutations des gènes *COL4A1* et *COL4A2*. Des microsaignements sont présents dans la très grande majorité des microangiopathies cérébrales, toutes causes confondues. Les calcifications font également partie de leur spectre radiologique. Elles peuvent être corticales ou prédominer au niveau des noyaux gris centraux, comme dans les CCP. Des calcifications, notamment occipitales, sont retrouvées dans certaines formes d'AAC et correspondent sur le plan histologique à des zones de dépôts amyloïdes très sévères. Enfin, d'autres

calcifications peuvent découler de mécanismes génétiques très variables : Atteinte ribosomale par mutation du gène *SNORD118* dans les leucopathies kystiques calcifiantes (LCC) ou atteinte du collagène dans les mutations des gènes *COL4A1* et *COL4A2*.

À l'inverse, une même entité de microangiopathie peut être responsable de phénotypes très hétérogènes. Ainsi, l'AAC se manifeste principalement par des hémorragies spontanées lobaires, des symptômes neurologiques transitoires mais aussi des troubles cognitifs, le *CADASIL* par des crises migraineuses avec aura, des infarctus répétés conduisant à un état dit « multi-lacunaire » avec troubles cognitifs et troubles vésico-sphinctériens. Les CCP se manifestent principalement par des troubles psychiatriques, des syndromes extrapyramidaux avec troubles de la marche et mouvements anormaux mais peuvent aussi être complètement asymptomatiques.

Bien que les microangiopathies soient liées à des mécanismes primaires communs, par atteinte de la paroi des petits vaisseaux, structurelle ou liée à des dépôts en son sein, elles englobent pourtant un spectre clinique très large. Un même phénotype peut découler de plusieurs causes, tout comme à l'inverse, une même cause peut s'exprimer par des situations cliniques très diverses, ce qui complexifie beaucoup l'étude des microangiopathies. Il est ainsi primordial d'aborder leur spécificité pour un diagnostic de précision.

Intérêt des études phénotypiques des microangiopathies

Certaines entités rares ont été décrites ces dernières décennies principalement grâce à l'avènement de l'IRM mais également par l'identification de nouvelles causes génétiques. Peu de traitement curatif spécifique des microangiopathies sont disponibles à l'heure actuelle mais l'attente des cliniciens pousse les équipes de recherche à mieux comprendre les mécanismes de ces pathologies pour développer à terme de nouvelles cibles thérapeutiques. Des progrès considérables ont été réalisés par exemple dans le cadre de microangiopathies d'origine génétique comme le *CADASIL*, avec l'identification de mutations causales de *NOTCH3*. Depuis, de nombreux travaux en imagerie ont permis la construction d'un modèle de maladie des petites artères profondes, applicable à un plus grand nombre de patients.

L'angiopathie amyloïde cérébrale (AAC) représente une entité de définition complexe et de diagnostic difficile. Ses manifestations cliniques et radiologiques sont très variées. L'AAC intègre probablement plusieurs sous-groupes, sous-tendant des mécanismes physiopathologiques et génétiques différents. Une association à une maladie d'Alzheimer (MA) est fréquente et complexe à aborder. Cette pathologie est relativement fréquente chez la personne âgée et de présentation souvent sporadique. Cependant, des débuts précoces avec déterminisme potentiellement génétique existent et sont encore imparfaitement élucidés. Ces cas rares pourraient servir de modèle afin de mieux appréhender les spécificités clinico-radiologiques de l'AAC et être appliquées au plus grand nombre. Un exemple concret est l'utilisation des AAC liées des mutations du gène *APP* de type Hollandaise comme modèle ayant servi à développer les critères diagnostiques, basés sur l'imagerie cérébrale et actuellement utilisés pour l'AAC sporadique (2).

L'objectif général de ce travail de thèse est ainsi de mieux caractériser le spectre phénotypique et radiologique des microangiopathies liées à une accumulation de dépôts comme l'AAC et les CCP mais aussi de mieux comprendre certains des déterminants génétiques de ces microangiopathies.

5. INTRODUCTION GÉNÉRALE : LES CALCIFICATIONS CÉRÉBRALES PRIMAIRES

Les calcifications cérébrales primaires (CCP) ou anciennement « maladie de Fahr » sont caractérisées par la présence de dépôts phosphocalciques au niveau des vaisseaux dans les Noyaux Gris Centraux (NGC) (striato-pallidaux) principalement, mais aussi dans les noyaux dentelés du cervelet, la substance blanche et le cortex. Ces dépôts sont bilatéraux et visualisés sur l'imagerie cérébrale, soit sur tomодensitométrie (TDM) soit sur imagerie par résonance magnétique (IRM). Cette entité est cliniquement et génétiquement hétérogène, avec 6 gènes connus pour être impliqués (*SLC20A2*, *PDGFB*, *PDGFRB*, *XPR1*, *MYORG* et *JAM2*). De nombreuses dénominations ont été utilisées pour désigner cette entité clinico-radiologique et depuis l'identification des premiers gènes causaux, le terme « primaire » doit être utilisé, et non plus « idiopathique » (3). Dans les formes Mendéliennes, bien que la pénétrance « radiologique », à savoir la présence de calcification soit systématique au-delà de 50 ans, la pénétrance « clinique » est extrêmement variable : Plus d'un tiers des patients porteurs de mutations pathogènes sont asymptomatiques et la sévérité des symptômes quand ils sont présents est également très variable(4)(5). Il peut s'agir principalement de syndrome extrapyramidal, de mouvements anormaux et/ou troubles psychiatriques ou cognitifs à des degrés très divers. Il existe une importante diversité inter et intrafamiliale.

De nombreux diagnostics différentiels peuvent également conduire à des calcifications de même topographie. En effet, des calcifications asymptomatiques liées au vieillissement sont relativement fréquentes, identifiées sur environ 5,5 à 20 % des TDM chez les patients de plus de 50 ans (6). Selon une étude japonaise menée sur plus de 5000 patients hospitalisés de façon consécutive et ayant bénéficié de TDM sans injection, 20.5% présentaient des calcifications, avec un effet de l'âge(7).

De plus, un bilan étiologique exhaustif à la recherche de cause secondaire doit être réalisé et notamment bilan phosphocalcique, métabolique et mitochondrial avant de parler de calcifications primaires. La prévalence exacte de la maladie reste méconnue et probablement sous-estimée en raison de la fréquence non négligeable de porteurs asymptomatiques. On décrit souvent une prévalence de 2.1/10000 dans la littérature mais une étude récente multicentrique chinoise rapporte plutôt une prévalence de

6.6/10000(8). Les études épidémiologiques sont difficiles à mener car inclure uniquement les patients symptomatiques sous-estimerait la prévalence. À l'inverse, une étude incluant tous les patients présentant des calcifications quelque soit leur degré ou sans bilan étiologique préalable conduirait à une surestimation de la prévalence.

5.1. MANIFESTATIONS CLINIQUES

Les CCP peuvent donner lieu à une importante diversité clinique allant de l'absence complète de manifestations ou uniquement des céphalées ponctuelles à des troubles neuropsychiatriques sévères. Un travail de méta-analyse a été effectué en 2021 portant sur les 517 patients diagnostiqués CCP avec un diagnostic génétique établi et rapportés dans la littérature(4). Cette méta-analyse n'a pas identifié de prédominance masculine ni féminine dans les CCP. L'âge médian de début chez les 209 patients symptomatiques était de 43 ans mais pouvant aller de l'enfance (cas symptomatique à 1an) jusqu'à un âge avancé (87 ans). Vingt-deux patients avaient un âge de début avant 10 ans. Les patients avec un début précoce présentent plus souvent des signes psychiatriques et/ou cognitifs et les tableaux tardifs comportent plus souvent des signes moteurs(9). La diversité inter mais aussi intrafamiliale est majeure : 31.6% des patients porteurs de mutations étaient asymptomatiques dans cette méta-analyse. Chez les patients symptomatiques, 27 % rapportaient des signes moteurs isolés, 31 % uniquement des symptômes non moteurs au premier plan et 42 % des symptômes moteurs et non moteurs(4).

Dans certains cas, l'imputabilité des calcifications dans les symptômes présentés par le patient peut être discutée : La découverte de calcifications peut être fortuite si l'imagerie cérébrale est réalisée pour des céphalées ponctuelles ou des troubles psychiatriques chez un patient jeune par exemple ou alors pour des troubles cognitifs d'autre origine (Alzheimer ou vasculaire) chez un patient plus âgé.

Globalement, d'après la mise à jour faite en 2015 de la série française de CCP (total 57 patients), les 3 catégories de symptômes les plus fréquents sont les signes psychiatriques (présents dans 75% des cas symptomatiques) puis moteurs (60%) et enfin cognitifs (57%) (9). Parmi les signes moteurs, un syndrome parkinsonien est le plus fréquemment rapporté, suivi ensuite par des tremblements. D'autres mouvements anormaux (dystonie mais aussi chorée ou dyskinésies), des troubles d'élocution ou syndrome cérébelleux font également partie du spectre clinique rencontré dans les CCP.

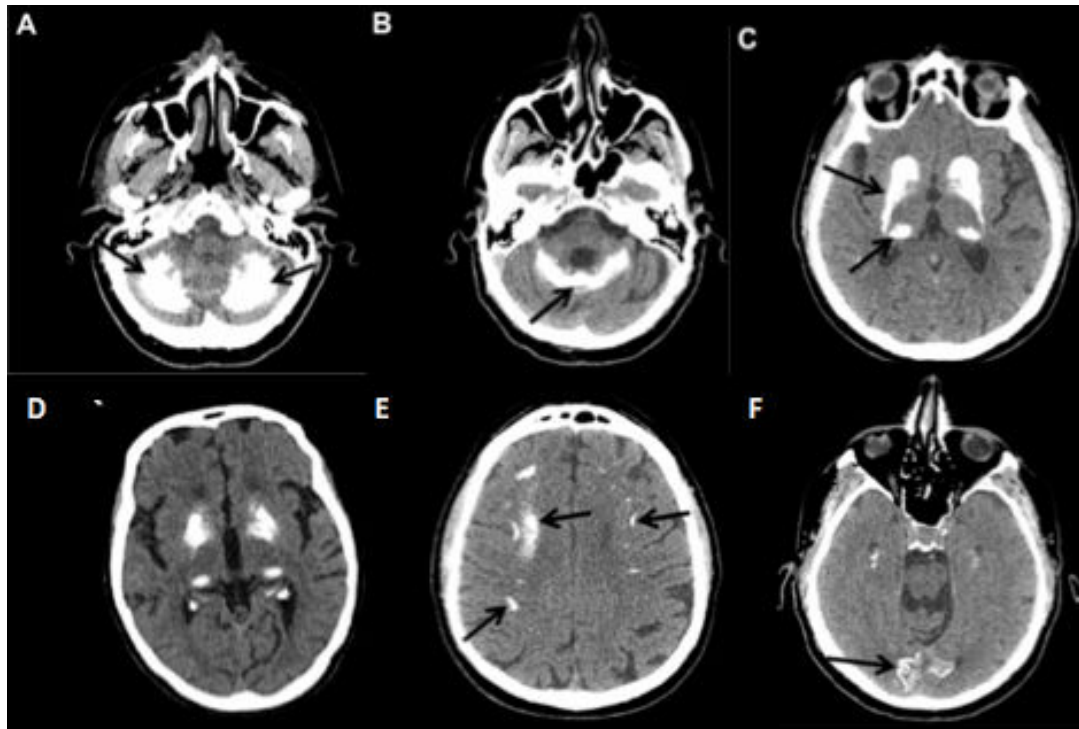
D'après la méta-analyse des 209 patients symptomatiques avec diagnostic génétique établi rapportés dans la littérature, 13% présentaient un syndrome dépressif récurrent et 9% une psychose mais ces chiffres varient beaucoup selon les séries(4). Quelques rares patients présentent une déficience intellectuelle mais la plupart du temps, les manifestations cognitives se développent à l'âge adulte pouvant aller jusqu'à un syndrome démentiel. Il s'agit plus fréquemment de troubles mnésiques de type sous-cortico-frontal et de syndrome dysexécutif (10). Des crises d'épilepsie sont rares(11). A l'heure actuelle, il n'existe pas de corrélation génotype-phénotype dans les formes autosomiques dominantes et aucun signe spécifique n'est évocateur de l'implication d'un gène plus qu'un autre (9).

5.2. MANIFESTATIONS RADIOLOGIQUES

Le TDM est l'examen clé pour détecter les calcifications. Elles apparaissent comme des hyperdensités spontanées dont la densité est proche de celle de l'os. Elles sont bilatérales et symétriques et touchent automatiquement les noyaux gris centraux(4). Le cervelet, le thalamus et la substance blanche sont le siège de calcifications respectivement dans 58%, 53% et 43% des cas avec diagnostic génétique identifié (4). Des calcifications corticales et notamment occipitales peuvent être retrouvées, plus souvent en cas de mutation *SLC20A2* (mais pas en cas de mutation *PDGFRB* en revanche) (Figure 1). L'étendue et le degré de calcifications augmentent avec l'âge au diagnostic (encore plus chez des patients porteurs d'une mutation causale comparativement aux patients sans diagnostic génétique).

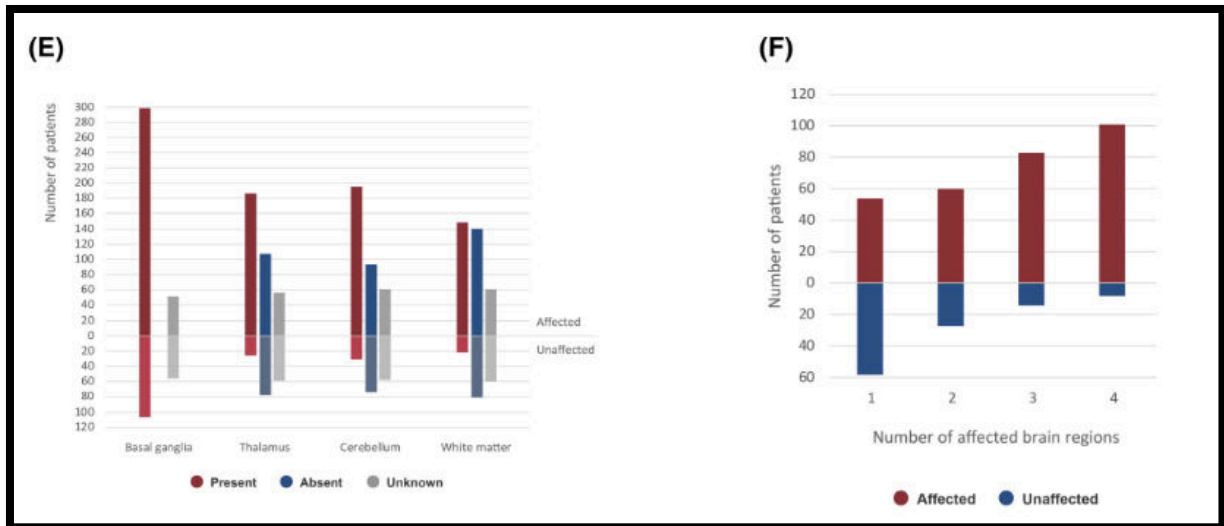
Figure 1- Différentes topographies des calcifications chez un porteur de mutation *SLC20A2* - Adapté à partir de Nicolas et al (9)

Coupes axiales de TDM sans injection montrant des calcifications au niveau A,B) des hémisphères cérébelleux (noyaux dentelés notamment), C,D) des thalami et noyaux lenticulaires, E) au niveau de la substance blanche sous corticale et F) au niveau du cortex occipital



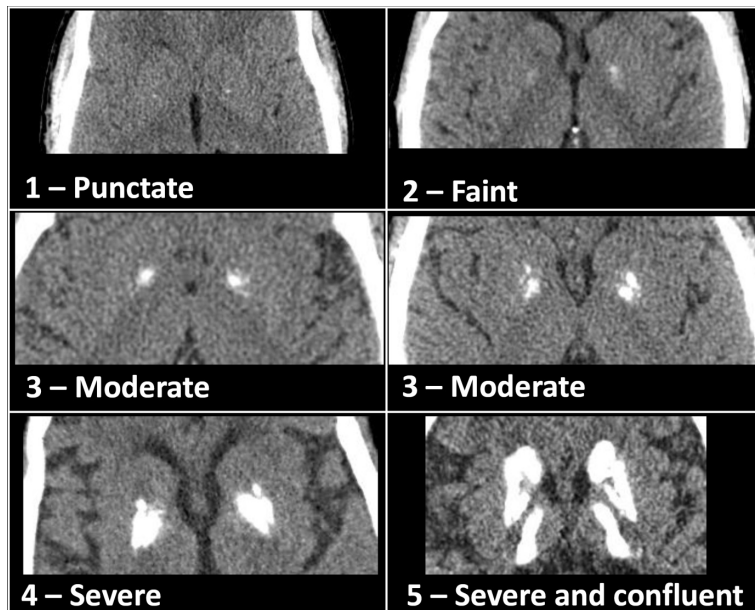
La probabilité d'être symptomatique augmente avec chaque région calcifiée supplémentaire et avec la sévérité des calcifications(12) (Figure 2) . En revanche, il n'y a pas de corrélation linéaire entre la localisation des calcifications et le spectre clinique. En termes de corrélation entre le génotype et l'imagerie, les patients porteurs de mutations de *SLC20A2* ont globalement des calcifications plus sévères que ceux porteurs de mutations de *PDGFB* puis *PDGFRB* (9). Une partie de notre travail sur les CCP a comporté l'analyse radiologique et la comparaison de l'ensemble des patients porteurs de mutations causales dans la série française de CCP.

Figure 2 – Données d'imagerie des 517 patients rapportés dans la littérature avec CPP et mutation génétique identifiée. *E)* Régions cérébrales signalées contenant des calcifications ; *(F)* relation entre le nombre de régions cérébrales calcifiées et le statut symptomatique ou non des patients –Extrait de Balck et al, 2021 (4)



Une des difficultés dans la démarche diagnostique de CCP est d'établir un seuil à partir duquel les calcifications ne peuvent pas être considérées comme liées à l'âge. En 2013, un score de cotation visuelle de calcification a été mis au point, de 0 à 80 permettant ainsi de classer ces calcifications comme pathologiques ou non en fonction de l'âge (12). Un score est attribué pour chaque localisation de calcifications, de 0 à 5 et additionné pour obtenir le score total (Figure 3). Les sites sont : Noyau lenticulaire / Noyau caudé / Thalamus /Cortex/Substance blanche sous-corticale/Hémisphères cérébelleux/Vermis/ Pont/Mésencéphale / Moelle épinière. Cette étude s'est basée sur l'analyse de 600 TDM chez des contrôles (patients consécutifs hospitalisés en neurologie, tous motifs confondus). Les seuils retenus comme non pathologiques sont dépendant de l'âge et sont considérés comme en dessous du 1^{er} percentile, soit TCS (total calcification score) à 0 avant 40 ans, 4 entre 40 et 60 ans et 5 après 60 ans.

Figure 3- Grille de cotation de 0 (absent) à 5 de chaque site présentant des calcifications selon le score de calcification proposé par Nicolas et al (12)



En IRM, les calcifications sont moins bien visibles que sur le TDM. Elles apparaissent en hyposignal T1 et T2 et sont mieux vues sur les séquences T2* ou séquences de susceptibilité magnétique (SWI, SWAN)(13). Une IRM doit cependant être systématiquement réalisée afin de rechercher des lésions de substance blanche qui peuvent être associées aux CCP (14) mais aussi d'autres lésions comme des kystes par exemple qui orientent vers des causes de calcifications secondaires.

Enfin, peu de données sont disponibles sur le DAT (dopamine transporteur) scanner mais sembleraient retrouver une déperdition dopaminergique pré synaptique (18) et le TEP (tomographie par émission de positon) au 18-FDG montre une hypofixation striatale et corticale(19). L'imagerie fonctionnelle en SPECT au 99mTc-HMPAO montre aussi une hypoperfusion des noyaux gris centraux mais aussi de certaines régions corticales (orbito-frontal, préfrontale, cingulaire)(20).

5.3. DÉMARCHE DIAGNOSTIQUE

Avant de pouvoir parler de CCP, deux grandes étapes doivent être effectuées :

- 1) S'assurer que les calcifications ont un score élevé et ne sont donc pas considérées comme physiologiques, liées à l'âge. En effet, des microcalcifications typiquement bipallidales peuvent être liées à un vieillissement sans complication particulière et ne s'accompagnent pas de symptômes.

2) Exclure les causes secondaires de calcifications. En effet, les CCP sont un diagnostic d'élimination et la démarche diagnostique doit passer par l'exclusion de diagnostics différentiels. Les principaux diagnostics différentiels à évoquer sont les troubles du métabolisme phosphocalcique (hypo ou hyperparathyroïdie), des mitochondriopathies ou bien des lésions acquises, infectieuses ou post-radiques par exemple (3)(15). Plusieurs publications ont suggéré des diagrammes dans la démarche diagnostique (Figure 4). Ce bilan doit être adapté en fonction de la présentation clinique, du terrain du patient. Si les calcifications ont été découvertes sur TDM, un complément minimal par IRM est requis. De même, un bilan biologique minimal comportant un bilan phosphocalcique sanguin et urinaire doit être systématique (calcémie, phosphorémie, dosage de vitamine D, PTH et calciurie, phosphore urinaire) (16)(17)

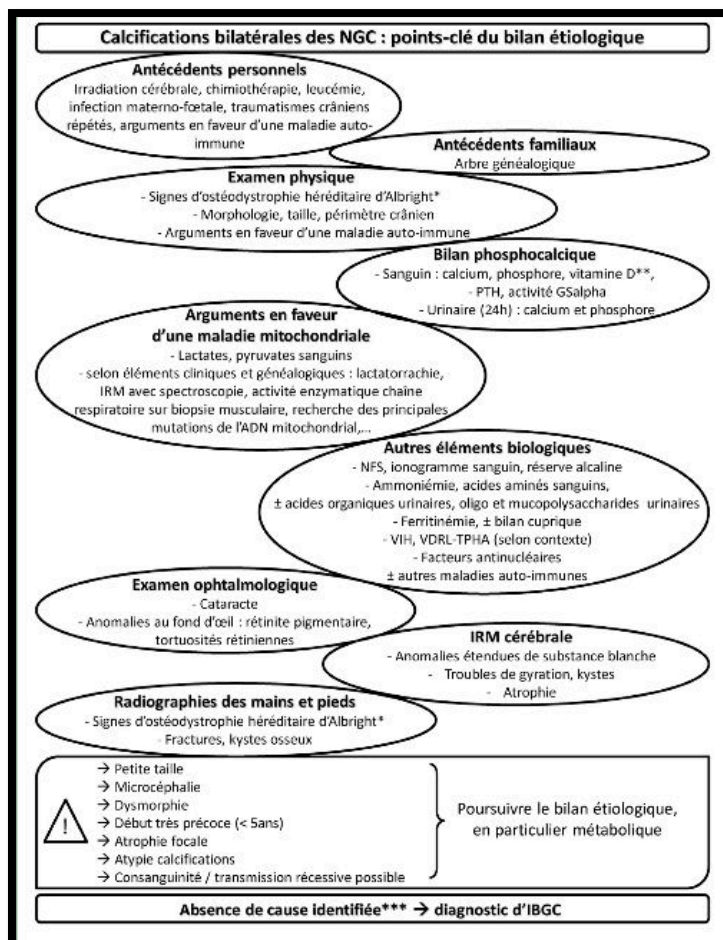


Figure 4 – Bilan étiologique à réaliser devant des calcifications intracérébrales – Extrait de Nicolas et al (17)

A l'heure actuelle, il n'existe pas de critère diagnostique validé. Des critères proposés par Ramos dans Gene Reviews en 2017 (3) requièrent au moins cinq conditions : 1) une symptomatologie neurologique progressive, incluant souvent une pathologie du mouvement et/ou des manifestations neuropsychiatriques ; 2) la présence de calcifications bilatérales affectant au minimum les noyaux gris centraux; 3) l'absence d'anomalies biochimiques et de symptômes suggérant une maladie mitochondriale, métabolique ou un autre trouble systémique 4) l'absence de cause infectieuse, toxique ou traumatique 5) un contexte familial compatible avec une transmission autosomique dominante (Il est important de noter que ces critères ont été rédigés avant la découverte de forme de CCP autosomique récessive).

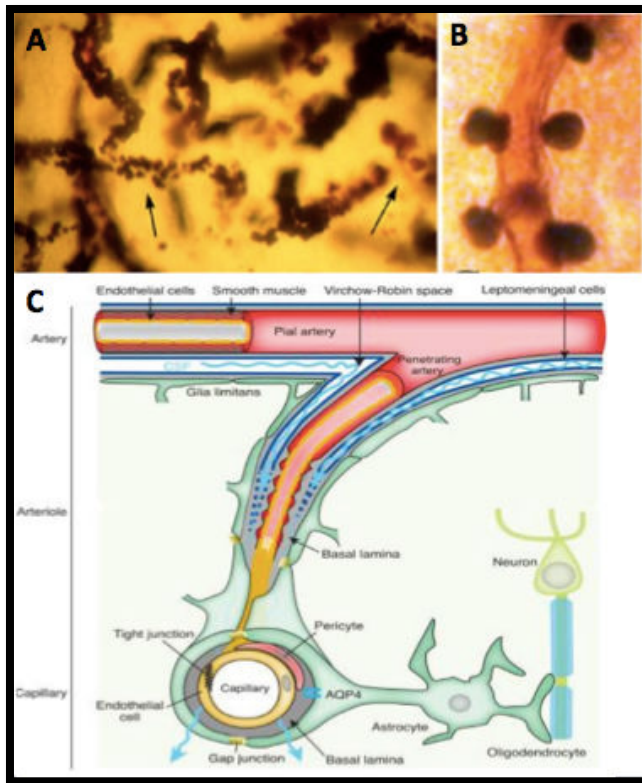
5.4. ANATOMOPATHOLOGIE

Les caractéristiques histologiques des calcifications primaires sont aspécifiques et similaires aux calcifications secondaires, identifiées par exemple en cas de trouble phosphocalcique(18)(19). Les dépôts sont situés au sein des parois des capillaires, artérioles, veinules, et dans les espaces périvasculaires (20). Les dépôts sont principalement phosphocalcique mais d'autres minéraux peuvent être présents aussi (aluminium, cobalt, cuivre, molybdène, fer, plomb, manganèse, magnésium, phosphore..) (3). Les cellules les plus touchées sont les cellules vasculaires musculaires lisses et les péricytes (21). Lorsque l'atteinte capillaire est évoluée, on observe la disparition des cellules endothéliales et de la membrane basale (absence complète de collagène) et la présence uniquement de sphéroïdes de calcium. Ceci donne un aspect de « capillaires fantômes » (Figure 5).

En microscopie électronique, on retrouve proche de ces calcifications des astrocytes réactifs mais également une microglie activée, reflet de processus d'inflammation chronique. Une neurodégénérescence a aussi été décrite autour des calcifications (21).

Figure 5. Examen anatomopathologique de calcifications vasculaires chez un patient porteur de mutation *SLC20A2* – Extrait de Miklossy et al (21)

A,B) Technique Gallya silver mettant en évidence des dépôts calciques, irréguliers le long des capillaires et images de sphérules calcifiées et disparition des cellules endothéliales donnant l'aspect de capillaire fantôme C) Représentation schématique des différents éléments de l'unité neuro-vasculaire (Jessen et al.,2015 Copyright 2015, Springer US)



5.5. DÉTERMINISME GÉNÉTIQUE

Les CCP sont une entité génétiquement hétérogène, avec six gènes identifiés à ce jour. Les mutations au sein de 4 d'entre eux (*SLC20A2*, *PDGF*, *PDGFRB* et *XPR1*) sont héritées selon un mode autosomique dominant et plus récemment, la transmission autosomique récessive a été identifiée pour *MYORG* et *JAM2*. Les mutations de *SLC20A2* représentent la cause la plus fréquente de CCP avec cause génétique identifiée (58,3 %), suivies par des mutations de *PDGFB* (17,8%) et de *MYORG* (13,5%), et enfin *XPR1* (6,3%) et *PDGFRB* (2,5%)(22). La pénétrance « radiologique » semble être complète avec calcifications cérébrales systématiques au-delà de 50 ans. En revanche, la pénétrance « clinique » est extrêmement variable allant d'une symptomatologie mineure ou inexistante à un phénotype précoce et sévère. De ce fait, pour parler d'apparenté non atteint dans les études génétiques, l'absence de calcifications sur TDM, réalisé après 50 ans est nécessaire. La stratégie génétique ces 10 dernières années a été principalement des approches intrafamiliales avec souvent analyse de liaison et étude de gènes candidats. Dans les formes autosomiques dominantes, aucune relation claire entre le génotype et le phénotype n'a été établie (Figure 6).

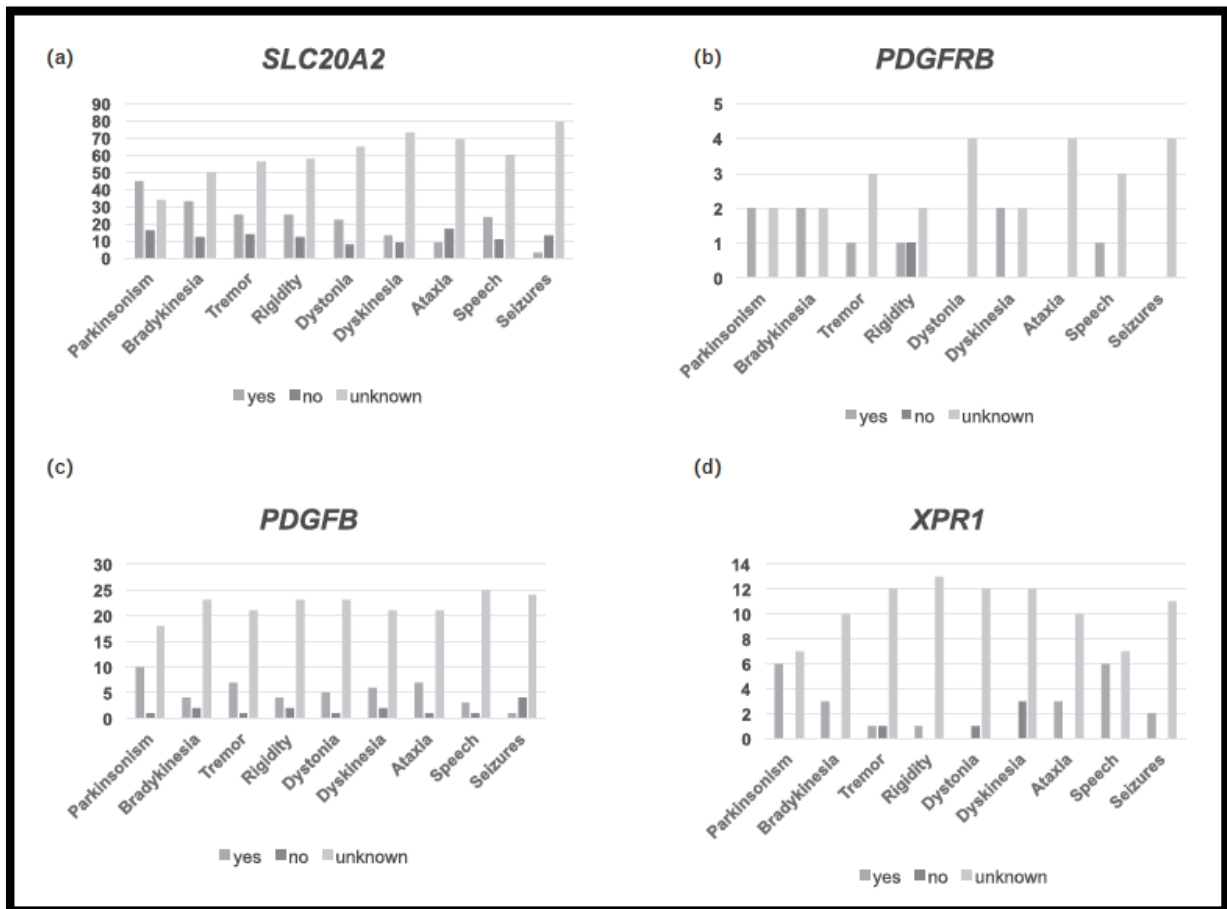


Figure 6 – Manifestations cliniques rapportées en fonction du gène impliqué selon méta-analyse– Extrait de Westenberger et al (22)
 Nombre de patients en ordonnée, yes = signe présent, no = absent et unknown = donnée indisponible

5.5.1. Mutations de SLC20A2

Le gène *SLC20A2* code pour PiT2, un co-transporteur transmembranaire de phosphate inorganique et de sodium. Il importe le phosphate dans la cellule. Les premières mutations pathogènes ont été identifiées en 2012 dans des familles chinoises, brésiliennes et espagnoles (23). Ces mutations entraînent une perte de fonction, avec une diminution de l'importation du phosphate inorganique et accumulation en extracellulaire de ce phosphate inorganique(24). *SLC20A2* est exprimé dans le cerveau mais faiblement dans les cellules vasculaires musculaires lisses et les péricytes, cellules les plus touchées par les calcifications(25). Il a alors été suggéré que l'augmentation du phosphate inorganique extracellulaire entraînait secondairement une accumulation de phosphate de calcium via un autre transporteur, PiT1, qui lui est exprimé

majoritairement dans ces cellules musculaires lisses. Ce transporteur PiT1 est codé par *SLC20A1*, dont l'expression chez la souris est dépendante de *SLC20A2* (26)(27).

A ce jour, plus de 40 mutations faux-sens de *SLC20A2* sont décrites, la plupart privées (c'est-à-dire portées par un seul malade) et situées tout le long du gène(28). La plus fréquente mutation (c.1723G>A; p.Glu575Lys) a été retrouvée chez cinq patients(4). La plus grande série de patients mutés *SLC20A2* comprend 218 patients issus de 29 familles(29). Une large délétion de la totalité du gène *SLC20A2* avec gènes adjacents(30) mais aussi des délétions de petite taille (partielles de *SLC20A2*)(31) et mutations non-sens ont été rapportées, de même que des variants dans la région non-codante 5'UTR du gène(32). A l'heure actuelle, *SLC20A2* représente le gène majeur causal de CCP, avec des mutations retrouvées dans près de 50% des familles, dans plusieurs séries (29)(33). Ces chiffres ne sont cependant pas retrouvés dans notre série française de plus de 200 cas, avec antécédents familiaux mais incluant aussi des cas sporadiques (environ 14% des patients avec mutation *SLC20A2*).

Le mécanisme causal le plus probable est une haplo-insuffisance (le produit d'un seul allèle actif est synthétisé en quantité insuffisante pour permettre le fonctionnement normal de la cellule)(23)(29). Les souris homozygotes knock-out *Slc20a2* présentent des agrégats faiblement calcifiés au niveau cérébral et qui augmentent avec l'âge(34). Le phosphate dosé dans leur LCS (liquide céphalo-spinal) est plus élevé que chez les souris sauvages, suggérant que PiT2 joue un rôle dans le transport du phosphate inorganique du LCS vers le plasma(35). Ces agrégats calcifiés se situent à l'intérieur ou autour des vaisseaux sanguins du thalamus et ganglions de la base principalement et semblent prendre naissance dans les péricytes et les astrocytes(36). Ces souris homozygotes knock-out présentent aussi des anomalies extra-neurologiques, au niveau du squelette avec une diminution de la densité minérale osseuse(37). Des résultats contradictoires avec parfois absence de calcifications sont retrouvés chez les souris knock-out hétérozygotes *Slc20a2* (38)(34).

5.5.2. Mutations de *PDGFRB*

Le gène *PDGFRB* code pour une tyrosine kinase de surface, appelée récepteur bêta du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGFRB). Ce récepteur et son ligand, le facteur de croissance bêta dérivé des plaquettes(PDGFB) sont impliqués dans les

processus d'angiogenèse, d'hématopoïèse précoce et dans le maintien de l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique (BHE)(39). PDGFRB est une protéine transmembranaire comportant cinq domaines extracellulaires de type immunoglobuline C2, un domaine transmembranaire et un domaine tyrosine kinase.

Les cellules musculaires lisses et les péricytes qui expriment à leur surface le récepteur PDGFRB vont être recrutées par les cellules endothéliales qui sécrètent le ligand PDGFB (40). La liaison de 2 récepteurs au ligand (qui est un dimère) active une cascade de signalisation intracellulaire(41). Les mécanismes par lesquels les variants pathogènes conduisent aux calcifications ne sont pas encore élucidés. L'identification du gène *PDGFRB* dans les CCP découle de l'analyse d'une grande famille française en 2013 (42). Les mutations identifiées sont des variants faux-sens entraînant une perte de fonction par haplo-insuffisance. Aucune récurrence interfamiliale n'a été rapportée jusqu'à présent. La plupart des variants sont situés dans le domaine tyrosine kinase et bloquent l'autophosphorylation du récepteur(43) mais d'autres altèrent sa stabilité (44). Il est intéressant de noter que des variants gain de fonction de *PDGFRB* sont connus pour être responsable de myofibromatose infantile et du syndrome de Penttinen (trouble de vieillissement prématuré)(45).

5.5.3. Mutations de PDGFB

Le gène *PDGFB* code pour un précurseur du principal ligand de PDGFRB. Des variants pathogènes ont été identifiés initialement au sein de 2 familles (24). Quelques autres familles ont été rapportées depuis (46)(47).

Il s'agit principalement de variants faux-sens et non-sens mais des mutations d'épissage ont été rapportées également. Une délétion partielle des exons 2-5 a été identifiée chez un cas sporadique avec calcifications des noyaux gris centraux et leuco encéphalopathie sévère (48).D'après les études *in vitro*, ces mutations entraînent une perte de fonction par probable haplo-insuffisance également.

Dans les modèles murins, le knock-out homozygote pour *PDGFRB* conduit à une mortalité périnatale liée à une altération sévère des cellules musculaires lisses et vasodilatation cérébrale(49). C'est le modèle homozygote pour une mutation hypomorphe partiellement inactivante de *PDGFB* qui a permis l'étude des mécanismes physiopathologiques ; montrant le développement avec l'âge, de calcifications multiples, co-localisées avec les vaisseaux sanguins uniquement au niveau cérébral (42). Comme

les modèles murins hétérozygotes *SLC20A2*, les modèles hétérozygotes *PDGFB* ne développent pas de calcifications cérébrales.

5.5.4. Mutations de *XPR1*

Le gène *XPR1* code pour un récepteur rétroviral, une protéine transmembranaire qui a un rôle d'exportateur de phosphate inorganique (50). *XPR1* est exprimé de façon ubiquitaire mais de façon plus marquée au niveau cérébelleux et du striatum.

Dans une grande famille nord-américaine (51)(52), un variant faux-sens a été détecté dans un domaine hautement conservé du gène *XPR1* (53). Depuis, d'autres familles, notamment françaises ont été rapportées(54). Au total, 32 patients sont porteurs de variants faux-sens uniquement(4). Peu de données phénotypiques sont disponibles. Les variants pathogènes identifiés entraînent une perte de fonction par haplo-insuffisance (55). Elles semblent localisées dans un « hotspot », dans le domaine SPX dont on ne connaît pas bien la fonction au niveau protéique(16). D'après les études *in vitro*, il y a arrêt de l'efflux de phosphate inorganique, entraînant son augmentation au niveau intracellulaire mais aussi accumulation de phosphate de calcium(23). Il est intéressant de noter que l'exportateur *XPR1* co-localise avec le récepteur *PDGFRB*(55). Sur le plan des modèles animaux, le poisson zèbre portant une mutation dans *xpr1b*, proche de *XPR1* humain, présente une perte microgliale et présente une ostéoporose (56).

5.5.5. Mutations de *MYORG*

En 2018, le premier gène causal de CCP associé à une transmission autosomique récessive a été identifié chez six familles chinoises (57). Ce gène code pour une glycosidase, transmembranaire. Il est exprimé de façon ubiquitaire mais de façon plus marqué au niveau cérébral et notamment au niveau astrocytaire. En revanche, il n'est pas exprimé au niveau des péricytes par exemple (57). Au niveau intracellulaire, *Myorg* est localisé dans le réticulum endoplasmique. Son rôle serait donc la régulation de la glycosylation des protéines dans le réticulum endoplasmique des astrocytes. A l'heure actuelle, on sait peu de choses sur la manière dont les mutations de *MYORG* peuvent provoquer des calcifications cérébrales et aucun cas d'autopsie n'a encore été rapporté. L'hypothèse principale est une altération astrocytaire et consécutivement une altération de l'unité neuro-vasculaire.

Les souris homozygotes knock-out *MYORG* sont viables et présentent des calcifications à partir de 9 mois, ce qui est plus tardif que les autres modèles murins de CCP autosomique-dominant.

Aucun phénotype reconnaissable n'a pu être établi dans les formes dominantes de CCP. Un de nos premiers objectifs de travail sur les microangiopathies cérébrales avec dépôts a été l'étude phénotypique de patients porteurs de mutation *MYORG* afin d'identifier un pattern clinico-radiologique spécifique pouvant guider le clinicien et les analyses génétiques. L'enjeu est ici le conseil génétique, où les informations données aux familles dépendent étroitement de la connaissance que nous avons des phénotypes (expression clinique, âge de début et mode de transmission de la maladie).

5.5.6. Mutations de *JAM2*

L'année qui a suivie la découverte des mutations de *MYORG*, un autre gène associé à une transmission autosomique récessive a été identifié chez 3 familles : *JAM2*(58). *JAM2* code pour une protéine de jonction serrée, principalement exprimée par la cellule endothéliale et les astrocytes, jouant un rôle majeur dans l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique et l'adhésion cellulaire. Peu de temps après, quatre autres familles ont été décrites(59) avec analyses fonctionnelles supplémentaires. L'approche dans ces 2 études a été une cartographie d'homozygotie et WES (whole-exome sequencing). Les variants identifiés à l'état homozygote ou hétérozygote composite sont tronquants ou faux-sens.

Les premiers patients décrits présentaient des difficultés d'apprentissage et de l'épilepsie, des symptômes psychiatriques, une ataxie cérébelleuse, des signes extrapyramidaux et des calcifications étendues à l'imagerie cérébrale (notamment au niveau du tronc cérébral). Le mécanisme de perte de fonction a été souligné par les analyses *in vitro* montrant une diminution d'expression de *JAM2* et l'absence de la protéine *JAM2* dans les fibroblastes chez les patients porteurs de ces variants. Les souris homozygotes knock-out *Jam2* présentaient un phénotype clinique et des calcifications cérébrales similaires à ce qui est observé chez ces familles. Sur le plan histologique, une perte neuronale et astrogliose ont été décrites.

A l'heure actuelle, les mécanismes expliquant comment des calcifications vasculaires peuvent retentir sur le fonctionnement neuronal sont encore méconnus. Les

calcifications microgliales et astrocytaires et l'altération de la barrière hémato-encéphalique pourraient engendrer des phénomènes inflammatoires et de neurotoxicité.

Dans d'autres microangiopathies avec dépôts comme l'AAC, les retentissements neuronaux peuvent être expliqués au moins en partie directement par la présence de dépôts au niveau parenchymateux souvent associés aux dépôts vasculaires.

5.5.7. Nombreux cas sans diagnostic génétique

Bien que les connaissances sur le plan génétique aient considérablement évolué ces 10 dernières années (Table 1), de nombreux cas de CCP restent sans diagnostic génétique. Ceci représente encore plus de la moitié des patients selon la méta-analyse de plus de 500 cas publiés(4) et selon notre série française (52%).

En effet, nous constituons au laboratoire une série de patients présentant des CCP pour lesquels un exome peut être réalisé. Les patients ont pour la plupart au préalable une recherche ciblée de mutations ponctuelles et délétions des gènes *SLC20A2* et *PDGFB*. Pour être inclus, il faut présenter des calcifications bilatérales, présentes au minimum au niveau lenticulaire, avec un score TCS dépassant le seuil pathologique et un bilan de recherche de diagnostics différentiels négatif.

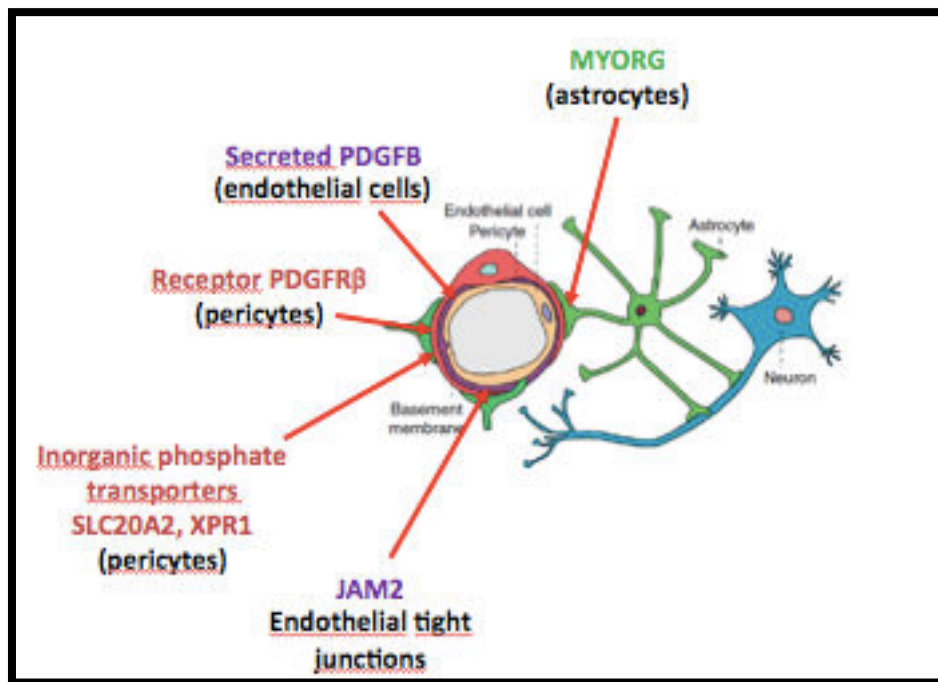
Il s'agit pour beaucoup de cas d'allure sporadique mais la difficulté est que ceci ne peut être affirmé qu'une fois s'être assuré de l'absence de calcifications sur un TDM des apparentés (compte tenu du caractère fréquemment asymptomatique de ces calcifications). Beaucoup sont probablement des transmissions autosomiques dominantes avec un parent pauci ou asymptomatique en réalité. Néanmoins, quelques cas de mutation *de novo* ont été rapportés, notamment des mutations dans *SLC20A2* et dans *PDGFB*(60)(48).

Table 1 – Formes autosomiques dominantes et récessives de CCP

	Formes autosomiques dominantes	Formes récessives
Gènes connus	SLC20A2/XPR1 : Perte de fonction de transporteurs de phosphate → Anomalie du métabolisme intracérébral du phosphate FPDGFB/PDGFRB : Perte de fonction de facteur de croissance dérivé des plaquettes et son récepteur, présents sur les péricytes : Altération BHE ?	MYORG >> JAM 2
Physiopathologie	Ossification de l'unité neurovasculaire Astrocytes réactifs	Mécanisme ? Expression astrocytaire Jonctions serrées cellules endothéliales
Présentation clinique	Très variable Pas de corrélation phénotype-génotype connue Sévérité variable ++ Diversité intra et inter familiale	Signes moteurs prédominants? Dysarthrie ?
Pénétrance clinique	Incomplète (33% asymptomatique)	Complète?

BHE : barrière hémato-encéphalique

Figure 7 – Gènes impliqués dans les CCP et convergence vers l'unité neuro-vasculaire – De Gaël Nicolas



6. INTRODUCTION GÉNÉRALE : L'ANGIOPATHIE AMYLOÏDE CÉRÉBRALE

L'AAC est caractérisée par des dépôts amyloïdes dans les parois des artères, des artérioles et, moins souvent, des capillaires et des veines du système nerveux central (SNC). Les dépôts amyloïdes sont liés à un défaut de conformation de certaines protéines, entraînant leur agrégation et la formation de fibrilles hautement insolubles, riches en conformation β -plissée. Différentes protéines amyloïdes peuvent provoquer une AAC, focalisée uniquement au SNC ou s'étendant au niveau systémique(61): la plus fréquente est l'AAC liée à des dépôts de peptides β amyloïde ($A\beta$). La première description clinique d'AAC a été faite par Scholz en 1938 et les fibrilles amyloïdes extraites des vaisseaux leptoméningés atteints ont ensuite conduit à la découverte du peptide $A\beta$. D'autres protéines sont identifiées comme la cystatine C, la transthyréline ou la gelsoline mais contrairement à l'AAC liée à l' $A\beta$, ces différentes formes sont extrêmement rares et majoritairement d'origine génétique(62).

La très grande majorité des AAC à $A\beta$ sont d'allure sporadique et retrouvées chez des patients âgés. En effet, l'âge est le facteur de risque le plus important. La prévalence de l'AAC augmente ainsi avec l'âge, allant de 2,3% entre 65 à 74 ans et jusqu'à 12,1% après 85 ans selon des études relativement anciennes basées sur examen anatomopathologique (63). Il n'existe pas de prédominance sexuelle de la maladie. Une forte association existe avec la maladie d'Alzheimer (MA) en raison de mécanismes physiopathologiques communs (64). Globalement, la prévalence de l'AAC au sein de différentes populations est difficile à établir compte tenu de chiffres très variables en fonction des différentes études anatomopathologiques publiées ces 30 dernières années : Cette prévalence va de 16 à 70% en population âgée générale (65)(66) et de 20 à 100% chez les patients atteints de MA(67)(68). Basés sur une méta-analyse publiée en 2022 qui a intégré les données de 170 études et 73000 patients, nous retenons une prévalence globale d'AAC de 5% en population générale âgée sans trouble cognitif, tous âges confondus et une prévalence de 48% chez les patients atteints de MA(69). En cas de MA cependant, l'AAC est bien plus souvent modérée que sévère (seulement 23% des cas) selon la classification histologique de Von Sattel.

L'AAC peut être asymptomatique mais se manifeste habituellement par des hémorragies cérébrales spontanées récidivantes et des troubles cognitifs progressifs, indépendamment de la survenue d'hématomes.

Il s'agit de la première cause d'hémorragie lobaire chez le sujet âgé, après 65 ans (70)(71). On estime que l'AAC serait responsable d'environ 12 à 20% des hémorragies cérébrales, tous âges confondus, ce qui en fait la 2^{ème} cause d'hémorragie cérébrale primitive après l'HTA (69)(72). Schématiquement, l'HTA est responsable d'hémorragie profonde (noyaux gris centraux, tronc cérébral) liée à une fragilité par lipohyalinose des petits vaisseaux perforants profonds (on parle de « microangiopathie hypertensive ») et l'AAC est responsable d'hémorragie de topographie lobaire, touchant le cortex cérébral et la substance blanche juxta-corticale, en lien avec les dépôts amyloïdes au niveau des vaisseaux de petits et moyens calibre corticaux et leptoméningés. Du fait de la prévalence élevée de l'AAC et de l'HTA chez les sujets âgés, certains patients présentent une « microangiopathie mixte » avec coexistence des deux pathologies. Enfin, l'incidence des hémorragies lobaires après 75 ans a doublé durant les 20 dernières années, suggérant l'impact croissant de l'AAC chez une population vieillissante mais également l'usage accru des anticoagulants oraux(71). Il y a cependant pour la première fois des données publiées cette année retrouvant une diminution après 50 ans de l'incidence annuelle des accidents vasculaires cérébraux hémorragiques en France entre 2008 et 2019 (73). Ceci est probablement en lien avec une meilleure prise en charge de facteurs de risque cardio-vasculaire telle que l'HTA.

6.1. MANIFESTATIONS CLINIQUES

On peut classiquement subdiviser la sémiologie de l'AAC en 3 catégories

6.1.1. Hématomes spontanés lobaires

Ils se manifestent cliniquement de façon souvent bruyante par la survenue brutale de troubles de vigilance, de déficits focaux, parfois associées à des céphalées et nausées et/ou crises d'épilepsie, révélant des hémorragies cérébrales intra parenchymateuses à bords irréguliers, de topographie lobaire, corticale ou sous-corticale, préférentiellement dans les régions postérieures, en particulier le lobe temporal et occipital(74)(75). Leur volume est plus important que dans le cadre d'autres pathologies comme la microangiopathie hypertensive(76). L'atteinte cérébelleuse est possible mais ne fait désormais plus partie des critères diagnostiques(2). Les régions profondes en revanche

(substance blanche, noyaux gris centraux et tronc cérébral) sont classiquement épargnées. Ces hématomes peuvent être multifocaux et le risque de récurrence est important, de 7 à 10% par an (77). Une méta-analyse récente a montré que le risque annuel de récurrence était plus élevé en cas d'hématome lié à de l'AAC comparativement aux hématomes non liés à de l'AAC (7,4 % contre 1,1 %)(78). La présence sur l'imagerie de nombreux microsaignements lobaires, d'hémosidérose, l'usage d'anti-thrombotiques ou anticoagulants ou le génotype *APOEε4* ou *APOEε2* favorisent les récurrences(79)(78)(80). La mortalité est forte et le pronostic fonctionnel est souvent sévère avec des séquelles importantes. Enfin, selon une étude récente prospective, la survenue de démence après hémorragie cérébrale est de 14% à 1 an et 28% à 4 ans (34)

6.1.2. Auras amyloïdes

Il s'agit de phénomènes neurologiques transitoires, d'une durée inférieure à 30 minutes, stéréotypés et récurrents. On parle également d'épisodes neurologiques focaux transitoires (*transient focal neurological event* - TFNE en anglais) ou « *amyloid spells* ». Il peut s'agir de symptômes positifs (paresthésies progressives, clonies, phénomènes visuels, etc...) ou négatifs (hémiparésie, aphasie, etc...). Ils sont présents chez environ 14% des patients avec AAC (81). Leur mécanisme pourrait être d'origine épileptique ou lié à un processus de dépression corticale envahissante similaire à celui des auras migraineuses(82). Les traitements antiépileptiques sont parfois efficaces. Ces manifestations sont fortement associées à la présence de deux marqueurs radiologiques d'AAC : la sidérose corticale superficielle et d'hémorragie sous-arachnoïdienne de la convexité, bien que non retrouvées systématiquement (83). Les *amyloid spells* sont de mauvais pronostic, associé à la survenue dans la moitié des cas d'un hématome lobaire dans l'année qui suit(81)(61).

6.1.3. Déclin cognitif

L'AAC favorise la survenue de troubles cognitifs par différents mécanismes : le développement de troubles lié à la survenue d'hématomes cérébraux(84), un processus neurodégénératif en lien avec une MA associée (64) ou bien une démence dite « vasculaire », indépendamment de toute MA (85). En effet, plusieurs études ont suggéré le rôle indépendant de l'AAC sur le déclin cognitif progressif. Une étude longitudinale rassemble les données d'autopsies de plus de 1000 participants qui

avaient bénéficié d'évaluation neuropsychologique annuelle plusieurs années avant leur décès. Cette étude retrouvait bien une association entre une AAC modérée à sévère et un déclin de la cognition globale, de la vitesse de perception, de la mémoire épisodique et de la mémoire sémantique, même après ajustement sur l'âge et les lésions anatomopathologiques de la MA (86)(87) (88).

Une hypothèse est que la détérioration cognitive dans l'AAC puisse être liée à une hypoperfusion chronique, fortement associée aux images de leucopathie et micro-infarctus visualisés sur l'IRM (89). Un nombre important de micro-saignements et l'atrophie corticale sont aussi associés à un déclin cognitif croissant dans l'AAC(90)(91). Les données concernant le lien entre cognition et sidérose sont plus rares mais il semblerait que le score sur l'échelle cognitive MMSE (mini-mental evaluation scale) soit plus bas en cas de présence d'hémosidérose (92).

Le profil neuropsychologique peut être d'allure sous-cortico-frontale, c'est-à-dire avec des difficultés mnésiques prédominant sur la récupération et des troubles dysexécutifs au premier plan. A terme, tous les champs de la cognition peuvent cependant être altérés et parfois mimer une MA. Un profil neuropsychologique spécifique d'AAC est ainsi difficile à définir (93)(94). En cas de MA associée, le profil cognitif correspond facilement au premier plan à des troubles en mémoire épisodique d'allure hippocampique avec difficultés de l'encodage, associée à des difficultés praxiques et phasiques et/ou une anosognosie des troubles(95).

6.1.4. Formes inflammatoires : ABRA et CAA-ri

Il s'agit d'une forme beaucoup plus rare d'AAC qui se caractérise par un syndrome neurologique hétérogène d'apparition subaiguë associée à des hypersignaux FLAIR de la substance blanche chez une population moins âgée (à partir de 40 ans selon les critères diagnostiques actuels) (96). Ceci est lié à une réaction inflammatoire en regard des dépôts vasculaires de peptide A β , soit périvasculaire avec présence de cellules géantes multinucléées : on parle alors d'AAC -ri (*related inflammation* en anglais), soit intra-et/ou transmurale, angiodestructrice et associée à un infiltrat fréquemment granulomateux : on parle d'angéite liée à l'A β (ABRA pour A β related angiitis)(97)(98)(99). Cette inflammation a lieu au niveau des artères de petit et moyen calibre où les dépôts amyloïdes sont les plus sévères(100). Il s'agit probablement d'une réaction auto-immune avec production d'anticorps anti A β , hypothèse illustrée par la

présence de ces anticorps objectivés dans le LCS en phase aigüe, ceux-ci retrouvant une concentration basale en phase de rémission(101).

En dehors de l'examen anatomopathologique, la distinction entre CAA-ri et ABRA est à l'heure actuelle difficile tant sur le plan clinique que radiologique. Il est d'ailleurs fréquent que les 2 sous-types coexistent chez un même patient(102). Ils sont ainsi fréquemment regroupés ensemble, sous le terme d'angiopathie amyloïde de forme inflammatoire (97).

Le mode de révélation est typiquement subaigu, de quelques semaines, pour un âge moyen de début des symptômes de 67 ans avec une discrète prédominance masculine (102). La plupart des patients présentent des signes neurologiques focaux (déficit moteur, troubles visuels allant jusqu'à la cécité corticale, troubles du langage) selon la topographie de l'inflammation; des troubles cognitifs d'apparition rapidement progressive voire troubles du comportement avec parfois des hallucinations visuelles, et trouble de la vigilance. Les crises d'épilepsie, focales ou généralisées et les céphalées surviennent globalement dans un tiers des cas. L'IRM montre de larges plages d'hypersignal FLAIR de la substance blanche, s'étendant jusque dans les régions juxta corticales avec atteinte des fibres en U mais épargnant le cortex, et pouvant atteindre de manière variable les régions profondes. Elles peuvent être unifocales, mais sont plus typiquement multifocales, bilatérales et surtout asymétriques comme précisé dans les critères diagnostiques établis initialement par Chung et al en 2011(103) et affinés par la suite par Auriel et al en 2016(96). Les lésions hémorragiques d'AAC comme les microsaignements ou hémosidérose sont retrouvées fréquemment au sein de ces plages d'hypersignal FLAIR. Il peut exister une prise de contraste de ces lésions jusqu'à 70% des cas, en lien avec l'œdème vasogénique et la rupture de barrière hémato-encéphalique mais également une prise de contraste leptoméningée associée parfois à une dilatation et/ou sténose de plusieurs artères intracrâniennes, de manière segmentaire prenant alors l'aspect de vascularite de petits vaisseaux(104) . Il est fréquemment utilisé de façon empirique en phase inflammatoire des traitements par corticothérapie (souvent intraveineuse initialement, parfois relayée per os avec décroissance progressive) ou immunosuppresseurs (cyclophosphamide principalement) (102,105). A ce jour, leur efficacité n'a pas été démontrée de manière robuste par des essais randomisés mais plutôt basée sur l'expérience de différents centres (106)(107).

Ils sembleraient apporter une amélioration clinique à court terme dans plus de la moitié des cas, mais néanmoins l'évolution à long terme reste incertaine à ce jour (108).

6.2. MANIFESTATIONS RADIOLOGIQUES

6.2.1. Micro-saignements ou *microbleeds* (MBs)

Leur détection ne peut se faire que par IRM, sur les séquences de susceptibilité magnétique comme les séquences en T2 écho de gradient (T2EG ou T2*) ou encore les séquences SWI ou SWAN qui ont une bien meilleure sensibilité(109) (Figure 8). Ils apparaissent comme des hyposignaux arrondis de petite taille (inférieurs à 10mm)(78). Dans l'AAC, ils sont de localisation lobaire, juxta corticale, et prédominant dans les régions postérieures, à plus haute concentration en dépôts amyloïdes(110). Dans la microangiopathie hypertensive, les MBs sont principalement profonds, au niveau des noyaux gris centraux. Des associations claires ont été établies entre MBs lobaires et génotype *APOEε4* d'une part et MBs profonds et HTA d'autre part(111). Des corrélations ont également été démontrées entre la présence de MBs de topographie profonde et la survenue d'hématomes symptomatiques profonds et la présence de MBs de topographie lobaire et la survenue d'hématome lobaire(112). La présence de MBs profonds exclut le diagnostic d'AAC selon les critères diagnostiques en vigueur (2). Cependant, la présence combinée de MBs lobaires et profonds est une situation fréquente en pratique courante, jusqu'à 30% des patients avec HIC symptomatique et reflète probablement la coexistence de microangiopathie hypertensive et d'AAC sous-jacentes(113)(114). Ainsi, l'intégration dans les critères diagnostiques d'un ratio MBs lobaires/profonds plutôt a été suggérée (115) mais n'apparaît pas encore dans leur dernière version(2).

Des données récentes sont disponibles sur la prévalence des microbleeds strictement lobaires au sein de différentes populations : Une méta-analyse a évalué leur prévalence à 22% en cas de maladie d'Alzheimer, 7% en population générale et 19% en cas d'hématome cérébral, toutes localisations confondues (69). Globalement, des microbleeds sont retrouvés chez 52% des patients avec AAC(76). Des échelles visuelles validées sont désormais disponibles pour aider à leur cotation, comme la Microbleeds Anatomical Rating Scale (MARS) par exemple (116). Des méthodes automatisées d'analyse quantitative des MBs ne sont malheureusement pas encore disponibles. Sur le plan anatomopathologique, les premières études sur autopsies établissaient une correspondance entre les microbleeds et une accumulation focale de macrophages

chargés d'hémosidérine, au contact de vaisseaux préalablement fragilisés par l'angiopathie(117). Les microbleeds seraient ainsi un reflet direct d'un processus hémorragique primaire. Cependant, d'autres hypothèses, plus récentes, évoquent finalement un processus ischémique (par micro-infarctus) avec composant pétéchiol. Ces micro-infarctus n'étaient jusqu'à présent pas détectés sur l'imagerie. Le développement de l'IRM 7 Tesla a permis de réaliser des études de corrélation entre imagerie et analyse histologique, montrant que les microbleeds peuvent correspondre à des substratum pathologiques hétérogènes et éventuellement des mécanismes physiopathologiques différents : Phénomènes ischémiques anciens, hémorragies récentes...(118)(119)(120)

Une importante littérature ces dernières années étudie leur valeur clinique et pronostique. Ils sont en effet associés à une augmentation du risque de survenue d'HIC (OR:3.93;95% CI:2.71–5.69) avec un effet-dose d'une part mais également de mortalité. (OR 1.36; 95%CI:1.24–1.48) et de démence (adj-HR:1.35;95%CI:1.00–1.82) d'autre part (121)(122)(78)(123).

6.2.2. Sidérose corticale superficielle (SCS)

La sidérose corticale superficielle (SCS) est un autre marqueur diagnostique important inclus dans les critères de Boston modifiés [14]. On pense que la sidérose corticale superficielle résulte d'extravasations répétées de produits sanguins dans l'espace sous-arachnoïdien à partir de vaisseaux fragiles affectés par l'AAC, aboutissant à des dépôts d'hémosidérine tapissant les sillons corticaux(124)(125). Elle apparaît en IRM sur les séquences T2* ou SWI ou SWAN comme des hyposignaux curvilignes « gyriformes » recouvrant les sillons. Elle est définie comme focale (≤ 3) ou disséminée (> 3) selon le nombre de sillons touchés. L'hémosidérose n'est pas visible en séquence FLAIR, contrairement à l'hémorragie sous-arachnoïdienne aiguë qui apparaît en hypersignal FLAIR. Elle prédomine nettement à la convexité des hémisphères cérébraux(126), contrairement à la sidérose superficielle du névraxe qui prédomine en sous-tentorial (souvent lié à une malformation vasculaire). Deux mécanismes ont été proposés (19): l'extension sous-arachnoïdienne d'un saignement à partir d'un hématome lobaire d'une part, et/ou la rupture des vaisseaux méningés directement dans l'espace sous-arachnoïdien d'autre part. En effet, de la SCS est souvent retrouvée chez des patients diagnostiqués AAC, sans aucun hématome associé (20). Cependant, sa prévalence

augmente en cas d'hématome associé. Retrouvée dans 20 % des patients AAC sans hématome, elle l'est dans 40-60% avec hématome(82)(126). La prévalence de la SCS est de 0,4- 0,7 % en population générale(127)(128) et de 2 à 5 % dans les centres mémoire(129)(92). Ce marqueur hémorragique semble relativement spécifique d'AAC, non retrouvé par exemple dans d'autres microangiopathies comme le *CADASIL*(130). L'hémosidérose est fortement associée au génotype *APOEε2* et est apparue ces dernières années comme l'un des meilleurs prédicteurs d'une future hémorragie lobaire(131)(132)(133). Une méta-analyse a montré que l'incidence de l'HIC par an était de 11,1 % en présence d'hémosidérose et de 3,9 % sans (134). Ce risque augmente selon l'étendue et le caractère multifocal de la SCS. La SCS se manifeste souvent par des *TFNE* ou auras amyloïdes(135). Sur le plan histologique, l'hémosidérose semble associée à une augmentation de l'Aβ locale leptoméningée mais à une diminution de l'Aβ globale corticale. *A contrario*, les micro-saignements sont, eux, associés à une augmentation de l'Aβ vasculaire corticale globale. Ainsi, cela pourrait correspondre à différents phénotypes d'AAC : 1) des patients présentant une maladie leptoméningée et une hémosidérose plus importante 2) des patients présentant une AAC corticale avec micro-saignements plus importants.

6.2.3. Hémorragie sous-arachnoïdienne (HSA) de la convexité

On distingue dans l'AAC, l'HSA isolée de la convexité et l'HSA associée à un hématome lobaire (136). L'HSA associée à un hématome lobaire est plus fréquemment rencontrée et apparaît comme un critère diagnostique possible d'AAC, soit sur IRM (elle apparaît alors comme un hyposignal en T2* et en hypersignal en FLAIR, témoignant du caractère récent de l'hémorragie) soit sur TDM sans injection (sous forme d'hyperdensité spontanée) (137). Nous aborderons dans cette thèse sa valeur diagnostique en situation d'urgence. Elle est facilement associée avec d'autres lésions hémorragiques dans l'AAC et notamment de l'hémosidérose (138). Elle est prédictive d'une extension de l'hématome lobaire (139), d'une récurrence hémorragique (138) et d'un mauvais pronostic fonctionnel après un hématome lobaire(140)

6.2.4. Lésions de substance blanche

Celles-ci sont liées à une hypoperfusion chronique de la substance blanche, vascularisée par des artères perforantes longues originaires des vaisseaux leptoméningés d'une part

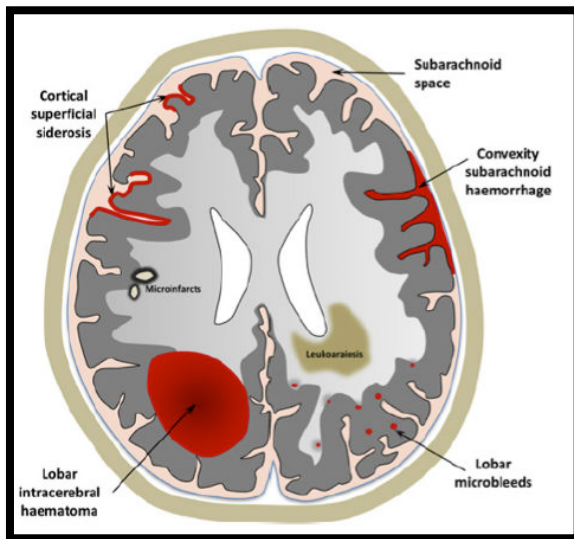
et à l'altération de la vasoréactivité cérébrale d'autre part (141). Les lésions de substance blanche sont plus sévères dans l'AAC que dans la MA ou que celles liées au vieillissement(142)(143). Elles évoluent plus rapidement également(142)(144). L'aspect est globalement peu spécifique, mais on note quelques particularités par rapport à la leucopathie retrouvée dans l'angiopathie hypertensive : on peut retrouver un pattern d'hypersignaux punctiformes de la substance blanche sous-corticale (pattern « multi-spots»), ainsi qu'une prédominance périventriculaire postérieure de la leucoaraïose(2). Ces lésions sont le plus souvent symétriques et respectent les fibres en U. La leucopathie est corrélée à l'atrophie cérébrale et à la dilatation des espaces périvasculaires. Leur volume est corrélé à la charge amyloïde détectée en PET-PIB(143). L'échelle la plus communément utilisée est l'échelle globale de Fazekas (145). Cliniquement, il y a une corrélation avec le déclin cognitif et le risque de saignement(146).

6.2.5. Micro-infarctus corticaux

Très souvent identifiés sur les études anatomopathologiques(147)(118), les micro-infarctus ont longtemps été considérés comme invisibles sur l'IRM. Le développement d'IRM de meilleure résolution spatiale et notamment en 7 Tesla a permis de mettre en évidence les lésions à la limite supérieure de la taille des micro infarctus (119). Lorsqu'ils sont récents (moins de 15 jours), ils peuvent apparaître en hypersignal en séquence de diffusion (*Diffusion-weighted imaging* - DWI) de moins de 5mm, associé à un hyposignal en ADC et un hypersignal FLAIR(148). La majorité des micro-infarctus (dont le diamètre est de moins de 1mm) ne sont pas visibles en imagerie courante. Souvent silencieux, ils sont de topographie préférentiellement corticale ou sous corticale. Ces lésions peuvent être visibles soit lors de la survenue d'un hématome (possiblement reflet de la baisse agressive de la pression artérielle sur un terrain altéré de vasoréactivité cérébrale) ou bien lors du suivi du patient, évoquant alors plutôt un marqueur de lésions cérébrales continues (hypoperfusion et micro-embolies). Sur le plan de l'imagerie, ils sont le plus fréquemment associés à l'atrophie cérébrale (149), aux lésions de substance blanche (150), aux espaces périvasculaires dilatés et aux micro-saignements(151), ce qui suggère qu'ils résultent en effet d'une artériopathie chronique occlusive des petits vaisseaux(152)(153). Selon les études histologiques, les micro-infarctus sont corrélés à une AAC avancée(154). On en retrouve dans près de 15%

des cas d'AAC selon les études d'autopsies (154) mais cette prévalence peut augmenter jusqu'à 57% selon des études en IRM 3 Tesla (155), tandis qu'ils sont absents dans la MA (154). Ils ne sont pas spécifiques de l'AAC et peuvent être retrouvés dans la microangiopathie hypertensive mais moins fréquemment(152). Bien que minuscules individuellement, ils semblent avoir collectivement un impact clinique significatif et sont associés à un déclin cognitif dans l'AAC (156)(89), à plus d'institutionnalisation (157) et à un moins bon pronostic fonctionnel après hématome(158).

Figure 8. Schéma regroupant les différentes manifestations radiologiques possibles de l'AAC. Extrait de Cordonnier et al (159)



6.2.6. Espaces péri-vasculaires dilatés

La dilatation des espaces périvasculaires (espaces de Virchow-Robin) dans l'AAC est un reflet d'un défaut de drainage de liquide interstitiel et prédomine au niveau des centres semi-ovales dans l'AAC, contrairement à la microangiopathie hypertensive où l'on trouve ces espaces péri-vasculaires dilatés au niveau des noyaux gris centraux(160)(161)(162). Situés le long du trajet des artères perforantes, ils correspondent sur l'IRM à des lésions ayant le signal du LCS, de petite taille (moins de 3mm) (163)(164). Comme pour les microbleeds, des échelles semi-quantitatives ont été développées. Cet item a tout récemment intégré les critères diagnostiques de Boston pour les AAC sporadiques (2) et a également été retrouvé au sein de formes héréditaires (mutation *APP* dite Hollandaise)(161). Une étude en IRM a montré une corrélation avec la présence de sidérose corticale superficielle(165) et sur le plan

clinique, ils semblent associés à un déclin cognitif(166). Sur le plan histologique, une étude de corrélation imagerie-autopsie montre que les espaces périvasculaires dilatés visualisés sur l'IRM sont situés autour de la substance blanche proche des artéριοles perforantes corticales et leur étendue était associée à la gravité de l'AAC dans le cortex sus-jacent. Au sein des vaisseaux avec espaces périvasculaires dilatés, on retrouve une réduction marquée des cellules musculaires lisses et une accumulation forte d'A β vasculaire s'étendant dans la substance blanche(167)(168).

6.2.7. L'atrophie corticale

Il s'agit d'un marqueur non spécifique de maladie neurodégénérative qui résulte d'une perte neuronale principalement mais aussi probablement de remaniements secondaires aux lésions de microangiopathies(169). L'atrophie est également associée aux lésions de substance blanche(170). Il s'agit d'un marqueur d'AAC corrélé au déclin cognitif, et cela même indépendamment d'une MA associée(171)(172). Ces études se sont basées sur les formes héréditaires d'AAC avec mutation d'APP dite Hollandaise, où l'on observe uniquement des dépôts amyloïdes vasculaires, sans lésion caractéristique de MA associée (plaques amyloïdes parenchymateuses et dégénérescences neuro-fibrillaires).

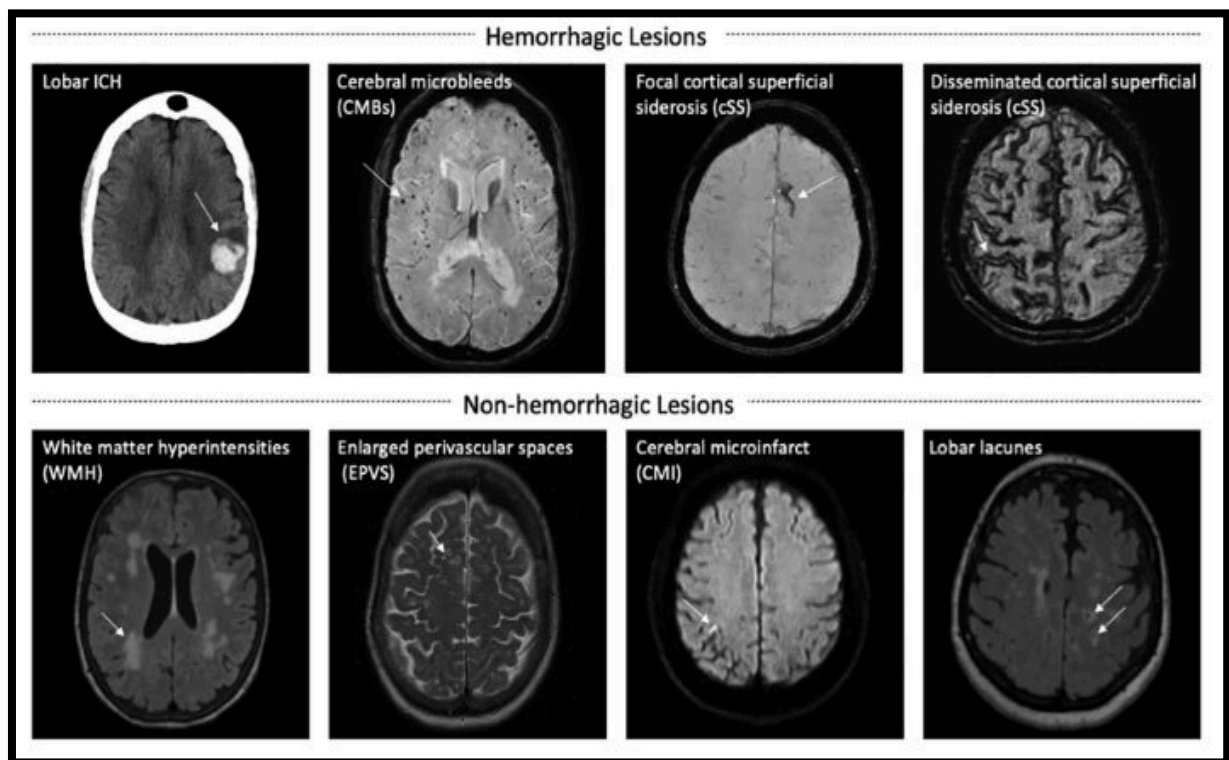


Figure 9. Lésions hémorragiques et non hémorragiques associées à l'AAC - Extrait de Kozberg et al, 2022(173).

Rangée supérieure (de gauche à droite) : Tomodensitométrie sans contraste puis IRM séquence de susceptibilité magnétique SWI. Ligne du bas (de gauche à droite) : IRM séquence FLAIR, IRM séquence T2, IRM séquence de diffusion, IRM séquence FLAIR. Les flèches indiquent des exemples représentatifs de chaque lésion dans chaque panneau.

6.3. Critères diagnostiques révisés de Boston

La première version de ces critères date de 2001(174), développée par l'équipe de Boston dirigée par Steven Greenberg, et deux autres versions ont depuis permis d'améliorer leur spécificité mais surtout leur sensibilité (126)(2). Ces critères catégorisent l'AAC comme certaine (post-mortem, sur autopsie) ou probable avec preuve anatomopathologique (à partir d'un hématome évacué ou biopsie cérébrale) si des dépôts vasculaires A β ont été mis en évidence sur le plan histologique. Une AAC peut être probable ou possible, sans examen histologique, en fonction des lésions hémorragiques présentes sur l'IRM cérébrale. Les seules lésions incluses initialement étaient les hématomes et micro-saignements, manquant surtout de sensibilité. L'hémosidérose corticale n'a été intégrée qu'en 2010, suite notamment à plusieurs études des AAC héréditaires, liées à une mutation *APP* dite Hollandaise. Ceci a considérablement amélioré la sensibilité sans altérer la spécificité des critères. Ces révisions ont été basées sur la comparaison d'un groupe de 38 patients ayant une AAC définie histologiquement et un groupe de 22 patients ayant un hématome intraparenchymateux sans mise en évidence d'AAC à l'histologie. Ces critères révisés ont alors montré des sensibilités allant de 57,9 % à 76,9 % et des spécificités allant de 87,5 % à 100 % (163,174). L'hémosidérose plus particulièrement montre une très bonne spécificité. Pour parler d'AAC probable, plusieurs lésions hémorragiques strictement lobaires (corticale ou juxta-corticale) sont nécessaires, avec une spécificité des critères révisés de Boston de 100%. On parle d'AAC possible en cas de lésion hémorragique lobaire unique et la spécificité des critères diminue alors fortement, à 62%. Néanmoins, les différentes lésions hémorragiques – hématome, microsaignement et hémosidérose - sont incluses dans ces critères sans réelle considération de la gravité comme la taille, la topographie ou leur nombre. Intégrer le caractère disséminé ou non de l'hémosidérose, le nombre de microsaignements par seuil > 5, >10.. ou encore la topographie occipitale

des lésions pourrait améliorer encore la précision des critères. De plus, ils ne prennent en compte que les lésions visualisées sur l'IRM et n'intègrent pour le moment pas d'autres types de preuve de dépôts amyloïdes, comme les biomarqueurs du LCS ou le PET-PIB.

Ces critères n'ont également pas les mêmes performances diagnostiques selon la présentation clinique initiale (115). En effet, la sensibilité est assez faible (42,4%) en cas de troubles cognitifs ou d'épisodes neurologiques focaux transitoires comme présentation initiale par rapport à la survenue d'un hématome lobaire symptomatique (175). Enfin, l'accessibilité à l'IRM peut être limitante (comparativement au TDM par exemple), dans des situations d'urgence ou dans des pays émergents.

La dernière version v2.0 est parue en août 2022(2) (Table 2). Cette étude a été basée sur un recrutement international de plus de 300 patients pour lesquels une confirmation anatomopathologique était disponible. Une modification importante est l'intégration des lésions de substance blanche, et notamment la dilatation des espaces périvasculaires des centres semi-ovales. L'exclusion de tout microsaignement profond a été soulignée et la limite inférieure d'âge a été avancée à 50 ans. Enfin, les hématomes cérébelleux pouvaient être comptabilisés comme lobaires dans la version de 2010, et ne sont désormais ni comptabilisés comme lobaires ou profonds dans la version 2.0.

Table 2 – Les nouveaux critères diagnostiques révisés de Boston v2.0 (2)

Definite CAA	Full brain post-mortem examination demonstrating: <ul style="list-style-type: none"> - Spontaneous ICH, TFNE, convexity subarachnoid hemorrhage, or cognitive impairment - Severe CAA with vasculopathy - Absence of other diagnostic lesion
Probable CAA with supporting pathology	Clinical data and pathologic tissue (evacuated hematoma or cortical biopsy) demonstrating: <ul style="list-style-type: none"> - Presentation with spontaneous ICH, TFNE, convexity subarachnoid hemorrhage, or cognitive impairment - Some degree CAA in specimen - Absence of other diagnostic lesion
Probable CAA	Clinical data and MRI demonstrating: <ul style="list-style-type: none"> - Age > 50 years (and no more 55 years) - Presentation with spontaneous ICH, TFNE, convexity subarachnoid hemorrhage, or cognitive impairment - > 2 lobar, cortical, or cortical-subcortical hemorrhage including ICH,

	<p>MBS, or foci of CSS or convexity SaH</p> <ul style="list-style-type: none"> - Or single lobar hemorrhagic lesion AND one white matter feature (severe perivascular spaces in the centrum semiovale or white matter hyperintensities in a multispot pattern) - Absence of any deep hemorrhagic lesions - Cerebellar hemorrhage no more counted - Absence of other cause of hemorrhage
Possible CAA	<p>Clinical data and MRI demonstrating:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Age > 50 years (and no more 55 years) - Presentation with spontaneous ICH, TFNE, convexity subarachnoid hemorrhage, or cognitive impairment - One lobar, cortical, or cortical-subcortical hemorrhage including ICH, MBS, or foci of CSS or convexity SaH - Or one white matter feature (severe perivascular spaces in the centrum semiovale or white matter hyperintensities in a multispot pattern) - Absence of any deep hemorrhagic lesions - Cerebellar hemorrhage no more counted - Absence of other cause of hemorrhage

Les modifications comparativement à la version de 2010 sont indiquées en gras et en bleu.

6.4. PREUVES DE DÉPOTS AMYLOÏDES :

6.4.1. Imagerie PET amyloïde :

En Positron Emission Tomography (PET), le 11C- Pittsburgh Compound B (PIB) a la capacité de se lier avec l'A β fibrillaire et est utilisé pour refléter indirectement les dépôts amyloïdes cérébraux. Les corrélations entre l'imagerie et l'anatomopathologie montrent que le PET-PIB prédit fortement la présence d'une pathologie A β significative à l'autopsie (176). Il s'agit du radio traceur le mieux connu et étudié dans la MA, qui a d'ailleurs été utilisé pour évaluer l'efficacité, sur le plan de l'imagerie du moins, de nouvelles molécules comme l'adécanumab(177). La première étude de PET-PIB dans l'AAC n'incluait que 6 patients mais plusieurs études de plus grands effectifs sont désormais disponibles(178). Il a globalement été démontré dans l'AAC une rétention globale du PIB (exprimé en *standardized uptake value ratio*; SUVR) mais avec une nette prédominance occipitale. Il semblerait donc y avoir une distribution de fixation différente de la MA, où il y a plutôt une rétention à prédominance frontale. Dans l'ensemble des études publiées, l'imagerie TEP amyloïde a une utilité diagnostique certaine et permet surtout d'exclure une AAC si le TEP est négatif, que ce soit par

rapport à des témoins sains ou à des témoins avec hématome profond lié à de l'HTA. Si le TEP est positif en revanche, la distinction d'une AAC avec une MA peut être difficile et, jusqu'à présent, aucune approche (valeurs régionales, ratios, évaluation visuelle) ne semble suffisante et suffisamment spécifique(179). En effet, d'après une étude réalisée sur autopsie de 41 patients, il semblerait que la rétention au PIB soit plus corrélée aux plaques amyloïdes qu'aux dépôts vasculaires(180). Le Florbetapir, un autre traceur amyloïde est en cours de développement mais présente les mêmes limites(181). Un traceur sélectif de l'amyloïde vasculaire, ne se fixant pas à l'amyloïde parenchymateuse est en cours de développement ([⁶⁸Ga] Ga-p14-032)(182)

Le PET-PIB examen n'est pour le moment disponible en France que dans un contexte de protocole de recherche, et non en pratique courante. Un marqueur amyloïde vient juste d'obtenir une autorisation en France pour la MA et ouvre la voie à son usage en soins.

Il nous semble ainsi important de développer de nouveaux outils diagnostiques. En effet, les critères ont intégré, au fur et à mesure des versions, de nouveaux éléments radiologiques afin d'en améliorer la sensibilité et spécificité. Cependant, la distinction entre AAC et diagnostics différentiels n'est pas toujours facile, notamment du fait de possible angiopathie mixte avec coexistence de pathologies comme HTA et AAC. Obtenir des preuves de dépôts amyloïdes pour un diagnostic plus précis et même plus précoce (avant survenue des lésions hémorragiques) en pratique courante semble primordial.

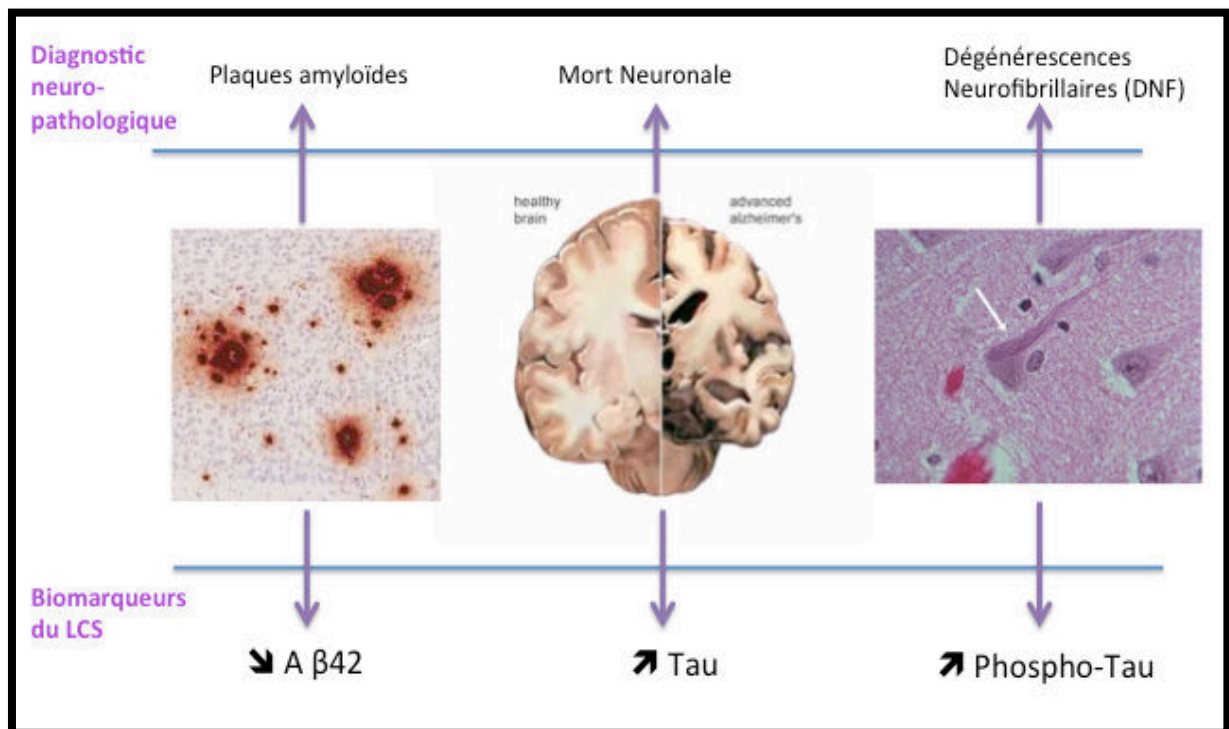
6.4.2. Biomarqueurs du LCS

Les biomarqueurs du liquide céphalo-spinal (LCS), classiquement utilisés en pratique courante dans la maladie d'Alzheimer (MA), suscitent de plus en plus d'intérêt dans la démarche diagnostique de l'AAC.

Ils sont en effet complètement validés depuis plusieurs années (183) et largement utilisés par les cliniciens pour le diagnostic de la MA. Ils regroupent la protéine Tau totale (Tau) et sa forme phosphorylée à la thréonine 181 (phospho-Tau) ainsi que les peptides A β 42 et A β 40. Ils ont montré des niveaux de sensibilité et spécificité dépassant systématiquement 80 % (183) dans la MA et sont désormais recommandés par la Haute Autorité de Santé (HAS) en cas de début des symptômes avant l'âge de 65 ans ou en cas de tableau clinique atypique (184). Un profil évocateur de MA comprend une diminution du niveau d'A β 42 et des niveaux élevés de Tau et phospho-Tau (Figure 1). Le dosage de l'A β 40 seule n'est pas pertinente pour distinguer les patients MA des contrôles sains,

contrairement au calcul du ratio $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ (185). L'élévation de la protéine Tau semble refléter une dégénérescence axonale, de façon aspécifique, alors que la protéine phospho-Tau est considérée comme un marqueur des dégénérescences neurofibrillaires (DNF) caractéristiques de la MA (185). Enfin, les dépôts amyloïdes extracellulaires, en dépôts diffus ou dans les plaques amyloïdes parenchymateuses, expliquent la diminution du peptide $A\beta_{42}$ retrouvée dans le LCS.

Figure 10 – Profil des biomarqueurs Alzheimer (Extrait de Grangeon L, Wallon D – La lettre du neurologue –septembre 2022)



La MA et l'AAC partageant une physiopathologie commune avec dépôts amyloïdes, la pertinence des biomarqueurs du LCS dans l'AAC a été soulevée par plusieurs auteurs récemment. Le dosage de l' $A\beta_{40}$ pourrait être plus sensible dans l'AAC. En effet, il s'agit de l'isoforme principal s'accumulant dans la paroi des vaisseaux cérébraux contrairement aux dépôts amyloïdes parenchymateux trouvés dans la MA constitués principalement d' $A\beta_{42}$ (186)(187). En 2018, une méta-analyse incluait un total de 59 LCS de patients AAC probables ou certaines, comparés à 94 LCS de contrôles sains et 159 de patients MA (188). Les biomarqueurs $A\beta_{42}$, $A\beta_{40}$ et Tau totale permettaient de

différencier les patients AAC des contrôles mais pas le dosage de phospho-Tau (189)(190)(191).

Il n'existe actuellement pas de consensus concernant la valeur diagnostique des biomarqueurs du LCS dans l'AAC. La dernière version 2.0 des critères modifiés de Boston (2) publiée en 2022 ne les a pas intégrés, faute de données suffisantes dans la littérature. Ceci sera l'objet d'un de nos travaux de recherche.

6.5. ANATOMOPATHOLOGIE ET PHYSIOPATHOLOGIE

6.5.1. Métabolisme normal et pathologique du peptide A β

Le gène *APP*, situé sur le chromosome 21, code pour la protéine précurseur du peptide bêta-amyloïde (protéine APP). Son expression est ubiquitaire mais prédomine au niveau cérébral, notamment produite par les neurones et les cellules musculaires lisses artérielles. La protéine APP est transmembranaire, avec une longue partie N-terminale située au niveau extracellulaire et une courte région C-terminale dans le cytoplasme. Il s'agit d'une protéine précurseur qui sera par la suite clivée pour donner d'autres protéines plus petites, dont la bêta-amyloïde. Il existe deux principales voies de clivages:

- La voie non amyloïdogénique, où la protéine APP va être clivée par les enzymes α -secrétase (principalement composée d'ADAM10) puis par la γ -secrétase (dont les unités catalytiques sont composées de PSEN1 ou PSEN2), conduisant à différentes protéines utiles à la plasticité cérébrale, la régulation de la migration neuronale, la synaptogénèse...
- La voie amyloïdogénique, où la protéine APP va être clivée par la β -secrétase (composée de BACE1) puis la γ -secrétase aboutissant au peptide A β .

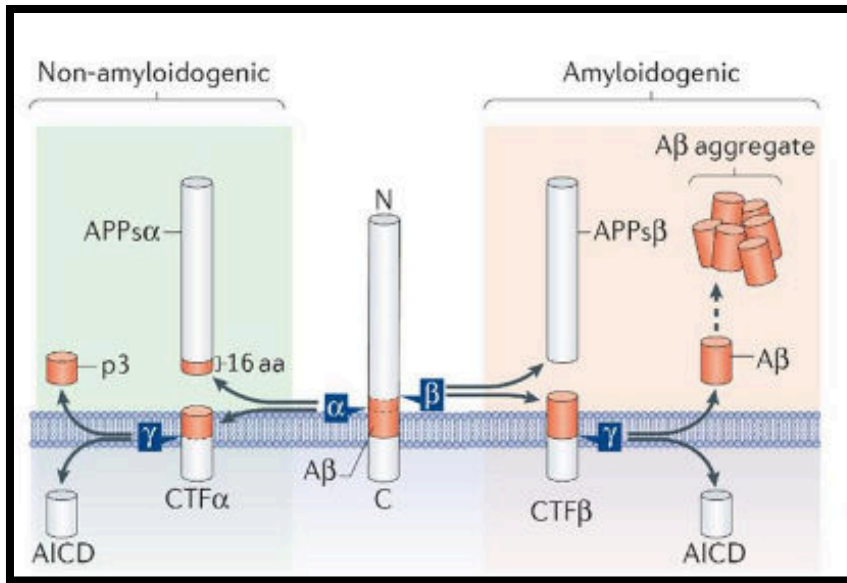


Figure 11 : Voies de clivage de la protéine APP

Le clivage par l'α-sécrétase dans la voie non amyloïdogénique (fond vert) se produit au sein de la séquence d'acide aminés du peptide Aβ, générant l'APPsα et le peptide p3 après action de la γ- sécrétase. La voie amyloïdogénique, elle, (fond orange) libère l'APPsβ et le CTFβ puis génère le peptide Aβ dans l'espace extracellulaire après l'action de la β-sécrétase. Un fragment intracellulaire (domaine intracellulaire de l'APP (AICD)) est libéré dans les deux voies.

En fonction du site de clivage du précurseur APP, les fragments sont composés d'un nombre variable d'acides aminés, aboutissant notamment aux peptides Aβ 1-38, Aβ 1-40 ou Aβ 1-42. Dans l'AAC et dans la MA, la voie amyloïdogénique prédomine. Les dépôts de protéine amyloïde s'accumulent alors dans la média et l'adventice des artères cérébrales corticales et leptoméningées de petit et moyen calibre et peuvent s'accumuler au niveau parenchymateux, de façon diffuse ou former des plaques dites « plaques séniles » ou « plaques amyloïdes ». C'est ce que l'on décrit dans la MA mais ceci est aussi en lien avec l'âge. L'Aβ42, très hydrophobe, se dépose principalement dans le parenchyme, forme plus rapidement des agrégats et prédomine dans les plaques séniles de la MA, tandis que l'Aβ40, plus soluble, se dépose préférentiellement au niveau vasculaire, et prédomine dans l'AAC (192)(193)(194).

Les voies physiologiques d'élimination de ces peptides sont multiples(195)(186) :

- La clairance du peptide via la barrière hémato-encéphalique (BHE), représentant près de 85% de la clairance totale. Elle est médiée principalement par le récepteur LRP-

1 (*Low density lipoprotein Receptor-related Protein 1*) qui va capter le complexe A β -Apolipoprotéine E (ApoE) et l'éliminer dans le plasma. Les capacités de liaison de LRP1 au complexe A β - ApoE dépendent de l'isoforme de la protéine ApoE. En effet, cette liaison va être facilitée si l'isoforme est ApoE2 ou 3. En revanche, la liaison au récepteur LRP1 est complètement bloquée si l'isoforme est l'ApoE4 et ce mécanisme de clairance est alors quasi inactif. L'Apolipoprotéine J (ou clusterine) permet également le transport de l' A β à travers la BHE via le récepteur LRP2.

- Le catabolisme par phagocytose par les macrophages périvasculaires, les astrocytes et la microglie
- Le catabolisme par voie enzymatique : les principales protéases impliquées sont la néprilysine et l'*insulin-degrading enzyme*.
- Le drainage péri-vasculaire via le liquide interstitiel, éliminé jusqu'au système lymphatique cervical, à travers la membrane basale des cellules musculaires lisses (CML) de la média des artères de petit calibre. Celui-ci est entraîné par les pulsations artérielles(196) mais également par la contraction des CML (197). Le rôle des pieds astrocytaires et notamment des canaux AQP4 est majeur pour le transport de protéases et la capture d'A β (198). Les progrès de l'IRM pourraient améliorer la visualisation des voies de clairance amyloïde chez l'homme in vivo. Un reflet indirect d'une dysfonction de ce drainage périvasculaire est la dilatation des espaces périvasculaires visualisés sur l'IRM.

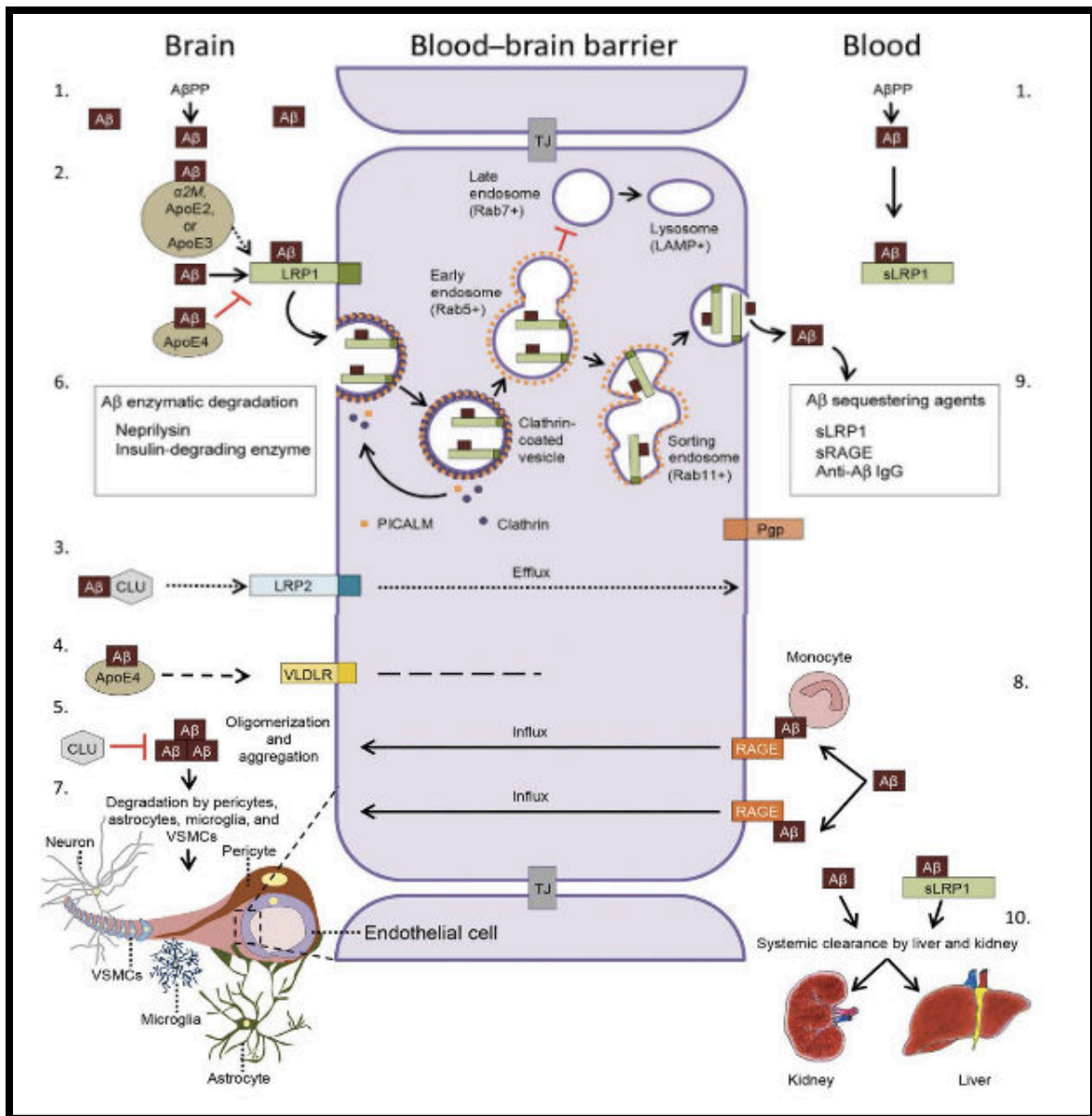


Figure 12. Principales voies de clairance du peptide Aβ à travers la barrière hémato-encéphalique

Une fois dans le plasma, l'Aβ se lie à plusieurs molécules pour être transporté aux tissus périphériques et LRP1 soluble extracellulaire est la protéine périphérique majeure liant Aβ et séquestrant plus de 70% du peptide Aβ circulant.

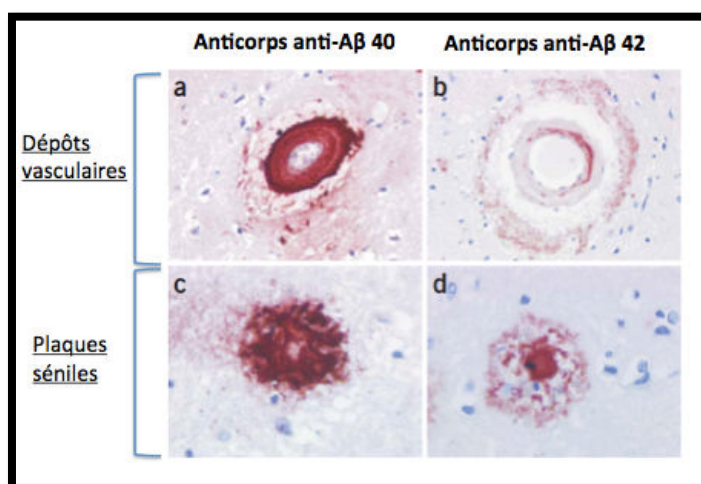
Au total, la quantité de peptide Aβ dans le tissu cérébral normal est le résultat d'un équilibre finement régulé entre synthèse, sécrétion, dégradation, et clairance à travers la BHE et périvasculaire.

Dans l'AAC, les trois premiers mécanismes deviennent dysfonctionnels et la clairance périvasculaire de l'Aβ devient majoritaire par rapport à la dégradation. Cependant, avec

l'âge, les artères deviennent plus rigides avec une membrane basale plus épaisse par accumulation de collagène et perte de polarisation des canaux AQP4 et le drainage périvasculaire finit par s'affaiblir également(199). Cette altération du drainage périvasculaire semble être le mécanisme central dans la physiopathologie de l'AAC sporadique, là où dans les formes héréditaires d'AAC par duplications ou mutations du gène *APP*, on retient surtout une surproduction d'A β ou augmentation de son agrégabilité(200)(201). Une meilleure compréhension de ce défaut de drainage de l' A β semble cruciale, notamment pour développer de futures cibles thérapeutiques.

En conséquence de ce déséquilibre entre synthèse et clairance, le peptide A β s'accumule au sein des artères cérébrales et va changer de conformation pour devenir fibrillaire, chargé en structures β -plissées. Ces dépôts sont accompagnés d'autres protéines comme les protéines du complément, l' α 1-antichymotrypsine, les glycosaminoglycanes, la métalloprotéinase 9 de la matrice (MMP9) et différentes apolipoprotéines, telles que l'apoE, l'apo J. Ces « co-dépôts » peuvent accélérer la formation de fibrilles amyloïdes par ailleurs(186). L'A β 42 étant moins soluble, il va se déposer en premier au sein de la media des artères, constituant un filtre au passage du peptide A β 40 qui sera retenu à son tour dans la paroi artérielle. Par la suite, ce dernier constituera généralement le composant majoritaire des dépôts amyloïdes dans l'AAC alors que l'A β 42 est majoritaire dans les plaques parenchymateuses retrouvées dans la MA (192)(193)(194).

Figure 13 – Caractérisation immunohistochimique des dépôts vasculaires d'AAC et des plaques séniles parenchymateuses sur autopsie d'un patient porteur de duplication du gène *APP*. Extrait de Rovelet-Lecrux et al(202)



Dans les formes héréditaires d'AAC, la toxicité vasculaire du peptide A β est très forte, avec une agrégation quasi immédiate et une importante résistance à la dégradation protéolytique (plus forte dans les mutations *APP* type Hollandaise que Flamande).

L'accumulation d'A β est corrélée avec une réponse toxique des CML adjacentes: Il a été montré *in vitro* que les dépôts modifient leurs propriétés d'adhérence cellulaire(203), engendrent alors une destruction de la lame basale et *in fine* une dégénérescence des CML par rupture du réseau d'actine intracellulaire, fragmentation nucléaire et activation de caspases conduisant à une apoptose des CML mais aussi des cellules endothéliales(204).

6.5.2. Dysfonction vasculaire

Ces dépôts déclenchent une cascade incluant, entre autres, la libération de composants inflammatoires, l'activation du système du complément, le stress oxydatif. La survenue secondaire ou primaire de ces dysfonctions fait à l'heure actuelle débat et plusieurs études *in vivo* montrent ces phénomènes de dysfonction vasculaire avant l'apparition des dépôts vasculaires. L'étude des modèles animaux permet d'approfondir ces questions. Le peptide A β 40 soluble peut en effet conduire à une vasoconstriction (205)(206) et lorsqu'il est sous forme fibrillaire, il va alors induire des dysfonctions vasodilatatoires profondes(207)(208). Au-delà des changements structurels vasculaires avec dégénérescence des CML, on retrouve dans l'AAC une diminution au niveau endothélial de l'activité enzymatique eNOS, responsable de la synthèse de l'oxyde nitrique vasodilatateur (NO) (209)(210)(211). Ceci aboutirait à des phénomènes ischémiques chroniques par vasodilatation altérée et hypo-oxygénation tissulaire secondaire, synthèse de radicaux libres responsables de stress oxydatif.

De manière générale, on retrouve une baisse de vasoréactivité dans l'AAC. *In vivo*, les études en IRM fonctionnelle (BOLD) ont également montré une baisse de vasoréactivité au niveau occipital à certains stimuli visuels et les analyses de perfusion sur séquences ASL retrouvent une diminution du débit sanguin cérébral (212)(213). Cette diminution de vasoréactivité est retrouvée sur les séquences de perfusion d'IRM cérébrale très tôt (avant la survenue d'autres marqueurs hémorragiques par exemple) chez les patients porteurs de mutation *APP* dite Hollandaise, mais pas encore symptomatiques(214).

6.5.3. Autres mécanismes impliqués

Parallèlement à cette dysfonction endothéliale, on retrouve une augmentation de la perméabilité des cellules endothéliales et perturbation des jonctions étroites. Cette altération de la perméabilité de la BHE conduit à une extravasation de protéines plasmatiques, conduisant à des phénomènes inflammatoires (215) et activation de métalloprotéases qui vont à terme altérer les parois microvasculaires et matrice extracellulaire et favoriser les hémorragies(207)(216). En effet, des études *in vitro* ont montré une sécrétion de métalloprotéases par les cellules endothéliales lorsqu'elles étaient stimulées avec des peptides A β (217)

6.5.4. Lésions anatomopathologiques

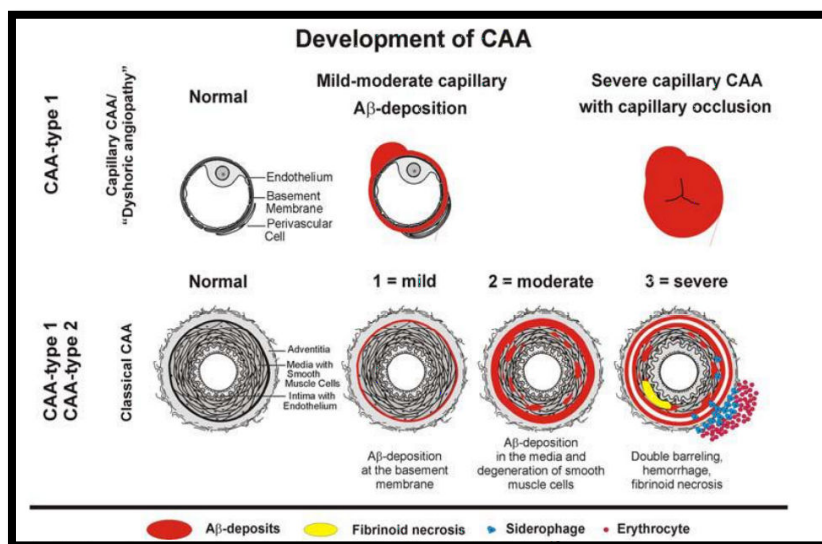
Sur le plan anatomique, l'accumulation du peptide A β va se faire avant tout au sein des artères corticales et leptoméningées de petit et moyen calibre et moins au niveau capillaire (parfois les veines) alors que les vaisseaux de substance blanche profonde sont généralement épargnés. Comparativement au niveau périphérique, on ne retrouve pas au niveau cérébral de limitante élastique externe, moins de cellules musculaires lisses et de fibres élastiques dans la média et une adventice très mince avec pour conséquence un rapport paroi/lumière plus petit que les artères périphériques. Les artères leptoméningées, particulièrement touchées dans l'AAC (contrairement à d'autres types de microangiopathies) ont peu de ramifications et des rapports importants avec les pieds astrocytaires et donnent des artérioles parenchymateuses, qui elles, sont complètement entourées de pieds astrocytaires. On comprend alors mieux l'impact sur les vaisseaux leptoméningés de la dégénérescence des CML et de l'altération du drainage péri-vasculaire (faisant intervenir principalement les astrocytes) dans l'AAC.

La distribution des lésions vasculaires de l'AAC est fragmentée et segmentaire, avec des vaisseaux affectés à des stades différents parfois sur une même coupe histologique(218). Les dépôts d'A β sont initialement situés au niveau de l'adventice et de la média et envahissent progressivement les autres couches de la paroi vasculaire, de façon concentrique, altérant et remplaçant les cellules musculaires lisses. Ceci provoque une désorganisation architecturale de la paroi vasculaire avec épaissement de l'intima et dégénérescence hyaline de la média, une réduction luminale d'une part et la formation de micro anévrysmes et de nécrose fibrinoïde, fragilisant la paroi et l'exposant à des complications hémorragiques d'autre part. Des classifications

anatomopathologiques comme l'échelle de Thal ou Vonsattel(219)(220) permettent de quantifier la sévérité histologique de l'AAC. Il n'y a à l'heure actuelle pas de consensus sur les critères de graduation de l'AAC. Les colorations les plus couramment utilisées pour mettre en évidence les dépôts amyloïdes sont la Thio flavine S ou T et surtout le Rouge Congo (apparaissant vert sous lumière polarisée). D'après Thal et al, on peut décrire 3 stades en fonction du degré d'infiltration amyloïde dans la paroi du vaisseau :

- Légère (dépôts amyloïdes confinés à la média)
- Modérée (dépôts atteignant la média et l'adventice avec un aspect feuilleté ou radiaire)
- Sévère (aspect en double contour avec formation de micro-anévrysmes, dépôts d'hémosidérine, astrogliose périphérique, et occlusion de capillaires)

Figure 14: Classement anatomopathologique en fonction du degré d'infiltration amyloïde dans la paroi des vaisseaux d'après Thal et al., 2008(221)



6.5.5. Deux types histopathologiques décrits

Deux types d'AAC ont été décrits selon le type de vaisseaux atteints(220).

- L'AAC de type 1 est caractérisée avant tout par une atteinte des capillaires corticaux, avec ou sans atteinte des autres vaisseaux
- L'AAC de type 2 ne comporte pas d'atteinte capillaire et atteint principalement les artères leptoméningées et corticales.

Ces deux différents sous-types d'AAC représentent probablement des mécanismes physiopathologiques sous-jacents différents. L'hypothèse que l'AAC de type 1 soit le

stade avancé du type 2 est exclue. Dans l'AAC de type 2, les dépôts sont principalement constitués d'A β 40, qui vont progressivement remplacer les cellules musculaires lisses, elles-mêmes responsables d'une partie de la production d'A β 40. Dans l'AAC de type 1, les dépôts au niveau des capillaires, ne possédant pas de cellules musculaires lisses, sont principalement constitués d'A β 42 comme les plaques séniles de la MA. L'AAC de type 1 est d'ailleurs statistiquement associée à la MA et au génotype *APOE* ϵ 4 (OR=13.4 (IC 95% 3.3-54.4) ainsi qu'à un phénotype d'AAC sans hématome symptomatique (124)

Deux hypothèses s'opposent pour expliquer les dépôts amyloïdes vasculaires et pourraient correspondre à la description histopathologiques de deux types d'AAC différents : l'hypothèse amyloïde et l'hypothèse vasculaire.

1) L'hypothèse amyloïde où l'origine neuronale des peptides amyloïdes dans l'AAC est privilégiée. Les dépôts vasculaires capillaires résulteraient ainsi du drainage anormal des dépôts parenchymateux d'A β à proximité. En quelque sorte, l'AAC serait une résultante directe de la MA. Ceci semble cohérent avec la corrélation de l'AAC de type 1 à la présence de plaques séniles, ainsi qu'à leur sévérité. Dans certains modèles animaux, il a été montré que la pathologie AAC se développait secondairement à l'expression neuronale du peptide A β (222)(223).

2) L'hypothèse vasculaire où les dépôts vasculaires se formeraient de façon indépendante par rapport aux dépôts parenchymateux. En effet, puisque les cellules musculaires lisses, les péricytes et les cellules endothéliales expriment tous *APP* et les micro vaisseaux méningés étant capables de produire de l'A β , la vascularisation cérébrale elle-même a été proposée comme une source possible d'A β cérébral(224)(225).

6.6. DÉTERMINISME GÉNÉTIQUE DE L'AAC À A β

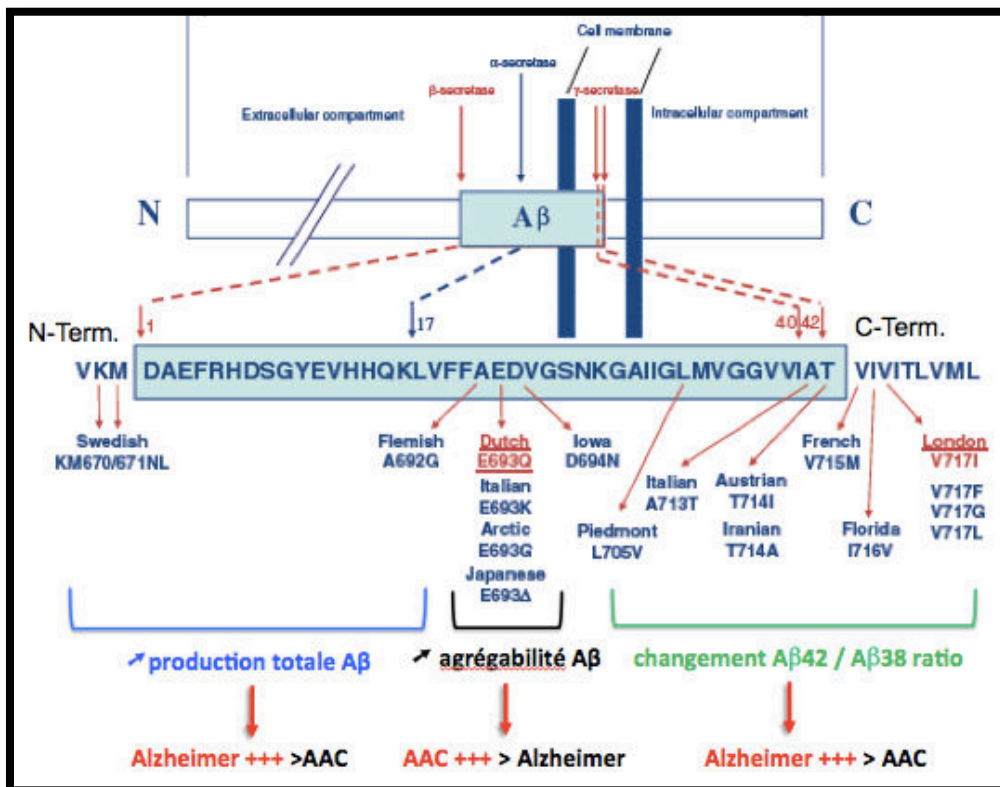
Le facteur de risque principal d'AAC reste de loin l'âge. Néanmoins, certaines familles avec transmission autosomique dominante et même l'existence d'agrégations intrafamiliales avec parfois des débuts précoces, avant 65 ans, suggèrent une composante génétique dans l'étiopathogénie de l'AAC, jusqu'à présent peu étudiée.

6.6.1. *APP*, le seul gène causal connu

Mutations ponctuelles

Les variants responsables d'AAC au premier plan sont tous situés au niveau des exons 16 et 17 du gène *APP*, dans la région codante pour le peptide A β . Les mutations, localisées à proximité des sites de clivage de la β -secrétase ou de la γ -secrétase avec des changements d'acides aminés flanquant la séquence A β , entraînent des tableaux de MA précoce, et celles situées plus proche de la région C terminale donnent lieu à des tableaux de MA précoce avec AAC (Figure 15). A l'heure actuelle, six mutations ont été clairement établies comme pathogènes dans l'AAC (Table 3) mais d'autres (au moins 2) ont été rapportées, sans que leur pathogénicité n'ait été prouvée à ce jour(226)(227).

Figure 15– Représentation du gène *APP* et mutations connues– Adaptée de Biffi (228)



Nous pouvons détailler les six mutations responsables de forme d'AAC autosomique dominante. Un récapitulatif des manifestations cliniques et âge de début est présenté dans le tableau 3.

- La mutation Hollandaise c.2077G>C (p.Glu693Gln) ou HCHWA-D (hémorragie cérébrale héréditaire avec amyloïdose de type hollandais) est considérée à ce jour comme un modèle d'AAC vasculaire pur et a été la plus étudiée. Ce sont justement les

diverses études approfondies des IRM de ces patients qui ont fait évoluer les critères diagnostiques de Boston en intégrant par exemple l'hémosidérose corticale superficielle en 2010 (126) et les espaces périvasculaires dilatés en 2022 (161). Une étude sur l'imagerie amyloïde PET Pittsburgh B (PiB) (229) décrit une accumulation amyloïde importante dans les régions postérieures, qui augmente au cours du suivi et semble corrélée au taux d'A β 40 dans le LCS de ces patients. Les premières descriptions cliniques datent de 1964 chez deux familles originaires des Pays-Bas (230)(231), présentant des hémorragies lobaires récidivantes. Un déclin cognitif peut parfois survenir secondairement avec crises d'épilepsie. La migraine avec aura a récemment été décrite comme plus fréquente chez ces patients (232). Des cas de démence sans hématome ont déjà été décrits (233). Cependant, bien que l'on trouve des plaques d'A β diffuses associées à l'AAC, les études histologiques ne retrouvent pas de plaques amyloïdes classiques à noyau dense ou de DNF associées (234).

- La mutation Flamande c.2075C>G (p.Ala692Gly) a été identifiée plus tardivement dans de rares familles flamandes présentant des troubles cognitifs sévères principalement mais aussi des hématomes lobaires pour moins d'un quart des patients porteurs (235)(236)(237). Cette mutation a également été décrite chez un homme français (238). Les IRM dont nous disposons montrent des lésions hémorragiques typiques d'AAC (micro-saignements et hémosidérose) avec leucopathie et atrophie cérébrale(238). Sur le plan histologique, on retrouve une AAC sévère associée à des plaques composées d'A β 40 dites à " noyau dense ", centrées autour des vaisseaux atteints et des dépôts diffus parenchymateux avec DNF (239).

- La mutation Italienne c.2077G>A (p.Glu693Lys). Le phénotype clinique décrit au sein de 4 familles italiennes n'est pas spécifique avec des troubles cognitifs, des crises d'épilepsie et hématomes lobaires (240). Une particularité sur l'IRM de ces patients est la présence de calcifications corticales occipitales, qui correspondent sur le plan histologique à des dépôts très sévères d'AAC. En revanche, sur le plan histologique, il n'y a pas de plaques ou de DNF associés aux dépôts vasculaires.

- La mutation arctique c.2078A>G (p.Glu693Gly) est décrite dans une seule famille originaire du nord de la Suède (d'où le terme "arctique", qui permet de la différencier de la Suédoise responsable de tableaux de MA)(241). Il s'agit principalement de tableaux de

MA précoce (242)(243). Sur le plan histologique, on retrouve toujours une AAC sévère mais cette fois associée à des plaques parenchymateuses et DNF(244).

- La mutation Iowa c.2080G>A (p.Asp694Asn) a en réalité été décrite chez des familles d'origine européenne avec des présentations hémorragiques et cognitives (245). Nous notons également des manifestations extra-cérébrales avec dysplasie de l'artère carotide externe (246). Comme chez les patients porteurs de mutation Italienne, des calcifications corticales occipitales ont été décrites et sur le plan anatomopathologique, on retrouve l'association d'AAC et de DNF et plaques amyloïdes diffuses comme pour la mutation Arctique (62).

- Enfin, la mutation Piedmont c.2113C>G (p.Leu705Val) semble être responsable de tableaux d'hématomes lobaires récurrents au 1^{er} plan(247). Les analyses histologiques montrent une AAC sans plaques parenchymateuses ni DNF. Cette mutation est associée à une AAC leptoméningée proéminente avec une épargne relative des vaisseaux corticaux

Table 3– Six mutations faux-sens au sein du gène *APP* impliquées dans l'AAC

Nom	Mutation	Age de début	Hématome lobaire	Démence	Présence de plaques séniles et DNF associées	Particularités
Hollandaise	c.2077 G>C (p.Glu693Gln)	39-76	+	+	-	Dépôts de calcium et de fer au sein des artères corticales au niveau occipital sous forme de « stries » à l'IRM (248) ou calcifications (249)
Flamande	c.2075C>G (p.Ala692Gly)	35-61	+	+	+	
Iowa	c.2080G>A (p.Asp694Asn)	38-77	+	+	+	Calcifications corticales(238)
Italienne	c.2077G>A (p.Glu693Lys)	44-63	+	+	-	Calcifications corticales(238)
Piedmont	c.2113C>G (p.Leu705Val)	45-72	+	-	-	
Arctique	c.2078A>G	52-62	-	+	+	Absence de

	(p.Glu693Gly)					lésions hémorragiques sur IRM(244)
--	---------------	--	--	--	--	--

Enfin, une étude de l'équipe de génétique de Rouen a identifié en 2016 trois variants en région non codante 3'UTR d'*APP* chez des patients AAC probable mais il n'a été retenu la probable pathogénicité que pour un seul de ces variants (c.*331_*332del)(250). Cette délétion était absente chez 175 contrôles et a été associée à une augmentation de l'expression d'*APP* in vivo et in vitro. Le mécanisme d'action est probablement ici une altération de la structure de l'ARN messager d'*APP* et la liaison de deux microARN.

Duplications

Des anomalies du nombre de copies par duplication du gène *APP* ont été identifiées pour la première fois par l'équipe de génétique de Rouen en 2006 chez cinq familles présentant une MA de début précoce avec AAC. Conduisant à une augmentation de l'expression d'*APP*, une duplication du gène *APP* est suffisante pour causer une MA associée ou non à une AAC (251). Ces duplications comportent en effet au minimum la totalité du gène *APP* (252) mais peuvent emporter certains gènes avoisinants. Un cas français de duplication *de novo* a été rapporté par ailleurs (253).

Depuis leur première description, une importante hétérogénéité phénotypique inter mais également intrafamiliale a été décrite (254). Le tableau clinique est principalement une démence précoce de type MA (entre 39 et 62 ans) et une hémorragie spontanée lobaire symptomatique survient dans environ 30% des cas (Table 4). Les crises d'épilepsie précoces semblent être un signe évocateur de duplication du gène *APP* comparativement aux mutations ponctuelles d'*APP* ou aux cas de MA de survenue tardive (255). Sur le plan histologique, on retrouve des dépôts amyloïdes parenchymateux diffus avec DNF et AAC sévère mais aussi dans certains cas des corps de Lewy (256). Sur le plan de l'imagerie, peu de données IRM sont disponibles ; les patients peuvent présenter une atrophie cérébrale sans lésion hémorragique ou bien au contraire de nombreux micro-saignements. Un cas de forme inflammatoire d'AAC est décrit, confirmant que cette forme particulière concerne aussi les cas autosomiques dominants (257).

Les patients trisomiques 21, porteurs également d'une duplication du gène *APP* puisqu'il est situé sur le chromosome 21, développent fréquemment une MA précoce. En

revanche, ils ne présentent que rarement des hématomes lobaires (258). Une AAC modérée à sévère est pourtant souvent retrouvée à l'anatomopathologie avec des micro-saignements et leucopathie vasculaire évocateurs sur leur IRM (259)(260)(261). L'hypothèse de gènes protecteurs, situés ailleurs sur le chromosome 21 a été suggérée depuis longtemps pour expliquer cette absence d'hémorragie symptomatique chez les patients avec trisomie 21. Une étude anatomopathologique a cherché à comparer les patients porteurs de duplication *APP*, mutations ponctuelles d'*APP*, trisomie 21 et cas sporadiques de MA précoce et tardive. Les dépôts amyloïdes vasculaires étaient plus importants chez les patients porteurs de duplications avec en revanche moins de plaques parenchymateuses comparativement aux patients avec trisomie 21 (262).

Table 4– Revue des duplications du gène *APP* rapportées dans la littérature

Auteur	Nombre de familles	ID fam	Nombre d'apparentés porteurs	Taille de duplication (Mb)	APOE	Age de début	Déclin cognitif	Hématome syptomatique	Epilepsie
Rovelet-Lecrux et al, 2006 (202) Cabrejo et al, 2006 (254)	5	F028 (EXT_028)	2	0.58	E3E3 E3E4	42-60	Rapportée dans notre série Grangeon et al		
		F037 (ROU_037)	6	0.78	E3E3 E3E3 E3E3 E3E3 E3E3	48-59			
		F009 (EXT_478)	2	1.98	E3E4 E3E4	46-57			
		F019 (EXT_010)	2	3.96	NA E3E3	42-59			
		F229 (ALZ_229)	2	6.37	E3E3 E3E3	52-69			
Guyant-Marechal et al, 2008 (256)	1	F262 (BES_262)	3	0.55	E3E3 E3E3 E3E3	44-52			
Lanoiselée et al, 2017 (263) Rovelet-Lecrux et al, 2015 (264) Wallon et al, 2012 (265)	5	EXT1093	1	2.2	E3E3	53-65			
		EXT857	1	1.4	E3E4	50-62			
		EXT814	1	5.9	E3E3	50-54			
		EXT1252 EXT773	1 1	1.4 7.6	E3E3 E3E3	54-58 44			
Remes et al, 2004(253) Rovelet-Lecrux et al, 2007 (266)	1		10	0.55	E3E3	50	Oui	Non	Oui
					E3E3	40	Oui	Non	Non
					E3E3	56	Oui	Non	Non
					E3E3	45	Oui	Oui	Non
					E3E3	54	Oui	Oui	Non
					E3E3	50	Oui	Oui	Oui
					E3E3	53	Oui	Non	Non
					E3E3	53	Oui	Oui	Non
					E3E3	46	Oui	Non	Non
					E3E3	40	Oui	Oui	Non
Slegers et al,	2	FAM1104	4	0.7	E3E3	53	Oui	Non	Oui

2006 (252)					E3E3	62	Oui	Non	NA
					E3E3	47	Oui	Non mais AAC sur autopsie	Oui
					NA	58	NA	NA	NA
		FAM1043	1	0.7	E3E4	55	Oui	Non	Oui
Kasuga et al, 2009 (267)	2	PED3281	1	4.2	E3E3	52	Oui	Non mais microsaignements sur IRM	NA
		PED2945	1	0.7	E3E4	53	Oui	Non / IRM normale	NA
Llado et al, 2014 (268)	1		1	14.5	E3E3	54	Non	Oui	Non
McNaughton et al, 2012 (269)	5		1	6.35	E3E4	48	Oui	Oui	Oui
			1	6.49	E3E4	40	Oui	Non	Oui
			1	15.5 +1.55 (discontinuos)	E3E3	39	Oui	Non	Oui
			1	4.96	E3E4	NA	NA	NA	NA
			1	2.77	E3E3	48	Oui	Non	Oui
Thonberg et al, 2011(270)	1	D08	1	1.09	NA	60	Oui	NA	NA
Antonell et al, 2012 (271)	1		1	0.59	E3E3	57	Oui	Non mais AAC sur autopsie	Non
Total/25 (notre série exclue)						39-62	22 (88%)	7 (28%)	9 (36%)

6.6.2. Mutations PSEN1 et PSEN2

La préséniline-1, codée par le gène *PSEN1* et la préséniline-2, codée par le gène *PSEN2* font partie du complexe enzymatique gamma-sécrétase. Les mutations au sein de ces 2 gènes sont impliquées dans la MA, les mutations *PSEN1* étant la première cause de MA familiale autosomique dominante selon <https://www.alzforum.org/mutations> (263) (272). Les tableaux cliniques chez les patients porteurs de mutations *PSEN1* peuvent associer un syndrome amnésique typique de MA mais également des signes extrapyramidaux, cérébelleux et une spasticité des membres inférieurs. La présence d'AAC sévère à l'examen neuropathologique associée aux dépôts parenchymateux et DNF a été décrite dans un certain nombre de mutations *PSEN1*, principalement situées au-delà du codon 200 (273)(274). Ce n'est que rarement que des cas d'hématomes symptomatiques ont été rapportés liés à des mutations *PSEN1* (2 familles porteuses des mutations c.49976C>T (p.Pro264Leu) et c.857T>C (p.Leu286Pro)) (275)(276) et plus récemment un variant hétérozygote composite (277).

En ce qui concerne *PSEN2*, des cas d'hématomes ont été rapportés chez 2 patients porteurs du variant c.422A>T (p.Asn141Ile) (278)(279). Cette mutation, identifiée

initialement dans des familles d'origine allemande de la Volga, représente la majorité des cas de mutation *PSEN2* dans la MA (280).

6.6.3. APOE, le seul gène de susceptibilité identifié

Le génotype de l'apolipoprotéine E (*APOE*) est le principal facteur de risque génétique d'AAC sporadique identifié(186). Trois allèles différentes (les allèles $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ et $\epsilon 4$) codent respectivement 3 formes différentes de protéines ApoE : ApoE2, ApoE3 et ApoE4. On parle ainsi de polymorphisme de l'ApoE. En population générale caucasienne, la fréquence des différents allèles est très variable : 74% porteur de $\epsilon 3$, 21-24% porteur de $\epsilon 4$ et 5% porteur de $\epsilon 2$ (281)(282)(283). L'*APOE* $\epsilon 4$ est un facteur de risque reconnu de MA et l'*APOE* $\epsilon 2$ est plutôt protecteur (284). Pour l'AAC, une méta-analyse en 2013 incluant 3 520 participants a montré une association avec l'*APOE* $\epsilon 4$ (OR=2,7, IC95% [2,3 à 3,1] $p < 0,00001$), qui était plus forte en cas d'homozygotie, et ceci indépendamment de l'âge. Il n'y avait en revanche pas d'association significative entre l'*APOE* $\epsilon 2$ et la survenue d'AAC (59). A notre connaissance, aucune donnée n'est disponible concernant l'homozygotie *APOE* $\epsilon 2/2$ dans l'AAC, compte tenu de sa rareté. Néanmoins, les deux allèles $\epsilon 2$ et $\epsilon 4$ sont associées au risque d'hématome lobaire(285)(286)(287), à son expansion (288)(289) et à la survenue d'hémorragie sous-arachnoïdienne et d'hémosidérose dans l'AAC(139)(290). L'*APOE* $\epsilon 4$ favoriserait ainsi les dépôts vasculaires A β alors que l'*APOE* $\epsilon 2$ favoriserait, elle, l'hémorragie à partir de vaisseaux sanguins déjà chargés d' A β en majorant la vasculopathie et en les fragilisant (291). L'implication de la protéine ApoE dans la pathogénèse de l'AAC est imparfaitement comprise. Avant tout, l'ApoE est un des composants principaux des plaques séniles et des dépôts vasculaires retrouvés dans l'AAC, et donc de même localisation que le peptide A β (292). Des études *in vitro* ont également montré que l'ApoE influençait la conformation d'A β , la formation de fibrilles et leur toxicité (71) (72) et des études *in vivo* chez la souris ont montré également un rôle dans sa clairance (68). En effet, l'implication d'ApoE dans la pathogénèse de l'AAC pourrait aussi être liée au fait que la liaison A β à l'apoE module la clairance du peptide à travers la barrière hémato encéphalique (BHE) (293), qui serait spécifique de l'isoforme de l'apoE. En effet, cette protéine exprimée dans le cerveau par les astrocytes et dans une moindre mesure la microglie, est un transporteur lipidique capable de se lier à l'A β . Le complexe A β -ApoE ainsi formé va ensuite traverser la BHE via le récepteur LRP1(292). Cependant, l'*APOE* $E4$ a tendance à

changer cette voie de clairance via LRP1 vers la voie moins efficace du récepteur de la lipoprotéine de très basse densité (VLDL), tandis que l'apolipoprotéine E2 et E3 médient une clairance plus rapide via LRP1 et VLDL. Dans tous les cas, l'action de l'ApoE dépend de son état de lipidation, et donc du taux de cholestérol : Une ApoE riche en lipide favorise la clairance et la dégradation de l'A β (294).

Enfin, le génotype *APOE* semble influencer la localisation vasculaire des dépôts d'A β : l'*APOE* ϵ 4 est associée à l'AAC capillaire de type I, tandis que l'*APOE* ϵ 2 est associée à l'AAC de type II(221)(220)

6.7. AUTRES FORMES D'AAC

D'autres formes d'AAC sont exceptionnelles, liées à des dépôts vasculaires amyloïdes de protéines diverses non- A β . Six protéines amyloïdes peuvent toucher le système nerveux central (SNC), certaines de façon isolée et d'autres avec atteinte extra-neurologique, rentrant dans le cadre ainsi d'une maladie systémique. Il s'agit pour toutes de formes familiales, de transmission autosomique dominante. Ces 6 formes sont présentées dans le tableau ci-dessous (Table 5) (Figure 16).

6.7.1. Amyloïdose oculoleptoméningée familiale ou amylose à transthyréline :

La transthyréline (TTR) est une protéine, transporteur de rétinol/thyroxine T4 dans le sang et le LCS ; synthétisée par le foie, les plexus choroïdes et l'épithélium pigmentaire rétinien (295)(296).

Il s'agit de l'amylose familiale la plus fréquente et de nombreuses mutations du gène *TTR* codant pour cette protéine sont responsables de phénotypes très hétérogènes. Il n'y a pas de corrélation génotype-phénotype mais on distingue globalement 3 grands phénotypes: une polyneuropathie amyloïde familiale, une cardiomyopathie amyloïde familiale et une atteinte méningée ou oculoleptoméningée familiale (297)(296).

Les dépôts amyloïdes peuvent en effet être retrouvés au niveau du SNC mais aussi au niveau systémique, responsable alors de neuropathies axonales, de dysautonomie, canal carpien, atteinte cardiaque ou rénale.

Dans la forme oculoleptoméningée, les dépôts prédominent au niveau du vitré et de la rétine et au niveau des vaisseaux des leptoméninges et plexus choroïdes et les parois ventriculaires. Les vaisseaux du parenchyme cérébral sont habituellement épargnés. (298)(299)(300). Les phénotypes peuvent parfois être associés : Des dépôts méningés

peuvent être retrouvés chez des patients souffrant de polyneuropathie amyloïde familiale (301)(302). Les manifestations principales de la forme leptoméningée surviennent à partir de 40 ans et sont des hémorragies sous-arachnoïdiennes, qui peuvent être récurrentes (296)(303)(304)(305); et/ou des épisodes neurologiques focaux transitoires et/ou des troubles cognitifs progressifs, plus rare (306);

L'IRM cérébrale peut montrer une sidérose superficielle (supra et infratentorielle, cette dernière étant la plus importante) et des micro-saignements cérébraux (304)(307) en plus d'un rehaussement méningé diffus (296)(308) mais aussi des calcifications le long des scissures sylviennes. Une atrophie cérébrale est souvent retrouvée mais peu de leucopathie.

6.7.2. Amyloïdose à cystatine C (ou forme Islandaise) ou HCHWA-I (hémorragie cérébrale héréditaire avec amyloïdose de type islandais):

Cette maladie est décrite chez plusieurs familles islandaises, la première en 1935. Il s'agit de tableaux sévères débutant vers l'âge de 20 ans d'hématomes récidivants, lobaires ou profonds, avec une évolution rapidement fatale. (309)(310)(311)(312). L'espérance de vie moyenne est d'environ 30 ans(313). La cystatine C est un inhibiteur des cystéines protéinases extracellulaires et de répartition ubiquitaire. Seule la mutation Leu68Gln est décrite. Les dépôts de cystatine sont diffus et prédominant dans la paroi des petites artères et artérioles cérébrales, superficielles et profondes et leptoméningés. On trouve également des dépôts cutanés, dans les ganglions lymphatiques, la rate, les glandes salivaires et les testicules ; asymptomatiques(314). L'IRM retrouve une atteinte de la substance blanche mais la présence de lésions hémorragiques type microbleeds ou hémosidérose n'est pas établie à ce jour(315).

6.7.3. Amyloïdose à Gelsoline (ou forme Finlandaise) :

Deux mutations du gène GSN, au même locus, NM_198252.3(GSN) : c.487G>A (p.Asp163Tyr) et NM_198252.3(GSN) : c.487G>T (p.Asp163Tyr) ont été rapportées. La première en 1969 en Finlande (316) (317)(318).

La protéine gelsoline se lie à l'actine et participe au remodelage du cytosquelette. D'un point de vue histologique, on observe des dépôts dans de nombreux organes, particulièrement sur les membranes basales des cellules épithéliales, musculaires lisses

et striées (319). Dans le système nerveux central, les dépôts sont principalement vasculaires et concernent la matière grise et blanche, la moelle épinière et les méninges(320).

L'âge de début est un peu plus tardif que l'amyloïdose à cystatine, entre 40 et 50 ans et l'espérance de vie n'est pas diminuée(321). Les principaux symptômes sont oculaires (dystrophie grillagée cornéenne au 1^{er} plan, cataracte et glaucome) et cutanés (aspect de cutis laxa ou perte de l'élasticité de la peau). En cas d'atteinte du système nerveux, les symptômes peuvent associer paralysie des nerfs crâniens (paralysies faciales, syndrome bulbaire), neuropathie périphérique ou atteinte des cordons postérieurs de la moelle et enfin troubles cognitifs (rarement démence)(321). Il n'y a pas d'hémorragie cérébrale symptomatique rapportée. L'IRM cérébrale peut révéler une leuco encéphalopathie prédominant au niveau de la substance blanche profonde et une atrophie cérébrale diffuse (322) avec un petit nombre de microhémorragies(323).

6.7.4. ITM2B : Démence familiale britannique et danoise

Deux mutations du gène de la protéine de membrane intégrale 2B, *ITM2B* (anciennement appelée *BRI2*) sont responsables d'une démence dégénérative associée à une AAC : c.799T>A (p.Ter267Arg) et c.787_796dup (p.Ser266fs). Ces mutations sont responsables de la synthèse de la protéine Abri, décrite dans la démence familiale britannique et ADan, décrite dans la démence familiale danoise. Ces protéines sont plus longues que la protéine sauvage, interagissent avec APP et conduisent à la production de fibrille amyloïde pathogène (324).

Au sein des familles anglaises, il s'agit de tableau de démence, ataxie cérébelleuse et tétraparésie spastique; des manifestations de type « Stroke-like », se rapprochant possiblement de TFNE ont été également rapportées dans près de 25% des patients(325). Rarement, des hématomes symptomatiques, notamment profonds, ont été décrits. L'âge de début se situe entre 20 et 40 ans. Les IRM décrivent une atteinte de substance blanche mais aussi des lacunes et micro-saignements (326)

Au sein des familles danoises, la survenue d'hématome symptomatique n'a pas été clairement identifiée à ce jour et il s'agit de tableau de psychose et démence principalement(327). L'IRM cérébrale ne montre pas a priori de lésions hémorragiques(62). Histologiquement, dans les 2 pathologies, il existe des dépôts amyloïdes diffus vasculaires corticaux, cérébelleux, leptoméningés, dans les noyaux gris

et médullaires et des dépôts parenchymateux diffus non fibrillaires(324)(325). Des dépôts systémiques existent chez les cas britanniques (328). Enfin, des dépôts d'A β associés aux dépôts d'ADan ont été décrits chez les cas danois (329)

6.7.5. AAC liée à la protéine prion :

L'association d'une AAC à une maladie à prions a été exceptionnellement rapportée(330), principalement dans les formes héritées de mutations non-sens du gène PRNP, entraînant des formes tronquées de la protéine PrP (331)(332). Les dépôts vasculaires sont alors constitués d' A β , mais par contre situés dans les petits et moyens vaisseaux de la substance grise cérébrale et cérébelleuse, parfois seulement dans les leptoméninges(333). Sur le plan histologique, on retrouve l'AAC associée à des DNF et dégénérescence spongiforme et gliose, typique des maladies à prions. Il ne semble pas y avoir d'hémorragie symptomatique mais surtout des tableaux de démence progressive et troubles du comportement, souvent confondus avec les symptômes de la maladie à prion en elle-même.

Table 5 – Récapitulatif des formes familiales d'AAC hors Aβ* Données issues du centre de référence CERVCO (<http://www.cervco.fr>)

Nom	Gène	Nature du peptide amyloïde	Histologie/ Mécanismes	Tableau clinique d'AAC	Hémorragie cérébrale	Atteinte neurologique autre	Atteinte extra-neurologique	Nombre de famille décrites*
Amyloïdose Gelsoline (forme Finlandaise)	GSN	Gelsoline	- Liaison active du cytosquelette - Dépôts sur membranes basales des cellules épithéliales, musculaires lisses et striées - Dépôts vasculaires profonds/corticaux/paires crâniennes/moelle	Rarement au premier plan, troubles cognitifs rares	Absence	Neuropathie périphérique, atteinte des paires crâniennes, syndrome bulbaire, myélopathie, dysautonomie	Oculaire (dystrophie grillagée de la cornée, cataracte et glaucome) et cutané (perte de l'élasticité de la peau). Atteinte cardiaque et rénale possible	600 patients mutés mais seulement 10 familles avec AAC symptomatique
AAC liée à la protéine prion	PRNP	Aβ	Dépôts vasculaires Aβ associés à DNF et dégénérescence spongiforme et gliose, typique des maladies à prions	Démence progressive, troubles du comportement difficile à distinguer des manifestations au prion	Absence	Dysautonomie Neuropathie périphérique	Diarrhée chronique	Principalement les formes héritées de mutations non-sens
AAC à Cystatine C (forme Islandaise)	GST3	Cystatine C	-Inhibiteur de la cystéine extracellulaire - Dépôts vasculaires profonds+ corticaux - Absence de plaques séniles ou DNF - Dépôts diffus rate, glandes salivaires, peau mais asymptomatiques	Tableau sévère d'hématomes lobaires profonds récidivants, déclin cognitif	+++	Non	Non	9 familles en Islande (>200 patients)
Amyloïdose oculoleptoméningée familiale	TTR	Transthyrétine	-Transport protéique hépatique, plexus choroïdes, rétine -Dépôts prédominant sur vitré et méninges	Le + souvent, atteinte vasculaire silencieuse, HSA répétée ++ Hématome et déclin cognitif rares	Rare Hémosidrose disséminée avec prise de contraste méningée	Neuropathie amyloïde, canal carpien	Troubles visuels, cardiomyopathie	12 familles dans le monde
AAC familiale de type Britannique	Bri2 (ou ITM2B)	Protéine ABRI	- Dépôts vasculaires profonds+ corticaux/moelle/rétine	Démence au 1 ^{er} plan, TFNE, rares hématomes	Rares hématomes profonds	Sd cérébelleux, tétraparésie spastique Anévrismes	Absence	4 familles
AAC familiale de type Danoise	Bri2 (ou ITM2B)	Protéine ADAN	- Absence de plaques séniles ou DNF mais dépôts parenchymateux non fibrillaires	Démence au 1 ^{er} plan	Absence	Ataxie, psychose	Cataracte à 30 ans puis surdité	

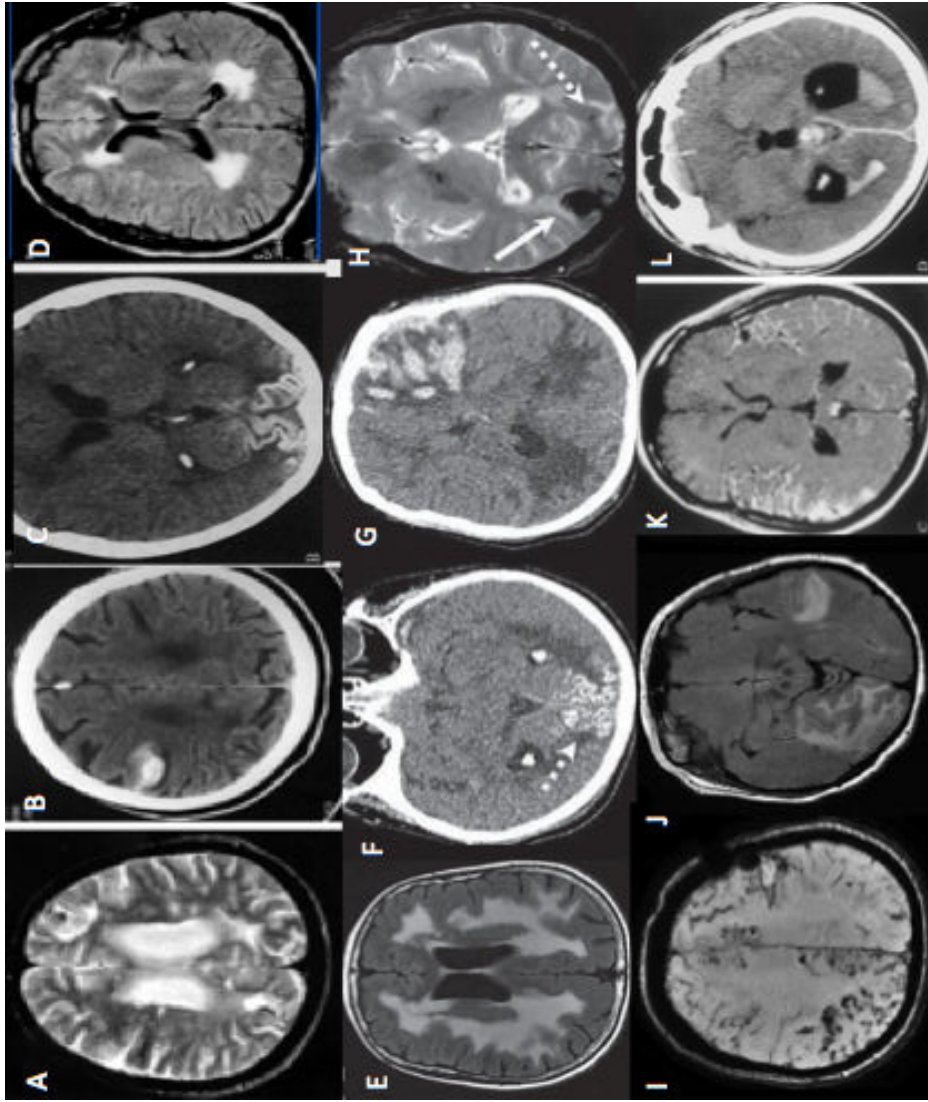


Figure 16- Images représentatives de formes monogéniques d'AAC - Extrait de Ellie et al(332), Sellal et al (236), Roks et al(235) et Iglesias et al (244).

De haut en bas et de gauche à droite : (A,B) Mutation APP Flamande montrant hématome lobaire frontal gauche, (C) Mutation APP Iowa montrant des calcifications occipitales, (D) mutation PSEN1 retrouvant leucoencéphalopathie périventriculaire à prédominance postérieure, (E,F,G) Mutation APP Iowa montrant des calcifications occipitales et leucoencéphalopathie, (H) Mutation APP Italienne, (I,J) Duplications du gène APP retrouvant multiples microsaignements et forme inflammatoire, (K,L) Mutation TTR avec prise de contraste leptoméningé diffus et hémorragie intraventriculaire

6.8. GRAND NOMBRE D'AAC PRÉCOCE SANS DIAGNOSTIC GÉNÉTIQUE

A l'heure actuelle, la composante génétique de l'AAC reste peu étudiée. Malgré une limite d'âge minimum établi dans les critères révisés de Boston, des formes plus précoces d'AAC peuvent survenir, comme certaines formes héritées détaillées ci-dessus. La prévalence d'AAC précoce n'est pas connue mais ne semble pas exceptionnelle. En effet, à titre d'exemple, dans le cadre de nos travaux de recherche et de notre recrutement national d'AAC au laboratoire de génétique de Rouen, nous avons inclus seize cas rouennais en 2021 avec un âge de début avant 66ans, avec ou sans histoire familiale évocatrice d'AAC ou de MA. Sur le recrutement des 10 dernières années, seul 5% des cas avaient une anomalie concernant *APP* (mutation ou duplication).

Par comparaison, parmi les patients atteints de MA, avec ou sans AAC associée, environ 4 % présentent les premiers symptômes avant l'âge de 65 ans, ce qui définit la maladie d'Alzheimer à début précoce (334)(335). Dans cette population, une cause monogénique est identifiée dans ~2% à 77% des cas, selon l'âge de survenue et les antécédents familiaux (263)(336)(337).

Une des hypothèses pour expliquer ce nombre important de cas sans diagnostic génétique serait que certaines AAC précoces soient finalement acquises. L'identification récente de causes iatrogéniques conforte cette hypothèse. Alors qu'il a été démontré expérimentalement que de nombreuses protéines associées à la neurodégénérescence avaient des propriétés "prion-like", il n'y avait pas de preuve claire de leur transmission iatrogène jusqu'à récemment. Cependant, un premier cas en 2015 d'AAC iatrogène par un processus de type prion a été décrit après traitement par hormone de croissance hypophysaire dérivée de cadavres humains dont il a été prouvé par la suite une contamination par de l'A β (338). Depuis, plusieurs cas ont été rapportés de transmission humaine de pathologie A β , notamment après geste neurochirurgical avec greffe de dure-mère cadavérique. Les analyses anatomopathologiques de ces cas retrouvent en effet des dépôts d' A β sur les greffons avec diffusion secondaire au parenchyme et vaisseaux cérébraux (339)(340)(341). Le délai entre la survenue d'hématomes et le geste chirurgical est de plusieurs décennies. Ces patients présentent les mêmes caractéristiques IRM ou du LCS que les formes non iatrogènes d'AAC.

Les techniques chirurgicales impliquées sont désormais obsolètes mais la connaissance de ce mode de transmission est primordiale pour le clinicien, bien que représentant fort heureusement un faible nombre de cas.

Une autre hypothèse à ce nombre de cas d'AAC précoce sans cause identifiée reste la composante génétique, soit respectant un mode de transmission Mendélien avec des gènes causaux non connus à ce jour, soit liée à des facteurs de susceptibilité génétiques, fréquents ou rares, comme l'APOE. La combinaison de certains de ces facteurs et/ou l'impact de l'âge pourrait intervenir sur l'expression phénotypique de la maladie.

Certaines approches génétiques, comme les GWAS (*genome-wide association study*) ont déjà cherché à identifier des variants fréquents (fréquence allélique >5%), c'est-à-dire des polymorphismes nucléotidiques. Certaines se sont focalisées sur l'AAC avec quelques centaines de participants et ont mis en évidence la possible association de gènes comme TGF (facteur de croissance transformant β 1 jouant sur l'activation des astrocytes et de la microglie), TOMM40 (translocase de la membrane mitochondriale extérieure 40) et CR1 (récepteur 1 du complément) ou encore LRP1 (337) (Table 6). Une autre étude GWAS, publiée en 2018 s'est focalisée chez les patients présentant des microsaignements, toutes causes confondues(342).

Table 6 – Revue des résultats de GWAS dans l'AAC – Extrait de Rannkimae et al (337)

Table 2 Summary of studies of non-apolipoprotein E polymorphisms and cerebral amyloid angiopathy				
Gene	Location/polymorphism	No of studies	No of participants	Summary of results
TGF- β 1(transforming growth factor β 1) ^{s13,s24}	rs1800470	2	449	Consistent trend for positive association between T allele and CAA
TOMM40 (translocase of outer mitochondrial membrane 40) ^{s132}	rs2075650, rs34404554, rs11556505, rs769449, rs12972156, rs12972970, rs157582, rs184017, rs157581, rs283815, rs157580, rs439401, rs34095326, rs10119	1	723	SNPs associated with vascular amyloid burden
CR1 (complement component receptor 1) gene ^{s133}	rs6656401	1	544	Associated with severity of CAA pathology
LRP1 (low density lipoprotein receptor 1) ^{s38,s41,s100}	rs1799986	3	597	No overall significant associations (inconsistent trends and in some cases associations in subgroups)
ACT (α 1 antichymotrypsin) ^{s7,s81}	Signal region of the gene \rightarrow A/T alleles that determine the amino acid alanine or threonine*	2	235	
CYP46 ^{s41,s129}	rs754203	2	524	
ACE (angiotensin 1 converting enzyme) ^{s35,s129}	Intron 16 insertion/deletion of a 287 bp sequence	2	239	
Other genes				
PS1 (presenilin-1) ^{s4} ;BCH E (butyrylcholinesterase) ^{s6} ;DXS1047 locus ^{s130} ;APOE promoter ^{s80,s129} ;A2M (α 2 macroglobulin) ^{s5} ;PON1 (paraoxonase) ^{s11} ;NEP (neprilysin) ^{s12} ;OLR1 (oxidised low-density lipoprotein receptor 1) ^{s38} ;LRP (low density lipoprotein receptor related protein) ^{s100} ;CYP46 ^{s41} ; CH25H ^{s41} ;VEGF (vascular endothelial growth factor) ^{s37} ;IL-1A ^{s131} ;IL-1B ^{s131} ;IL-33 ^{s39} ;GSTO1-1 (glutathione S-transferase omega-1) ^{s131} ;SORL1 (sortilin related receptor) ^{s46} ;CTSD (cathepsin D) ^{s97} ; A β PP and A β PPpromoter ^{s71}	18	50–380†		

*Probably rs4943.
†Range of participant numbers in individual studies.
APOE, apolipoprotein E; CAA, cerebral amyloid angiopathy; SNP, single nucleotide polymorphism.

Des gènes autres que l'*APOE* semblent ainsi susceptibles d'influencer l'AAC. Certains résultats préliminaires positifs méritent d'être reproduits dans des études plus larges mais surtout bien phénotypées. En effet, identifier des critères diagnostiques précis et enrichir les cohortes en cas familiaux permettraient de limiter les phénotopies, qui affaiblissent ces études. De plus, les associations génétiques peuvent également différer selon la localisation et le sous-type d'AAC, d'où l'intérêt encore une fois d'une population bien caractérisée. Pour ceci, des études phénotypiques rigoureuses au préalable mais également le développement de marqueurs biologiques ou radiologiques supplémentaires sont nécessaires pour renforcer la robustesse de futures études génétiques.

L'hypothèse d'une implication de facteurs de susceptibilité génétiques rares a été peu étudiée dans l'AAC, à notre connaissance. Compte tenu de la prévalence de la maladie, il nous semble important d'identifier de tels facteurs tout d'abord au sein d'une population d'AAC précoce (afin de limiter les facteurs liés au vieillissement qui impactent directement la vasculopathie) et bien définie (afin de limiter les phénotopies). Ces facteurs de susceptibilité génétiques pourraient à terme être extrapolés aux formes d'AAC sporadiques, tous âges de début confondus et permettraient une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques sous-jacents afin d'identifier de potentielles cibles thérapeutiques.

6.9. PRISE EN CHARGE ET CIBLES THÉRAPEUTIQUES POTENTIELLES

La prise en charge des patients atteints d'AAC repose sur des mesures thérapeutiques communes à plusieurs microangiopathies comme le contrôle des facteurs de risque vasculaires ou des approches plus prudentes pour le recours aux anti thrombotiques ou à la neurochirurgie. L'attente est importante en matière de traitements curatifs spécifiques.

6.9.1. Contrôle des facteurs de risque vasculaires

Plusieurs facteurs de risque comme l'HTA (343) ou le diabète (344) semblent favoriser l'AAC dans les études animales. Une hypoperfusion cérébrale chronique crée par sténose carotidienne bilatérale chez la souris aggrave également l'AAC (345).

Un contrôle strict des facteurs de risque pourrait ainsi prévenir la progression de cette maladie.

La gestion de l'HTA surtout semble essentielle pour réduire le risque d'hématome lobaire et des chiffres de pression artérielle moyennement élevés, avec une systolique entre 120 et 139 mmHg et une diastolique entre 80 et 89 mmHg ont été corrélée à une récurrence hémorragique dans l'AAC selon des études observationnelles (346)(347). Une analyse de sous-groupe de l'étude PROGRESS a montré que la diminution de la pression artérielle par le périndopril réduisait de 77 % le risque de récurrence d'hématome lobaire lié à l'AAC sur une période de suivi de 3,9 ans (347). Il n'y a à l'heure actuelle pas de consensus sur le seuil de pression artérielle recommandé spécifiquement dans l'AAC mais il semblerait qu'obtenir des chiffres encore plus bas que 140/90mmHg soit bénéfique(348). La labilité tensionnelle a également été associée à la progression de l'AAC(349).

L'association entre une glycémie à jeun élevée et le risque hémorragique a surtout été retrouvée dans le cadre d'hématome profond (350) (351).

La prise en charge de l'hypercholestérolémie fait débat dans l'AAC. En effet, des taux réduits de lipoprotéines de basse densité (LDL) (moins de 70-80 mg/dL) ont été associés à une récurrence d'hématome lobaire (352)(353)(354) et un risque significativement plus élevé de récurrence hémorragique a été observé dans l'étude SPARCL en 2006 en cas de traitement par statine à fortes doses. Il a même été recommandé d'éviter les statines chez les patients ayant déjà présenté un hématome cérébral, en particulier lobaire(355) (356) (357). Cependant, cette recommandation a vite été controversée car la majorité des études réalisées après l'essai SPARCL n'ont pas réussi à démontrer une association entre les statines avec le risque d'hématome intra-parenchymateux (358). Une méta-analyse de 31 essais contrôlés randomisés avec plus de 180 000 patients n'a pas montré d'effet des statines sur le risque d' hématome intra-parenchymateux (359). En outre, une autre méta-analyse de 11 études n'a pas non plus trouvé d'association entre la prise de statines et le risque d'AVC hémorragique chez les patients ayant déjà présenté un hématome lobaire (RR, 0.7; 95% CI, 0.2-3.4)(360). Enfin, une étude récente, publiée en 2015 par Chen et son équipe, étudiant l'impact de la prise précoce de statines après un AVC hémorragique ne retrouvait pas de risque accru de récurrence hémorragique (AHR 1.044; 95% IC 0.812-1.341) mais plutôt un effet bénéfique de la prise de statine sur la mortalité toute cause confondue (AHR ratio 0.742; 95% IC 0.598-0.919)(361). Les recommandations actuelles sont de poursuivre le

traitement par statines chez les patients atteints d'AAC qui ont une indication claire selon les directives de l'ACC/AHA.

Cependant, à notre connaissance, aucune étude n'a été menée spécifiquement dans l'AAC pour étudier l'impact des statines et ceci nous semble d'autant plus pertinent connaissant l'interaction entre les statines, l'hypocholestérolémie et le transporteur *APOE*, impliqué dans la clairance de l'A β . Nous avons donc mené une étude observationnelle rétrospective au CHU de Rouen sur l'impact de la prise de statines sur les lésions hémorragiques visualisées sur l'IRM lors du premier épisode d'hématome lobaire dans l'AAC. Ceci a été mené dans le cadre d'une thèse de médecine que j'ai encadrée en 2020 et fait l'objet d'un article soumis, présenté en annexe 1. Les patients traités antérieurement par statines ne présentaient pas d'hématome lobaire plus volumineux ou de micro-saignements plus nombreux sur leur imagerie cérébrale mais un signal semble apparaître quant à l'hémosidérose, plus disséminée en cas de traitement antérieur par statine. L'étude SATURN, un essai contrôlé randomisé, évaluera les avantages et les inconvénients potentiels de la poursuite ou de l'arrêt des statines chez les patients ayant survécu à un hématome lobaire.

6.9.2. Gestion des traitements antiagrégant et anticoagulant

Selon les recommandations actuelles, les traitements antiagrégants plaquettaires en prévention primaire doivent être évités chez les patients avec AAC, à moins que le patient n'ait une indication formelle pour leur utilisation d'antiplaquettaires (comme après des procédures coronariennes ou cardiaques par exemple)(362). En effet, l'usage d'antiagrégants a été associé à une majoration de microsaignements sur l'imagerie cérébrale d'une part mais aussi à la survenue d'hématome lobaire (363)(364)(365).

L'étude RESTART, essai prospectif randomisé, portant sur plus de 500 patients avec antécédent d'hématome lobaire alors qu'ils étaient sous traitement antiplaquettaire en prévention secondaire n'a pas mis en évidence de risque accru de récurrence d'hématome en cas de reprise du traitement, comparativement aux patients pour lesquels ce traitement antiagrégants a été définitivement arrêté (366).

L'anticoagulation (warfarine et les anticoagulants oraux) en revanche augmente significativement, de 2 à 5 fois le risque d'hématome et la mortalité liée à cet hématome (367)(368). La diminution des complications hémorragiques qu'on connaît des

anticoagulants oraux comparativement à la warfarine ne peut s'appliquer dans le cadre de l'AAC car ces patients ont été exclus de tous les essais comparant les deux types de traitements. L'anticoagulation est à l'heure actuelle contre-indiquée en cas de diagnostic d'AAC, qu'il s'agisse d'antécédent d'hématome lobaire ou même la survenue de TFNE avec présence d'hémosidérose sur l'imagerie (369)(370). Il n'y a pas eu à ce jour d'essais contrôlés randomisés sur l'utilisation d'anticoagulants chez les patients diagnostiqués AAC. Cependant, dans certains cas comme une embolie pulmonaire ou une valve cardiaque mécanique, les avantages potentiels de l'anticoagulation peuvent l'emporter sur les risques hémorragiques.

L'initiation ou la poursuite d'une anticoagulation chez les patients qui sont à la fois à haut risque ischémique et hémorragique doit toujours être basée sur le risque individuel du patient, l'indication de l'anticoagulation, les alternatives potentielles à l'anticoagulation et la durée requise de l'anticoagulation. Des outils de stratification du risque de récurrence hémorragique sont basés sur les marqueurs IRM (nombre de microsaignements et hémosidérose) et sur le génotype *APOE* (371).

La prise en charge de fibrillation atriale non valvulaire, fréquemment identifiée chez la personne âgée, fait débat en cas de diagnostic d'AAC. En effet, certaines études ont montré que la reprise des anticoagulants chez les patients avec fibrillation auriculaire après une hémorragie intra-parenchymateuse réduisait la mortalité globale (372)(373). Cependant, ces études rétrospectives incluaient des patients ayant à la fois des hématomes liés à une AAC et liés à d'autres causes sous-jacentes.

Des approches préventives alternatives comme une fermeture percutanée de l'auricule doivent être privilégiées afin d'éviter au long cours l'usage d'anticoagulant(370).

6.9.3. Gestion en urgence de l'hémorragie lobaire spontanée liée à une AAC

La décision de choisir entre des traitements conservateurs (anti-œdème et antihypertenseurs) par rapport à un traitement chirurgical est un sujet de débat en cas d'AAC. Des données rétrospectives ont montré une évolution défavorable suite à l'évacuation chirurgicale d'un hématome lié à une AAC en cas de démence associée, d'âge supérieur à 75 ans, de troubles de vigilance importants et d'extension intraventriculaire de l'hématome (374). Des essais cliniques prospectifs randomisés sont nécessaires pour identifier les traitements appropriés de l'hématome lié à l'AAC. De nouveaux critères diagnostiques, dits d'Edimbourg sont basés cette fois sur le TDM sans

injection en cas d'hématome lobaire et ont été développés en 2018 afin de pouvoir poser rapidement un diagnostic d'AAC dans un contexte d'urgence, ce qui permet d'adapter au plus vite la prise en charge, notamment chirurgicale(137). Cependant, ces critères ont aussi intégré le génotype *APOE*, ce qui semble peu pertinent dans un contexte d'urgence. Un de nos travaux a consisté à valider ces critères radiologiques en excluant le génotype *APOE*.

6.9.4. Développement des nouvelles thérapeutiques spécifiques

Il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement curatif dans l'AAC et à notre connaissance, aucun essai thérapeutique de phase 3 n'est en cours. Cependant, plusieurs candidats thérapeutiques ciblant la cascade d'événements pathogènes initiés par l'A β semblent pertinents d'après des études basées sur modèles animaux d'AAC. Ces approches s'articulent autour de stratégies de diminution de la charge amyloïde à différents stades de la pathogenèse de l'AAC, comme l'élimination des formes agrégées ou solubles de l'A β , la réduction de sa production et les stratégies visant à améliorer sa clairance par les voies de drainage périvasculaire. De plus, les progrès très récents dans la MA avec plusieurs essais de phase 3 pour des traitements basés sur anticorps anti-A β comme l'Aducanumab ou le Lecanemab pourraient être à l'avenir testés dans l'AAC.

- Cibler la dégradation du peptide A β : Seules de rares études in vitro concernant les enzymes dégradant l'A β sont disponibles. Une réduction des niveaux d'A β cérébraux par la néprilysine a été démontrée chez la souris (375) mais à ce jour aucune molécule augmentant l'activité de cette enzyme n'est disponible. La mémantine, antagoniste des récepteurs NMDA, semble candidate puisqu'elle diminue les dépôts d'hémosidérine dans le modèle de murin APP23(376). Le mécanisme d'action de la mémantine pourrait être une diminution d'expression cérébrovasculaire de l'IDE, qui contribue à la dégradation de l'A β (377).

- Cibler la clairance du peptide A β :

- Le récepteur LRP1 est très impliqué dans la clairance du peptide A β et il est fortement exprimé dans les parois vasculaires cérébrales. Le modèle murin *APP/PSEN1* avec knock-out conditionnel de LRP1 dans les cellules musculaires lisses vasculaires augment les dépôts A β vasculaires et le knock-out conditionnel de LRP1

au niveau neuronal entraîne une altération de la clairance interstitielle de l'A β (378)(379). Un traitement à base de régime alimentaire avec de l'oléocanthal, un composant de l'huile d'olive extra vierge, a démontré une expression accrue de LRP1 au niveau de la BHE, ce qui a conduit à une amélioration de la clairance A β chez les souris (380)(381).

- L'élimination par anticorps anti-A β est depuis longtemps au centre de l'attention dans le domaine de la MA. Une approche similaire a été envisagée pour les patients atteints d'AAC (186). Les leçons tirées des essais d'immunothérapie chez les patients MA ont toutefois des implications importantes pour l'application aux patients avec AAC. Les premières études dans la MA axées sur l'immunisation active (382) ont démontré une élimination efficace des plaques d'A β , en revanche près de 6% des patients ont présenté des encéphalites, proche des formes inflammatoires d'AAC. Les essais ont alors été interrompus (383). Il s'agissait principalement de patients porteurs du génotype *APOE ϵ 4/4* et pour qui de l'AAC était associée à la MA à l'examen neuropathologique (384) ou présentant de nombreux microsaignements sur leur imagerie cérébrale (385).

Depuis lors, l'attention s'est portée sur l'immunothérapie passive avec des anticorps anti- A β , mais donnant des résultats décevants. Deux exceptions récentes sont des essais de phase 3 sur l'Aducanumab (386) et sur le Lecanemab (387). Des ARIA ont également été observées suite à ces thérapeutiques, chez 47 % des patients recevant la dose la plus élevée (386).

Une hypothèse pour expliquer ces évènements serait que l'élimination de l'A β de vaisseaux avec dépôts sévères prédispose ces vaisseaux aux hémorragies et réactions inflammatoires oedémateuses. Par conséquent, l'immunothérapie pourrait ne pas être l'approche candidate la plus sûre dans l'AAC. Des résultats négatifs ont été observés dans un essai thérapeutique dans l'AAC (388). Aucune survenue d'épisode inflammatoire n'a été observé lors de cet essai mais en revanche, il a été démontré une diminution de la réactivité vasculaire des patients traités par rapport à ceux recevant le placebo. Il est possible également que l'aggravation de l'AAC était consécutive à une surcharge en A β dans les voies de drainage périvasculaires via l'efflux d'A β provoqué par l'immunothérapie.

- Ce drainage périvasculaire dépend de la pulsatilité artérielle, qui décline avec l'âge. Des traitements vasoactifs ont ainsi été suggérés (389)(390). Le cilostazol, un inhibiteur sélectif de la phosphodiesterase de type 3, réduisait les dépôts d'Aβ40 et a amélioré la déficience cognitive chez des modèles murins d'AAC. La distance parcourue par les Aβ fluorescents pendant une certaine période de temps était significativement plus grande dans le groupe traité par le cilostazol que dans les contrôles, ce qui indique que les médicaments vasoactifs pourraient favoriser l'élimination des Aβ (391).

Des antioxydants comme la taxifoline ont été suggérés pour bloquer la formation d'Aβ oligomères, maintenir l'intégrité vasculaire chez la souris(392). Le traitement par minocycline a réduit le nombre de microhémorragies dans le cerveau de souris transgéniques AAC (393).

- Cibler la production du peptide Aβ :

Une telle stratégie de prévention pourrait être efficace chez les porteurs de mutations pré-symptomatiques des formes héréditaires de l'AAC par exemple. Les inhibiteurs de l'enzyme de clivage de l'Aβ, BACE ont longtemps été la principale option, mais malheureusement, les essais récents chez les patients atteints de MA ont été interrompus en raison de l'aggravation des troubles cognitifs.

Des travaux sur la modulation de l'épissage d'*APP* sont actuellement en cours dans les formes héréditaires avec mutation *APP* Hollandaise pour développer des approches par oligonucléotides anti-sens contre la protéine précurseur APP, entraînant le saut de l'exon 17, générant ainsi une isoforme *APP* plus courte, dépourvue d'une partie du domaine Aβ(394). Il en résulte une réduction de l'Aβ40 dans des cellules souches pluripotentes (IPSC) induites dérivées de patients et différenciées sur le plan neuronal. In vivo, les souris de type sauvage traitées par ces oligonucléotides anti-sens ont aussi montré un saut d'exon sur l'étude des ARN(395).

- Moduler l'action de l'APOE en cas de génotype *APOEε4* :

Enfin, tout récemment, une étude chez la souris exprimant l'APOE E4 +/- humain (5XE4) a montré une efficacité de l'immunothérapie anti-APOE(396). Dans la MA, ce type de traitement a été jusque là peu exploré, avec des études de petit effectif. Cette étude dans l'AAC a évalué l'anticorps anti-APOE humain HAE-4, qui reconnaît

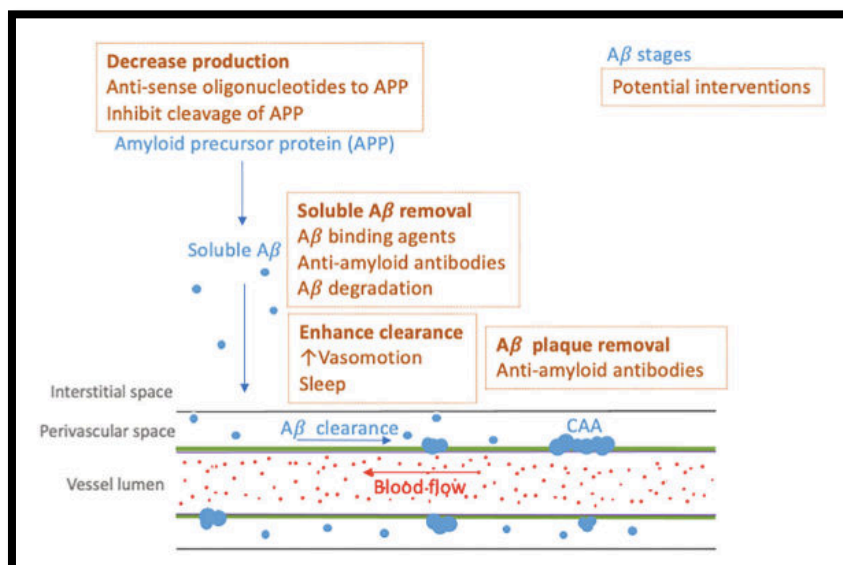
sélectivement l'APOE humain qui est co-déposé avec l'A β au niveau vasculaire et parenchymateux. L'anticorps HAE-4 a réduit les dépôts d'A β , vasculaires et parenchymateux, par rapport à un anticorps témoin, et l'anticorps anti-A β également testé dans cette étude n'a eu aucun effet sur les dépôts vasculaires et a majoré les microhémorragies. L'HAE-4 n'a pas stimulé les microhémorragies et a amélioré le fonctionnement cérébrovasculaire au niveau des artères leptoméningées in vivo. Il s'agit donc d'une étude très récente mais prometteuse.

On ne sait pas à l'heure actuelle si l'une de ces approches pourrait arrêter la progression de la maladie et surtout prévenir la survenue d'hématomes chez les patients AAC.

L'identification des altérations chronologiques biologiques tout au long de la progression de la maladie est cruciale pour comprendre la pathogenèse de l'AAC et, avec l'avènement des thérapies géniques, la compréhension des mécanismes génétiques sous-jacents est essentielle (Figure 17). Les essais récents sur l'immunothérapie anti-APOE ou les oligonucléotides anti-sens ciblant le gène *APP* en sont l'illustration.

Un diagnostic précoce et précis d'AAC est très important pour l'utilisation de traitements préventifs et modificateurs de la maladie. Par conséquent, la poursuite des recherches visant à découvrir des biomarqueurs biologiques ou radiologiques mais aussi des études phénotypiques, identifiant différents sous-types de cette maladie complexe sont nécessaires pour développer ces traitements.

Figure 17- Potentielles cibles thérapeutiques et mode d'action – Extrait de Kozberg et al, 2022(173)



7. RÉSULTATS PARTIE 1 : PHENOTYPES DE MICROANGIOPATHIES GÉNÉTIQUEMENT DÉTERMINÉES OU PHÉNOTYPE EXTRÊME

Une des premières étapes avant de rechercher de nouveaux marqueurs d'une maladie ou identifier les mécanismes génétiques sous-jacents est d'identifier des phénotypes les plus reconnaissables possibles. Ceci permet de guider le clinicien dans la prise en charge et dans les analyses génétiques à demander, et d'aider au conseil génétique. Cela limite aussi les phénocopies qui pourraient être à tort incluses dans les études génétiques ou thérapeutiques. Or, dans le domaine des microangiopathies liées à des dépôts (phosphocalciques ou amyloïdes par exemple), l'atteinte des petits vaisseaux cérébraux peut conduire à un large spectre clinique.

7.1. Caractérisation d'un nouveau syndrome clinico-radiologique associé aux mutations bi-alléliques de *MYORG* dans les Calcifications Cérébrales Primaires

Des corrélations génotype-phénotype semblent importantes à établir. Nous nous sommes focalisés dans une première étude sur les CCP liées aux mutations du gène *MYORG*.

Dans les formes autosomiques dominantes de CCP connues (mutations de *SLC20A2*, *XPR1*, *PDGFB* et *PDGFRB*), aucune corrélation génotype-phénotype n'a été établie avec une importante hétérogénéité inter et intrafamiliale et près d'un tiers des patients présentant des calcifications peuvent être asymptomatiques(4). Des mutations bi-alléliques au sein du gène *MYORG* ont été identifiées en 2018 au sein de 6 familles chinoises avec CCP(57). C'est la première fois qu'un mode de transmission autosomique récessif a été décrit dans les CCP. Ceci est primordial notamment pour le conseil génétique et les informations transmises aux familles concernant le risque de récurrence intrafamiliale. Les patients décrits par Yao et al (57) présentaient principalement des symptômes d'ataxie et de dysarthrie, et des calcifications cérébelleuses et des ganglions de la base.

Nous avons constitué au laboratoire de génétique de Rouen, à partir d'un recrutement multicentrique national, une série de patients CCP, c'est à dire (1) présentant au minimum des calcifications bilatérales au niveau lenticulaire (mais pouvant également toucher les autres ganglions de la base, le cortex, la fosse postérieure) et (2) ayant bénéficié d'un premier bilan étiologique à la recherche de causes secondaires négatif (avec notamment bilan phosphocalcique). Des analyses génétiques par séquençage et recherche d'anomalie

du nombre de copie pour les gènes *SLC20A2* et *PDGFB* sont réalisées au titre du diagnostic. En cas de première recherche négative, un whole exome sequencing peut alors être réalisé.

Dans notre série de 29 patients CCP non apparentés sans cause génétique identifiée, nous avons pu identifier 16 patients issus de 11 familles porteurs de mutation de *MYORG*. Le caractère bi-allélique des variants a été prouvé soit par étude de ségrégation lorsque les prélèvements des parents étaient disponibles, soit par étude de clonage dans le cas contraire (5 familles avec variants homozygotes et 6 familles avec variants hétérozygotes composites). Il s'agissait principalement de mutations faux-sens.

Nous avons alors cherché à caractériser le phénotype clinique mais également radiologique de ces patients, en réalisant notamment des comparaisons avec les 102 patients CCP porteurs de mutations au sein des gènes de transmission dominante *PDGFB, PDGFRB, SLC20A2* et *XPR1*.

Sur le plan clinique, la pénétrance de ces mutations *MYORG* semblait élevée avec 15/16 porteurs symptomatiques, avec des âges de début précoce (52 ans en moyenne [21-62]). La dysarthrie était le symptôme initial chez 11 patients sur 16 et les manifestations motrices (syndrome pyramidal, extrapyramidal et syndrome cérébelleux) étaient majeures comparativement aux patients porteurs d'autres mutations. Les manifestations psychiatriques ou déclin cognitif en revanche étaient moins fréquentes que chez les autres patients CCP.

Comparativement aux formes dominantes de CCP, un pattern de calcifications plus sévère a été identifié sur les TDM, avec atteinte spécifique du tronc cérébral retrouvée chez 12/15 patients. Huit d'entre eux présentaient notamment une atteinte du pont. C'est dans le pont que les faisceaux de substance blanche et substance grise sont le plus intriqués au niveau cérébral. A ce jour, ce pattern spécifique d'atteinte pontique n'est pas bien compris. Nous pouvons citer d'autres microangiopathies avec cette même atteinte topographique mais d'autres mécanismes physiopathologiques, tel que les tableaux PADMAL liés à des mutations du gène *COL4A1*. Aucune atteinte pontique n'a été identifiée dans les formes dominantes de CCP.

Une autre particularité radiologique chez les patients porteurs de mutations au sein de *MYORG* était l'atrophie du vermis cérébelleux, soulignée sur les analyses de morphométrie VBM (voxel-based morphometry) par IRM.

Ce travail nous a permis de confirmer que *MYORG* est un nouveau gène causal majeur de CCP, impliqué dans l'unité neuro-vasculaire car il est exprimé principalement par les astrocytes. Les liens entre les différents gènes impliqués dans les autres formes de CCP, de transmission autosomique dominante et le rôle spécifique de *MYORG* dans la fosse postérieure restent à comprendre.

Une force de l'étude est d'avoir identifié un syndrome facilement reconnaissable sur la base de caractéristiques généalogiques, cliniques et radiologiques, à l'interface entre calcifications cérébrales et ataxies spino-cérébelleuses (Figure 18). Ceci a été établi grâce à des analyses sémiologiques rigoureuses, des analyses radiologiques basées sur des scores de calcifications et des analyses VBM en IRM. Nous avons pu objectiver un pattern radiologique de calcifications liées aux mutations *MYORG* avec réalisation de Heatmap par exemple. L'établissement de tels critères cliniques et radiologiques est utile pour cibler les analyses génétiques et aider à l'interprétation de variations génétiques de *MYORG*. Depuis la publication de cette étude, 6 autres nouvelles mutations pathogènes (classe 4 ou 5 selon l'ACGM (397)) homozygotes ou hétérozygotes composites ont été identifiées dans notre laboratoire à Rouen.

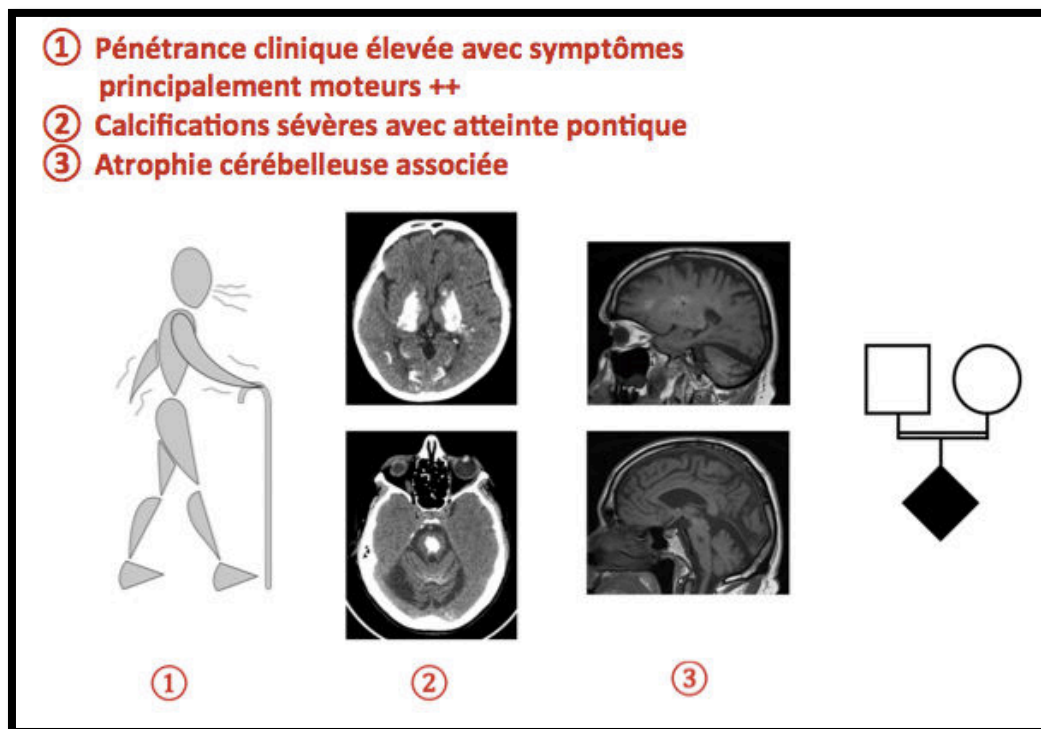


Figure 18 – Phénotype reconnaissable des patients porteurs de mutations au sein de *MYORG*

Biallelic *MYORG* mutation carriers exhibit primary brain calcification with a distinct phenotype

Lou Grangeon,¹ David Wallon,¹ Camille Charbonnier,² Olivier Quenez,² Anne-Claire Richard,² Stéphane Rousseau,² Clara Budowski,¹ Thibaud Lebouvier,³ Anne-Gaëlle Corbille,⁴ Marie Vidailhet,⁵ Aurélie Méneret,⁵ Emmanuel Roze,⁵ Mathieu Anheim,^{6,7} Christine Tranchant,^{6,7} Pascal Favrole,⁸ Jean-Christophe Antoine,⁹ Luc Defebvre,¹⁰ Xavier Ayrignac,¹¹ Pierre Labauge,¹ Jérémie Pariente,^{12,13} Michel Clanet,¹² David Maltête,¹⁴ Anne Rovelet-Lecrux,² Anne Boland,¹⁵ Jean-François Deleuze,¹⁵ The French PFBC study group,* Thierry Frebourg,² Didier Hannequin,¹ Dominique Campion^{2,16} and Gaël Nicolas²

*Appendix 1.

Primary familial brain calcification (PFBC) is a rare neurogenetic disorder with diverse neuropsychiatric expression. Mutations in four genes cause autosomal dominant PFBC: *SLC20A2*, *XPR1*, *PDGFB* and *PDGFRB*. Recently, biallelic mutations in the *MYORG* gene have been reported to cause PFBC with an autosomal recessive pattern of inheritance. We screened *MYORG* in 29 unrelated probands negatively screened for the autosomal dominant PFBC genes and identified 11 families with a biallelic rare or novel predicted damaging variant. We studied the clinical and radiological features of 16 patients of these 11 families and compared them to that of 102 autosomal dominant PFBC patients carrying a mutation in one of the four known autosomal dominant PFBC genes. We found that *MYORG* patients exhibited a high clinical penetrance with a median age of onset of 52 years (range: 21–62) with motor impairment at the forefront. In particular, dysarthria was the presenting sign in 11/16 patients. In contrast to patients with autosomal dominant PFBC, 12/15 (80%) symptomatic patients eventually presented at least four of the following five symptoms: dysarthria, cerebellar syndrome, gait disorder of any origin, akinetic-hypertonic syndrome and pyramidal signs. In addition to the most severe clinical pattern, *MYORG* patients exhibited the most severe pattern of calcifications as compared to the patients from the four autosomal dominant PFBC gene categories. Strikingly, 12/15 presented with brainstem calcifications in addition to extensive calcifications in other brain areas (lenticular nuclei, thalamus, cerebellar hemispheres, vermis, \pm cortex). Among them, eight patients exhibited pontine calcifications, which were observed in none of the autosomal dominant PFBC patients and hence appeared to be highly specific. Finally, all patients exhibited cerebellar atrophy with diverse degrees of severity on CT scans. We confirmed the existence of cerebellar atrophy by performing MRI voxel-based morphometry analyses of *MYORG* patients with autosomal dominant PFBC mutation carriers as a comparison group. Of note, in three families, the father carried small pallido-dentate calcifications while carrying the mutation at the heterozygous state, suggesting a putative phenotypic expression in some heterozygous carriers. In conclusion, we confirm that *MYORG* is a novel major PFBC causative gene and that the phenotype associated with such mutations may be recognized based on pedigree, clinical and radiological features.

- 1 Normandie Univ, UNIROUEN, Inserm U1245 and Rouen University Hospital, Department of Neurology and CNR-MAJ, F 76000, Normandy Center for Genomic and Personalized Medicine, Rouen, France
- 2 Normandie Univ, UNIROUEN, Inserm U1245 and Rouen University Hospital, Department of Genetics and CNR-MAJ, F 76000, Normandy Center for Genomic and Personalized Medicine, Rouen, France
- 3 Department of Neurology and CNR-MAJ, Lille University Hospital, Lille, France
- 4 Department of Neurology, Nantes University Hospital, Nantes, France
- 5 Département de neurologie, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Assistance Publique - Hôpitaux de Paris, Faculté de médecine de Sorbonne Université, Inserm U1127, CNRS UMR 7225, ICM, F-75013, Sorbonne Universités, Paris, France
- 6 Service de Neurologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Hôpital de Hautepierre; Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Université de Strasbourg, Strasbourg, France
- 7 Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), Illkirch, France
- 8 Department of Neurology, Aix Hospital, Aix-en-Provence, France
- 9 Department of Neurology, Saint-Etienne University Hospital, Saint-Etienne, France
- 10 Department of Neurology A, Salengro University Hospital, and EA4559, Lille, France
- 11 Department of Neurology, Montpellier University Hospital, Montpellier, France
- 12 Toulouse NeuroImaging Center, Toulouse University, Inserm, Toulouse, France
- 13 Department of Neurology, Toulouse University Hospital, Toulouse, France
- 14 Normandie Univ, UNIROUEN, Inserm U1239, Laboratory of Neuronal and Neuroendocrine Differentiation and Communication, Mont-Saint-Aignan and Rouen University Hospital, Department of Neurology, F-76000, Rouen, France
- 15 Centre National de Recherche en Génomique Humaine (CNRGH), Institut de Biologie François Jacob, CEA, Université Paris-Saclay, F-91057, Evry, France
- 16 Department of Research, Rouvray Psychiatric Hospital, Sotteville-les-Rouen, France

Correspondence to: Gael Nicolas

Inserm U1245, Faculté de médecine, 22, boulevard Gametta, 76183 Rouen, France

E-mail: gaelnicolas@hotmail.com

Keywords: primary familial brain calcification; *MYORG* gene; autosomal recessive inheritance; cerebellar atrophy; pons calcification

Abbreviations: AD-PFBC = autosomal dominant PFBC; PFBC = primary familial brain calcification; TCS = total calcification score

Introduction

Primary familial brain calcification (PFBC) is a neurogenetic calcifying disorder of the cerebral microvessels associated with diverse motor, cognitive and psychiatric symptoms. This disorder is defined by the presence of calcifications affecting at least both lenticular nuclei and a negative aetiological assessment (Nicolas *et al.*, 2015). Mutations in four genes cause autosomal dominant PFBC: *SLC20A2* (Wang *et al.*, 2012) and *XPR1* (Legati *et al.*, 2015) encoding phosphate transporters, and *PDGFB* (Keller *et al.*, 2013) and *PDGFRB* (Nicolas *et al.*, 2013b) encoding the platelet-derived growth factor B and its cognate receptor, respectively. Although the exact prevalence of autosomal dominant PFBC (AD-PFBC) is unknown, it is considered as a rare disorder affecting at least 4.5 in 10 000 individuals (Nicolas *et al.*, 2018). No specific clinical or radiological features have been identified among the four different AD-PFBC mutation carriers. AD-PFBC is marked by inter- and intra-familial diversity, in terms of (i) clinical symptoms with up to 42% of mutation carriers being asymptomatic; and (ii) calcification patterns and severity as measured by a semiquantitative visual rating scale (Nicolas *et al.*, 2013a, 2015). In particular, calcifications may affect the thalamus, the caudate nuclei, cortical sulci,

the supratentorial white matter, the cerebellar hemispheres, and the vermis in addition to the lenticular nuclei. We showed previously that the total calcification score (TCS) highly correlated with ageing and was higher in *SLC20A2* and *PDGFB* than *PDGFRB* mutation carriers (Nicolas *et al.*, 2015). The *PDGFRB* mutation carriers did not exhibit calcifications in the vermis and in the cerebral cortex, while it was frequent in the other two genetic groups. However, we could not identify a gene-specific pattern. Although the phenotype associated with *XPR1* mutations has not been reported systematically in detail, it seems to be highly comparable to the one of *SLC20A2* mutation carriers. Remarkably, calcifications of the brainstem and, more specifically, in the pons, remain extremely rare. To date, no patients with pontine calcifications exhibited a mutation in one of the four known AD-PFBC genes.

Recently, the first gene associated with autosomal recessive PFBC transmission was reported in six families from China (Yao *et al.*, 2018). The patients mainly exhibited symptoms of ataxia and dysarthria and obvious calcifications of the cerebellum and the basal ganglia that were considered as similar within and among families. To assess the phenotype associated with *MYORG* biallelic mutations, we screened this gene in 29 PFBC unrelated probands negatively screened for the four known AD-PFBC

genes and identified 11 unrelated families carrying biallelic *MYORG* mutations, with a total of 16 affected individuals after segregation analyses in relatives. After comparison with affected individuals of families with an AD-PFBC causative mutation, we demonstrate that *MYORG* mutation carriers exhibit the most severe calcification phenotype, with a propensity for posterior fossa—including brainstem—calcifications, cerebellar atrophy and a predominantly motor phenotype with high clinical penetrance.

Materials and methods

Inclusions and genetic analyses

Patients were recruited from multiple French centres as previously described (Nicolas *et al.*, 2015). They all exhibited calcifications affecting at least both lenticular nuclei with a TCS greater than the age-specific threshold, and a normal calcium-phosphorus metabolism assessment. Patients were recruited regardless of the presence of a positive family history. All patients provided informed, written consent for genetic analyses. They were all screened for the four AD-PFBC genes, by Sanger sequencing and quantitative multiplex PCR of short fluorescent fragments (QMPSF) or by whole exome sequencing (WES) or both (David *et al.*, 2016; Ramos *et al.*, 2018). A total of 29 patients were considered negative for all four genes and we analysed whole exome sequencing data regarding the *MYORG* gene. Briefly, all exons were captured using an Agilent SureSelect Human All Exon kit (V5, $n = 20$; V5 + UTR, $n = 9$) followed by Illumina sequencing with an average depth of coverage of $140\times$. Bioinformatics pipelines were previously described (David *et al.*, 2016). Briefly, reads were mapped to the 1000 Genomes GRCh37 build using BWA 0.7.5a.10. Picard Tools 1.101 was used to flag duplicate reads. We applied GATK for indel realignment, base quality score recalibration and single nucleotide polymorphisms, and indels discovery using the Haplotype Caller across all samples simultaneously according to GATK 3.3 Best Practices recommendations. Variants were annotated using SNPEff and SNPSIFT. To detect copy number variants from WES data, we used the CANOES suite as described previously (Backenroth *et al.*, 2014; David *et al.*, 2016). We extracted all variants of the coding regions and flanking intronic sequences of the *MYORG* gene (previously known as KIAA1161). Segregation of the rare (allele frequency $<1\%$ among all gnomAD ethnic subgroups) coding variants was assessed when DNA of relatives was available (Lek *et al.*, 2016).

Rare variants were interpreted following the ACMG-AMP recommendations (Richards *et al.*, 2015). For clarity purposes, we use the word ‘mutation’ here to report likely pathogenic (class 4) and pathogenic (class 5) variants together.

We determined the phase of the variants using segregation analyses in families and/or cloning of the entire unique coding exon. Cloning and sequencing of *MYORG* variants was carried out in patients with initial insufficient or absent segregation data. Briefly, the sequence containing both variants was PCR-amplified using primers with the EcoRI (forward primer) or XbaI (reverse primer) restriction site (Supplementary material). After double digestion with EcoRI and XbaI, the PCR products were ligated into the pcDNA3 plasmid. Ligations

were transformed into competent Stbl3 bacteria. Colonies were obtained and then sequenced using specific primers.

Inclusion of autosomal dominant PFBC patients and data collection

We compared clinical and radiological characteristics of AD-PFBC patients harbouring an *SLC20A2*, *PDGFB*, *PDGFRB* or an *XPR1* mutation to that of *MYORG* mutation carriers with the aim to highlight any putative distinct phenotype.

We included all probands and affected relatives for which a blood or DNA sample was referred to the Inserm Research Unit 1245 and the Department of Genetics of the Rouen University Hospital (Rouen, France) for PFBC genetic screen since the year 2010 and who were positively screened for one of the four known AD-PFBC genes. The medical charts and radiological data of all mutation carriers were examined. We carried out the same data collection and imaging analyses as those conducted in *MYORG* mutation carriers (see below). Briefly, the AD-PFBC comparison group consisted of the update of the French PFBC series, most of the patients having been reported before (Legati *et al.*, 2015; Nicolas *et al.*, 2015; Anheim *et al.*, 2016; David *et al.*, 2016; Ramos *et al.*, 2018), although the clinical and radiological phenotype of *XPR1* mutation carriers has not yet been studied extensively as a group.

Clinical data and CT scan analyses

Clinical data were retrieved from the patient’s medical charts provided by each referring clinician and analysed following previously reported categories of symptoms (Manyam *et al.*, 2001; Nicolas *et al.*, 2015). We considered the category akinetic-hypertonic syndrome as positive when patients were reported to exhibit akinesia/bradykinesia, plastic hypertonia or both. We considered pyramidal signs as present when patients exhibited clearly brisk, diffused tendon reflexes with Babinski and/or Hoffmann signs upon examination, whatever the presence of paresis or spasticity. When paresis or spasticity were present, we added this piece of information.

Cerebral CT scans were assessed as well as MRI, when native dicom-format images were available. We rated all calcification regions as previously described and computed the TCS.

To assess the ponto-cerebellar atrophy in *MYORG* mutation carriers, three independent neurologists first rated (i) the number of sulci displayed on CT scan in cerebellar hemispheres and in the vermis area, respectively; and (ii) dilatation of each cistern of the posterior fossa as discrete, moderate or marked according to a previously published scale (Ramos *et al.*, 1987). When the scores differed between the raters, a consensus was reached.

MRI voxel-based morphometry

In a second step, we performed whole-brain volumetric analyses of all available MRI that included a 3D T₁-weighted imaging of *MYORG* and AD-PFBC mutation carriers from the French PFBC series. To exclude white matter calcification bias, this voxel-based morphometry (VBM) substudy was restricted to grey matter differences between patients harbouring a

MYORG mutation versus AD-PFBC mutation carriers. All pre-processing steps and analyses were performed using the SPM12 package (Statistical Parametric Mapping; <http://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm>) implemented in MATLAB 9.0.0 environment (MathWorks; <http://www.mathworks.com>). Available raw images were checked for quality control and transformed from the standard DICOM format (Digital Imaging and Communication in Medicine) to the NIfTI format (Neuroimaging Informatics Technology Initiative). First, we generated a custom template using the Diffeomorphic Anatomical Registration with the Exponentiated Lie Algebra algorithm tool (DARTEL) (Ashburner and Friston, 2005). Subsequently, the images were processed using the New Segment tool for defining tissue probability maps through non-linear deformation and registration, in order to obtain grey matter, white matter and CSF images (Ashburner and Friston, 2005). The final DARTEL template was then normalized into Montreal Neurological Institute (MNI) space, and the original (native space) grey matter segments were warped to the DARTEL/MNI template. Finally, images were smoothed with a full-width at half-maximum (FWHM) 6-mm Gaussian kernel to increase the variation signal in the anatomical structure. A grey matter analysis mask was created by averaging individual smoothed (also at 6 mm FWHM) and normalized grey matter segmentations above an optimum threshold (Ridgway *et al.*, 2008). *MYORG* and AD-PFBC mutation carriers were compared in an SPM-t comparison using a full factorial design and taking the mutation status as factor (*MYORG* carriers or non-carriers) and the total intracranial volume, age at MRI and sex as covariates. The statistical significance of the contrast was initially set up with a primary threshold of voxel-wise $P = 0.001$ uncorrected due to low statistical power. Second, the threshold for the resulting clusters was limited to $P < 0.05$ family-wise error (FWE) correction.

Statistics

Chi-squared, Fisher exact tests and Mann-Whitney tests were used to compare clinical characteristics between genetic groups. Results are expressed as mean \pm standard deviation (SD) unless otherwise specified.

We analysed calcification rating scores as reported previously (Nicolas *et al.*, 2015) using the R statistical software version 3.0.2. First, a negative binomial distribution was adopted to model the TCS, allowing for over-dispersion of count data, when accounting for the combined effects of the age at CT scan, sex, and causative genes. The effect of sex appeared much less significant than the effect of genes and age at CT scan and appeared to be mostly driven by *PDGFB* mutation carriers (not shown). For these reasons, we present here the results obtained without adjustment on sex. Second, a heat map was built, representing the grid of quantification scores for each location and patient on a coloured scale. On each axis, locations and patients displaying similar score profiles were ordered and clustered together by ascending hierarchical clustering based on the Euclidean distance and Ward's aggregation criterion. To compare scores of locations rated twice (left and right, rated /10) versus locations rated once [median structures (vermis, pons, and medulla) and cortex, each rated /5], we doubled the score of the last-mentioned locations.

Data availability

The de-identified clinical classification of patients, following the categories in Manyam *et al.* (2001) and the details on TCS rating are available upon request.

Results

Identification of 11 families exhibiting biallelic *MYORG* mutations

After WES of 29 unrelated patients negatively screened for the four known AD-PFBC genes, we identified 11 unrelated probands carrying one homozygous ($n = 5$ families) or two heterozygous ($n = 6$ families) rare coding variants in the *MYORG* gene (Table 1). Segregation ($n = 3$) and cloning ($n = 4$) analyses allowed us to confirm that affected individuals of the latter six families harboured compound heterozygous variants, hence consistent with an autosomal recessive pattern of inheritance (Fig 1). Of note, no copy number variation encompassing this gene was detected using the CANOES bioinformatics tool.

Of the 16 identified distinct *MYORG* mutations, 10 were missense mutations, one was nonsense and six were short insertions or deletions (indels, four in-frame and two frame-shift) (Table 1). Of note, only one had previously been reported, an in-frame insertion, p.(R116_S117insLAFR), reported in patients from Asian ancestry (Yao *et al.*, 2018). We identified this insertion in two additional families of Asian ancestry. Six *MYORG* variants were present in the genome Aggregation Database (gnomAD) (Lek *et al.*, 2016) with extremely low allele frequencies (maximum allele count: 10; Table 1) and all *MYORG* variants were absent at the homozygous state in this database. All but one missense variants were predicted to be deleterious by the three interrogated softwares (PolyPhen-2, SIFT and MutationTaster); the last one was predicted damaging by two of the three. The 16 identified mutations were not clustered in a specific domain but located throughout the coding region of the *MYORG* gene (Fig. 2).

Description of the pedigrees

The *MYORG* mutation carriers consisted of six cases with a sporadic presentation and five families with two or three affected siblings. Among the five probands with a homozygous mutation, a history of consanguinity was known for two (EXT-439, EXT-805, with common ancestors three and five generations beyond each parent, respectively) (Fig. 1).

Strikingly, in three families, the father of the proband was reported to present brain calcifications. In Family EXT-1162 of Asian origin, the mother had a normal CT scan and carried the c.337_348dupCTGGCCTTCCGC, p.(R116_S117insLAFR) already reported by Yao *et al.* (2018). The father carried a novel nonsense mutation,

Table 1 Biallelic variants identified in MYORG in 11 unrelated probands

Family	Status	cDNA nomenclature	Protein effect	Variant type	MAF gnomAD	n homozygous carriers gnomAD	SIFT	PolyPhen-2	Mutation Phasing Taster	ACMG-AMP class
EXT-321	Compound heterozygous	c.1865T>C	p.(Leu622Pro)	Missense	Absent	0	D	PD	DC	4
		c.338T>G	p.(Leu113Arg)	Missense	Absent	0	D	PossD	DC	4
EXT-505	Compound heterozygous	c.1967T>C	p.(Ile656Thr)	Missense	3.6×10^{-5} (AC = 10)	0	D	PD	DC	4
		c.1427C>A	p.(Thr476Asn)	Missense	Absent	0	D	PD	DC	4
EXT-439	Homozygous	c.1300G>C	p.(Asp434His)	Missense	7.7×10^{-6} (AC = 2)	0	D	PD	DC	4
EXT-695	Homozygous	c.1979T>A	p.(Leu660Gln)	Missense	Absent	0	D	PD	DC	4
EXT-428	Homozygous	c.747G>C	p.(Trp249Cys)	Missense	4.1×10^{-6} (AC = 1)	0	D	PD	DC	4
EXT-753	Compound heterozygous	c.1831C>T	p.(Arg611Trp)	Missense	Absent	0	D	PD	DC	5
		c.337_348dup	p.(Arg116_Ser117 insLeuAlaPheArg)	Inframe insertion ^a	3.6×10^{-5} (AC = 9)	0	NA	NA	NA	5
		CTGGCCTTCCGC								
EXT-756	Compound heterozygous	c.1538_1540delCCT	p.(Ser513del)	Inframe deletion	Absent	0	NA	NA	NA	4
		c.1118C>A	p.(Ala373Asp)	Missense	Absent	0	T	PD	DC	4
EXT-805	Homozygous	c.706_708dupGCC	p.(Ala236dup)	Inframe insertion	Absent	0	NA	NA	NA	4
EXT-1162	Compound heterozygous	c.337_348dup	p.(Arg116_Ser117 insLeuAlaPheArg)	Inframe insertion ^a	3.6×10^{-5} (AC = 9)	0	NA	NA	NA	5
		CTGGCCTTCCGC								
		c.1333C>T	p.(Gln445 ^{fs})	Nonsense	Absent	0	NA	NA	NA	5
EXT-1385	Compound heterozygous	c.1078delT	p.(Tyr360fs)	Frameshift	Absent	0	NA	NA	NA	5
		c.1394dupG	p.(Glu466fs)	Frameshift	4.3×10^{-6} (AC = 1)	0	NA	NA	NA	5
EXT-990	Homozygous	c.191G>A	p.(Gly64Glu)	Missense	Absent	0	D	PD	DC	4

^aPresent in Yao et al., 2018.

AC = allele count; D = deleterious; DC = disease-causing; NA = not available; PD = probably damaging; PossD = possibly damaging; T = tolerated.

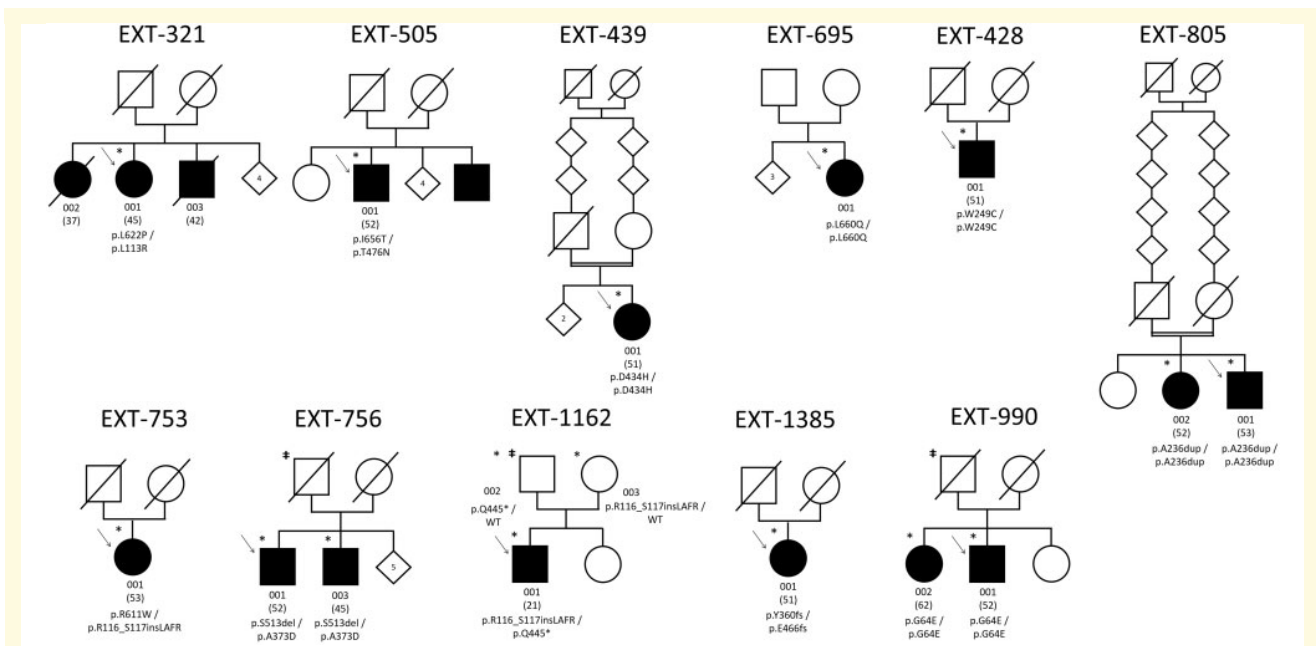


Figure 1 Reduced pedigrees of the 11 PFBC families with MYORG mutations. Arrow = proband; asterisk = DNA available; square = male; circle = female; diamond = male(s) or female(s); strikethrough = deceased individual; filled symbols = PFBC-affected individual; open symbols = relative assumed to be healthy; double dagger = relative with non-extensive brain calcifications. 001 = ID number; values in parentheses = age at onset; WT = reference allele.

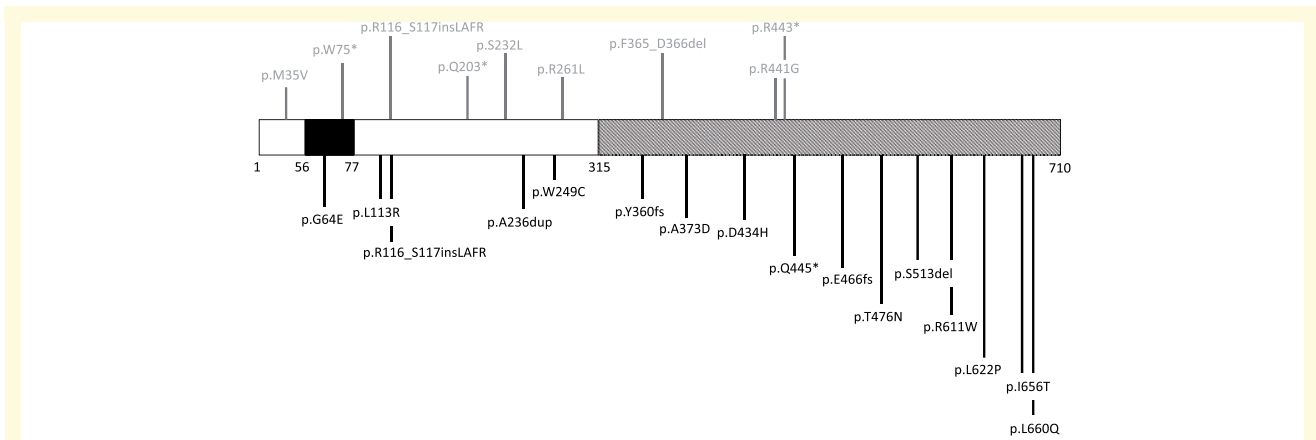


Figure 2 Distribution of MYORG mutations on the protein, modified from Yao et al. (2018). The MYORG protein contains a short cytoplasm domain, a transmembrane fragment (black) and a long C-terminal luminal fragment with a glycosidase domain (striped area). Mutations reported in Yao et al. are represented at the top in grey, whereas mutations reported here are represented at the bottom, in black.

c.1333C>T, p.(Gln445*). His neurological examination was completely normal (age at examination: 65 years) and his CT scan showed lenticulo-cerebellar calcifications (TCS = 12; Supplementary Fig. 1), with a much lower severity than his affected symptomatic son (TCS = 55; see Table 2 for clinical presentation).

In Family EXT-756, no CT scan was available in the mother who died at the age of 63 years with no history of a neurological disorder. The father was reported to present with depression and cognitive impairment starting from

the age of 67 years and leading to dementia. He was first diagnosed with Alzheimer’s disease. Then, the observation of asymmetric extrapyramidal syndrome led to the hypothesis of dementia with Lewy bodies. His CT scan showed small lenticular and small cerebellar bilateral calcifications (TCS could not be computed precisely because of poor image quality, we can however estimate a TCS < 12; Supplementary Fig. 2). He died at the age of 81 years. Both affected symptomatic brothers exhibited severe calcifications with a TCS of 32 in the proband and the affected

Table 2 Demographics and clinical characteristics of patients carrying biallelic variants in MYORG

Family	Mutation	Patient ID/Sex	AAO/ALE	Inaugural symptom	Clinical summary	Cognitive assessment
EXT-321	p.Leu622Pro/ p.Leu113Arg	321-001/F	45/52	Dysarthria	Dysarthria, cerebellar ataxia with ataxia of limbs followed 1 y later by pyramidal signs of all four limbs and akinetic hypertonic syndrome with tremor, chorea and dystonia. No improvement following dopaminergic therapy. Marked difficulties to swallow only 2 y after the onset of symptoms. History of depression.	At age 56 y: MMSE = 27/30 (N), FAB = 12/15 (verbal fluences could not be assessed)
EXT-505	p.Ile656Thr/p.Thr476Asn	321-002/F 321-003/M	37/68 (death) 42/56 (death)	Dysarthria and pyramidal signs Dysarthria	Progressive dysarthria associated with pyramidal signs of all four limbs with right hemiparesis of rapid onset. Secondary progressive occurrence of akinetic hypertonic syndrome and cerebellar ataxia. 25% increase of the UPDRS-III score following L-DOPA treatment. No cognitive impairment. Died at age 68. Isolated dysarthria then akinetic hypertonic syndrome with chorea, dystonia and isolated dysarthria then akinetic hypertonic syndrome with chorea, dystonia and gait disorder. No improvement following dopaminergic therapy. Pyramidal signs without paresis. Marked worsening of difficulties to swallow leading to death at age 56.	At age 53 y: MMSE 30/30
EXT-439	p.Asp434His	505-001/M	52/64	Dysarthria	Dysarthria with swallowing disorder. Stroke-like episode 6 y after with rapidly progressive left-sided weakness (no evidence of stroke on MRI) and akinetic hypertonic syndrome with freezing. No improvement following dopaminergic therapy. Cerebellar ataxia.	At age 44 y: MMSE = 29/30 (N). At age 47 y: Total IQ = 75. Verbal IQ = 85. Performance IQ = 66, MDRS = 120/144 (P). Dysexecutive signs
EXT-695	p.Leu660Gln	439-001/F	51/64	Cerebellar syndrome	Rapid onset of cerebellar ataxia then progressive worsening together with ataxia of limbs, dysarthria, bradykinesia, severe spasticity of all four limbs with pyramidal signs. History of depression.	At age 63 y: MMSE = 28/30 (N). FCSRT: free recall = 40/48 (N), total recall = 47/48 (N), FAB: 14/18, (N), TMT A and B: normal scores.
EXT-428	p.Trp249Cys	695-001/F 428-001/M	Asymptomatic/28 51/69 (death)	NA Dysarthria	Several faintings, normal neurological examination. Dysarthria followed 10 y after by cerebellar ataxia with ataxia of limbs, later associated with akinetic hypertonic syndrome. No improvement following dopaminergic therapy. Pyramidal signs at examination. History of depression.	At age 63 y: MMSE = 29/30 (N), MDRS = 135/144, FAB = 16/18 (N)
EXT-753	p.Arg611Trp/p.Arg116_Ser117msLeu/AlaPheArg	753-001/F	53/61	Dysarthria and cerebellar syndrome	Died at age 69 following intracerebral haemorrhage.	At age 57 y: MMSE = 19/30 (P), FAB = 9/18 (P)
EXT-756	p.Ser513del/p.Ala373Asp	756-001/M	52/56	Depressive episode	Dysarthria, cerebellar ataxia with ataxia of limbs. Progressive worsening 1 y after with bilateral pyramidal signs, akinetic hypertonic syndrome and tremor. Marked depressive episode with loss of weight then cerebellar ataxia with dysarthria and mild akinetic hypertonic syndrome. Pyramidal signs at examination.	At age 52 y: MMSE = 30/30 (N), MDRS = 144/144 (N), FAB = 18/18 (N), FCSRT: free recall = 28/48 (N), total recall = 48/48 (N) Dysexecutive signs, no scale available.
EXT-805	p.Ala236dup	756-003/M 805-001/M 805-002/F	45/54 53/63 52/65	Unspecified Dysarthria Akinesia	Dysarthria, akinetic hypertonic syndrome, gait disorder of unknown origin. Subjective improvement following dopaminergic therapy. Normal ¹²³ I-iodoflupane SPECT. Isolated dysarthria then bilateral akinetic hypertonic syndrome, pyramidal signs. History of depression.	At age 59 y: MMSE = 29/30 (N), FAB = 13/18 (P). Dysexecutive signs At age 65 y: MMSE = 24/30 (P), FAB = 11/18 (P)
EXT-1162	p.Arg116_Ser117msLeu AlaPheArg/p.Gln445*	1162-001/M	21/31	Dysarthria	Unilateral akinesia followed 3 y later by dysarthria of rapid onset together with cognitive impairment and chorea. Cerebellar ataxia and pyramidal signs 10 y after. History of depression.	NA
EXT-1385	p.Tyr360fs/p.Glu466fs	1385-001/F	57/67	Dysarthria and gait disorders	Isolated dysarthria, then associated with paroxysmal dyskinesia. Occurrence of akinetic hypertonic syndrome and generalized dystonia after 10 y of evolution.	NA
EXT-990	p.Gly64Glu	990-001/M 990-002/F	52/66 62/62	Dysarthria Dysarthria and gait disorders	Gait disorder of unknown origin associated with dysarthria, associated to swallowing difficulties and cerebellar signs. Several falls. At examination, pyramidal signs and akinetic hypertonic syndrome. Isolated dysarthria followed 3 y later by behavioural disorders, cognitive impairment and cerebellar ataxia. Progressive worsening with bilateral pyramidal and akinetic hypertonic syndrome with tremor, orofacial dyskinesia. Wheelchair requirement at the age of 64. Normal ¹²³ I-iodoflupane SPECT. Initial stroke with sudden vertigo and dysarthria. Multiple ischaemic strokes on MRI (right cerebellar territory and left middle cerebral artery territory, probable cardioembolic cause) followed by progressive pyramidal signs and dysexecutive syndrome. Bradykinesia.	At age 62 y: MMSE = 26/30 (N), MDRS = 124/144 (P), FAB = 7/18 (P). Dysexecutive signs At age 63 y: MMSE = 23/30 (P), FAB = 8/18 (P)

AAO = age at onset, in years; ALE = age at last examination, in years; F = female; FAB = Frontal Assessment Battery; FCSRT = Free and Cued Selective Reminding Test; M = male; MDRS = Mattis Dementia Rating Scale; MMSE = Mini-Mental State Examination; N/P = score in normal of pathological ranges following age and education level normative values; NA = not available; TMT = Trail Making Test; y = years.

brother was described as displaying diffuse calcifications (Table 2). Unfortunately, no CT scan was available for rating in the affected brother. Both affected brothers carried c.1538_1540delCCT, p.(Ser513del) and a c.1118C>A, p.(Ala373Asp) variants. We could demonstrate that these variants were located in *trans* in both affected brothers by further segregation analysis and cloning but we could not determine which allele was the paternal one.

In Family EXT-990, no CT scan was available in the mother who died at the age of 87 years with no history of a neurological disorder. The father was reported to be asymptomatic and to present with calcifications restricted to the lenticular nuclei (images not available); he died at the age of 87 years. Again, both affected and symptomatic proband and sister showed extensive calcifications with a TCS of 36 at 62 years old and a TCS of 31 at the age of 62 years, respectively.

Clinical features of MYORG biallelic mutation carriers

We report the phenotype of 16 patients from these 11 families. All but one were symptomatic, with an average age at onset of 48.3 years (SD = 10.1; median = 52, range: 21–62). The only asymptomatic affected individual was a 28-year-old female. The most frequent clinical symptoms were dysarthria (15/16), akinetic-hypertonic syndrome (15/16), pyramidal signs (13/16), gait disorder of any origin (13/16) and cerebellar syndrome (10/16) (Table 3). Strikingly, dysarthria was the prominent inaugural symptom in 11/16 patients, either isolated ($n = 7$) or associated with akinetic-hypertonic syndrome or gait disturbance ($n = 4$). In the majority of cases, dysarthria resulted from various combinations of ataxic, hypokinetic and/or spastic components.

Pyramidal signs were bilateral in 9/16 patients and associated with motor weakness in three patients. In addition, spasticity was mentioned in four patients.

Movement disorders consisted mostly of akinetic-hypertonic syndromes ($n = 15/16$). Chorea ($n = 3$), dystonia ($n = 3$), orofacial dyskinesia ($n = 1$) or paroxysmal dyskinesia ($n = 1$) were rare and, if present, always associated to akinetic-hypertonic syndrome. In these patients, information on L-DOPA or dopaminergic agonists treatment was available in six patients. It was considered inefficient in 4/6. In the two remaining patients, subjective improvement was noticed. However, an increase of only 25% of the UPDRS-III score was observed for one of them, suggesting a modest effect of L-DOPA. On-off UPDRS-III rating were not available for the second patient. In two patients, ^{123}I -ioflupane SPECT was carried out and was considered normal.

Cognitive impairment was reported in eight patients (Table 2). Four patients presented a memory impairment, but dedicated scales were not available to characterize further this impairment in all patients. Of note, three patients underwent a free and cued selective reminding test (FCSRT) more than 10 years after the onset of motor symptoms and

showed normal scores. Dysexecutive signs were noted in all eight patients with a cognitive impairment. Of note, cognitive impairment did not fulfil the criteria of major neurocognitive disorder (according to The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 5th edn. American Psychiatric Association, 2013) for any of them.

Psychiatric signs, one of the most frequent presentations of AD-PFBC, were reported in 7/16 patients only [six displaying one marked or recurrent depressive episode(s) and one displaying severe behavioural disorders]. None suffered from psychotic signs or seizures (Tables 2 and 3).

Of note, two patients experienced strokes. One of them suffered from ischaemic strokes in multiple territories suggesting a cardio-embolic origin and the other patient died following cerebral haemorrhage but we could not determine if it was related to PFBC or not. In addition, one patient exhibited rapidly progressive left hemiparesis with unchanged MRI including no sign of ischaemic or haemorrhagic stroke, suggesting a stroke-like episode.

We then compared the clinical symptoms of the MYORG patients to those of 51 patients harbouring a mutation in *SLC20A2* (30 patients from 16 families and 21 sporadic cases), 26 in *PDGFB* (13 patients from six families and 13 sporadic cases), 14 in *PDGFRB* (13 patients from one family and one sporadic case) and 11 in *XPR1* (five patients from three families and six sporadic cases). This series consists of the update of the *SLC20A2*, *XPR1*, *PDGFB*, and *PDGFRB* mutation carriers from the French PFBC study group (Nicolas *et al.*, 2015; Ramos *et al.*, 2018). All mutation details are presented in Supplementary Table 2. In addition to novel *SLC20A2* and *PDGFB* mutation carriers, we also added *XPR1* mutation carriers, the phenotype of which has not yet been reported in detail. Briefly, all *XPR1* mutation carriers were symptomatic with an average age at onset of 51.6 years (SD = 15.2). The main inaugural symptoms were akinetic-hypertonic syndrome (3/11), cognitive impairment (3/11 patients), psychiatric symptoms, such as a psychotic disorder (1/11) or depression (1/11). Eight patients (72.7%) displayed an akinetic-hypertonic syndrome, nine presented a cognitive impairment (81.8%) and six (54.6%) had psychiatric signs. Clinical summary of each *XPR1* mutation carrier is available in Supplementary Table 3.

Univariate analyses comparing MYORG patients with the entire series of AD-PFBC patients and gene by gene are presented in Table 3. Age of clinical onset, age at CT scan and age at last examination did not differ between groups ($P = 0.28$, $P = 0.34$ and $P = 0.99$, respectively) except for the *PDGFB* mutation carriers presenting an earlier onset compared to MYORG patients ($P = 0.04$). Strikingly, MYORG patients were more likely to present with dysarthria (100% versus 22.7%, $P < 0.001$), cerebellar syndrome (66.6% versus 24.0%, $P = 0.002$), gait disorders (86.6% versus 34.1%, $P < 0.001$), and pyramidal signs (86.6% versus 13.9%, $P < 0.001$) than all others AD-PFBC patients, apart and gathered. In addition, akinetic-hypertonic syndrome was also more prominent in

Table 3 Comparison between PFBC patients carrying biallelic *MYORG* mutations and AD-PFBC carrying mutations in *SLC20A2*, *PDGFB*, *PDGFRB* or *XPR1*

	<i>MYORG</i> (n = 16)	AD-PFBC (n = 102)	P	<i>SLC20A2</i> (n = 51)	<i>PDGFB</i> (n = 26)	<i>PDGFRB</i> (n = 14)	<i>XPR1</i> (n = 11)
Age at onset, years, mean [min–max]	48.3 [21–62]	41.5 [6–77]	0.28	42.3 [7–77]	37.7 [7–68]	26.2 [6–66]	51.6 [29–73]
Age at CT scan, years, mean [min–max]	55.9 [27–66]	49.3 [6–82]	0.34	59.5 [35–82]	45.0 [11–81]	41.7 [6–68]	58.1 [41–73]
Age at last examination							
Symptomatic individuals, years, mean [min–max]	59.9 [31–69]	55.7 [6–86]	0.99	59.9 [20–86]	49.7 [11–82]	43.0 [6–68]	56.0 [33–76]
Asymptomatic individuals, years, mean [min–max]	28	46.7 [13–83]	NA	56.2 [29–83]	41.0 [20–57]	43.3 [13–65]	NA
Sex n (%)							
Male	8 (50)	51 (50)	1	27 (52.9)	10 (38.4)	8 (57.1)	5 (45.4)
Female	8 (50)	51 (50)		24 (47.1)	16 (61.6)	6 (42.9)	6 (54.6)
Symptomatic, n (%)	15 (93.7)	79 (77.4)	0.18	44 (86.3)	19 (73.0)	5 (35.7)	11 (100)
Movement disorders, n (%)	15 (100)	48 (60.8)	0.002	30 (68.2)	8 (42.1)	2 (40.0)	8 (72.7)
Akinetic-hypertonic syndrome, n (%)	15 (100)	41 (51.9)	<0.001	26 (59.1)	5 (26.3)	2 (40.0)	8 (72.7)
Tremor, n (%)	3 (20.0)	25 (31.6)	0.54	17 (38.6)	3 (15.7)	1 (20.0)	4 (36.3)
Chorea, n (%)	3 (20.0)	4 (5.1)	0.08	1 (2.3)	2 (10.5)	1 (20.0)	0
Dystonia, n (%)	3 (20.0)	8 (10.1)	0.37	5 (11.4)	2 (10.5)	1 (20.0)	0
Other, n (%)	2 (13.3)	8 (10.1)	0.65	5 (11.4)	2 (10.5)	0	1 (9.0)
Cognitive impairment, n (%)	8 (53.3)	48 (60.7)	0.82	25 (56.8)	12 (63.2)	2 (40.0)	9 (81.8)
Dysexecutive signs, n (%)	8 (53.3)	26 (32.9)	0.07	13 (29.5)	7 (36.8)	2 (40.0)	4 (36.3)
Memory impairment, n (%)	4 (26.6)	27 (34.1)	1	16 (36.4)	8 (42.1)	2 (40.0)	1 (9.0)
Psychiatric disorders, n (%)	7 (46.6)	53 (67.0)	0.13	28 (63.6)	15 (78.9)	4 (80.0)	6 (54.5)
Psychotic symptoms, n (%)	0	14 (17.7)	0.11	9 (20.4)	4 (21.0)	0	1 (9.1)
Mood disorder, n (%)	6 (40.0)	25 (31.6)	1	14 (31.8)	7 (36.8)	2 (40.0)	2 (18.2)
Other, n (%)	1 (6.7)	22 (27.8)	0.18	10 (22.7)	6 (31.6)	2 (40.0)	4 (36.4)
Dysarthria, n (%)	15 (100)	18 (22.7)	<0.001	11 (25.0)	2 (10.5)	1 (20.0)	4 (36.3)
Cerebellar syndrome, n (%)	10 (66.6)	19 (24.0)	0.002	13 (29.5)	2 (10.5)	1 (20.0)	3 (27.3)
Gait disturbance, n (%)	13 (86.6)	27 (34.1)	<0.001	18 (40.9)	4 (21.0)	1 (20.0)	4 (36.3)
Pyramidal signs, n (%)	13 (86.6)	11 (13.9)	<0.001	6 (13.6)	4 (21.0)	1 (20.0)	0
Seizures, n (%)	0 (0)	6 (7.5)	0.58	3 (6.8)	2 (10.5)	0	1 (9.1)

Percentages are given in reference to the number of symptomatic patients. NA = not available. Values in bold: $P < 0.05$.

MYORG patients than all AD-PFBC patients (100% versus 51.9%; $P < 0.001$). This remained significant against *SLC20A2* ($P = 0.002$), *PDGFB* ($P < 0.001$), *PDGFRB* ($P = 0.008$) mutation carriers but not *XPR1* ($P = 0.06$). Conversely, they presented with less frequent psychiatric disorders than all AD-PFBC patients, without any psychosis, although this was not statistically significant (46.6% versus 67.0%, $P = 0.13$).

Calcification patterns and severity

CT scan images of 15/16 *MYORG* patients were available and were compared to those of AD-PFBC mutation carriers (43, 25, 13, and 10 *SLC20A2*, *PDGFB*, *PDGFRB* and *XPR1* mutation carriers, respectively, with available CT scan imaging data). Notably, all 15 *MYORG* mutation carriers exhibited bilateral calcifications in the lenticular nuclei, the thalamus, the cerebellar hemispheres, but also the vermis (Fig. 3A). The subcortical white matter was

affected in 14/15 and the cerebral cortex appeared calcified in 11/15 patients although the calcifications were punctate in two. Strikingly, calcifications were observed in the brainstem in 12/15 *MYORG* mutation carriers although only 2/43 *SLC20A2* and 1/10 *XPR1* mutation carriers exhibited calcifications in the brainstem (overall, 3/91 AD-PFBC mutation carriers). More specifically, calcifications in the pons were observed in 8/15 *MYORG* mutation carriers while none of the AD-PFBC mutation carriers were affected by such calcifications (Fig. 4). Conversely, the caudate nucleus was clearly calcified in only 8/15 patients as compared to 60/91 patients in other genes (Fig. 3A).

Assuming a binomial negative regression model adjusted for age at CT scan, *MYORG* mutation carriers exhibited a greater expected TCS compared to *SLC20A2* ($P = 4.1 \times 10^{-3}$), *PDGFB* ($P = 3.2 \times 10^{-6}$), and *PDGFRB* ($P = 8.3 \times 10^{-13}$) (Fig. 3B). They also presented a higher expected TCS than the *XPR1* mutation carriers although this result did not reach significance ($P = 0.089$).

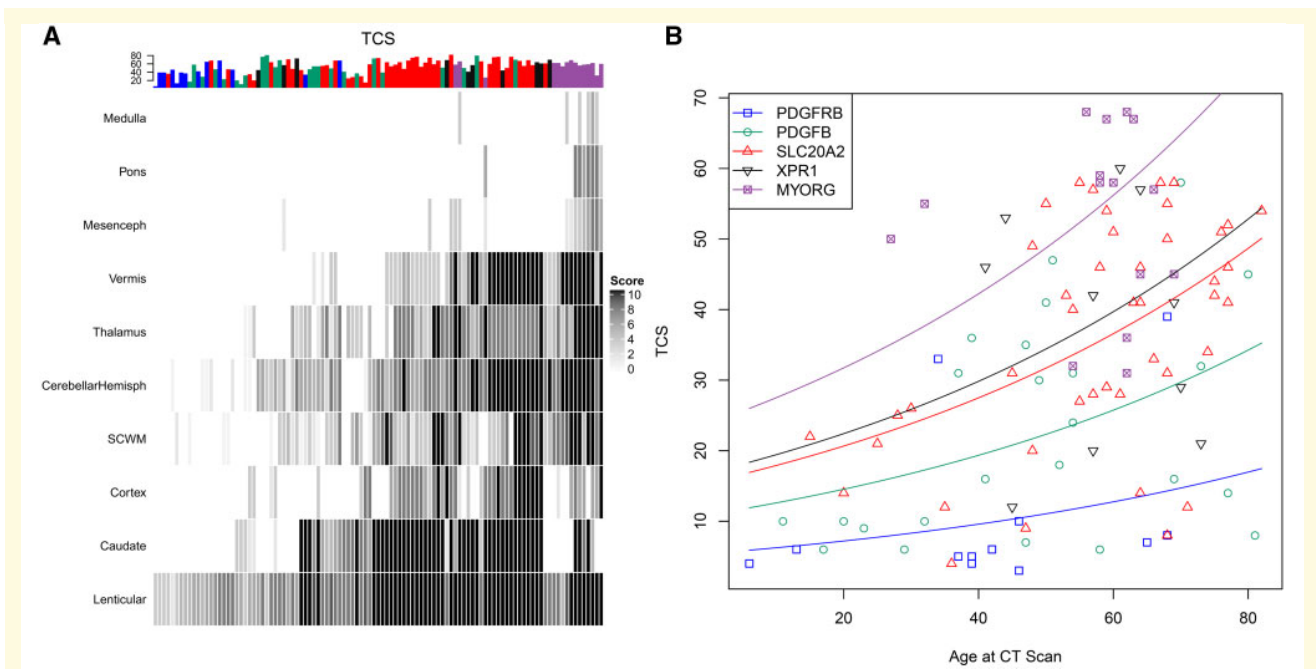


Figure 3 Calcifications scores of the MYORG patients compared to the AD-PFBC groups. **(A)** Heat map of the ascending hierarchical clustering of the calcification scores. All scores of right and left structures were summed (e.g. left lenticular nucleus plus right lenticular nucleus). Scores of the unique regions were doubled (vermis, pons, medulla) as well as the score of the cortex. In the upper part of the figure, the age of the patients when the CT scan was performed appear with colours corresponding to the genes: blue (PDGFRB), green (PDGFB), red (SLC20A2), black (XPR1) and purple (MYORG). SCWM = subcortical white matter. **(B)** Total calcification score (TCS) of all patients with available CT scan, according to the age at CT scan. The TCSs of MYORG patients were higher than those of SLC20A2 patients ($P = 4.1 \times 10^{-3}$), of PDGFB patients ($P = 3.2 \times 10^{-6}$), PDGFRB patients ($P = 8.3 \times 10^{-13}$) and XPR1 patients (but not statistically significant, $P = 0.089$).

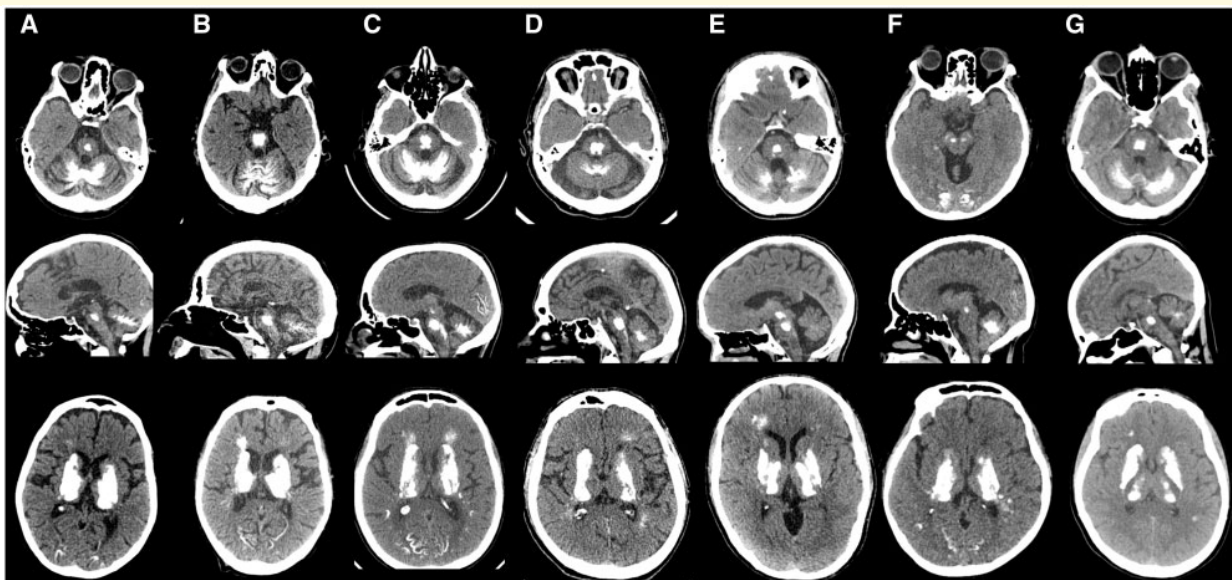


Figure 4 Brainstem calcifications and cerebellar atrophy on CT scan in patients carrying MYORG mutations. CT scans of **(A)** Patient 321–001; **(B)** Patient 321–003; **(C)** Patient 439–001; **(D)** Patient 428–001; **(E)** Patient 1162–001; **(F)** Patient 753–001; and **(G)** Patient 695–001.

Cerebellar atrophy in *MYORG* biallelic mutation carriers

Cerebellar atrophy was observed in the neuroimaging (CT and/or MRI) of all *MYORG* mutation carriers (Fig. 4). To explore this atrophy further, we sought to perform a VBM analysis based on the subset of patients with available 3D T₁-MRI data. MRI scans from four *MYORG* and seven AD-PFBC mutation carriers (three *SLC20A2*, three *PDGFB* and one *PDGFRB*) were retained after quality control procedures. The grey matter volume differences between the *MYORG* group and the AD-PFBC group were mainly significant in the cerebellar cortex, confirming our visual analysis. In particular, cerebellar atrophy was observed in the cerebellar vermis VI ($P < 0.05$, FWE corrected) and within a broader region overlapping the antero-superior cerebellar hemispheric lobes V–VI ($P < 0.001$, uncorrected) (Fig. 5).

Identification of a recognizable phenotype highly suggestive of *MYORG* mutations

Overall, the phenotypic features enriched in *MYORG* mutation carriers as compared to AD-PFBC mutation carriers were: (i) a high clinical penetrance with 15/16 patients being symptomatic (range of ages at onset: 21–62 years) and exhibiting motor symptoms (dysarthria, akinetic-hyper-tonic syndrome, pyramidal signs, cerebellar syndrome and gait impairment). More specifically, 10 patients presented with all five signs, and two presented with 4/5 signs. In addition, psychiatric features seemed to be under-represented as compared to AD-PFBC patients and most patients presented relatively preserved cognitive functions even

when showing severe motor symptoms years after the clinical onset; (ii) the highest overall severity in terms of calcification burden as compared to AD-PFBC patients with a propensity for calcifications affecting the brainstem (12/15) and, more specifically, the pons (8/15); and (iii) the existence of cerebellar atrophy, which was marked in 13/15 patients but present in all 15 patients with diverse severity.

Overall, 11/15 patients with clinical and imaging data available presented all three features: motor symptoms, calcifications in the brainstem and cerebellar atrophy. Four patients presented 2/3 features: no calcifications in the brainstem in Patients EXT-756–001, EXT-990–001, EXT-990–002 and no symptoms in Patient EXT-695–001.

Discussion

By screening 29 unrelated PFBC patients by WES, we identified 11 families with biallelic mutations in the recently reported PFBC-causative gene *MYORG*, with an autosomal recessive pattern of inheritance (Yao *et al.*, 2018). This confirms that this gene is a major PFBC-causative gene. Here, we show that *MYORG* mutation carriers exhibit significant clinical and radiological differences as compared to AD-PFBC mutations carriers.

First, clinical penetrance was high in *MYORG* mutation carriers, with 15/16 patients being symptomatic in our study. Of note, the only asymptomatic patient was the youngest (28 years old). While previous studies have shown a wide clinical diversity within and between families harbouring mutations in *SLC20A2*, *PDGFB*, *PDGFRB* or *XPR1* (Nicolas *et al.*, 2013a, 2015) with psychiatric symptoms, cognitive impairment, and movement disorders equally distributed, *MYORG* patients exhibited a very homogenous clinical pattern with motor signs at the forefront. The cardinal presentation was dysarthria (100% of symptomatic patients), which possibly remained isolated before the development of additional features including akinetic-hyper-tonic syndrome (100%), cerebellar syndrome (66.6%), gait disorders of any origin and a pyramidal sign (86.6% each). In particular, pyramidal signs, with or without paresis, were reported to be quite uncommon among cases with other PFBC-causative mutations (Nicolas *et al.*, 2015). In the Yao *et al.* (2018) study, all six symptomatic patients with *MYORG* mutations had similar symptoms including slurred speech (6/6), ataxia (5/6), and chorea (1/6).

Second, this study also allowed the identification of a distinct radiological pattern including cerebellar atrophy and severe extensive calcifications encompassing the posterior fossa and, more specifically, the pons.

Although it was not possible to predict the clinical symptoms of AD-PFBC patients judging by the location and severity of brain calcifications, prominent speech, gait disorders and pyramidal signs in *MYORG* patients seem to be in line with the radiological features. Overall, this anatomo-clinical expression places *MYORG*-related PFBC

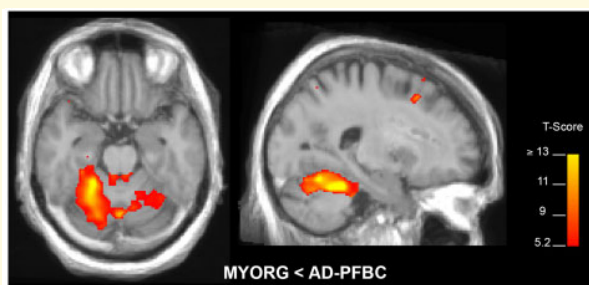


Figure 5 VBM analysis showing SPMs of structural differences in grey matter between *MYORG* and AD-PFBC gene mutation carriers. Analysis was performed using normalized T₁-weighted MRI scans in MNI space, taking total intracranial volume, age and sex as covariates. SPMs were superimposed on a normalized T₁-weighted mean image of all patients and thresholded at $P < 0.001$ uncorrected. Grey matter differences are colour coded (red-yellow) in terms of t-score as indicated on the colour bar (right).

on a crossroad between the spectrum of spinocerebellar ataxias (SCA) and primary brain calcification. Interestingly, a single pedigree has previously been reported with an autosomal dominant pattern of inheritance of dysarthria, ataxia and cerebellar atrophy with dentate calcifications, and even calcifications of the basal ganglia in some patients related to a duplication in 11q12.2-q12.3 (Knight *et al.*, 2004, 2008). However, the mechanisms leading to this disorder, named SCA20, remain unclear and both calcification and inheritance patterns appeared different from *MYORG* patients.

Pontine calcifications are a very rare entity and are usually associated with an underlying structural lesion such as pontine astrocytoma (Dierssen *et al.*, 1984), neurocysticercosis (Del Brutto and Del Brutto, 2013), vascular malformations (Krings *et al.*, 2003) or following radiation therapy (Price *et al.*, 1988). However, most of the time these calcifications are restricted to the posterior fossa. Only isolated cases of marked pontine calcifications have been reported with a genetic cause: *COL4A1* mutations (Livingston *et al.*, 2011) or Aicardi-Goutières syndrome (Kumar *et al.*, 1998). However, the clinical manifestations generally began in childhood, emphasizing a possibly higher specificity of *MYORG* mutations in adulthood discovery of pontine calcifications. Furthermore, several cases remained unsolved (Naderi *et al.*, 1993; Saito *et al.*, 2005; Stamelou *et al.*, 2013). Strikingly, of them, two presented with clinical and radiological features reminiscent of that of our *MYORG* patients. The first family comprised four brothers, one of whom was asymptomatic (31 years old). The other three (54, 49 and 27 years old) presented with cerebellar syndrome (3/3), dysarthria (2/3) and impaired gait (2/3) (Naderi *et al.*, 1993). CT scans showed cerebellar and basal ganglia calcifications in all of them and pons calcifications in two. The second report described a 41-year-old proband suffering from dysarthria, gait impairment and cerebellar syndrome. CT scans performed in the proband but also in two of her asymptomatic, younger brothers (36 and 32 years of age, respectively) revealed extensive symmetrical calcifications in the basal ganglia, dentate nucleus and pons for all of them (Smits *et al.*, 1983).

The cerebellar and brainstem tropism of the lesions related to *MYORG* mutations remains unknown. Such regional propensity might be determined by a specific expression of *MYORG* compared to AD-PFBC genes. Nevertheless, data based on microarrays in human brains issued from the Allen brain atlas (Sunkin *et al.*, 2013) showed apparently comparable patterns of expression in the pons and cerebellum between PFBC causative genes. Calcium-phosphate deposits in PFBC are typically observed within or adjacent to the vessel walls, in perivascular spaces (Morgante *et al.*, 1986; Miklossy *et al.*, 2005). Connections might be made with the pontine autosomal dominant microangiopathy with leukoencephalopathy entity (PADMAL), a small vessel disease caused by specific *COL4A1* mutations that also predominantly involves the pontine vessels (Verdura *et al.*, 2016). This location is also poorly understood in PADMAL, given the ubiquitous

expression of *COL4A1*. Thus, we may speculate that the pontine tropism in *MYORG* mutations is more related to vascular anatomical characteristics than the pattern of gene expression itself. It has been suggested that, of all areas of the brain, the pons displays the greatest degree of admixture of grey matter (containing more capillaries) and white matter, increasing its sensitivity to blood–brain disruption (Norenberg, 2010).

In addition, comparison with AD-PFBC genes and associated patterns of calcification (themselves correlated to ageing) could suggest a natural history of brain calcification progression throughout life (Nicolas *et al.*, 2015) not reaching a certain pattern and degree of severity in controls (Nicolas *et al.*, 2013a) and with a diversity of the ongoing process that would see *SLC20A2*, *XPR1* mutation carriers evolve more rapidly and *MYORG* mutation carriers evolve even quicker. Of note, *MYORG* mutation carriers might also show some distinct routes as suggested by a few patients not exhibiting caudate calcifications despite extensive locations in other brain regions.

Little is known about how *MYORG* mutations may cause brain calcifications and no autopsy case has yet been reported. Yao *et al.* (2018) suggested that *MYORG* was specifically expressed in astrocytes. A putative dysfunction of astrocytes might impair the neurovascular unit. However, it remains unclear how it would lead to calcium-phosphate deposits and putative ossification of the capillaries. In addition, pathophysiological links with the AD-PFBC genes, namely the phosphate transporters *SLC20A2* and *XPR1* and the growth factor *PDGFB* and its receptor *PDGFR β* remain to be understood (Vanlandewijck *et al.*, 2015).

One limit of our work is the clinical assessment. Because of the retrospective study design, we could not compare the clinical features (including motor, psychiatric and cognitive features) using dedicated scales. Hence, we identified the most prominent differences among genetic groups and more subtle and subclinical features may have been missed. More generally, prospective studies are lacking in the study of PFBC and would be necessary to confirm and better characterize this disease with a heterogeneous clinical presentation.

In AD-PFBC, movement disorders are mostly represented by akinetic-hypertonic syndrome starting after the age of 50 (Nicolas *et al.*, 2015). Paroxysmal motor symptoms have rarely been associated with PFBC in younger patients (Zhu *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2017). Here, one *MYORG* patient showed paroxysmal dyskinesia in his 20s, suggesting that this spectrum of movement disorder may concern young PFBC patients in general, although still rare.

Strikingly, three fathers of probands displayed non-diffuse calcifications. Neurological symptoms were reported in one. We cannot exclude that this was related to the *MYORG* heterozygous mutation or to a differential diagnosis. The presence of limited but abnormal calcifications in three fathers could be consistent with a semi-dominant inheritance pattern with incomplete penetrance, with

biallelic mutations explaining a severe and early clinico-radiological phenotype. Of note, 11/29 probands exhibited a biallelic mutation in our series. However, this may not represent the true diagnostic yield of this gene as these patients were selected prior to WES.

In conclusion, *MYORG* is the first PFBC causative gene leading to a recognizable phenotype associating (i) initial dysarthria followed by cerebellar and pyramidal syndromes with akinetic-hypertonic syndrome; (ii) extensive calcifications encompassing the brainstem and more specifically the pons; and (iii) cerebellar atrophy. The association of a prominent clinical and radiological tropism for ponto-cerebellar regions might place *MYORG*-related PFBC phenotypic features at the interface between PFBC and spinocerebellar ataxias.

Acknowledgements

We are grateful to the patients and family relatives as well as all referring clinicians. In particular, we would like to thank Thierry Pesque, Cécile Azais Vuillemin and Alain Destée.

Collaborators from the PFBC study group appear in Appendix 1.

Funding

This work was supported by grants from the French National Research Agency (CALCIPHOS, ANR-17-CE14-0008-02, to G.N.) and from Conseil Régional de Haute Normandie - APERC 2014 no. 2014-19 in the context of *Appel d'Offres Jeunes Chercheurs* (CHU de Rouen, to G.N.). This study was co-supported by European Union and Région Normandie, more specifically in the context of the Recherche Innovation Normandie (RIN 2018). Europe gets involved in Normandie with the European Regional Development Fund (ERDF).

Competing interests

The authors report no competing interests.

Supplementary material

Supplementary material is available at *Brain* online.

Appendix 1

Collaborators of the French PFBC study group

Full details are provided in the Supplementary material.

Pascal Favrole, Christophe Verny, Pierre Krystkowiak, Ludvine Chamard, Sébastien Moutton, Cyril Goizet, Claude Ferec, Serge Timsit, Stéphane Schaeffer, Nathalie Derache, Gilles Defer, Franck Durif, François Sellal, Olivier Rouaud, Christel Thauvin-Robinet, Stéphanie Cubizolle, Mathilde Sauvée, Amélie Leblanc, Alexis Demas, Alice Poisson, Elisabeth Tournier-Lasserre, Dominique Hervé, Hugues Chabriat, Guillaume Grolez, Nicolas Carriere, Luc Defebvre, Thibaud Lebouvier, Tatiana Witjas, Jean-Philippe Azulay, Frédérique Fluchere, Mira Didic, Karine Nguyen, Mahmoud Charif, Xavier Aygnac, Pierre Labauge, Caroline Lionnet, Cecilia Marelli-Tosi, Simon Gaud, Tiphaine Rouaud, Brice Laurens, Emmanuelle Folgoas, Bertrand Isidor, Jean Chiesa, Maud Pallix-Guyot, Nicolas Gaillard, Nadège Olivier, Snejana Jurici, Isabelle Marey, Perrine Charles, Claire Ewencyck, Alexandra Durr, Cécile Hubsch, Aurélie Meneret, Marie Vidailhet, Yann Nadjar, Isabelle Le Ber, David Grabli, Emmanuel Roze, Vincent Navarro, Sylvie Mecharles-Darrigol, Julien Lagarde, Marie Sarazin, Marc Vérin, Romain Lefaucheur, David Maltête, David Wallon, Didier Hannequin, Olivier Martinaud, Lucie Guyant-Maréchal, Gaël Nicolas, Thierry Frebourg, Anne-Claire Richard, Dominique Campion, Olivier Guillin, Marion Yger, Mathieu Anheim, Mathilde Renaud, Christine Tranchant, Gabrielle Rudolf, Benjamin Crétin, Martial Mallaret, Jérémie Pariente, Fabienne Ory-Magne.

References

- Anheim M, López-Sánchez U, Giovannini D, Richard A-C, Touhami J, N'Guyen L, et al. XPR1 mutations are a rare cause of primary familial brain calcification. *J Neurol* 2016; 263: 1559–64.
- Ashburner J, Friston KJ. Unified segmentation. *NeuroImage* 2005; 26: 839–51.
- Backenroth D, Homsy J, Murillo LR, Glessner J, Lin E, Brueckner M, et al. CANOES: detecting rare copy number variants from whole exome sequencing data. *Nucleic Acids Res* 2014; 42: e97.
- David S, Ferreira J, Quenez O, Rovelet-Lecrux A, Richard A-C, Verin M, et al. Identification of partial *SLC20A2* deletions in primary brain calcification using whole-exome sequencing. *Eur J Hum Genet* 2016; 24: 1630–4.
- Del Brutto OH, Del Brutto VJ. Isolated brainstem cysticercosis: a review. *Clin Neurol Neurosurg* 2013; 115: 507–11.
- Dierssen G, Figolls J, Trigueros F, Vazquez A. A pontine astrocytoma with radiological evidence of very extensive and dense calcification. Case report. *Neurochirurgia (Stuttg)* 1984; 27: 190–2.
- Keller A, Westenberger A, Sobrido MJ, Garcia-Murias M, Domingo A, Sears RL, et al. Mutations in the gene encoding PDGF-B cause brain calcifications in humans and mice. *Nat Genet* 2013; 45: 1077–82.
- Knight MA, Gardner RJM, Bahlo M, Matsuura T, Dixon JA, Forrest SM, et al. Dominantly inherited ataxia and dysphonia with dentate calcification: spinocerebellar ataxia type 20. *Brain J Neurol* 2004; 127: 1172–81.
- Knight MA, Hernandez D, Diede SJ, Dauwese HG, Rafferty I, van de Leemput J, et al. A duplication at chromosome 11q12.2–11q12.3 is associated with spinocerebellar ataxia type 20. *Hum Mol Genet* 2008; 17: 3847–53.
- Krings T, Foltys H, Meister IG, Reul J. Hypertrophic olivary degeneration following pontine haemorrhage: hypertensive crisis or

- cavernous haemangioma bleeding? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003; 74: 797–9.
- Kumar D, Rittey C, Cameron AH, Variend S. Recognizable inherited syndrome of progressive central nervous system degeneration and generalized intracranial calcification with overlapping phenotype of the syndrome of Aicardi and Goutieres. *Am J Med Genet* 1998; 75: 508–15.
- Legati A, Giovannini D, Nicolas G, López-Sánchez U, Quintáns B, Oliveira JRM, et al. Mutations in XPR1 cause primary familial brain calcification associated with altered phosphate export. *Nat Genet* 2015; 47: 579–81.
- Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, Samocha KE, Banks E, Fennell T, et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature* 2016; 536: 285–91.
- Livingston J, Doherty D, Orcesi S, Tonduti D, Piechiecchio A, La Piana R, et al. COL4A1 mutations associated with a characteristic pattern of intracranial calcification. *Neuropediatrics* 2011; 42: 227–33.
- Manyam BV, Walters AS, Narla KR. Bilateral striopallidodentate calcinosis: clinical characteristics of patients seen in a registry. *Mov Disord* 2001; 16: 258–64.
- Miklossy J, Mackenzie IR, Dorovini-Zis K, Calne DB, Wszolek ZK, Klegeris A, et al. Severe vascular disturbance in a case of familial brain calcinosis. *Acta Neuropathol (Berl)* 2005; 109: 643–53.
- Morgante L, Vita G, Meduri M, Di Rosa AE, Galatioto S, Coraci MA, et al. Fahr's syndrome: local inflammatory factors in the pathogenesis of calcification. *J Neurol* 1986; 233: 19–22.
- Naderi S, Colakoglu Z, Luleci G. Calcification of basal ganglia associated with pontine calcification in four cases: a radiologic and genetic study. *Clin Neurol Neurosurg* 1993; 95: 155–7.
- Nicolas G, Charbonnier C, Champion D, Veltman JA. Estimation of minimal disease prevalence from population genomic data: application to primary familial brain calcification. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2018; 177: 68–74.
- Nicolas G, Charbonnier C, de Lemos RR, Richard A-C, Guillin O, Wallon D, et al. Brain calcification process and phenotypes according to age and sex: lessons from SLC20A2, PDGFB, and PDGFRB mutation carriers. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2015; 168: 586–94.
- Nicolas G, Pottier C, Charbonnier C, Guyant-Marechal L, Le Ber I, Pariente J, et al. Phenotypic spectrum of probable and genetically-confirmed idiopathic basal ganglia calcification. *Brain* 2013a; 136: 3395–407.
- Nicolas G, Pottier C, Maltete D, Coutant S, Rovelet-Lecrux A, Legallic S, et al. Mutation of the PDGFRB gene as a cause of idiopathic basal ganglia calcification. *Neurology* 2013b; 80: 181–7.
- Norenberg MD. Central pontine myelinolysis: historical and mechanistic considerations. *Metab Brain Dis* 2010; 25: 97–106.
- Price DB, Hotson GC, Loh JP. Pontine calcification following radiotherapy: CT demonstration. *J Comput Assist Tomogr* 1988; 12: 45–6.
- Ramos A, Quintana F, Diez C, Leno C, Berciano J. CT findings in spinocerebellar degeneration. *AJNR Am J Neuroradiol* 1987; 8: 635–40.
- Ramos EM, Carecchio M, Lemos R, Ferreira J, Legati A, Sears RL, et al. Primary brain calcification: an international study reporting novel variants and associated phenotypes. *Eur J Hum Genet* 2018; 26: 1462–77.
- Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015; 17: 405–24.
- Ridgway GR, Henley SMD, Rohrer JD, Scchill RI, Warren JD, Fox NC. Ten simple rules for reporting voxel-based morphometry studies. *NeuroImage* 2008; 40: 1429–35.
- Saito Y, Shibuya M, Hayashi M, Matsuoka S, Kaneko K, Chikumaru Y, et al. Cerebellopontine calcification: a new entity of idiopathic intracranial calcification? *Acta Neuropathol (Berl)* 2005; 110: 77–83.
- Smits MG, Gabreels FJ, Thijssen HO, 't Lam RL, Notermans SL, ter Haar BG, et al. Progressive idiopathic strio-pallido-dentate calcinosis (Fahr's disease) with autosomal recessive inheritance. Report of three siblings. *Eur Neurol* 1983; 22: 58–64.
- Stamelou M, Adams M, Davagnanam I, Batla A, Sheerin U, Talbot K, et al. Progressive ataxia and palatal tremor associated with dense pontine calcification: a unique case. *Mov Disord* 2013; 28: 1155–7.
- Sunkin SM, Ng L, Lau C, Dolbeare T, Gilbert TL, Thompson CL, et al. Allen Brain Atlas: an integrated spatio-temporal portal for exploring the central nervous system. *Nucleic Acids Res* 2013; 41: D996–1008.
- Vanlandewijck M, Lebouvier T, Andaloussi Mae M, Nahar K, Hornemann S, Kenkel D, et al. Functional characterization of germline mutations in PDGFB and PDGFRB in primary familial brain calcification. *PLoS One* 2015; 10: e0143407.
- Verdura E, Hervé D, Bergametti F, Jacquet C, Morvan T, Prieto-Morin C, et al. Disruption of a miR-29 binding site leading to COL4A1 upregulation causes pontine autosomal dominant microangiopathy with leukoencephalopathy: COL4A1 upregulation in PADMAL. *Ann Neurol* 2016; 80: 741–53.
- Wang C, Li Y, Shi L, Ren J, Patti M, Wang T, et al. Mutations in SLC20A2 link familial idiopathic basal ganglia calcification with phosphate homeostasis. *Nat Genet* 2012; 44: 254–6.
- Wang C, Ma X, Xu X, Huang B, Sun H, Li L, et al. A PDGFB mutation causes paroxysmal nonkinesigenic dyskinesia with brain calcification: letters: new observations. *Mov Disord* 2017; 32: 1104–6.
- Yao X-P, Cheng X, Wang C, Zhao M, Guo X-X, Su H-Z, et al. Biallelic mutations in MYORG cause autosomal recessive primary familial brain calcification. *Neuron* 2018; 98: 1116–23.e5.
- Zhu M, Zhu X, Wan H, Hong D. Familial IBGC caused by SLC20A2 mutation presenting as paroxysmal kinesigenic dyskinesia. *Parkinsonism Relat Disord* 2014; 20: 353–4.

Co-investigators of the French PFBC study group

Aix-en-Provence Hospital, Department of Neurology: Pascal Favrole

Angers University Hospital, Department of Neurology: Christophe Verny

Amiens University Hospital, Department of Neurology: Pierre Krystkowiak

Besançon University Hospital, Department of Neurology: Ludivine Chamard

Bordeaux University Hospital: François Tison (Department of Neurology), Sébastien Moutton, Cyril Goizet (Department of Genetics)

Brest University Hospital: Claude Ferec (Department of Genetics), Serge Timsit (Department of Neurology)

Caen University Hospital, Department of Neurology: Stéphane Schaeffer, Nathalie Derache, Gilles Defer

Clermont Ferrand University Hospital, Department of Neurology: Franck Durif

Colmar Hospital, Department of Neurology: François Sellal

Dijon University Hospital: Olivier Rouaud (Department of Neurology), Christel Thauvin-Robinet (Department of Genetics)

French Polynesia Hospital, Papeete, Departement of Neurology: Stéphanie Cubizolle

Grenoble University Hospital, Department of Neurology: Mathilde Sauvée

Hôpital d'Instruction des Armées, Department of Neurology, Brest: Amélie Leblanc

Le Havre Hospital, Department of Neurology: Alexis Demas

Le Vinatier Hostpital, Bron, France: Alice Poisson

Lariboisière University Hospital, AP-HP, Paris, Department of Genetics: Elisabeth Tournier-Lasserre, Dominique Herbé, Hugues Chabriat

Lille University Hospital, Department of Neurology: Guillaume Grolez, Nicolas Carriere, Luc Defebvre, Thibaud Lebouvier

Marseille University Hospital, Timone Hospital: Tatiana Witjas, Jean-Philippe Azulay, Frédérique Fluchere, Mira Didic (Department of Neurology), Karine Nguyen (Department of Genetics)

Montpellier University Hospital, Department of Neurology: Mahmoud Charif, Xavier Ayrygnac, Pierre Labauge, Caroline Lionnet, Cecilia Marelli-Tosi

Nancy University Hospital, Department of Neurology: Simon Gaud

Nantes University Hospital: Tiphaine Rouaud, Brice Laurens, Emmanuelle Folgoas (Department of Neurology), Bertrand Isidor (Department of Genetics)

Nimes University Hospital, Department of Genetics: Jean Chiesa

Orléans Hospital, Department of Neurology: Maud Pallix-Guyot

Perpignan Hospital, Department of Neurology: Nicolas Gaillard, Nadège Olivier, Snejana Jurici

Pitié-salpêtrière University Hospital, AP-HP, Paris: Isabelle Marey, Perrine Charles, Claire Ewencyck, Alexandra Durr (Department of Genetics), Cécile Hubsch, Aurélie Meneret, Marie Vidailhet, Yann Nadjar, Isabelle Le Ber, David Grabli, Emmanuel Roze (Department of Neurology), Vincent Navarro (Department of Clinical Neurophysiology)

Pointes-à-Pitres University Hospital, Department of Neurology: Sylvie Mecharles-Darrigol

Saint-Anne University Hospital, AP-HP, Paris: Julien Lagarde, Marie Sarazin

Rennes University Hospital, Department of Neurology: Marc Vérin

Rouen University Hospital: Romain Lefaucheur, David Maltête, David Wallon, Didier Hannequin, Olivier Martinaud (Department of Neurology), Lucie Guyant-Maréchal, Gaël Nicolas, Thierry Frebourg, Anne-Claire Richard (Department of Genetics)

Rouvray Psychiatric Hospital, Sotteville-lès-Rouen: Dominique Campion, Olivier Guillin

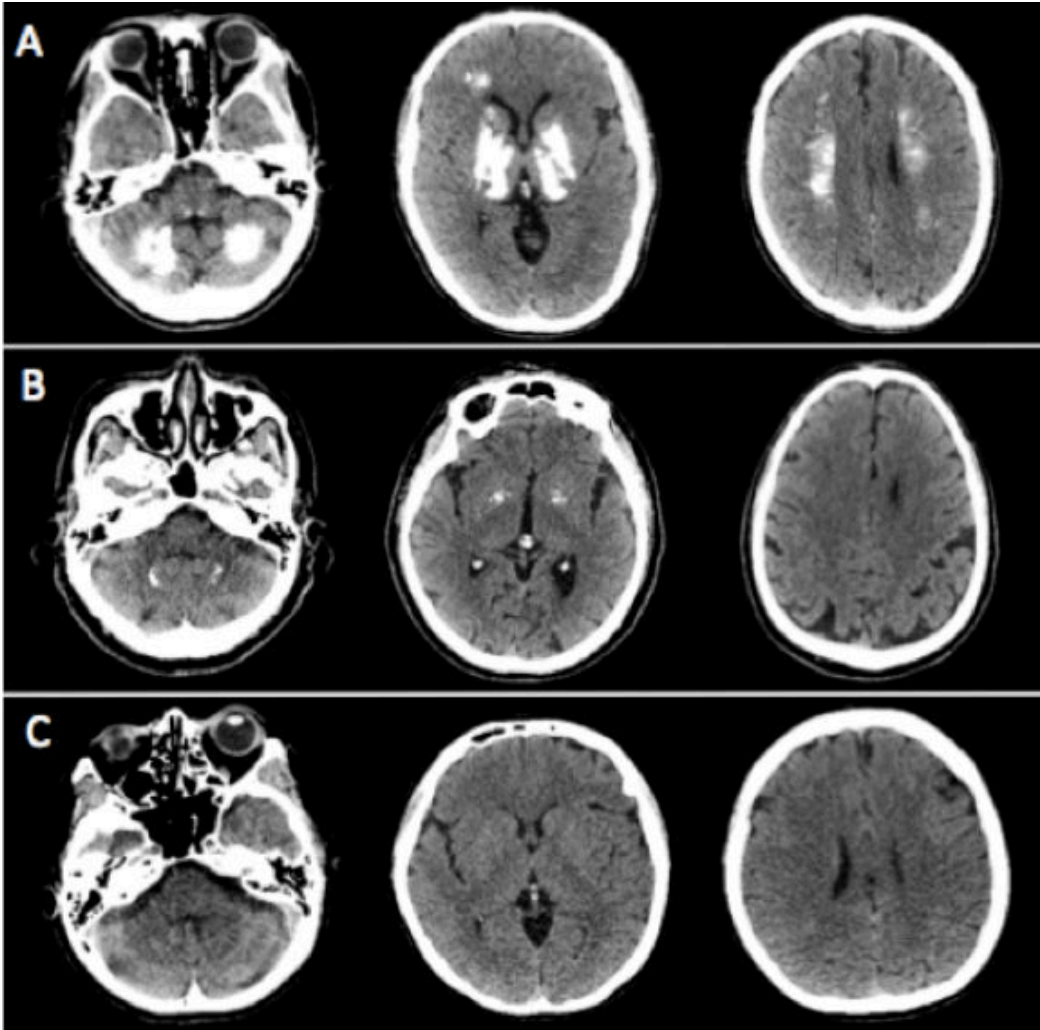
Saint-Antoine Hospital, AP-HP, Paris, Department of Neurology: Marion Yger

Strasbourg University Hospital, Department of Neurology: Mathieu Anheim, Mathilde Renaud, Christine Tranchant, Gabrielle Rudolf, Benjamin Créatin, Martial Mallaret

Toulouse University Hospital, Department of Neurology: Jérémie Pariente, Fabienne Ory-Magne

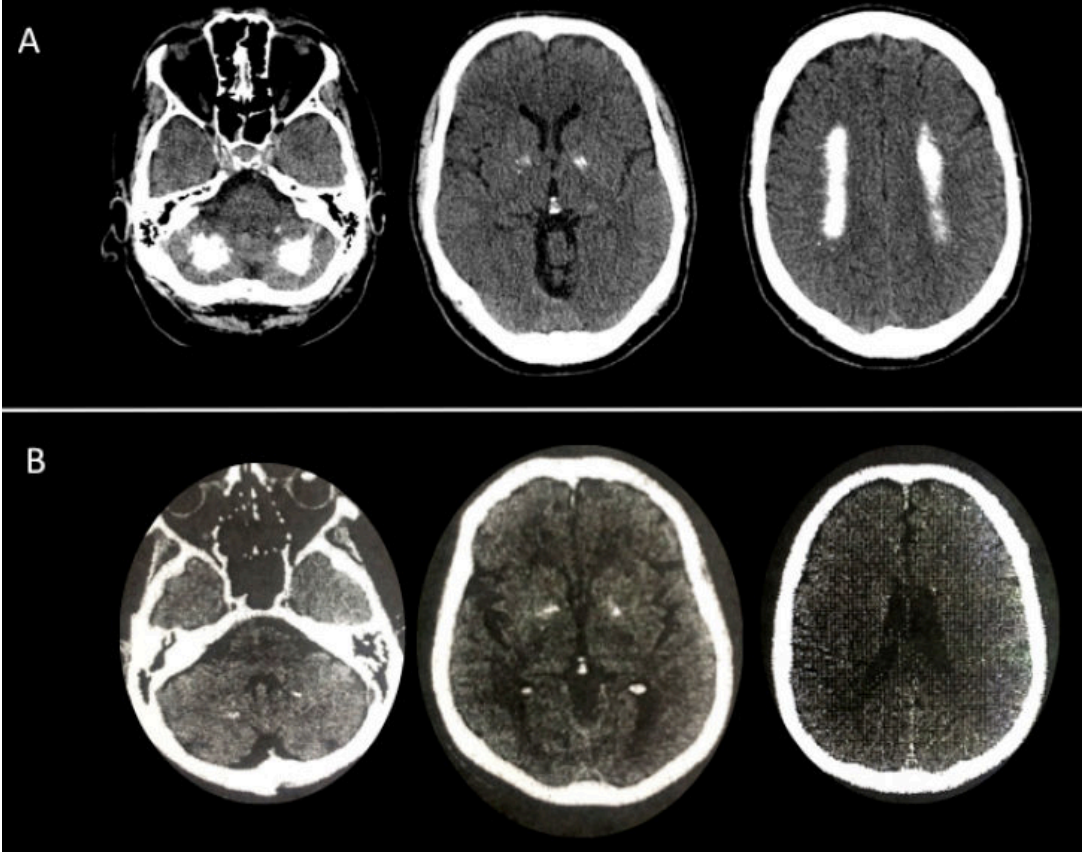
Supplementary figure 1. Imaging of Family EXT 1162

A: CT scan of the proband 1162-001, carrying compound heterozygous mutations; B: CT scan of the father of the proband; C: CT scan of the mother of the proband.



Supplementary figure 2. Imaging of Family EXT 756

A: CT scan of the proband 756-001, carrying compound heterozygous mutations; B: CT scan of the father of the proband



Supplementary table 1. Clinical details of MYORG mutation carriers.

ID Case	Movement Disorders	Akinetic-hypertonic syndrome	Tremor	Chorea	Dystonia	Other	Cognitive	Dysexecutive	Memory impairment	Psychiatric signs	Mood	Other	Disarthria	Cerebellar signs	Gait	Pyramidal signs	Spasticity	Motor weakness
805 001	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0
805 002	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0
428 001	1	1	0	0	0	0	0			1	1	0	1	1	1	1	0	0
695 001	0				0	0	0			0			0	0	0	0		
439 001	1	1	0	0	0	0	0			1	1	0	1	1	1	1	1	NA
753 001	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0
505 001	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0			1	1	1	1	1	1
756 001	1	1	0	0	0	0	0			1	1	0	1	1	1	1	0	0
756 003	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0			1	0	1	0		
321 001	1	1	1	1	1	0	0			1	1	0	1	1	1	1	0	0
321 002	1	1	0	0	0	0	0			0			1	1	1	1	1	1
321 003	1	1	0	1	1	0	1	1	0	NA			1	NA	1	1	0	0
1162 001	1	1	0	0	1	1	0			0			1	0	0	0		
1385 001	1	1	0	0	0	0	NA			NA			1	1	1	1	0	0
990 001	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
990 002	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0			1	0	0	1	NA	NA

Supplementary table 2. Details of mutations in the AD-PFBC comparison group (n=102)

Gene	Family Identification	ID Case	Mutation type	Exon / Intron*	c.DNA*	Protein*	Mutation Class ACMG	Reference
PDGFB	EXT 747	EXT 747 001	Splice	Intron 1	c.64-3C>G	p.?	5	Nicolas et al., 2015
		EXT 747 002						
		EXT 747 003						
PDGFB	ROU 1046	ROU 1046 001	Intragenic large deletion	Exon 3-5	NA	NA	5	Nicolas et al., 2015
PDGFB	EXT 692	EXT 692 001	Missense	Exon 4	c.283G>A	p.Ala95Thr	3	Nicolas et al., 2015
PDGFB	EXT 621	EXT 621 001	Missense	Exon 4	c.328C>G	p.Leu110Val	3	Nicolas et al., 2015
PDGFB	EXT 433	EXT 433 001	Nonsense	Exon 4	c.439C>T	p.Gln147*	5	Nicolas et al., 2015
PDGFB	ALZ 159	ALZ 159 003	Stop loss	Exon 6	c.726G>C	p.*242TyrExt*89	5	Nicolas et al., 2015 Keller et al., 2013
		ALZ 159 010						
		ALZ 159 012						
		ALZ 159 013						
		ALZ 159 014						
		ALZ 159 017						
		ALZ 159 018						
		ALZ 159 023						
ALZ 159 020								
PDGFB	EXT 1251	EXT 1251 001	Stop loss	Exon 7	c.724T>C	p.*242GlnExt*89	5	Ramos et al., 2018
PDGFB	ROU 5019	ROU 5019 001	Stop loss	Exon 6	c.726G>C	p.*242TyrExt*89	5	Ramos et al., 2018
PDGFB	EXT 929	EXT 929 003	Missense	Exon 4	c.394G>C	p.Gly132Arg	4	Ramos et al., 2018
PDGFB	EXT 1196	EXT 1196 001	Nonsense	Exon 4	c.445C>T	p.Arg149*	5	Ramos et al., 2018
PDGFB	EXT 1361	EXT 1361 001	Intragenic large deletion	Exons 2-3-4	NA	NA	5	novel
PDGFB	ROU 1184	ROU 1184 001	Missense	Exon 4	c.425G>A	p.Arg142His	3	Ramos et al., 2018

<i>PDGFB</i>	EXT 1419	EXT 1419 001	Missense	Exon 4	c.394G>C	p.Gly132Arg	3	novel
<i>PDGFB</i>	ROU 5116	ROU 5116 001	Missense	Exon 4	c.283G>A	p.Ala95Thr	3	novel
<i>PDGFB</i>	EXT 1494	EXT 1494 001	Nonsense	Exon 5	c.571C>T	p.Arg191*	5	novel
<i>PDGFB</i>	EXT 929	EXT 929 001	Missense	Exon 4	c.394G>C	p.Gly132Arg	4	novel
<i>PDGFRB</i>	ROU 1060	ROU 1060 001	Missense	Exon 22	c.2959C>T	p.Arg987Ttp	4	Nicolas et al., 2015
		ROU 870 001						
		ROU 870 004						
		ROU870 006						
		ROU 870 007						
		ROU 870 017						
		ROU 870 020						
<i>PDGFRB</i>	ROU 870	ROU 870 555	Missense	Exon 14	c.1973T>C	p.Leu658Pro	5	Nicolas et al., 2013
		ROU 870 021						
		ROU 870 014						
		ROU 870 016						
		ROU 870 024						
		ROU 870 002						
		ROU 870 027						
<i>SLC20A2</i>	ROU 1352	ROU 1352 001	Missense	Exon 2	c.82G>A	p.Asp28Asn	5	Nicolas et al., 2015
		DFT CAE 752 001						
		DFT CAE 752 002						
<i>SLC20A2</i>	DFT CAE 752	DFT CAE 752 003	Splice	Intron 3	c.431-1G>T	p.?	5	Nicolas et al., 2015
		DFT CAE 752 00X						
<i>SLC20A2</i>	ROU 1038	ROU 1038 001	Missense	Exon 5	c.551C>T	p.Pro184Leu	4	Nicolas et al., 2015
		ROU 1038 002						
		ROU 1038 003						
<i>SLC20A2</i>	ROU 1147	ROU 1147 001	Missense	Exon 5	c.560A>G	p.Tyr187Cys	3	Nicolas et al., 2015
		ROU 1147 003						

SLC20A2	EXT 485	EXT 485 001	Missense	Exon 5	c.581A>G	p.Asn194Ser	4	Nicolas et al., 2015
		EXT 485 003						
SLC20A2	EXT 625	EXT 625 001	Frameshift	Exon 7	c.750del	p.Ala251LeuFs*67	5	Nicolas et al., 2015
		EXT 898 001 ROU 5000 001						
SLC20A2	898	EXT 898 001	Frameshift	Exon 8	c.1138del	p.Leu380CysFs*75	5	Nicolas et al., 2015
		DFT CAE 424 001						
SLC20A2	DFT CAE 424	DFT CAE 424 001	Frameshift	Exon 9	c.1527delT	p.Asn509LysFs*7	5	Nicolas et al., 2015
		EXT 413 001						
SLC20A2	EXT 413	EXT 413 001	Missense	Exon 10	c.1711G>A	p.Gly571Ser	3	Nicolas et al., 2015
		EXT 794 001						
SLC20A2	EXT 794	EXT 794 001	Frameshift	Exon 10	c.1755-1768del	p.Asn587SerFs*7	5	Nicolas et al., 2015
		EXT 1026 001						
SLC20A2	EXT 1026	EXT 1026 001	Missense	Exon 8	c.1506C>A	p.His502Gln	3	Hsu et al., 2013
		EXT 1026 002						
SLC20A2	EXT 945	EXT 945 001	Frameshift	Exon 3	c.382del	p.Val1285Serfs*43	5	Ramos et al., 2018
		EXT 451 001						
SLC20A2	EXT 451	EXT 451 001	Intragenic large deletion	exons 4-5	del	NA	5	David et al., 2016
		EXT 451 002						
SLC20A2	Family EXT 434	EXT LAC 434 001	Intragenic large deletion	exons 4	del	NA	5	David et al., 2016
		EXT LAC 434 002						
SLC20A2	ROU 1129	ROU 1129 001	Intragenic large deletion	exon 2	del	start loss	5	David et al., 2016
		ROU 1129 002						
		ROU 1129 003						
SLC20A2	DFT SAL 383	DFT SAL 383 003	Intragenic large deletion	exon 2	del	start loss	5	David et al., 2016
		ROU 375 001						
		ROU 375 002						
		ROU 375 003						
		ROU 375 004						
SLC20A2	ROU 375	ROU 375 001	Missense	Exon 5	c.551C>T	p.Pro184Leu	4	Ramos et al., 2018
		ROU 375 002						
		ROU 375 003						
		ROU 375 004						
		EXT 1138 001						
SLC20A2	EXT 1138	EXT 1138 001	Frameshift	Exon 10	c.1755-1768del	p.Asn587SerFs*7	5	Ramos et al., 2018
		ROU 5028 001						
SLC20A2	ROU 5028	ROU 5028 001	Nonsense	Exon 8	c.1158C>A	p.Tyr386*	5	Ramos et al., 2018
		EXT 1118 001						
SLC20A2	EXT 1118	EXT 1118 001	Nonsense	Exon 8	c.1158C>A	p.Tyr386*	5	Ramos et al., 2018
		EXT 1083 001						
SLC20A2	EXT 1083	EXT 1083 001	Nonsense	Exon 8	c.1207C>T	p.Arg403*	5	Ramos et al., 2018
		EXT 1063 001						
SLC20A2	EXT 1063	EXT 1063 001	Nonsense	Exon 8	c.1426G>T	p.Glu476*	5	Ramos et al., 2018
		EXT 1136 001						
SLC20A2	EXT 1136	EXT 1136 001	Splice	intron 8	c.1524-2A>G	p.?	5	Ramos et al., 2018
		EXT 1136 001						

SLC20A2	EXT 1132	EXT 1132 001	Missense	Exon 3	c.290G>A	p.Gly97Asp	3	Ramos et al., 2018
SLC20A2	EXT 878	EXT 878 001	Splice	intron 2	c.289+5G>A	p.?	3	Ramos et al., 2018
SLC20A2	EXT 1020	EXT 1020 001	Missense	Exon 11	c.1871T>A	p.Val624Glu	3	Ramos et al., 2018
SLC20A2	EXT 1146	EXT 1146 001	Missense	Exon 5	c.581A>G	p.Asn194Ser	4	Ramos et al., 2018
SLC20A2	EXT 1180	EXT 1180 001	Splice	Intron 6	c.730+1G>T	p.?	5	Ramos et al., 2018
SLC20A2	EXT 1291	EXT 1291 001	Nonsense	Exon 2	c.149T>G	p.Leu50*	5	Ramos et al., 2018
SLC20A2	EXT 1318	EXT 1318 001	Missense	Exon 8	c.1532G>A	p.Ser508Asn	3	Ramos et al., 2018
SLC20A2	EXT 1235	EXT 1235 001	Missense	Exon 10	c.1753G>A	p.Ala585Thr	4	Ramos et al., 2018
SLC20A2	EXT 1359	EXT 1359 001	Frameshift	Exon 8	c.1152_1153del	p.(Asn384Lysfs*30)	4	novel
SLC20A2	EXT 1571	EXT 1571 001	Splice	Intron 2	c.290-1G>C	?	5	novel
SLC20A2	EXT 1353	EXT 1353 001	Missense	Exon 9	c.1703C>T	p.Pro568Leu	4	novel
SLC20A2	EXT 1610	EXT 1610 001	Intragenic large deletion	Exons 6-7	del exons 6-7	del exons 6-7	4	novel
XPR1	ROU 1025	ROU 1025 001	Missense	Exon 4	c.407G>A	p.Ser136Asn	5	Legati et al., 2015
XPR1	EXT 895	EXT 895 001	Missense	Exon 4	c.434T>C	p.Leu145Pro	5	Legati et al., 2015
		EXT 895 002						
XPR1	EXT 685	EXT 685 001	Missense	Exon 6	c.653T>C	p.Leu218Ser	5	Legati et al., 2015
XPR1	EXT 955	EXT 955 001	Missense	Exon 4	c.419T>C	p.Pro140Leu	5	Legati et al., 2015
XPR1	EXT 1003	EXT 1003 0001	Missense	Exon 4	c.260T>C	p.Leu87Pro	5	Anheim et al., 2016 Ramos et al., 2018
XPR1	EXT 1187	EXT 1187 001	Missense	Exon 4	c.434T>C	p.Leu145Pro	5	Ramos et al., 2018
XPR1	EXT 1219	EXT 1219 001	Missense	Exon 14	c.1855A>G	p.Asn619Asp	4	Ramos et al., 2018
XPR1	ROU 5059	ROU 5059 001	Missense	Exon 11	c.1375C>T	p.Arg459Cys	4	Ramos et al., 2018
XPR1	ROU 5075	ROU 5075 001	Missense	Exon 14	c.1886T>G	p.Ile629Ser	4	novel

Supplementary table 3. Demographic and clinical characteristics of patients carrying XPR1 variants

Family ID	ID Case	c.DNA	Protein effect	Sex	Age at onset	Inaugural symptom	Clinical summary
ROU-5075	ROU 5075 001	c.1886T>G	p.Ile629Ser	Female	42	Sensitive disorder and subjective complaints	Left sided paresthesia on upper limb and face. Motor fatigability with no objective signs upon examination. Migraine.
ROU-1025	ROU 1025 001	c.407G>A	p.Ser136Asn	Male	66	Memory impairment	Memory impairment, dysexecutive syndrome, behavioral disorders, ataxic dysarthria.
EXT-895	EXT 895 001	c.434T>C	p.Leu145Pro	Female	63	Psychotic signs	Visual hallucinations. Akinetic-hypertonic syndrome with orofacial dyskinesia and dysexecutive syndrome two years after, gait disorder.
	Male			44	Mood disorder	Recurrent depressive episodes, development of mild akinetic-hypertonic syndrome with tremor, initially attributed to neuroleptic prolonged intake. Dysarthria.	
EXT-685	EXT 685 001	c.653T>C	p.Leu218Ser	Female	56	Dysexecutive signs	Dysexecutive signs with no worsening over time (3 years follow-up).
EXT-955	EXT 955 001	c.419T>C	p.Pro140Leu	Female	73	One loss of consciousness	One loss of consciousness (possible seizures). Moderate akinetic-hypertonic syndrome, dysexecutive signs and behavioural disorders.
EXT-1003	EXT 1003 001	c.260T>C	p.Leu87Pro	Male	33	Writing difficulties	One episode of hallucinations was noted two years before. Slowly progressive writing difficulties, dysarthria, concentration deficit, dysexecutive syndrome, akinetic-hypertonic syndrome with tremor, cerebellar ataxia.
EXT-1187	EXT 1187 001	c.434T>C	p.Leu145Pro	Male	29	Memory impairment and behavioral disorder	Memory impairment and behavioral disorders. Akinetic-hypertonic syndrome with tremor 20 years after with more severe cognitive impairment and dysarthria.
	Female			38	Parkinsonism	Bradykinesia requiring wheelchair, psychomotor slowing	
EXT-1219	EXT 1219 001	c.1855A>G	p.Asn619Asp	Male	69	Gait disorder	Sudden gait disorder with hearing loss, mild cerebellar ataxia.
ROU-5059	ROU 5059 001	c.1375C>T	p.Arg459Cys	Male	55	Parkinsonism	Asymmetric tremor of the left upper limb, followed three years after by L-Dopa responsive akinetic-hypertonic syndrome. History of mild intellectual disability of unknown cause.

MYORG (KIAA1161)

>chr9:34370327-34373358

TAACACTAAGAAAACACACGTTCTAAGTGTGGTGGGGGCTATTTGGAGACCTT
AAATAAGATCAAGTCCCCACCTAAGATGGACAAAGATGGCCACGAAAGCCAGG
AGGGGGAGGTTTCTCTTTGTGCTTTTAAACCCCAACCATGTATAACCATGTAT
AACAGGAAGAGAGCTGACCTTTTTCTCTAAGCTCTCTGGCTTCCACCCAGG
GAAGAGGTTTCTGCAGATTGGTGTGAGTGTGGGGGTGGAAAGGGCACAGTAAG
GATTGTGCGTTGGAGCAGGAGATTGCTTCAGTGCCCCCTCCCTAGGCCCCACC
TTCAGCAGCTGGTTCAGCACATTTAAGTCAGCAGCCACTTAATGGGTGGTAT
AGAGG**T**GGGAGGTTCTGAGGTACATGGTGCGGGTGTGACGG**AGGGTTCAAG**
GTCTGCATGAAGACTGGGGGCTTTGCGGTTACCGGGCCCTGGGCTGGG**TCAGG**
ACGCCAGGTAAAGTAGGCGATCTCATCCAGGTCGACCGGGTAATCGGTGAGC
AGCACCGGCGTCTTGTCGAAAAGCTCACCCCTGTAGCTGCGCCACTTGCCGGC
GGGCAAATAGACGTCGCGCTCCTGCTTGCCTGGCTCCAGCACCGGGGCCACAA
GCAGCGTGTCCCC**A**TAAGGAACTGCGAGTCGATACGGTGAGCTGTCTCGTCCG
CCGGGCGCAATCCACCAAAGGGGGCGCACGATAGGGTCACCCGTGTCCGGTGAC
CTCGCCCGCC**A**GCTCAAGCAACAGCGGTGCCACAAGCGAGGCC**G**CAGGGCGG
CGAACTTCTGCGCGATGGCCACCACTTCCGCGTCGTAGCGCCAGGGCGGGATA
GAGAACTGCATGGCCGGCATAAAGGCGGCCACTTCCAGCCAGCGAATGTAGAG
CTCGCGCTCGGGCACATCGCCGCCGGCTGTCCGCTGGGGCACGGCGTTGCCGC
CCACCATATCGGGTAGGATGAATGGGTAGCCAGCATGCTGACGGTGAGCACC
GCGGGGATGAGTGAGCGCAACCCAGGTCGTAGCCCC**ACACAGAGTCGCGATC**
CACCAGGCGGAAGAAGC**AGG**AGAT**TGTTCTGTGACTGGTAGCCT**ACGCGCACCT
CCGCCAGCGAGAAGAA**G**GGCAGCGCCATCTCAGTGTAGCGCCGGCTCCAGACG
CTGGGGTCCGGCAGCGGCCGGTAG**G**TGCTGAAGTCCCGCGGCAGGTAGCTGAC
CTCG**C**CCGCGTCGAACTTGAAGGAAGCCACGGAGTAGCGAGAGCGCAGCCGCC
GCAGGTGTCCCTGGAACCAGTCGCGGGCCTTTGGGTGCGTGAAGTCTAGCACC
GCGCCGATGCCGTTCCACCCGCAGCGCACCCAGCGCAGGTAACCGGCCCGTGGG
TTCGCGCACGAACAGCTCGCGCTCCACGCCCTCGCCGAAGCGCGACGAGTTGT
AGTTGACAAAAGGGTGCACCCAGAGCGTGACGCGG**A**AGCCGGCGTCGCGCAGG
CGGCGGAACATGTCGCTG**G**CGTTGGGGAATTTGACCTCATCGAAGTCGAAGTC
GCCAT**A**AGCAGGTGTGTACATGTCGTCGATTTCCAGGTGGCTGCTGTTGAAGT
GGTGCAGGCGGATCTGTTGGGCAAACGCAGCACCTTGTCTGGTCCACGGCG
CGCCCGTACAGCGCCCATGTGG**CCAAATGGGGTCTCGGAAGG**CCTCGGGTGC
TGGCACCCTTGACGGC**TTGTTGAAGTAGCGACGCAC**CATGTACTTGTGGATGG
AGGTGACGTCTGAGCCCACGCACACTCGGTAGCTCAGCTCTGGCGCTGCGGCG

CGGCCGGCGGGTGGCTTGTAGGGCGTGTCTGGTAGCGCGCCTGAAGCCGCAG
CGAGCGCTCCGTGCTGTTCCAGCCCAGGTGGAAGGGCACTGAGTCATTGACTT
TGATGGCGGCCGCGCGCGAAGATAGCCAGTAGCGCTCGAGGATGCCCCAAAC
GCGGCGTCGGAGGAGTAGACATCGCTGGTGACGAACGGCTGGGGCTCCTGCTG
GCCATCCAGGC**GGATGGGCCAGTGTTCGCTCCTCATCTCGGCGCCACCATAACC**
AGTGGGCCCGCCGCTCGCCCAAGAACATGGCGTGCTCCACGGCCCCGGCCCGC
GCTGCCTCCTCCAGCGCACGCGGTAGCACATGACCGTGTCTTGGGCCGCAC
AGT**CTGGATGAAGAAGTGCAGCG**GCAGCCCGTTCGGCCGTGAGCGAGCAGCCCA
GCAGGGCGCCATCGCGGCTGCAGGAGTCAAGGTCCAGCGCGCCGGA**GCGGAAG**
GCCAGGCGGAAGACCTGCTCTCCCTT**CTGATTGCGGATGGAGAAGC**CGCCAGC
TTTCAGGTCCAGCAGCTCCGCGCGAAGTCGCTCCGCCTTGCCTAGGGAGACGC
TGTAGTAGCACCAGGCCACCACCGCGGCCAGCACAAAGCAGCAGCCCCAGAACC
GCGGAGCCCAGCAGCGGCTTCAG**G**TCTTTGGAAGGCTTGGGCTTGGCAGGTGA
GAAGTTGTCGGGCAGGAAGGTGTACATAGCTGCGGCTGCGATGGCCTCGGGGT
TCTGACG**G**TATGCGTAGCAGCCAGGCCGGCGGGCGGGGGTAGGCCTGGCTC
TTCTCCTGAGGG**T**TCTGGAGCATTAGTGGGCTGCTAAGAAAGGAGCGGGCCGT
GGGCCATCTGACTGAGTTCATCTCAACCTGCTCTGAAAGGAGGAGACAGAGA
TGGAAGTGAAGTATCT**C**ATCCCATGATATTTCCATTTGCTGCCGCAAGCTAAG
AGGAGGTGTATACTTTGGGAAGATGAATACTGGAACCTGAGGGCTTGAAGAGT
GGCAAAGGTGAGACCCTTACCAGGACAATCTGTGCCTAACCCACCCTTTCTCA
TGGGACCTAATGCATTGCCCAAATTAGGACTCTGTGACTGGGGAGCGGCCCAT
GTGACTGGGAGATGGCACCCATCCTCATTTCCTAGTGGAGAAACAAACCCTG
AGAGGGTCAGGAAGCTTTCCAGGATCACAGGATAAGCCAGGCCTCCCCAGATC
ACACATGGGGCCGTT

c.1 = 34372943 c. = 34370799 Taille exon : 2144pb*

EBAT0321.1 ECIS0505.1 ETAN0753.1 NCAP0756.1 EBAL1385.1

CLONING PRIMERS

OLIGO	start	len	tm	gc%	any_th	3' th	hairpin	seq
LEFT PRIMER	587	19	59.08	57.89	10.46	0.00	0.00	CAAATAGACGTCGCGCTCC
RIGHT PRIMER	2325	20	59.06	55.00	0.00	0.00	0.00	GCTTCTCCATCCGCAATCAG
SEQUENCE SIZE: 3036								
INCLUDED REGION SIZE: 3036								

PRODUCT SIZE: 1739, PAIR ANY_TH COMPL: 0.00, PAIR 3'_TH COMPL: 0.00

MYORG_Clon_F_1739 : CG**GAATTCG****CAAATAGACGTCGCGCTCC**
MYORG_Clon_R_1739 : GCT**CTAGAGC****GCTTCTCCATCCGCAATCAG**

SEQUENCING PRIMERS

MYORG_ex2a

OLIGO	<u>start</u>	<u>len</u>	<u>tm</u>	<u>gc%</u>	<u>any th</u>	<u>3' th</u>	<u>hairpin</u>	<u>seq</u>
LEFT PRIMER	102	20	58.93	50.00	0.00	0.00	0.00	AGGGTTCAAGGTCTGCATGA
RIGHT PRIMER	790	20	58.28	50.00	0.00	0.00	0.00	AGGCTACCAGTCACAGAACA

SEQUENCE SIZE: 853
INCLUDED REGION SIZE: 853

PRODUCT SIZE: 689, PAIR ANY_TH COMPL: 0.00, PAIR 3'_TH COMPL: 0.00

MYORG_ex2a_F_689 = **AGGGTTCAAGGTCTGCATGA**

MYORG_ex2a_R_689 = **CGTAGGCTACCAGTCACAGA**

MYORG_ex2b

OLIGO	<u>start</u>	<u>len</u>	<u>tm</u>	<u>gc%</u>	<u>any th</u>	<u>3' th</u>	<u>hairpin</u>	<u>seq</u>
LEFT PRIMER	121	19	59.79	57.89	14.06	0.00	0.00	ACACAGAGTCGCGATCCAC
RIGHT PRIMER	808	20	59.14	50.00	19.50	0.00	0.00	GTGCGTCGCTACTTCAACAA

SEQUENCE SIZE: 878
INCLUDED REGION SIZE: 878

PRODUCT SIZE: 688, PAIR ANY_TH COMPL: 0.64, PAIR 3'_TH COMPL: 9.19

MYORG_ex2b_F_688 = **ACACAGAGTCGCGATCCAC**

MYORG_ex2b_R_688 = **GTGCGTCGCTACTTCAACAA**

MYORG_ex2c

OLIGO	<u>start</u>	<u>len</u>	<u>tm</u>	<u>gc%</u>	<u>any th</u>	<u>3' th</u>	<u>hairpin</u>	<u>seq</u>
LEFT PRIMER	114	20	60.39	60.00	0.00	0.00	0.00	CCAAATGGGGTCTCGGAAGG
RIGHT PRIMER	772	20	59.06	55.00	0.00	0.00	0.00	GCTTCTCCATCCGCAATCAG

SEQUENCE SIZE: 832
INCLUDED REGION SIZE: 832

PRODUCT SIZE: 659, PAIR ANY_TH COMPL: 0.00, PAIR 3'_TH COMPL: 0.00

MYORG_ex2c_F_659 = **CCAAATGGGGTCTCGGAAGG**

MYORG_ex2c_R_659 = **GCTTCTCCATCCGCAATCAG**

MYORG_ex2d

OLIGO	<u>start</u>	<u>len</u>	<u>tm</u>	<u>gc%</u>	<u>any th</u>	<u>3' th</u>	<u>hairpin</u>	<u>seq</u>
LEFT PRIMER	191	20	59.27	55.00	0.00	0.00	0.00	CTGGATGAAGAAGTGCAGCG
RIGHT PRIMER	685	20	59.38	55.00	0.00	0.00	0.00	TGAACTCAGTCAGATGGCCC

SEQUENCE SIZE: 823
INCLUDED REGION SIZE: 823

PRODUCT SIZE: 495, PAIR ANY_TH COMPL: 0.00, PAIR 3'_TH COMPL: 0.00

MYORG_ex2d_F_495 = **CTGGATGAAGAAGTGCAGCG**

MYORG_ex2d_R_495 = **TGAACTCAGTCAGATGGCCC**

7.2. Hétérogénéité clinique et radiologique des patients porteurs de duplications du gène *APP*

D'autres formes de microangiopathies liées à une cause génétique peuvent au contraire englober un spectre clinico-radiologique plus large rendant l'identification d'un phénotype reconnaissable beaucoup plus ardue. Un exemple caractéristique de diversité phénotypique est la duplication du gène *APP*, responsable de MA précoce et d'AAC. Rapportée dès les descriptions initiales, il existe en effet une forte diversité inter mais également intrafamiliale chez des patients porteurs donc de la même duplication. Par ailleurs, l'absence d'hématomes symptomatiques chez les patients trisomie 21, pourtant porteurs d'une duplication *APP* et avec présence d'AAC sur le plan anatomopathologique dans la grande majorité des cas, est mal comprise. Plusieurs auteurs ont suggéré la possibilité de gènes, situés sur le chromosome 21, considérés comme modulateurs de l'expression phénotypique, notamment protecteurs de manifestations hémorragiques (258).

Afin d'améliorer la compréhension de cette étonnante diversité, il nous a semblé important de réunir et d'analyser l'ensemble des données cliniques mais également biologiques et radiologiques de patients porteurs de duplication *APP*. En effet, la plus grande série à ce jour comportait cinq familles, avec peu de données d'imagerie notamment (254) et au total, 51 cas ont été rapportés dans la littérature, principalement sous forme de case reports. Une analyse poussée des IRM de ces patients, chez qui un mécanisme de surproduction d'A β est certain(251), nous permettrait l'exploration de l'ensemble des biomarqueurs radiologiques. Cette approche, grâce aux études IRM des patients porteurs de mutation *APP* dite Hollandaise a permis de faire évoluer nos connaissances sur les biomarqueurs en imagerie de l'AAC. Là où la mutation Hollandaise est considérée comme un modèle d'AAC « vasculaire pure », la duplication du gène semble plus complexe à aborder, avec implications de différents gènes selon la taille de duplication et tableaux cliniques très divers.

Nous avons analysé l'ensemble de la série française de 43 patients issus de 24 familles porteurs de duplications d'*APP*, constituant à notre connaissance la plus grande série de cas de cette affection rare. Les objectifs de notre travail étaient multiples :

- Concernant la description approfondie des familles, nous montrons que les troubles neurocognitifs majeurs, les hémorragies intracérébrales symptomatiques et les crises d'épilepsie représentent les principales

présentations cliniques chez les porteurs de duplication d'*APP* mais qu'environ 20% des patients débutent par des tableaux atypiques, comme des troubles du comportement au premier plan. Neufs examens neuropathologiques ont été regroupés : 2/9 cas présentaient des corps de Lewy, en plus des lésions typiques de MA et d'AAC. 14/19 patients dont les IRM cérébrales étaient disponibles, remplissaient les critères radiologiques actuels d'AAC (73,7%), tandis que 5 ne présentaient aucune caractéristique hémorragique.

- Pour tenter d'expliquer cette importante hétérogénéité, nous avons alors cherché une corrélation génotype-phénotype en comparant les marqueurs hémorragiques d'IRM avec la taille des duplications mais surtout leur contenu génique. Malgré un panel de tailles de duplications très différentes, allant de 0.55Mb à 9Mb, aucune corrélation n'a été retrouvée. Ainsi les gènes potentiellement modulateurs d'expression, situés sur le chromosome 21 et qui limiteraient la survenue d'hématomes en cas de trisomie 21 par exemple, ne semblent pas se trouver à proximité du gène *APP*. Des études sur modèles murins avec trisomie 21 ont d'ailleurs récemment suggéré qu'une accumulation d'A β pouvait survenir indépendamment d'une copie supplémentaire du gène *APP* (4).
- Un autre objectif de cette étude était d'établir un pattern radiologique faisant évoquer une duplication du gène *APP*, comparativement à une population de 40 patients avec AAC sporadique, sans cause génétique identifiée après screening du gène *APP* négatif. Le but était de mieux guider le clinicien et donner les critères en cas d'AAC précoce pour cibler la recherche d'une duplication d'*APP* (par QMPSF par exemple) comparativement à d'autres analyses, notamment le séquençage d'exome ou génome. Ici, les porteurs d'une duplication présentaient une sidérose corticale superficielle significativement moins fréquente (14,2 % contre 52,5 % chez les AAC contrôles, $p=0,01$) et une distribution antérieure plus faible des lésions de substance blanche, comme le montrait le score moyen de Fazekas modifié dans les régions prérolandiques (0,9 chez les porteurs de duplication *APP* contre 1,6 chez les AAC contrôles ($p=0,02$)). Malgré un effectif modeste, un pattern radiologique semblerait se détacher chez les patients porteurs de duplication *APP* comparativement aux autres AAC. Ceci pourrait en outre supporter des mécanismes d'AAC sous-jacents différents avec d'une part une surproduction d'A β en cas de duplication et d'autre part préférentiellement

un défaut de clairance de l'A β au premier plan, entraînant plus d'hémosidérose et de leucopathie sur l'imagerie.

Une situation très particulière et beaucoup plus rare correspond à la forme inflammatoire d'AAC. Déjà décrite dans les résultats d'essais cliniques avec thérapeutiques anti- A β dans la MA sous la forme des ARIA, elle peut survenir spontanément dans l'AAC. Sa physiopathologie semble liée à des dépôts sévères d'A β dans la paroi des microvaisseaux corticaux et leptoméningés et elle parait favorisée par le génotype *APOE ϵ 4*. Une de nos patientes porteuses de duplication *APP* s'est aussi manifestée initialement par un épisode d'AAC inflammatoire, suggérant la nécessité de mieux connaître cette entité.

Phenotype and imaging features associated with APP duplications

Running head: Phenotypes associated with APP duplications

Lou Grangeon¹, Camille Charbonnier², Aline Zarea¹, Stephane Rousseau², Anne Rovelet-Lecrux², David Bendetowicz³, Marion Lemaitre⁴, Cécile Malrain⁵, Muriel Quillard-Muraine⁶, Kevin Cassinari², David Maltete¹, Jeremie Pariente⁷, Olivier Moreaud⁸, Eloi Magnin⁹, Benjamin Cretin¹⁰, Marie-Anne Mackowiak¹², Adeline Rollin Sillaire¹², Martine Vercelletto¹³, Elsa Dionet¹⁴, Olivier Felician¹⁵, Pauline Rod-Olivieri¹⁶, Catherine Thomas-Antérion¹⁷, Gaelle Godeneche¹⁸, Mathilde Sauvée⁸, Leslie Cartz-Piver¹⁹, Isabelle Le Ber³, Valérie Chauvire²¹, Thérèse Jonveaux²², Anna-Chloé Balageas²³, Annie Laquerière²⁴, Charles Duyckaerts²⁵, Anne Vital²⁷, Andre Maues de Paula²⁸, David Meyronet²⁹, Lucie Guyant-Marechal², Didier Hannequin¹, Elisabeth Tournier-Lasserre³⁰, Dominique Campion², CNR-MAJ collaborators, Gaël Nicolas², David Wallon¹.

¹ *Normandie Univ, UNIROUEN, Inserm U1245 and CHU Rouen, Department of Neurology and CNR-MAJ, 76000 Rouen, France.*

² *Normandie Univ, UNIROUEN, Inserm U1245 and CHU Rouen, Department of Genetics and CNR-MAJ, 76000 Rouen, France.*

³ *Paris Brain Institute, Sorbonne Université, UPMC Univ Paris 06, Inserm U1127, CNRS UMR 7225, ICM, Paris, France and Neurology Department, Hôpital La Pitié-Salpêtrière APHP, Paris, France*

⁴ *Geriatric department, Seclin-Carvin Hospital, Seclin, France*

⁵ *Department of Neurology, Rennes Hospital, Rennes, France.*

⁶ *Laboratoire de biochimie, Rouen University Hospital and University of Rouen, Rouen, France*

- ⁷ *Neurology Department, Toulouse University Hospital and Toulouse NeuroImaging Center (ToNIC) INSERM-University of Toulouse Paul Sabatier, Toulouse, France*
- ⁸ *Department of Neurology, Grenoble Hospital, Grenoble, France.*
- ⁹ *Department of Neurology, Besancon Hospital, Besancon, France.*
- ¹⁰ *Department of Neurology, Hautepierre Hospital, Strasbourg, France.*
- ¹² *Univ. Lille, CHU Lille, CNRMAJ, 59000, Lille, France.*
- ¹³ *Department of Neurology, Nantes University Hospital, Nantes, France*
- ¹⁴ *Department of Neurology, Clermont-Ferrand Hospital, Clermont-Ferrand, France*
- ¹⁵ *APHM, Service de Neurologie et Neuropsychologie, CHU Timone, Marseille, France
Aix Marseille Univ, INSERM, INS, Inst Neurosci Syst, Marseille, France*
- ¹⁶ *Neurology Department, Hôpital Saint Anne APHP, Paris, France*
- ¹⁷ *Department of Neurology, Lyon University Hospital, Lyon, France*
- ¹⁸ *Department of Neurology, La Rochelle Hospital, La Rochelle, France.*
- ¹⁹ *Centre Mémoire Ressources et Recherche (CMRR), Limoges University Hospital, Limoges, France*
- ²¹ *Department of Neurology, Angers University Hospital, Angers, France*
- ²² *Department of Neurology, Nancy University Hospital, Nancy, France*
- ²³ *CHRU Tours, Centre Mémoire Ressources et Recherche (CMRR), Tours, France*
- ²⁴ *Normandie Univ, UNIROUEN, Inserm U1245 and Rouen University Hospital, Department of Neuropathology, F 76000, Normandy Center for Genomic and Personalized Medicine, Rouen, France*
- ²⁵ *Sorbonne Université, INSERM, CNRS U1127, ICM and Laboratoire de Neuropathologie R. Escourolle, Hospital Pitie-Salpêtrière, Paris, France*
- ²⁷ *Department of Pathology, University Hospital, Bordeaux*
- ²⁸ *Department of Pathology, La Timone University Hospital, Marseille*
- ²⁹ *Department of Pathology, Hopital Civil University Hospital, Lyon*
- ³⁰ *AP-HP, Groupe Hospitalier Saint-Louis Lariboisière-Fernand-Widal, Service de Génétique Moléculaire Neurovasculaire, INSERM UMR 1141, NeuroDiderot, Université de Paris, France*

Title word count: 12

Abstract word count: 263

Introduction word count: 522

Discussion word count: 1322

Body Word count: 4289

Tables: 2

Figures: 2
Supplemental table or figure: 2
References: 45

Corresponding Author:

Lou Grangeon, M.D.
Department of Neurology
Rouen University Hospital. 76031 Rouen Cedex, France
Tel.: +(33) 2 32 88 82 94; Fax: + (33) 2 32 88 87 41 e-mail: lou.grangeon@chu-rouen.fr

Keywords:

Cerebral Amyloid Angiopathy, Alzheimer disease, APP duplication, cerebral MRI, autosomal dominant

ABSTRACT

Background: APP duplication is a rare genetic cause of Alzheimer disease and cerebral amyloid angiopathy (CAA). We aimed to evaluate the phenotypes of APP duplications carriers.

Methods: Clinical, radiological and neuropathological features of 43 *APP* duplication carriers from 24 French families were retrospectively analyzed and MRI features and cerebrospinal fluid (CSF) biomarkers were compared to 40 *APP*-negative CAA controls.

Results: Major neurocognitive disorders were found in 90.2% symptomatic *APP* duplication carriers, with prominent behavioral impairment in 9.7%. Symptomatic intracerebral hemorrhages were reported in 29.2% and seizures in 51.2%. CSF A β 42 levels were abnormal in 18/19 patients and 14/19 patients fulfilled MRI radiological criteria for CAA, while only 5 displayed no hemorrhagic features. We found no correlation between CAA radiological signs and duplication size. Compared to CAA controls, *APP* duplication carriers showed less frequent cortical superficial siderosis (14.2% vs 52.5%, $p=0.01$ adjusted for the delay between symptoms onset and MRI) and less anterior white matter lesion (mean Fazekas score 0.9 vs 1.6, $p=0.02$ adjusted for the delay between symptoms onset and MRI). Deep microbleeds were found in two *APP* duplication carriers, without hypertension. In addition to neurofibrillary tangles and senile plaques, CAA was diffuse and severe with thickening of leptomeningeal vessels in all 9 autopsies. Lewy bodies were found in substantia nigra, locus coeruleus and cortical structures of 2/9 patients and one presented vascular amyloid deposits in basal ganglia.

Discussion: Phenotypes associated with *APP* duplications were heterogeneous with no apparent correlation with duplication size. Amyloid burden was severe and widely extended to cerebral vessels as suggested by hemorrhagic features on MRI and neuropathological data.

INTRODUCTION

Cerebral amyloid angiopathy (CAA) is mainly characterized by pathological deposition of Amyloid- β (A β) peptides in the walls of cortical and leptomeningeal vessels. CAA may lead to intracerebral hemorrhages such as microbleeds (CMB), hematomas (ICH), focal subarachnoid hemorrhage, and cerebral superficial siderosis (CSS). In cerebral autopsy series, Alzheimer disease (AD) is frequently associated with some degree of CAA(1). AD is neuropathologically defined by an abnormal aggregation of A β peptides in the brain parenchyma, along with neurofibrillary tangles composed of intra-neuronal abnormally hyperphosphorylated Tau proteins. A β peptides thus play a central role in both CAA and AD(1). Despite the existence of other peptides putatively causing CAA in rare genetic forms, A β aggregation is the major peptide responsible for CAA in elderly people and most CAA patients.

Among AD patients, 4% to 10% exhibit the first symptoms before the age of 65 defining early-onset AD (EOAD)(2)(3)(4). In this population, a monogenic cause is identified in ~2% to 77%, depending on ages at onset and family history(5)(6)(7)(8). Such pathogenic variants in either the Amyloid- β Protein Precursor (*APP*), presenilin 1 (*PSEN1*), or presenilin 2 (*PSEN2*) genes or duplications of the *APP* locus are autosomal dominantly inherited. After their discovery in 2006(9), *APP* locus duplications were described in autosomal dominant EOAD series with various frequencies, 8% (95%CI, 2.6–17.1) in France(9) and 2.7% (95%CI, 0.32–9.3) in the Netherlands(10). This copy number variant (CNV), located on chromosome 21, may encompass the *APP* gene with or without surrounding genes. However, no correlation has been identified between the phenotype of *APP* duplication carriers and the size of the duplicated locus or the genes included but the small number of reported families precluded any definite conclusion(11). *APP* is clearly the main gene as its duplication is sufficient to cause EOAD and/or CAA through overexpression.

mRNA levels are increased ~1.5 times in carriers(9),(12) with widespread A β deposits in the brain parenchyma and vessels(13). Recently, we reported a family with an *APP* triplication (4 copies of *APP*) and a phenotype similar to *APP* duplications(14). Of note, single nucleotide variants (SNV) in or around the A β peptide coding sequence in the *APP* gene can also cause either AD, CAA, or both.

Some degree of inter and intrafamilial phenotype diversity has been reported with *APP* duplication but from a small number of families(11)(15). Most carriers presented AD-related cognitive decline and around 30% with CAA-related lobar spontaneous ICH upon presentation. Moreover, *APP* duplication carriers were more likely to present seizures(16). Neuropsychiatric disorders with hallucinations related to a pathologically proven Lewy body (LB) disease have also been reported(15). Given the rarity of *APP* duplications, little is known of the radiological pattern. Large discrepancies have been reported, from normal neuro-imaging to severe CAA with multiple CMB or large inflammatory-related CAA(17). The proportion of *APP* duplication carriers exhibiting CAA according to Boston-imaging criteria(18) (except the age criterion) remains unknown and studies on AD cerebrospinal fluid (CSF) biomarkers are still required.

Here, we analyzed the clinical, radiological and neuropathological features of 43 patients carrying 24 distinct *APP* duplications, and compared their MRI features to 40 *APP*-negative CAA controls.

MATERIAL AND METHODS

This retrospective study analyzed the phenotypic data of *APP* duplication carriers detected in France in the CNRMAJ center (Rouen University Hospital) from a nation-wide recruitment since 2006. Patients or legal representatives provided informed written consent for genetic analyses, in a medical and research setting (RBM 02-59, EudraCT 2009-010884-18) or

GMAJ, NCT01622894, respectively approved by Paris Ile de France II and CPP Nord Ouest I ethics committees.

Inclusion and genetic analyses

The CNRMAJ laboratory of Rouen has a nation-wide recruitment of blood samples from patients with EOAD and/or with early-onset CAA (onset before 66 years). DNA isolated from whole blood samples of EOAD±CAA were screened by Sanger or exome sequencing for exons 16-17 of *APP*, *PSEN1* and *PSEN2* coding exons and for *APP* duplication by quantitative multiplex PCR of short fluorescent fragments (QMPSF), as previously described(19), and CAA patients (without AD phenotype) were screened for *APP* pathogenic variants and duplications. Genes surrounding *APP* were assessed by additional QMPSF or digital droplet PCR(20) experiments in order to assess the size of each duplication and its gene content. All patients were genotyped for *APOE* by Sanger sequencing. Patients were recruited regardless of the presence of a positive family history.

We included all patients exhibiting *APP* locus duplication including probands and their relatives. Before diagnosis, patients had neurological examination, neuropsychological assessment, and some had cerebral MRI and CSF AD biomarker analysis. Clinical data were retrieved from patients' medical charts provided by each referring clinician.

The MRI patterns of these patients were compared to a control group of 40 *APP*-negative CAA controls (by sequencing exons 16 and 17 and by QMPSF) referred either to CNRMAJ, Rouen or to the Department of Genetics, Lariboisière Hospital, Paris, and fulfilling radiological criteria for probable CAA(18).

MRI analysis

All cerebral 1.5 or 3-T MRI containing magnetic-susceptibility sequences were assessed. These blood-sensitive sequences, used to evaluate intracranial bleeds, were T2 gradient echo (T2 GRE) sequences, T2*, susceptibility weighted imaging (SWI) or a T2*-weighted angiography (SWAN), depending on the MRI machine and protocol used. The diagnosis of probable CAA was performed according to revised Boston diagnostic criteria, except for the age criterion (>55 years)(18). In order to assess a consensus, two clinicians (LG and DW) independently rated hemorrhagic features in each brain region of interest. All hemorrhagic lesions were analyzed independently by both experts, by visually counting each lesion. The presence and number of CMBs (<10 mm diameter) and ICH (\geq 10 mm) was evaluated(21) and CSS was classified as focal (\leq 3 sulci) or disseminated (>4 sulci) after recording the number of sulci involved(22). Hippocampal atrophy was scored according to Scheltens scale on 3D acquisition or 2D coronal T1-weighted-sequences(23). Perivascular white matter lesions were scored according to Fazekas scale on T2 or FLAIR-weighted sequences(24). Lesions were also classified according to location: lobar pre- or post-rolandic, deep, or in posterior fossa. In case of repeated MRI, only the latest images were considered for rating.

CSF analysis

CSF was obtained by lumbar puncture (LP). All centers used a common 10-ml polypropylene tube to collect CSF (catalog number 62.610.201; Sarstedt, Nümbrecht, Germany). All samples were aliquoted after centrifugation for 10 minutes at +4°C in polypropylene Eppendorf tubes, then frozen at -80°C within 1 hour. A β 42, A β 40, Tau and p-Tau protein measurements were taken using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Fujirebio-Europe, Ghent, Belgium) according to the manufacturer's instructions. Analysis was performed in duplicate and a coefficient of variation (CV) less than 15% was considered as acceptable. In this case, the mean of the two measured values was taken as final result. All sites belong to the same

national ePLM network which was created to enhance harmonization of procedures regarding CSF AD biomarkers(25). As preanalytical and analytical procedures might still have impact on the quantification, we set the normal thresholds for all CSF biomarkers following local laboratory normal ranges.

Neuropathological examination

Nine brain autopsies were available (BES_262, EXT_298, EXT_773, EXT_144, EXT_019, two patients from ROU_037 and two patients from EXT_028). The brains were fixed in a 10% formaldehyde solution buffer for at least three months. Seven-micrometer sections were cut from paraffin-embedded blocks of frontal, temporal including hippocampus, occipital lobes and cerebellar hemispheres and brainstem. Sections were stained with hematoxylin–eosin, periodic acid Schiff, Orcein, Luxol-Phloxine. Routine immunohistochemical study was performed using antibodies directed against alpha-synuclein (diluted 1/200) (Zymed, Clinisciences, Montrouge, France), PHF tau (AT8, 1/20) (Innogenetics, Gent, Belgium), glial fibrillary acidic protein (GFAP,1/300), PrP (1/50), ubiquitin (1/100) and the macrophagic marker CD68 (1/300) (Dakopatts, Trappes, France). Vascular and intraparenchymatous amyloid deposits were characterized using β -amyloid protein antibody (diluted 1/100) (Dakopatts, Trappes, France).

Statistical analyses

Results are expressed as mean \pm standard deviation (SD) unless otherwise specified. Fisher exact tests and Mann–Whitney U tests were used to compare radiological characteristics between *APP* duplication carriers and the CAA controls. Logistic regression was used with adjustment for time from symptom onset to MRI. Radiological findings were analyzed using R statistical software version 3.6.2.

Data availability statement

De-identified database and statistical analysis plan will be shared upon reasonable request for two years after publication.

RESULTS

***APP* duplication families**

Overall, 43 *APP* duplication carriers, 41 symptomatic and 2 presymptomatic, from 24 families were included. The two presymptomatic individuals were asymptomatic at the age of 32 and 38 years, respectively (Figure 1). The duplicated segments had a minimal size ranging from 0.55 to 15.3 Mb and contained 3 to 25 protein-coding genes; all duplications encompassed at least the *APP* gene entirely (Figure 2). All patients had a positive family history except one who displayed a *de novo* occurrence, already reported in 2015(26). Retrospective analysis of medical records revealed no clinical features suggestive of Down syndrome in any patient, as expected, as the critical Down syndrome region on chromosome 21 was never encompassed in the duplicated segment. Regarding the *APOE* genotypes, three (7.3%) patients carried at least one *APOE* ϵ 2 allele (*APOE2*) and six (14.6%) carried at least one *APOE* ϵ 4 allele (*APOE4*) (no homozygous).

Cognitive impairment was observed from 42 to 60 years (mean: 50.7 years), and ICH from 42 to 63 years (mean: 46.7 years). No significant correlation was found between age at onset and the number of *APOE4* alleles ($p= 0.46$ according to Pearson's coefficient). For 21 patients, age at death ranged from 42 to 68 years (mean: 58.6 years), occurring after a mean disease duration of 9.33 ± 6.3 years. Among symptomatic cases ($n=41$), cognitive decline was observed in all but four (90.2%). Seventeen patients (41.4%) presented amnesic syndrome of the hippocampal type suggestive of AD, four (9.7%) with a mainly behavioral presentation.

Nine patients (21.9%) had a rapid progression and quickly became bedridden, which prevented further neuropsychological classification. Two patients (4.8%) presented moderate attention impairment after ICH, one (2.4%) with a clinical diagnosis of LB disease. No further details were available for six patients (14.6%). Symptomatic ICH was reported in twelve patients (29.2%) and seizures in 21 (51.2%) patients; 11 in the first 5 years of cognitive decline or before. One patient (BES_262) presented seizures and an aspect of CAA-related inflammation on MRI according to current diagnostic criteria(27). She died from ICH six years later.

Five patients (12.1%) presented atypical cognitive impairment. Two of them developed isolated psychiatric disorders: one (EXT_2066) had visual hallucinations, delusion and behavioral disorders associated with bilateral tremor and rigidity at 52 years, suggestive of LB disease and one (EXT_1093) had psychiatric disorders from the age of 53 with dissociative delirium leading to admission to a psychiatric department followed by severe cognitive decline 5 years later, with a final diagnosis of AD. Another patient (BES_262) also developed behavioral disorders and hallucinations at 44 years of age, which were associated with cognitive decline and parkinsonism suggestive of LB disease(15). Finally, two patients (EXT_1516 and EXT_298) developed social or eating behavioral disorders associated with cognitive decline leading to an initial hypothesis of fronto-temporal lobar degeneration, quickly followed by repeated seizures and a bedridden state.

Nineteen *APP* duplication carriers underwent LP with measurement of AD CSF biomarkers. A β 42 levels were below the normal threshold in all but one. Phospho-Tau levels were over the normal threshold in 15/19 patients (78.9%) and total Tau protein levels were over the normal threshold in 11/19 (57.8%). Overall, all patients with a clinical diagnosis of AD showed abnormal levels of at least two out of three CSF biomarkers whereas four (26.3%) patients showed normal phospho-Tau and total Tau levels. None of the four patients with

isolated decreased A β 42 levels presented a cognitive decline typical of AD (EXT_2066, EXT_1516 and EXT_298 described above and EXT_145 presenting recurrent ICH). Among the patients who underwent LP, only two had recurrent ICH, whereas all remaining patients had severe progressive cognitive impairment.

Neuroimaging in *APP* duplication families

MRI with blood-sensitive sequences was available for 19 patients in this study. Five carriers showed no hemorrhagic features on MRI (mean time between symptom onset and MRI 3.9 years +/- 2.2), whereas 14 (73.6%) fulfilled the revised Boston imaging criteria for probable CAA diagnosis (mean time between symptom onset and MRI 4.0 years +/- 3.1). Among them, four carriers showed no ICH on MRI but exhibited multiple CMBs. Only two *APP* duplication carriers showed CSS, affecting one sulcus for one and three sulci for the other, and none showed disseminated CSS. Surprisingly, two *APP* duplication carriers showed one CMB in the basal ganglia (Supp Figure 1). Of note, one of these two patients had no history of hypertension and the other one was given antihypertensive medication after ICH occurrence but no further details were available concerning his condition before ICH.

Overall, the numbers of CMBs ranged from 0 to 420 and the numbers of ICH from 0 to 3. In line with this high extra-familial heterogeneity, intra-familial heterogeneity was also observed in the BES_262 family, in which 3 MRIs of symptomatic patients were available (Supp Figure 2). The number of CMBs ranged from 42 to 420 (MRI performed at 54 and 56 years of age, respectively) and one patient from this family showed CAA-related inflammation at 52 years of age(17).

No correlation was observed between CAA radiological signs and *APP* duplication size (Figure 2). For instance, patients carrying smaller duplications (size <1 Mb) could show from no CMBs (0.75Mb in ROU_037 at age 49) up to 420 CMBs (0.55Mb in BES_262 at age 56).

No correlation was observed with the other genes included in the duplication. Among the 14 patients fulfilling the revised Boston imaging criteria for probable CAA diagnosis, two patients from the same family (EXT_144) carried one *APOE2* allele, one (ALZ_478) carried an $\epsilon 2/\epsilon 4$ genotype and the other (EXT_298) carried one *APOE4* allele. Conversely, the five patients with no hemorrhagic features on MRI were *APOE3* homozygous. In addition, no correlation was observed between CSF A β 42 levels and MRI features (data not shown).

Neuroimaging comparison of APP duplication carriers and CAA controls

CAA controls (n=40) had a mean age at onset of 63.0 ± 9.7 years. Initially, 11 (27.5%) had cognitive decline and 22 (55.0%) had ICH. The remaining patients (n=7) presented seizures (n=3), transient focal neurologocical episodes (TFNE) (n=2) or cephalalgia (n=2). Eleven controls (27.5%) had seizures during the disease course. Regarding *APOE* genotypes, 15 (37.5%) carried at least one *APOE4* allele and 7 (17.5%, not homozygous) carried at least one *APOE2* allele (not homozygous). The radiological features of these controls were compared to those of the *APP* duplication carriers with available MRI and who fulfilled Boston criteria for CAA (n=14). *APP* duplication carriers showed a higher number of total CMBs compared to CAA controls (mean 110.7 vs 56.7; $p=0.004$) with a very prominent posterior location of CMBs (mean posterior /anterior ratio of 10.1 vs 5.3 respectively; $p=0.009$). Conversely, CAA controls showed CSS more often (52.5% vs 14.2%, $p=0.01$), with more frequent disseminated CSS (37.5% vs 0%; $p=0.005$) and a higher number of sulci (mean 5.8 vs 0.28; $p=0.005$) but also more severe white matter lesions with higher Fazekas score (Table 3). After adjustment for time from symptom onset to MRI, CSS remained significantly more frequent in CAA controls than *APP* duplication carriers ($p=0.017$) but not a higher number of MBs ($p=0.21$). No difference was observed in terms of hippocampal atrophy.

Neuropathological findings

Nine brain autopsies were available (BES_262, EXT_298, EXT_773, EXT_144, EXT_019, two patients from ROU_037 and two patients from EXT_028) including six previously reported(15)(11). With the addition of three novel cases, neuropathological examination confirmed the high variability of lesions associated with *APP* duplications. Macroscopic examination revealed diffuse cerebral atrophy in all cases, which was more pronounced in the temporo-parietal regions with *a vacuo* ventricular dilatation as a consequence. Histologically, diffuse neuronal loss affecting cortical structures but also the brainstem was observed. Loss of Purkinje cells in the cerebellar cortex was variable.

Using tau and ubiquitin immunohistochemistry, numerous fibrillary tangles and senile plaques were observed in the hippocampal cortex, consistent with a definite diagnosis of AD with Braak & Braak stage V–VI(28) in all but one patient (EXT_144, presenting repeated ICH from the age of 42 and seizures but with no marked cognitive decline), who displayed no neurofibrillary tangles. Several neurofibrillary tangles were found in the thalamus, the putamen and the caudate nucleus in most of patients.

In all patients, amyloid plaques were present (as well as diffuse amyloid deposits), sometimes organized in rose petal-like formations in the cortical structures and predominating in the hippocampal formation and superficial cortex but moderate in the cerebellum. In one patient (ROU_037), multiple microcalcifications close to the amyloid angiopathy was observed within the cortical and subcortical occipital structures but no CT scan was available for this patient.

In all 9 cases, CAA was diffuse and severe with prominent thickening of leptomeningeal vessels, as well as superficial and deep intraparenchymatous small arteries, capillaries and veinules (Thal stage 3-5). Abundant circumferential amyloid deposits were found in the intima of arteriolar walls, with fragmentation of the internal elastic layer and media. CAA was

also identified in the vessels of deep nuclei (EXT_773) in one patient and one recent hemorrhage was found in the pes pedonculi in another patient (EXT_144). In most of cases, ischemic changes and small infarcts were found near the amyloid vascular deposits. In the hemispheric white matter, microinfarcts were found close to the vascular amyloid deposits or at a short distance from affected vessels. Nearly all the meningeal vessels were strongly positive for A β 40 antibodies within amyloid deposits whereas A β 42 immunoreactivity was detected on the core of amyloid plaques in the hippocampal and parahippocampal gyri. GFAP immunohistochemistry showed positive reactive astrocytes in several areas such as frontal and temporal lobes or cerebellum. Alpha-synuclein antibodies showed numerous structured LBs in the substantia nigra and locus coeruleus but also cortical structures in two patients, BES_262(15) and EXT_773. Whenever performed, PrP antibodies were always negative in all structures studied.

DISCUSSION

In this study we analyzed the clinical, radiological and neuropathological features of 43 patients from 24 European families harboring an *APP* duplication, a rare cause of autosomal dominant AD and/or CAA, and compared their MRI features to those of 40 *APP*-negative CAA controls.

The wide range of different duplications shown here with distinct breakpoints (Figure 2) and the diverse ethnicities of *APP* carriers reported in literature, as Japanese cases for instance(29), are not suggestive of a founder effect. Interestingly, one of our patients (EXT_773) harbored a *de novo* duplication. Given the reports of different-sized duplications

and the identification of the first *APP* triplication, the *APP* locus appears to be a hotspot region for recombination, likely related to different regions with short tandem repeats(14). In our study, clinical penetrance was high in *APP* duplication carriers, with 41/43 symptomatic patients and a young age of asymptomatic patients (32 and 38 years, respectively). Overall, 90.2% of symptomatic patients had major neurocognitive impairment, with a clinical diagnosis of amnesic AD and prominent episodic memory impairment in 41.4%, atypical presentation with prominent behavioral impairment in 9.7%, and severe dementia with quick bedridden state in 21.9% of patients. According to pedigrees, isolated cognitive decline occurred in 13/24 (54.2%) *APP* duplication families, with no reported ICH, whereas cognitive decline and ICH occurred in 10 (41.6%) families and ICH alone in one family (4.1%). Mean age at onset of cognitive decline ranged from 42 to 60, highlighting the early onset and severity of cognitive impairment in patients harboring *APP* duplications.

Based on 16 *APP* duplication carriers, our group previously described seizures occurring in 31% of cases(16), with higher seizure risk compared to *PSEN1* or *APP* point mutation carriers in EOAD. An epileptiform activity consecutive to A β overproduction which modulates presynaptic and postsynaptic transmission in mice models was suggested, in addition to the effect of brain hemorrhages(30). By adding 27 new carriers, our series further underlines the frequency of seizures in half of *APP* duplication carriers, independently of symptomatic ICH occurrence (in only 29.2%) or CSS on MRI (present in only 14.2%). Consequently, seizure occurrence in EOAD or CAA, whatever the clinical presentation, or in familial dementia, could be an argument for *APP* duplication screening.

Symptomatic ICH related to CAA occurred in 29.2% of our series, with a range at onset from 42 to 63 years, in line with the literature with a global rate of 30% when all reported *APP* duplications were gathered. In other autosomal dominant hereditary CAA such as Dutch type

(HCHWA-D), Iowa or Italian *APP* point mutations, ICH occurred at similar ages (between 40 and 65 years) but with a higher prevalence of 75% in Iowa and Italian mutations(31) and up to 100% in HCHWA-D with fatal outcome in 2/3 cases after the first event(32). Overall, 14/19 (73.6%) *APP* duplication carriers with available MRI fulfilled the radiological criteria for CAA while only 5 displayed no hemorrhagic features. We identified three interesting MRI features in those 14 carriers: scarcity of CSS, less extended white matter lesions, and higher number of CMBs with prominent posterior location. These results, despite the relatively small number of patients, suggest a correlation more specifically between *APP* duplications and radiological profile. It has been shown that the *APOE* genotype has an impact on the MRI characteristics of CAA patients with a correlation between *APOE2* and CSS, and *APOE4* and higher number of CMBs(33):(34). The underlying mechanisms of CSS and CMBs are now considered to be different, if not opposite(35). In *APP* duplication carriers, the pathogenic mechanism is the overproduction of A β (12), which could lead to a specific radiological pattern, with CMBs, but no CSS or large white matter lesions. Indeed, a higher number of CMBs is known to be associated with severe amyloid load(36), which is consistent with the more severe amyloid deposits found in *APP* duplication compared to other *APP* point mutations(13).

Given the wide clinical and radiological heterogeneity, we sought a correlation between phenotype and duplication size. This question was initially raised with DS. Indeed, in line with the common sharing of an extracopy of the *APP* gene, located on chromosome 21 and its consequent overexpression(12), EOAD is highly penetrant in DS(37). However, ICH is a strikingly rare feature in DS, despite the deposition of large amounts of amyloid plaques in the brain parenchyma and vessels. A recent histological study comparing 34 DS to 4 *APP* duplication carriers revealed prominent diffuse A β plaques throughout the cerebral cortex in

DS, associated with CAA confined to leptomeningeal vessels conversely to *APP* duplication phenotypes which exhibited capillary and arterial intraparenchymatous CAA with fewer A β plaques(13). This suggests that one or several duplicated genes in DS may provide partial protection against the pro-hemorrhagic effects of *APP* duplication(38) similarly to *BACE2* involvement in age at onset of dementia in DS(39). Hence, we investigated whether any of the surrounding genes could account for the hemorrhagic features in *APP* duplications but found no correlation (Figure 2). Moreover, the high heterogeneity even between members of a same family, carrying the same duplication, is a strong argument for assuming that this variability cannot be explained at the level of the duplication itself. The pro-hemorrhagic effects of *APP* duplications may more likely be modulated by more distant genes on chromosome 21 or other factors. The *APOE* genotype should also be considered as all patients carrying an *APOE2* allele present hemorrhagic features on MRI in line with previous data obtained from sporadic CAA patients(40).

Overall, numerous fibrillary tangles and senile plaques, observed in the hippocampal formation and the isocortex, consistent with a definite diagnosis of AD were observed in all patients but one (presenting recurrent ICH). CAA was diffuse and severe with thickening of the leptomeningeal vessels, as well as superficial and deep intraparenchymatous small arteries, capillaries and veinules, and small infarcts often found near amyloid vascular deposits. Interestingly, LBs in the substantia nigra and locus coeruleus but also cortical structures were found in 2/9 (22.2%) carriers, one of them already reported(10). The association of LB-pathology with AD-type pathology is however well recognized in autosomal dominant AD due to *APP*, *PSEN1* or *PSEN2* mutations but also DS(41). The present work underlines the need for *APP* duplication screening in families with a mixed phenotype of EOAD and LB dementia.

Finally, some clinical and radiological features of CAA due to *APP* duplications could be helpful to study sporadic CAA. HCHWA-D, due to a fully penetrant *APP* mutation, was previously considered to explore new MRI biomarkers in sporadic CAA diagnosis(42)(43). More specifically, one additional hemorrhagic lesion (*i.e.* CSS) was added to the modified Boston criteria in 2010(44). Additional radiological features are still a matter of debate in a new revised version of the Boston criteria, as the possibility to consider hemorrhages in deep brain territories when associated with other lobar locations, or CSS severity(44). In HCHWA-D, no deep CMBs have been reported. Nevertheless, we found 2 deep CMBs in *APP* duplication carriers and more importantly one autopsy described vascular amyloid deposits in deep grey vascular structures, in the absence of lipohyalinosis. Taken together, these results support a revision of the radiological criteria integrating lobar/deep ratio of CMBs. Regarding CSF profile, all but one *APP* duplication carrier showed decreased A β 42 levels, underlying the potential diagnostic value of this biomarker, as previously suggested from a sporadic CAA cohort by our group(45)

In conclusion, phenotypes associated with *APP* duplications are characterized by EOAD and/or CAA with overall symptomatic ICH representing 30%. More than 10% of carriers showed an atypical presentation such as isolated behavioral disorders or hallucinations suggestive of Lewy body disease and frequent early seizures. Subsequent APP overproduction leads to high amyloid burden, notably within cerebral vessels as demonstrated by the neuropathological data, the high number of CMBs and the possible occurrence of CAA-related inflammation. Overall, we suggest *APP* duplication screening in all patients with CAA onset before age 66, AD onset before age 51, or early-onset family history.

DECLARATIONS:

Ethics Approval:

Patients or legal representatives provided informed written consent for genetic analyses, in a medical and research setting (RBM 02-59, EudraCT 2009-010884-18) or GMAJ, NCT01622894, respectively approved by Paris Ile de France II and CPP Nord Ouest I ethics committees.

Data availability statement

De-identified database and statistical analysis plan will be shared upon reasonable request for two years after publication.

Consent for publication Not applicable

Competing Interests: The authors declare that they have no competing interests

Acknowledgements:

The authors are grateful to Dr Francois De la Fourniere, Pau Hospital, Dr Marie-Bernadette Delisle, Toulouse University Hospital for their contribution to this work and Nikki Sabourin-Gibbs, Rouen University Hospital, for her help with editing the manuscript.

Potential Conflict Of Interest

The authors declare no conflict of interest

Funding: None

Authors' contributions :

LG: drafting a significant portion of the manuscript ; conception and design of the study

CC: Statistical analyses, drafting a significant portion of the manuscript

AZ: drafting a significant portion of the manuscript ; acquisition and analysis of data

SR: acquisition and analysis of data

ARL: acquisition and analysis of data

DB: acquisition and analysis of data

ML: acquisition and analysis of data

CM: acquisition and analysis of data
MQM: acquisition and analysis of data
KC: acquisition and analysis of data
DM : acquisition and analysis of data
JP : acquisition and analysis of data
OM : acquisition and analysis of data
EM : acquisition and analysis of data
BC : acquisition and analysis of data
MAM : acquisition and analysis of data
ARS : acquisition and analysis of data
MV : acquisition and analysis of data
ED : acquisition and analysis of data
OF : acquisition and analysis of data
PRO : acquisition and analysis of data
CTA : acquisition and analysis of data
GG : acquisition and analysis of data
MS : acquisition and analysis of data
LCP : acquisition and analysis of data
ILB : acquisition and analysis of data
VC : acquisition and analysis of data
TJ : acquisition and analysis of data
ACB : acquisition and analysis of data
AL : acquisition and analysis of data
CD : acquisition and analysis of data
AV : acquisition and analysis of data
AMP : acquisition and analysis of data
DM : acquisition and analysis of data
LGM : acquisition and analysis of data, conception and design of the study
DH : conception and design of the study
ETL : conception and design of the study
DC : conception and design of the study
GN : conception and design of the study ; drafting a significant portion of the manuscript
DW : conception and design of the study ; drafting a significant portion of the manuscript

All authors read and approved the final manuscript

REFERENCES :

1. Greenberg SM, Bacskai BJ, Hernandez-Guillamon M, Pruzin J, Sperling R, van Veluw SJ. Cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer disease—one peptide, two pathways. *Nat Rev Neurol*. 2019;1–13.
2. Cacace R, Slegers K, Van Broeckhoven C. Molecular genetics of early-onset Alzheimer's disease revisited. *Alzheimers Dement*. 2016 Jun;12(6):733–48.
3. Carcaillon-Bentata L, Quintin C, Boussac-Zarebska M, Elbaz A. Prevalence and incidence of young onset dementia and associations with comorbidities: A study of data from the French national health data system. Sachdev PS, editor. *PLOS Med*. 2021 Sep 23;18(9):e1003801.
4. Hendriks S, Peetoom K, Bakker C, van der Flier WM, Papma JM, Koopmans R, et al. Global Prevalence of Young-Onset Dementia: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Neurol*. 2021 Sep 1;78(9):1080.
5. Lanoiselee HM, Nicolas G, Wallon D, Rovelet-Lecrux A, Lacour M, Rousseau S, et al. APP, PSEN1, and PSEN2 mutations in early-onset Alzheimer disease: A genetic screening study of familial and sporadic cases. *PLoS Med*. 2017 Mar;14(3):e1002270.
6. Lacour M, Quenez O, Rovelet-Lecrux A, Salomon B, Rousseau S, Richard AC, et al. Causative Mutations and Genetic Risk Factors in Sporadic Early Onset Alzheimer's Disease Before 51 Years. *J Alzheimers Dis JAD*. 2019;71(1):227–43.
7. Nicolas G, Veltman JA. The role of de novo mutations in adult-onset neurodegenerative disorders. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2019 Feb;137(2):183–207.
8. Rannikmäe K, Samarasekera N, Martínez-González NA, Al-Shahi Salman R, Sudlow CLM. Genetics of cerebral amyloid angiopathy: systematic review and meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2013 Aug;84(8):901–8.
9. Rovelet-Lecrux A, Hannequin D, Raux G, Le Meur N, Laquerrière A, Vital A, et al. APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. *Nat Genet*. 2006 Jan;38(1):24–6.
10. Slegers K, Brouwers N, Gijssels I, Theuns J, Goossens D, Wauters J, et al. APP duplication is sufficient to cause early onset Alzheimer's dementia with cerebral amyloid angiopathy. *Brain*. 2006 Sep 29;129(11):2977–83.
11. Cabrejo L, Guyant-Marechal L, Laquerrière A, Vercelletto M, De La Fourniere F, Thomas-Anterion C, et al. Phenotype associated with APP duplication in five families. *Brain*. 2006 Sep 29;129(11):2966–76.
12. Pottier C, Wallon D, Lecrux AR, Maltete D, Bombois S, Jurici S, et al. Amyloid- β Protein Precursor Gene Expression in Alzheimer's Disease and Other Conditions. *J Alzheimers Dis*. 2012 Feb 7;28(3):561–6.

13. Mann DMA, Davidson YS, Robinson AC, Allen N, Hashimoto T, Richardson A, et al. Patterns and severity of vascular amyloid in Alzheimer's disease associated with duplications and missense mutations in APP gene, Down syndrome and sporadic Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2018 Oct;136(4):569-87.
14. Grangeon L, Cassinari K, Rousseau S, Croisile B, Formaglio M, Moreaud O, et al. Early-Onset Cerebral Amyloid Angiopathy and Alzheimer Disease Related to an APP Locus Triplication. *Neurol Genet*. 2021 Oct;7(5):e609.
15. Guyant-Marechal I, Berger E, Laquerriere A, Rovelet-Lecrux A, Viennet G, Frebourg T, et al. Intrafamilial diversity of phenotype associated with app duplication. *Neurology*. 2008;71(23):1925-1926.
16. Zarea A, Charbonnier C, Rovelet-Lecrux A, Nicolas G, Rousseau S, Borden A, et al. Seizures in dominantly inherited Alzheimer disease. *Neurology*. 2016 Aug 30;87(9):912-9.
17. Chamard L, Wallon D, Pijoff A, Berger E, Viennet G, Hannequin D, et al. Amyloid-Related Imaging Abnormalities in A β PP Duplication Carriers. *J Alzheimers Dis*. 2013 Oct 10;37(4):789-93.
18. Linn J, Halpin A, Demaerel P, Ruhland J, Giese AD, Dichgans M, et al. Prevalence of superficial siderosis in patients with cerebral amyloid angiopathy. *Neurology*. 2010;74(17):1346-1350.
19. Wallon D, Rousseau S, Rovelet-Lecrux A, Quillard-Muraine M, Guyant-Marechal L, Martinaud O, et al. The French series of autosomal dominant early onset Alzheimer's disease cases: mutation spectrum and cerebrospinal fluid biomarkers. *J Alzheimers Dis JAD*. 2012;30(4):847-56.
20. Cassinari K, Quenez O, Joly-Hélas G, Beaussire L, Le Meur N, Castelain M, et al. A Simple, Universal, and Cost-Efficient Digital PCR Method for the Targeted Analysis of Copy Number Variations. *Clin Chem*. 2019 Sep;65(9):1153-60.
21. Puy L, Pasi M, Rodrigues M, van Veluw SJ, Tsivgoulis G, Shoamanesh A, et al. Cerebral microbleeds: from depiction to interpretation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2021 Jun;92(6):598-607.
22. Charidimou A, Linn J, Vernooij MW, Opherk C, Akoudad S, Baron JC, et al. Cortical superficial siderosis: detection and clinical significance in cerebral amyloid angiopathy and related conditions. *Brain*. 2015 Aug;138(8):2126-39.
23. Scheltens PH, Leys D, Barkhof F, Huglo D, Weinstein HC, Vermersch P, et al. Atrophy of medial temporal lobes on MRI in "probable" Alzheimer's disease and normal ageing: diagnostic value and neuropsychological correlates. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1992;55(10):967-972.
24. Fazekas F, Barkhof F, Wahlund LO, Pantoni L, Erkinjuntti T, Scheltens P, et al. CT and MRI rating of white matter lesions. *Cerebrovasc Dis*. 2002;13(Suppl. 2):31-36.

25. Lehmann S, Dumurgier J, Schraen S, Wallon D, Blanc F, Magnin E, et al. A diagnostic scale for Alzheimer's disease based on cerebrospinal fluid biomarker profiles. *Alzheimers Res Ther.* 2014;6(3):38.
26. Rovelet-Lecrux A, Charbonnier C, Wallon D, Nicolas G, Seaman MNJ, Pottier C, et al. De novo deleterious genetic variations target a biological network centered on A β peptide in early-onset Alzheimer disease. *Mol Psychiatry.* 2015 Sep;20(9):1046–56.
27. Auriel E, Charidimou A, Gurol ME, Ni J, Van Etten ES, Martinez-Ramirez S, et al. Validation of Clinikoradiological Criteria for the Diagnosis of Cerebral Amyloid Angiopathy-Related Inflammation. *JAMA Neurol.* 2016 Feb;73(2):197–202.
28. Thal DR, Rüb U, Orantes M, Braak H. Phases of A β deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology.* 2002 Jun 25;58(12):1791–800.
29. Kasuga K, Shimohata T, Nishimura A, Shiga A, Mizuguchi T, Tokunaga J, et al. Identification of independent APP locus duplication in Japanese patients with early-onset Alzheimer disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2009 Sep 1;80(9):1050–2.
30. Palop JJ, Mucke L. Amyloid- β -induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks. *Nat Neurosci.* 2010 Jul;13(7):812–8.
31. Sellal F, Wallon D, Martinez-Almoyna L, Marelli C, Dhar A, Oesterle H, et al. APP Mutations in Cerebral Amyloid Angiopathy with or without Cortical Calcifications: Report of Three Families and a Literature Review. *J Alzheimers Dis JAD.* 2017;56(1):37–46.
32. Kamp JA, Moursel LG, Haan J, Terwindt GM, Lesnik Oberstein SAMJ, van Duinen SG, et al. Amyloid β in hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis-Dutch type. *Rev Neurosci [Internet].* 2014 Jan 1 [cited 2021 Sep 17];25(5). Available from: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/revneuro-2014-0008/html>
33. Charidimou A, Boulouis G, Roongpiboonsopit D, Auriel E, Pasi M, Haley K, et al. Cortical superficial siderosis multifocality in cerebral amyloid angiopathy: a prospective study. *Neurology.* 2017;89(21):2128–2135.
34. Knol MJ, Lu D, Traylor M, Adams HHH, Romero JRJ, Smith AV, et al. Association of common genetic variants with brain microbleeds: A genome-wide association study. *Neurology.* 2020 Dec 15;95(24):e3331–43.
35. Shoamanesh A, Martinez-Ramirez S, Oliveira-Filho J, Reijmer Y, Falcone GJ, Ayres A, et al. Interrelationship of superficial siderosis and microbleeds in cerebral amyloid angiopathy. *Neurology.* 2014 Nov 11;83(20):1838–43.

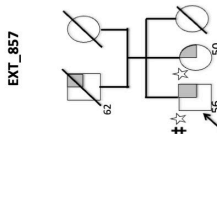
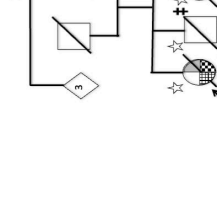
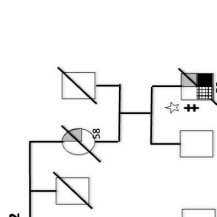
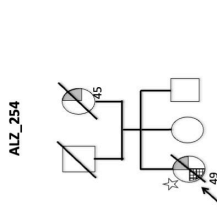
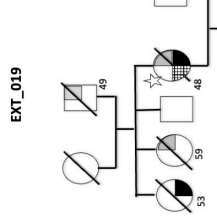
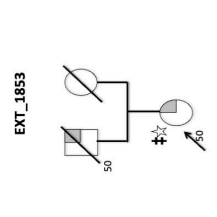
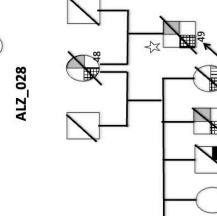
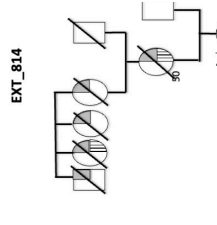
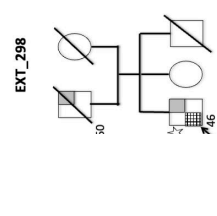
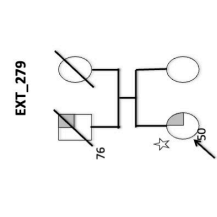
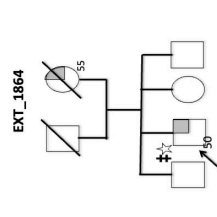
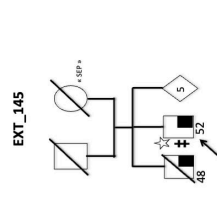
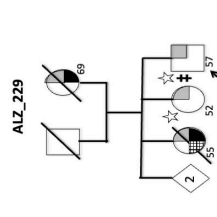
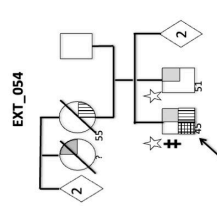
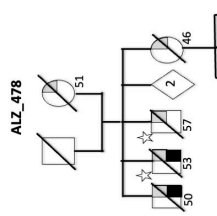
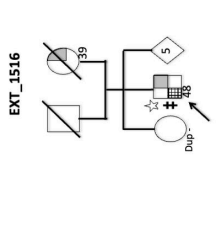
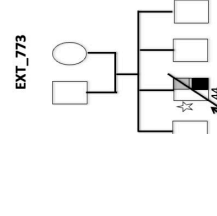
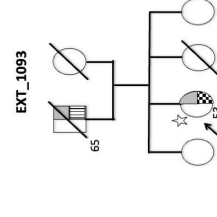
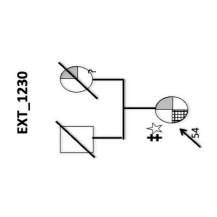
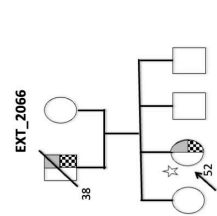
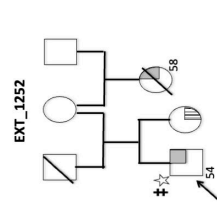
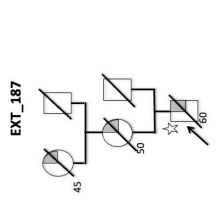
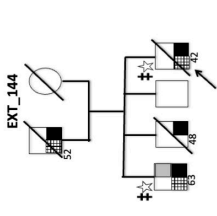
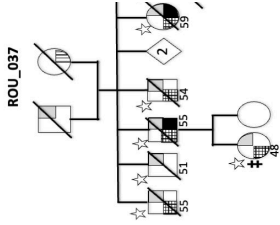
36. Haller S, Vernooij MW, Kuijter JPA, Larsson EM, Jäger HR, Barkhof F. Cerebral Microbleeds: Imaging and Clinical Significance. *Radiology*. 2018 Apr;287(1):11–28.
37. Fortea J, Vilaplana E, Carmona-Iragui M, Benejam B, Videla L, Barroeta I, et al. Clinical and biomarker changes of Alzheimer's disease in adults with Down syndrome: a cross-sectional study. *Lancet Lond Engl*. 2020 Jun 27;395(10242):1988–97.
38. Buss L, Fisher E, Hardy J, Nizetic D, Groet J, Pulford L, et al. Intracerebral haemorrhage in Down syndrome: protected or predisposed? *F1000Research*. 2016;5.
39. Alić I, Goh PA, Murray A, Portelius E, Gkanatsiou E, Gough G, et al. Patient-specific Alzheimer-like pathology in trisomy 21 cerebral organoids reveals BACE2 as a gene dose-sensitive AD suppressor in human brain. *Mol Psychiatry*. 2021 Oct;26(10):5766–88.
40. Charidimou A, Zonneveld HI, Shams S, Kantarci K, Shoamanesh A, Hilal S, et al. *APOE* and cortical superficial siderosis in CAA: Meta-analysis and potential mechanisms. *Neurology*. 2019 Jul 23;93(4):e358–71.
41. Siczkowski E, Milenkovic I, Venkataramani V, Giera R, Ströbel T, Höftberger R, et al. I716F A β PP mutation associates with the deposition of oligomeric pyroglutamate amyloid- β and α -synucleinopathy with Lewy bodies. *J Alzheimers Dis JAD*. 2015;44(1):103–14.
42. Martinez-Ramirez S, Van Rooden S, Charidimou A, van Opstal AM, Wermer M, Gurol ME, et al. Perivascular spaces volume in sporadic and hereditary (Dutch-type) cerebral amyloid angiopathy. *Stroke*. 2018;49(8):1913–1919.
43. Koemans EA, van Etten ES, van Opstal AM, Labadie G, Terwindt GM, Wermer MJH, et al. Innovative Magnetic Resonance Imaging Markers of Hereditary Cerebral Amyloid Angiopathy at 7 Tesla. *Stroke*. 2018 Jun;49(6):1518–20.
44. Greenberg SM, Charidimou A. Diagnosis of cerebral amyloid angiopathy: evolution of the Boston criteria. *Stroke*. 2018;49(2):491–497.
45. Grangeon L, Paquet C, Guey S, Zarea A, Martinaud O, Rotharmel M, et al. Cerebrospinal Fluid Profile of Tau, Phosphorylated Tau, A β 42, and A β 40 in Probable Cerebral Amyloid Angiopathy. *J Alzheimers Dis JAD*. 2022 Apr 1;

FIGURE AND TABLE LEGENDS :

Figure 1: Reduced pedigrees of 23 *APP* duplication families

Figure 2: Size of *APP* locus duplications for each carrier and associated genes involved

*Rectangles show the duplicated regions in each family. First column shows the position on chromosome 21 (GRCh37); second column shows name of genes corresponding to the position or the exon number within the *APP* gene; following columns represent the genomic duplication carried by each family (with family number and size of duplication in Mb). Each duplication contains the complete grey line corresponding to the *APP* gene. CAA: cerebral amyloid angiopathy diagnosis on MRI according to Boston revised criteria (except age criterion); ICH: intra cerebral hemorrhage, CMB: cerebral microbleed, CSS: cortical superficial siderosis.*



Legend:

- ▣ Proband
- ➔ Age at onset
- ▨ Lobar hemorrhage
- ▧ Stroke (unspecified)
- ☆ DNA available
- ⊕ MRI available
- ◐ Dementia
- ◑ Psychosis

Additional Information:

- Asymptomatic: 37 y.o.
- De Novo

Supp Figure 1: MRI scans of two *APP* duplication carriers showing deep microbleeds (orange arrows). A: EXT_814 carrying a 5.7Mb duplication and B: EXT_1516 carrying a 0.95Mb duplication.

Supp Figure 2: MRI scans of three patients from the BES_262 family showing the large heterogeneity of cerebral imaging

A: MRI of 262-001; B: MRI of 262-003; C: MRI of 262-004

Table 1: All 24 French families carrying an *APP* duplication

ID fam	Duplication size (Mb) (Hg19)	<i>APOE</i> (index case)	AAO (years)	DD of sampled patients (years)	Nb patients sampled	Nb affected or highly suspected affected members
EXT_006	15.3	33	58	3	1	NA
EXT_019	3.6	33	42-59	12	2	5
ALZ_028	0.6	34	42-60	15-30	2	6
ROU_037	0.75	33	48-59	5-12	7	8
EXT_054	11	33	45-55	1-12	2	4
EXT_144	9.7	23	42-63	1-4	2	4
EXT_145	6.1	33	48-52	6	1	3
EXT_187	14.2	33	45-60	4	1	3
ALZ_229	6.1	33	52-69	1-18	2	4
ALZ_254	14.7	33	45-49	6	1	2
BES_262	0.55	33	44-58	5-32	5	8
EXT_279	1.08	33	50 -76	3	1	2
EXT_298	0.78	34	46-50	13	1	2
ALZ_478	1.9	24	46-57	3-9	4	8
EXT_773	6.3	33	44	12	1	1 (<i>de novo</i>)
EXT_814	5.7	33	50-54	8-10	1	6
EXT_857	1.5	34	50-62	1-2	2	3
EXT_1093	1.5	33	53-65	10	1	2
EXT_1230	9.3	33	54	7	1	2
EXT_1252	1.4	33	54-58	8	1	3
EXT_1516	0.95	33	39-48	4	1	2
EXT_1853	0.95	33	50	7	1	2
EXT_1864	3.4	33	50-55	6	1	2
EXT_2066	0.6	33	38-52	2	1	2

ID Fam: Family identification number; AAO: Age at onset; DD: disease duration; Nb: number

Table 2: Demographics and clinical characteristics of symptomatic *APP* duplication carriers (n= 41)

Age at onset, years, mean ± SD	50.8 ± 5.9
Age at death, years, mean ± SD	58.6 ± 6.2 (<i>n=21</i>)
Sex, Male (n%)	25 (60.9%)
First neurologic event	
ICH, n patients (%)	5 (12.1%)
Cognitive decline, n patients (%)	32 (78.0%)
Ischemic stroke, n patients (%)	0
Psychiatric symptoms n patients (%)	2 (4.9%)
Seizures, n patients (%)	2 (4.9%)
Symptomatic lobar ICH	12 (29.2%)
Age at 1st ICH (years, mean ± SD)	47.2 ± 18.8

Seizure, n patients (%)	21 (51.2%)
Presence of cognitive decline, n patients (%)	37 (90.2%)
APOE genotype	
APOE2 carriers n (%)	3 (7.3%)
APOE4 carriers n (%)	6 (14.6%)
APOE2 or 4 homozygous n (%)	0
CSF biomarkers available, n(%)	19 (46.3%)
A β -42 (pg/ml), mean \pm SD	378.1 \pm 133.1
Tau (pg/ml), mean \pm SD	600.5 \pm 318.0
Phospho-Tau (pg/ml), mean \pm SD	84.0 \pm 39.3

ICH: intra cerebral hemorrhage

Table 3: Radiological data compared to CAA controls

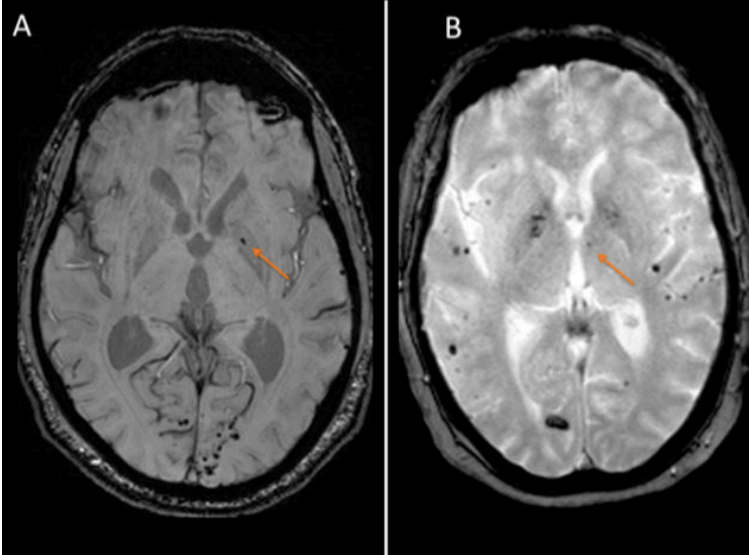
	<i>APP</i>	<i>CAA</i>	<i>Crude</i>		<i>After adjustment for onset-MRI delay*</i>	
	Duplication with CAA on MRI	comparison group	<i>OR/difference</i>	<i>p value</i>	<i>OR/difference</i>	<i>p-value</i>
	(n=14)	(n=40)				
Blood-sensitive sequence						
- T2*	13	36				
- SWI or SWAN	1	4				
Age at IRM (y,mean \pm SD)	55.2 \pm 6.2	68.2 \pm 8.5		1.0 x 10 ⁻⁶		
Time from symptom onset to MRI (y,mean \pm SD)	4.1 \pm 3.1	3.3 \pm 3.6		0.23		
Hemorrhages						
Presence of ICH						
Lobar	10 (71.4%)	24 (60.0%)	1.55	0.746	1.68 [0.46 ; 7.22]	0.447
Posterior fossa	2	0	[0.36 ;8.02]			
Deep	0	0				
Presence of cortical superficial siderosis						
-At least one sulcus	2 (14.2%)	21 (52.5%)	0.15	0.013	0.14 [0.02 ; 0.59]	0.017
-Disseminated CSS	0	15 (37.5%)	[0.01 ;0.80]	0.005		
Microbleeds						
Presence in posterior fossa	6 (42.8%)	7 (17.5%)		0.07		
Lobar MBs (mean \pm SD)	110.7 \pm 146.6	56.7 \pm 121.3	55.3 [-146.8 ; 36.1]	0.004	50 [-30.0 ; 131.9]	0.212
Ratio post./ant.	10.1 \pm 12.5	5.3 \pm 15.2	4.5 [-13.0 ; 4.0]	0.009	4.9 [-4.3 ; 14.22]	0.291
Presence in deep gray matter	2 (14.2%)	0				
Infarct						
Presence of lacunes	0	5 (12.5%)		0.31		
Presence of large vessel infarcts	2 (14.2%)	1 (2.5%)		0.16		
WM hyperintensities (Fazekas scale,mean \pm SD)						
Modified Fazekas score in the pre-rolandic WM regions	0.9 \pm 0.64	1.6 \pm 0.9	0.59 [0.13 ; 1.04]	0.027	-0.60 [-1.13 ; -0.07]	0.026

Modified Fazekas score in the post-rolandic WM regions	1.5 ± 1.0	1.9 ± 0.9	0.41 [-0.28 ; 1.10]	0.135	-0.44 [-1.08 ; 0.18]	0.162
Hippocampal atrophy (Scheltens scale,mean)						
Right	1.7 ± 1.4	1.6 ± 1.3	0.1 [-1.1 ; 0.8]	0.877	0.10 [-0.82 ; 1.02]	0.826
Left	2.0 ± 1.5	1.7 ± 1.2	0.25 [-1.20 ; 0.70]	0.609	0.23 [-0.66 ; 1.13]	0.601

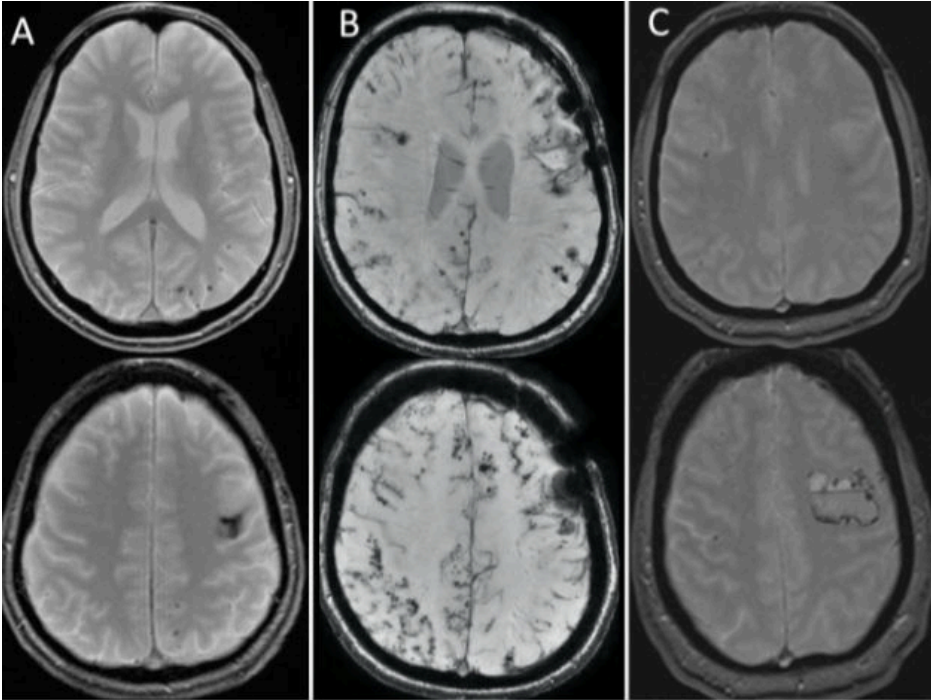
CAA: cerebral amyloid angiopathy; ICH: intra cerebral hemorrhage, CMB: cerebral microbleed, CSS: cortical superficial siderosis, WM: white matter

**Linear (logistic) regressions were performed using each quantitative (resp. binary) variable of interest as output and group as explicative factor with adjustment for time from symptom onset to MRI. The last column gives p-values for the Dup/Non Dup group variable in each regression.*

Supp Figure 1: MRI scans of two *APP* duplication carriers showing deep microbleeds (orange arrows). A: EXT_814 carrying a 5.7Mb duplication and B: EXT_1516 carrying a 0.95Mb duplication.



Supp Figure 2: MRI scans of three patients from the BES_262 family showing the large heterogeneity of cerebral imaging A: MRI of 262-001; B: MRI of 262-003; C: MRI of 262-004



7.3. Les formes inflammatoires d'AAC : Un phénotype particulier à considérer comme un sous-groupe d'AAC ou une entité indépendante ?

Les formes inflammatoires d'AAC sont très rares. Les critères diagnostiques initiaux ont été établis uniquement à partir d'une revue de littérature de cas confirmés par l'anatomopathologie qui ne comportait que 69 patients(398). Cette forme est encore mal comprise : Est-elle à considérer comme une forme particulière d'AAC ou comme une entité indépendante ? Les inflammations transmurales retrouvées dans le sous-groupe des ABRA se rapprochent beaucoup des vascularites primitives des petits vaisseaux par exemple.

A ce jour, nous n'avons pas suffisamment de données biologiques, radiologiques ou de suivi pour répondre à cette question. En effet, il existe très peu de données de biomarqueurs dans l'AAC inflammatoire. La plus grande série regroupait 25 patients et décrivait un profil de LCS assez proche de celui des formes non inflammatoires, à savoir une diminution des taux d'A β 40 et A β 42 mais plus marquée cependant (7) (8). Ces études ont été faites sur des nombres très limités de patients et demandent à être confirmées par de plus grandes séries. Dans l'AAC-inflammatoire, le génotype ApoE ϵ 4/ ϵ 4 semble jouer un rôle important (4) mais cette association reste encore incomprise. Certains évoquent que ce génotype pourrait potentialiser l'activation du complément par A β (5) ou bien une activation délétère de la microglie (6). Les données de la littérature sont pour le moment insuffisantes.

Nous souhaitons donc évaluer les marqueurs radiologiques, biologiques et moléculaires de cette entité mais aussi leur devenir à moyen et long terme. Un des objectifs principaux était la comparaison aux formes non-inflammatoires d'AAC afin d'identifier les points communs et spécifiques des formes inflammatoires. Le but étant d'apporter des arguments supplémentaires pour intégrer ces formes en tant qu'épisode transitoire survenant au cours d'une AAC.

Nous avons inclus rétrospectivement tous les patients diagnostiqués AAC inflammatoire selon les derniers critères en vigueur, issus au de 13 centres français (96). Nous avons parallèlement constitué une cohorte témoin de formes non inflammatoires d'AAC probables(126) appariés en sexe et en âge, avec une durée d'évolution depuis les premiers symptômes comparables. La survie, l'autonomie et l'évolution cognitive ont été comparées après régression logistique. Les micro-saignements, les hémorragies intracérébrales, la sidérose corticale superficielle et l'atrophie hippocampique ont été

analysés ainsi que le profil des biomarqueurs du LCS et le génotype *APOE* lorsqu'il était disponible. Les résultats ont été comparés à l'aide de courbes de Kaplan-Meier et de tests log-rank.

48 patients CAA-ri ont été inclus avec une durée moyenne de suivi de plus de 3 ans : 11 patients sont décédés (22,9%) et 18 (37,5%) ont rechuté. Les patients inflammatoires étaient plus fréquemment institutionnalisés (30 % vs 8,3 %, $p < 0,001$) mais les taux de mortalité restaient similaires. Les scores MMSE et échelle de Rankin modifiée étaient plus sévères chez les patients inflammatoires à la fin du suivi. Leur IRM ont montrées des micro-saignements plus nombreux au début et à la fin du suivi ($p < 0,001$ et $p = 0,004$ respectivement) et des niveaux initiaux d'A β 42 dans leur LCS plus faibles (373,3 pg/ml contre 490,8 pg/ml, $p = 0,05$). Les patients inflammatoires étaient plus souvent porteurs d'au moins un allèle *APOE* $\epsilon 4$ (76 % vs 37,5 %, p ajusté = 0,05), en particulier à l'état homozygote (56 % vs 6,2 %, $p < 0,001$). Au total, la forme inflammatoire d'AAC semblait être plus sévère que la forme non inflammatoire avec une perte d'autonomie significative à court et moyen terme et une charge amyloïde globale plus élevée (reflétée par les marqueurs radiologiques), possiblement favorisée par l'allèle $\epsilon 4$. Nos données suggèrent un impact négatif majeur de la phase inflammatoire, rapportant près de 50 % d'issues défavorables et un degré de sévérité de la maladie significativement plus élevé par rapport aux AAC non inflammatoires pendant les phases aiguës et subaiguës. Cette phase inflammatoire sévère semble corrélée à un processus d'angiopathie sous-jacent avancé. Toutefois, au-delà de sa gravité initiale, plusieurs éléments nous ont amené à la considérer comme un événement intercurrent survenant au cours d'une évolution progressive et avancée d'AAC non inflammatoire. Le nombre de diagnostics d'AAC posés antérieurement à la survenue d'un épisode inflammatoire (14.5%) et l'atrophie hippocampique plus sévère en sont les reflets et l'évolution à long-terme de nos 2 groupes semblait similaire sur les courbes de Kaplan-Meier.

Appartenant à la même entité, ces deux sous-types partagent les mêmes voies physiopathologiques sous-jacentes bien qu'avec des degrés de sévérité différents. Une charge amyloïde élevée serait à l'origine d'un épisode inflammatoire bruyant, potentiellement déclenché par certaines facteurs de risque ou conditions médicales encore mal comprises. L'*APOE* $\epsilon 4$, porté ici par 76 % des patients inflammatoires, est également connue pour être associée à l'AAC de type 1, affectant principalement les capillaires. Ce type de vaisseau étant beaucoup plus fin, l'isoforme *APOE* $\epsilon 4$ pourrait

indirectement favoriser un contact massif entre l'A β et le système immunitaire local, conduisant à une réaction immunitaire dirigée contre ce peptide. D'autres facteurs de risque pourraient être identifiés afin de prévenir ou de contrôler plus efficacement cette condition rare mais sévère dans l'évolution de la maladie



Different clinical outcomes between cerebral amyloid angiopathy-related inflammation and non-inflammatory form

L. Grangeon¹ · G. Quesney¹ · M. Verdalle-Cazes² · S. Coulette³ · D. Renard⁴ · A. Wacogne⁴ · T. Allou⁵ · N. Olivier⁵ · Y. Boukriche⁶ · G. Blanchet-Fourcade⁷ · P. Labauge³ · C. Arquizan³ · S. Canaple⁸ · O. Godefroy⁸ · O. Martinaud^{9,10} · P. Verdure¹¹ · M. Quillard-Muraine¹² · J. Pariente¹³ · E. Magnin¹⁴ · G. Nicolas¹⁵ · C. Charbonnier¹⁵ · D. Maltête¹ · M. Formaglio¹⁶ · N. Raposo¹³ · X. Ayrygnac³ · D. Wallon^{1,14}

Received: 10 December 2021 / Revised: 12 April 2022 / Accepted: 13 April 2022 / Published online: 26 June 2022
© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany 2022

Abstract

Objective Cerebral amyloid angiopathy-related inflammation (CAA-ri) is a rare manifestation related to CAA, thought to be more severe. We aimed to compare the clinical and radiological outcomes of CAA-ri and non-inflammatory CAA.

Materials and methods We retrospectively included all patients with CAA-ri from 13 French centers. We constituted a sex- and age-matched control cohort with non-inflammatory CAA and similar disease duration. Survival, autonomy and cognitive evolution were compared after logistic regression. Cerebral microbleeds (CMB), intracerebral hemorrhage, cortical superficial siderosis and hippocampal atrophy were analyzed as well as CSF biomarker profile and *APOE* genotype when available. Outcomes were compared using Kaplan–Meier curves and log-rank tests.

Results Data from 48 CAA-ri patients including 28 already reported and 20 new patients were analyzed. Over a mean of 3.1 years, 11 patients died (22.9%) and 18 (37.5%) relapsed. CAA-ri patients were more frequently institutionalized than non-inflammatory CAA patients (30% vs 8.3%, $p < 0.001$); mortality rates remained similar. MMSE and modified Rankin scale scores showed greater severity in CAA-ri at last follow-up. MRI showed a higher number of CMB at baseline and last follow-up in CAA-ri ($p < 0.001$ and $p = 0.004$, respectively). CSF showed lower baseline levels of A β 42 in CAA-ri than non-inflammatory CAA (373.3 pg/ml vs 490.8 pg/ml, $p = 0.05$). CAA-ri patients more likely carried at least one *APOE* $\epsilon 4$ allele (76% vs 37.5%, adjusted $p = 0.05$) particularly as homozygous status (56% vs 6.2%, $p < 0.001$).

Interpretation CAA-ri appears to be more severe than non-inflammatory CAA with a significant loss of autonomy and global higher amyloid burden, shown by more CMB and a distinct CSF profile. This burden may be partially promoted by $\epsilon 4$ allele.

Keywords Cerebral amyloid angiopathy · Cerebral amyloid angiopathy-related inflammation · Clinical outcome · Cerebral MRI · CSF biomarkers · APOE genotype

Abbreviations

AD	Alzheimer's disease
CAA	Cerebral amyloid angiopathy
CAA-ri	Cerebral amyloid angiopathy-related inflammation
CMB	Cerebral microbleeds

CSF	Cerebrospinal fluid
CSS	Cortical superficial siderosis
ICH	Intracerebral hemorrhage
LP	Lumbar puncture
MRI	Magnetic resonance imaging
WMH	White matter hyperintensity

L. Grangeon and G. Quesney have contributed equally to this work as Co-first authors.

X. Ayrygnac and D. Wallon have contributed equally to this work as Co-last authors.

✉ L. Grangeon
lou.grangeon@chu-rouen.fr

Extended author information available on the last page of the article

Introduction

Cerebral amyloid angiopathy (CAA) is mainly characterized by the deposition of beta amyloid (A β) in the media and adventitia of the cortical and leptomeningeal vessels, mostly revealed by lobar intracerebral hemorrhage (ICH) and cognitive impairment in the elderly [1]. A rare manifestation of

CAA is related to an inflammatory reaction against A β species (CAA-ri), inducing a sub-acute neurological syndrome with atypical sub-cortical pattern of white matter hyperintensities (WMH) on magnetic resonance imaging (MRI) FLAIR-weighted sequences [2]. Symptoms can include cognitive impairment, headache, seizure, focal neurological signs, consciousness or behavioral disorders [3]. Given the rarity of CAA-ri, diagnostic criteria were written in 2011, based on a review of series including less than 70 patients [2], and modified in 2016 on a 17 patient cohort to improve specificity [4].

Several radiological features such as cerebral microbleeds (CMB) [5] and the presence of cortical superficial siderosis (CSS) [6] were reported to be associated with higher mortality and worse clinical outcomes in non-inflammatory CAA. In CAA-ri, more CMB on MRI were associated with more severe sub-cortical inflammatory lesions [7]. Another study found a higher number of CMB in CAA-ri compared to non-inflammatory CAA but no difference regarding ICH or CSS [8].

However, until now, little was known about clinical outcomes specifically in CAA-ri. Recently, two important studies were published in 2019 [9] and 2021 [10] based on two multicenter cohorts of 48 and 93 probable or definite CAA-ri, respectively. The first study focused on the association between immunosuppressive treatment and outcomes, supporting the effectiveness of such treatment. The second study prospectively analyzed clinical and radiological outcomes over time and studied prognostic factors of relapse.

Gathering 214 CAA-ri case reports and series from the literature with heterogeneous data, one study showed good outcomes with no or mild disability in half of the cases while 20% of patients presented with a long-term moderate to severe disability. The mortality rate reached 31% [11]. The rate of clinical recovery reached 80% in both recent multicenter cohorts but 40% of patients relapsed [9, 10]. Except for the use of prolonged immunosuppressive treatment with gradual tapering, no prognostic factor, clinical, biological or radiological has clearly been identified so far.

CAA-ri is commonly thought to be more severe than non-inflammatory CAA but without any study specifically designed to address that question. Moreover, it remains unclear whether CAA-ri should be considered as a distinct severe entity or as a sub-group belonging to the non-inflammatory form of CAA disease. Thus, the aims of this study were to investigate the long-term clinical and radiological outcomes of a large cohort of CAA-ri patients compared to non-inflammatory CAA controls, and to identify potential clinical and radiological prognostic factors of CAA-ri.

Materials and methods

CAA-ri patients

A multicenter retrospective study was conducted in 13 French neurological centers between January 2007 and April 2019 consecutively including all patients with suspected CAA-ri according to current diagnostic criteria [4]. We included in our cohort the French series reported by Coulette et al. in 2019 [12]. We collected demographic data, medical history, clinical presentation at baseline and CAA-ri-specific treatments. Clinical outcome was assessed by mini-mental state examination (MMSE) and autonomy by modified Rankin scale (mRS) at diagnosis and during follow-up, as well as rates of institutionalization, relapse and mortality. Final clinical outcome (MMSE, mRS) measures were the last available evaluations before death or at the end of follow-up. Relapse was defined as recurrence of symptoms (such as headache or seizure) and/or reappearance or worsening of asymmetric white matter hyperintensities on new MRI. Poor outcome was defined as a mRS score of > 2 at the end of follow-up. Routine care follow-up consisted in clinical visits for all patients, mostly every 3 months during the first year followed by at least annual visit. Mortality rates were collected from medical charts and by telephone calls to general practitioners in case of missing data.

Ethical approval for data collection and publication was obtained from the institutional review board of Rouen University Hospital (CERDE #E2021-15 notification).

Comparison with a non-inflammatory CAA cohort

To perform comparative analyses, we included non-inflammatory definite or probable CAA patients, according to the modified Boston diagnosis criteria, from the Rouen University Hospital cohort [13], and only if neurological symptoms onset was no more than 2 years before inclusion. Cerebral MRI at diagnosis was used for rating. Each randomly selected non-inflammatory CAA patient (computer generated randomization) was age- (± 4 years) and sex matched with a CAA-ri patient.

Neuroimaging assessment

The same neuroradiologist (MVC) from Rouen University Hospital, blinded to the clinical outcome, analyzed patients' cerebral MRI at baseline and at last follow-up. Hippocampal atrophy was scored according to Scheltens' scale on 3D acquisition or 2D coronal T1-weighted sequences [14]. To assess brain hemorrhagic features, blood sensitive sequences were studied using T2 gradient echo (T2 GRE),

susceptibility-weighted imaging (SWI) or T2 star-weighted angiography (SWAN). Final radiological measures (number of CMB or CSS, Scheltens' scale) were the last available evaluations before death or at the end of follow-up. Only sequences that could be compared between baseline and follow-up imaging (i.e., T2 GRE on both baseline and follow-up MRI, or SWI/SWAN on both baseline and follow-up MRI) were analyzed given the very different sensitivity of these weighted sequences. Hemorrhagic lesions were counted based on a visual analysis. CMB were studied with maximum intensity projection (MIP) reconstructions. CMB count was arbitrarily stopped above 1000 for reliability. Finally, CSS was classified as focal (≤ 3 sulci) or disseminated (> 4 sulci) after recording the number of sulci involved [15]

Cerebrospinal fluid biomarkers

When performed, we recorded the levels of Alzheimer cerebrospinal fluid (CSF) biomarkers after lumbar puncture (LP), including measures of total Tau protein, phosphorylated Tau (p-Tau) protein, A β 42 and A β 40 peptide levels, expressed in pg/mL. In an effort to reduce inter-site variability in CSF readings, all centers used a common 10-mL polypropylene tube to collect CSF (catalog number 62.610.201; Sarstedt, Nümbrecht, Germany) [16]. After centrifugation, all samples were aliquoted into polypropylene Eppendorf tubes, then frozen at -80 °C within 1 h. A β 42, A β 40, Tau and p-Tau protein measurements were taken using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) according to the manufacturer's instructions. The quality of the results was ensured by the use of validated standard operating procedures and internal quality controls as all the centers were already involved in nationwide studies [17] and belong to the same national *ePLM* network to enhance harmonization of procedures.

APOE Genotyping

After obtaining written informed consent from the patient, genetic analyses were performed on DNA extracted from whole blood when available. *APOE* genotype was determined for each subject by Sanger sequencing.

Statistics

Descriptive statistics were expressed as median and interquartile range (IQR) or mean \pm standard deviation (SD). The two groups of patients were compared using a Mann–Whitney Test for continuous data and a Fisher exact test or a Chi2 test for categorical data. All items ($n=26$) were fed into logistic regression using R software (“glm” function, p calculated from Wald's test), adjusted for age at onset,

sex, follow-up duration, time from onset to LP for CSF data and time from baseline MRI to last follow-up MRI for imaging data. The nominal significance level was 0.05. To address multiple statistical test bias, we performed a Bonferroni correction and therefore retained a corrected significance threshold of 0.002. A Kaplan–Meier curve was performed using a composite prognostic endpoint based on the occurrence of death or institutionalization. The comparison between non-inflammatory CAA and CAA-ri was carried out using the “ggsurvplot” function and was based on a log-rank test. To highlight prognostic factors, we then compared CAA-ri patients with good outcomes (defined as a mRS score of ≤ 2) and CAA-ri patients with poor outcomes following the same statistical strategies.

Data availability statement

A de-identified database and statistical analysis plan are available upon reasonable request.

Results

CAA-ri population and outcomes

The study enrolled 48 CAA-ri patients, including 28 cases that were previously reported (Fig. 1) [12]. Twenty-five (52.1%) were male and mean age at onset was 72.7 ± 7.0 years (Table 1). Six (12.5%) had a histologically confirmed diagnosis on biopsy. The most common clinical features were confusion or behavioral disorder, present in 28 patients (58.3%), and hemiparesis in 19 patients (39.5%). Other symptoms included seizures and vision disturbances in 16 patients (33.3%), mostly generalized seizures ($n=9$) and headaches ($n=8$). Initial MMSE and mRS were available, respectively, in 16 and 45 patients, with mean scores of 20.8 ± 6.6 and 0.93 ± 1.2 . Nine patients (18.7%) presented a cognitive impairment and seven patients (14.6%) had a history of spontaneous ICH prior to the CAA-ri diagnosis. Seven patients (14.5%) already met the diagnostic criteria for non-inflammatory CAA before the inflammatory event. Three patients had a familial history of early-onset Alzheimer's disease (AD).

Overall, 32 patients (66.7%) were treated with corticosteroids. Twenty patients received high doses of intravenous (IV) therapy (methylprednisolone 1 g per day) for 5 days followed by oral therapy (prednisone or prednisolone 0.5–1 mg/kg per day) for 15 patients. Twelve patients were only treated with long-term oral therapy. Six patients (12.5%) received immunosuppressive therapy (mycophenolate mofetil, cyclophosphamide or azathioprine).

The mean duration of follow-up was 3.1 years \pm 2.2. Three patients were quickly lost to follow-up after their

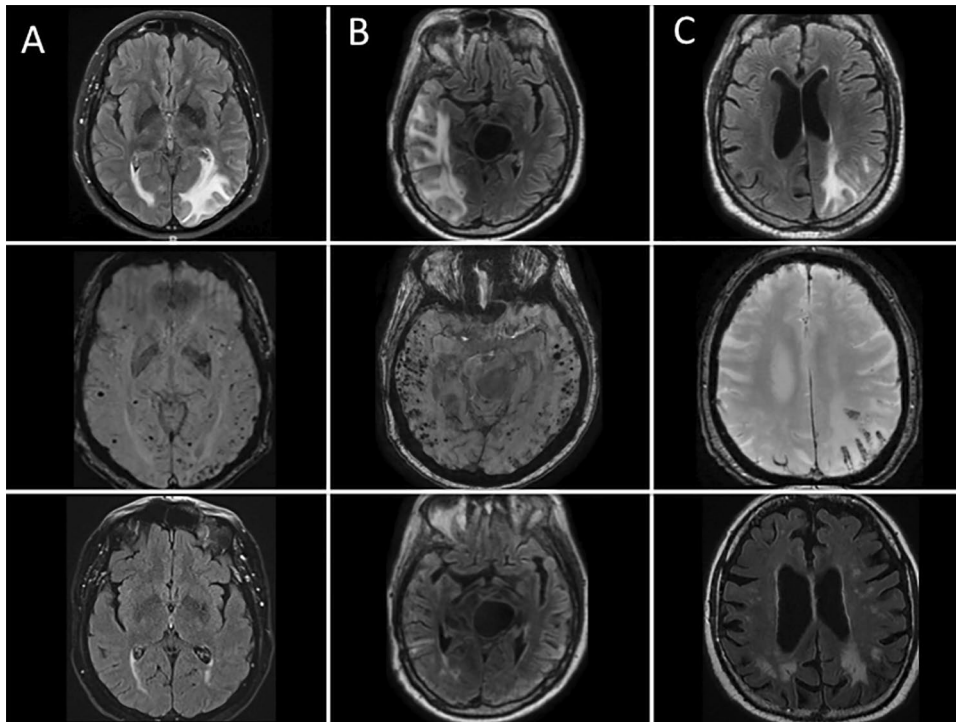


Fig. 1 Representative imaging findings in three different patients (A–C) with suspected CAA-ri at presentation and after 3 months of follow-up. Fluid-attenuated inversion recovery (FLAIR) axial sequences at first presentation (upper line) showing cortical and sub-cortical asymmetric hyper intensities with edema but no mass effect. T2 GRE or SWI axial sequences (middle line) showing numerous cerebral microbleeds, mainly clustered in the hyperintensity area. After

3–4 months of follow-up (lower line), FLAIR sequences showing a significant reduction of edema. Patients A and B were treated with 5 days of IV boluses of 1 g/d methylprednisolone followed by 1 mg/kg oral prednisone daily and gradual tapering over several months. Patient (C) did not receive any corticosteroid treatment considering his age (89 years old) and fragile condition and very mild presentation (isolated partial seizure)

first admission. Outcome data are presented in Table 2. Six patients (12.5%) presented ICH during follow-up. Eighteen patients (37.5%) had a relapse at a mean of $1.2 \text{ years} \pm 1.5$ after the first inflammatory event, while on a specific long-term treatment. Among them, first-line high-dose IV corticosteroids followed by gradual oral tapering were used in 8/18 patients (44.4%) (the oral dose ranged from 5 to 35 mg per day when the relapse occurred), 3/18 (16.6%) relapses occurred after the sudden withdrawal of oral corticosteroids without first-line high-dose IV corticosteroid therapy and 7/18 relapses (38.9%) occurred in patients who did not receive any corticosteroid therapy.

Thirteen relapses were treated with high-dose corticosteroids and 8 (44.4%) with additional long-term immunosuppressive therapy.

During follow-up, MMSE was globally stable in the cohort (initial score = 20.8 ± 6.6 versus last follow-up score = 21.0 ± 6.1) in contrast with a marked worsening of the last follow-up mRS score (0.93 ± 1.2 versus 3.0 ± 1.9). In total, 11 patients (22.9%) died during follow-up, after a mean time from first symptoms of $1.2 \text{ years} \pm 0.9$; the earliest after 24 days. Twelve patients had a severe disability

during follow-up justifying institutionalization (after a mean time of $1.7 \text{ years} \pm 1.9$ after first symptoms).

MRI was available for analysis of the number of CMB and CSS in this study in 38 patients, with all but three using the same magnetic susceptibility-weighted sequence during follow-up (Table 3). Mean total number of CMB at baseline was 431.3 ± 431.8 , increasing to 501.3 ± 509.6 at last follow-up. They were predominantly post-Rolandic (mean posterior/anterior ratio 1.61 ± 1.37). ICH and at least one sulcus with CSS were found in 8 (16.6%) and 14 (29.1%) patients, respectively, on MRI at baseline. Finally, mean Scheltens' scale score at baseline was 1.72 ± 1.28 on the right and 1.52 ± 1.26 on the left.

Forty-four CAA-ri patients underwent LP during the diagnostic assessment, with AD CSF biomarkers analyzed in 33 patients. A β 40 peptide was also measured in 28 of them. Mean white cell count in CSF was $10.8/\text{mm}^3 \pm 54.1$, but 38/44 patients (86.3%) had less than $5/\text{mm}^3$. Of note, only one patient displayed marked lymphocytic meningitis with $360/\text{mm}^3$ white cells during the acute phase of CAA-ri. Seven patients had elevated protein level $> 1 \text{ g/L}$. Overall, 19/44 (43.2%) standard LPs were considered

Table 1 Comparison of baseline characteristics of patients with CAA-ri and non-inflammatory CAA

	CAA-ri (n=48)	Non-inflammatory CAA (n=48)	p value	p value after adjustment
Age at onset (y):			0.74	NA
Mean ± SD	72.7 ± 7.0	73.1 ± 8.5		
Median (IQR)	72.5 (12)	73 (14)		
Follow-up duration (y)			0.79	NA
Mean ± SD	2.6 ± 2.2	2.5 ± 1.8		
Median (IQR)	2.0 (2.95)	2.43 (2.5)		
Time from onset to last follow-up			0.84	NA
Mean ± SD	2.8 ± 2.2	2.6 ± 1.8		
Hypertension	34 (70%)	28 (58.3%)	0.2	0.18
Smoking	14 (29.2%)	16 (33.3%)	0.65	0.61
Chronic alcohol abuse	10 (20.8%)	5 (10.4%)	0.15	0.15
Dyslipidemia	19 (39.5%)	26 (54.1%)	0.15	0.16
Diabetes mellitus	8 (16.6%)	9 (18.7%)	0.79	0.79
Antiplatelet treatment	4/20 (20%)*	12/48 (25.0%)*	0.65	0.69
Anticoagulation therapy	6/20 (30%)*	3/48 (6.2%)*	0.01	0.02
Time from onset to lumbar puncture (days)	148 ± 189	270 ± 284	0.007	NA
CSF Leucocytes			0.03	0.02
Mean ± SD	10.8 ± 54.1	1.3 ± 2.8		
Median (IQR)	1 (3.2)	0 (0.75)		
CSF Protein level			0.02	0.03
Mean ± SD	0.69 ± 0.53	0.46 ± 0.16		
Median (IQR)	0.49 (0.3)	0.47 (0.24)		
CSF Total Tau			0.004	0.08
Mean ± SD	595.1 ± 356	412.6 ± 433.7		
Median (IQR)	458 (521)	309.5 (193)		
CSF p-Tau			0.58	0.54
Mean ± SD	59.4 ± 33.7	56.7 ± 18.3		
Median (IQR)	53 (20.7)	57 (23.5)		
CSF Aβ 40			0.01	0.52
Mean ± SD	8023.1 ± 8697.3	10,273.9 ± 5686.3		
Median (IQR)	5857.5 (5631.5)	9000 (5300)		
CSF Aβ 42			0.03	0.05
Mean ± SD	373.3 ± 128.5	490.8 ± 249.7		
Median (IQR)	368 (140)	420 (92.5)		
CSF Ratio Aβ 42/ Aβ 40	0.06	0.05	0.17	0.37
<i>APOE</i> ε2 ≥ 1 carriers	2/25 (8.0%)*	3/16 (18.7%)*	0.36	0.99
<i>APOE</i> ε4 ≥ 1 carriers	19/25 (76%)*	6/16 (37.5%)*	0.01	0.05
<i>APOE</i> ε4 homozygous carriers	14/25 (56%)*	1/16 (6.2%)*	0.002	≤0.001

CAA Cerebral Amyloid Angiopathy, CAA-ri Cerebral Amyloid Angiopathy-related inflammation, y years, CSF cerebrospinal fluid, SD Standard deviation, Tau Tau protein, p-Tau phosphorylated Tau, Aβ42 amyloid β1–42, Aβ40 amyloid β1–40

Nominal significance (i.e., $p < 0.05$) is indicated in bold and statistical significance after Bonferroni correction (i.e., $p < 0.002$) is underlined

*Due to missing data, numbers of patients analyzed with available data is mentioned

completely normal according to local laboratory thresholds. Mean total Tau protein level was 595.1 ± 356 ng/L, p-Tau protein level was 59.4 ± 33.7 ng/L. Finally, mean Aβ40 peptide was 8023.1 ± 8697.3 ng/L and mean Aβ42

peptide was 373.3 ± 128.5 ng/L. *APOE* genotype was available in 25 patients. Among them, two carried at least one *APOE* ε2 (*APOE2*) allele and 19 at least one *APOE* ε4 (*APOE4*) allele.

Table 2 Comparison of clinical outcomes

	CAA-ri (<i>n</i> =48)	Non-inflammatory CAA (<i>n</i> =48)	<i>p</i> value	<i>p</i> value after adjustment
MMSE at baseline			0.10	0.18
Mean ± SD	20.8 ± 6.6	23.9 ± 5.2		
Median (IQR)	20 (9.7)	25 (6.5)		
MMSE at last follow-up			0.03	0.03
Mean ± SD	21.0 ± 6.1	24.2 ± 4.9		
Median (IQR)	22.5 (10.2)	25 (3)		
mRS at baseline Mean ± SD	0.93 ± 1.2	1.74 ± 1.4	0.001	0.006
Median (IQR)	0 (2)	1 (1.5)		
mRS at last follow-up:			0.004	0.05
Mean ± SD	3.0 ± 1.9	1.85 ± 1.4		
Median (IQR)	3 (3)	2 (2.5)		
Institutionalization	12/39 (30.8%)	4/48 (8.3%)	0.01	≤0.001
Time from onset to institutionalization (y)	1.7 ± 2.3	1.1 ± 0.8	0.67	NA
Mortality	11 (22.9%)	5 (10.4%)	0.1	0.07
Time from onset to death (y)	1.2 ± 0.9	2.7 ± 1.7	0.07	NA
Occurrence of ICH during follow-up	6 (12.5%)	15 (31.2%)	0.02	0.03

CAA Cerebral amyloid angiopathy, CAA-ri Cerebral amyloid angiopathy-related inflammation, SD Standard deviation, MMSE Mini-mental state examination, mRS modified Rankin scale

Nominal significance (i.e., $p < 0.05$) is indicated in bold and statistical significance after Bonferroni correction (i.e., $p < 0.002$) is underlined

CAA-ri and CAA group comparison

The control group of 48 non-inflammatory CAA patients had similar baseline characteristics to the CAA-ri group for age at onset, follow-up duration, cardiovascular risk factors and ongoing treatment, except for anticoagulation therapy, which was more frequent in the CAA-ri group (30% vs 6.2%, adjusted $p = 0.02$) but discontinued after the first inflammatory event (Table 1). Among the non-inflammatory CAA patients, 34 (70.8%) presented symptomatic ICH at baseline, 8 (16.6%) with transient focal neurological episode (TFNE), 5 (10.4%) with cognitive impairment and 1 with ischemic stroke. The mortality rate was similar but this was not statistically significant. Institutionalization occurred more frequently in CAA-ri patients than in non-inflammatory CAA patients (30% vs 8.3%, adjusted $p < 0.001$). MMSE score at baseline (at discharge after the first inflammatory event) was lower in CAA-ri than in non-inflammatory CAA but this was not statistically significant. MMSE score at last follow-up remained lower in CAA-ri than in non-inflammatory CAA (21.0 ± 6.1 vs 24.2 ± 4.9, adjusted $p = 0.03$). mRS score at last follow-up was higher in CAA-ri than in non-inflammatory CAA (3.0 ± 1.9 vs 1.8 ± 1.4, adjusted $p = 0.05$) despite a lower mRS score at baseline (0.9 ± 1.2 vs 1.7 ± 1.4, adjusted $p = 0.006$). After multiple test correction, only the higher rate of institutionalization in CAA-ri patients remained significant. On the Kaplan–Meier curve, mortality and

institutionalization rates were higher in the first 3 years in CAA-ri than in non-inflammatory CAA ($p = 0.04$ according to log-rank test; Fig. 2). Beyond this first 3-year period, this did not seem to be confirmed with overlapping confidence intervals in the 2 groups.

After Bonferroni correction, the number of CMB at baseline was significantly higher, while the number of ICH at baseline and at last follow-up was significantly lower in CAA-ri than in non-inflammatory CAA (Table 3). The ratio of posterior/anterior CMB was similar between groups. Hippocampal atrophy appeared more severe in CAA-ri than in non-inflammatory CAA at baseline and at last follow-up. Regarding CSF data, 27 patients (56.2%) with non-inflammatory CAA underwent LP with AD CSF biomarkers (Table 1). After adjustment for time from onset to LP, CAA-ri patients had a nominal increase of leukocytes (mean 10.8 ± 54.1 vs 1.3 ± 2.8, adjusted $p = 0.02$) and total protein level (mean 0.69 ± 0.53 vs 0.46 ± 0.16, adjusted $p = 0.03$). A nominal decrease of CSF Aβ42 peptide was observed in CAA-ri patients (mean 373.3 ± 128.5 vs 490.8 ± 249.7, adjusted $p = 0.05$), while a difference in Aβ40 level was not significant after adjustment (mean 8023.1 ± 8697.3 vs 10,273.9 ± 5686.3, $p = 0.01$, adjusted $p = 0.52$). Total Tau protein level was not significant after correction (adjusted $p = 0.08$) and p-Tau protein level was similar between groups. Finally, CAA-ri patients were more likely to carry at least one APOE4 allele (76% vs 37.5%, adjusted $p = 0.05$) but also APOE4/E4 homozygous status,

Table 3 Comparison of radiological outcomes

	CAA-ri (n=48)	Non-inflammatory CAA (n=48)	p value	p value after adjustment
MRI available	38 (79.1%)	41 (85.4%)	0.42	NA
Time from MRI at baseline to MRI at last follow-up (days)	500.2 ± 593.4	329.9 ± 397.4	0.84	NA
Magnetic susceptibility-weighted sequence			0.20	NA
-T2*	33 (86.8%)	31 (75.6%)		
-SWI	5 (13.1%)	10 (24.4%)		
Number of CMB at baseline			<0.001	<0.001
Mean ± SD	431.3 ± 431.8	99.4 ± 123.7		
Median (IQR)	315 (501.5)	59.5 (109.5)		
Number of CMB at last follow-up			<0.001	0.004
Mean ± SD	501.3 ± 509.6	154.2 ± 230.6		
Median (IQR)	331.5 (548)	98 (117)		
Ratio of posterior/ anterior CMB at baseline			0.33	0.76
Mean ± SD	1.61 ± 1.37	2.34 ± 2.26		
Median (IQR)	1.1 (1.2)	1.5 (2.7)		
Ratio of posterior/ anterior CMB at last follow-up			0.31	0.15
Mean ± SD	3.21 ± 4.92	2.32 ± 3.53		
Median (IQR)	1.1 (1.8)	1.1 (2.2)		
CSS at baseline			0.001	
Presence	14 (29.1%)	30 (62.5%)	0.5	
Focal	7	12		
Disseminated	7	18		
CSS at last follow-up			<0.001	0.14
Presence	17 (35.4%)	34 (70.8%)		
Focal	8	9		
Disseminated	9	25		
Number of ICH at baseline			<0.001	<0.001
Mean ± SD	0.32 ± 0.73	1.4 ± 1.1		
Median (IQR)	0 (0)	1 (1)		
Number of ICH at last follow-up			<0.001	0.002
Mean ± SD	0.41 ± 0.96	1.4 ± 1.25		
Median (IQR)	0 (0)	1 (1)		
Right Scheltens' scale score at baseline			0.003	0.01
Mean ± SD	1.72 ± 1.28	0.9 ± 0.87		
Median (IQR)	2 (2)	1 (1)		
Right Scheltens' scale score at last follow-up			<0.001	0.003
Mean ± SD	2.12 ± 1.19	1.22 ± 1.1		
Median (IQR)	2 (2)	1 (2)		
Left Scheltens' scale score at baseline			0.01	0.06
Mean ± SD	1.52 ± 1.26	0.85 ± 0.89		
Median (IQR)	2 (2.2)	1 (1)		
Left Scheltens' scale score at last follow-up			0.004	0.01
Mean ± SD	1.94 ± 1.20	1.18 ± 1.05		
Median (IQR)	2 (2)	1 (2)		

CAA Cerebral Amyloid Angiopathy, CAA-ri Cerebral Amyloid Angiopathy-related inflammation, SD Standard deviation, ICH Intracerebral Hemorrhage, CMB Cerebral Microbleeds, CSS Cerebral Superficial Siderosis, T2* T2 gradient echo, SWI susceptibility-weighted imaging
Nominal significance (i.e., $p < 0.05$) is indicated in bold and statistical significance after Bonferroni correction (i.e., $p < 0.002$) is underlined

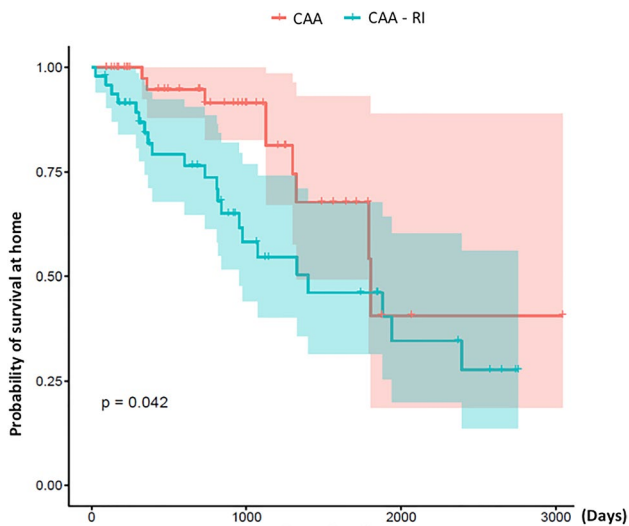


Fig. 2 Kaplan–Meier curve following a composite prognostic endpoint including occurrence of death or institutionalization of CAA-ri patients (in blue) and non-inflammatory CAA patients (in red) during follow-up (in days)

remaining significant after multiple test correction (56% vs 6.2%, adjusted $p < 0.001$).

Comparison of CAA-ri patients with good outcomes and with poor outcomes

In our cohort, 26 CAA-ri patients (54.1%) had poor functional outcomes at last follow-up (Table 4). No prognostic factor was identified after comparison between groups for demographics, cardiovascular risk or ongoing therapy except for hypertension, which was more frequent in cases of good outcome (94.7% vs 50%, adjusted $p = 0.006$). No prognostic factor was identified for CSF biomarkers or *APOE* genotype. The number of ICH at baseline tended to be lower in cases of good outcomes (0.13 vs 0.48, adjusted $p = 0.05$) but the number of CMB or spread of CSS was not relevant to predict CAA-ri outcomes. The use of specific treatments such as corticosteroids or immunosuppressive therapy did not seem to impact long-term outcomes (used in 68.4% of cases with good outcomes vs 65.3% with poor outcomes, $p = 0.83$). When restricted to prognostic factors of relapse (Table 5), we found a lower A β 42 level in CAA-ri patients who had a relapse ($n = 18$) ($p = 0.02$) and a higher total Tau level ($p = 0.03$).

Discussion

This multicenter study aimed to analyze the clinical and radiological outcomes of 48 patients with CAA-ri compared to non-inflammatory CAA and to identify potential

prognostic factors. CAA-ri patients showed worse short- and mid-term clinical outcomes, with more altered autonomy and higher institutionalization rates. This inflammatory event seemed to occur in CAA patients with a higher number of CMBs and a distinct CSF biomarker profile compared to non-inflammatory CAA patients, possibly promoted by the *APOE4* genotype. Although not exceeding the significance threshold after a Bonferroni correction, MMSE and mRS scores at the end of follow-up showed greater severity in CAA-ri, which could contribute to higher institutionalization rates. While not significant, MMSE scores at baseline were already lower than in non-inflammatory CAA, underlying an aggressive course of cognitive impairment, which did not recover even after normalization of cerebral imaging. The mortality rate was close to 25% and relapse occurred in 37.5% of cases within the first year after onset, as previously described [9, 10]. The rate of 15% of ICH development over long-term follow-up was also similar to the reported data in these studies. Overall, our cohort shares the same clinical characteristics (age at onset, sex, clinical presentation, past history of ICH or cognitive impairment) with the other two CAA-ri cohorts [9, 10], suggesting a good reliability of the clinical profile of these patients at baseline. In contrast with the rate of 80% of good outcomes reported recently, less than 40% of this current CAA-ri cohort had good outcomes at last follow-up. However, we used different definitions for good outcome, using detailed quality-of-life scales including several aspects of disability while clinical outcomes were characterized as improved/stable or worsened in [9], or as stable or recovery from neurological conditions preexisting the acute inflammatory event in [10] without any neuropsychological or autonomy assessment, potentially explaining these discrepancies. Here, our data suggest a major negative impact of the inflammatory phase in line with the findings of a systematic review of the literature [11], reporting nearly 50% of poor outcomes. Overall, patients with CAA-ri had significantly greater disease severity compared to non-inflammatory CAA during acute and sub-acute phases.

This severe inflammatory phase seems correlated with an advanced underlying CAA process. Indeed, CAA-ri patients in this study, had a much higher number of CMBs at disease onset in line with the literature [8]. Moreover, given the correlation between the number of microbleeds and the underlying amyloid load [18, 19], we can assume that amyloid deposits were increased in CAA-ri patients. This was also suggested by their CSF profile. CSF biomarkers are now well validated in AD diagnosis [20] with a typical profile of decreased A β 42 and elevated Tau and p-Tau levels [21]. Decreased levels of both A β 42 and A β 40 have been reported in CAA, while total Tau and p-Tau seemed less altered [22]. Here, only A β 42 levels tended to be lower in CAA-ri compared to CAA at a nominal significance (adjusted $p = 0.05$). This could reflect both higher parenchymal and intravascular

Table 4 Comparison of CAA-ri patients with good outcomes and with poor outcomes

	CAA-ri with good outcomes (<i>n</i> = 19)	CAA-ri with poor outcomes (<i>n</i> = 26)	<i>p</i> value	<i>p</i> value after adjustment
Sex (male)	14 (73.7%)	10 (38.4%)	0.02	NA
Age at diagnosis (y):	70.9 ± 7.9	74.8 ± 6.5	0.11	NA
Age at onset (y):	70.6 ± 7.9	74.3 ± 6.2	0.11	NA
Hypertension	18 (94.7%)	13 (50%)	0.002	0.006
Smoking	6 (31.5%)	8 (25%)	0.95	0.27
Chronic alcohol abuse	5 (26.3%)	5 (12.5%)	0.57	0.60
Dyslipidemia	7 (36.8%)	11 (42%)	0.71	0.70
Diabetes mellitus	5 (26.3%)	3 (17%)	0.20	0.22
Antiplatelet treatment	2/6 (33.3%)*	2/11 (18.2%)*	0.58	0.40
Anticoagulation therapy	2/6 (33.3%)*	4/11 (36.3%)*	1	0.70
CSF Leucocytes	1.4 ± 3.1	19.2 ± 74.6	0.02	0.39
CSF Protein level (g/l)	0.59 ± 0.2	0.81 ± 0.69	0.64	0.12
CSF Total Tau (pg/ml)	449.5 ± 273.6	690 ± 391.9	0.11	0.11
CSF p-Tau (pg/ml)	49.1 ± 17.6	61.1 ± 39.8	0.60	0.27
CSF Aβ40 (pg/ml)	4682.1 ± 2768.6	9907.5 ± 10,605.1	0.09	0.25
CSF Aβ42 (pg/ml)	326.3 ± 101.9	401.5 ± 147.5	0.14	0.37
Ratio Aβ42/ Aβ40	0.07 ± 0.02	0.06 ± 0.03	0.10	0.11
Use of specific treatment ^a	13 (68.4%)	17 (65.3%)	0.83	
<i>APOE</i> ε2 ≥ 1 carriers	0	2/11 (18.2%)*	0.19	0.99
<i>APOE</i> ε4 ≥ 1 carriers	12/13 (92.3%)*	6/11 (54.5%)*	0.06	0.15
<i>APOE</i> ε4 homozygous carriers	7/13 (53.8%)*	6/11 (54.5%)*	0.97	
Number of CMB at baseline	624.7 ± 536.8	267 ± 282	0.03	0.13
Fazekas score at baseline	2.17 ± 0.75	2.60 ± 0.53	0.056	0.16
Number of sulci with CSS at baseline	2.73 ± 5.23	1.96 ± 4.55	0.98	0.59
ICH at baseline	0.13 ± 0.35	0.48 ± 0.90	0.28	0.05
Right Scheltens' scale score	1.86 ± 1.46	1.67 ± 1.24	0.72	0.63
Left Scheltens' scale score	1.64 ± 1.39	1.46 ± 1.25	0.67	0.75

CAA Cerebral Amyloid Angiopathy, CAA-ri Cerebral Amyloid Angiopathy-related inflammation, CMB Cerebral Microbleeds, CSF Cerebrospinal fluid, y years, SD Standard deviation, Tau Tau protein, p-Tau phosphorylated Tau, Aβ42 amyloid β1–42, Aβ40 amyloid β1–40, ICH Intracerebral Hemorrhage, CSS Cerebral Superficial Siderosis

Nominal significance (*i.e.*, $p < 0.05$) is indicated in bold

*Due to missing data, the number of patients analyzed with available data is mentioned

^aSpecific treatment included corticosteroids and/or immunosuppressive therapy

Aβ deposits in CAA-ri as already reported [23]. Further studies with specific Aβ imaging such as 18F-florbetaben or 11C-Pittsburgh compound B-positron emission tomography would confirm the correlation between CSF profile and amyloid load in CAA-ri [24]. However, we cannot exclude intercurrent variations in CSF biomarker levels secondary to the inflammatory phase itself, progressively recovering to the usual CAA ranges over time. Indeed, while CSF biomarkers are known to remain stable during the disease course in AD [25], changes were reported just after the CAA-ri inflammatory phase [26].

Beyond its initial severity, several factors led us to consider this inflammatory storm as one intercurrent event occurring during a progressive and advanced course of

non-inflammatory CAA disease. Belonging to the same entity, CAA-ri and non-inflammatory CAA share the same underlying pathways although with different degrees of severity. Indeed, several patients were already diagnosed with non-inflammatory CAA (14.5%) before their acute CAA-ri presentation. Moreover, in terms of neuroimaging, hippocampal atrophy was severe in CAA-ri patients from baseline, suggesting the contribution of an ongoing neurodegenerative process evolving for a long time before the inflammatory phase. Finally, when focusing on the disease course 3 years after onset (Fig. 2), similar clinical outcome trajectories were observed in both groups, reflecting common long-term outcomes in CAA-ri and non-inflammatory CAA. Further demonstration that CAA-ri and non-inflammatory

Table 5 Comparison of CAA-ri patients with and without relapse during follow-up

	CAA-ri with a relapse (n = 18)	CAA-ri without a relapse (n = 30)	p value
Sex (male)	8 (44.4%)	17 (56.7%)	0.55
Age at onset (y): mean ± SD	70.5 ± 6.9	74.0 ± 6.9	0.14
Hypertension	11 (61.1%)	23 (76.6%)	0.32
Smoking	6 (33.3%)	8 (26.6%)	0.74
Chronic alcohol abuse	4 (22.2%)	6 (20.0%)	1
Dyslipidemia	6 (33.3%)	13 (43.3%)	0.55
Diabetes mellitus	2 (11.1%)	6 (20%)	0.69
Leucocytes	3.4 ± 7.2	15.0 ± 67.7	0.98
CSF Protein level (g/l)	0.79 ± 0.7	0.64 ± 0.37	0.67
Total Tau (pg/ml)	469 ± 334.9	693.3 ± 349.6	0.03
p-Tau (pg/ml)	46.6 ± 16.3	69.3 ± 40.3	0.09
Aβ40 (pg/ml)	5228.5 ± 2907.8	10,445.2 ± 11,184.7	0.14
Aβ42 (pg/ml)	319.1 ± 95.2	413.3 ± 137.3	0.02
APOE ε2 ≥ 1	1/14 (7.1%)*	1/11 (9.1%)*	1
APOE ε4 ≥ 1	11/14 (78.5%)*	9/11 (81.8%)*	1
APOE ε4 homozygous	7/14 (50.0%)*	7/11 (63.6%)*	0.68
Number of microbleeds at baseline	534.6 ± 457.0	359.5 ± 408.1	0.18
Fazekas score at baseline	2.55 ± 0.57	2.39 ± 0.68	0.44

CAA-ri Cerebral Amyloid Angiopathy-related inflammation, CSF Cerebrospinal fluid, y years, SD Standard deviation, Tau Tau protein, p-Tau phosphorylated Tau, Aβ42 amyloid β1–42, Aβ40 amyloid β1–40

*Due to missing data, numbers of patients analyzed with available data is mentioned

CAA belong to the same entity is needed, especially given recent case reports showing CAA-ri in a broad spectrum of diseases [27, 28]. Prospective studies without age matching could help to establish whether CAA-ri occurs in older patients with longer disease duration for instance.

The inflammatory storm triggered by a high amyloid burden due to advanced underlying amyloid process in CAA-ri could be driven by risk factors or medical conditions that are poorly understood. Indeed, relapses occurred more frequently in CAA-ri patients with lower CSF Aβ42 levels. The current study showed a prominent APOE4 carrier status in 76% of CAA-ri patients (of which 74% were homozygous), compared to non-inflammatory CAA. This is concordant with a recent literature review and case series where the APOE4 allele was found in nearly 65% and 75% of CAA-ri cases, respectively, mainly homozygous [3, 9]. APOE4 isoform is known to reduce Aβ clearance, thus inducing increased amyloid deposits within cerebral vessels [29, 30]. APOE4 is also known to be associated with type 1 CAA, mostly affecting capillaries [31]. As this type of vessel is much thinner, the APOE4 isoform could indirectly promote massive contact between Aβ and the local immune system, leading to an immune reaction directed against this peptide. Furthermore, one of the main risk factors regarding amyloid-related imaging abnormalities (ARIA), a vasogenic inflammatory response induced by anti-amyloid therapy in clinical trials for AD, was the carriage of one or two E4 alleles

[32]. These inflammatory abnormalities are thought to be related to CAA and are highly similar to CAA-ri. Regarding modifiable prognostic factors among CAA-ri patients, a medical history of hypertension was prominent in cases of good outcome and seems an interesting therapeutic target. A distinct role of hypertension itself as a good prognostic factor remains unclear to date. Nonetheless, despite the lack of data, we can indirectly hypothesize that a good outcome here is more related to the increased use of antihypertensive therapy. Lower blood pressure decreases the risk of ICH, notably using an ACE inhibitor [33] but could also slow down vasculopathy and fibrinoid necrosis promoted by hypertension with a minor subsequent inflammatory reaction in CAA-ri patients [34]. As other authors [11, 12], we found no impact on the long-term outcome of corticosteroid or immunosuppressive therapy. Nevertheless, recent literature showed more frequent clinical improvement in individuals treated compared to those with no treatment [9] but using quite different definitions of good outcome. Moreover, sudden withdrawal of corticosteroids was recently identified as a prognostic factor of relapse [10] but the vast majority of our treated patients had a gradual tapering of oral corticosteroids, precluding a reliable comparison with our results. Further randomized studies are needed to determine the real impact of these treatments.

CAA-ri remains an extremely rare entity and large multicenter national networks are required to analyze the

natural disease course and clinical outcome. CAA-ri is most likely an under-recognized entity, and some patients with a less marked presentation may have been undiagnosed and therefore were not included in our series, leading to a potential selection bias. Strengths of this study include the multi-dimensional assessment of clinical prognosis including neuropsychological and autonomy scores, mortality and institutionalization rates but also detailed laboratory analyses, including Alzheimer CSF biomarkers. To better characterize this entity, a control group of non-inflammatory CAA was included with similar demographics, thus preventing any bias only related to age. CAA disease burden is indeed known to increase with patient's age [35], with more CMB on MRI [36]. This group included patients with a homogeneous initial presentation given the large predominance of ICH or TFNE and, therefore, a clear time of symptoms onset. We also randomly selected patients who were recently considered as symptomatic (less than 2 years) to prevent disease progression bias in the analyses between groups and reduce immortal time bias in the analysis. Nevertheless, this duration remains uncertain in most patients, due to the insidious development of CAA. Another limit was the lack of definite histological diagnosis. However, the external validity of the current diagnostic criteria was recently confirmed with a high specificity of 97% [2, 4]. Furthermore, the follow-up duration of 2.5 years minimized a risk of misdiagnosis. Finally, given the retrospective nature of the study, heterogeneous data were collected, including differences in terms of follow-up, treatments used or cerebral imaging, reflecting clinical practices, in the absence of current guidelines.

In this large cohort, CAA-ri appears as a severe intercurrent event in the progressive course of CAA with a significant loss of autonomy that could be related to a higher amyloid burden compared to other non-inflammatory CAA, with a greater number of CMBs and a distinct CSF profile. This higher burden may be partially promoted by the *APOE4* genotype but other risk factors need to be identified to prevent or more efficiently manage this rare but severe condition in CAA disease course.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00415-022-11145-4>.

Acknowledgements We are grateful to Dany Laforêt for her help in CSF biomarker analyses and to Nikki Sabourin-Gibbs, Rouen University Hospital, for her help in editing the manuscript.

Funding No funding was received for conducting this study.

Data availability A de-identified database and statistical analysis plan are available upon reasonable request.

Declarations

Conflicts of interest The authors declare that they have no conflict of interest.


Ethics approval Ethical approval for data collection and publication was obtained from the institutional review board of Rouen University Hospital (CERDE #E2021-15 notification) in view of the retrospective nature of the study and all the procedures performed were part of routine care.

References

- Greenberg SM, Bacskai BJ, Hernandez-Guillamon M et al (2020) Cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer disease—one peptide, two pathways. *Nat Rev Neurol* 16(1):30–42. <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0281-2>
- Chung KK, Anderson NE, Hutchinson D et al (2011) Cerebral amyloid angiopathy related inflammation: three case reports and a review. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 82:20–26. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2009.204180>
- Castro Caldas A, Silva C, Albuquerque L et al (2015) Cerebral amyloid angiopathy associated with inflammation: report of 3 cases and systematic review. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 24:2039–2048. <https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2015.04.015>
- Auriel E, Charidimou A, Gurol ME et al (2016) Validation of clinico-radiological criteria for the diagnosis of cerebral amyloid angiopathy-related inflammation. *JAMA Neurol* 73:197–202. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2015.4078>
- Charidimou A, Imaizumi T, Moulin S et al (2017) Brain hemorrhage recurrence, small vessel disease type, and cerebral microbleeds: a meta-analysis. *Neurology* 89:820–829. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000004259>
- Wollenweber FA, Opherck C, Zedde M et al (2019) Prognostic relevance of cortical superficial siderosis in cerebral amyloid angiopathy. *Neurology* 92:e792–801. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000006956>
- Renard D, Wacogne A, Le Floch A et al (2016) Vicinity of FLAIR hyperintensities and SWI microbleeds in cerebral amyloid angiopathy-related inflammation. *Eur Neurol* 75:223–224. <https://doi.org/10.1159/000446023>
- Renard D, Tatu L, Collombier L et al (2018) Cerebral amyloid angiopathy and cerebral amyloid angiopathy-related inflammation: comparison of hemorrhagic and DWI MRI features. *J Alzheimers Dis* 64:1113–1121. <https://doi.org/10.3233/JAD-180269>
- Regenhardt RW, Thon JM, Das AS et al (2020) Association between immunosuppressive treatment and outcomes of cerebral amyloid angiopathy-related inflammation. *JAMA Neurol* 77:1–10. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2020.1782>
- Antolini L, DiFrancesco JC, Zedde M et al (2021) Spontaneous ARIA-like events in cerebral amyloid angiopathy-related inflammation: a multicenter prospective longitudinal cohort study. *Neurology* 97:e1809–e1822. <https://doi.org/10.1212/WNL.00000000000012778>
- Corovic A, Kelly S, Markus HS (2018) Cerebral amyloid angiopathy associated with inflammation: a systematic review of clinical and imaging features and outcome. *Int J Stroke* 13:257–267. <https://doi.org/10.1177/1747493017741569>
- Coulette S, Renard D, Lehmann S et al (2019) A clinico-radiological study of cerebral amyloid angiopathy-related inflammation. *Cerebrovasc Dis* 48:38–44. <https://doi.org/10.1159/000502832>

13. Linn J, Halpin A, Demaerel P et al (2010) Prevalence of superficial siderosis in patients with cerebral amyloid angiopathy. *Neurology* 74:1346–1350
14. Scheltens PH, Leys D, Barkhof F et al (1992) Atrophy of medial temporal lobes on MRI in “probable” Alzheimer’s disease and normal ageing: diagnostic value and neuropsychological correlates. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 55:967–972
15. Charidimou A, Linn J, Vernooij MW et al (2015) Cortical superficial siderosis: detection and clinical significance in cerebral amyloid angiopathy and related conditions. *Brain* 138:2126–2139. <https://doi.org/10.1093/brain/awv162>
16. Lehmann S, Schraen S, Quadrio I et al (2014) Impact of harmonization of collection tubes on Alzheimer’s disease diagnosis. *Alzheimers Dement* 10:S390–S394. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2013.06.008>
17. Lehmann S, Dumurgier J, Schraen S et al (2014) A diagnostic scale for Alzheimer’s disease based on cerebrospinal fluid biomarker profiles. *Alzheimers Res Ther* 6:38
18. Graff-Radford J, Lesnick T, Rabinstein AA et al (2020) Cerebral microbleed incidence, relationship to amyloid burden: the mayo clinic study of aging. *Neurology* 94:e190–e199. <https://doi.org/10.1212/WNL.00000000000008735>
19. Haller S, Vernooij MW, Kuijter JPA et al (2018) Cerebral microbleeds: imaging and clinical significance. *Radiology* 287:11–28. <https://doi.org/10.1148/radiol.2018170803>
20. Mouton-Liger F, Wallon D, Troussière A-C et al (2014) Impact of cerebro-spinal fluid biomarkers of Alzheimer’s disease in clinical practice: a multicentric study. *J Neurol* 261:144–151. <https://doi.org/10.1007/s00415-013-7160-3>
21. Gabelle A, Dumurgier J, Vercruysse O et al (2013) Impact of the 2008–2012 French Alzheimer plan on the use of cerebrospinal fluid biomarkers in research memory center: the PLM study. *J Alzheimers Dis* 34:297–305. <https://doi.org/10.3233/JAD-121549>
22. Charidimou A, Friedrich JO, Greenberg SM et al (2018) Core cerebrospinal fluid biomarker profile in cerebral amyloid angiopathy: a meta-analysis. *Neurology* 90:e754–e762. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000005030>
23. Renard D, Wacogne A, Aygnac X et al (2016) Cerebrospinal fluid Alzheimer’s disease biomarkers in cerebral amyloid angiopathy-related inflammation. *J Alzheimers Dis* 50:759–764. <https://doi.org/10.3233/JAD-150621>
24. Renard D, Collombier L, Demattei C et al (2018) Cerebrospinal fluid, MRI, and florbetaben-PET in cerebral amyloid angiopathy-related inflammation. *J Alzheimers Dis* 61:1107–1117. <https://doi.org/10.3233/JAD-170843>
25. Blennow K, Dubois B, Fagan AM et al (2015) Clinical utility of cerebrospinal fluid biomarkers in the diagnosis of early Alzheimer’s disease. *Alzheimers Dement* 11:58–69. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2014.02.004>
26. Piazza F, Greenberg SM, Savoirdo M et al (2013) Anti-amyloid β autoantibodies in cerebral amyloid angiopathy-related inflammation: implications for amyloid-modifying therapies. *Ann Neurol* 73:449–458. <https://doi.org/10.1002/ana.23857>
27. Van Ommeren R, Izenberg A, Shadowitz S et al (2020) Clinical Reasoning: an 81-year-old woman with decreased consciousness and fluctuating right facial droop. *Neurology* 94:843–848. <https://doi.org/10.1212/WNL.00000000000009410>
28. Gera A, Witek N, Bailey M (2019) Pearls & Oysters: CAA-related inflammation presents as subacute cognitive decline in a patient with Parkinson disease. *Neurology* 92:1116–1118. <https://doi.org/10.1212/WNL.00000000000007610>
29. Deane R, Sagare A, Hamm K et al (2008) apoE isoform-specific disruption of amyloid β peptide clearance from mouse brain. *J Clin Invest* 118:4002–4013. <https://doi.org/10.1172/JCI36663>
30. Greenberg SM, Briggs ME, Hyman BT et al (1996) Apolipoprotein E epsilon 4 is associated with the presence and earlier onset of hemorrhage in cerebral amyloid angiopathy. *Stroke* 27:1333–1337. <https://doi.org/10.1161/01.str.27.8.1333>
31. Thal DR, Ghebremedhin E, Orantes M et al (2003) Vascular pathology in Alzheimer disease: correlation of cerebral amyloid angiopathy and arteriosclerosis/lipohyalinosis with cognitive decline. *J Neuropathol Exp Neurol* 62:1287–1301. <https://doi.org/10.1093/jnen/62.12.1287>
32. Salloway S, Sperling R, Gilman S et al (2009) A phase 2 multiple ascending dose trial of bapineuzumab in mild to moderate Alzheimer disease. *Neurology* 73:2061–2070. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181c67808>
33. Arima H, Tzourio C, Anderson C et al (2010) Effects of perindopril-based lowering of blood pressure on intracerebral hemorrhage related to amyloid angiopathy: the PROGRESS trial. *Stroke* 41:394–396. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.109.563932>
34. Yamada M (2015) Cerebral amyloid angiopathy: emerging concepts. *J Stroke*. <https://doi.org/10.5853/jos.2015.17.1.17>
35. Boyle PA, Yu L, Nag S et al (2015) Cerebral amyloid angiopathy and cognitive outcomes in community-based older persons. *Neurology* 85:1930–1936
36. Yates PA, Villemagne VL, Ellis KA et al (2014) Cerebral microbleeds: a review of clinical, genetic, and neuroimaging associations. *Front Neurol*. <https://doi.org/10.3389/fneur.2013.00205>

Authors and Affiliations

L. Grangeon¹  · G. Quesney¹ · M. Verdalle-Cazes² · S. Coulette³ · D. Renard⁴ · A. Wacogne⁴ · T. Allou⁵ · N. Olivier⁵ · Y. Boukriche⁶ · G. Blanchet-Fourcade⁷ · P. Labauge³ · C. Arquizan³ · S. Canaple⁸ · O. Godefroy⁸ · O. Martinaud^{9,10} · P. Verdure¹¹ · M. Quillard-Muraine¹² · J. Pariente¹³ · E. Magnin¹⁴ · G. Nicolas¹⁵ · C. Charbonnier¹⁵ · D. Maltête¹ · M. Formaglio¹⁶ · N. Raposo¹³ · X. Aygnac³ · D. Wallon^{1,14}

¹ Department of Neurology, Rouen University Hospital, 76031 Rouen, France

² Department of Radiology, Rouen University Hospital, Rouen, France

³ Department of Neurology, INM, Univ Montpellier, INSERM, Montpellier University Hospital, Montpellier, France

⁴ Department of Neurology, Nimes University Hospital, Nimes, France

⁵ Department of Neurology, Perpignan Hospital, Perpignan, France

⁶ Department of Neurology, Beziers Hospital, Beziers, France

⁷ Department of Neurology, Narbonne Hospital, Narbonne, France

⁸ Department of Neurology and Functional Neuroscience, Lab (UR UPJV 4559), Amiens University Hospital and University of Picardy Jules Verne, Amiens, France

- ⁹ Department of Neurology, Caen University Hospital, Caen, France
- ¹⁰ EPHE, INSERM, U1077, CHU de Caen, Neuropsychologie Et Imagerie de La Mémoire Humaine, Normandie Univ, UNICAEN, PSL Research University, Caen, France
- ¹¹ Department of Neurology, Les Feugrais Hospital, Elbeuf, France
- ¹² Laboratoire de Biochimie, Rouen University Hospital and University of Rouen, Rouen, France
- ¹³ Neurology Department, Hôpital Pierre-Paul Riquet, Centre Hospitalier, Universitaire de Toulouse, Toulouse, France
- ¹⁴ Department of Neurology, Besancon Hospital, Besancon, France
- ¹⁵ INSERM U1245, IRIB, Normandy University, CNR-MAJ, Rouen University Hospital, Rouen, France
- ¹⁶ Department of Neurology, Lyon University Hospital, Lyon, France

Table Sup. 1. Characteristics of CAA-ri patients already reported [12] (n=28) and CAA-ri patients from other centers (n=20).

	Already reported patients (n=28)	Unpublished CAA-ri patients (n=20)
Sex: male	13 (46)	12 (60)
Age at onset (y): Mean +/-SD	72.1 ± 7.0	74 ± 7
Follow-up duration (y) Mean +/-SD	3.0 ± 2.4	2.0 ± 1.9
Past medical history		
Lobar ICH n (%)	4 (14)	3 (15)
Cognitive impairment, n (%)	5 (18)	4 (20)
Clinical symptoms		
Confusion/behavioral disorders, n (%)	15 (54)	13 (65)
Hemiparesis, n (%)	10 (35.7)	9 (45)
Visual symptoms, n (%)	6 (21)	10 (50)
Seizure, n (%)	7 (25)*	9 (45)
Headaches, n (%)	4 (14)	4 (20)
CSS		
Presence, n (%)	5 (17.8) *	9 (45)
Focal, n (%)	1	6
Disseminated, n (%)	4	3
Number of CMB at baseline Mean +/-SD	424.9 ± 325.4 *	383.2 ±446.7
Lumbar puncture available, n (%)	25 (89.2)	19 (95)

With CSF biomarkers	19	14
CSF Leucocytes > 5, n (%)	6 (21)	2 (10)
CSF Protein level Mean +/-SD (g/l)	0.72 ± 0.62	0.66 ± 0,38
CSF Total Tau (pg/ml) Mean +/-SD	591.3 ± 392	600.7 ± 311.5
CSF p-Tau (pg/ml) Mean +/-SD	44.7 ± 14.2	80.9 ± 42.1
CSF Aβ 40 (pg/ml) Mean +/-SD	4760.0.1 ± 2495.1	14911.9 ± 12751.9
CSF Aβ 42 (pg/ml) Mean +/-SD	326.8 ± 133.6	436.5 ± 91.9
<i>APOE</i> ε2≥1 carriers	2/20	0/5
<i>APOE</i> ε4≥1 carriers	14/20	5/5
<i>APOE</i> ε4 homozygous	10/20	4/5
Outcomes		
Good, n (%)	13 (46.4)	6 (30)
Relapse, n (%)	15 (53.5)*	3 (15)
ICH, n (%)	5	1
Death, n (%)	8 (28.5)	3 (15)
Patients with corticosteroid therapy, n (%)	21 (75)	11 (55)
Patients with immunosuppressive therapy, n (%)	6	0

CAA: Cerebral Amyloid Angiopathy, CAA-ri: Cerebral Amyloid Angiopathy-related inflammation, CSF: Cerebrospinal fluid, y: years, SD: Standard deviation, Tau: Tau protein, p-Tau: phosphorylated Tau, Aβ42: amyloid β1–42, Aβ40: amyloid β1–40, ICH: Intracerebral Hemorrhage, CSS: Cerebral Superficial Siderosis

* Re assessed since Coulette et al [12]

8. RÉSULTATS PARTIE 2: AIDE À LA PRÉCISION DIAGNOSTIQUE DANS L'AAC

Si il a été possible dans les CCP liées à des mutations de *MYORG* d'identifier un phénotype reconnaissable, ceci n'a pas été le cas pour les duplications *APP*. Ainsi, se baser sur des marqueurs cliniques est une stratégie insuffisante pour caractériser les différentes entités de microangiopathies. Cette caractérisation est pourtant un pré-requis indispensable pour mener des études génétiques. D'autres marqueurs, biologiques ou radiologiques sont nécessaires.

8.1. Apport des biomarqueurs du LCS

Avec l'avènement de nouvelles thérapeutiques qui pourraient émerger dans l'AAC dans les suites des stratégies thérapeutiques pour la MA (Lecanumab par exemple), un des enjeux actuels est d'obtenir un diagnostic de précision et des outils applicables en pratique courante. Nous avons vu que l'AAC était une entité complexe avec une importante diversité clinico-radiologique, montrée dans ces premières études phénotypiques centrées sur des formes héréditaires (duplications du gène *APP*) ou des phénotypes extrêmes avec les AAC inflammatoires. De nouveaux marqueurs diagnostiques sont donc nécessaires. Les nouveaux critères de Boston intègrent désormais pour la première fois, non seulement des lésions hémorragiques, mais également des lésions de substance blanche, comme les espaces périvasculaires dilatés du centre semi-ovale ou la leucopathie dite « multispot », à savoir punctiforme diffuse(2). Il s'agit principalement de marqueurs radiologiques reflétant indirectement les mécanismes d'hypoperfusion chronique et de défaut de drainage périvasculaire retrouvés dans l'AAC. Toutefois, ces marqueurs peuvent survenir tardivement dans l'évolution de la maladie. Il serait pertinent de se reposer sur des preuves plus directes de dépôts amyloïdes d'une part, et des marqueurs altérés de façon plus précoce dans l'évolution de la maladie d'autre part. Les biomarqueurs du LCS classiquement utilisés en pratique courante dans la MA suscitent ainsi de plus en plus d'intérêt dans la démarche diagnostique de l'AAC. L'apport des biomarqueurs à l'imagerie pour améliorer la précision des critères diagnostiques a ainsi été suggéré par l'équipe de Boston elle-même (115) mais la dernière version 2.0 des

critères diagnostiques (2) ne les a pas intégrés, faute de données jugées suffisantes dans la littérature.

Pour palier cela, nous avons mené une étude rétrospective au sein de deux centres, le CHU de Rouen et Paris-Lariboisière décrivant les taux d'A β 42, d'A β 40, de protéine Tau totale et de phospho-Tau dans le LCS de 63 patients avec AAC probable. Ces taux étaient altérés chez plus de 85% des patients AAC avec 3 profils identifiés : 50,8% présentaient une diminution du taux d'A β 42 associée à une élévation de phospho-Tau et/ou de Tau, 34,9% une diminution isolée du taux d'A β 42 et 14,3% un taux d'A β 42 normal. Il faut bien entendu rester prudent concernant ce dernier groupe compte tenu de l'absence de confirmation neuropathologique. Un profil comparable à celui dans la MA chez plus de la moitié des patients suggérait donc la coexistence des 2 processus d'AAC et de pathologie Alzheimer, comme cela est retrouvé dans les études autopsiques (186) (399). Ceci incite à suivre ces patients sur le plan cognitif de façon plus rapprochée. Le second groupe avec baisse isolée du peptide A β 42 pourrait représenter un groupe d'atteinte vasculaire « pure », liée à des dépôts amyloïdes vasculaires provenant d'un dysfonctionnement des vaisseaux sanguins (et notamment des cellules musculaires lisses qui sont capables de sécréter du peptide A β) mais sans plaque amyloïde parenchymateuse ou DNF (5). En effet, sur le plan anatomopathologique, des AAC de type I ou II ont été décrites en fonction de la présence d'une atteinte capillaire mais aussi de l'association ou non avec des plaques séniles et une pathologie MA (6-8).

Dans notre étude, les patients AAC probable avaient des niveaux plus faibles de Tau, phospho-Tau et d'A β 40 mais un niveau d'A β 42 non significativement différent comparativement à 27 patients MA (qui ne présentaient aucune lésion hémorragique sur leur IRM). Aucune corrélation entre les niveaux d'A β 42 ou d'A β 40 et la neuro-imagerie (nombre de microsaignements ou extension de l'hémorragie) n'a été trouvée. Enfin, les peptides A β 42 et A β 40 ont montré les meilleures performances diagnostiques sur les courbes ROC comparativement à 21 contrôles (aire sous la courbe ROC A β 42 = 0.79 et A β 40 = 0.69). Ces contrôles étaient des patients ayant bénéficié de PL dans le cadre de pathologie non-neurodégénérative (le plus souvent, pathologie psychiatrique ou bilan d'épilepsie atypique) au CHU de Rouen.

Cette étude représente une importante série avec données de LCS chez des patients AAC probable avec comparaison à un groupe de patients MA sans lésion hémorragique sur leur IRM et des patients contrôles mais également un travail de corrélation entre

marqueurs radiologiques et LCS. Ces biomarqueurs du LCS pourraient représenter un nouvel outil diagnostique utilisable rapidement en pratique courante. Les biomarqueurs du LCS ont profondément modifié celle-ci dans la MA (400) et il pourrait en être de même dans les années à venir dans l'AAC. Il est à noter que cette étude a fait l'objet d'un éditorial écrit par Andreas Charidimou, premier auteur des critères révisés 2.0 de Boston (401).

Reflétant l'attente importante des cliniciens et des chercheurs, cette année, une étude multicentrique allemande a rapporté parallèlement les données de LCS de 30 patients AAC, soulignant la performance du ratio $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ (aire sous la courbe ROC = 0.88) (402).

Dans notre rétrospective de patients porteurs de duplication du gène *APP* décrite auparavant, les taux de biomarqueurs étaient également altérés chez tous les patients pour qui nous avons les données de LCS. Une étude portant sur une autre forme héréditaire d'AAC, liée à une mutation *APP* dite « Hollandaise » plaidait aussi en faveur d'un rôle important des biomarqueurs, et cela même chez des patients mutés mais encore asymptomatiques. Dans le futur, une étude, même sur de petits effectifs d'AAC sporadique avec données histologiques et de LCS permettrait de confirmer nos hypothèses de sous-groupe avec coexistence d'AAC et MA d'une part, et de profil d'AAC plus « vasculaire pure » d'autre part. Ceci est néanmoins difficile à obtenir compte tenu du caractère invasif d'une biopsie. Une collaboration avec des équipes de neurochirurgie pour l'envoi systématique en anatomopathologie de prélèvements d'hématome lobaire évacué dans le cadre du soin et la demande spécifique de coloration Rouge Congo sur ces prélèvements pourrait être envisagée. Une autre possibilité pourrait être de corrélérer les biomarqueurs du LCS et les données de PIB-Pittsburg mais nous risquerions d'être confrontés au manque de spécificité de liaison du PIB à l' $A\beta$ vasculaire et parenchymateux

Cerebrospinal Fluid Profile of Tau, Phosphorylated Tau, A β ₄₂, and A β ₄₀ in Probable Cerebral Amyloid Angiopathy

Lou Grangeon^{a,*}, Claire Paquet^b, Stéphanie Guey^c, Aline Zarea^a, Olivier Martinaud^d, Maud Rotharmel^e, David Maltête^a, Muriel Quillard-Muraine^f, Gael Nicolas^g, Camille Charbonnier^g, Hugues Chabriat^c and David Wallon^a

^aNormandie Univ, UNIROUEN, Inserm U1245 and CHU Rouen, Department of Neurology and CNR-MAJ, Normandy Center for Genomic and Personalized Medicine, Rouen, France

^bCMRR Paris Nord AP-HP, Groupe Hospitalier Lariboisière Fernand-Widal Saint-Louis, INSERM, U942, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, UMRS 942, France

^cDepartment of Neurology, AP-HP, Groupe Hospitalier Lariboisière Fernand-Widal Saint-Louis, Paris, France

^dDepartment of Neurology, Caen University Hospital, Caen, France

^eRouvray Hospital of Rouen, University Department of Psychiatry, France

^fLaboratory of Biochemistry, CHU Rouen, Rouen France

^gNormandie Univ, UNIROUEN, Inserm U1245 and CHU Rouen, Department of Genetics and CNR-MAJ, Normandy Center for Genomic and Personalized Medicine, Rouen, France

Handling Associate Editor: Mana Shams

Accepted 7 March 2022

Pre-press 1 April 2022

Abstract.

Background: There is no consensus regarding the diagnostic value of cerebrospinal fluid (CSF) Alzheimer's disease (AD) biomarkers in cerebral amyloid angiopathy (CAA).

Objective: To describe the CSF levels of A β ₄₂, A β ₄₀, total protein Tau, and phosphorylated-Tau (p-Tau) in a large series of probable CAA patients and to compare with AD patients in order to identify a specific pattern in CAA but also to look for correlations with the neuroimaging profile.

Methods: We retrospectively included from 2 French centers probable CAA patients according to modified Boston criteria who underwent lumbar puncture (LP) with CSF AD biomarker quantifications. Two neurologists independently analyzed all MRI sequences. A logistic regression and Spearman's correlation coefficient were used to identify correlation between MRI and CSF biomarkers in CAA.

Results: We included 63 probable CAA and 27 AD patients. Among CAA 50.8% presented with decreased A β ₄₂ level associated with elevated p-Tau and/or Tau, 34.9% with isolated decreased A β ₄₂ level and 14.3% patients with normal A β ₄₂ level. Compared to AD, CAA showed lower levels of Tau ($p=0.008$), p-Tau ($p=0.004$), and A β ₄₀ ($p=0.001$) but similar A β ₄₂ level ($p=0.07$). No correlation between A β ₄₂ or A β ₄₀ levels and neuroimaging was found.

Conclusion: CSF biomarkers may improve the accuracy of the modified Boston criteria with altered profile in 85% of the patients fulfilling revised Boston criteria for probable CAA. A β ₄₀ appears as an interesting selective biomarker in differential diagnosis.

Keywords: A β ₄₂, A β ₄₀, cerebral amyloid angiopathy, cerebrospinal fluid biomarker, intracerebral hemorrhage

*Correspondence to: Lou Grangeon, MD, Department of Neurology, Rouen University Hospital, 76031 Rouen Cedex, France.

Tel.: +33 2 32 88 82 94; Fax: +33 2 32 88 87 41; E-mail: lou.grangeon@chu-rouen.fr.

INTRODUCTION

Amyloid- β ($A\beta$)-cerebral amyloid angiopathy (CAA) is a devastating disease characterized by deposits of $A\beta$ peptide in the walls of cortical and leptomeningeal vessels and by intracerebral hemorrhages. $A\beta$ -CAA is frequently associated with Alzheimer's disease (AD), amyloid pathology being the *primum movens* of both diseases [1]. In contrast to the parenchymal amyloid depositions found in AD, which mostly consist of $A\beta$ 1-42 ($A\beta_{42}$), CAA contains both $A\beta$ 1-40 ($A\beta_{40}$) and $A\beta_{42}$, with $A\beta_{40}$ being the major isoform [1, 2]. *In vivo* diagnosis is mainly based on brain imaging showing lobar hematomas (ICHs), microbleeds (CMBs), and cortical superficial siderosis (CSS) in iron-sensitive sequences [3]. These elements are constitutive of the core revised Boston criteria [4], which showed sensitivities ranging from 57.9% to 76.9% and specificities from 87.5% to 100% [5, 6]. Nevertheless, the different hemorrhagic lesions—ICHs, CMBs, and CSS—are included in those criteria without consideration regarding the severity as the size, topography or number of occurrences. Moreover, these criteria tend to preclude probable CAA if CMBs are identified in deep territories. The sensitivity of these criteria appears to be influenced by the initial clinical presentation [7]. Indeed, sensitivity is quite lower (42.4%) in case of cognitive impairment or transient focal neurological episodes as initial presentation compared to ICH [8].

In a few studies with limited numbers of CAA patients, decreased levels of both $A\beta_{42}$ and $A\beta_{40}$ have been reported in the cerebrospinal fluid (CSF), while total Tau protein (Tau) and its phosphorylated form at threonine 181 (p-Tau) seemed less altered [9]. These biomarkers are now well validated in AD diagnosis [10] with a typical profile of decreased CSF $A\beta_{42}$ and elevated Tau and p-Tau levels [11]. In AD, however, the quantification of CSF $A\beta_{40}$ alone is not able to distinguish patients to healthy controls in numerous large studies [12]. Only the CSF $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ ratio has shown a clinical relevance and is now applied to help AD diagnosis [13, 14].

Considering the $A\beta$ -centered pathology between AD and CAA, there is a critical need to assess the diagnostic and prognostic values of CSF AD biomarkers in CAA in addition to the criteria based on brain imaging. Indeed, identifying CAA at an early stage for instance, before the appearance of multiple hemorrhagic lesions could provide valuable insights in patient care and in the design of preventive trials. As suggested by Greenberg et al., future directions

in CAA diagnosis may include more complex criteria incorporating other lesion categories (i.e., CSS severity or abundant enlarged perivascular spaces) and CSF biomarkers in order to improve accuracy of the modified Boston criteria [7, 15, 16]

To date, studies addressing CSF biomarkers in CAA were limited by small size, absence of clinical correlation or systematic control group [9, 17, 18]. A recent meta-analysis [9] including three studies with respectively 12 [19], 15 [20] and 17 [21] probable or definite CAA showed that $A\beta_{42}$, $A\beta_{40}$, and Tau biomarkers differentiated CAA from controls but p-Tau was marginal. A correlation between $A\beta_{42}$ level and widespread of CSS was recently suggested [17] but the underlying mechanism remains to be elucidated. Comparisons with AD given the diversity in amyloid distribution would also help understanding and specifying the CSF pattern in CAA.

From a retrospective multicenter study, we aimed to describe the CSF levels of $A\beta_{42}$, $A\beta_{40}$, total protein Tau, and p-Tau in probable CAA patients. We further searched for correlations with their neuroimaging profile and compared profiles between CAA and AD as secondary endpoints.

MATERIALS AND METHODS

Patient inclusions

Patients were retrospectively recruited from two French Neurology centers in Rouen University Hospital and Lariboisière Hospital Université de Paris between 2012 and 2019. All consecutive patients who met the diagnostic criteria for probable CAA [4] and who underwent lumbar puncture (LP) for CSF AD biomarkers analysis with MRI data available were included in the study, independently from their initial clinical presentation. LP were mostly performed during the diagnosis assessment of CAA of early-onset. We collected demographics, medical history, clinical presentation, and drug use at diagnosis by a careful review of the medical charts provided by each referring clinician. Clinical presentations were divided into four categories: cerebral hematomas; transient focal neurological episodes or amyloid spells defined as recurrent and stereotypical episodes with positive seizure-like or negative transient ischemic attacks-like phenomena [22]; cognitive decline; or other presentation (such as stroke or behavioral disorders). For greater reliability, we excluded patients with criteria meeting possible but not probable CAA ($n=5$) as well as CAA-related inflammation ($n=7$) given

the specific CSF pattern found in this condition [23]. LPs were performed at least 3 months after any cerebrovascular event, head trauma or seizure given the transient increase the Tau level of CSF in those conditions [24, 25]

In order to better understand and specify the CSF pattern in CAA, we compared them to 27 AD patients, recruited from Rouen University Hospital and diagnosed according to currently validated clinical diagnosis criteria for probable AD by the NIA-AA [26]. The same evaluation and data collection conducted in the probable CAA group were performed. In order to prevent significant overlap with CAA, only AD patients without lobar hemorrhagic lesions including CMBs or CSS on their MRI (T2 gradient echo sequences) were included.

In order to estimate the diagnostic sensitivity and specificity of each CSF biomarker in CAA, 21 control patients were also included. Those controls were diagnosed with non neurodegenerative disease or psychiatric disorder before performance of LP in Rouen University Hospital.

Following the current French legislation regarding retrospective study, we excluded any patient mentioning his opposition for the use of his CSF sample for research purposes.

Ethics board approval was obtained for data collection and publication from the institutional review board of Rouen University Hospital for retrospective non-interventional research (E2021-14).

CSF analyses

CSF was obtained by LP between the L3/L4 or L4/L5 intervertebral space, using a 22-gauge needle in fed-state condition. In an effort to reduce intersite variability in CSF readings, both centers used a common 10-ml polypropylene tube to collect the CSF (catalog number 62.610.201; Sarstedt, Nümbrecht, Germany) [27]. All samples were aliquoted after centrifugation for 10 min at +4°C into polypropylene Eppendorf tubes, then frozen at -80°C within 1 h. A β ₄₂, A β ₄₀, Tau, and p-Tau protein measurements were taken using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Fujirebio-Europe, Ghent, Belgium) according to the manufacturer's instructions. The analysis was performed in duplicate and a coefficient of variation (CV) less than 15% was considered as acceptable. In this case, the mean of the two measured values was taken as final result. When the CV was above 15%, samples were reanalyzed in duplicate. The quality of the results was ensured by the

use of validated standard operating procedures and internal quality controls (QC) as the two centers were already involved in nationwide studies [28]. Both sites belong to the same national biomarker network (ePLM) which was created to enhance harmonization of procedures regarding CSF biomarkers in AD. In the absence of universal consensus, we used the laboratory standards to set the thresholds for CSF biomarker quantification, i.e., 635 pg/mL for A β ₄₂ level; 466 pg/mL for Tau protein level; 55 pg/mL for phospho-Tau protein level.

MRI analyses

Cerebral MRI (1.5 or 3 Tesla) were only assessed when blood sequences (see below) were available and analyzed on a Picture Archiving and Communication System (PACS) console dedicated to neurological imaging. All patients underwent MRI collected by either LG, AZ, DW, or OM confirming that all patients met modified Boston criteria for probable CAA but unfortunately, four were not available for research scoring of hemorrhagic lesions.

Blood-sensitive sequences used to evaluate intracranial bleedings were T2 gradient echo (T2 GRE) sequences, T2 star or a magnetic susceptibility sequence, being either a susceptibility weighted imaging (SWI) or a T2 star weighted angiography (SWAN), depending on the MRI machine used. In order to assess a consensual, two neurologists (LG, DW) independently graded distinct hemorrhagic features in each region of interest. They were blinded to the CSF biomarker profile. All hemorrhagic lesions were analyzed independently by both neurologists, by visually counting each lesion. The presence and number of CMBs (<10 mm diameter) [29], ICH (\geq 10 mm) were evaluated and CSS was classified as focal (\leq 3 sulci) or disseminated (>4 sulci) after recording the number of sulci involved [30]. CMBs count was arbitrarily stopped above 1000 for reliability. Hippocampal atrophy was scored according to Scheltens scale on 3D acquisition or 2D coronal T2-weighted-sequences [31]. Perivascular white matter lesions was scored according to Fazekas scale on T2 or FLAIR-weighted sequences [32]. Each lesion was also classified upon their location: lobar pre or post Rolandic, deep, or in posterior fossa.

Statistical analyses

CSF biomarker levels were compared between groups. Descriptive statistics were expressed as mean

Table 1
Clinical characteristics and CSF biomarker profile in the different patient groups

	Probable CAA (n = 63)	AD (n = 27)	Controls (n = 21)	p
Sex, male, n (%)	34 (53.9%)	14 (51.8%)	11	0.98
Age at LP (y)	72.6 ± 7.4	64.1 ± 6.3	65.8 ± 9.6	<0.001
Age of onset (y)	71.0 ± 7.8	60.0 ± 5.7	NA	<0.001*
Time from onset to LP (y)	1.9 ± 2.4	3.2 ± 2.1	NA	<0.001*
Follow-up duration (y)	3.2 ± 2.6	9.7 ± 3.6	NA	<0.001*
MMSE at LP	23.9 ± 5.6	20.1 ± 5.8	NA	0.008*
T-tau (pg/ml), mean ± SD	409.7 ± 310.1	661.9 ± 338.7	365.4 ± 271.6	0.006
P-tau (pg/ml), mean ± SD	61.1 ± 24.1	92.9 ± 36.0	56.6 ± 32.6	0.003
Aβ ₄₂ (pg/ml), mean ± SD	490.2 ± 220.4	350.7 ± 181.9	742.7 ± 233.2	<0.001
Aβ ₄₀ (pg/ml), mean ± SD	9171.9 ± 4146.2	12588 ± 5016.2	11633 ± 4851	0.001
Aβ _{42/40} ratio, mean ± SD	0.060 ± 0.027	0.040 ± 0.02	0.089 ± 0.07	<0.001

CAA, cerebral amyloid angiopathy; AD, Alzheimer's disease; y, years; SD, standard deviation; LP, lumbar puncture; MMSE, Mini-Mental State Examination; Tau, Tau protein; p-Tau, phosphorylated Tau; Aβ₄₂, amyloid β₁₋₄₂; Aβ₄₀, amyloid β₁₋₄₀. In order to compare the three groups, Kruskal Wallis test and Fisher exact test were used for univariate analyses, and Wilcoxon Mann Whitney test for pairwise comparisons (*).

with standard deviation (SD) and median. The three groups of patients were compared using a Kruskal-Wallis or Wilcoxon Mann Whitney test for pairwise comparisons for quantitative data and a Fisher exact test for qualitative data. For multivariate analysis, CSF biomarkers were compared between groups following a logistic regression adjusting for age at LP, sex, and time from onset to LP.

We used Spearman's correlation coefficient in order to identify any correlation between MRI pattern and CSF biomarkers in probable CAA patients. Finally, receiver operator characteristic (ROC) analysis was led to evaluate the ability of CSF biomarkers to discriminate CAA from controls, using our laboratory standards to set the thresholds for CSF biomarker quantification. All statistical analyses were implemented with the R statistical software, including the pROC package for ROC graphical representations and AUC computations. The threshold for statistical significance was set to $p \leq 0.05$.

RESULTS

Probable CAA population

We included 63 probable CAA patients, of whom 53.9% ($n = 34$) were males. Fifty-one cases were recruited in the Rouen University Hospital and 12 in the Lariboisière Hospital Université de Paris. Baseline characteristics are presented on Table 1.

The mean age at first neurological clinical event was 71.0 ± 7.8 years old and the mean age at LP, 72.6 ± 7.4 years old. The most common initial presentation was ICH, present in 47.6% ($n = 30$),

followed by cognitive decline in 22.2% ($n = 14$) and amyloid spells in 23.8% ($n = 15$). Other symptoms included prolonged encephalopathy revealing multiple CMBs ($n = 1$) and ischemic stroke ($n = 3$). The Mini-Mental Status Evaluation (MMSE) at LP was available in 54/63 patients with an average score of 23.9 ± 5.6 . Thirty-six (57.1%) patients suffered from moderately high blood pressure (140–179 mmHg) before the first clinical presentation of CAA. During follow-up, 38 patients (60.3%) presented at least one symptomatic ICH and 31 (49.2%) showed secondary progressive cognitive impairment. Regarding their cognitive profile, 20 showed prominent memory impairment whereas 4 showed a language disorder, 3 praxis disorders and 3 showed a dysexecutive syndrome in the foreground. Their neuropsychological battery showed a clear hippocampal profile in 12 patients and subcortical profile in 9 patients. Six patients showed diffuse impairment that did not allow us to categorize them.

Regarding their radiological characteristics, the mean number of lobar MBs was 59.6 ± 104.5 per patient with an increasing anterior to posterior density as revealed by the mean post-rolandic/pre-rolandic ratio of 3.8 ± 7.2 . Twelve patients (19.0%) presented with one or two MBs in cerebellum. Thirty-four (53.9%) presented with at least one sulcus of CSS, including 25 with disseminated CSS (39.6%) whereas 29 (46%) did not show any CSS.

CSF biomarker profile in probable CAA patients

The mean CSF Aβ₄₂ and Aβ₄₀ levels were respectively 490.2 ± 220.4 and 9171.9 ± 4146.2 pg/mL.

Table 2
Comparison between probable CAA patients according to their CSF biomarker profile

	CAA with profile similar to AD (<i>n</i> = 32)	CAA with isolated decreased A β ₄₂ level (<i>n</i> = 22)	CAA with normal A β ₄₂ profile (<i>n</i> = 9)	<i>p</i>
Sex, male, <i>n</i> (%)	16 (50.0%)	14 (63.6%)	4 (44.4%)	0.50
Age of onset (y)	70.8 ± 7.1	72.3 ± 6.4	68.4 ± 12.7	0.68
Age at LP (y)	72.7 ± 6.8	73.3 ± 6.2	70.5 ± 11.7	0.94
Time from onset to LP (y)	2.2 ± 2.7	1.2 ± 1.6	2.5 ± 2.5	0.27
Follow-up duration (y)	3.5 ± 2.9	2.6 ± 1.8	3.6 ± 3.3	0.66
MMSE at LP	23.3 ± 6.7	23.7 ± 3.9	25 ± 4.5	0.36
Initial presentation				
– ICH	14 (43.7%)	11 (50.0%)	5 (55.5%)	0.61
– Cognitive decline	9 (28.1%)	3 (13.6%)	2 (22.2%)	
– Amyloid spells	8 (25%)	5 (22.7%)	2 (22.2%)	
– Other	1 (0.3%)	3 (13.6%)	0	
Presence of cognitive decline during follow-up, <i>n</i> (%)	16 (50.0%)	11 (50.0%)	4 (44.4%)	0.95
Presence of symptomatic ICH during follow-up, <i>n</i> (%)	17 (53.1%)	15 (68.2%)	6 (66.7%)	0.98
Presence of high blood pressure, <i>n</i> (%)	19 (59.3%)	10 (45.4%)	7 (77.8%)	0.23
Magnetic-susceptibility weighted sequence				
– T2*	22	15	6	0.99
– SWAN/ SWI	10	7	3	
Number of ICH, mean (SD)	0.9 ± 1.0	1.2 ± 1.1	1.7 ± 1.6	0.37
Lobar microbleeds, mean (SD)	65.4 ± 131.8	68.7 ± 76.1	17.8 ± 24.2	0.54
Ratio Post-Rolandic / Pre-Rolandic, mean (SD)	2.9 ± 2.7	5.8 ± 11.5	1.6 ± 0.7	0.76
CSS (number of affected sulci), total (median)	8.5 ± 12.4	4.9 ± 6.5	2.7 ± 4.4	0.33
Disseminated CSS	14 (43.7%)	8 (36.3%)	3 (33.3%)	0.78
Hippocampal Atrophy, Scheltens scale				
– right	1.1 ± 1.1	1.5 ± 0.9	1.2 ± 1.1	0.52
– left	1.3 ± 1.0	1.6 ± 1.0	1.5 ± 0.7	0.65
Leukopathy, Fazekas scale mean (SD)				
Anterior leukopathy	1.3 ± 0.9	1.4 ± 0.8	1.2 ± 1.2	
Posterior leukopathy	1.6 ± 1.1	1.9 ± 1.0	1.5 ± 1.3	

CAA, cerebral amyloid angiopathy; y, years; SD, standard deviation; LP, lumbar puncture; MMSE, Mini-Mental State Examination; IC, intracerebral hemorrhage; CSS, cerebral superficial siderosis; Tau, Tau protein; p-Tau, phosphorylated Tau; A β ₄₂, amyloid β 1-42; A β ₄₀, amyloid β 1-40. In order to compare the three groups, Kruskal Wallis test and Fisher exact test were used

No correlation was found according to Pearson's coefficient between age at LP and A β ₄₂ ($p=0.89$), A β ₄₀ level ($p=0.16$), Tau ($p=0.31$), or p-Tau level ($p=0.32$). Thirty-two probable CAA patients (50.8%) presented a decreased CSF A β ₄₂ level associated with elevated p-Tau and/or Tau level (Table 2). This pattern was defined as similar to AD. Twenty-two patients (34.9%) showed isolated decreased CSF A β ₄₂ levels and 9 (14.3%) patients showed CSF A β ₄₂ levels in normal ranges. Despite this normal profile, the Boston diagnostic criteria of probable CAA were still fulfilled (Fig. 1). Among those 9 patients, 6 had completely normal profiles with CSF Tau and p-Tau in normal ranges and three showed moderately elevated p-Tau values (59, 68, and 69 pg/mL).

Overall, we defined three CSF profiles in probable CAA patients: A) similar to AD; B) isolated decreased A β ₄₂ level; and C) normal A β ₄₂ levels

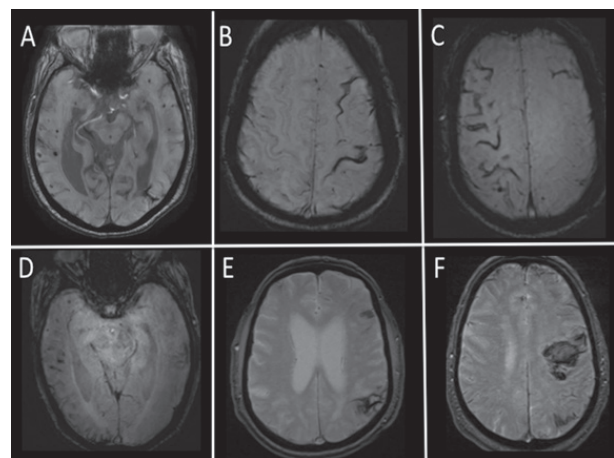


Fig. 1. Representative imaging of probable CAA patients with normal CSF biomarker profile.

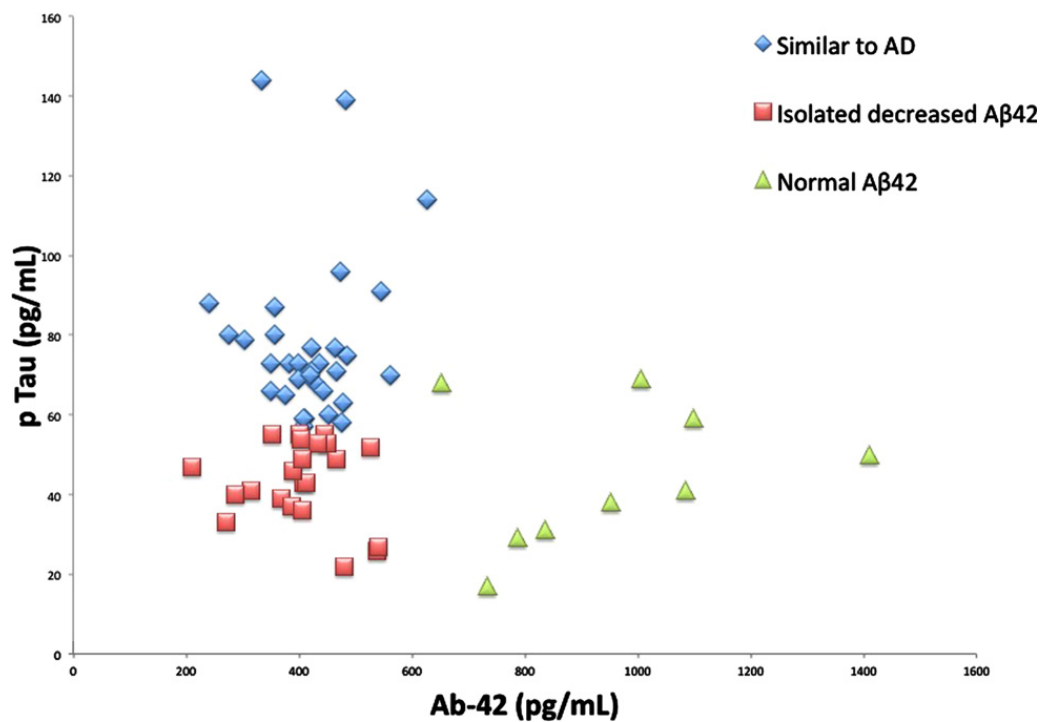


Fig. 2. CSF biomarkers according to the 3 CSF profiles in probable CAA patients.

Table 3
Levels of AD biomarkers according to the CSF profile of probable CAA patients

	CAA with profile similar to AD (n = 32)	CAA with isolated decreased A β_{42} level (n = 22)	CAA with normal A β_{42} profile (n = 9)
A β_{42} (pg/ml), mean (SD)	419.6 \pm 80.1	404.2 \pm 83.6	951.1 \pm 232.3
A β_{40} (pg/ml), mean (SD)	9087.6 \pm 3025.7	7626.5 \pm 2447.7	13239.9 \pm 7434.9
Tau protein (pg/ml), mean (SD)	485.1 \pm 80.1	267.5 \pm 53.5	489.9 \pm 715.4
pTau protein (pg/ml), mean (SD)	77.8 \pm 20.6	43.4 \pm 10.1	44.6 \pm 18.1

CAA, cerebral amyloid angiopathy; SD, standard deviation; Tau, Tau protein; p-Tau, phosphorylated Tau; A β_{42} , amyloid β 1-42; A β_{40} , amyloid β 1-40.

with or without increased Tau or p-Tau (Fig. 2). No difference was found regarding the A β_{40} level between the profile A and B ($p=0.10$). However, higher CSF A β_{40} level was found in profile C compared to other profiles ($p=0.04$) (Table 3). These profiles did not differ in terms of clinical characteristics, age of onset, time from onset to LP. Notably, probable CAA patients with a CSF profile similar to AD did not show lower MMSE at LP ($p=0.36$) or prominent cognitive profile ($p=0.95$) compared to other profiles. No difference was found in terms of number of ICH, MBs, or presence of CSS on MRI.

Comparison with 27 AD cohort

The mean follow-up duration of AD patients was 9.7 ± 3.6 years with a mean age of onset of 60.0 ± 5.7

years old (Table 1). Reflecting the French guidelines for performing LP only in AD in cases with an age of onset before 66 years [33, 34] the group of AD patients was younger than the probable CAA patients (60 versus 71.0, $p < 0.001$). Probable CAA patients underwent LP more quickly after their first symptoms and were followed in our centers for a shorter period of time. AD patients seemed to present a more altered cognition with a lower average MMSE score at LP (20.1 ± 5.8 versus 23.9 ± 5.6 in CAA, $p = 0.008$)

Compared to AD, probable CAA patients presented with lower CSF A β_{40} levels (mean 9171.9 ± 4146.2 versus 12588 ± 5016.2 , adjusted $p = 0.001$) and higher A $\beta_{42/40}$ ratios (mean 0.060 ± 0.027 versus 0.040 ± 0.02 , adjusted $p = 0.001$) but did not show significant difference regarding CSF A β_{42} level (mean 490.2 versus 350.7 , adjusted $p = 0.067$)

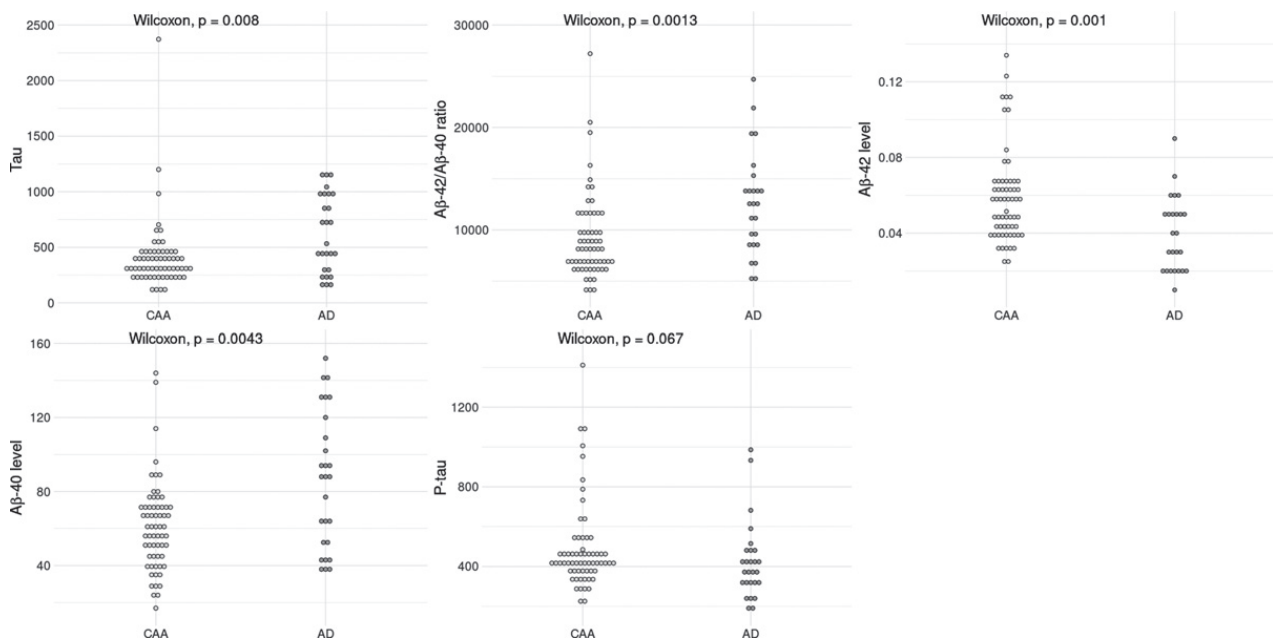


Fig. 3. Scatterplots illustrating CSF biomarkers in probable CAA and AD. A) CSF level of Tau. B) CSF level of p-Tau protein. C) CSF level of $A\beta_{42}$. D) CSF level of $A\beta_{40}$. E) Ratio of $A\beta_{42}$ to $A\beta_{40}$. Wilcoxon Mann Whitney test was used with adjustment for age at LP, sex, and time from onset to LP.

(Fig. 3). Tau and p-Tau levels were lower in probable CAA patients compared to AD (409.7 versus 661.9; adjusted $p=0.008$ and 61.1 versus 92.9, adjusted $p=0.004$ respectively).

More, ROC analysis for differentiation of CAA from AD is presented in Fig. 5 and yielded the following results or sensitivity (Se), specificity (Sp), and area under the curves (AUC) for $A\beta_{42}$ (Se: 48.7%; Sp: 75.8%; AUC: 0.62), $A\beta_{40}$ (Se: 59.8%; Sp: 84.7%; AUC: 0.72), t-tau (Se: 53.3%; Sp: 82.1%; AUC: 0.67), and p-tau (Se: 55.6%; Sp: 82.5%; AUC: 0.69).

Correlation between CSF biomarkers and neuroimaging

We showed no clear correlation between CSF $A\beta_{42}$ or $A\beta_{40}$ levels and MBs number or CSS dissemination in probable CAA patients according to Spearman correlation, regardless of the sequence type used for analysis (Fig. 4). No difference was found between patients with focal CSS ($n=9$), disseminated CSS ($n=25$) and patient without CSS ($n=29$) regarding $A\beta_{42}$, $A\beta_{40}$, Tau, or p-Tau levels (Table 4).

Sensitivity and specificity of CSF AD biomarkers in probable CAA compared to controls

ROC analysis for optimal differentiation of CAA from controls yielded the following results for

sensitivity (Se), specificity (Sp), and area under the curves (AUC) for $A\beta_{42}$ (Se: 65.5%; Sp: 92.4%; AUC: 0.79), $A\beta_{40}$ (Se: 50.6%; Sp: 87.4%; AUC: 0.69), t-tau (Se: 43.1%; Sp: 77.1%; AUC: 0.60), and p-tau (Se: 43.5%; Sp: 76.0%; AUC: 0.56) (Fig. 6).

DISCUSSION

This study describes the CSF biomarkers profile and neuroimaging pattern of a 63 probable CAA patient cohort providing detailed comparison with 27 AD patients. Following the CSF biomarker quantifications, three distinct profiles were encountered: patients with CSF profile similar to AD patients including elevated Tau and pTau levels (50.8%), patients with isolated decreased $A\beta_{42}$ level (34.9%) and patients with normal $A\beta_{42}$ level (14.3%). While $A\beta_{40}$ level was not modified in AD, this biomarker was significantly altered in CAA.

CSF biomarkers are being widely used in AD diagnosis in clinical practice and several authors raised the question of their relevance in CAA diagnosis assessment in addition to brain imaging [7]. In the present study, more than 85% of the cohort showed an altered CSF biomarker profile, supporting their potential contribution to the CAA diagnostic process even though caution must be taken given the lack of neuropathological confirmation. Despite a known overlap between AD and CAA, we confirmed that

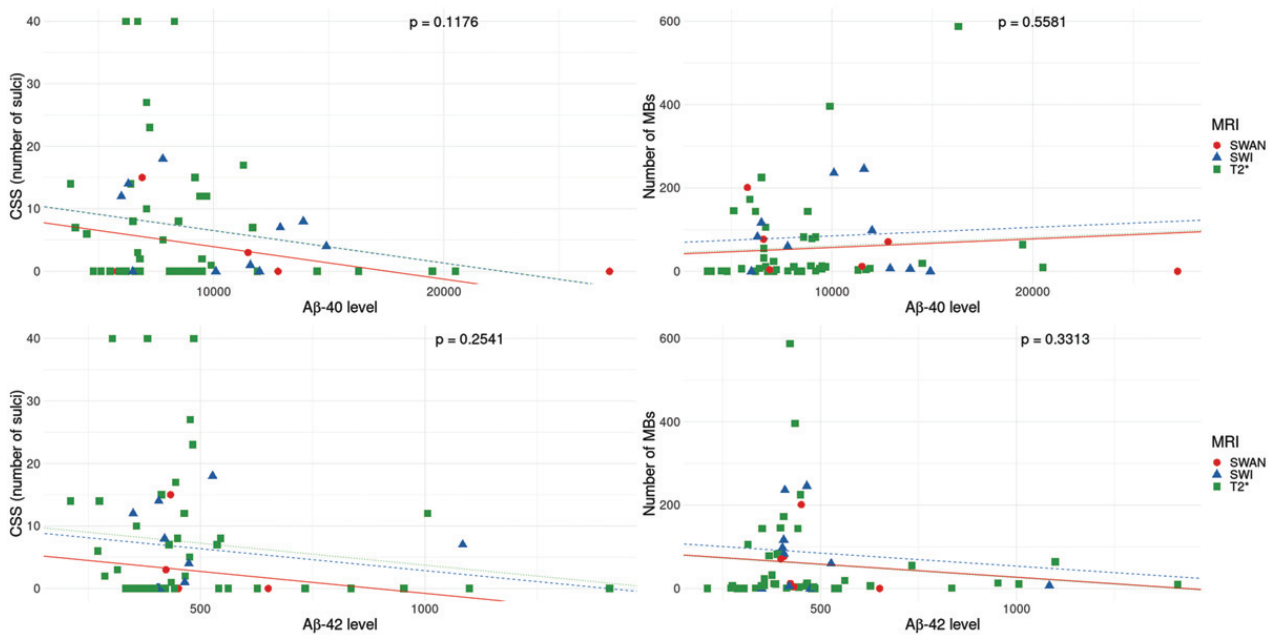


Fig. 4. Microbleeds (MBs) and cortical superficial siderosis (CSS) on MRI according to the levels of $A\beta_{42}$ and $A\beta_{40}$. The blood-sensitive sequence used for analysis (SWAN, SWI, or $T2^*$) is indicated on each panel, with parallel trend lines indicating no impact of the sequence on correlation between neuroimaging and CSF biomarkers. Correlations were analyzed according to Spearman's coefficient.

CSF profile seemed differentially associated with the underlying pathology. Overall, probable CAA patients presented with a significant lower $A\beta_{40}$, tau, and p-Tau levels but close $A\beta_{42}$ levels compared to AD patients, which is consistent with $A\beta_{42}$, but not $A\beta_{40}$, being predominantly present in parenchymal amyloid depositions of patients with AD. In CAA, $A\beta_{40}$ is the major isoform accumulating in cerebral vessels and increasing over the disease progression [35]. The exact same CSF pattern was reported in CAA in a recent meta-analysis gathering three studies with a total of 59 CAA patients compared to 94 healthy controls and 159 AD patients [9]. We here confirmed with a substantial sample size and ROC analyses, larger than previous studies [21] that $A\beta_{40}$ may be helpful to differentiate CAA from AD. Moreover, our ROC analyses compared to controls underlined the relevance of both CSF $A\beta_{42}$ and $A\beta_{40}$ levels to diagnose CAA.

Three different CSF profiles were described among our probable CAA series. The prominent profile was similar to AD (50.8%) suggesting a distinct CAA AD-related sub-group. Indeed, CSF tau levels are known to correlate with the rate of axonal degeneration, while p-Tau is more specific of neurofibrillary tangles in AD [36]. In CAA, an elevated Tau could be the result of neuronal loss from another mechanism such as leukopathy or the presence of microbleeds. Nevertheless, the absence of significant

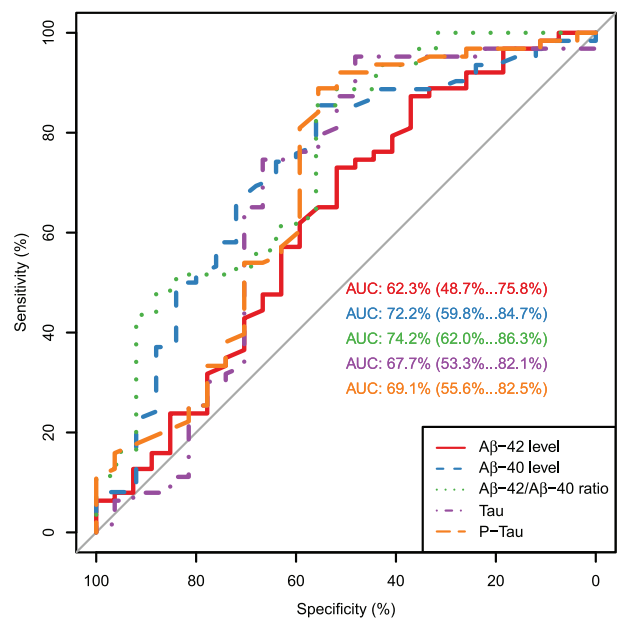


Fig. 5. ROC curve analyses comparing CAA versus AD. Se, sensitivity; Sp, Specificity; AUC, Area under the curve.

difference in terms of cerebral imaging according to the CSF profile in probable CAA does not support this hypothesis. The altered Tau and p-Tau dosages rather suggest the coexistence of AD in this sub-group of CAA patients. Indeed, AD and CAA share common pathogenic pathways beginning with genetic factors as the *APOE* genotypes as well as the role of *APP*

Table 4
Levels of AD biomarkers stratified for presence and extent of CSS

	Patients without CSS (n = 29)	Patients with focal CSS (n = 9)	Patients with disseminated CSS (n = 25)	p
A β ₄₂ (pg/ml), mean (SD)	526.8 ± 255.6	398.2 ± 91.9	480.8 ± 203.8	0.76
A β ₄₀ (pg/ml), mean (SD)	9991.5 ± 5229.0	10336.4 ± 2738.9	7848.6 ± 2553	0.10
Tau protein (pg/ml), mean (SD)	441.9 ± 423.4	400.2 ± 163.6	376.0 ± 167.1	0.90
pTau protein (pg/ml), mean (SD)	59.1 ± 25.3	61.2 ± 24.5	63.4 ± 23.5	0.62

CSS, cerebral superficial siderosis; Tau, Tau protein; p-Tau, phosphorylated Tau; A β ₄₂, amyloid β 1-42; A β ₄₀, amyloid β 1-40. In order to compare each biomarker in the three groups of patients, a Kruskal Wallis test was used.

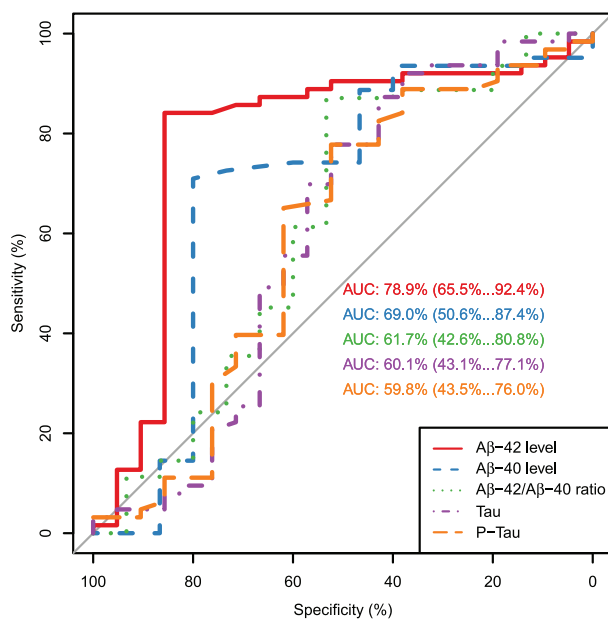


Fig. 6. ROC curve analyses comparing CAA versus controls. Se, sensitivity; Sp, Specificity; AUC, Area under the curve.

mutations and duplications in autosomal dominant forms [1]. The expected rates of co-pathologies are quite high and increase with aging [1]. Based on 3,976 autopsied subjects, CCA was present in 52–98% of subjects with high AD neuropathologic changes [37]. However, there was no over-representation of cognitive decline in patients with CSF profile similar to AD compared to other probable CAA patients at onset or during the follow-up. In CAA, cognition is affected through multiple mechanisms such as AD-related pathophysiology but also through alterations of the microvascularisation. A recent study showed that CAA pathology is an independent contributor to dementia, over and above AD pathology [38]. Nevertheless, this CAA AD-related subtype might warrant further cognitive monitoring during long-term follow-up.

The second group of CSF profile was the isolated low-A β ₄₂ level (34.9%), without tau or pTau

altered dosages. This could be related to vascular A β deposits arising from blood vessel dysfunction (notably smooth muscle cells) without AD-related neuritic plaques or neurofibrillary lesions [39]. Indeed, histopathologically, A β deposition has been classified as CAA type I or II according to the presence of capillary involvement but also association or not with neuritic plaques and severe AD pathology [40–42]. We may hypothesize that the CAA type I (with neuritic plaques) is more prominent in the first group with a CSF profile similar to AD, whereas the CAA type II could be more frequent in the second group of CSF profile with isolated low-A β ₄₂ level. Further studies with histological examination are needed to establish this suggested link. Such isolated low-A β ₄₂ sub-group may reflect a pure vascular model of CAA without AD-related parenchymal A β deposition. In patients carrying an Italian *APP* mutation for instance, neuropathology showed no neurofibrillary tangles but only amyloid depositions [43].

A last minor CSF pattern was identified through our cohort with 9 patients (14.3%) showing normal range of A β ₄₂ level. No correlation with phenotype was found as they did not differ in terms of age of onset, delay from onset to LP or clinical presentation. Great caution should be taken while no histological data was available for those 9 patients. However, they all met the Boston criteria for probable CAA and showed marked lobar hemorrhagic signs on their MRI. Careful attention has been paid to any potential differential diagnosis in those cases but even after follow-up, the final probable CAA diagnosis remained. One possible hypothesis to explain that normal profile could be the precocity of the CSF AD biomarkers analysis, at onset of the CAA course. Nevertheless, in AD and in mutation carriers with hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis–Dutch type, the changes from normal to abnormal levels of CSF biomarkers most likely occur during the preclinical asymptomatic phase of

the disease, up to 20 years before onset [44–46]. We could also argue a lack of specificity of the immunoassay technology targeting A β ₄₂ applied in a disease with preferential deposition of A β ₄₀. Several other biomarkers such as soluble A β PP α , soluble A β PP β or TREM2 are currently studied in CAA [47] and could be interesting to analyze in those patients with normal CSF profile.

No significant correlation between CSF and the number of MBs or extent of CSS on MRI was found. Nevertheless, further investigation of correlation between CSF biomarkers and the volume of microhemorrhages instead of MBs number would be interesting. In a recent large study including 80 probable CAA patients focused on correlation with cerebral imaging [17], the authors reported a significant lower A β ₄₂ level in CSF of patients with CSS compared to those without but they did not detect differences in tau, p-tau or A β ₄₀ levels. The underlying mechanism of this presumed association between CSS and A β ₄₂ CSF level remains to be elucidated.

Limitations in this study include the retrospective character and the absence of pathologically proven CAA case, notably among patients with normal A β ₄₂ level and the use of different MRI blood-sensitive sequences that may have had an impact on the number of CMB and potentially the extent of CSS. Furthermore, given the absence of strictly healthy controls, we used patients with other conditions, however not interfering with CSF biomarkers quantification to build the ROC curves. Strengths include the substantial sample size of probable CAA cohort with CSF, clinical and neuroimaging data, the multicenter design but standardized CSF analysis as well as the central double reading of the MRI. In the absence of current guidelines for CSF biomarker analysis regarding CAA, a selection bias in the CAA group could be argued. Nevertheless, LP was performed as a mandatory complementary examination in case of early-onset CAA or AD for both centers, to explore potential differential diagnoses thus, limiting the risk of selection bias.

According to this study, AD CSF biomarkers may add strength to refine CAA diagnosis complementary to the Boston radiological criteria with an altered profile in more than 85% of the probable CAA patients but further studies with neuropathological confirmation are needed. In this large probable CAA cohort, the prominent CSF profile was similar to AD followed by isolated decrease in A β ₄₂ level, suggesting heterogenous brain injuries and A β deposition mechanisms. Among all CSF biomarkers, both A β ₄₀ and

A β ₄₂ could be the most relevant candidates to help CAA diagnosis.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Dany Laforêt for her help in CSF biomarker analyses.

Authors' disclosures available online (<https://www.j-alz.com/manuscript-disclosures/21-5208r2>).

REFERENCES

- [1] Greenberg SM, Bacskai BJ, Hernandez-Guillamon M, Pruzin J, Sperling R, van Veluw SJ (2020) Cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer disease—one peptide, two pathways. *Nat Rev Neurol* **16**, 30–42.
- [2] Masters CL, Bateman R, Blennow K, Rowe CC, Sperling RA, Cummings JL (2015) Alzheimer's disease. *Nat Rev Dis Primer* **1**, 15056.
- [3] Smith EE, Greenberg SM (2003) Clinical diagnosis of cerebral amyloid angiopathy: Validation of the Boston criteria. *Curr Atheroscler Rep* **5**, 260–266.
- [4] Linn J, Halpin A, Demaerel P, Ruhland J, Giese AD, Dichgans M, Van Buchem MA, Bruckmann H, Greenberg SM (2010) Prevalence of superficial siderosis in patients with cerebral amyloid angiopathy. *Neurology* **74**, 1346–1350.
- [5] Knudsen KA, Rosand J, Karluk D, Greenberg SM (2001) Clinical diagnosis of cerebral amyloid angiopathy: Validation of the Boston Criteria. *Neurology* **56**, 537–539.
- [6] Charidimou A, Jaunmuktane Z, Baron J-C, Burnell M, Varlet P, Peeters A, Xuereb J, Jager R, Brandner S, Werring DJ (2014) White matter perivascular spaces: An MRI marker in pathology-proven cerebral amyloid angiopathy? *Neurology* **82**, 57–62.
- [7] Greenberg SM, Charidimou A (2018) Diagnosis of cerebral amyloid angiopathy: Evolution of the Boston criteria. *Stroke* **49**, 491–497.
- [8] Martinez-Ramirez S, Romero J-R, Shoamanesh A, McKee AC, Van Etten E, Pontes-Neto O, Macklin EA, Ayres A, Auriel E, Himali JJ, Beiser AS, DeCarli C, Stein TD, Alvarez VE, Frosch MP, Rosand J, Greenberg SM, Gurol ME, Seshadri S, Viswanathan A (2015) Diagnostic value of lobar microbleeds in individuals without intracerebral hemorrhage. *Alzheimers Dement* **11**, 1480–1488.
- [9] Charidimou A, Friedrich JO, Greenberg SM, Viswanathan A (2018) Core cerebrospinal fluid biomarker profile in cerebral amyloid angiopathy: A meta-analysis. *Neurology* **90**, e754–e762.
- [10] Mouton-Liger F, Wallon D, Troussière A-C, Yatimi R, Dumurgier J, Magnin E, de la Sayette V, Duron E, Philippi N, Beaufils E, Gabelle A, Croisile B, Robert P, Pasquier F, Hannequin D, Hugon J, Paquet C (2014) Impact of cerebrospinal fluid biomarkers of Alzheimer's disease in clinical practice: A multicentric study. *J Neurol* **261**, 144–151.
- [11] Gabelle A, Dumurgier J, Vercurysse O, Paquet C, Bombois S, Laplanche J-L, Peoc'h K, Schraen S, Buée L, Pasquier F, Hugon J, Touchon J, Lehmann S (2013) Impact of the 2008–2012 French Alzheimer Plan on the use of cerebrospinal fluid biomarkers in research memory center: The PLM Study. *J Alzheimers Dis* **34**, 297–305.
- [12] Olsson B, Lautner R, Andreasson U, Öhrfelt A, Portelius E, Bjerke M, Hölttä M, Rosén C, Olsson C, Strobel G, Wu E,

- Dakin K, Petzold M, Blennow K, Zetterberg H (2016) CSF and blood biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol* **15**, 673-684.
- [13] Biscetti L, Salvadori N, Farotti L, Cataldi S, Eusebi P, Paciotti S, Parnetti L (2019) The added value of A β 42/A β 40 in the CSF signature for routine diagnostics of Alzheimer's disease. *Clin Chim Acta* **494**, 71-73.
- [14] Dumurgier J, Schraen S, Gabelle A, Vercurysse O, Bombois S, Laplanche J-L, Peoc'h K, Sablonnière B, Kastanenka KV, Delaby C, Pasquier F, Touchon J, Hugon J, Paquet C, Lehmann S (2015) Cerebrospinal fluid amyloid- β 42/40 ratio in clinical setting of memory centers: A multicentric study. *Alzheimers Res Ther* **7**, 30.
- [15] Boulouis G, Charidimou A, Pasi M, Roongpiboonsopit D, Xiong L, Auriel E, van Etten ES, Martinez-Ramirez S, Ayres A, Vashkevich A, Schwab KM, Rosand J, Goldstein JN, Gurol ME, Greenberg SM, Viswanathan A (2017) Hemorrhage recurrence risk factors in cerebral amyloid angiopathy: Comparative analysis of the overall small vessel disease severity score versus individual neuroimaging markers. *J Neurol Sci* **380**, 64-67.
- [16] Charidimou A, Jäger RH, Peeters A, Vandermeeren Y, Laloux P, Baron J-C, Werring DJ (2014) White matter perivascular spaces are related to cortical superficial siderosis in cerebral amyloid angiopathy. *Stroke* **45**, 2930-2935.
- [17] Catak C, Zedde M, Malik R, Janowitz D, Soric V, Seegerer A, Krebs A, Düring M, Opherck C, Linn J, Wollenweber FA (2019) Decreased CSF levels of β -amyloid in patients with cortical superficial siderosis. *Front Neurol* **10**, 439.
- [18] Girard-Stein L, Dumurgier J, Paquet C, Chabriat H (2020) Clinical features related to CSF level of amyloid A β 42 and A β 40 proteins in presence of lobar microbleeds. *Rev Neurol (Paris)* **176**, 864-867.
- [19] Martínez-Lizana E, Carmona-Iragui M, Alcolea D, Gómez-Choco M, Vilaplana E, Sánchez-Saudinós MB, Clarimón J, Hernández-Guillamón M, Munuera J, Gelpi E (2015) Cerebral amyloid angiopathy-related atraumatic convexal subarachnoid hemorrhage: An ARIA before the tsunami. *J Cereb Blood Flow Metab* **35**, 710-717.
- [20] Renard D, Gabelle A, Hirtz C, Demattei C, Thouvenot E, Lehmann S (2016) Cerebrospinal fluid Alzheimer's disease biomarkers in isolated supratentorial cortical superficial siderosis. *J Alzheimers Dis* **54**, 1291-1295.
- [21] Verbeek MM, Kremer BPH, Rikkert MO, Van Domburg PHMF, Skehan ME, Greenberg SM (2009) Cerebrospinal fluid amyloid β ₄₀ is decreased in cerebral amyloid angiopathy. *Ann Neurol* **66**, 245-249.
- [22] Charidimou A, Peeters A, Fox Z, Gregoire SM, Vandermeeren Y, Laloux P, Jäger HR, Baron J-C, Werring DJ (2012) Spectrum of transient focal neurological episodes in cerebral amyloid angiopathy: Multicentre magnetic resonance imaging cohort study and meta-analysis. *Stroke* **43**, 2324-2330.
- [23] Renard D, Wacogne A, Ayrignac X, Charif M, Fourcade G, Azakri S, Le Floch A, Bouly S, Marelli C, Arquizan C, Hirtz C, Gabelle A, Thouvenot E, Lehmann S (2016) Cerebrospinal fluid Alzheimer's disease biomarkers in cerebral amyloid angiopathy-related inflammation. *J Alzheimers Dis* **50**, 759-764.
- [24] Alosco ML, Tripodis Y, Fritts NG, Heslegrave A, Baugh CM, Conneely S, Mariani M, Martin BM, Frank S, Mez J, Stein TD, Cantu RC, McKee AC, Shaw LM, Trojanowski JQ, Blennow K, Zetterberg H, Stern RA (2018) Cerebrospinal fluid tau, A β , and sTREM2 in Former National Football League Players: Modeling the relationship between repetitive head impacts, microglial activation, and neurodegeneration. *Alzheimers Dement* **14**, 1159-1170.
- [25] Hesse C, Rosengren L, Vanmechelen E, Vanderstichele H, Jensen C, Davidsson P, Blennow K (2000) Cerebrospinal fluid markers for Alzheimer's disease evaluated after acute ischemic stroke. *J Alzheimers Dis* **2**, 199-206.
- [26] McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR, Kawas CH, Klunk WE, Koroshetz WJ, Manly JJ, Mayeux R, Mohs RC, Morris JC, Rossor MN, Scheltens P, Carrillo MC, Thies B, Weintraub S, Phelps CH (2011) The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* **7**, 263-269.
- [27] Lehmann S, Schraen S, Quadrio I, Paquet C, Bombois S, Delaby C, Dorey A, Dumurgier J, Hirtz C, Krolak-Salmon P, Laplanche J-L, Moreaud O, Peoc'h K, Rouaud O, Sablonnière B, Thouvenot E, Touchon J, Vercurysse O, Hugon J, Gabelle A, Pasquier F, Perret-Liaudet A (2014) Impact of harmonization of collection tubes on Alzheimer's disease diagnosis. *Alzheimers Dement* **10**, S390-S394.e2.
- [28] Lehmann S, Dumurgier J, Schraen S, Wallon D, Blanc F, Magnin E, Bombois S, Bousiges O, Campion D, Cretin B (2014) A diagnostic scale for Alzheimer's disease based on cerebrospinal fluid biomarker profiles. *Alzheimers Res Ther* **6**, 38.
- [29] Puy L, Pasi M, Rodrigues M, van Veluw SJ, Tsivgoulis G, Shoamanesh A, Cordonnier C (2021) Cerebral microbleeds: From depiction to interpretation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **92**, 598-607.
- [30] Charidimou A, Linn J, Vernooij MW, Opherck C, Akoudad S, Baron J-C, Greenberg SM, Jäger HR, Werring DJ (2015) Cortical superficial siderosis: Detection and clinical significance in cerebral amyloid angiopathy and related conditions. *Brain* **138**, 2126-2139.
- [31] Scheltens PH, Leys D, Barkhof F, Huglo D, Weinstein HC, Vermersch P, Kuiper M, Steinling M, Wolters EC, Valk J (1992) Atrophy of medial temporal lobes on MRI in "probable" Alzheimer's disease and normal ageing: Diagnostic value and neuropsychological correlates. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **55**, 967-972.
- [32] Fazekas F, Barkhof F, Wahlund LO, Pantoni L, Erkinjuntti T, Scheltens P, Schmidt R (2002) CT and MRI rating of white matter lesions. *Cerebrovasc Dis* **13**, 31-36.
- [33] Hort J, O'Brien JT, Gainotti G, Pirttila T, Popescu BO, Rektorova I, Sorbi S, Scheltens P, on behalf of the EFNS Scientist Panel on Dementia (2010) EFNS guidelines for the diagnosis and management of Alzheimer's disease: EFNS guidelines for Alzheimer's disease. *Eur J Neurol* **17**, 1236-1248.
- [34] Monsch AU, Bula C, Hermelink M, Kressig RW, Martensson B, Mosimann U, Muri R, Vogeli S, von Gunten A (2013) [Consensus 2012—diagnosis and treatment of patients with dementia in Switzerland]. *Rev Med Suisse* **9**, 838-847.
- [35] Alonzo NC, Hyman BT, Rebeck GW, Greenberg SM (1998) Progression of cerebral amyloid angiopathy: Accumulation of amyloid-beta40 in affected vessels. *J Neuropathol Exp Neurol* **57**, 353-359.
- [36] Hampel H, Goernitz A, Buerger K (2003) Advances in the development of biomarkers for Alzheimer's disease: From CSF total tau and Abeta(1-42) proteins to phosphorylated tau protein. *Brain Res Bull* **61**, 243-253.

- [37] Brenowitz WD, Nelson PT, Besser LM, Heller KB, Kukull WA (2015) Cerebral amyloid angiopathy and its co-occurrence with Alzheimer's disease and other cerebrovascular neuropathologic changes. *Neurobiol Aging* **36**, 2702-2708.
- [38] Boyle PA, Yu L, Nag S, Leurgans S, Wilson RS, Bennett DA, Schneider JA (2015) Cerebral amyloid angiopathy and cognitive outcomes in community-based older persons. *Neurology* **85**, 1930-1936.
- [39] Greenberg SM, Salman RA-S, Biessels GJ, van Buchem M, Cordonnier C, Lee J-M, Montaner J, Schneider JA, Smith EE, Vernooij M, Werring DJ (2014) Outcome markers for clinical trials in cerebral amyloid angiopathy. *Lancet Neurol* **13**, 419-428.
- [40] Thal DR, Rüb U, Orantes M, Braak H (2002) Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology* **58**, 1791-1800.
- [41] Thal DR, Ghebremedhin E, Orantes M, Wiestler OD (2003) Vascular pathology in Alzheimer disease: Correlation of cerebral amyloid angiopathy and arteriosclerosis/lipohyalinosis with cognitive decline. *J Neuropathol Exp Neurol* **62**, 1287-1301.
- [42] Mäkelä M, Paetau A, Polvikoski T, Myllykangas L, Tanskanen M (2016) Capillary amyloid- β protein deposition in a population-based study (Vantaa 85+). *J Alzheimers Dis* **49**, 149-157.
- [43] Bugiani O, Giaccone G, Rossi G, Mangieri M, Capobianco R, Morbin M, Mazzoleni G, Cupidi C, Marcon G, Giovagnoli A (2010) Hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis associated with the E693K mutation of APP. *Arch Neurol* **67**, 987-995.
- [44] Blennow K, Dubois B, Fagan AM, Lewczuk P, de Leon MJ, Hampel H (2015) Clinical utility of cerebrospinal fluid biomarkers in the diagnosis of early Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* **11**, 58-69.
- [45] Sutphen CL, Jasielc MS, Shah AR, Macy EM, Xiong C, Vlassenko AG, Benzinger TLS, Stoops EEJ, Vanderstichele HMJ, Brix B, Darby HD, Vandijck MLJ, Ladenson JH, Morris JC, Holtzman DM, Fagan AM (2015) Longitudinal cerebrospinal fluid biomarker changes in preclinical Alzheimer disease during middle age. *JAMA Neurol* **72**, 1029.
- [46] Oxtoby NP, Young AL, Cash DM, Benzinger TLS, Fagan AM, Morris JC, Bateman RJ, Fox NC, Schott JM, Alexander DC (2018) Data-driven models of dominantly-inherited Alzheimer's disease progression. *Brain* **141**, 1529-1544.
- [47] Banerjee G, Ambler G, Keshavan A, Paterson RW, Foiani MS, Toombs J, Heslegrave A, Dickson JC, Fraioli F, Groves AM, Lunn MP, Fox NC, Zetterberg H, Schott JM, Werring DJ (2020) Cerebrospinal fluid biomarkers in cerebral amyloid angiopathy. *J Alzheimers Dis* **74**, 1189-1201.

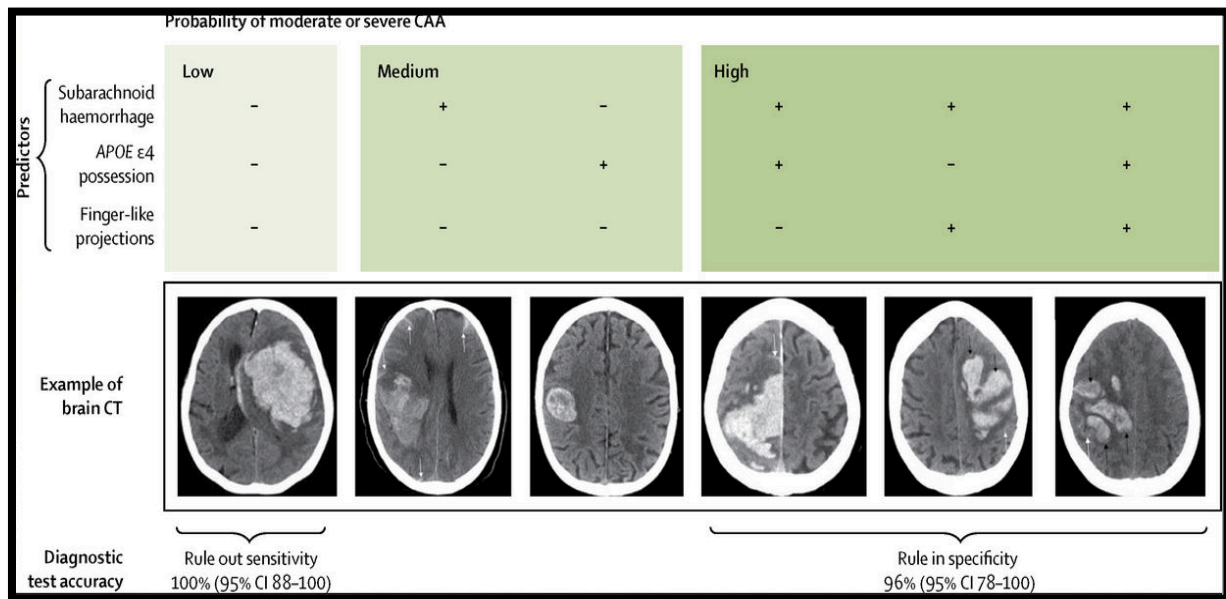
8.2. Apport de la tomodensitométrie (TDM) en urgence

Cette même question de la précision diagnostique se pose également dans des circonstances d'urgence.

En effet, l'AAC se manifeste avant tout par des hématomes cérébraux lobaires de survenue spontanée et les questions diagnostiques et thérapeutiques sont soulevées chez des patients pris en charge en urgence. Bien qu'il n'y ait pas de traitement spécifique de l'AAC, la distinction d'une AAC probable des autres causes d'hématomes cérébraux pourrait avoir un impact important sur la prise en charge des patients, et notamment sur la décision d'évacuation chirurgicale et leur pronostic. L'IRM est nécessaire pour évaluer si les critères diagnostiques de Boston sont remplis mais, malheureusement, n'est pas toujours disponible dans un contexte d'urgence. De plus, il a été montré que 75% des décès liés aux hématomes cérébraux avait lieu dans des pays émergents (403). L'IRM n'y est pas toujours possible.

Des critères diagnostiques d'AAC probable basés sur le scanner cérébral sans injection ont été développés en 2018 : les critères d'Edimbourg (137) (Figure 19). L'étude princeps s'est basée sur des autopsies de patients décédés d'un hématome lobaire. Ces critères comprennent deux items radiologiques : l'extension en « doigt de gant » de l'hématome et l'association à une hémorragie sous-arachnoïdienne mais également un critère génétique : le génotype *APOEε4*. Ceci reflète une prise en compte de plus en plus importante de la composante génétique de l'AAC, mais néanmoins, ne semble pas réalisable en pratique courante d'urgence.

Figure 19 – Critères d'Edimbourg avec TDM représentatifs (Extrait de Rodrigues et al – Lancet Neurology – 2018 (137))



Il nous semblait important de réaliser une validation externe de ces critères en excluant le génotype *APOE*. De même, la confirmation diagnostique anatomopathologique (à partir d'une biopsie par exemple) n'est pratiquée que rarement et nous avons ainsi utilisé comme « gold standard » dans cette étude diagnostique, les critères révisés de Boston basés sur l'IRM cérébrale.

Nous avons inclus 102 patients se présentant en urgence au CHU de Rouen pour hématome lobaire spontané, après exclusion des hématomes profonds, cérébelleux et des contextes traumatiques et, pour qui les données de TDM sans injection et IRM réalisée au décours étaient disponibles. Une double lecture radiologique des TDM sans injection, indépendante et en aveugle du diagnostic final a été réalisée. Au final, une AAC probable a été retenue pour 36 patients et une autre cause d'hématome (HTA, malformation vasculaire..) a été retenue pour 46 patients. Le diagnostic final est resté indéterminé pour 20 patients, qui ont donc été exclus des analyses primaires.

Nous avons en premier lieu pu fournir une confirmation externe solide des critères radiologiques d'Edimbourg sans le génotype *APOE* et ces derniers sont directement applicables dans les situations aiguës d'hématome lobaire spontané. Les deux critères radiologiques d'Edimbourg, à savoir les projections en doigt de gant et l'extension sous-arachnoïdienne associée à l'hématome, ont montré une grande capacité à distinguer l'AAC des autres causes d'hématomes avec une aire sous la courbe (AUC) de 0,76

(IC95% : 0,660 à 0,859) sur la courbe ROC. La valeur prédictive positive était proche de 92%, signifiant une forte probabilité d'AAC en présence d'extension en « doigt de gant » de l'hématome et d'association à une hémorragie sous-arachnoïdienne. En revanche, en absence de ces deux critères, la valeur prédictive négative était moins forte (76%) et le diagnostic d'AAC ne peut donc être exclu.

Compte tenu de scores de reproductibilité inter-observateur très variables dans l'étude princeps de Rodrigues et al (137) mais également dans notre étude, nous avons en outre proposé un nouveau modèle diagnostique incluant les projections en doigt de gant, l'extension sous-arachnoïdienne associée et l'atteinte corticale de l'hématome. Ce modèle a permis d'améliorer les performances diagnostiques avec une AUC de 0,82 (IC95% : 0,722 à 0,909). L'extension aux espaces sous-arachnoïdiens et l'atteinte corticale de l'hématome lié à l'AAC pourraient être en lien avec les dépôts vasculaires d'A β situés spécifiquement dans les vaisseaux corticaux et leptoméningés dans l'AAC, entraînant une rupture dans l'espace sous-arachnoïdien et une localisation parenchymateuse superficielle, comparativement à d'autres causes d'hématome [24]. La physiopathologie des projections en doigt de gant n'est pas entièrement comprise : elle pourrait être secondaire à des troubles d'hémostase dues au dysfonctionnement endothélial induit par l'AAC et/ou être liées à une nouvelle expansion de l'hématome.

Ce modèle proposant 3 marqueurs radiologiques sur le TDM sans injection pourrait être largement utilisé dans la pratique quotidienne future et guider les soins médicaux telle que la décision d'une procédure chirurgicale.

Ce même travail a été mené parallèlement par une équipe allemande avec publication au mois de mai 2022 (404), utilisant la même méthodologie avec un effectif de 200 patients se présentant aux urgences avec hématome lobaire. Nos conclusions sont similaires avec de bonnes performances diagnostiques des 2 items radiologiques (AUC = 0.74 selon Sembill et al (404)), une valeur prédictive positive forte également mais en revanche une valeur prédictive négative insuffisante. Il s'agit donc ici d'une réelle aide au diagnostic, avec une bonne reproductibilité entre deux études issues de centres différents.

Applicability of the Edinburgh CT criteria for lobar intra-cerebral hemorrhage associated with cerebral amyloid angiopathy

Lou Grangeon ^{1,2#}, Melanie Roussel ^{3#}, Andre Gillibert ⁴, Mikael Verdalle-Cazes⁵, Mickael Dolores ⁵, Ozlem Ozkul-Wermester ¹, Vianney Gilard ⁶, Stephane Derrey ⁶, David Maltête ¹, Emmanuel Gerardin⁵, Luc-Marie Joly ³, David Wallon ^{1,2}, Nicolas Magne⁵

Co-first authors

¹ *Department of Neurology, Rouen University Hospital, 76000, Rouen, France*

² Normandie Univ, UNIROUEN, Inserm U1245, Normandy Center for Genomic and Personalized Medicine, Rouen, France

³ *Emergency Department, Rouen University Hospital, 76000, Rouen, France*

⁴ *Department of Biostatistics, Rouen University Hospital, University of Rouen, 76000 Rouen, France*

⁵ *Department of Radiology, Rouen University Hospital, 76000, Rouen, France*

⁶ *Department of Neurosurgery, Rouen University Hospital, 76000, Rouen, France*

Corresponding Author:

Lou Grangeon, M.D.

Department of Neurology

Rouen University Hospital. 76031 Rouen Cedex, France

Tel.: +(33) 2 32 88 82 94; Fax: + (33) 2 32 88 87 41

lou.grangeon@gmail.com

Author contributions:

LG: study concept, collection, analysis and interpretation of data, drafting of manuscript

MR: collection, analysis and interpretation of data, drafting of manuscript.

AG: statistical analysis and interpretation of data, drafting of manuscript

MD: collection and analysis of data

OOW: drafting and revision of manuscript

GN: drafting and revision of manuscript

VG: drafting and revision of manuscript

SD: drafting and revision of manuscript

DM: drafting and revision of manuscript

LMJ: drafting and revision of manuscript

DW: drafting and revision of manuscript

NM: study concept, analysis and interpretation of data and manuscript revision

ACKNOWLEDGEMENTS: None

SOURCES OF FUNDING: None

CONFLICT OF INTEREST: All authors have no disclosures

Key Words:

Cerebral amyloid angiopathy; CT scan; MRI-based modified Boston criteria; lobar hemorrhage, external validation of Edinburgh criteria

Key points:

- We provided strong external confirmation of the radiological Edinburgh criteria, based on the modified MRI Boston criteria for cerebral amyloid angiopathy diagnosis and without taking into account the APOE genetic status. This model could be widely used in future daily practice and is directly applicable in acute settings
- The two criteria, finger-like projections and subarachnoid extension showed high capability to distinguish CAA from other causes of lobar hemorrhage with an AUC of 0.76
- A new prediction model integrating a third radiologic variable, the cortical involvement of ICH, showed better diagnostic performances with an AUC reaching 0.80

Non standard Abbreviations and Acronyms

APOE: Apolipoprotein E

AUC: Area Under the Curve

CAA: Cerebral Angiopathy Amyloid

CI: Cortex Involvement

CMB: Cerebral Microbleeds

CSS: Cerebral superficial siderosis

ER: Emergency Room

FL: Finger-Like projection

ICH: Intra-cerebral hemorrhage

MRI : Magnetic Resonance Imaging

NCCT scan: Non Contrast Computed tomography

WMH: White Matter Hyperintensities

SE: Subarachnoid Extension

ABSTRACT:

Objective: Based on histopathology, Edinburgh diagnostic criteria were proposed to consider a non-traumatic intra-cerebral lobar hemorrhage (ICH) as related to cerebral amyloid angiopathy (CAA) using the initial CT scan and the APOE genetic status. We aimed to externally validate the Edinburgh prediction model, excluding the APOE genotyping and based on the modified Boston criteria on the MRI for CAA diagnosis

Methods: We included patients admitted for spontaneous lobar ICH in the emergency department between 2016 and 2019 who underwent non-contrast CT scan and MRI. According to the MRI, patients were classified in the CAA group or in the non-CAA group in case of other cause of ICH. Two neuroradiologists, blinded to the final retained diagnosis, rated every item studied in the Edinburgh study on initial CT scan

Results: 102 patients were included, of whom 36 classified in the CAA group, 46 in the non-CAA causes group and 20 of undetermined cause (excluded from the primary analysis). The Edinburgh prediction model, including finger-like projections and subarachnoid extension showed an area under Receiver Operating Characteristic curve (AUC) of 0.760 (95% CI: 0.660 à 0.859) for the diagnosis of CAA. The AUC reached 0.808 (95% CI: 0.714 to 0.901) in a new prediction model integrating a third radiologic variable: the ICH cortical involvement.

Conclusion: Using the Boston MRI criteria as a final assessment, we provided a new external confirmation of the radiological Edinburgh CT criteria, which are directly applicable in acute settings of spontaneous lobar ICH and further proposed an original 3-set model considering finger-like projections, subarachnoid extension, and cortical involvement that may achieve a high discrimination performance.

INTRODUCTION

Cerebral amyloid angiopathy (CAA) is characterized by deposition of beta-amyloid proteins within cortical and leptomeningeal vessel walls. CAA is an important cause of intra-cerebral hemorrhage (ICH), up to 74% in non-traumatic lobar ICH [1,2]. The identification of an underlying CAA is an important question, upon admission to the emergency department (ED) of a patient with spontaneous lobar hematoma and could influence the management and prognosis of ICH [3,4]. Increased risk of rebleeding and higher morbidity and mortality rate have been suggested in case of evacuation of ICH in suspected CAA [5,6]. Nevertheless, indications for surgery of ICH in a precise context of CAA is poorly described in the recent clinical trials on ICH (STICH I et II, MISTIE III) [7,8] and the question of surgery in CAA is still a matter of debate.

Nowadays, in vivo diagnosis is mainly based on brain imaging showing lobar hematomas (ICHs), microbleeds (CMBs) and cortical superficial siderosis (CSS) in blood-sensitive sequences on MRI. These elements are constitutive of the core revised Boston criteria and showed high specificity and sensitivity [9–11]. In the absence of histological evidence for vascular amyloid deposits, CAA is considered probable or possible, according to the hemorrhagic features on the MRI. Nevertheless, MRI is not always available in the emergency setting of ICH and most patients undergo CT scan first. Using an imaging modality that is available worldwide would be optimal, given that 75% of deaths from haemorrhagic stroke now occur in middle and low-income countries [12].

A recent study has proposed diagnostic criteria to consider an ICH as related to CAA compared to other causes, using the initial brain non-contrast CT (NCCT) scan and the Apolipoprotein E (APOE) genetic status [13]. The authors identified as independently associated with CAA (autopsy confirmed) subarachnoid hemorrhage, hemorrhage with finger-like projections and APOE ϵ 4 genotype possession. They indeed included only patients who

died from their ICH and underwent research autopsy. Nevertheless, the APOE genotyping is not available in the acute setting of patients admitted for ICH, while care procedures have to be decided in a very short time. Rodrigues et al assessed the diagnostic test accuracy of a simplified model using CT scans alone and highlighted a 100% specificity of the combination of subarachnoid hemorrhage and finger-like projection. A recent study validated those criteria in 55 Dutch-type hereditary CAA, a rare genetic form of CAA [14] and another one applied them in sporadic CAA [15].

Given the high impact expected using those criteria in routine practice, the primary objective of this study was to perform an external validation of the Edinburgh diagnostic prediction model, precluding the APOE genotyping, in a cohort study using the well-known modified Boston criteria on MRI as a gold standard for the diagnosis of CAA. Secondary objectives included the assessment of the diagnostic accuracy of the rule out and rule in Edinburgh criteria and we looked if a modified prediction model could improve its diagnostic performance.

METHODS:**Study design and participants:**

A monocenter retrospective study was conducted between 2016 and 2019. All consecutive adult patients admitted for lobar ICH in the emergency department who underwent non-contrast CT (NCCT) and contrast CT scan and MRI were assessed. We excluded patients with ICH secondary to obvious non-CAA causes as head trauma, macrovascular or structural causes already identifiable on NCCT scan (n= 212). ICHs of deep or cerebellar topography were also excluded (n=95) See. Flow Chart (Fig.1). We collected demographics, medical history, and ongoing treatment at diagnosis and during follow-up by a careful review of the medical charts.

Ethics board approval was obtained from the Local Ethical Comity for non-interventional research (N° 2020-26).

Radiological interpretation:

Two neuroradiologists independently performed a blinded review of every NCCT scan available on the same Advantage Windows 4.6 (GE Healthcare, USA) console. They strictly assessed the same ICH-related items than Rodrigues et al [13]: side and location of ICH, intra ventricular extension, any associated subarachnoid hemorrhage (adjacent or not to the hematoma), subdural extension, extension in deep territories, finger-like projection (elongated extensions arising from the hematoma, regardless of whether they extended to the cortex or not), midline shift and cortical involvement. They also rated, as indicated by Rodrigues et al, the presence of other vascular lesions, white matter hyper intensities (WMH) and cortical atrophy. According to Rodrigues et al, after precluding the APOE genotyping, we used the two predictor variables highlighted in their study: Associated subarachnoid hemorrhage and finger-like projections. We used the initial ratings done by the first neuroradiologist for

primary analyses but the inter-rater agreement is available for each item in Supplemental Table S1 and showed similar kappa coefficient with Rodrigues et al.

Final diagnosis:

The final ICH diagnoses were established by both neuroradiologist and neurologist after careful review of medical charts, follow-up data and MRI analysis, independently from CT scan analysis. For each patient, the most recent MRI was analyzed in case of long-term follow-up with several MRIs available. MRI imaging protocols are detailed in table S2. Patients were classified in the CAA group if they fulfilled the modified Boston criteria for probable CAA on the follow-up MRI without any other cause identified over the follow-up duration. Patients were classified “non-CAA causes” if a clear underlying mechanism of ICH was identified, without any lobar microbleed or cortical superficial siderosis on the follow-up MRI. The remaining patients were gathered in the group “Undetermined” if they fulfilled the modified Boston criteria for possible CAA only i.e the ICH only with no other hemorrhagic lesion on follow-up MRI or in case of too short follow-up duration to conclude and were excluded from the primary analysis.

Statistical analyses:

The Edinburgh prediction model without APOE ϵ 4 component was retrieved from Rodrigues et al [13] supplementary materials: The risk formula was $-1.24 + 1.71 \times$ (subarachnoid hemorrhage) $+ 2.89 \times$ (finger-like projections) yielding the logit of the predicted probability of CAA. The discrimination of scores was estimated by area under receiver operating curves (AUC) for CAA diagnosis while calibration was assessed in predicted-observed probabilities plots. The 95% confidence intervals of proportions were estimated by the Clopper-Pearson method. The calibration flaw was compared to zero by a

likelihood ratio test comparing two nested logistic regressions. Proportions were compared by Fisher's exact tests and means were compared by Student's t tests. We used the linear-weighted Cohen's κ coefficient in order to assess the inter-rater agreement of CT features. No multiple testing procedures were applied. The statistical significance threshold was set at 5%. All analyses were conducted with R statistical software (version 3.6.2).

RESULTS:

ICH patients

We included 102 patients who underwent at least one brain MRI after their NCCT scan, with a mean time from CT to last MRI of 14.4 months +/- 25.3. Two patients underwent MRI before their ICH: One with signs of CAA that already met the modified Boston criteria for probable CAA and another who presented aneurysmal ICH with no signs of CAA on anterior MRI. 39 patients were excluded because they did not undergo MRI (Fig.1). Patients without MRI were older and had much larger hematomas (mean (SD): 70.7 (57.1) vs 28.3 (26.6) cc) and more frequent intra-ventricular hemorrhage (74.4% vs 31.4%) and subarachnoid extension (92.3% vs 47.1%). (Table S3)

Out of the 102 patients included, 36 (35.3%) met the Boston criteria for probable CAA and were consequently classified in the CAA group, 20 (19.6%) were classified in the “Undetermined” group and 46 (45.1%) in the well identified “Non-CAA causes” group. Among those 46 non-CAA causes, ICHs were due to arterio-venous malformation in 5 patients and others vascular causes in 5 patients (including cavernomatosis, dural fistula and cerebral aneurysms), intra cerebral tumor in 9 patients, auto immune or infectious vasculitis or rupture of mycotic aneurysm in 7 patients, chronic hypertension in 6 patients, hemorrhagic transformation of ischemic stroke in 3 patients, reversible cerebral vasoconstriction syndrome in two patients, venous thrombosis in two patients and finally, medication and systemic disease coagulopathy in 7 patients.

Among the 20 patients of the “undetermined” group, four patients died quickly after their ICH and three were quickly lost to follow-up, precluding a final diagnosis as defined before. Of the 13 remaining patients, no final diagnosis was retained after a median (IQR) follow-up of 9.4 (5.3 to 13.5) months. They were mostly young patients without any personal or familial history and underwent an exhaustive etiologic assessment of their ICH including genetic

screening, follow-up MRIs, and cerebral arteriography. Given the high heterogeneity of the “Undetermined” group and the fact that it may contain both CAA and non-CAA patients, they were excluded from all statistical analyses but sensitivity analyses

Baseline characteristics are presented on table 1. The CAA patients were older (mean (SD) 73.8 (10.4) versus 62.0 (14.5) years old, $p < 0.0001$) than non-CAA group. None of the non-CAA patients had a known history of previous ICH. The death rate in hospital after ICH did not significantly differ between groups (22.2% vs 13.0%, $p = 0.38$).

Comparison of our cohort to that of Rodrigues et al

When comparing our cohort with the primary study[13], we included younger patients (median age 69 vs 82 years old) with less frequent hypertension before ICH (53% vs 68%) and less frequent use of antiplatelet treatment (21% vs 53%) than Rodrigues et al [13] On their CT, they had a smaller ICH (median volume of 18 vs 63 mL), less frequent subdural haemorrhage (7% vs 19%), SAH (46% vs 69%) and less frequent intraventricular extension (26% vs 50%). Regarding inter-rater agreement obtained from radiological assessment, we found similar inter-observer Cohen’s Kappa coefficient as Rodrigues et al[13] (Table S1). Several items showed low (< 0.40) Kappa coefficient such as the presence of blood/fluid level or the irregular border of ICH but most of them showed moderate inter-rater agreement, including the subarachnoid extension (Kappa coefficient 0.57) and the finger-like projections items (Kappa coefficient 0.45).

Radiological characteristics of ICH according to the final retained diagnosis (table 2)

Comparing to the non-CAA group, ICH associated with probable CAA showed significantly more subarachnoid extensions (66.7% versus 30.4%, $p = 0.002$), finger-like projections (38.9% versus 2.2%, $p < 0.0001$) and reached cortex more frequently (77.8% versus 23.9%,

$p < 0.0001$). Volumes of ICH and topography were similar. Of note, the “Finger-like projections” feature was highly specific, with only one non-CAA patient, suffering from vasculitis, who presented with such projections on initial NCCT scan. The “Strictly lobar” feature appeared to be neither sensitive nor specific, implying respectively 58.3% of CAA related-ICH and 56.5% of ICH due to non-CAA causes. Finally, CAA patients displayed marked WMH score and cortical atrophy scores compared to non-CAA patients.

Primary Analysis: External validation of the radiologic Edinburgh prediction model

The ROC curve of Rodrigues et al two-items prediction model, excluding APOE genotyping, is presented in figure 2, panel A with AUC of 0.760 (95%CI: 0.660 to 0.859). The observed probabilities were not significantly different from the predicted risk ($p=0.47$, panel B); therefore, there was no evidence of a calibration flaw. In the primary analysis, patients of the undetermined group ($n=20$) were excluded. In a second step, we performed sensitivity analyses in which they were included in the non-CAA group then in the CAA group (see bellow).

Secondary Analysis: Diagnostic accuracy of the rule-in/rule-out Edinburgh criteria

Among ICH due to non-CAA causes, 32 (70%) displayed none of those radiologic features (Specificity of the Edinburgh “rule-out” criterion) and only one (2%) showed both whereas 12 (33%) of CAA related-ICH fulfilled both criteria (Sensitivity of Edinburgh “rule-in” criterion, Table 3). The predictive negative value of the “rule-out” criterion was 76% (95% CI: 61% to 88%) while the predictive positive value of the “rule-in” criterion was 92% (95% CI: 64% to 100%). Sensitivity, specificity, positive and negative predictive values of each radiologic Edinburgh criteria items are presented in Table 4.

Sensitivity Analyses: imputation of the undetermined CAA status

In a second step, we performed sensitivity analyses in which they were included in the non-CAA group then in the CAA group. The area under ROC curve was estimated at 0.713 (95% CI: 0.612 to 0.814) and there was a significant calibration flaw ($p=0.02$) with an overestimation of the probability of CAA for the four predicted probabilities of the Rodrigues et al prediction model (Figure S1 in the Online Supplemental Data). When moving patients of the undetermined group in the CAA group, the area under ROC curve was estimated 0.722 (95% CI: 0.634 to 0.810) with no significant calibration flaw ($p=0.19$). The positive predictive value of finger-like projections and subarachnoid hemorrhage together (“rule in” criteria) was 12/17 (70.6%) when classifying them with non-CAA patients and 16/17 (94.1%) when classifying them with CAA patients

We then suggested in a post hoc analysis an improvement of the diagnostic prediction model:

Post hoc analysis: improvement of the diagnostic prediction model

Trying to enhance this prediction model based only on ICH radiologic features, we first built a model integrating all significant criteria at threshold $p < 0.10$ in Rodrigues et al (i.e subarachnoid hemorrhage, finger-like projections but also cortical involvement and strictly lobar ICH) with all items having the same weight in order to avoid over fitting; predicted probabilities were obtained from a logistic regression, assuming a logit-linear effect of the score from 0 to 4 with a predicted probability of $1/(1+\exp(2.14-1.07\times\text{score}))$. The AUC did not improve much compared to the previous prediction model (AUC = 0.793, 95% CI: 0.694 to 0.892) (Figure 3, panel A,B). The combination of all 4 items had 100% (4/4) positive predictive value and the combination of 3 or more items had 79% (22/28) positive predictive value (Table 5). Three CAA-related ICH did not fulfill any of those 4 criteria.

Finally, given the poor sensitivity and specificity of the “Strictly lobar ICH” feature in our

cohort, we performed a post-hoc analysis with a 3 items logistic prediction model: Subarachnoid hemorrhage, finger-like projections and cortical involvement with coefficients estimated by a logistic regression on our sample. The second model was developed as the prediction of a logistic regression fitted by the four variables of the second model minus the “strictly lobar ICH” variable. The training and validation sets were the same (complete sample) for this model, leading to overfitting; thanks to Monte Carlo simulations, the overfitting bias of the area under ROC curve was estimated and subtracted from the point estimate and 95% confidence interval bounds. After correction of the overfitting, the ROC curve was estimated with an AUC of 0.808 (95% CI: 0.714 to 0.901) (Figure 3, Panel C,D). Only one non-CAA patient fulfilled all criteria whereas 35 (76.1%) of them had a predicted probability less than 25% (Table 6).

DISCUSSION:

The primary goal of this study was to assess the performance of the prediction model previously developed by Rodrigues et al for diagnosis of lobar CAA-related ICH following a more pragmatic approach. Herein, based on our data, finger-like projections and subarachnoid extension on initial NCCT scan seem to have a good capacity to distinguish CAA from other causes of ICH with an AUC 0.76 (95%CI: 0.660 à 0.859) and high rule-in specificity. We assessed final CAA diagnosis based on the well-known modified Boston criteria [9] which are widely applicable in everyday clinical practice compared to histopathological confirmation. Indeed, they showed good sensitivity and specificity over the last decade [16] although based on cerebral MRI scans. We focused on radiological features only, without considering APOE genotype, the third element of the Edinburgh criteria, which is typically not available in acute setting for ICH patients. The early identification of underlying CAA both influences clinical and surgical management and guides prognosis in ICH patients. Those simplified Edinburgh CT criteria without APOE genotyping were also proposed in a recent monocenter study [15] gathering 210 patients with lobar ICH highlighting the need for criteria that are more readily available to clinicians in the care setting. Nevertheless, the interrater agreement of the CT features reported in previous studies [13] [15] but also in our study is moderate. Therefore, given the profound expected clinical implications of those criteria in routine practice when MRI is not available (due to patient clinical conditions or machine availability), investigating their diagnostic accuracy in different centers with distinct cohorts supports their validation and use in clinical care. We here categorized the patients according to their final diagnosis retained after a long-term follow-up, including radiological and clinical data in order to build the ROC curves based on high reliability and took into account the undetermined and possible CAA in sensitivity analyses. Diagnosis discrimination for validation of MRI-based diagnosis of probable CAA (AUC 0.74, 95% CI: 0.67-0.81)[15] was similar in our study (AUC 0.76,

95%CI: 0.66- 0.86), in different settings, supporting the wide clinical use of those simplified Edinburgh CT criteria.

Given the observed probability of CAA of 24% when no radiological criteria are present, we cannot completely rule out CAA diagnosis in the absence of these criteria. As underlined by van Etten et al in Dutch-type hereditary CAA[17], radiologic Edinburgh criteria may be more relevant in case of larger hematomas and false negative cases may occur with smaller ICH. Contrary to the rule-out criteria, the presence of the combination of subarachnoid extension and finger-like projections with positive predictive value of 92% [64-100%] may allow clinician to rule in probable CAA, as also suggested by Sembill et al[15] and Schwarz et al[18]. Compared to the development study [13] we included younger patients with less pre-ICH hypertension, smaller ICH volume, and less frequent IVH, SAH or subdural hemorrhage, reflecting the feasibility of performing MRI in this patient group, with less severe neurologic status. Interestingly, this current study showed a good external validation in young patients with less severe ICH and better neurologic status, who consequently are more prone to benefit from improved treatment options and consequently from faster diagnosis identification.

In our study, probable underlying CAA yielded an important frequency of 35.2% of lobar ICH, regardless of the age of the patient, which is consistent with literature (34%)[19][20]. This great frequency of CAA in ICH highlights the importance of their timely identification. Following our results, the presence of combined subarachnoid extension and finger-like projections on CT scan may alert the neurosurgeon and impact on his decision of surgery. Small series reported a risk of postoperative ICH in CAA patients [21][22][23], suggesting that the surgical decision might depend on the radiological diagnosis of CAA. The finger-like feature alone showed high specificity in our study with only one non-CAA patient out of 46 fulfilling this criterion. Nevertheless, we cannot completely state on its discrimination performance alone, as only two CAA patients presented with finger-like projections without

subarachnoid extension in our study and none in Rodrigues et al.

To increase the efficiency of the modified criteria, we tried in a second-step a new prediction model using 4 radiological features. This model did not improve much discrimination performance with AUC of 0.79. This may be partially explained by the low diagnostic test accuracy for strictly lobar item in our study. Moreover, this item previously showed a low inter-observer Cohen's Kappa coefficient (0.42 95% CI [0.28-0.56])[13]. We here confirmed that this feature is not relevant in a new prediction model. We finally identified a new 3 variables model with subarachnoid extension, finger-like protrusions and cortical involvement that reached better discrimination performance with AUC of 0.81. Further studies are needed to externally confirm the performances of this model. Nevertheless, this model has several advantages, by its acceptable reproducibility and reliance on variables that can easily be measured. The inter-observer agreement for the cortex involvement was previously described as high (0.80)[13] and this model is easily applicable and usable for radiologists, neurosurgeons and neurologists.

Extension to subarachnoid spaces and cortex involvement in CAA-related ICH may be in relation with the major deposition of beta amyloid in the media and adventice of the cortical and leptomeningeal vessels, leading to a rupture into the subarachnoid space and superficial parenchymal location in CAA patients[24]. Similarly, presence of subarachnoid hemorrhage on MRI was recently identified as frequently associated with CAA-related ICH compared to ICH of other causes [25]. In a recent meta-analysis, subarachnoid extension was a very common feature of CAA-related ICH [26] but cortical location was only studied in three articles [27]·[28]·[29].

Contrarily to subarachnoid extension and cortex involvement, the pathophysiology of finger-like projections is not fully understood. It may reflect deficiencies in haemostasis due to CAA-induced endothelial dysfunction and may be related to further hematoma expansion

[30], [26], [31]. Such hematoma expansion has been recently correlated with severity leukoaraiosis in cerebral small vessel disease [32]. CAA-related ICHs were indeed associated with increased leukoaraiosis compared to other ICHs in our study.

Given the issues related to MRI access in many ER or feasibility due to potential critical condition of ICH patients, the early identification of the cause of ICH by CT scan paves the way for better early management of patients. This was actually replicated recently for identification of arterio-venous malformation with excellent performance [33]. Setting an alternative to MRI, those CT-scan based criteria allow a step-by-step medical care upon patient admission and reflect ICH clinical severity [34] but do not prevent from performing MRI for diagnosis confirmation, especially in the absence of finger-like projections or subarachnoid extension on CT.

This study has some limitations, such as the small sample size. We excluded patients who died from their ICH before MRI performance, leading to a lower early mortality rate (17.1%) than the literature (approximately 40%) [35], [19] and explaining why the ICH volume was much lower for patients with MRI than patients without MRI. As the 3-months fatality rate is dependent on the etiology of the ICH [20], this may lead to a differential selection bias but nevertheless represents a relative small number of patients (n=39). The lack of histopathological CAA confirmation precludes the exclusion of mild CAA lesions in ICH of undetermined or non-CAA causes. Nevertheless, they did not meet criteria for probable CAA on MRI. Given the high sensitivity of the modified Boston criteria, the probability of such CAA lesions without any hemorrhagic signs on MRI seems limited. To limit this misclassification bias, patients of the “undetermined” group were excluded of the primary analysis. Finally, the Undetermined group without final diagnosis for ICH might reduce effectiveness of the proposed criteria due to a lack of possible categorization, but such a group is inevitable and represents the real-world setting.

In conclusion, using the modified Boston MRI criteria, this study provides a new external confirmation of the radiological Edinburgh CT criteria, which are directly applicable in acute settings of spontaneous lobar ICH. We further suggested a 3-set model with finger-like projections, subarachnoid extension and cortical involvement, which may achieve a higher discrimination performance but requires an external validation. Further prospective studies could measure their impact on surgical choices and patient long-term outcomes.

CONFLICT OF INTEREST: All authors have no disclosures

REFERENCES:

- [1] Biffi A, Greenberg SM (2011) Cerebral Amyloid Angiopathy: A Systematic Review. *J Clin Neurol* **7**, 1.
- [2] Arvanitakis Z, Leurgans SE, Wang Z, Wilson RS, Bennett DA, Schneider JA (2011) Cerebral amyloid angiopathy pathology and cognitive domains in older persons. *Ann Neurol* **69**, 320–327.
- [3] Haley KE, Greenberg SM, Gurol ME (2013) Cerebral Microbleeds and Macrobleeds: Should They Influence Our Recommendations for Antithrombotic Therapies? *Curr Cardiol Rep* **15**, 425.
- [4] Charidimou A, Gang Q, Werring DJ (2012) Sporadic cerebral amyloid angiopathy revisited: recent insights into pathophysiology and clinical spectrum. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **83**, 124–137.
- [5] Mehndiratta P, Manjila S, Ostergard T, Eisele S, Cohen ML, Sila C, Selman WR (2012) Cerebral amyloid angiopathy–associated intracerebral hemorrhage: pathology and management. *Neurosurg Focus* **32**, E7.
- [6] Bardutzky J, Hieber M, Roelz R, Meckel S, Lambeck J, Niesen W-D (2020) Cerebral amyloid angiopathy-related intracerebral hemorrhage: Feasibility and safety of bedside catheter hematoma evacuation with urokinase. *Clin Neurol Neurosurg* **190**, 105655.
- [7] Mendelow AD, Gregson BA, Rowan EN, Murray GD, Gholkar A, Mitchell PM (2013) Early surgery versus initial conservative treatment in patients with spontaneous supratentorial lobar intracerebral haematomas (STICH II): a randomised trial. *The Lancet* **382**, 397–408.
- [8] Morgenstern LB, Frankowski RF, Shedden P, Pasteur W, Grotta JC (1998) Surgical treatment for intracerebral hemorrhage (STICH): A single-center, randomized clinical trial. *Neurology* **51**, 1359–1363.
- [9] Linn J, Halpin A, Demaerel P, Ruhland J, Giese AD, Dichgans M, van Buchem MA, Bruckmann H, Greenberg SM (2010) Prevalence of superficial siderosis in patients with cerebral amyloid angiopathy. *Neurology* **74**, 1346–1350.
- [10] Knudsen KA, Rosand J, Karluk D, Greenberg SM (2001) Clinical diagnosis of cerebral amyloid angiopathy: Validation of the Boston Criteria. *Neurology* **56**, 537–539.
- [11] Charidimou A, Jaunmuktane Z, Baron J-C, Burnell M, Varlet P, Peeters A, Xuereb J, Jager R, Brandner S, Werring DJ (2014) White matter perivascular spaces: An MRI marker in pathology-proven cerebral amyloid angiopathy? *Neurology* **82**, 57–62.
- [12] Feigin VL, Lawes CM, Bennett DA, Barker-Collo SL, Parag V (2009) Worldwide stroke incidence and early case fatality reported in 56 population-based studies: a systematic review. *Lancet Neurol* **8**, 355–369.
- [13] Rodrigues MA, Samarasekera N, Lerpiniere C, Humphreys C, McCarron MO, White PM, Nicoll JAR, Sudlow CLM, Cordonnier C, Wardlaw JM, Smith C, Al-Shahi Salman R (2018) The Edinburgh CT and genetic diagnostic criteria for lobar intracerebral haemorrhage associated with cerebral amyloid angiopathy: model development and diagnostic test accuracy study. *Lancet Neurol* **17**, 232–240.
- [14] van Etten ES, Kaushik K, van Zwet EW, Voigt S, van Walderveen MAA, van Buchem MA, Terwindt GM, Wermer MJH (2020) Sensitivity of the Edinburgh Criteria for Lobar Intracerebral Hemorrhage in Hereditary Cerebral Amyloid Angiopathy. *Stroke* **51**, 3608–3612.
- [15] Sembill JA, Knott M, Xu M, Roeder SS, Hagen M, Sprügel MI, Mrochen A, Borutta M, Hoelter P, Engelhorn T, Rothhammer V, Macha K, Kuramatsu JB (2022) Simplified Edinburgh CT Criteria for Identification of Lobar Intracerebral Hemorrhage Associated With Cerebral Amyloid Angiopathy. *Neurology* **98**, e1997–e2004.
- [16] Caetano A, Ladeira F, Barbosa R, Calado S, Viana-Baptista M (2018) Cerebral

amyloid angiopathy - The modified Boston criteria in clinical practice. *J Neurol Sci* **384**, 55–57.

- [17] van Etten ES, Kaushik K, van Zwet EW, Voigt S, van Walderveen MAA, van Buchem MA, Terwindt GM, Wermer MJH (2020) Sensitivity of the Edinburgh Criteria for Lobar Intracerebral Hemorrhage in Hereditary Cerebral Amyloid Angiopathy. *Stroke* **51**, 3608–3612.
- [18] Schwarz G, Banerjee G, Hostettler IC, Ambler G, Seiffge DJ, Ozkan H, Browning S, Simister R, Wilson D, Cohen H, Yousry T, Salman RA-S, Lip GYH, Brown MM, Muir KW, Houlden H, Jäger R, Werring DJ (2022) MRI and CT imaging biomarkers of cerebral amyloid angiopathy in lobar intracerebral hemorrhage. *Int J Stroke Off J Int Stroke Soc* 17474930211062478.
- [19] Fakan B, Reisz Z, Zadori D, Vecsei L, Klivenyi P, Szalardy L (2020) Predictors of localization, outcome, and etiology of spontaneous intracerebral hemorrhages: focus on cerebral amyloid angiopathy. *J Neural Transm*.
- [20] Meretoja A, Strbian D, Putaala J, Curtze S, Haapaniemi E, Mustanoja S, Sairanen T, Satopää J, Silvennoinen H, Niemelä M, Kaste M, Tatlisumak T (2012) SMASH-U: A Proposal for Etiologic Classification of Intracerebral Hemorrhage. *Stroke* **43**, 2592–2597.
- [21] Mehndiratta P, Manjila S, Ostergard T, Eisele S, Cohen ML, Sila C, Selman WR (2012) Cerebral amyloid angiopathy-associated intracerebral hemorrhage: pathology and management. *Neurosurg Focus* **32**, E7.
- [22] Lange M, Feiden W (1991) Amyloid angiopathy--a rare cause of intracerebral hemorrhage. *Neurosurg Rev* **14**, 297–301.
- [23] Zhang Y, Wang X, Schultz C, Lanzino G, Rabinstein AA (2012) Postoperative outcome of cerebral amyloid angiopathy-related lobar intracerebral hemorrhage: case series and systematic review. *Neurosurgery* **70**, 125–130; discussion 130.
- [24] Greenberg SM, Bacskai BJ, Hernandez-Guillamon M, Pruzin J, Sperling R, van Veluw SJ (2019) Cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer disease—one peptide, two pathways. *Nat Rev Neurol* 1–13.
- [25] Viguier A, Raposo N, Patsoura S, Calviere L, Albucher JF, Ruidavets JB, Chollet F, Cognard C, Olivot JM, Bonneville F (2019) Subarachnoid and Subdural Hemorrhages in Lobar Intracerebral Hemorrhage Associated With Cerebral Amyloid Angiopathy. *Stroke* **50**, 1567–1569.
- [26] Samarasekera N, Rodrigues MA, Toh PS, Salman RA-S (2017) Imaging features of intracerebral hemorrhage with cerebral amyloid angiopathy: Systematic review and meta-analysis. *PLOS ONE* **12**, e0180923.
- [27] Andoh Y, Wakai S, Nagai M, Honma K, Fujihara S (1989) [Lobar intracerebral hemorrhage secondary to cerebral amyloid angiopathy: a clinicopathologic study of three operated cases]. *No To Shinkei* **41**, 1217–1223.
- [28] Miller JH, Wardlaw JM, Lammie GA (1999) Intracerebral haemorrhage and cerebral amyloid angiopathy: CT features with pathological correlation. *Clin Radiol* **54**, 422–429.
- [29] Wagle WA, Smith TW, Weiner M (1984) Intracerebral hemorrhage caused by cerebral amyloid angiopathy: radiographic-pathologic correlation. *AJNR Am J Neuroradiol* **5**, 171–176.
- [30] Renard D, Parvu T, Thouvenot E (2019) Finger-Like Projections in Lobar Haemorrhage on Early Magnetic Resonance Imaging Is Associated with Probable Cerebral Amyloid Angiopathy. *Cerebrovasc Dis Basel Switz* **47**, 121–126.
- [31] Lang EW, Ren Ya Z, Preul C, Hugo HH, Hempelmann RG, Buhl R, Barth H, Klinge H, Mehdorn HM (2001) Stroke pattern interpretation: the variability of hypertensive versus amyloid angiopathy hemorrhage. *Cerebrovasc Dis Basel Switz* **12**, 121–130.
- [32] Uniken Venema SM, Marini S, Brouwers HB, Morotti A, Woo D, Anderson CD, Rosand J (2020) Associations of Radiographic Cerebral Small Vessel Disease with Acute

Intracerebral Hemorrhage Volume, Hematoma Expansion, and Intraventricular Hemorrhage. *Neurocrit Care* **32**, 383–391.

[33] Zhang Y, Zhang B, Liang F, Liang S, Zhang Y, Yan P, Ma C, Liu A, Guo F, Jiang C (2019) Radiomics features on non-contrast-enhanced CT scan can precisely classify AVM-related hematomas from other spontaneous intraparenchymal hematoma types. *Eur Radiol* **29**, 2157–2165.

[34] Ornello R, Colangeli E, Tommasino E, Tiseo C, Perrotta G, Scarpato C, Gentile M, Mammarella L, Marini C, Pistoia F, Splendiani A, Sacco S (2021) Clinical usefulness of Edinburgh CT criteria in patients with lobar intracerebral hemorrhage. *Eur Stroke J* **6**, 36–43.

[35] Feigin VL, Lawes CMM, Bennett DA, Barker-Collo SL, Parag V (2009) Worldwide stroke incidence and early case fatality reported in 56 population-based studies: a systematic review. *Lancet Neurol* **8**, 355–369.

TABLES AND FIGURE LEGENDS:**Table 1.** Baseline characteristics of patients, according to the final retained diagnosis of ICH

	CAA group (n=36)	Non-CAA causes (n=46)	P value
Sex, male, n (%)	16 (44.4%)	25 (54.3%)	0.50
Age at ICH (y), mean \pm SD	73.8 \pm 10.4	62.0 \pm 14.5	<0.0001
High blood pressure, n (%)*	19 (52.8%)	24 (53.3%)	>0.99
History of ICH, n (%)*	9 (25%)	0	0.0007
Antiplatelet use, n (%)*	8 (22.2%)	9 (20%)	>0.99
Anticoagulation use, n (%)*	6 (16.7%)	8 (17.8%)	>0.99
Cognitive decline before ICH, n (%)*	8 (22.2%)	7 (15.6%)	0.63
Follow-up duration median (IQR), months	5.4 (0.2 ; 13.4)	8.4 (0.2 ; 23.3)	0.20
Decease due to the ICH, n (%)	8 (22.2%)	6 (13.0%)	0.38
New ICH during follow-up, n (event/year/patient)	10 (0.24 evts/y/patient)	3 (0.09 evts/y/patient)	0.10**
Progressive cognitive decline during follow-up, n (event/year/patient)	15 (0.36 evts/y/patient)	6 (0.18 evts/y/patient)	0.16**

* One missing datum in the non-CAA causes group (medical record not found) was excluded from this description.

** P-value computed in a Poisson model with log(duration) of follow-up as offset

CAA and Non-CAA groups were compared by Fisher's exact test for proportions, Student's t test for means, Mann-Whitney test for medians and Poisson regressions for incidences. ICH: Intra cerebral hemorrhage; CAA: Cerebral Amyloid Angiopathy; y: years old; SD: standard deviation, IQR: inter-quartile range

Table 2. Radiological characteristics of ICHs on initial NCCT scan in the different groups

	CAA group (n=36)	Non-CAA causes (n=46)	P value
Time from CT to last MRI (days), mean +/- SD	214.4 +/-365.0	136.9 +/-243.9	0.16
Time from symptoms to CT (hours), mean +/- SD	3.13 +/- 8.46	3.34 +/- 9.02	0.53
Multiples sites of ICH, n(%)	3 (8.3%)	5 (10.9%)	>0.99
Topography of main ICH, n			0.65
- Occipital	2 (5.9%)	5 (12.5%)	
- Temporal	6 (17.6%)	9 (22.5%)	
- Parietal	13 (38.2%)	11 (27.5%)	
- Frontal	13 (38.2%)	15 (37.5%)	
Strictly lobar ICH, n(%)	21 (58.3%)	26 (56.5%)	>0.99
Left side of ICH, n(%)	16 (44.4%)	24 (52.2%)	0.64
Intraventricular Hemorrhage, n(%)	12 (33.3%)	9 (19.6%)	0.25
Subarachnoid extension, n(%)	24 (66.7%)	14 (30.4%)	0.002
- Adjacent to the hematoma	23	12	
- Distant from the hematoma	1	2	
Subdural extension, n(%)	4 (11.1%)	2 (4.3%)	0.46
Midline Shift, n(%)	8 (22.2%)	20 (43.5%)	0.07
Presence of blood/fluid level, n(%)	5 (13.9%)	3 (6.5%)	0.46
Irregular border of ICH, n(%)	25 (69.4%)	29 (63.0%)	0.71
Finger-like projections, n(%)	14 (38.9%)	1 (2.2%)	<0.0001
Cortex involvement, n(%)	28 (77.8%)	11 (23.9%)	<0.0001
Variable density within ICH, n(%)	15 (41.7%)	27 (58.7%)	0.19
Dilute appearance of ICH, n(%)	6 (16.7%)	9 (19.6%)	0.97
Volume of ICH (cm ³), mean +/- SD	26.8 +/- 28.8	26.5 +/- 25.9	0.96
Associated vascular lesions, n(%)	17 (47.2%)	17 (37.0%)	0.48
Anterior WMH, mean +/- SD	0.69 +/- 0.67	0.37 +/- 0.57	0.02
Posterior WMH, mean +/- SD	0.97 +/- 0.70	0.46 +/- 0.65	0.0009
Deep Atrophy, mean +/- SD	0.86 +/- 0.54	0.45 +/- 0.59	0.002
Cortical Atrophy, mean +/- SD	0.92 +/- 0.37	0.70 +/- 0.51	0.03

ICH: Intra cerebral hemorrhage; NCCT scan: Non Contrast Computed Tomography; MRI:

Magnetic Resonance Imaging; WMH: White Matter Hyperintensities. SD: Standard Deviation. IQR: Inter-quartile range.

Table 3. Dispersion of patients fulfilling the radiologic Edinburgh criteria in the different groups and observed probabilities of CAA diagnosis.

Radiologic Edinburgh criteria fulfilled	CAA group, n (%)	Non-CAA causes, n (%)	Predicted probability (original model) ¹²¹³	Observed probability % [CI95%]
None	10 (28%)	32 (70%)	22%	24% [12%-39%]
SE	12 (33%)	13 (28%)	62%	48% [28%-69%]
FL	2 (6%)	0 (0%)	84%	100% [16%-100%]
FL+SE	12 (33%)	1 (2%)	97%	92% [64%-100%]

CAA : Cerebral Amyloid Angiopathy ; SE: Subarachnoid extension ; FL : Finger-like projection

Table 4. Sensitivity, specificity, positive and negative predictive values at each possible threshold of the Edinburgh prediction model.

Predicted probability threshold (Edinburgh criteria fulfilled)	Sensitivity % [CI95%]	Specificity % [CI95%]	Positive predictive value % [CI95%]	Negative predictive value % [CI95%]
≥ 22% (None)	100%	0%	44% [33-55%]	N/A
≥ 62% (SE)	72% [55-86%]	70% [54-82%]	65% [48-79%]	24% [12-39%]
≥ 84% (FL)	39% [23-57%]	98% [88-100%]	93% [68-100%]	33% [22-45%]
= 97% (FL+SE)	33% [19-51%]	98% [88-100%]	92% [64-100%]	35% [24-47%]

SE: subarachnoid extension ; FL : finger like projection

Table 5. Performance of a new prediction model (first post hoc model), at all possible thresholds, from 0 to 4, integrating all NCCT scan items associated with CAA with a P-value below 0.10 in Rodrigues et al article (subarachnoid hemorrhage, finger-like projections, cortical involvement and strictly lobar ICH).

Score threshold	CAA (%)	Non-CAA causes (%)	Sensitivity % [95% CI]	Specificity % [95% CI]	Positive predictive value % [95% CI]	Negative predictive value % [95% CI]
≥0	3 (8%)	12 (26%)	100%	0%	44% [33-55%]	0 / 0
≥1	5 (14%)	22 (48%)	92% [78-98%]	26% [14-41%]	49% [37-62%]	20% [4-48%]
≥2	6 (17%)	6 (13%)	78% [61-90%]	74% [59-86%]	70% [53-83%]	19% [9-34%]
≥3	18 (50%)	6 (13%)	61% [43-77%]	87% [74-95%]	79% [59-92%]	26% [15-40%]
=4	4 (11%)	0 (0%)	11% [3-26%]	100% [92-100%]	100% [40-100%]	41% [30-53%]

The new formula was $1 \times (\text{finger like projections}) + 1 \times (\text{subarachnoid extension}) + 1 \times (\text{Cortex involvement}) + 1 \times (\text{Strictly lobar})$ with a predicted probability equal to

$$1/(1+\exp(2.14-1.07\times\text{score}))$$

NCCT scan: Non Contrast Computed Tomography; CAA: Cerebral Amyloid Angiopathy;
ICH: Intra-cerebral hemorrhage

Table 6. Diagnostic performance of new logistic regression model (second post hoc model), integrating subarachnoid hemorrhage, finger-like projections and cortical involvement

Predicted probability threshold (criteria)	CAA (%)	Non-CAA causes (%)	Sensitivity % [IC95%]	Specificity % [IC95%]	Positive predictive value % [IC95%]	Negative predictive value % [IC95%]
≥ 17% (None)	6 (17%)	28 (62%)	100%	0%	44% [33-55%]	0 / 0
≥ 23% (SE)	2 (6%)	7 (16%)	83% [67-94%]	61% [45-75%]	62% [47-76%]	18% [7-35%]
≥ 53% (CI)	4 (11%)	4 (9%)	78% [61-90%]	76% [61-87%]	72% [55-85%]	19% [8-33%]
≥ 61% (SE)	10(28%)	5 (11%)	67% [49-81%]	85% [71-94%]	77% [59-90%]	24% [13-37%]
≥ 91% (FL+CI)	2 (6%)	0 (0%)	39% [23-57%]	98% [88-100%]	93% [68-100%]	33% [22-45%]
= 94% (FL+SE+CI)	12(33%)	1 (2%)	33% [19-51%]	98% [88-100%]	92% [64-100%]	35% [24-47%]

The new formula was $-1.55+2.24\times(\text{finger like projections})+ 0.34\times(\text{subarachnoid extension})+1.67\times(\text{Cortex involvement})$ with a predicted probability equal to $1/(1+\exp(-\text{score}))$
CAA : Cerebral Amyloid Angiopathy ; SE: Subarachnoid extension ; CI: Cortex involvement ; FL : Finger-like projection

Figure 1. Flow diagram showing included and excluded patients throughout the study

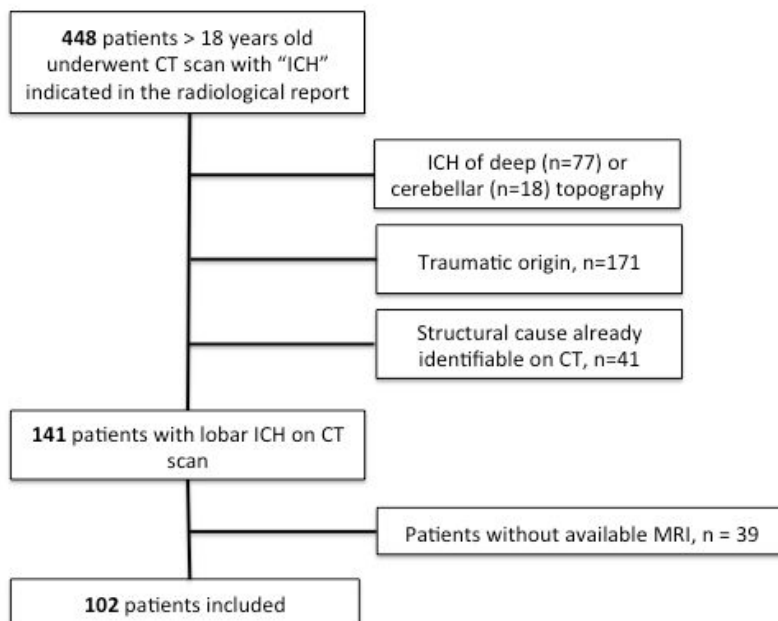
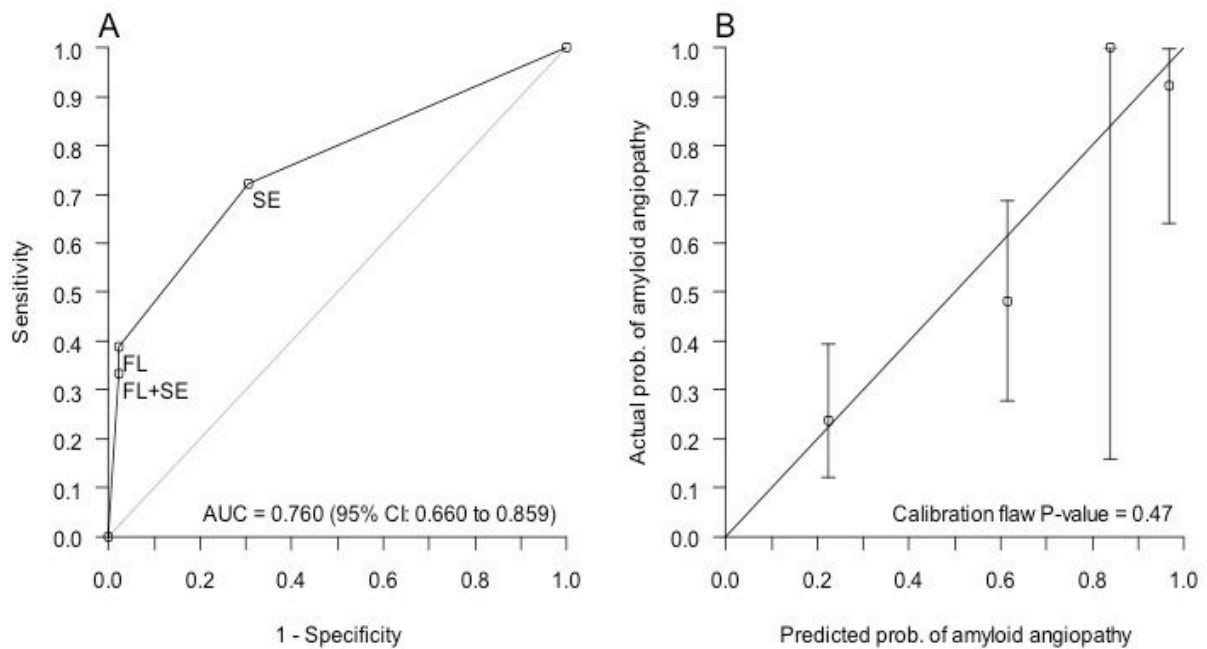
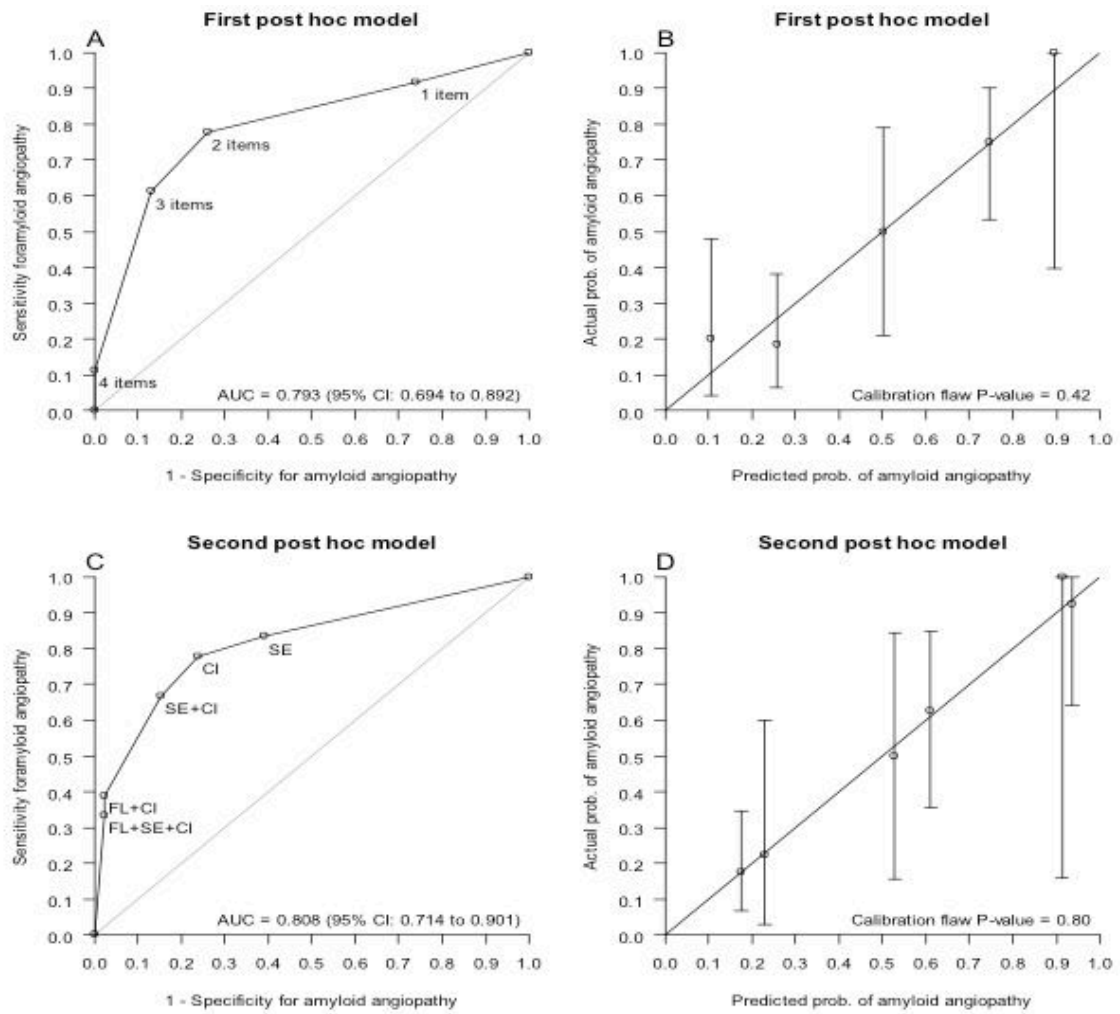


Figure 2. Receiver operating characteristic (ROC) curve (panel A) and calibration plot (panel B) of observed frequency versus predicted probability of cerebral amyloid angiopathy (CAA) for the external validation of the two-items (subarachnoid hemorrhage + finger-like projection) radiologic Edinburg prediction model.



AUC: Area under the curve ; SE: subarachnoid extension ; FL : finger like projection
 Grey line indicates perfect calibration. Points represent the four different CAA risk groups based on radiologic Edinburgh criteria. Error bars represents 95% confidence interval according to the Clopper-Pearson method.

Figure 3. Discrimination (AUC) and calibration (predicted vs observed probability plot) of the first post hoc model (panels A and B) based on Subarachnoid Extension (SE), Finger-like extension (FL), Cortex Involvement (CI) and Strictly Lobar ICH (SL) equally weighted and the second post hoc model (panels C and D) based on a logistic regression involving SE, FL and CI but not SL.



SUPPLEMENTARY TABLES AND FIGURE LEGENDS

Table S1. Inter-observer agreement for computed tomography features

Characteristic	Frequency (n=102) n(%)	Inter-observer agreement (n=102)	In Rodrigues et al
Intraventricular Hemorrhage, n(%)	32 (31.3%)	0.83	0.73
Subarachnoid extension, n(%)	48 (47.0%)	0.57	0.71
Subdural extension, n(%)	13 (12.7%)	0.52	0.59
Midline Shift, n(%)	41 (40.2%)	0.59	0.61
Presence of blood/fluid level, n(%)	9 (8.8%)	0.37	0.27
Irregular border of ICH, n(%)	70 (68.6%)	0.23	0.13
Finger-like projections, n(%)	20 (19.6%)	0.45	0.60
Cortex involvement, n(%)	51 (50.0%)	0.45	0.80
Variable density within ICH, n(%)	53 (51.9%)	0.68	
Dilute appearance of ICH, n(%)	18 (17.6%)	0.52	0.57

Agreement assessed with correlation coefficient. ICH = intracerebral haemorrhage. Cohen suggested the Kappa result be interpreted as follows: values ≤ 0 as indicating no agreement and 0.01–0.20 as none to slight, 0.21–0.40 as fair, 0.41–0.60 as moderate, 0.61–0.80 as substantial, and 0.81–1.00 as almost perfect agreement.

Table S2: Detailed MRI protocols used in our cohort

Model/ Manufacturer/ Magnetic field	AVANTO / SIEMEN S/ 1.5T	AVANTO / SIEMEN S/ 1.5T	DISCOVER Y/ GE/ 3T	DISCOVER Y/ GE/ 3T	SOLA/ SIEMEN S/ 1.5T	SOLA/ SIEMEN S/ 1.5T	AREA/ SIEMEN S/ 1.5T	ACHIEV A/ PHILIPS/ 1.5T
Sequence	Axial gradient echo T2	SWI 3D	Axial gradient echo T2	SWAN	Axial gradient echo T2	SWI 3D	Axial gradient echo T2	Axial gradient echo T2
Number of patients (n)	27	4	14	33	6	11	1	1
TR (ms)	945	49	725	45.4	983	49	858	854.95
TE (ms)	19.1	40	14.9	24.71	18.9	40	18	23.02
Flip angle (°)	20	15	25	20	20	15	20	18
Slice thickness (mm)	4	2	3.5	2.2	3.5	2.1	4	5
Space between slices (mm)	4.4		4.5	1.1	4.2		4.4	6
In-plane voxel size (mm)	0.45 x 0.45	0.45 x 0.45	0.51 x 0.51	0.47 x 0.47	0.45 x 0.45	0.9 x 0.9	0.83 x 0.83	0.9 x 0.9

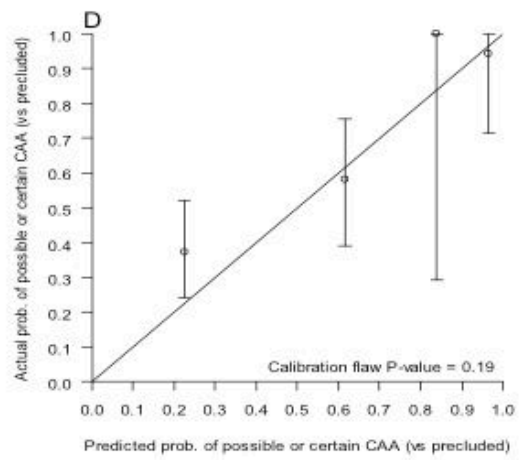
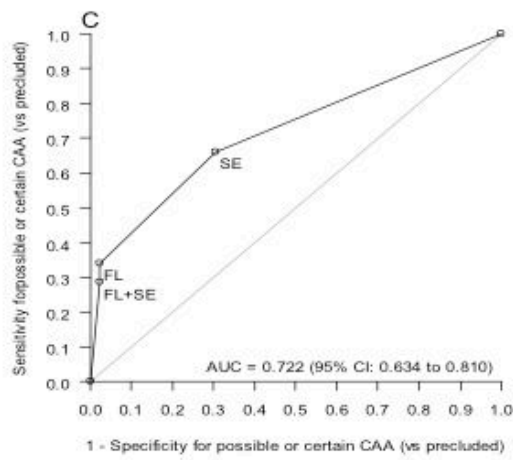
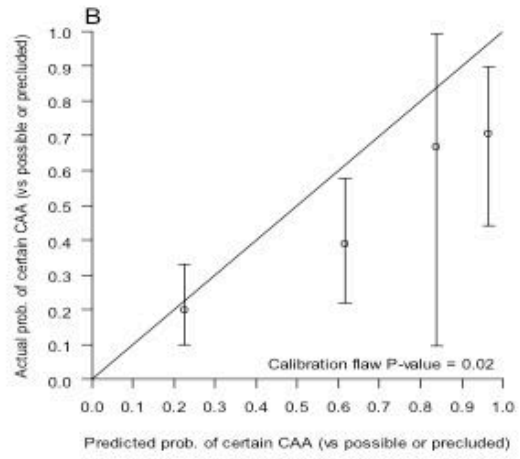
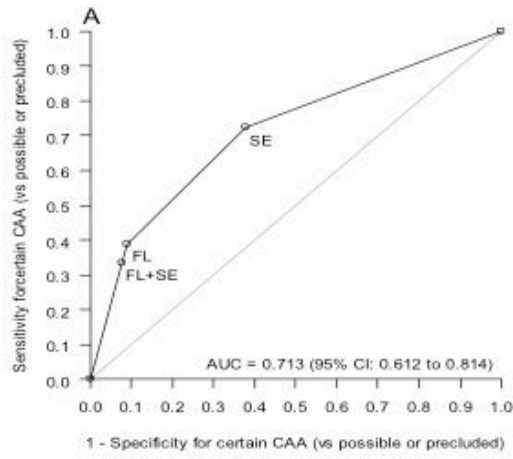
Table S3: Comparison between patients included versus patients who did not undergo brain MRI and therefore excluded.

	Patients included (n=102)	Patients without MRI and excluded (n=39)	p value
Sex, male, n (%)	53 (52.0%)	30 (76.9%)	0.008
Age at ICH (y), mean \pm SD	66.7 \pm 15.4	74.2 \pm 16.2	0.03
High blood pressure, n (%)	54 (53.5%)	23 (59.0%)	0.51
Multiples sites of ICH, n (%)	8 (7.8%)	3 (7.7%)	>0.99
Intraventricular Hemorrhage, n (%)	32 (31.4%)	29 (74.4%)	<0.0001
Subarachnoid extension, n (%)	48 (47.1%)	36 (92.3%)	<0.0001
Subdural extension, n (%)	13 (12.7%)	10 (25.6%)	0.08
Volume of ICH (cm ³), mean \pm SD	28.3 \pm 26.6	70.7 \pm 57.3	<0.0001

Mean \pm standard deviation, n (%) for qualitative data

ICH: Intra cerebral hemorrhage; MRI: Magnetic Resonance Imaging

Figure S1. ROC curves (panels A and C) and calibration chart (panels B and D) of sensitivity analyses grouping the undetermined CAA group either with the non-CAA group (panels A and B) or with the CAA group (panels C and D).



9. RÉSULTATS PARTIE 3 : APPROCHES GÉNOMIQUES POUR IDENTIFIER DE NOUVELLES CAUSES

A l'avènement des thérapies géniques, mieux comprendre les mécanismes génétiques impliqués dans l'AAC à A β afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques semble une étape primordiale. Compte tenu des échecs des traitements par immunothérapie anti- A β visant à éliminer les plaques amyloïdes, cibler des mécanismes plus en amont de la cascade amyloïde pourraient être une approche pertinente. Il n'y a, à l'heure actuelle, que très peu de traitements disponibles dans le cadre de microangiopathies cérébrales mais certains traitements, basés sur les mécanismes génétiques impliqués dans la pathologie, ont été développés, comme récemment dans l'amylose à transthyrétine: Le patisiran est un petit acide ribonucléique entraînant dans le foie une interférence par ARN réduisant la production de TTR et l'inotersen est un oligonucléotide antisens inhibiteur de la TTR. Ces deux traitements ont obtenu l'AMM en France ces 5 dernières années.

L'AAC à A β est principalement d'allure sporadique chez le sujet âgé mais peut également survenir de façon bien plus précoce, dans des contextes familiaux ou non. Les mécanismes physiopathologiques en jeu semblent variables, impliquant d'une part une surproduction du peptide A β et d'autre part une diminution de sa clairance par perte d'efficacité du drainage périvasculaire. Les mécanismes génétiques sous-jacents doivent donc être complexes et multiples.

A l'heure actuelle, il n'y a pas de recommandation consensuelle internationale concernant les analyses génétiques à effectuer dans le cadre d'une AAC. En pratique courante en France, une recherche des mutations ponctuelles du gène *APP* par séquençage des exons 16 et 17 est souvent réalisée en cas de forme précoce (c'est-à-dire d'âge de début inférieur à 65ans) et/ou en cas de contexte familial évocateur. Une recherche dédiée d'anomalie du nombre de copies du gène *APP* est réalisé le plus souvent mais pas systématiquement. Certaines équipes suédoises ou britanniques ne recommandent pas cette recherche par exemple chez des cas sporadiques, même jeune (405). Nous effectuons au laboratoire de génétique de Rouen, au titre du diagnostic, un séquençage des exons 16 et 17 d'*APP*, un dépistage d'anomalie du nombre de copies par QMPSF mais également un génotypage de l'*APOE* en cas d'AAC probable ou certaine

selon les critères révisés de Boston (hormis leur critère d'âge) et d'âge de début strictement inférieur à 66ans. Il s'agit d'un recrutement national en cours depuis plusieurs années. Aucune cause génétique n'est identifiée dans la majorité de ces cas d'AAC précoce (près de 95% des cas dans notre cohorte). Nous poursuivons alors les analyses pour ces prélèvements déjà collectés au laboratoire dans un cadre de recherche avec l'approbation du comité éthique du CHU de Rouen (CERDE E2021-92).

Nous faisons l'hypothèse d'une part d'un mécanisme causal Mendélien pouvant expliquer des cas de survenue très précoce (seuil établi arbitrairement à 50ans d'âge de début) . En outre, de possibles facteurs de susceptibilité génétique, comme l'*APOE* peuvent également être associés. Ces cas « extrêmes » sont supposés plus riches en variants à fort impact et il a été démontré qu'une stratégie d'échantillonnage par phénotypes extrêmes était efficace pour réduire la taille de l'échantillon nécessaire dans des études cas/témoins par exemple pour détecter un variant associé rare.

9.1. Anomalie du nombre de copies : Identification d'une triplification du gène *APP*

En réalisant tout d'abord la recherche systématique d'anomalie du nombre de copie du gène *APP* par QMPSF, nous avons identifié pour la première fois une triplification du gène *APP*, englobant l'ensemble du gène, sans aucun autre gène avoisinant, au sein d'une famille dont le proband présentait une MA précoce et son père présentait un tableau d'hématomes lobaires récurrents. En effet, quatre copies du gène de l'*APP* (région de 506 kb située en 21q21.3) ont été identifiées initialement chez le proband par PCR quantitative multiplex de courts fragments fluorescents avec affinement des bornes de la triplification par la suite par CGH array (*comparative genomic hybridization*) et confirmation d'un génotype 3 +1 par hybridation fluorescente in situ (FISH), probablement hérité du père compte tenu de la présence de deux copies *APP* chez la mère saine et de l'histoire clinique.

Le proband a développé des troubles de mémoire épisodique sévères depuis l'âge de 39 ans, avec un profil de biomarqueurs du LCS typique de MA et de multiples microbleeds lobaires dans les régions postérieures à l'IRM cérébrale. Son père souffrait de crises d'épilepsie et d'hémorragies lobaires récurrentes depuis l'âge de 37 ans, avec une biopsie cérébrale montrant d'abondants dépôts amyloïdes périvasculaires, conduisant au diagnostic d'AAC à début précoce. L'hypothèse était alors que ces 4 copies d'*APP* entraînaient une surexpression du gène, responsable de ce tableau extrêmement sévère et précoce. Pour le prouver, nous avons étudié l'expression du gène *APP* chez le proband par RT-digital droplet PCR et l'avons comparé à 10 contrôles et 9 porteurs de duplication d'*APP*. Cette analyse du niveau d'ARNm d'*APP* a montré une augmentation de 2 fois chez le proband et de 1,8 fois en moyenne chez les porteurs de la duplication d'*APP* par rapport aux contrôles. De façon intéressante, l'âge d'apparition des symptômes au sein de cette famille était un peu plus précoce que celui des cas antérieurs de duplications (37 et 39 ans contre 39-65 ans). Le phénotype pourrait être plus précoce en cas de triplification comparativement aux duplications. Il y aurait en quelque sorte « un effet-dose » avec une corrélation entre la gravité et l'augmentation du dosage du gène puisqu'un nombre de copies du gène *APP* plus élevé semble être associé à une phase symptomatique plus précoce.

Dans ce case report, la triplication était associée à des présentations diverses, notamment un trouble cognitif sévère chez le proband, une hémorragie intraparenchymateuse et des crises récurrentes chez son père. On souligne ici la survenue précoce, en dehors d'évènements hémorragiques, de crises d'épilepsie comme cela a été démontré dans les duplications(255). Au vu des résultats d'étude d'expression, le mécanisme ici semble, comme dans les duplications, être une surproduction d' A β consécutive à une surexpression du gène, dépassant les processus normaux d'élimination cérébraux. Ceci conforte l'hypothèse d'un rôle probablement pro-épileptogène des dépôts d' A β .

Comme souligné précédemment, les anomalies du nombre de copies connues dans l'AAC comportaient jusqu'à présent des duplications, de tailles très différentes et responsables de phénotypes très divers. A ce jour, une seule duplication du gène *APP* seul, sans autre gènes avoisinants a été rapportée(252). Ce cas de triplication d'*APP* confirme que l'augmentation du nombre de copies de l'*APP* suffit à elle seule à provoquer une MA et/ou une AAC. Dans le domaine des maladies neurodégénératives, une telle variété du nombre de copies d'un gène est connue par exemple pour le gène *SNCA* où des duplications mais aussi triplications ont été signalées chez des patients atteints de maladie de Parkinson ou de maladie à corps de Lewy(406). Les mécanismes qui sous-tendent l'instabilité génomique de la région *APP* restent méconnus et d'autres cas sont nécessaires pour préciser si les points de cassure sont partagés, récurrents ou nouveaux.

La force de l'étude réside dans le phénotypage précis et l'étude d'expression par quantification de l'ARNm chez le proband. Nous préconisons d'envisager un dépistage d'anomalie du nombre de copies d'*APP* devant toute forme précoce de MA ou d'AAC, et particulièrement quand la présentation initiale comporte des crises d'épilepsie. En effet, les panels génétiques ou le whole exome sequencing n'ont pas toujours la capacité de rechercher simultanément les variations du nombre de copies et peuvent donc manquer ce diagnostic (utilisation d'outils spécifiques nécessaires).

Cette variabilité phénotypique majeure décrite au sein de cette famille porteuse d'une triplication se retrouve également dans le cadre de duplication, parfois même intra-familiale. Des contributions polygéniques et multifactorielles pourraient moduler

l'expression clinique chez des patients avec surproduction d'*APP* (par duplication ou triplication du gène), comme nous l'avons discuté dans notre autre travail portant sur les duplications. On se pose également la question de contributions polygéniques dans le cadre des formes plus fréquentes d'AAC de survenue tardive, où le mécanisme suspecté n'est pas une surproduction d'*APP*. Dans ces formes, nous ne suspectons pas un mécanisme Mendélien mais plutôt des facteurs de risque génétiques, ayant un effet faible ou modéré. A ce jour, le seul connu dans l'AAC est le génotype *APOEε4*, facteur de risque fréquent à effet modéré mais d'autres sont certainement à découvrir. L'identification de tels facteurs de risque au sein d'une population d'AAC précoce (ce qui permet de nous affranchir d'autres facteurs liés au vieillissement impactant sur l'angiopathie), bien définie et phénotypée, pourrait nous permettre à terme de les extrapoler aux formes d'AAC sporadiques, tous âges de début confondus.

Early-Onset Cerebral Amyloid Angiopathy and Alzheimer Disease Related to an APP Locus Triplication

Lou Grangeon, MD, Kévin Cassinari, MD, Stéphane Rousseau, BSc, Bernard Croisile, MD, Maité Formaglio, MD, Olivier Moreaud, MD, Jean Boutonnat, MD, Nathalie Le Meur, PharmD, Manuele Miné, PharmD, PhD, Thibault Coste, MD, Eva Pipiras, MD, PhD, Elisabeth Tournier-Lasserre, MD, PhD, Anne Rovelet-Lecrux, PhD, Dominique Campion, MD, PhD, David Wallon, MD, PhD, and Gael Nicolas, MD, PhD

Correspondence
Dr. Nicolas
gaelnicolas@hotmail.com

Neurol Genet 2021;7:e609. doi:10.1212/NXG.000000000000609

Abstract

Background and Objective

To report a triplication of the amyloid- β precursor protein (*APP*) locus along with relative messenger RNA (mRNA) expression in a family with autosomal dominant early-onset cerebral amyloid angiopathy (CAA) and Alzheimer disease (AD).

Methods

Four copies of the *APP* gene were identified by quantitative multiplex PCR of short fluorescent fragments, fluorescent in situ hybridization (FISH), and array comparative genomic hybridization. *APP* mRNA levels were assessed using reverse-transcription–digital droplet PCR in the proband's whole blood and compared with 10 controls and 9 *APP* duplication carriers.

Results

Beginning at age 39 years, the proband developed severe episodic memory deficits with a CSF biomarker profile typical of AD and multiple lobar microbleeds in the posterior regions on brain MRI. His father had seizures and recurrent cerebral hemorrhage since the age of 37 years. His cerebral biopsy showed abundant perivascular amyloid deposits, leading to a diagnosis of CAA. In the proband, we identified 4 copies of a 506-kb region located on chromosome 21q21.3 and encompassing the whole *APP* gene without any other gene. FISH suggested that the genotype of the proband was 3 copies/1 copy corresponding to an *APP* locus triplication, which was consistent with the presence of 2 *APP* copies in the healthy mother and with the paternal medical history. Analysis of the *APP* mRNA level showed a 2-fold increase in the proband and a 1.8 fold increase in *APP* duplication carriers compared with controls.

Discussion

Increased copy number of *APP* is sufficient to cause AD and CAA, with likely earlier onset in case of triplication compared with duplication.

RELATED ARTICLE

Editorial

The Dose Makes the Poison

Page e610

From the Department of Neurology and CNR-MAJ (L.G., D.W.), Normandie University, UNIROUEN, Inserm U1245, CHU Rouen, CIC-CRB1404, F 76000; Department of Genetics and CNR-MAJ (K.C., S.R., N.L.M., A.R.-L., D.C., G.N.), Normandie University, UNIROUEN, Inserm U1245 and CHU Rouen, F 76000; Department of Neurology (B.C., M.F.), Lyon University Hospital; Department of Neurology (O.M.), Grenoble University Hospital; Department of Histology (J.B.), Grenoble University Hospital; AP-HP (M.M., T.C., E.T.-L.), Groupe Hospitalier Saint-Louis Lariboisière-Fernand-Widal, Service de Génétique Moléculaire Neurovasculaire, INSERM UMR 1141, NeuroDiderot, Université de Paris; Department of Histology Embryology and Cytogenetics (E.P.), Jean Verdier Hospital; Paris 13 University (E.P.), Sorbonne Paris Cité, UFR SMBH Bobigny; and PROTECT (E.P.), INSERM, Paris Diderot University, Bondy, France.

Go to Neurology.org/NG for full disclosures. Funding information is provided at the end of the article.

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives License 4.0 (CC BY-NC-ND), which permits downloading and sharing the work provided it is properly cited. The work cannot be changed in any way or used commercially without permission from the journal.

Glossary

aCGH = array comparative genomic hybridization; **AD** = Alzheimer disease; **APP** = amyloid- β precursor protein; **CAA** = cerebral amyloid angiopathy; **EOAD** = early-onset Alzheimer disease; **MMSE** = Mini Mental State Examination; **mRNA** = messenger RNA; **QMPSF** = quantitative multiplex PCR of short fluorescent fragments.

Amyloid- β precursor protein (*APP*) is the main gene known to be involved in autosomal dominantly inherited cerebral amyloid angiopathy (CAA). After the description of point mutations, *APP* locus duplications were identified in 2006 as a cause of early-onset CAA and/or early onset Alzheimer disease (EOAD, onset before 65 years).¹ Such copy number variations encompass at least the *APP* gene, with or without surrounding genes on chromosome 21,² and are associated with ~1.5-fold increased messenger RNA (mRNA) levels in blood compared with healthy controls, in similar ranges to patients with trisomy 21.³ The size of the duplication and the gene content—beyond the critical *APP* gene—do not appear to influence phenotypic presentation in cases.^{1,4-6} Patients with trisomy 21 usually show cognitive impairment similar to Alzheimer disease (AD), although they less frequently exhibit cerebral hematoma, suggesting the presence of protective mechanisms in patients with Down syndrome.⁷ Indeed, a recent histopathologic study showed more severe CAA but less parenchymal amyloid plaque formation in *APP* duplication than in trisomy 21 patients.⁷ Given this diversity in amyloid distribution according to the underlying genetic background, CAA pathogenesis remains to be understood. We here report an *APP* locus triplication, along with relative mRNA expression in the proband's blood.

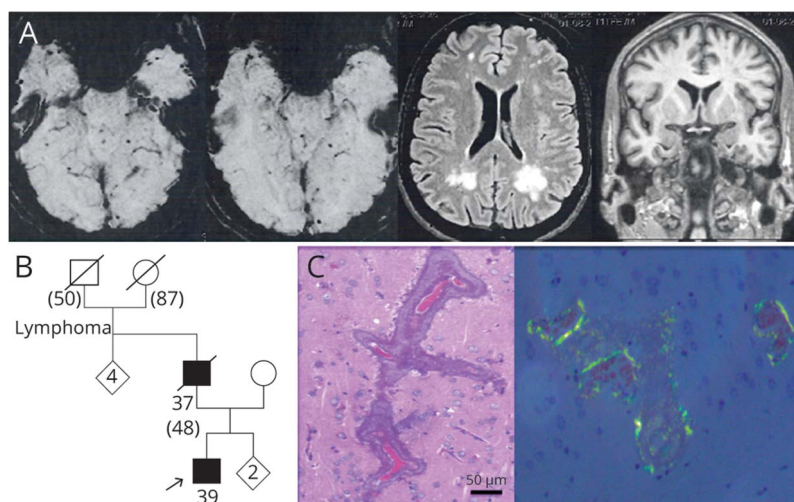
Case Presentation

A 41-year-old man without medical history was referred to a memory care center for the evaluation of progressive

cognitive decline.⁸ From age 39 years, he presented with an aggressive course of episodic memory loss making him unable to maintain his professional activity as well as attention deficit and executive dysfunction. The Mini Mental State Examination (MMSE) scored 18/30 and Frontal Assessment Battery 15/18. There was neither language impairment nor praxis or visuoconstructive dysfunction. The patient did not present any episode suggestive of stroke or seizures. Brain MRI showed multiple lobar microbleeds in the posterior fossa and occipital region and posterior periventricular leukoencephalopathy (Figure 1A) with hippocampal atrophy (bilateral Scheltens scale rating of 2). He underwent lumbar puncture for quantification of CSF AD biomarkers A β ₄₂, tau, and phosphorylated-tau. The A β ₄₂ level was decreased (404 ng/L, N > 550), with increased tau (491 ng/L, N < 400) and phospho-tau protein levels (95 ng/L, N < 60). The A β ₄₀ level was 8,546 ng/L (4,540 < N < 8,480). Overall, he fulfilled the diagnostic criteria of probable AD with evidence of the AD pathophysiologic process,⁸ in association with probable CAA following the modified Boston criteria, except the age criterion.

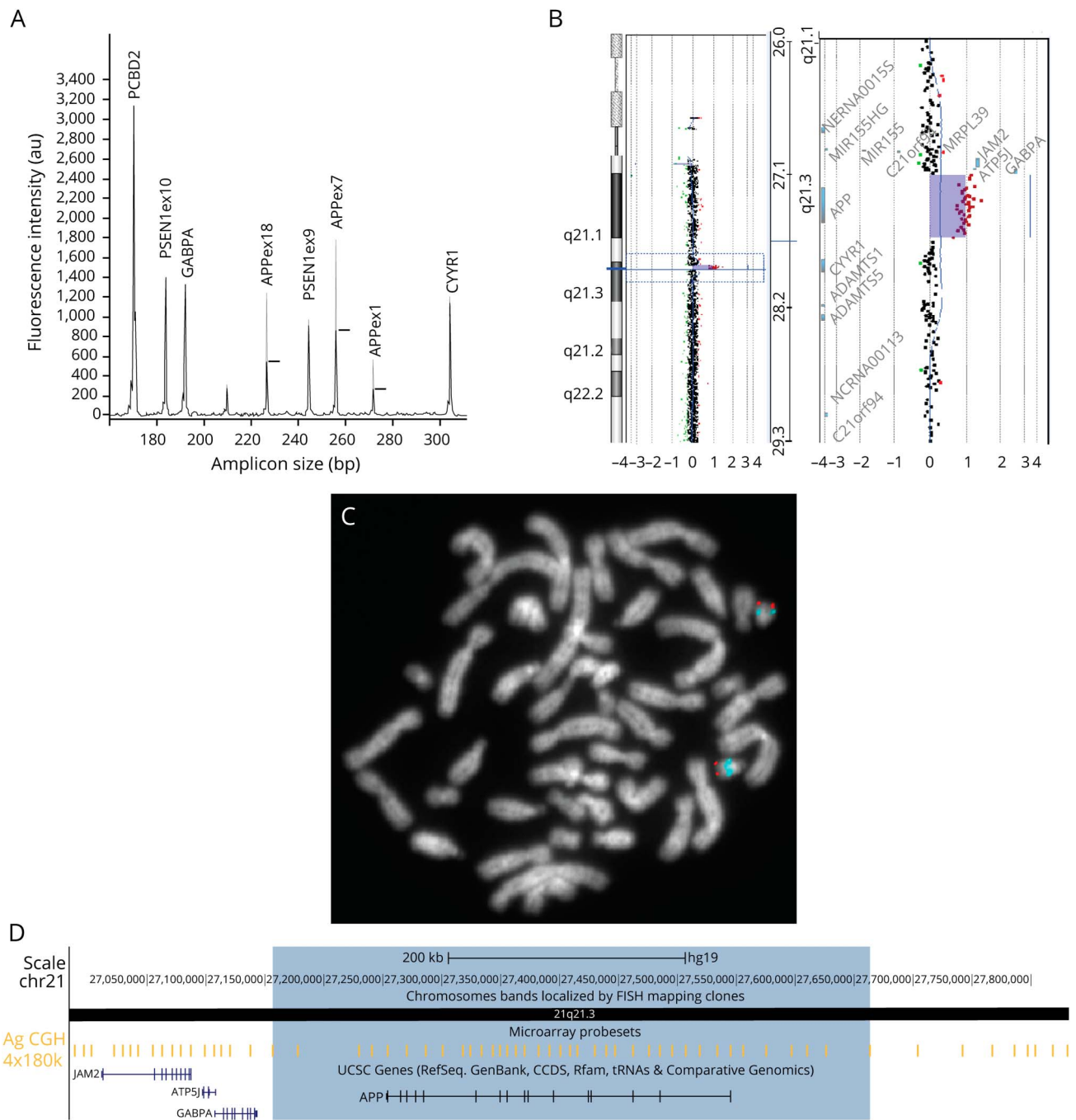
His father had had recurrent migraine with visual aura and presented at age 37 years with transient loss of consciousness (Figure 1B). Focal epilepsy was diagnosed after recurrent episodes of contact loss and electroencephalography showing slow bilateral temporal waves and then treated by carbamazepine. Subsequent cerebral MRI showed hyperintensities in

Figure 1 Partial Pedigree, Cerebral MRI of the Proband, and Histopathologic Examination of the Cerebral Biopsy Performed in His Father



(A) T2* weighted sequence showing multiple lobar microbleeds (first and second images); FLAIR-weighted sequence showing posterior leukoencephalopathy (third image) and coronal view of T1-weighted sequence showing moderate bilateral hippocampal atrophy (fourth image). (B) Age at death (in parentheses) and age at onset are indicated. The proband is identified by an arrow. (C) Histopathologic examination of the cerebral biopsy of the proband's father. Bouin-fixed paraffin sections of the cerebral biopsy were stained with hematoxylin-eosin (left part) and Congo red (right part). Sections stained with Congo red were examined under crossed polarized light for analyzing vascular amyloid and revealed apple-green birefringence of amyloid material in blood vessel walls.

Figure 2 Representation of the 21q21.3 Triplication

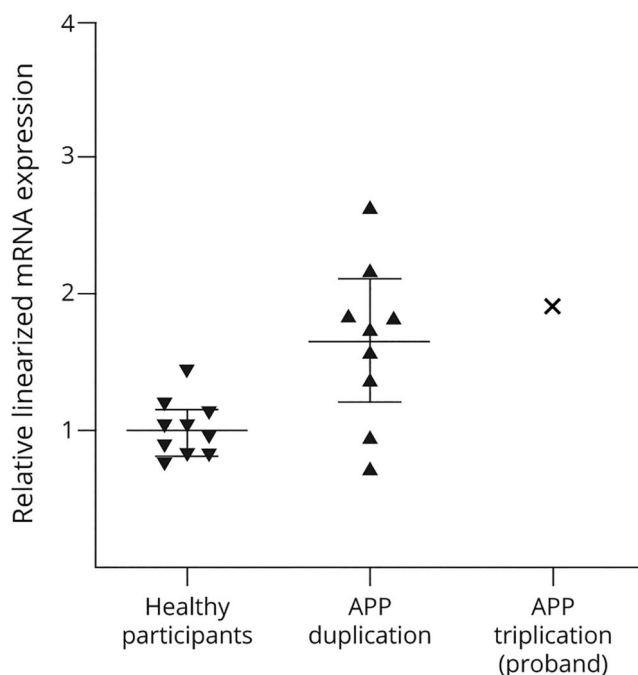


(A) Detection by QMPSF of an *APP* triplication. The electropherogram of the proband (in light gray) was superimposed on that of a normal individual (in black) by adjusting to the same level the peaks obtained from the control amplicon *PCBD2* located on chromosome 5. The vertical axis shows fluorescence in arbitrary units, and the horizontal axis indicates the size of the amplicon in base pairs. Horizontal bars indicate triplication of the amplicons, detected by a 2-fold heightening of the corresponding peaks. This QMPSF also covers 2 genes located at 21q21, *GABPA* and *CYR1* that are not duplicated. (B) Refinement of triplication breakpoints by array CGH. Representation on the Agilent Genomic Workbench 7.0 software of the 21q21.3 triplication (log ratio: 0.97) on chr21: 38,156,233-27,662,338;hg19. (C) FISH analysis of peripheral blood lymphocytes of the proband. Red: control probe located on chromosome 21 long arm subtelomeric region (VJlyRM2029, Vysis; Abbott, Chicago, IL); Blue: *APP* locus specific probe (RP11-410J1; Empire Genomics, Buffalo, NY) located on 21q21.3. (D) Gene content of the triplicated region: Visualization in the UCSC genome browser of the 21q21.3 triplication chr21:27,156,233-27,662,338;hg19 (blue highlight). Yellow bars represent array CGH probes. Yellow bars at both extremes of the blue zone represent the last triplicated probes. The reference assembly used is GRCh37/hg19. Other panels represent, from top to bottom: Agilent 180K probes, cytogenetic band, UCSC genes (only RefSeq sequence). *APP* = amyloid- β precursor protein; FISH = fluorescent in situ hybridization.

centrum semiovale on T2-weighted sequences. CSF was acellular and showed a moderately high protein level (0.61 g/L), but AD biomarkers were not available at this time.

Progressive behavioral disorders and severe cognitive impairment occurred 4 years later and worsened over time with an MMSE of 24/30. Neuropsychological testing showed

Figure 3 Expression Analysis Using RT-ddPCR



RT-ddPCR with a target amplicon in the *APP* gene and a reference amplicon in the *DLG4* housekeeping gene for healthy controls (N = 10), patients carrying an *APP* duplication (N = 9), and our patient carrying an *APP* triplication (N = 1). Each point represents the average of 3 measures obtained for an individual (except for the proband where the point represents the average of 5 measures). Results are presented through an expression ratio *APP*/*DLG4* linearized with the average expression ratio of controls: For each group, the median relative *APP* mRNA expression is indicated with a wide horizontal line, and 95% confidence intervals are shown with short horizontal lines. *APP* = amyloid- β precursor protein; mRNA = messenger RNA; RT-ddPCR = reverse-transcription-digital droplet PCR.

episodic memory loss associated with praxis and visuoconstructive moderate dysfunction. He thus fulfilled the diagnostic criteria of probable AD⁸ and probable CAA. Tc99m-HMPAO cerebral single photon emission computerized tomography was considered normal. At age 44 years, his condition was extremely severe with repeated loss of consciousness episodes and major upper cerebral dysfunction. Cerebral MRI showed acute bilateral temporal hematomas and posterior leukoencephalopathy. Cerebral angiography did not display any sign of cerebral vasculitis. Cerebral biopsy revealed abundant perivascular amyloid deposits enabling the final diagnosis of probable CAA with supporting pathological evidence (Figure 1C). He died at age 48 years after a second hemorrhagic event with left temporal hematoma. There was no history of dementia or stroke in his family, although a censoring effect was noticed: the paternal grandfather of the proband indeed died at age 50 years from lymphoma (Figure 1B).

Genetic Assessment

We obtained informed written consent for genetic analyses by the patient and by the father's legal representative. This study was approved by the Institutional Review Board of Rouen University Hospital (CERDE #2019-55 notification).

Quantitative multiplex PCR of short fluorescent fragment (QMPSF) analyses performed from DNA isolated from fresh whole blood revealed 4 copies of the *APP* gene in the proband (Figure 2A). His *APOE* genotype was 33, and Sanger sequencing did not detect any point mutation in exons 16–17 of *APP*. The 68-year-old unaffected mother carried 2 copies of *APP*, suggesting a 3 + 1 genotype in the proband, but no DNA sample was available from his father. Fluorescent in situ hybridization using *APP* locus specific probes (RP11-410J1; Empire Genomics, Williamsville, NY) on cultured lymphocytes metaphase cells showed an asymmetric positive hybridization signal on chromosome 21 long arm without other signal hybridization anywhere else (Figure 2C), further suggesting a 3 + 1 genotype and hence autosomal dominant transmission of a triplication.

We further mapped the triplication using array comparative genomic hybridization (aCGH, Agilent SurePrint 4 × 180k; Agilent Technologies, Santa Clara, CA). The 506-kb 21q21.3 triplication (chr21:27,156,233-27,662,338;hg19) was restricted to the whole *APP* gene without any flanking gene coding sequence (Figure 2, B and D).

Finally, mRNA *APP* levels were assessed using reverse-transcription-digital droplet PCR in the proband whole blood comparatively to 10 normal controls (including the proband's mother) and 9 patients carrying *APP* duplications (see eMethods, links.lww.com/NXG/A465). The patient showed a 2-fold increase of relative *APP* mRNA levels compared with controls (Figure 3 and eFigure 1, links.lww.com/NXG/A470). Patients with *APP* duplication showed a median of 1.8 fold increase compared with controls, but no comparison could be directly made with our proband, considering this single *APP* triplication case.

Discussion

To our knowledge, this is the first report of an *APP* locus triplication, causing a two-fold upregulation of *APP* mRNA levels, in a family presenting with autosomal dominant EOAD with severe CAA. Although duplications of a given gene are now a classical cause of several autosomal dominant disorders, there are few examples of mendelian diseases caused by a gene triplication. In the field of neurodegenerative diseases, *SNCA* triplications on chromosome 4 have been reported in patients with Parkinson or Lewy body disease along with duplications in other patients.⁹ As for the *APP* gene, alpha-synuclein-encoding *SNCA* increased gene copies encompassed at least the *SNCA* gene, with or without surrounding genes (1 to 50), and displayed high diversity in clinical phenotype.¹⁰ Similarly, since its first description, some diversity of phenotypes associated with *APP* duplications has been described, mostly related to the predominance of AD or CAA-related symptoms at presentation.⁶ In this report, triplication was associated with diverse presentation, including severe cognitive disorder in the proband and recurrent ICH and seizures in his father.

The higher copy number seemed to be associated with earlier symptomatic phase in our report (37 and 39 years of age at onset) compared with *APP* duplications carriers showing ages at onset ranging from 39 to 65 years.^{1,4-6} However, we can expect some degree of diversity in ages of onset in other *APP* triplication families.

In a recent French series of EOAD, *APP* duplication carriers were more likely to present with seizures,¹¹ possibly explained by A β overproduction related to increased *APP* expression. Early seizures may be a shared clinical feature with *APP* triplication as observed in the father of the proband.

Different mechanisms can be involved in autosomal dominant CAA and AD pathogenesis. In contrast with *APP* point mutations, which can result in increased beta cleavage of *APP*, change in A β 42/38 ratio, or in A β aggregation propensity,¹² *APP* duplications lead to *APP* overproduction, with severe A β deposits in the brain parenchyma and within vessels walls.^{1,3} Here, cerebral biopsy of the proband's father confirmed severe amyloid perivascular deposits consecutive to *APP* overproduction. Indeed, we found a 2-fold upregulation of *APP* mRNA levels in blood. Unfortunately, no comparison could be made with *APP* duplication carriers given the availability of RNA in the proband only so that we cannot be sure that triplications result in significantly increased mRNA levels than in duplication.

Here, we showed by aCGH that the triplication encompassed the *APP* gene only. To our knowledge, there is a single case report of an *APP* duplication encompassing the *APP* gene solely, highlighting that increased *APP* expression is sufficient to cause EOAD and CAA.² However, the resolution of the techniques did not allow us to assess whether the breakpoints were the same in our case and in this 290–750 kb duplication.² The mechanisms underlying genomic instability of the *APP* region remain elusive, and further reports are needed to refine shared or novel breakpoints.

Overall, our report provides further evidence that increased *APP* expression is sufficient to lead to A β aggregation and subsequent EOAD and CAA. Although ages at clinical onset were among the earliest ones in our *APP* triplication carriers compared with duplication carriers, further cases would be required to conclude.

Study Funding

No targeted funding reported.

Disclosure

The authors report no disclosures relevant to the manuscript. Go to Neurology.org/NG for full disclosures.

Publication History

Received by *Neurology: Genetics* April 1, 2021. Accepted in final form June 8, 2021.

Appendix Authors

Name	Location	Contribution
Lou Grangeon, MD	Department of Neurology and CNR-MAJ, UNIROUEN, Inserm U1245, CHU Rouen, CIC-CRB1404, F-76000 Rouen, France	Collection, interpretation of data, and drafting and manuscript revision
Kévin Cassinari, MD	Department of Genetics and CNR-MAJ, Normandie University, UNIROUEN, Inserm U1245 and CHU Rouen, F-76000 Rouen, France	Collection, statistical analysis, and interpretation of data and drafting of the manuscript
Stéphane Rousseau, BSc	Department of Genetics and CNR-MAJ, Normandie University, UNIROUEN, Inserm U1245 and CHU Rouen, F-76000 Rouen, France	Collection, analysis, and interpretation of data
Bernard Croisile, MD	Department of Neurology, Lyon University Hospital, France	Collection and interpretation of data
Maité Formaglio, MD	Department of Neurology, Lyon University Hospital, France	Collection and interpretation of data
Olivier Moreaud, MD	Department of Neurology, Grenoble University Hospital, France	Collection and interpretation of data
Jean Boutonnat, MD	Department of Neurology, Grenoble University Hospital, France	Collection, analysis, and interpretation of data
Nathalie Le Meur, PharmD	Department of Genetics and CNR-MAJ, Normandie University, UNIROUEN, Inserm U1245 and CHU Rouen, F-76000 Rouen, France	Collection and interpretation of data
Manuele Miné, PharmD, PhD	AP-HP, Groupe Hospitalier Saint-Louis Lariboisière-Fernand-Widal, Service de Génétique Moléculaire Neurovasculaire, INSERM UMR 1141, NeuroDiderot, Université de Paris, France	Collection and interpretation of data
Thibault Coste, MD	AP-HP, Groupe Hospitalier Saint-Louis Lariboisière-Fernand-Widal, Service de Génétique Moléculaire Neurovasculaire, INSERM UMR 1141, NeuroDiderot, Université de Paris, France	Collection and interpretation of data
Eva Pipiras, MD, PhD	Department of Histology Embryology and Cytogenetics, Jean Verdier Hospital; Paris 13 University, Sorbonne Paris Cité, UFR SMBH Bobigny; PROTECT, INSERM, Paris Diderot University, Bondy, France	Collection and interpretation of data
Elisabeth Tournier Lasserre, MD, PhD	AP-HP, Groupe Hospitalier Saint-Louis Lariboisière-Fernand-Widal, Service de Génétique Moléculaire Neurovasculaire, INSERM UMR 1141, NeuroDiderot, Université de Paris, France	Interpretation of data and drafting and manuscript revision

Continued

Appendix (continued)

Name	Location	Contribution
Anne Rovelet-Lecrux, PhD	Department of Genetics and CNR-MAJ, Normandie University, UNIROUEN, Inserm U1245 and CHU Rouen, F-76000 Rouen, France	Collection, analysis, and interpretation of data
Dominique Campion, MD, PhD	Department of Genetics and CNR-MAJ, Normandie University, UNIROUEN, Inserm U1245 and CHU Rouen, F-76000 Rouen, France	Collection, analysis, and interpretation of data
David Wallon, MD, PhD	Department of Neurology and CNR-MAJ, Normandie University, UNIROUEN, Inserm U1245, CHU Rouen, CIC-CRB1404, F-76000 Rouen, France	Study concept, interpretation of data, and drafting and manuscript revision
Gael Nicolas, MD, PhD	Department of Genetics and CNR-MAJ, Normandie University, UNIROUEN, Inserm U1245 and CHU Rouen, F-76000 Rouen, France	Study concept, interpretation of data, and drafting and manuscript revision

References

1. Rovelet-Lecrux A, Hannequin D, Raux G, et al. APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. *Nat Genet*. 2006;38(1):24-26.
2. Sleegers K, Brouwers N, Gijssels I, et al. APP duplication is sufficient to cause early onset Alzheimer's dementia with cerebral amyloid angiopathy. *Brain*. 2006;129(pt 11):2977-2983.
3. Pottier C, Wallon D, Lecrux AR, et al. Amyloid- β protein precursor gene expression in Alzheimer's disease and other conditions. *J Alzheimers Dis*. 2012;28(3):561-566.
4. Wallon D, Rousseau S, Rovelet-Lecrux A, et al. The French series of autosomal dominant early onset Alzheimer's disease cases: mutation spectrum and cerebrospinal fluid biomarkers. *J Alzheimers Dis*. 2012;30(4):847-856.
5. Lanoiselee H-M, Nicolas G, Wallon D, et al. APP, PSEN1, and PSEN2 mutations in early-onset Alzheimer disease: a genetic screening study of familial and sporadic cases. *PLoS Med*. 2017;14(3):e1002270.
6. Guyant-Marechal I, Berger E, Laquerriere A, et al. Intrafamilial diversity of phenotype associated with app duplication. *Neurology*. 2008;71(23):1925-1926.
7. Mann DMA, Davidson YS, Robinson AC, et al. Patterns and severity of vascular amyloid in Alzheimer's disease associated with duplications and missense mutations in APP gene, Down syndrome and sporadic Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2018;136(4):569-587.
8. McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2011;7(3):263-269.
9. Zafar F, Valappil RA, Kim S, et al. Genetic fine-mapping of the Iowan SNCA gene triplication in a patient with Parkinson's disease. *NPJ Park Dis*. 2018;4:18. Accessed October 2, 2020. [nature.com/articles/s41531-018-0054-4](https://www.nature.com/articles/s41531-018-0054-4).
10. Book A, Guella I, Candido T, et al. A meta-analysis of α -synuclein multiplication in familial Parkinsonism. *Front Neurol*. 2018;9:1021. Accessed October 2, 2020. [frontiersin.org/article/10.3389/fneur.2018.01021/full](https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fneur.2018.01021/full).
11. Zarea A, Charbonnier C, Rovelet-Lecrux A, et al. Seizures in dominantly inherited Alzheimer disease. *Neurology*. 2016;87(9):912-919.
12. Greenberg SM, Bacskai BJ, Hernandez-Guillamon M, Pruzin J, Sperling R, van Veluw SJ. Cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer disease—one peptide, two pathways. *Nat Rev Neurol*. 2020;16(1):30-42.

9.2. Recherche dans l'AAC de facteurs de risque récemment identifiés dans la MA: les variants rares exomiques prédits délétères de *SORL1*, *TREM2*, *ABCA7*, *ABCA1* et *ATP8B4*

Pour mettre en évidence des facteurs de susceptibilité génétique dans le développement de maladies multifactorielles, nous faisons alors appel aux études cas/témoin qui ont été beaucoup développées ces dernières années.

- Dans les GWAS, ce sont des variants fréquents (MAF >5%), c'est à dire des polymorphismes à effet faible qui sont détectés dans des maladies fréquentes.

- Dans les études d'association, on recherche l'implication de variants peu fréquents voire rares, « à impact clinique intermédiaire ». Plus précisément, on recherche un enrichissement en variants rares dans une série de cas comparativement à une série de témoins. Plusieurs types existent, principalement les *Burden test* (test de charge) ou des tests de variance. Identifier un signal d'association à l'échelle du variant est un réel défi, souvent limité par un manque de puissance. En effet, puisqu'on parle de variants rares, on pourrait être amené à comparer l'observation d'un variant vu une seule fois chez un cas contre aucune fois chez les témoins. Les études d'association se focalisent plutôt sur une association à l'échelle du gène ou d'un panel de gènes par « collapsing test », en agréant donc tous les variants rares à une échelle plus grande (Figure 20). On mesure ainsi « la charge » en variants rares par gène chez les cas et chez les contrôles. On rassemble alors des informations de plusieurs variants en un seul score génétique et on teste l'association entre ce score et la maladie(407). Le seuil de significativité doit tenir compte d'une correction pour tests multiples et puisque les 20 000 gènes sont séquencés par exome, cela revient en quelque sorte à réaliser 20 000 tests différents. Nous retenons donc le seuil de significativité de $0.05 / 20\ 000 = 2,5 \cdot 10^{-6}$.

Dans la MA, proche sur le plan physiopathologique de l'AAC, plusieurs études d'association ont permis de mettre en évidence le rôle des variants perte-de-fonction au sein des gènes *SORL1*, *TREM2*, *ABCA7* et plus récemment *ABCA1* et *ATP8B4* (408)(409)(410)(411).

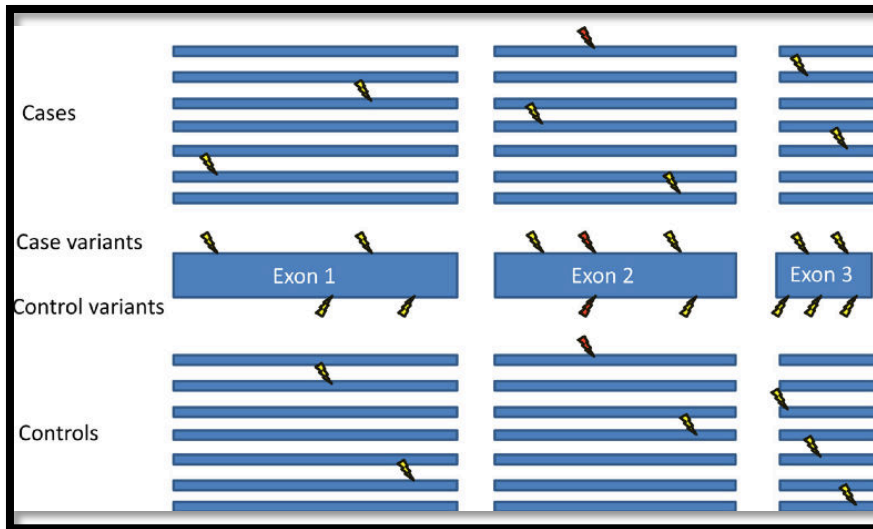


Figure 20 - Gene-based collapsing tests - Extrait de Cirulli et al, Plos genetics, 2016 (412)

Le gène est séquencé dans sa totalité chez les cas et les contrôles, puis une comparaison du nombre de cas et de contrôles portant au moins un variant rare (schématisé par un éclair) dans le gène est réalisée. La méthodologie consistant à rechercher chez les contrôles uniquement les variants identifiés chez les cas n'est pas valide. Dans l'exemple présenté ici, si l'on considère seulement les variants identifiés chez les cas, on dénombre 7 cas portant 7 variants rares différents dans le gène, dont seulement un est également identifié chez les contrôles (représenté par l'éclair rouge), conduisant à conclure à tort à un enrichissement en variants rares chez les cas. Cependant, si l'on considère tous les variants rares identifiés chez les cas et les contrôles, il existe le même nombre de cas et de contrôles portant un variant rare dans ce gène (7 individus mutés dans chaque groupe).

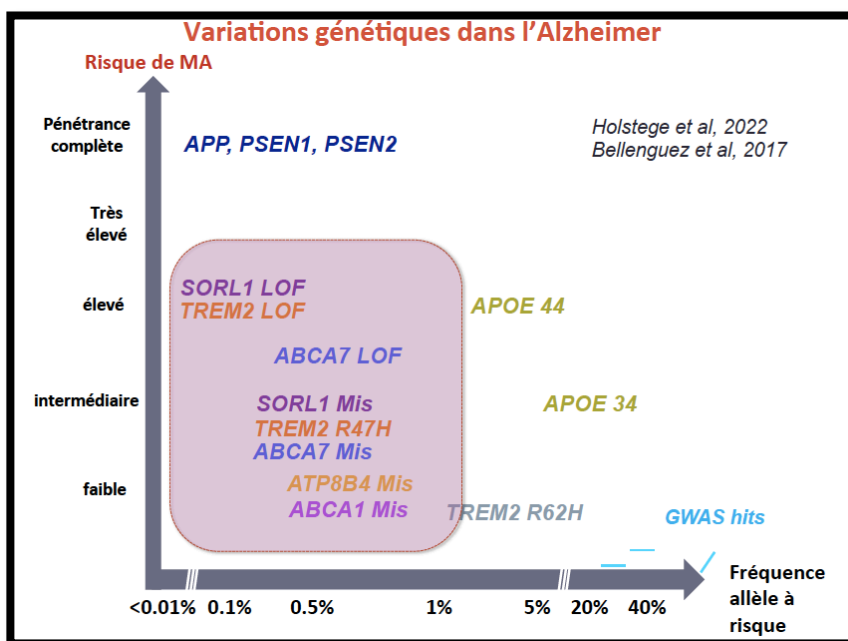


Figure 21. Hétérogénéité génétique de la MA - Adapté de l'EMC Neurologie – Génétique de la Maladie d'Alzheimer.

Les fonctions connues des produits de ces gènes sont principalement impliquées dans la production ou la clairance du peptide A β . *SORL1* code pour SorLA, une protéine clé impliquée dans le traitement de la protéine précurseur d'A β (APP). Des études *in vitro* ont montré une augmentation de la sécrétion d'A β associée à une fonction réduite de SorLA18. TREM2 est principalement exprimé dans la microglie et a un rôle dans la réponse immunitaire et la clairance des agrégats A β . *ABCA7* et *ABCA1* codent pour des transporteurs de phospholipides. La perte de fonction d'*ABCA7* est associée à la fois à une augmentation de la production et à une diminution de la clairance d'A β . La perte de fonction d'*ABCA1* est associée à une mauvaise lipidation des lipoprotéines du système nerveux central par l'APOE, ce qui facilite l'agrégation d'A β . Le rôle d'*ATP8B4*, qui code également pour un transporteur de phospholipides principalement exprimé dans la microglie, reste à déterminer.

Nous faisons l'hypothèse que des variants rares au sein de ces 5 gènes, impliqués dans la MA, doivent également être impliqués dans l'AAC. Après exclusion des cas identifiés d'anomalie du nombre de copies d'*APP* ou mutations ponctuelles d'*APP*, nous avons donc réalisé cette recherche par whole-exome-sequencing (WES). Comme décrit précédemment, nous avons constitué une cohorte de patients avec un diagnostic d'AAC certaine ou probable selon les critères révisés de Boston et d'âge de début inférieur à 66 ans. Ce seuil a été établi arbitrairement, par parallélisme avec les seuils utilisés dans la MA. Nous avons inclus les patients indépendamment de la présence d'un contexte familial et indépendamment de leur statut *APOE*. En effet, notre hypothèse est ici une combinaison de facteurs de risque. Ainsi, la présence déjà d'un facteur de susceptibilité, comme *APOE*, n'exclut pas la participation d'autres variants à l'expression phénotypique de la maladie. Après contrôle de qualité d'ADN (où malheureusement 28 étaient dégradés), 79 prélèvements de patients ont été séquencés par WES. Cette population était bien phénotypée et présentait plusieurs forces : Âge de début précoce (en moyenne 58.2 ans), critères diagnostiques précis, enrichissement en cas familiaux, c'est à dire antécédent de MA précoce ou hémorragie lobaire au 1^{er} degré (24% de notre série) et données biomarqueurs LCS disponibles dans 58% des cas (bien que ceci ne fasse pas partie des critères d'inclusion).

Nous avons tout d'abord cherché à écarter des diagnostics différentiels afin de réduire le nombre de phénotopies. En effet, une confirmation anatomopathologique n'était

disponible que pour 6% de notre cohorte. Nous avons établi une liste de 13 gènes impliqués dans d'autres pathologies pouvant mimer une AAC : les cavernomatoses, les pathologies liées aux mutations *COL4A1* et *COL4A2*, d'autres leucoencephalopathies vasculaires comme le *CADASIL*, *CARASIL* et les autres formes d'AAC non-A β . Nous avons identifié deux patients porteurs de mutations pathogènes au sein de *NOTCH3*, conduisant à un diagnostic final de *CADASIL* avec une présentation atypique. Quelques hématomes lobaires ont déjà été rapportés chez des patients diagnostiqués *CADASIL* mais cela reste rare, d'autant plus avec présence de microsaignements lobaires et hémosidérose. Ces résultats sont importants et poussent le clinicien à se méfier de diagnostics différentiels en cas de dépistage *APP* négatif chez des patients jeunes. Aucun variant pathogène en revanche n'a été trouvé dans les gènes impliqués dans les AAC non-A β . La réalisation d'une analyse dédiée des gènes *TTR*, *CST3*, *BRI2*, *PRNP* ou *GSN* en cas d'AAC précoce après un dépistage négatif d'*APP* reste une question souvent soulevée en pratique. A notre connaissance, aucune étude n'a réalisé un tel dépistage génétique d'AAC non-A β dans une population de patients répondant aux critères révisés de Boston, indépendamment des antécédents familiaux ou des caractéristiques extra-neurologiques. Nos résultats préliminaires, avec une taille d'échantillon limitée, ne plaident pas en faveur d'une évaluation supplémentaire systématique de *TTR*, *CST3*, *BRI2*, *PRNP* ou *GSN* après un dépistage négatif de l'*APP*.

Malheureusement, cet effectif de 79 WES était insuffisant pour réaliser une étude d'association. Néanmoins, une première approche a consisté à comparer la fréquence cumulée des variants rares identifiés chez nos cas d'AAC précoce au sein des gènes *SORL1*, *TREM2*, *ABCA7*, *ABCA1* et *ATP8B4* comparativement à des témoins (via des données publiées récemment dans la littérature sur la database ADES). Il s'agit d'une database de contrôle d'origine caucasienne et dont les données sont disponibles au laboratoire de génétique de Rouen. Nous avons filtré les variants rares, c'est à dire avec une fréquence allélique < 0.01, respectant certains critères de couverture et qualité. En effet, près de 1000 variants rares et non-synonymes sont attendus par exome. Nous avons retenu les variants non-synonymes et appliqué des filtres sur les prédictions de pathogénicité. En effet, certaines prédictions dites *in silico* sont données par des logiciels, se basant notamment sur la conservation inter-espèces des résidus amino-acides mais aussi la distance physico-chimique entre deux acides aminés. Les logiciels

d'interprétation des variants faux-sens utilisés classiquement sont MutationTaster, Polyphen2 mais nous avons ici utilisé le score REVEL. Ce score intègre un bien plus grand nombre d'informations et semble plus robuste. Cette approche a été utilisée justement dans les études d'association dans la MA et des seuils de REVEL score ont été établis pour chacun des 5 gènes pour pouvoir classer les variants comme prédits pathogènes ou non. Nous avons utilisé exactement les mêmes seuils. Sans réaliser de test statistique, les pourcentages de patients AAC porteurs de variants rares semblaient similaires à ceux rapportés dans les MA précoce et plus importants que chez les contrôles. Nos données suggèrent que *SORL1*, *TREM2*, *ABCA7*, *ABCA1* et *ATP8B4* pourraient être impliqués dans l'AAC précoce avec 11/76 (14,4%) des cas portant au moins un variant rare prédit pathogène. D'autres études de plus grande envergure sont nécessaires pour confirmer ces résultats et réaliser des tests d'association a proprement parler. En ne prenant en compte parmi ces variants rares que les facteurs de risque de MA clairement validés, 5 patients AAC (6,6 %) étaient porteurs d'un variant perte de fonction dans *ABCA7* ou *ABCA1*, un était porteur du variant R47H *TREM2* et un était porteur du variant R62H *TREM2*. Parmi eux, 3/5 présentaient un hématomate lobaire spontané sans déclin cognitif évocateur de la MA associée, de sorte que l'association avec une MA co-existante pourrait ne pas expliquer tous les résultats.

Enfin, des approches génétiques antérieures dédiées à l'AAC d'une part ou sur population présentant des microsaignements, toutes causes confondues d'autre part ont été faites par GWAS. Plusieurs hits ont été mis en évidence sur des gènes tels que *ABCB1/HSPG2/OSBPL5/GASAL1/PSG5/CCND1/TGFB/TOMM40/CR1/LRP1/ACT/CYP46/ACE/BCHE/A2M/PON1/NEP/OLR1/CYP46/CTSD*. Nous avons également recherché des variants candidats (rares et prédits pathogènes) au sein de ces gènes sur notre cohorte mais aucun n'a été identifié.

Input of Exome Sequencing in Early-Onset Cerebral Amyloid Angiopathy

Lou Grangeon ¹, Camille Charbonnier ², Stéphane Rousseau ², Anne Claire Richard, Olivier Quenez, Aline Zarea, David Maltête..., Anne Boland, Elisabeth Tournier-Lasserre, CAA Genetics French study group, Gael Nicolas ^{2#}, David Wallon ^{1#}

Co last authors

¹ *Normandie Univ, UNIROUEN, Inserm U1245 and CHU Rouen, Department of Neurology and CNRMAJ, F-76000 Rouen, France*

² *Normandie Univ, UNIROUEN, Inserm U1245 and CHU Rouen, Department of Genetics and CNRMAJ, F-76000 Rouen, France*

Keywords: Cerebral Angiopathy Amyloid, Intracerebral Hemorrhage, Genetic Risk Factors, Alzheimer disease

Abbreviations:

AD: Alzheimer's Disease

CAA: Cerebral Angiopathy Amyloid

CMB: Cerebral Microbleeds

CSF : CerebroSpinal Fluid

ICH: Intracerebral hemorrhage

LP: Lumbar Puncture

MRI : Magnetic Resonance Imaging

QMPCSF: Quantitative multiplex PCR of short fluorescent fragments

Authors contribution :

LG : Collection, interpretation of data, drafting and manuscript revision

CC : Statistical analysis and interpretation of data, drafting of manuscript

SR: Collection, analysis and interpretation of data

ACR: collection and interpretation of data

OQ: collection and interpretation of data

AZ: collection and interpretation of data

AB: collection of data

ETL: collection, analysis and interpretation of data

GN: study concept, interpretation of data, drafting and manuscript revision

DW: study concept, interpretation of data, drafting and manuscript revision

ABSTRACT

Background: The genetic landscape of probable cerebral amyloid angiopathy (CAA) remains understudied. CAA shares some pathophysiological features and the APOE gene as a risk factor with Alzheimer disease (AD). Both conditions might share other genetic risk factors.

Objective: To assess the contribution of differential diagnosis genes to early-onset probable CAA as well as rare variants in genes recently associated with Alzheimer's disease (AD): *SORL1*, *TREM2*, *ABCA7*, *ABCA1* and *ATP8B4*

Methods: We conducted a whole exome analysis among 78 French patients with early-onset definite or probable CAA after negative genetic screening for *APP* mutations or duplications.

Results: Among 14 genes known to be involved in AD (*PSEN1*, *PSEN2*), non-A β CAA (*CST3*, *GSN*, *BRI2*, *TTR*, *PRNP*), cavernomatosis or vascular leukoencephalopathies, we detected two distinct pathogenic variants in *NOTCH3* in two patients, who presented with spontaneous lobar intracerebral hematomas at 58 and 65 years old, suggesting that both patients were eventually affected by CADASIL. Of the remaining 76 patients, 23.1% carried at least one *APOE* ϵ 2 allele and 43.6% carried at least one *APOE* ϵ 4 allele and 14/76 (19.7%) carried either a loss-of function (LOF) or a rare predicted damaging missense variants in *SORL1*, *TREM2*, *ABCA7*, *ABCA1* and *ATP8B4*. Five of these variants (6.6%) are considered as definite AD-risk factors (two *ABCA7* LOF, one *ABCA1* LOF, , one *TREM2* R47H one R62H *TREM2* variants). These rare variants were in similar ranges in early-onset CAA here as compared to early-onset AD in the largest published AD case-control study, ADES .

Conclusions: CADASIL should be considered as a differential diagnosis of probable CAA. In addition to *APOE*, the identification of rare AD risk factors in CAA patients suggests putative shared genetic determinism that should be further assessed in larger studies.

INTRODUCTION

A β -Cerebral amyloid angiopathy (CAA) is a devastating disease characterized by A β peptide deposits in the walls of cortical and leptomeningeal vessels leading to intracerebral hemorrhages. Patients most frequently experience stroke episodes and/or cognitive decline. They may also experience other CAA-related symptoms, such as seizures or transient symptoms. A β -CAA is frequently associated with Alzheimer's disease (AD), A β peptide aggregation being central in the pathophysiology of both diseases¹. The definite diagnosis of A β -CAA relies on neuropathology. A probabilistic diagnosis can still be proposed *in vivo* and is mainly based on brain imaging showing lobar hematomas, microbleeds, meningeal bleedings and/or superficial siderosis in blood-sensitive MRI sequences. These arguments are constitutive of the core revised Boston criteria².

Despite high diagnostic performance of these criteria, the diagnosis remains probabilistic, and several differential diagnoses may account for the presence of spontaneous ICH or microbleeds in the absence of underlying vascular malformations, tumors, or impaired coagulation. For example, pathogenic variants in several genes as *NOTCH3*, *COL4A1* or *COL4A2* are associated with ICH risk in young patients and can even be observed in apparently sporadic cases^{3,4}. In addition, in rare families, peptides/proteins other than A β aggregate in cerebral blood vessels and account for a different form of CAA. Gelsolin, transthyretin, prion, BRI2 or cystatin peptides/proteins may be the cause of CAA in cases with a pathogenic variant in the corresponding gene frequently associated with extra-neurological features^{5,6}. However, the distribution of these genetic differential diagnoses in a clinically diagnosed A β -CAA cohort remains unclear in absence of a systematic genetic screening.

Most cases of A β -CAA usually occur sporadically with aging being the main risk factor. However, some A β -CAA patients exhibit an early onset (age at first symptoms set arbitrarily at <66 years, similarly to early-onset AD), suggesting a potential contribution of genetic

factors. Despite the exclusion of patients with a disease onset before 55 in the revised Boston criteria, neuropathologically proven autosomal dominant forms may be associated with younger ages at onset⁷. A minority of patients carries causative duplications⁸ (or even triplications⁹) of the *APP* gene associated with increased expression APP mRNA levels¹⁰. A rare variant in the 3'UTR of *APP* has also been reported in a patient with early-onset CAA and increased *APP* mRNA levels¹¹. The *APP* gene encodes the precursor of the A β peptide. Six rare specific missense pathogenic variants in the coding sequence of the A β peptide in the *APP* gene, between the codon 692 and 694, can also cause autosomal dominant forms of CAA: The Dutch, Italian, Arctic, Iowa, Flemish, and Piedmont mutations¹¹. Mutations in the *PSEN1*^{12(p1)} and *PSEN2* genes¹³, involved in autosomal-dominant early-onset AD, have been reported in cases of A β -CAA, most of the time associated with AD¹⁴.

Beyond the existence of autosomal dominant forms of A β -CAA, the genetic component of A β -CAA etiology remains largely understudied. In patients not carrying rare pathogenic variants in autosomal dominant genes, who represent the vast majority of early-onset CAA patients, genetic risk factors may contribute to the disease. CAA and AD share the main one, *APOE*. While *APOE* $\epsilon 4$ alleles increase significantly the risk of both AD and CAA, the $\epsilon 2$ allele is known to decrease the risk of AD and conversely has been associated with cerebral hemorrhagic features in CAA patients^{15,16}. In AD, five major genes have been identified as moderate-to-strong risk factors through rare protein-damaging variants,¹⁷ namely *SORL1*^{18(p1)19(p1)}, *TREM2*^{20(p2)}, *ABCA7*^{21(p7)22(p7)}, and, very recently, *ABCA1* and *ATP8B4*²³. Given the pathophysiological links between A β -CAA and AD, we hypothesized that susceptibility factors with a moderate to high effect on AD risk might play a role in the multifactorial etiology of non-autosomal dominant early-onset A β -CAA.

In an effort to better understand the molecular bases of early onset CAA, we performed exome sequencing in a series of probable or definite early onset CAA patients following a

nationwide recruitment and assessed the contribution of differential diagnosis genes as well as rare variants in *SORL1*, *TREM2*, *ABCA7*, *ABCA1* and *ATP8B4* to probable CAA.

METHODS

CAA participants

Blood samples from unrelated cases with early-onset CAA (age at onset ≤ 65 years) from multiple French hospitals were initially referred to two centers (either CNR-MAJ, Rouen or Department of Genetics Lariboisière Hospital, Paris, France) for *APP* sequencing and search for *APP* duplication in a clinical setting (Figure 1). From patients not carrying *APP* pathogenic variants or duplications, we selected patients for exome sequencing among those fulfilling the revised Boston criteria²⁴ (except the age criterion) for probable CAA, probable CAA with supporting pathology, or definite CAA, after ascertainment by two expert neurologists. We did not include patients with possible CAA (Figure 1). Only patients from parents born in Europe were included in order to allow a comparison with ADES data. Data collection included personal medical and family history assessment, neurological examination, CSF AD biomarkers if available, and neuroimaging by MRI with blood-sensitive sequences (T2 GRE, SWI and/or SWAN). All hemorrhagic lesions were analyzed by visually counting each lesion. The presence and number of cerebral microbleeds (CMBs <10 mm diameter), ICH (≥ 10 mm) were evaluated and cortical superficial siderosis (CSS) was classified as focal (≤ 3 sulci) or disseminated (>4 sulci) after recording the number of sulci involved. Clinical data were retrieved from patients' medical charts as provided by each referring clinician. A positive family history was defined by the presence of at least one relative with early-onset AD, CAA or spontaneous lobar ICH among first-degree relatives. Patients were recruited regardless of family history.

All patients or legal guardians provided informed, written consent for genetic and research analyses. This protocol was approved by our local ethic committee (CERDE E2021-92).

CSF Analyses

CSF was obtained by LP and all centers used a common 10-ml polypropylene tube to collect

the CSF (catalog number 62.610.201; Sarstedt, Nümbrecht, Germany) as part of standard care. All samples were aliquoted after centrifugation for 10 minutes at +4°C into polypropylene Eppendorf tubes, then frozen at −80°C within 1 hour. Aβ42, Aβ40, Tau and phospho-Tau protein quantification were made using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Fujirebio-Europe, Ghent, Belgium) or semi-automated chemiluminescence enzyme immunoassays (LUMIPULSE®) according to the manufacturer's instructions. The analysis was performed in duplicate and a coefficient of variation (CV) less than 15% was considered as acceptable. In this case, the mean of the two measured values was taken as final result. All sites belong to the same national ePLM network which was created to enhance harmonization of procedures regarding CSF AD biomarkers. Although preanalytical and analytical processes were harmonized, local laboratory threshold were used as recommended to take into account any site effect on the quantification .

Whole Exome Sequencing and Bioinformatics Pipeline:

Exomes were captured using the Agilent SureSelect All Exons Human V6+UTR kits (Agilent technologies, CA, USA). Sequencing was performed on an Illumina Novaseq6000 (Illumina, San Diego, CA, USA) at the CNRGH (*Centre National de Recherche en Génomique Humaine*, Evry, France) with paired end, 150 base pair (bp) reads. WES resulted in an average individual median depth of coverage on targeted exome kits of 128.79 [89-150.15].

Reads were mapped to the GRCh37 reference genome with BWA. Picard Tools 2.18.0 (<http://picard.sourceforge.net>) was used to flag duplicate reads. Genome Analysis Toolkit (GATK) was applied for short insertion and deletion (InDels) realignment, base quality score recalibration (BQSR) and finally single-nucleotide variants and InDel discovery using Haplotype Caller across all samples simultaneously. Variants were annotated with SnpEff 4.5 and SnpSift4.5 software, using dbNSFP 4.0 and EnsemblGRCh37.75 databases. A quality score (VQSLOD) was estimated for each variant with the VQSR function from GATK 3.8.

Only genotypes satisfying the following quality filters were retained for analysis: read depth >10 and genotype quality (GQ) >30 (90 for heterozygous variants). Exonic and splice region variants (located ± 2 bp around each coding exon) with a minor allele frequency (MAF) <0.01 in gnomAD v2.1 were then extracted within each gene region.

Probable Loss of function (LOF) variants included nonsense, canonical splice site variants and frameshift indels. Missense variants were annotated and prioritized using REVEL (Rare Exome Variant Ensemble Learner²⁶, annotation obtained from DBNSFP4.1a, ranging from 0 to 1, highest scores indicating highest likelihood of a protein-damaging effect)²⁵

We first established a list of 14 Mendelian genes known to be involved in AD, non-A β CAA⁶, cavernomatosis or vascular leukoencephalopathies (Supp Table 1). Variants in this list were interpreted following ACMG-AMP recommendations²⁶.

In patients not carrying pathogenic or likely pathogenic variants in Mendelian genes, we assessed the presence of rare non-synonymous variants in the *TREM2*, *SORL1*, *ABCA7*, *ABCA1* and *ATP8B4* genes. Cumulative minor allele frequencies of different variant categories in these genes (LOF, missense with REVEL score > 0.75, 0.50 or 0.25) were compared to that of early-onset AD (EOAD), late-onset AD (LOAD) patients, and non-demented controls from the ADES (Alzheimer Disease European Sequencing consortium) large dataset gathering multiple international studies and previously recently reported in *Holstege et al.*²³.

Statistical analyses

Results are expressed as mean \pm standard deviation (SD) unless otherwise specified.

Fisher exact tests were used to establish any correlation between the presence of rare non-synonymous variants in the *TREM2*, *SORL1*, *ABCA7*, *ABCA1* and *ATP8B4* genes and clinical characteristics, CSF biomarkers or APOE genotype.

RESULTS:

Inclusion of 78 definite or probable early-onset CAA patients

We included 74 probable and four definite CAA patients. Baseline characteristics are presented on Table 1. A positive family history was displayed in 19 (24.3%) patients. The mean age at first neurological clinical event was 58.2 ± 8.7 years. The most common initial presentation was ICH, present in 37 patients (47.4%), followed by cognitive decline in 26 (33.3%) and transient focal neurological episodes (TFNE) in 6 (7.7%). Five patients presented with seizures, acute cognitive decline and behavioral changes with an aspect of CAA-related inflammation on MRI according to current criteria²⁷. Other symptoms included ischemic stroke (n=1), dizziness or non-specific headache (n=2) leading to cerebral imaging. During the course of the disease, 48 patients (61.5%) presented at least one symptomatic ICH and 44 (56.4%) showed secondary progressive cognitive impairment.

Among early-onset CAA patients who underwent LP with measurement of AD CSF biomarkers, all but three patients showed decreased A β 42 levels. Phospho-Tau levels were above the threshold in 24/46 patients (52.2%) and total Tau protein levels were abnormal in 14/19 (30.4%). Overall, 22/46 (47.8%) patients presented with isolated decreased A β 42 levels and the same number 22/46 (47.8%) with increased Tau and/or phospho-Tau and decreased A β 42 levels, the latter profile being compatible with a comorbid AD diagnosis.

Pathogenic or likely pathogenic variants in differential diagnosis genes

No pathogenic or likely pathogenic variant was found in *PSEN1* and *PSEN2* genes or in non-A β CAA genes (*CST3*, *GSN*, *BRI2*, *TTR*, *PRNP*).

We then screened genes implicated in vascular leukoencephalopathies. Two distinct pathogenic variants in *NOTCH3* were identified in two patients (Figure 2), suggesting that both patients were eventually affected by CADASIL (Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy).

Patient ROU-1149 carried the variant NM_000435.2:c.2182C>T, p.(Arg728Cys). This variant affected a cysteine residue in one of the EGF-like repeats, with a REVEL score of 0.52 and a minor allele frequency of 3.9×10^{-5} in the gnomAD v2.1 database corresponding to 2/121,945 carriers. This variant has already reported as pathogenic in patients with CADASIL²⁸. The patient experienced two lobar ICH, the first event occurring at 65 years of age. No family history of stroke, dementia or migraine with aura was reported. Unfortunately, no DNA or cerebral imaging from relatives was available. His cerebral imaging showed exclusive lobar hemorrhage without lacunes in deep grey matter. Mild white matter hyperintensities, precluding the anterior temporal lobes was displayed.

The second patient, EXT-1182, carried the variant NM_000435.2: c.1774C>T, p.(Arg592Cys), with a REVEL score of 0.69 and 1/125,189 carrier in gnomAD v2.1, adding a cysteine residue in one of the EGF-like repeats and also previously reported as pathogenic in variant databases and in the literature.²⁹ The patient suffered from depression and first presented with a right thalamic stroke in the context of severe high blood pressure at age 58. Brain MRI revealed a left temporal sequela of ICH, more than 10 posterior lobar microbleeds but also two microbleeds in the basal ganglia and white matter hyperintensities affecting temporal lobes. His sister suffered from chronic migraine (no further details available regarding the presence of aura or MRI data) and his brother was reported to present « micro hemorrhages » on MRI but data were not available to us. Their father died from heart attack around the age of 60 without any history of neurological disease and his mother deceased in the context of dementia at 92 years of age (no further information available). None of those two *NOTCH3* pathogenic variant carriers underwent LP. Overall, we retained CADASIL as final diagnosis for those two patients with atypical lobar hemorrhage.

Of note, one rare, predicted damaging (REVEL score = 0.72) missense *NOTCH3* variant was found in another patient: NM_000435.2:c.3083G>C, p.(Trp1028Ser). This variant is absent

both from patient-specific and gnomAD databases (v2.1) and does not affect a cysteine residue, which is the typical pathogenic mechanism for CADASIL-causing NOTCH3 variant. It is thus considered as a variant of unknown significance and the carrier was not excluded from further analyses.

***APOE* genotypes and rare non-synonymous variants in AD-associated genes**

After exclusion of the two pathogenic *NOTCH3* variant carriers, 18 of the 76 remaining patients (23.1%) carried at least one *APOE* ϵ 2 allele (*APOE2*) and 34 (43.6%) carried at least one *APOE* ϵ 4 allele (*APOE4*), including 3 *APOE* 2-2 and 12 *APOE* 4-4 genotypes. No correlation was found between the age of onset and *APOE* genotypes (Spearman test, $p=0.4$).

All rare non-synonymous variants identified in AD-associated genes were observed at the heterozygous state (Table 3). Overall, we observed 15/76 (19.7%) carriers of either a LOF or a missense variants belonging to a category associated with AD²³.

The *TREM2* p.(Arg47His) was found in one CAA patient in our dataset. This variant, with a frequency of 0.0025 in gnomAD is a well-validated AD risk factor with odds ratios around 2-4 depending on the studies^{23,17}. This patient presented a left occipital ICH at 63 years old with three right lobar CMBs showed on MRI. He had no cognitive complaint. Unfortunately, no CSF biomarkers were available. In addition, one patient carried another well replicated AD-associated variant, p.(Arg62His), with a frequency of 0.007 in gnomAD and a rather modest effect on AD risk³⁰. This patient suffered from progressive cognitive impairment, gait disturbance and transient neurological episodes suggestive of absence epilepsy since the age of 57 years and his MRI showed several, exclusively lobar CMBs but also disseminated CSS. The CSF AD biomarkers profile was indicative of AD.

Two LOF *ABCA7* variants (one nonsense and one frameshift) were observed in CAA patients, along with five missense variants with a REVEL score >0.25 . Altogether, LOF and missense

variants affected 9.2% of cases compared to 6.2% in EOAD, 5.0% in LOAD and 3.9% in controls from Holstege et al²³.

Interestingly, one LOF variant was found in a CAA patient (c.2115+1G>A splicing variant) in the recently reported *ABCA1* AD gene, despite extreme rarity of LOF variants in controls (0.08%) and AD cases (0.28% in EOAD and 0.18% in LOAD).²³ Altogether, *ABCA1* LOF and missense variants with a REVEL score >0.75 affected 1.3% of cases compared to 1.91% in EOAD, 1.5% in LOAD and 1.13% in controls from Holstege et al. ref

In the *SORL1* gene, no LOF variant was found. Three CAA patients carried the same p.(Asp2065Val) variant in *SORL1*, with a REVEL score of 0.57 and a frequency of ~0.4% in gnomAD. It is one of the most recurrent non-synonymous rare variant in *SORL1* in European populations, most of the other variants being extremely rare. Importantly, this variant seems to have similar frequencies in AD cases and controls^{19(p1)} and it was not kept in the analysis by Holstege et al. because of quality reasons (differential missingness). This variant did not seem to be associated with AD in this dataset and previous studies, albeit these studies were not powerful enough to assess this question accurately at the variant level (Bellenguez, Nicolas). Thus, our analysis did not reveal any rare non-synonymous *SORL1* variants associated with AD in our early onset CAA dataset.

Finally, three distinct missense variants were seen in *ATP8B4* in two CAA patients. The cumulative MAF of variants in *ATP8B4* in early-onset CAA patients (LOF + Missense Revel >0.25 = 3.9%) which seems similar to that of EOAD (3.56%) and LOAD patients (3.08%) but higher than non-demented controls (2.09%) from the ADES dataset. Overall, only one individual carried more than one rare variant of interest: ROU-5131 carried two missense variants in *ATP8B4*, although we could not determine if the variants were in trans or in cis

In a second-step, we used Fisher's exact tests to search for any correlation between carrying a

rare predicted damaging variant in *TREM2*, *SORL1*, *ABCA7*, *ABCA1* or *ATP8B4* and *APOE* genotypes, clinical presentation or CSF profiles. No correlation was found regarding *APOE2* genotypes (3/14 *APOE2* genotype in carriers of damaging variant versus 15/62 *APOE2* in non-carriers, $p= 1$), *APOE4* genotype (5/14 *APOE4* genotype in carriers of damaging variant versus 28/62 *APOE2* in non-carriers, $p= 0.76$). No correlation was found either between being carrier of a predicted damaging variant within one of the 5 genes of interest and initial isolated cognitive decline (4/14 initial cognitive decline in carriers of damaging variant versus 23/62 in non-carriers, $p= 0.52$), symptomatic ICH (7/14 symptomatic ICH in carriers of damaging variant versus 39/62 in non-carriers, $p= 0.38$) or CSF profile indicative of AD ($n= 5/9$ in carriers versus 18/39 in non-carriers, $p= 0.40$).

DISCUSSION

In this pilot study, we assessed the genetic diagnostic spectrum in early-onset CAA patients and the presence of rare variants in CAA causative autosomal dominant genes and in the *SORL1*, *TREM2*, *ABCA7*, *ABCA1* or *ATP8B4* genes that are involved in AD as risk factors.

The genetic component of CAA remains largely understudied. Here, we have constituted a series of early-onset CAA, with or without a family history and for whom a screening for *APP* mutation or duplication was negative, representing 95% of the study series. The first clinical event was hemorrhagic in a majority of patients, either spontaneous lobar ICH, or TFNE revealing the presence of disseminated CSS. CAA-ri, another event of CAA, occurred in a few patients. Only one third of patients presented with isolated cognitive impairment. However, all of them met the modified Boston diagnostic criteria for probable or definite CAA (except the age). In the absence of histological confirmation, these criteria showed a very good sensitivity and specificity. We found a high proportion of patients with at least one *APOE* $\epsilon 4$ allele (43% compared to 21-24% expected in Caucasian populations³¹) and at least one *APOE* $\epsilon 2$ allele (23% compared to 5% expected in general population¹⁵). While the *APOE* $\epsilon 4$ allele is a well-established genetic risk factor of both CAA and AD^{32,33}, the *APOE* $\epsilon 2$ allele seems to be specifically associated with an increased risk and severity of CAA³⁴ while relatively protecting against AD. Our series thus well replicates *APOE* association with CAA with concordant prevalence of *APOE* $\epsilon 4$ and *APOE* $\epsilon 2$ in CAA according to literature³⁵.

In this highly selected and well-phenotyped CAA population, we first looked for differential diagnoses. Interestingly, no pathogenic variant was found in genes involved in non-A β CAA⁶. ICH is not always encountered in non-A β CAA and extra-neurological features can guide the clinician³⁶. Nevertheless, performing dedicated *TTR*, *CST3*, *BRI2*, *PRNP* or *GSN* assessment in case of early-onset CAA after negative *APP* screening is still a relevant question in clinical

practice. To our knowledge, no study has performed such non-A β CAA genetic screening in a population of patients fulfilling the revised Boston criteria, regardless of family history or extra-neurological features. Our preliminary results, despite limited sample size, do not argue in favor of systematic additional *TTR*, *CST3* or *GSN* assessment after negative *APP* screening in the absence of early-onset, suggestive family history or extra-neurological features³⁷.

Surprisingly, we identified two pathogenic variants in *NOTCH3*, leading to a final diagnosis of CADASIL with an atypical presentation. One patient presented at the age of 66 with two symptomatic lobar ICHs without any ischemic stroke and the second patient had a thalamic stroke at 58 of age, and then lobar ICH. Spontaneous lobar ICHs are rare in CADASIL. In a recent study, lobar ICHs were present in 8% of the 127 Taiwanese patients with CADASIL with a few being strictly lobar³⁸. The ICH prevalence in Caucasian patients with CADASIL ranged from 0.5% to 2%^{39,40}. Despite CSS was absent in 364 French–German CADASIL patients, 47% presented with lobar microbleeds but only 10% strictly lobar⁴¹. This current study illustrates that CADASIL might be considered in case of lobar ICH or microbleeds, especially if associated to deep microbleeds or lacunes. Nevertheless, coexisting AD, CAA and CADASIL neuropathological hallmarks have been reported in a few case reports^{42,43,44}. It remains difficult to speculate on whether association was coincidental, AD and CAA being common diseases, or if there might be a pathophysiological link.

Of note, one of the patient with a pathogenic *NOTCH3* variant here also carried one rare missense variant Gly395Ser in *ATP8B4*, which is the main variant driving AD genetic risk²³, and an *APOE2/4* genotype. Unfortunately, no histological study was available to look for co-existing CAA in this patient.

In a second step, we assessed the variants within 5 genes of interest, considered as novel or recently discovered AD risk factors with moderate to high effect, after exclusion of the latter

two patients^{17,23}. We notably observed two LOF variants in *ABCA7* and one in *ABCA1*, the latter being extremely rare. In AD, moderate to high variant effect-sizes were observed for LOF variants in *SORL1*, *TREM2* and *ABCA1* (albeit not significant by itself for *ABCA1*, probably because of extreme rarity of LOF variants and thus insufficient power, even in a study as large as ADES with >32,000 individuals). Here, the small size of our series did not allow us to perform a burden test. We thus compared our results to published gene-based burdens from 16,036 AD cases and 16,522 controls²³. Rare predicted damaging variants seemed to be in similar frequency ranges in *ABCA7* and *ATP8B4* in early-onset CAA as in early-onset AD, both compared to LOAD and non-demented controls from the ADES dataset. However, this descriptive comparison did not allow any meaningful statistical test. Indeed, despite using similar methods and variant selection criteria, additional biases did not allow us to directly compare burdens, as the diverse quality of sequencing in ADES that might modify actual burdens of rare variants in similar ranges as the sampling fluctuations from our pilot study. For example, as ADES gathered multiple studies with diverse capture and sequencing methods, the status of some rare variants was set to “missing”, in cases of differences in case-control sequencing quality at this position, as was the case of the the p.(Asp2065Val) recurrent variant in *SORL1*.

Overall, our data suggest that *TREM2*, *ABCA7*, *ABCA1* and *ATP8B4* might be involved in early-onset CAA with 11/76 (14.4%) of cases carrying at least one rare predicted damaging variant after exclusion of the *SORL1* p.(Asp2065Val) variant. Further larger studies are required to confirm these results and better understand the contribution of these genes to CAA. Taking into account only validated AD-risk factors among rare variants, 5 CAA patients (6.6%) carried either a LOF variant in *ABCA7* or *ABCA1*, one was a carrier of the R47H *TREM2* variant and one carried the R62H *TREM2* variant. Among them, 3/5 presented spontaneous lobar ICH without cognitive decline suggestive of AD, so that comorbid AD

might not explain all the results (table 3).

Of note, half of the included early-onset CAA patients showed elevated Tau or phospho-Tau protein levels in their CSF, as already reported in the literature⁴⁵, reflecting a possibly associated AD pathology. Conversely, an isolated decrease of CSF A β 42 level was found in the other half of patients. This has been suggested as a pure vascular profile of amyloid deposition, without parenchymal deposits and therefore without consecutive Tau or phospho-Tau markers. Although associated AD is highly likely in a number of our patients, the clinical presentation, the CSF profile and APOE genotypes in this series are consistent with CAA at the forefront. In addition, the selection of early-onset CAA patients here may reduced the probability of aging-associated comorbidities impacting vasculopathy⁵. Importantly, rare variants found in AD-related variants were not identified exclusively or more frequently in patients with suspected CAA+AD, suggesting that these variants might have a role in CAA independently of AD.

Preliminary research or case reports already suggested the role of *SORL1*, *TREM2*, *ABCA7*, and *ABCA1* genes in CAA. For instance, severe levels of CAA next to typical AD neuropathology were found in AD patients carrying rare LOF and missense variants in *ABCA7*⁴⁶ and *SORL1*⁴⁷. CAA-ri was already described in a patient carrying a *SORL1* variant⁴⁸. Interestingly, a patient with Tangier disease, due to homozygous *ABCA1* variants, presented with recurrent lobar intracerebral hemorrhages⁴⁹. In mouse models, lack of *ABCA1* and *TREM2* considerably increased the level of CAA and lobar microbleeds^{50 51 52}.

Pathophysiological consequences of variants with reduced or lost function in these genes appear to be compatible with a role as a risk factor of A β -CAA along with their established role in AD. The known functions of these genes products are mainly involved in the production or the clearance of the A β peptide. *SORL1* encodes SorLA, a key protein involved in the processing of the A β precursor protein (APP) and in vitro studies showed increased A β

secretion associated with reduced SorLA function¹⁸. *TREM2* is predominantly expressed in microglia and has a role in immune response and clearance of A β aggregates. *ABCA7* and *ABCA1* encode phospholipid transporters⁵³. Reduced *ABCA7* function is associated with both increased production and decreased clearance of A β . *ABCA1* loss of function is associated with poor APOE lipidation of CNS lipoproteins, which facilitates A β aggregation. The role of *ATP8B4*, also encoding a phospholipid transporter mainly expressed in microglia, remains to be determined.

Interestingly, early-stage CAA was associated with dysregulation in immune response networks and lipid processing but also decreased levels of *TREM2* with no reactive microgliosis⁵⁴. If further confirmed, those promising candidates in CAA genetic determinism would underline the impaired A β -aggregation and secretion and lipid metabolism as the mainstay in CAA pathophysiology. As for *APP* mutations or duplications⁵⁵, the same variant in those candidate genes could be responsible for AD phenotype in some patients and for prominent CAA phenotype in others.

Other processes such as decreased vascular reactivity or Nitric Oxide (NO) deficiency were also suggested to favor CAA^{56,57}. Of note, no candidate variant was found in NO pathway genes (data not shown).

Here, we did not assess the role of common variants. In AD, 75 common loci were associated with AD risk in genome-wide association studies (GWAS) performed using DNA chips. Each of these loci have a modest effect on AD risk and were combined into so-called polygenic risk scores (ref Bellenguez 2022). Most of these variants are non coding and can thus not be identified with exome sequencing. It might be interesting to generate GWAS data in a large sample of CAA patients to further assess the hypothesis if shared genetic component of CAA with AD. To conclude, by performing WES in 78 early-onset probable CAA patients, we found two patients with CADASIL and rare predicted damaging variants in AD-associated

genes *TREM2*, *ABCA7*, *ABCA1* and *ATP8B4*. Overall, 6.6% patients carried at least one well validated AD risk factor, in addition to *APOE*, suggesting putative shared genetic determinism. Although the role of AD-associated rare variants in CAA should be further studied in larger samples using the same selection criteria of early-onset CAA, we believe that there are evidences here to recommend screening for *NOTCH3* in patients with any atypical phenotype of small vessel disease.

REFERENCES :

1. Greenberg SM, Bacskai BJ, Hernandez-Guillamon M, Pruzin J, Sperling R, van Veluw SJ. Cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer disease—one peptide, two pathways. *Nat Rev Neurol*. Published online 2019:1–13.
2. Linn J, Halpin A, Demaerel P, et al. Prevalence of superficial siderosis in patients with cerebral amyloid angiopathy. *Neurology*. 2010;74(17):1346–1350.
3. Weng YC, Sonni A, Labelle-Dumais C, et al. COL4A1 mutations in patients with sporadic late-onset intracerebral hemorrhage. *Ann Neurol*. 2012;71(4):470–477.
4. Zhang C, Li W, Li S, et al. CADASIL: two new cases with intracerebral hemorrhage. *Ann Clin Transl Neurol*. 2017;4(4):266–271.
5. Yamada M. Cerebral Amyloid Angiopathy: Emerging Concepts. *J Stroke*. 2015;17(1):17. doi:10.5853/jos.2015.17.1.17
6. Revesz T, Holton JL, Lashley T, et al. Genetics and molecular pathogenesis of sporadic and hereditary cerebral amyloid angiopathies. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2009;118(1):115–130.
7. Kamp JA, Moursel LG, Haan J, et al. Amyloid β in hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis-Dutch type. *Rev Neurosci*. 2014;25(5). doi:10.1515/revneuro-2014-0008
8. Rovelet-Lecrux A, Hannequin D, Raux G, et al. APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. *Nat Genet*. 2006;38(1):24–26. doi:10.1038/ng1718
9. Grangeon L, Cassinari K, Rousseau S, et al. Early-Onset Cerebral Amyloid Angiopathy and Alzheimer Disease Related to an APP Locus Triplication. *Neurol Genet*. 2021;7(5):e609. doi:10.1212/NXG.0000000000000609
10. Pottier C, Wallon D, Lecrux AR, et al. Amyloid- β Protein Precursor Gene Expression in Alzheimer’s Disease and Other Conditions. *J Alzheimers Dis*. 2012;28(3):561–566. doi:10.3233/JAD-2011-111148
11. Nicolas G, Wallon D, Goupil C, et al. Mutation in the 3’ untranslated region of APP as a genetic determinant of cerebral amyloid angiopathy. *Eur J Hum Genet EJHG*. 2016;24(1):92–98. doi:10.1038/ejhg.2015.61
12. Sánchez-Valle R, Lladó A, Ezquerra M, Rey MJ, Rami L, Molinuevo JL. A novel mutation in the PSEN1 gene (L286P) associated with familial early-onset dementia of Alzheimer type and lobar haematomas. *Eur J Neurol*. 2007;14(12):1409–1412. doi:10.1111/j.1468-1331.2007.01988.x
13. Nochlin D, Bird TD, Nemens EJ, Ball MJ, Sumi SM. Amyloid angiopathy in a Volga German family with Alzheimer’s disease and a presenilin-2 mutation (N141I). *Ann Neurol*. 1998;43(1):131–135. doi:10.1002/ana.410430124
14. Mann DM, Pickering-Brown SM, Takeuchi A, Iwatsubo T, Group members of the FADPS. Amyloid angiopathy and variability in amyloid β deposition is determined by mutation position in presenilin-1-linked Alzheimer’s disease. *Am J Pathol*. 2001;158(6):2165–2175.
15. Wu L, Zhao L. ApoE2 and Alzheimer’s disease: time to take a closer look. *Neural Regen Res*. 2016;11(3):412.
16. Genin E, Hannequin D, Wallon D, et al. APOE and Alzheimer disease: a major gene with semi-dominant inheritance. *Mol Psychiatry*. 2011;16(9):903–907. doi:10.1038/mp.2011.52
17. Bellenguez C, Charbonnier C, Grenier-Boley B, et al. Contribution to Alzheimer’s

- disease risk of rare variants in TREM2, SORL1, and ABCA7 in 1779 cases and 1273 controls. *Neurobiol Aging*. 2017;59:220.e1-220.e9.
doi:10.1016/j.neurobiolaging.2017.07.001
18. Champion D, Charbonnier C, Nicolas G. SORL1 genetic variants and Alzheimer disease risk: a literature review and meta-analysis of sequencing data. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2019;138(2):173-186. doi:10.1007/s00401-019-01991-4
 19. Nicolas G, Charbonnier C, Wallon D, et al. SORL1 rare variants: a major risk factor for familial early-onset Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry*. 2016;21(6):831-836. doi:10.1038/mp.2015.121
 20. Jonsson T, Stefansson H, Steinberg S, et al. Variant of TREM2 associated with the risk of Alzheimer's disease. *N Engl J Med*. 2013;368(2):107-116.
 21. Cuyvers E, De Roeck A, Van den Bossche T, et al. Mutations in ABCA7 in a Belgian cohort of Alzheimer's disease patients: a targeted resequencing study. *Lancet Neurol*. 2015;14(8):814-822.
 22. Le Guennec K, Nicolas G, Quenez O, et al. ABCA7 rare variants and Alzheimer disease risk. *Neurology*. 2016;86(23):2134-2137.
 23. Holstege H, Hulsman M, Charbonnier C, et al. Exome sequencing identifies rare damaging variants in ATP8B4 and ABCA1 as novel risk factors for Alzheimers Disease.
 24. Charidimou A, Boulouis G, Frosch MP, et al. The Boston criteria version 2.0 for cerebral amyloid angiopathy: a multicentre, retrospective, MRI-neuropathology diagnostic accuracy study. *Lancet Neurol*. 2022;21(8):714-725.
 25. Liu X, Li C, Mou C, Dong Y, Tu Y. dbNSFP v4: a comprehensive database of transcript-specific functional predictions and annotations for human nonsynonymous and splice-site SNVs. *Genome Med*. 2020;12(1):1-8.
 26. Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet*. 2015;17(5):405-424. doi:10.1038/gim.2015.30
 27. Auriel E, Charidimou A, Gurol ME, et al. Validation of Clinicoradiological Criteria for the Diagnosis of Cerebral Amyloid Angiopathy-Related Inflammation. *JAMA Neurol*. 2016;73(2):197-202. doi:10.1001/jamaneurol.2015.4078
 28. Rutten JW, Hack RJ, Duering M, et al. Broad phenotype of cysteine-altering NOTCH3 variants in UK Biobank: CADASIL to nonpenetrance. *Neurology*. 2020;95(13):e1835-e1843. doi:10.1212/WNL.00000000000010525
 29. Testi S, Malerba G, Ferrarini M, et al. Mutational and haplotype map of NOTCH3 in a cohort of Italian patients with cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL). *J Neurol Sci*. 2012;319(1-2):37-41.
 30. Sims R, van der Lee SJ, Naj AC, et al. Rare coding variants in PLCG2, ABI3, and TREM2 implicate microglial-mediated innate immunity in Alzheimer's disease. *Nat Genet*. 2017;49(9):1373-1384. doi:10.1038/ng.3916
 31. Corbo RM, Scacchi R. Apolipoprotein E (APOE) allele distribution in the world. Is APOE* 4 a "thrifty" allele? *Ann Hum Genet*. 1999;63(4):301-310.
 32. Greenberg SM, Briggs ME, Hyman BT, et al. Apolipoprotein E epsilon 4 is associated with the presence and earlier onset of hemorrhage in cerebral amyloid angiopathy. *Stroke*. 1996;27(8):1333-1337. doi:10.1161/01.str.27.8.1333
 33. Liu Y, Yu JT, Wang HF, et al. APOE genotype and neuroimaging markers of Alzheimer's disease: systematic review and meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2015;86(2):127-134.

34. Nicoll JA, Burnett C, Love S, et al. High frequency of apolipoprotein E epsilon 2 allele in hemorrhage due to cerebral amyloid angiopathy. *Ann Neurol.* 1997;41(6):716-721. doi:10.1002/ana.410410607
35. Yu L, Boyle PA, Nag S, et al. APOE and cerebral amyloid angiopathy in community-dwelling older persons. *Neurobiol Aging.* 2015;36(11):2946-2953. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2015.08.008
36. Revesz T, Holton JL, Lashley T, et al. Sporadic and familial cerebral amyloid angiopathies. *Brain Pathol.* 2002;12(3):343-357.
37. Biffi A, Greenberg SM. Cerebral Amyloid Angiopathy: A Systematic Review. *J Clin Neurol.* 2011;7(1):1. doi:10.3988/jcn.2011.7.1.1
38. Liao YC, Hu YC, Chung CP, et al. Intracerebral Hemorrhage in Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy With Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy: Prevalence, Clinical and Neuroimaging Features and Risk Factors. *Stroke.* 2021;52(3):985-993. doi:10.1161/STROKEAHA.120.030664
39. Puy L, De Guio F, Godin O, et al. Cerebral Microbleeds and the Risk of Incident Ischemic Stroke in CADASIL (Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy With Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy). *Stroke.* 2017;48(10):2699-2703. doi:10.1161/STROKEAHA.117.017839
40. Nannucci S, Rinnoci V, Pracucci G, et al. Location, number and factors associated with cerebral microbleeds in an Italian-British cohort of CADASIL patients. *PloS One.* 2018;13(1):e0190878. doi:10.1371/journal.pone.0190878
41. Wollenweber FA, Opherck C, Zedde M, et al. Prognostic relevance of cortical superficial siderosis in cerebral amyloid angiopathy. *Neurology.* 2019;92(8):e792-e801. doi:10.1212/WNL.00000000000006956
42. Paquet C, Jouvent E, Mine M, et al. A cortical form of CADASIL with cerebral A β amyloidosis. *Acta Neuropathol (Berl).* 2010;120(6):813-820. doi:10.1007/s00401-010-0758-y
43. Gray F, Robert F, Labrecque R, et al. Autosomal dominant arteriopathic leukoencephalopathy and Alzheimer's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1994;20(1):22-30. doi:10.1111/j.1365-2990.1994.tb00953.x
44. Thijs V, Robberecht W, De Vos R, Sciot R. Coexistence of CADASIL and Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2003;74(6):790-792. doi:10.1136/jnnp.74.6.790
45. Grangeon L, Paquet C, Guey S, et al. Cerebrospinal Fluid Profile of Tau, Phosphorylated Tau, A β 42, and A β 40 in Probable Cerebral Amyloid Angiopathy. *J Alzheimers Dis JAD.* Published online April 1, 2022. doi:10.3233/JAD-215208
46. Van den Bossche T, Slegers K, Cuyvers E, et al. Phenotypic characteristics of Alzheimer patients carrying an ABCA7 mutation. *Neurology.* 2016;86(23):2126-2133.
47. Alvarez-Mora MI, Blanco-Palmero VA, Quesada-Espinosa JF, et al. Heterozygous and Homozygous Variants in SORL1 Gene in Alzheimer's Disease Patients: Clinical, Neuroimaging and Neuropathological Findings. *Int J Mol Sci.* 2022;23(8):4230.
48. Du Y, Liu C, Ma C, et al. Cerebral amyloid angiopathy-related inflammation: a case report presenting with a rare variant in SORL1 gene. *BMC Neurol.* 2019;19(1):1-6.
49. Feng W, Sidorov E, Smith K, Selim M. Recurrent lobar intracerebral hemorrhage in Tangier disease. *J Stroke Cerebrovasc Dis Off J Natl Stroke Assoc.* 2012;21(8):909.e5-6. doi:10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2011.10.009
50. Yang J, Kou J, Lalonde R, Fukuchi KI. Intracranial IL-17A overexpression decreases cerebral amyloid angiopathy by upregulation of ABCA1 in an animal model of Alzheimer's disease. *Brain Behav Immun.* 2017;65:262-273. doi:10.1016/j.bbi.2017.05.012

51. Wahrle SE, Jiang H, Parsadanian M, et al. Deletion of Abca1 increases Abeta deposition in the PDAPP transgenic mouse model of Alzheimer disease. *J Biol Chem.* 2005;280(52):43236-43242. doi:10.1074/jbc.M508780200
52. Koldamova R, Staufienbiel M, Lefterov I. Lack of ABCA1 considerably decreases brain ApoE level and increases amyloid deposition in APP23 mice. *J Biol Chem.* 2005;280(52):43224-43235. doi:10.1074/jbc.M504513200
53. Huynh TPV, Davis AA, Ulrich JD, Holtzman DM. Apolipoprotein E and Alzheimer's disease: the influence of apolipoprotein E on amyloid- β and other amyloidogenic proteins. *J Lipid Res.* 2017;58(5):824-836. doi:10.1194/jlr.R075481
54. Taylor X, Cisternas P, You Y, et al. A1 reactive astrocytes and a loss of TREM2 are associated with an early stage of pathology in a mouse model of cerebral amyloid angiopathy. *J Neuroinflammation.* 2020;17(1):1–18.
55. Guyant-Marechal I, Berger E, Laquerriere A, et al. Intrafamilial diversity of phenotype associated with app duplication. *Neurology.* 2008;71(23):1925–1926.
56. Tan XL, Xue YQ, Ma T, et al. Partial eNOS deficiency causes spontaneous thrombotic cerebral infarction, amyloid angiopathy and cognitive impairment. *Mol Neurodegener.* 2015;10:24. doi:10.1186/s13024-015-0020-0
57. Liao FF, Lin G, Chen X, et al. Endothelial Nitric Oxide Synthase-Deficient Mice: A Model of Spontaneous Cerebral Small-Vessel Disease. *Am J Pathol.* 2021;191(11):1932-1945. doi:10.1016/j.ajpath.2021.02.022

Figure 1 Summary of the study: CAA patients selected for WES and count of causative variants

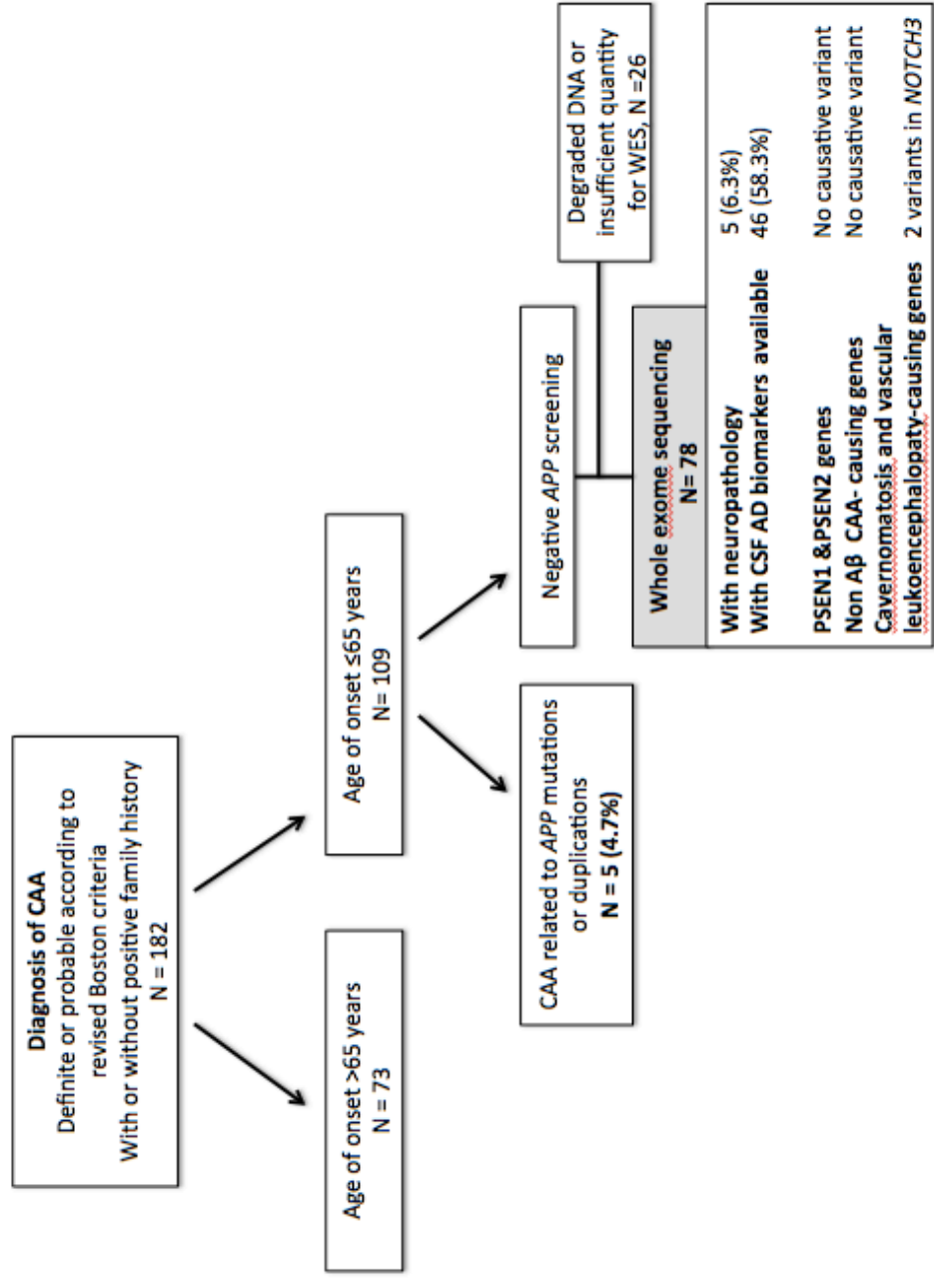


Table 1: Clinical characteristics of 78 definite or probable CAA French patients

Age at onset, years, mean \pm SD	58.2 \pm 8.7 [32-65]
Sex, Male n (%)	51 (65.3%)
First neurologic event	
ICH, n patients (%)	37 (47.4%)
Cognitive decline, n patients (%)	26 (33.3%)
Ischemic stroke, n patients (%)	1
AAC- ri n patients (%)	5 (6.3%)
TFNE revealing CSS, n patients (%)	6 (7.7%)
Vertigo or headache, n patients (%)	2 (2.5%)
Symptomatic lobar ICH	49 (62.8%)
Seizure during follow-up, n patients (%)	21 (26.9%)
Cognitive disorder during follow-up, n patients (%)	44 (56.4%)
CAA diagnosis following Boston revised criteria	
- Definite	4
- Probable	74
Familial history of ICH or EOAD in 1st degree relative	19 (24.3%)
APOE genotype	
APOE2-2 carriers n (%)	3 (3.8%)
APOE2-3 carriers n (%)	11 (14.1%)
APOE2-4 carriers n (%)	5 (6.4%)
APOE3-3 carriers n (%)	28 (35.9%)
APOE3-4 carriers n (%)	17 (21.8%)
APOE4-4 carriers n (%)	12 (15.3%)
CSF biomarkers available, n(%)	46 (58.3%)
Aβ-42 (pg/ml) , mean \pm SD	415.1
Aβ-40 (pg/ml) , mean \pm SD	7778.7 (20/78)
Tau (pg/ml), mean \pm SD	468.3
Phospho-Tau (pg/ml), mean \pm SD	72.9

ICH: intra cerebral hemorrhage; TFNE transient focal neurological episodes; CAA cerebral amyloid angiopathy; CSF cerebrospinal fluid,

EOAD early-onset Alzheimer's disease, SD standard deviation

Figure 2. Representative MRI imaging of the two carriers ROU-1149 (panel A) and EXT-1182 (panel B) of a pathogenic NOTCH3 variant and presenting with a history initially compatible with CAA.

Panel A: Left and middle axial T2-GRE weighted-sequence showing several posterior lobar microbleeds and bilateral temporal ICH sequela; right: axial T2 weighted-sequence showing mild periventricular white matter lesions of posterior topography and dilated perivascular spaces.

Panel B: Left and middle axial T2-GRE weighted-sequence showing several posterior lobar microbleeds; right: axial FLAIR weighted-sequence showing mild periventricular white matter lesions and previous thalamic stroke.

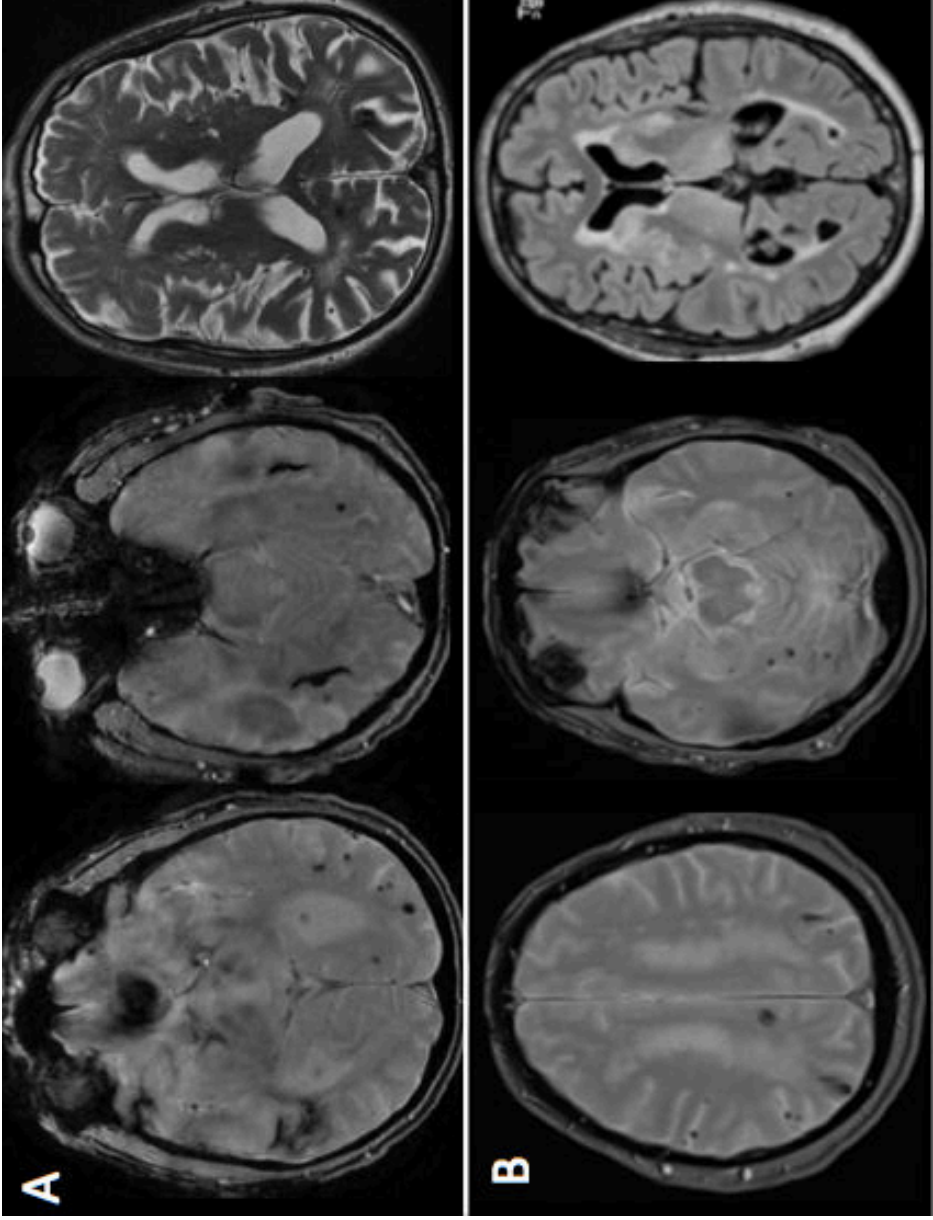


Table 3: Rare variants identified in *TREM2*, *SORL1*, *ABCA1*, *ABCA7* and *ATP8B4* in CAA patients and carrier characteristics

ID	APOE	AOO	Clinical presentation	Chr coordinates	Type	Gene	cDNA	Protein	REVEL score*	gnomAD
----	------	-----	-----------------------	-----------------	------	------	------	---------	--------------	--------

EXT-2260-001	33	63	Symptomatic occipital ICH with CMBs on MRI/ No cognitive decline	chr6:41129 252	missense	TREM2	c.140G>A	p.(Arg47His)	0.33	0.0015285 7
ROU-5259-001	23	57	Cognitive decline / Walking disorder/ Absence/ Lobar CMBs and CSS on MRI/ CSF indicative of AD	chr6_41129 207_	missense	TREM2	c.185G>A	p.(Arg62His)		0.0076296 1
ROU-0367-001	23	<65	3 symptomatic lobar ICH/ No cognitive decline	chr11:1214 95816	missense	SORL1	c.6194A>T	p.(Asp2065Val)	0.57	0.0023885 4
EXT-2376-001	33	43	Symptomatic parietal ICH with CMBs on MRI and small left deep infarct	chr11:1214 95816	missense	SORL1	c.6194A>T	p.(Asp2065Val)	0.57	0.0023885 4
EXT-0166-001	34	59	Rapidly progressive cognitive decline and behavioral disorders with early seizures. Autopsy showed severe CAA with coexisting AD lesions. No family history	chr11:1214 95816	missense	SORL1	c.6194A>T	p.(Asp2065Val)	0.57	0.0023885 4
ROU-5131-001	23	48	2 symptomatic occipital ICH with lobar CMBs on MRI, no cognitive decline. Of note, one treated aneurysm of anterior cerebral artery	chr15:5022 3353	missense	ATP8B4	c.1605G>T	p.(Leu535Phe)	0.66	0.0020790 7
EXT-0774-001	44	61	Behavioral disorders revealing CAA-related inflammation on MRI, biopsy confirming vascular A β deposits	chr15:5036 6373	missense	ATP8B4	c.58C>G	p.(Arg20Gly)	0.33	0.0027712 3
EXT-2041-001	34	<65	Cognitive decline with CMBs and CSS on MRI, CSF biomarkers profile indicative of AD, family history of ICH in his mother at 54	chr19:1043 091	LOF (nonsense)	ABCA7	c.631C>T	p.(Arg211*)	NA	3.18776e-5
EXT-1447-001	23	46	Occipital ICH followed 3 months after by new frontal ICH, biopsy confirmed CAA	chr19:1055 907	LOF (frameshift)	ABCA7	c.4208delT	p.(Leu1403fs)	NA	0.0005417

ROU-5270-001	34	61	diagnosis	chr19:1045206	missense	ABCA7	c.1421C>T	p.(Thr474Met)	0.40	NA
EFA-0620-001	44	55	Cognitive decline and early seizures, CSF profile with isolated decreased A β 42 level, family history of EOAD	chr19:1045170	missense	ABCA7	c.1385T>C	p.(Val462Ala)	0.49	NA
EXT-1654-001	44	32	Atypical imaging suggestive of CAA-related inflammation with CSF indicative of AD	chr19:1047497	missense	ABCA7	c.2113G>A	p.(Ala705Thr)	0.38	NA
ROU-5187-001	33	45	Initially isolated cognitive decline followed by symptomatic ICH, CMBs showed on MRI, CSF profile with isolated decreased A β 42 level	chr19:1051006	missense	ABCA7	c.2639G>A	p.(Arg880Gln)	0.72	0.0013744 ²
EXT-1704-001	33	39	Transient neurological episodes revealing disseminated CSS with lobar CMBs on MRI	chr19:1059079	missense	ABCA7	c.5458G>A	p.(Gly1820Ser)	0.91	0.0002552 ³
EXT-0636-001	33	50	Symptomatic occipital ICH, one deep lacunar infarct, numerous lobar CMBs, CSF indicative of AD	chr9:107591196	LOF (splice)	ABCA1	c.2115+1G>A		NA	NA

ICH: intra cerebral hemorrhage; CMB cerebral microbleeds; CSS cortical superficial siderosis; CAA cerebral amyloid angiopathy; CSF cerebrospinal fluid, EOAD Early-onset Alzheimer's disease, LOF loss-of-Function
 *The same REVEL thresholds that of Holstege et al were used i.e > 0.25 for ABCA7 (NM_019112.3), TREM2(NM_018965.3) and ATP8B4 (NM_024837.3) ; >0.50 for SORL1 (NM_003105.5) and >0.75 for ABCA1 (NM_005502.3), except for the TREM2 p.R62H variant which was previously shown to be nominally associated with AD (ref Sims et al.)

Supp Table 1: List of 14 genes involved in Alzheimer's Disease, non - A β CAA, cavernomatosis or vascular leukoencephalopathy

Disease categories

Alzheimer Disease and CAA	<i>PSENI (AD)</i> <i>PSEN2 (AD)</i>
Non A β -CAA	<i>TTR (AD)</i> <i>CST3 (AD)</i> <i>GSN (AD)</i> <i>BRI2 (AD)</i> <i>PRNP (AD)</i>
Cavernomatosis	<i>KRIT1 (CCM1) (AD)</i> <i>MGC4607 (CCM2) (AD)</i> <i>PDCD10 (CCM3) (AD)</i>
Vascular leukoencephalopathy	<i>NOTCH3 (CADASIL) (AD)</i> <i>HTRA1 (CARASIL) (AR, AD)</i> <i>COL4A1 (AD)</i> <i>COL4A2 (AD)</i> <i>TREX1 (AD)</i> <i>COLGALTI (AR)</i>

CAA cerebral amyloid angiopathy; AD: Autosomal Dominant, AR: Autosomal recessive

10. DISCUSSION ET PERSPECTIVES :

Les objectifs de ces travaux de thèse étaient d'une part d'explorer la diversité clinico-radiologique de l'AAC et des calcifications cérébrales primaires en vue d'une meilleure identification et efficacité diagnostique mais aussi d'un meilleur suivi pronostique, et d'autre part d'approfondir les connaissances sur leur déterminisme génétique.

Ces deux types de microangiopathie sont caractérisés par des dépôts au niveau de la paroi des petits vaisseaux cérébraux. Dans les CCP, la présence de dépôts phosphocalciques est complètement pathologique, liée probablement à une altération de l'unité neuro-vasculaire et rupture de barrière hémato-encéphalique. Dans l'AAC, il s'agit de dépôts d'A β fibrillaire, dont la forme sauvage a un certain rôle physiologique au niveau cérébral (plasticité notamment) mais qui sont pathologiques par leur forme fibrillaire d'une part et leur quantité excessive d'autre part. Notre travail souligne une importante diversité sous-tendant probablement différents sous-groupes d'AAC et mécanismes physiopathologiques, de surproduction d'A β d'une part et de diminution de clairance d'autre part. Les présentations cliniques de l'AAC sont au premier plan « vasculaire » avec des hématomes lobaires liés à la fragilité des vaisseaux due aux dépôts corticaux et leptoméningés. Les troubles cognitifs peuvent en partie être dû aux dépôts parenchymateux souvent associés en cas de MA coexistante à l'AAC. Des mutations causales ou anomalie du nombre de copies du gène *APP* qui code le peptide A β sont connues dans l'AAC mais des facteurs de risque fréquents, comme le génotype *APOE4* ou rares comme des mutations des gènes *SORL1*, *TREM2*, *ABCA1*, *ABCA7* ou *ATP8B4* pourraient intervenir dans les formes tardives sporadiques.

Dans les CCP, les vaisseaux profonds sont touchés avec des dépôts uniquement vasculaires et non parenchymateux mais l'expression clinique finalement ne comporte aucun événement « vasculaire », ischémique ou hémorragique. Les manifestations cliniques motrices ou psychiatriques doivent être liées alors à un retentissement neuronal de ces dépôts vasculaires, qui à ce jour est peu compris. Les gènes connus pour être impliqués dans les CCP codent des exportateurs ou importateurs de phosphate inorganique (*SLC20A2* ou *XPR1*), ou le ligand ou récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes (*PDGFB* et *PDGFRB*) exprimés respectivement sur les cellules endothéliales et péricytes et *MYORG* semble exprimé sur les astrocytes. Tout semble donc converger vers l'unité neuro-vasculaire.

Nous comprenons que pour appréhender la diversité clinico-radiologique et le déterminisme génétique de ces entités complexes, une collaboration rigoureuse multidisciplinaire entre neurologues, radiologues, généticien, bioinformaticien et biostatisticien est primordiale.

Certaines corrélations phénotype-génotype établies et des phénotypes cliniques reconnaissables clairs

Certaines CCP, comme la forme autosomique récessive liée aux mutations *MYORG*, prennent un phénotype reconnaissable, contrairement aux formes autosomiques dominantes. Notre étude est la première dans le domaine des CCP à identifier un pattern clinique et radiologique reconnaissable, pouvant guider le clinicien dans les analyses génétiques à demander. C'est en outre une étude sémiologique poussée, l'utilisation d'outils comme le score de calcification total et une collaboration avec l'équipe de biostatistique qui a permis via des Heatmap par exemple d'objectiver ce pattern radiologique spécifique avec calcifications sévères et atteinte du tronc cérébral. Ceci souligne l'importance d'approche collaborative transdisciplinaire. Cette étude nous apporte ici des éléments clairs aidant dans le raisonnement diagnostique, qui sont utilisables en pratique courante.

Dans une autre étude, l'analyse clinique, radiologique mais aussi pronostique de certaines formes bien particulières de microangiopathies comme les formes inflammatoires d'AAC a permis d'intégrer ce phénotype extrême dans l'entité AAC au sens large. Les formes inflammatoires semblent correspondre à un stade avancé d'AAC avec charge amyloïde sévère et favorisé par un déterminisme génétique avec le génotype APOE4/4 présent chez plus de la moitié des cas. L'impact du génotype APOE peut être à plusieurs niveaux : clairance du peptide A β , conformation fibrillaire mais APOE est aussi connu pour être impliqué dans le système du complément et donc pouvant moduler la neuro-inflammation. Une étude génétique dédiée à ces formes inflammatoires comparativement aux formes d'AAC non-inflammatoires, indépendamment de leur âge, serait intéressante pour explorer l'hypothèse d'une combinaison d'autres facteurs de risque rares impliqués dans les mécanismes inflammatoires, par approche voie candidate par exemple. A l'heure actuelle, tous âges confondus, nous avons collecté au laboratoire 12 prélèvements de forme inflammatoire sans cause génétique identifiée. Cet effectif est indiscutablement insuffisant mais cette

entité est très rare. Une collaboration est actuellement en cours avec plusieurs services de neurologie français afin de constituer une série de patients AAC-ri avec données d'imagerie (environ 80). Cette collaboration sera l'occasion de pouvoir potentiellement élargir le nombre de prélèvements de patients avec un diagnostic d'AAC-ri dans les années à venir.

Un diagnostic différentiel majeur d'AAC-ri est la vascularite primitive des petits vaisseaux cérébraux. La présentation radiologique est très proche, et des mécanismes sous-jacents communs sont possibles. Toujours dans un objectif de mieux caractériser ces phénotypes extrêmes de microangiopathie, une comparaison avec les patients diagnostiqués vascularite primitive des petits vaisseaux confirmée par biopsie cérébrale (cohorte prospective COVAC, n=50) est en cours.

Nouveaux marqueurs phénotypiques biologiques à évaluer ou identifier : Intérêt des biomarqueurs du LCR mais aussi plasmatiques

En dehors de certains phénotypes de microangiopathie reconnaissables détaillés ci-dessus, les données phénotypiques disponibles ne sont pas parfois pas suffisantes pour évoquer une entité particulière ou un mécanisme génétique sous-jacent compte tenu notamment de l'hétérogénéité de l'expression phénotypique. C'est le cas par exemple des duplications du gène *APP* chez qui nous avons souligné une diversité clinique majeure : Des formes hémorragiques dans 30% des cas, des formes inflammatoires possibles et des formes cognitives « pures » avec diagnostic de MA alors que sur le plan histologique, les dépôts vasculaires y sont pourtant sévères. Sur le plan radiologique, parmi 19 patients avec données d'IRM disponibles, seuls 14 remplissaient les critères modifiés de Boston. Les cas avec mutation « Hollandaise » du gène *APP* ((p.Glu693Gln) servent de longue date de modèle pour développer les outils radiologiques dans l'AAC car elles sont considérées comme un modèle « vasculaire pur ». Les duplications d'*APP* semblent conduire à plusieurs sous-types de tableaux, certains avec une MA au premier plan, d'autre des manifestations hémorragiques. Ce modèle est complexe mais permet cependant de soulever certains points qui n'ont pas été retrouvés en cas de mutation Hollandaise d'*APP*, comme la présence de microsaignements et dépôts vasculaires profonds possibles.

Établir de nouveaux marqueurs diagnostiques face à une telle diversité semble pertinent. Les biomarqueurs du LCS étaient par exemple altérés chez tous les patients porteurs de duplication *APP* qui avaient bénéficié d'une PL. Ceci apporte un élément de réflexion important à élargir aux formes d'AAC tardives, sans diagnostic génétique identifié.

Malgré les nouveaux critères v2.0 de Boston qui n'ont pas intégré les biomarqueurs du LCR, ceux-ci ont de nombreux avantages et pourraient réellement apporter un degré de certitude diagnostique supplémentaire. Les cas de microangiopathies mixtes sont une problématique courante, représentant jusqu'à 30% des cas avec hématomate cérébral symptomatique. Même si les nouveaux critères insistent sur l'exclusion du diagnostic d'AAC en cas de microsaignements profonds, la coexistence de microsaignements lobaires et profonds est une réalité rencontrée fréquemment chez la personne âgée hypertendue. Dans notre étude rapportant les résultats de 79 exomes chez des patients AAC probable, nous avons finalement retenu deux diagnostics de *CADASIL* chez des patients avec nombreux microsaignements lobaires et hématomate lobaire. Il est ainsi difficile de se baser uniquement sur des marqueurs radiologiques pour établir un diagnostic. Un degré de certitude supplémentaire avec les biomarqueurs du LCS est pertinent aussi en recherche pour les inclusions dans les études génétiques afin d'éviter les phénotopies. Plusieurs collaborations internationales prévues ou en cours pourraient permettre dans le futur de consolider nos premiers résultats sur les biomarqueurs du LCS dans l'AAC

- 1) Dans notre étude portant sur le LCS, plus de 85% des patients avaient des biomarqueurs Alzheimer altérés mais peut être que d'autres biomarqueurs sont plus spécifiques de l'AAC et moins partagés avec la MA. Une collaboration est en cours avec l'équipe du Pr Marcel Verbeek aux Pays-Bas (Donders Institute for Brain, Cognition and Behaviour, Radboud) qui étudie plusieurs biomarqueurs, principalement dans le LCS de patients MA, CAA mais aussi chez des modèles animaux (rat) grâce à une plateforme d'immunohistochimie. Le projet reposerait sur le dosage au sein du LCS de nos patients CAA de biomarqueurs candidats tels que PDGFR β (comme marqueur de rupture de barrière hémato-encéphalique, lié aux péricytes, retrouvé précédemment élevé dans le LCS de patient avec déclin cognitif et associé à une plus grande perméabilité de la barrière selon IRM

(*dynamic contrast-enhanced DCE*)(413) ou encore la lactadherine, impliquée dans l'angiogenèse ou encore les peptide solubles APP α et APP β (414).

Les demandes de financement sont en cours. Il serait notamment très intéressant de doser ces candidats au sein du LCS des 11 patients AAC probable de notre étude qui avaient des dosages des biomarqueurs Alzheimer normaux.

- 2) Établir des corrélations avec l'imagerie cérébrale permettrait de mieux étayer l'apport diagnostique potentiel des biomarqueurs du LCS mais aussi de mieux comprendre les mécanismes de leur altération. Nous n'avons pas retrouvé pour le moment de corrélation entre le LCS et le nombre de micro-saignements ou l'étendue de l'hémorragie. Un nouveau marqueur radiologique a été validé dans la dernière version v2.0 des critères révisés de Boston, publiée en août 2022 : les espaces périvasculaires dilatés des centres semi-ovales. Ils sont considérés comme un reflet de défaut de clairance périvasculaire, et donc du peptide A β . Un travail ciblé sur la corrélation entre les biomarqueurs dosés chez nos patients et ce marqueur radiologique est en cours grâce à une analyse radiologique centralisée (Dr Andreas Charidimou, Massachusetts General Hospital Stroke Research Center, Harvard Medical School, Boston et le Dr Grégoire Boulouis, neuroradiologue au CHU de Tours).
- 3) Face au caractère invasif de la PL, plusieurs équipes travaillent au développement de marqueurs plasmatiques dans l'AAC. Une première étape serait encore une fois de se concentrer sur des formes d'AAC certaine, héréditaire pour pouvoir les identifier et ensuite tâcher d'élargir ces découvertes au plus grand nombre. Dans ce contexte, nous avons débuté une collaboration avec l'équipe du Pr Henrik Zetterberg (Université de Gothenburg, Suède) avec envoi de prélèvements sanguins de certains patients porteurs de mutation ponctuelle et duplication *APP* mais aussi du patient avec triplication *APP*. La majeure limitation ici est le faible nombre de prélèvements en plasma frais congelé.

Poursuite de la caractérisation moléculaire de l'AAC et recherche de nouveaux mécanismes génétiques causaux

Pour répondre des nombreux cas d'AAC sans diagnostic génétique et notamment des cas de survenue très précoce (avant 50 ans), l'hypothèse pourrait être une combinaison de facteurs de risque génétiques rares mais aussi un déterminisme Mendélien.

La mise en évidence de nouveaux gènes causaux en cas de forme précoce est une étape importante, pouvant modifier nos pratiques en termes de conseil génétique. Pour cela, nous envisageons des analyses en trio ou intrafamiliale. Par ailleurs, la recherche de facteurs de susceptibilité génétique (et non pas mutation causale) faite initialement au sein des formes d'AAC précoces (<65 ans) pourrait à terme s'appliquer aux formes plus fréquentes de survenue tardive.

1) Analyse en trio

Jusqu'à présent, seuls des gènes intervenant au sein de la cascade amyloïde ont été impliqués dans l'AAC: le gène *APP* code pour le peptide $A\beta$; *APOE* intervient dans la clairance de ce peptide et les potentiels autres facteurs de susceptibilité identifiés dans notre étude d'exome semblent également jouer un rôle dans la clairance d' $A\beta$ via les transporteurs de la famille ATP-binding cassette (*ABCA1* et *ABCA7*) ou le système microglial. On peut également émettre l'hypothèse d'une implication de gènes intervenant sur une toute autre voie. Il a été abordé par exemple dans l'introduction les dysfonctionnement endothéliaux dans la physiopathologie de l'AAC, pouvant survenir de façon très précoce dans le développement de la maladie, voire même avant l'apparition des plaques amyloïdes. Néanmoins, rechercher de nouveaux gènes, sans aucun a priori sur leur fonction ou la voie impliquée, au sein d'une population de relativement petit effectif semble complexe. Les AAC jeunes sont principalement d'allure sporadique, sans contexte familial d'hématomes lobaires ou de troubles cognitifs. Dans ces cas-là, l'hypothèse de la contribution de variants exoniques *de novo* est à envisager ; c'est à dire un mécanisme autosomique dominant ou récessif (mais d'exploration plus complexe) mais apparu entre deux générations expliquant le caractère sporadique. Le séquençage d'exomes en trio consiste à séquencer un individu atteint et ses deux parents non malades, à la recherche d'une mutation *de novo*. On filtre alors les variants rares hérités des parents pour ne conserver

que les variants propres au cas index. En moyenne, chaque individu n'est porteur que de quelques variants exoniques *de novo* seulement : Le taux de mutation de novo par individu et par exome est de l'ordre de 1 à 1,5(415). Du fait de ce faible nombre, leur identification et l'analyse ultérieure de leur potentielle pathogénicité est plus simple. Cette stratégie est utilisée face à un cas sporadique d'une maladie rare mais aussi face à des cas de « phénotypes extrêmes » de maladies plus fréquentes, comme un âge de début très précoce d'AAC par exemple (avant 50 ans). Chez les MA jeunes non autosomiques dominantes par exemple, il existe aussi une majorité de formes sporadiques. Leur étude par séquençage d'exomes de trios, réalisé au laboratoire ces dernières années, a permis d'identifier de nouveaux gènes candidats tels que *VPS35*, et *MARK4* (359) Nous avons pu recruter au laboratoire ces 3 dernières années quatre trios d'AAC. Ces 4 cas index répondent aux critères suivants : Diagnostic d'AAC probable selon les critères révisés de Boston (en dehors de l'âge) et parents vivants non atteints (absence de symptômes évocateurs d'AAC ou de MA), en l'absence d'antécédents familiaux d'hématome lobaire ou de démence au premier et deuxième degré. Malheureusement, nous ne disposons pas d'IRM cérébrale pour certifier l'absence de microsaignements ou hémosidérose asymptomatique chez les parents. Cependant, au vu de l'âge avancé des parents des 4 cas index, de l'absence de troubles cognitifs ou de tout événement neurologique hémorragique, nous les avons considérés comme non atteints. Ceci est tout de même une limite de notre approche. L'analyse des variants identifiés après application de nos filtres est en cours et les efforts de recrutement de trio se poursuivent. Chaque trio peut être déterminant et interprété de façon tout à fait autonome. Ce recrutement est cependant difficile du fait des âges des cas index, avec nombreux parents décédés.

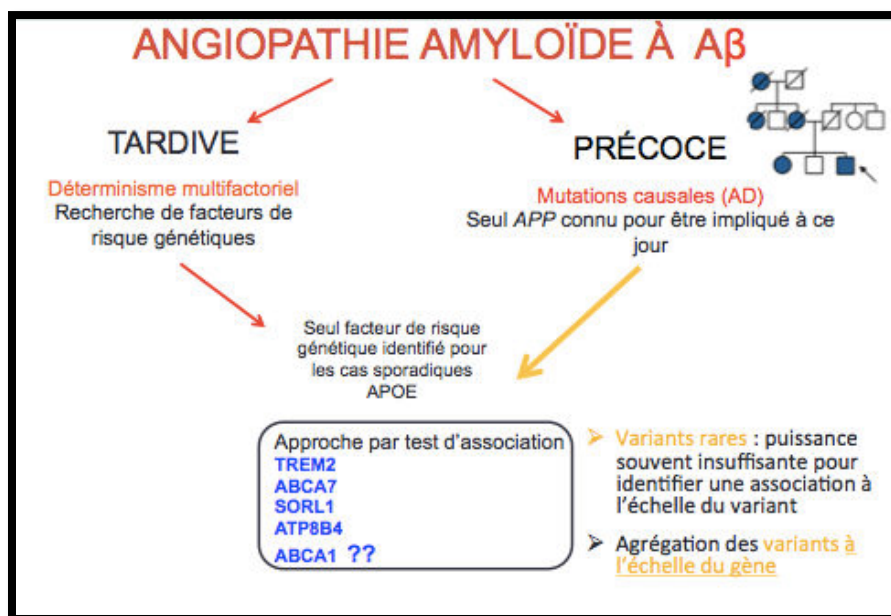
2) Analyse intrafamiliale

Une approche comparative intrafamiliale avec recherche directe d'un variant causal par co-ségrégation serait également cruciale pour identifier de nouveaux gènes mais à l'heure actuelle, nous n'avons pas pu réaliser de séquençage de plusieurs individus d'une même famille. L'effort de recrutement de grandes familles AAC doit se poursuivre.

3) Mise en évidence de facteurs de risque par test d'association

L'hypothèse polygénique avec combinaison de facteurs de risque rares à effet faible à modeste, voire des mécanismes de pénétrance incomplète, pourrait être la réponse expliquant ou contribuant à l'AAC quel que soit l'âge. Notre stratégie consiste donc tout d'abord à rechercher la présence de ces facteurs de risque génétiques au sein d'une population d'AAC précoce, étant donné qu'un certain déterminisme génétique est particulièrement suspecté. L'avantage est ainsi de nous soustraire de certains autres facteurs liés au vieillissement notamment sur la paroi vasculaire. Si cette première étape est validée, la recherche de ces facteurs pourra se faire au sein de l'ensemble des AAC (Figure 22).

Figure 22 – Identification de facteurs de risque dans l'AAC : des formes précoces à l'application aux formes tardives



Notre première étude d'exome a comporté un nombre insuffisant de prélèvements pour mener un test d'association de type *Burden Test*. Pour répondre à cela, le projet GENERALITY2 repose sur un recrutement prospectif sur 3 ans d'AAC précoce (<65 ans), avec ou sans antécédent familial, au sein de 10 centres français. L'objectif est d'inclure 100 patients et de pouvoir mener ce test d'association et évaluer tout d'abord le poids des variants rares déjà

identifiés dans la MA, *i.e.* *SORL1*, *TREM2*, *ABCA1*, *ABCA7* et *ATP8B4* dans l'AAC(409). Le financement (50000 euros) est déjà obtenu grâce la Fondation pour la Recherche sur les AVC; la demande d'accord d'un CPP catégorie 3 est en cours. Le recueil prospectif de données de suivi et notamment récurrence hémorragique la première année après l'inclusion du patient est prévu de façon à pouvoir rechercher des corrélations entre la présence de ces variants rares et le pronostic.

Ces différentes approches sont assez novatrices dans l'AAC et la diffusion de nos travaux au sein de la communauté scientifique et neurologique nous permettra certainement de recruter progressivement au sein de l'ensemble des centres sur le territoire.

La question de la validité de notre stratégie d'étudier les phénotypes extrêmes ou cas familiaux pour extrapoler par la suite aux formes sporadiques tardives peut cependant être soulevée. En effet, notre étude phénotypique comparant l'imagerie des duplications *APP* et les formes sporadiques par exemple ainsi que les études histologiques comparant les patients porteurs de duplication, de mutation ponctuelle d'*APP* et des cas sporadiques tardifs (262) tendent à montrer des sous-types d'AAC différents. Si l'AAC du sujet jeune correspond finalement à une autre entité que chez le sujet âgé, les conclusions découlant de nos travaux sur les formes précoces pourraient ne pas être applicables au plus grand nombre. Cette stratégie nous semble cependant pertinente. Elle a déjà été d'ailleurs utilisée dans le développement de marqueurs radiologiques de l'AAC tardive pour établir les critères de Boston, qui ont découlés d'étude de patients porteurs de mutation *APP* de type Hollandaise. Nous pouvons aussi évoquer ce qui est réalisé dans le cadre de la MA. Une cohorte internationale DIAN, mise en place au niveau mondial par la Washington University, Saint-Louis, USA, avec suivi longitudinal de familles porteuses de mutations causales de MA (au sein des gènes *PSEN1*, *PSEN2* ou *APP*) inclut des patients symptomatiques mais aussi des patients porteurs de mutations et asymptomatiques. Dans ces cas, la pénétrance clinique de ces mutations est complète, de même que la prédictibilité de l'âge de début des symptômes d'une génération à l'autre. Dès lors, plusieurs essais thérapeutiques actuellement à la recherche de traitement préventif (anticorps anti-A β principalement) se basent sur ces patients porteurs de mutations dont on sait qu'ils vont développer la maladie mais qui ne

présentent pas encore de symptômes. Si cette stratégie est efficace, elle pourrait être ensuite élargie à une population à risque plus large.

Nos approches d'étude génétique reposent sur le *whole exome sequencing* et pourraient nous permettre de répondre à cet objectif mais nous pourrions manquer la détection de certaines anomalies génomiques pertinentes comme la détection de variants dans les régions non codantes, ou les expansions nucléotidiques. Les mutations *3'UTR* découvertes dans l'AAC sont l'illustration de possibles implications de mutations non codantes (250). Ainsi, le recours au *whole genome sequencing* paraît pertinent mais soulève naturellement des problématiques techniques, logistiques et d'identification d'un signal pertinent. De même, un grand nombre de cas de CCP restent sans diagnostic génétique. Le Plan Médecine France Génomique 2025 permet dans le cadre des CCP (comme dans certaines autres pathologies) sans anomalie de *SCL20A2* et *PDGFB*, de réaliser un génome dans la démarche diagnostique. Ceci pourrait certainement dans les années à venir enrichir nos connaissances sur le déterminisme génétique des CCP avec l'identification de mutations dans les régions non codantes.

Identification de modulateurs génétique d'expression clinique dans des formes au phénotype très variable

1) Facteurs génétique « modificateur d'expression » fréquents: intérêt des puces de GWAS

Nous avons montré dans deux de nos études que des formes à déterminisme génétique par duplication et triplication *APP* sont responsables de phénotypes très variables. Notre étude regroupant une grande série de duplication a permis d'explorer l'impact des gènes environnants *APP*. Ceux-ci ne semblent pas impliqués dans la modulation de l'expression phénotypique. D'autres modulateurs pourraient se situer soit sur le chromosome 21 et plus à distance d'*APP*, soit même en dehors du chromosome 21, notamment certains facteurs de risque plus fréquents. Plusieurs prélèvements de nos patients duplication du gène *APP* (n = 30) ont été envoyés pour réaliser des puces de GWAS pour

explorer les « hits » mis en évidence dans la MA dans un premier temps mais il sera également intéressant de regarder ceux de l'étude récente en GWAS focalisée sur une population avec microsaignements cérébraux (342)

2) Identification de facteurs « d'expression » rares : Test d'association génétique

Nous recherchons dans le projet GENERALITY2 des facteurs de risque rares de développer une AAC. On pourrait également envisager que certains variants rares ne soient pas impliqués dans le développement de la maladie mais dans son expression clinique. Un exemple concret est le génotype APOE ϵ 2 dans l'AAC qui ne favorise pas les dépôts vasculaires A β (contrairement à l'APOE ϵ 4) mais favoriserait plutôt l'hémorragie à partir de vaisseaux sanguins déjà chargés d' A β . Pour cette stratégie, l'approche sera comparative selon la modalité phénotypique mais présente comme limite majeure de disposer d'un nombre très important de patients.

Dans les CPP, compte tenu d'une expressivité clinique très variable avec plus d'un tiers des patients porteurs d'une mutation causale, asymptomatiques, il pourrait aussi exister des facteurs encore inconnus mais à même de moduler l'expression clinique. Quels sont ceux qui pourraient contribuer au fait qu'un patient devienne symptomatique plutôt qu'un autre ? S'agit-il de facteurs environnementaux ou génétique ? La série française de CCP collectée actuellement au laboratoire de génétique de Rouen comporte près de 300 patients, dont la moitié avec un diagnostic génétique. Parmi eux, la proportion de patients asymptomatiques se rapproche de 40%. Nous discutons actuellement de rechercher des facteurs « d'expression » chez ces patients porteurs de mutations causales symptomatiques comparativement aux non symptomatiques.

Cette identification de facteurs de risque génétique impose des réflexions sur le plan éthique. En l'absence de traitement de précision basé sur la génétique et de schéma préventif spécifique, le principal impact du diagnostic génétique dans l'AAC et les CCP reste le conseil génétique. Celui-ci s'applique aux gènes mendéliens mais pas aux facteurs de risque à ce jour. Il ne peut pour l'instant être envisageable de rendre un statut de porteur de ces facteurs de susceptibilité. En revanche, leur étude est riche d'enseignement sur les mécanismes potentiellement en cause. Ils permettent aussi à

terme, avec un nombre suffisant de patients, d'établir des courbes de risque tout au long de la vie, étape préalable nécessaire avant d'envisager une stratégie de prévention médicamenteuse.

Des mécanismes génétiques aux mécanismes cellulaires : développement d'IPSC

Plusieurs études en biologie cellulaire se sont basées sur des cellules souches pluripotentes induites (iPSC pour *induced pluripotent stem cells*) à partir de fibroblastes, le plus souvent obtenus par biopsie cutanée de patients porteurs de mutation causale. Un modèle d'IPSC a été développé dans l'AAC à partir d'une biopsie cutanée de patient porteur de mutation *APP* de type Hollandaise par exemple (416). Il est possible ensuite de reprogrammer en culture cellulaire ces IPSC en neurones différenciés ou cellules endothéliales par exemple. L'intérêt est ici de travailler avec des neurones ou cellules endothéliales vivants et porteurs de la mutation causale. Ces modèles plus proches de la situation physiopathologique réelle permettent de décomposer un modèle cellulaire spécifiquement secondaire à l'anomalie génétique. Ces techniques sont maîtrisées par l'équipe du laboratoire de génétique du CHU de Rouen (Dr L. Miguel) et appliquées notamment dans la MA(417)(418)(419)(420). Elles pourraient être appliquées dans l'AAC afin d'étudier par exemple les étapes induisant la sécrétion du peptide APP jusqu'à son agrégation extracellulaire ou sa clairance mais aussi les phénomènes de dysfonction endothéliale et surtout leurs étapes chronologiques. En outre, un modèle récemment mis au point de barrière hémato-encéphalique *in vitro* à partir d'IPSC (421) a permis de montrer un impact de l'isoforme APOE4 sur le fonctionnement des péricytes par exemple. Un autre modèle se basant sur des cellules endothéliales, encore une fois obtenues à partir d'IPSC, permet l'évaluation de l'action directe du peptide A β sur la perméabilité de la barrière (422).

Une question primordiale est de savoir si les formes sporadiques tardives d'AAC découlent des mêmes mécanismes que les formes d'AAC plus précoces, pour lesquelles un déterminisme génétique est plus fortement suspecté. Ainsi, l'étude comparative d'IPSC issues de patients AAC sporadique tardive et de patients AAC plus précoce liée à une mutation causale serait pertinente. A l'heure actuelle, un premier projet pourrait se baser sur les fibroblastes qui ont été obtenus par biopsie cutanée du patient porteur de triplification APP. Des biopsies cutanées chez certains patients vivants porteurs de duplication identifiée récemment sont en cours.

11. CONCLUSION

L'AAC tout comme les CCP, sont des entités complexes à appréhender, regroupant comme nous l'avons montré, plusieurs sous-entités découlant de mécanismes sous-jacents différents. Il est donc primordial pour étudier ces conditions pathologiques d'identifier le maximum de caractéristiques phénotypiques propres ou spécifiques à la fois sur le plan clinique mais également radiologique ou dans les fluides biologiques. Les biomarqueurs, quel que soit leur modalité, offrent un niveau de certitude bien souvent pertinent pour développer les investigations en recherche, à l'instar de ce qui a été possible dans la maladie d'Alzheimer. Une collaboration pluridisciplinaire est dès lors nécessaire pour permettre un diagnostic de précision précoce, objectiver un signal pertinent vis-à-vis de nouveaux marqueurs ou nouvelles voies physiopathologiques ou génétiques. En effet, ces entités sont sous-tendues par un certain déterminisme génétique, que ce soit par mécanisme Mendélien ou bien polygénique avec intervention de facteurs de risque plus ou moins rares et ayant un impact fonctionnel. Nous sommes convaincus qu'il existe certainement de nouveaux gènes à découvrir mais les études futures porteront également sur l'analyse de la charge potentielle de ces facteurs de risque (notamment rares à fort effet) sur la survenue de la maladie et la présentation clinique. A l'avènement des thérapies géniques, des stratégies de prévention thérapeutique pourraient dès lors à l'utilisation d'un score polygénique comprenant obligatoirement l'ensemble des variants rares et fréquents jusqu'à présent connus pour tenir compte de l'ensemble du spectre génétique. Cette stratégie permettra alors d'identifier une population à risque de développer une microangiopathie et d'adapter la prise en charge en conséquence en cohérence avec une médecine de précision

12. LISTE DES ANNEXES

12.1. Article publiés :

1) Nicolas G, **Grangeon L**, Wallon D. Reply: New homozygous indel in MYORG linked to brain calcification, thyroidopathy and neuropathy. Brain. 2019 Sep 1;142(9):e52.

LETTER TO THE EDITOR

Reply: New homozygous indel in *MYORG* linked to brain calcification, thyroidopathy and neuropathy

✉ Gaël Nicolas,¹ Lou Grangeon² and David Wallon²

- 1 Normandie Univ, UNIROUEN, Inserm U1245 and Rouen University Hospital, Department of Genetics and CNR-MAJ, F 76000, Normandy Center for Genomic and Personalized Medicine, Rouen, France
- 2 Normandie Univ, UNIROUEN, Inserm U1245 and Rouen University Hospital, Department of Neurology and CNR-MAJ, F 76000, Normandy Center for Genomic and Personalized Medicine, Rouen, France

Correspondence to: Gaël Nicolas
Inserm U1245, Faculté de médecine, 22, boulevard Gambetta,
76183 Rouen, France
E-mail: gaelnicolas@hotmail.com

Sir,

In their letter, Ferreira and Oliveira (2019) report a novel protein-truncating homozygous variant in the *MYORG* gene in a Brazilian patient with primary familial brain calcification (PFBC), born to consanguineous parents. This gene was reported recently as the first PFBC-causative gene with autosomal recessive inheritance (Yao *et al.*, 2018). In a recent issue of *Brain*, we reported the phenotype associated with bi-allelic likely pathogenic or pathogenic *MYORG* variants in 16 French patients from 11 families (Grangeon *et al.*, 2019). After in-depth analysis of medical flow charts, brain CT scans and MRI of these patients as compared to 102 PFBC patients with a likely pathogenic or pathogenic variant in one of the autosomal dominant PFBC genes (AD-PFBC, i.e. carrying variants in *SLC20A2*, *PDGFRB*, *PDGFB* or *XPR1*), we showed that *MYORG* bi-allelic mutation carriers exhibited a distinct phenotype with three major features. First, they primarily suffered from motor symptoms (cerebellar, pyramidal, akinetic-hypertonic), with dysarthria being the most common presenting symptom, and showed a high clinical penetrance with 15/16 patients being symptomatic, the 16th patient being the youngest. Second, they exhibited the most severe calcification pattern, which possibly spared the caudate nuclei and encompassed the brainstem in 80% of the patients. Indeed, PFBC is characterized by the presence of calcifications affecting at least both lentiform nuclei (Nicolas *et al.*, 2013); patients often exhibit more extensive calcifications typically encompassing the caudate nuclei, the

thalamus, the cerebellar hemispheres (centred on the dentate nuclei), but also the vermis and/or the cerebral cortex in some *PDGFRB*, *SLC20A2* and *XPR1* mutation carriers (Nicolas *et al.*, 2013, 2015; Grangeon *et al.*, 2019). Strikingly, we observed calcifications in the brainstem in only 3/102 patients with AD-PFBC. In all three cases, they were restricted to the mesencephalon and were rated as faint. Among *MYORG* patients, however, 12/15 showed brainstem calcifications and, even more strikingly, eight of them showed pontine calcifications as compared to none of the 102 AD-PFBC patients, highlighting the high specificity of this radiological sign (Fig. 1B). Third and last, *MYORG* patients exhibited a diverse degree of cerebellar atrophy of the vermis and antero-superior hemispheric lobes (Fig. 1C).

The novel case identified by Ferreira and Oliveira recapitulates all three features, further confirming the high specificity of this triad for *MYORG* bi-allelic mutations. We assessed the presence of these symptoms in the 49 cases from 27 families reported so far, including our own report (Yao *et al.*, 2018; Arkadir *et al.*, 2019; Ferreira and Oliveira, 2019; Forouhideh *et al.*, 2019; Grangeon *et al.*, 2019; Peng *et al.*, 2019; Ramos *et al.*, 2019). Depending on the availability of the information in the respective articles, these reports confirm the following:

- (i) A high clinical penetrance with only 8/49 (16.3%) considered asymptomatic. The age at last examination of asymptomatic bi-allelic *MYORG* mutation carriers ranged from 28 to 53 years

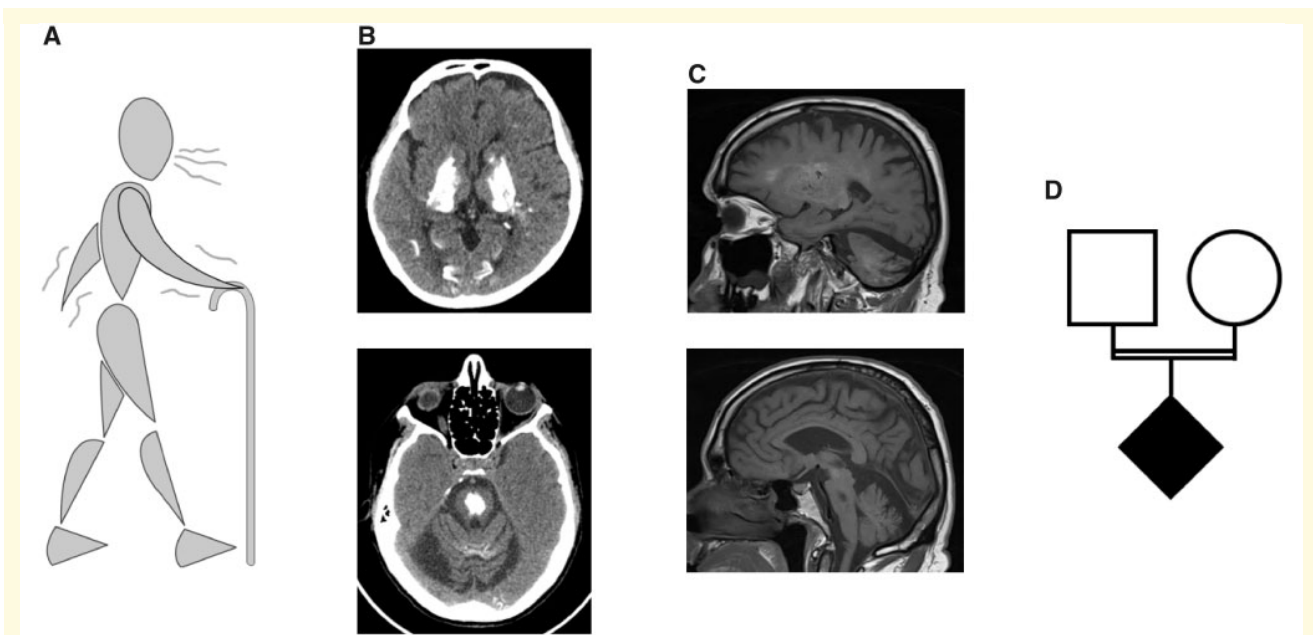


Figure 1 Summary of the major criteria supporting the existence of a bi-allelic MYORG mutation in a patient with basal ganglia calcifications and a normal phosphocalcic metabolism assessment. **(A)** Typical clinical course: progressive motor impairment starting from 20 to 60 years and marked by slurred speech and/or other motor symptoms among cerebellar syndrome, pyramidal signs, and akinetic-hypertonic syndrome. **(B)** Presence of extensive brain calcifications encompassing the brainstem, more specifically the pons (*bottom*). **(C)** Presence of cerebellar atrophy, more specifically in the vermis (*bottom*) and the antero- superior hemispheric lobes (*top*). **(D)** Patient born to consanguineous parents. We suggest that patients with basal ganglia calcifications, a normal phosphocalcic assessment and at least two of these four criteria should be proposed for genetic screening targeting primarily MYORG. In addition, we propose that the presence of at least two of the first three criteria (**A–C**) may support the pathogenicity of an ultra-rare coding, predicted damaging variant of unknown significance in MYORG, either if carried in the homozygous state or if in *trans* with a likely pathogenic variant. The absence of one or more of these three criteria, however, is not sufficient to rule out the pathogenicity of MYORG variants.

and the oldest age at clinical onset was 62 among symptomatic patients.

- (ii) An overrepresentation of motor impairment with all but one symptomatic patients showing at least one motor symptom; the single symptomatic patient with no motor symptom was aged 19 and suffered from psychosis and epilepsy.
- (iii) A high specificity of pontine calcifications with at least 25 patients showing calcifications in the brainstem, judging from the information provided in the main text, tables or available images, including 16 patients with clear pontine calcifications.
- (iv) The presence of cerebellar atrophy, appearing clearly in the patients from our study (Grangeon *et al.*, 2019) and in the letter by Ferreira and Oliveira (2019).

We can assume that additional patients, among those reported, eventually exhibit brainstem calcifications and/or cerebellar atrophy but that all images were not available to the authors or these features were not specifically assessed. Indeed, it is hard to judge on the presence or absence of cerebellar atrophy affecting the vermis and/or antero-superior lobes of the cerebellar hemispheres in transversal slides centered on the pons.

Overall, we consider that the novel reports on MYORG patients including the one by Ferreira and Oliveira confirm that MYORG screening should be proposed in the presence of basal ganglia calcifications, a normal phosphocalcic

metabolism assessment and at least two of the following suggestive features (Fig. 1): (i) a progressive motor impairment (cerebellar and/or pyramidal and/or akinetic-hypertonic) during mid-adulthood, the presence of slurred speech as a presenting symptom being highly suggestive; (ii) extensive calcifications encompassing the brainstem and more specifically the pons as better assessed on CT scan; (iii) cerebellar atrophy, affecting in particular the vermis and/or the antero-superior lobes of the hemispheres as better assessed on sagittal view of MRI; and (iv) a history of consanguinity. Of note, none of these features is mandatory. This includes the presence of compound heterozygous mutations in non-consanguineous families. In addition, we may expect a broader phenotypic spectrum in other patients, including psychiatric symptoms and cognitive impairment, isolated or in addition to motor symptoms, and a less severe calcification pattern. Therefore, MYORG screening is not to be ruled out in the absence of one or several of the above-mentioned features. Further studies will indeed be necessary to assess the whole phenotypic spectrum and conclude on possible genotype-phenotype correlations.

In the current era of medical genomics, the interpretation of rare variants remains one of the main challenges. Up to

now, *MYORG* (likely) pathogenic variants ever reported were either protein truncating, i.e. introducing a premature stop codon through nonsense single nucleotide substitutions or frameshift insertions or deletions (indels), or non-truncating variants, i.e. missense single nucleotide substitutions and in-frame indels. Functional analyses are required to better understand the consequences of these mutations on protein function and how they result in brain microvascular calcifications and neurological dysfunction.

The category of truncating variants appears quite easy to interpret as they all result in premature stop codons. Of note, the Refseq transcripts NM_020702.4 or NM_020702.5 both include a common nonsense variant in position c.69, p.23, identified in around 20% of the individuals from the gnomAD v2.1 database. This codon even used to appear as TAG, a stop codon, on the reference human genome build GRCh37. This position has been corrected as TAC in the newest version of the genome, build GRCh38, as TAC is the major allele. Nevertheless, this position is still polymorphic as a stop codon, TAG, in 20% of individuals on average, with a probable use of an alternate in-frame start codon at position p.35 of the same transcript. This alternate start corresponds to the ENST00000297625.7 transcript, (GRCh37). Hence, only premature stop codons introducing variants downstream from the genomic position chr9:34,372,836 (GRCh37) [chr9: chr9:34,372,838 (GRCh38)] should be considered as putatively pathogenic.

In addition, in-frame indels and missense variants are clearly more difficult to interpret than truncating variants, among those that were never reported in patients before. Interpretation remains based on the ACMG-AMP recommendations (Richards *et al.*, 2015) but some proportion of variants may remain of unknown significance. We believe that the presence of a typical phenotype (presence of at least two of three clinical features among a typical progressive motor impairment, brainstem calcifications, and cerebellar atrophy (Fig. 1A–C), may help to reclassify a variant of unknown significance as a likely pathogenic variant.

Ferreira and Oliveira report the presence of additional, extra-neurological features in their novel patient, including drusens, polyneuropathy, and autoimmune thyroiditis. Additional patients will be required to assess the assumption that some of these features might be caused by the *MYORG* homozygous mutation. Indeed, Hashimoto thyroiditis is a common disorder that is neither classically associated with brain calcification nor is it an argument against PFBC genetic screening, similar to other thyroid hormone imbalances, as long as the phosphocalcic metabolism assessment is normal. Caution may also be needed regarding the optic drusens considering their frequency in several ocular diseases. Further reports will be necessary to establish a putative link with ocular calcifications, as suggested by Ferreira and Oliveira. In addition, we can hypothesize that other, undiagnosed or unknown, genetic or non-genetic conditions may be present in this patient.

Finally, this additional patient recapitulates the novel syndrome recently characterized in *MYORG* bi-allelic mutation carriers and highlights the need of a careful and systematic clinical, CT and MRI screening in patients with brain calcifications. This novel syndrome may be considered as a calcifying form of complex spinocerebellar ataxia. The identification of a *MYORG* bi-allelic mutation may be of major importance for a patient and his/her family, given (i) the apparently more severe presentation than in AD-PFBC patients, possibly leading to motor disability with a high penetrance by the age of 60; and (ii) the radically different genetic counselling.

Data availability

Data sharing is not applicable to this article as no new data were created or analysed in this study.

Competing interests

The authors report no competing interests.

References

- Arkadir D, Lossos A, Rahat D, Abu Snineh M, Schueler-Furman O, Nitschke S, et al. *MYORG* is associated with recessive primary familial brain calcification. *Annals of clinical and translational neurology* 2019; 6: 106–13.
- Ferreira LD, de Oliveira JRM. New homozygous indel in *MYORG* linked to brain calcification, thyroidopathy and neuropathy. *Brain* 2019; 142: e51.
- Forouhdeh Y, Muller K, Ruf W, Assi M, Seker T, Tunca C, et al. A biallelic mutation links *MYORG* to autosomal-recessive primary familial brain calcification. *Brain* 2019; 142: e4.
- Grangeon L, Wallon D, Charbonnier C, Quenez O, Richard AC, Rousseau S, et al. Biallelic *MYORG* mutation carriers exhibit primary brain calcification with a distinct phenotype. *Brain* 2019; 142: 1573–86.
- Nicolas G, Charbonnier C, de Lemos RR, Richard AC, Guillin O, Wallon D, et al. Brain calcification process and phenotypes according to age and sex: lessons from *SLC20A2*, *PDGFB*, and *PDGFRB* mutation carriers. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2015; 168: 586–94.
- Nicolas G, Pottier C, Charbonnier C, Guyant-Marechal L, Le Ber I, Pariente J, et al. Phenotypic spectrum of probable and genetically-confirmed idiopathic basal ganglia calcification. *Brain* 2013; 136 (Pt 11): 3395–407.
- Peng Y, Wang P, Chen Z, Jiang H. A novel mutation in *MYORG* causes primary familial brain calcification with central neuropathic pain. *Clin Genet* 2019; 95: 433–5.
- Ramos EM, Roca A, Chunchim N, Dokuru DR, Van Berlo V, De Michele G, et al. Primary familial brain calcification caused by a novel homozygous *MYORG* mutation in a consanguineous Italian family. *Neurogenetics* 2019; 20: 99–102.
- Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Gen Med* 2015; 17: 405–24.
- Yao XP, Cheng X, Wang C, Zhao M, Guo XX, Su HZ, et al. Biallelic mutations in *MYORG* cause autosomal recessive primary familial brain calcification. *Neuron* 2018; 98: 1116–23 e5.

(9) Nicolas G, **Grangeon L**, Wallon D. Primary brain calcification due to a homozygous MYORG mutation causing isolated paroxysmal kinesigenic dyskinesia. *Brain*. 2020 May 1;143(5):e37.

LETTER TO THE EDITOR

Reply: Primary brain calcification due to a homozygous *MYORG* mutation causing isolated paroxysmal kinesigenic dyskinesia

Gaël Nicolas,¹ Lou Grangeon² and David Wallon²

1 Normandie University, UNIROUEN, Inserm U1245 and Rouen University Hospital, Department of Genetics and CNR-MAJ, F 76000, Normandy Center for Genomic and Personalized Medicine, Rouen, France

2 Normandie University, UNIROUEN, Inserm U1245 and Rouen University Hospital, Department of Neurology and CNR-MAJ, F 76000, Normandy Center for Genomic and Personalized Medicine, Rouen, France

Correspondence to: Gaël Nicolas

Normandie University, UNIROUEN, Inserm U1245 and Rouen University Hospital, Department of Genetics and CNR-MAJ, UFR Santé, 22, boulevard Gambetta, F 76000, Normandy Center for Genomic and Personalized Medicine, Rouen, France
E-mail: gaelnicolas@hotmail.com

Sir,

We read with great interest the letter by Saranza *et al.* (2020) on a new case with a homozygous pathogenic variant in the *MYORG* gene. The authors report the remarkable medical history and phenotypic description of a young female diagnosed with autosomal recessive primary familial brain calcification (AR-PFBC) with first symptoms noticed at age 8 years. This makes this case the youngest clinical expression of this recently described disorder to date. Interestingly, the clinical presentation was rather atypical as she presented with paroxysmal kinesigenic dyskinesia that was reported to be mildly disabling until last examination at age 36 years. In our series, all but one patient were symptomatic, with an age of clinical onset ranging from 21 to 62 years (Grangeon *et al.*, 2019). Symptoms were mainly motor with dysarthria, cerebellar syndrome, pyramidal tract impairment, and parkinsonism being prominent. Patients' phenotypes were progressively worsening and could be associated with some degree of disability although our study was retrospective, and disability or quality of life were not measured. Notably, the only asymptomatic bi-allelic mutation carrier in our series was the youngest, aged 28 at last evaluation. Other bi-allelic mutation carriers reported to be asymptomatic in the literature were also among the youngest (Nicolas *et al.*, 2019). Although the case reported by Saranza *et al.* did not exhibit the typical clinical course that we previously described, follow-up remains important in this young patient. Indeed, to date, the majority of patients

having reached the age of 62—if not all—showed motor signs from the above-mentioned spectrum. However, as we are at an early stage of the description of this new entity, one should remain cautious with clinical progression prediction in a clinical setting, as other symptoms may be more prominent in a minority of patients, including the symptoms more classically associated with autosomal dominant forms, such as cognitive impairment and psychiatric presentations, or even incomplete clinical expression as in many genetic disorders.

In the report by Saranza *et al.*, a previously described missense variant was identified, which was carried at the homozygous state in this new patient. Rare variants in the *MYORG* gene can be difficult to interpret. This gene contains a single coding exon and a 5' UTR first exon. Mutations reported to date are premature stop codon-introducing mutations (nonsense, frameshift indels), in-frame indels, and missense substitutions. The last two categories of variants are more difficult to interpret and to differentiate from rare neutral variations. Here, the recurrence of this missense c.1831C>T, p.(Arg611Trp) variant both at the compound heterozygous (Grangeon *et al.*, 2019; Chen *et al.*, 2020) and at the homozygous (Saranza *et al.*, 2020) states further confirms the pathogenicity of this variant in a recessive context.

Another remarkable feature of this new case is the report of placental calcifications, as observed following two pregnancies. Despite ubiquitous expression of all PFBC genes

and evidence for extra-cerebral abnormalities in PFBC mouse models, such clinical features are far from being recapitulated in humans (Borges-Medeiros *et al.*, 2019). We previously reported some degree of microcalcification in skin biopsies of a *PDGFRB* and an *XPR1* mutation carrier, which were not clinically detectable (Nicolas *et al.*, 2017). We also investigated bones in humans carrying *SLC20A2* mutations in a retrospective study and found a suggestive subclinical bone impairment (Beck-Cormier *et al.*, 2019), although this remains to be confirmed in further studies. Placental calcifications have not been reported in humans with PFBC before, to our knowledge. As reminded by Saranza and colleagues, *SLC20A2* and *PDGFRB* mouse models can exhibit placental alterations (Bjarnegard *et al.*, 2004; Wallingford *et al.*, 2016) including calcifications in the *Slc20a2* knockout model (Wallingford *et al.*, 2016). In addition, in *Xpr1*-deficient mice, decreased inorganic phosphate levels were recently reported in the amniotic fluid and in the serum of foetuses, together with placental calcification (Xu *et al.*, 2020). *MYORG* appears to be expressed in the placenta, at the RNA level, given the data from the Human Protein Atlas (www.proteinatlas.org/ENSG00000164976-MYORG, accessed February 2020) (Uhlen *et al.*, 2015). However, paradoxically, there was no detection of the protein in placenta using a specific antibody targeting the C-terminal region of the ENSP00000297625.9 protein (corresponding to transcript ENST00000297625.7) in the same database. This is then an interesting topic for further research, as well as assessing the degree of miscarriage and infertility in female bi-allelic *MYORG* mutation carriers.

Saranza *et al.* also investigated the presence of brain calcifications in one of the parents of the proband. Indeed, we previously reported three heterozygous carriers of likely pathogenic variants—all fathers of affected probands—who carried pallido-dentate calcifications (Grangeon *et al.*, 2019). The extension of calcifications was clearly considered as abnormal although such calcifications remained much less extensive than in probands carrying bi-allelic variants. Recently, Chen *et al.* (2020) reported additional heterozygous carriers with similar patterns of brain calcifications or smaller, including a heterozygous carrier of the same c.1831C>T, p.(Arg611Trp) variant as the one identified by Saranza and colleagues, this time with no calcification on CT from the single parent with available images (Saranza *et al.*, 2020). Hence, and given additional discordant images from parents with a same heterozygous pathogenic variant, this radiological expression in heterozygotes does not appear to be mutation-specific (Grangeon *et al.*, 2019; Chen *et al.*, 2020). To date, no heterozygous carrier was considered as symptomatic, although some of them exhibited symptoms that could not be clearly attributed to brain calcifications. Hence, the role of these variants in the development of brain calcification when carried at a heterozygous state remains to

be clarified, as well as modifiers of the expression. Finally, the identification of such a heterozygous variant in a patient should be confronted to the clinical and additional radiological features (Nicolas *et al.*, 2019).

In conclusion, this case further highlights the importance to report rare or atypical phenotypes of patients with rare diseases.

Data availability

Data sharing is not applicable to this article as no new data were created or analysed in this study.

Competing interests

The authors report no competing interests.

References

- Beck-Cormier S, Lelliott CJ, Logan JG, Lafont DT, Merametdjian L, Leitch VD, et al. *Slc20a2*, encoding the phosphate transporter PiT2, is an important genetic determinant of bone quality and strength. *J Bone Miner Res* 2019; 34: 1101–14.
- Bjarnegard M, Enge M, Norlin J, Gustafsdottir S, Fredriksson S, Abramsson A, et al. Endothelium-specific ablation of PDGFB leads to pericyte loss and glomerular, cardiac and placental abnormalities. *Development* 2004; 131: 1847–57.
- Borges-Medeiros RL, Ferreira LD, de Oliveira J. Lack of major ophthalmic findings in patients with primary familial brain calcification linked to *SLC20A2* and *PDGFB*. *J Mol Neurosci* 2019; 67: 441–4.
- Chen Y, Cen Z, Chen X, Wang H, Chen S, Yang D, et al. *MYORG* mutation heterozygosity is associated with brain calcification. *Mov Disord* 2020. doi: 10.1002/mds.27973.
- Grangeon L, Wallon D, Charbonnier C, Quenez O, Richard AC, Rousseau S, et al. Biallelic *MYORG* mutation carriers exhibit primary brain calcification with a distinct phenotype. *Brain* 2019; 142: 1573–86.
- Nicolas G, Grangeon L, Wallon D. Reply: new homozygous indel in *MYORG* linked to brain calcification, thyroidopathy and neuropathy. *Brain* 2019; 142: e52.
- Nicolas G, Marguet F, Laquerriere A, Mendes de Oliveira JR, Hannequin D. Microangiopathy in primary familial brain calcification: evidence from skin biopsies. *Neurol Genet* 2017; 3: e134.
- Saranza G, Grütz K, Klein C, Westenberger A, Lang AE. Primary brain calcification due to a homozygous *MYORG* mutation causing isolated paroxysmal kinesigenic dyskinesia. *Brain* 2020; 143: e36.
- Uhlen M, Fagerberg L, Hallstrom BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, et al. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science* 2015; 347: 1260419.
- Wallingford MC, Gammill HS, Giachelli CM. *Slc20a2* deficiency results in fetal growth restriction and placental calcification associated with thickened basement membranes and novel CD13 and laminalpha1 expressing cells. *Reprod Biol* 2016; 16: 13–26.
- Xu X, Li X, Sun H, Cao Z, Gao R, Niu T, et al. Murine placental-fetal phosphate dyshomeostasis caused by an *Xpr1* deficiency accelerates placental calcification and restricts fetal growth in late gestation. *J Bone Miner Res* 2020; 35: 116–29.

12.2. Article soumis :

(10) Helven C, Burel J, Vannier M, Maltête D, Ozkul-Wermester O, Wallon D, Hermary C, **Grangeon L**. Impact of previous statin use on first intracerebral hemorrhage in cerebral amyloid angiopathy. Soumis 09/2022 à la Revue Neurologique

Impact of previous statin use on first intracerebral hemorrhage in cerebral amyloid angiopathy

Heading title: statins and cerebral amyloid angiopathy

Camille Helven^{1#}, Julien Burel^{2#}, Margot Vannier³, David Maltête¹, Ozlem Ozkul-Wermester¹,
Capucine Hermary², David Wallon^{1,4}, Lou Grangeon^{1,4}

Co-first authors

¹ *Department of Neurology, Rouen University Hospital, 76000, Rouen, France*

² *Department of Radiology, Rouen University Hospital, 76000, Rouen, France*

³ *Department of Biostatistics, Rouen University Hospital, University of Rouen, 76000 Rouen, France*

⁴ *Normandie Univ, UNIROUEN, Inserm U1245 and CHU Rouen, Department of Neurology and CNR-MAJ, F 76000, Normandy Center for Genomic and Personalized Medicine, Rouen, France*

Title word count: 13

Abstract word count: 248

Body Word count: 2419

Tables: 4

Figures: 0

Supplemental table or figure: 0

References: 34

Corresponding Author:

Camille Helven, M.D.

Department of Neurology

Rouen University Hospital. 76031 Rouen Cedex, France

Tel.: +(33) 6 23 86 83 02; e-mail: camille.helven@gmail.com

Key Words:

Cerebral amyloid angiopathy; statin; intracerebral hemorrhage; microbleeds; hemosiderosis

Author contributions:

CH: Study concept, collection, analysis and interpretation of data, drafting and revision of manuscript

JB: Analysis and interpretation of data, drafting of manuscript

MV: Statistical analysis and interpretation of data

DM: Interpretation of data, drafting of manuscript

OOW: Interpretation of data, drafting of manuscript

DW: Interpretation of data, drafting of manuscript

CH: Interpretation of data, drafting of manuscript

LG: Study concept, recruitment of subjects, analysis and interpretation of data, drafting and revision of manuscript

Abbreviations:

AD: Alzheimer's Disease

CAA: Cerebral Amyloid Angiopathy

CMB: Cerebral Microbleeds

CSF: Cerebrospinal Fluid

CSS: Cortical Superficial Siderosis

GPs: General Practitioners

ICH: Intra-Cerebral Hemorrhage

MRI: Magnetic Resonance Imaging

CT scan: Computed Tomography scan

SPARCL: Stroke Prevention by Aggressive Reduction in Cholesterol Levels

TIA: Transient Ischemic Attack

Declarations of interest: none

ABSTRACT:

Objectives: Statins have been associated with an increased risk of spontaneous intracerebral hemorrhage (ICH) but without dedicated study in cerebral amyloid angiopathy (CAA). We aimed to evaluate the radiological and clinical impact of previous statin treatment in a CAA population during a first lobar ICH event.

Materials and methods: We retrospectively included all patients meeting the modified Boston criteria for probable or definite CAA and admitted for a first lobar ICH between 2010 and 2021 at Rouen University Hospital. Patients were classified as having previous statin treatment or not. We compared the ICH volume, the number of associated microbleeds and cortical superficial siderosis (CSS) according to previous statin treatment or not. We also compared patients' outcomes based on the modified Rankin scale at three months and ICH recurrence during the follow-up period.

Results: We included 99 patients, 27 of whom had statin treatment previous to their ICH. The ICH volume and the number of microbleeds did not differ between groups. Disseminated CSS was initially more frequent in the statin group (88% vs. 57%; $p=0.019$) but this was no longer significant after adjustment for antiplatelet treatment ($p=0.17$). The long-term outcome was similar between the two groups with no increased risk of ICH recurrence in the statin treated group (29.63% vs 23.61%, $p=0.54$).

Conclusions: Statin treatment was not associated with more severe hemorrhagic lesions in CAA in terms of ICH volume or number of microbleeds, but a trend for increased disseminated CSS was highlighted, which will require further larger studies.

INTRODUCTION:

Cerebral amyloid angiopathy (CAA) is a severe disease, mainly occurring in the elderly and characterized by deposits of A β peptide in the walls of cortical and leptomeningeal vessels leading to spontaneous intracerebral hemorrhage (ICH). The main risk factors are age and *APOE* genotype[1] [2]. The diagnosis of CAA is definite after pathological examination but may be clinically probable or possible according to modified Boston criteria, based on the presence of lobar ICH, microbleeds (CMB) and/or cortical superficial siderosis (CSS) on Magnetic Resonance Imaging (MRI)[3]. In the absence of curative treatment, the management of risk factors, such as hypertension or hypercholesterolemia, is crucial.

However, concerns have been raised about statins and an increased risk of cerebral bleeding. Indeed, several studies and notably the post hoc analysis of the Stroke Prevention by Aggressive Reduction in Cholesterol Levels (SPARCL)[4] aimed to evaluate the effect of atorvastatin 80 mg on secondary prevention of stroke or transient ischemic attack (TIA) and showed a potential association between statin use and the risk of hemorrhagic stroke. The risk of recurrent hemorrhagic stroke during follow-up was found to be >5.5-fold higher with atorvastatin treatment than placebo[5]. Although patients with initial hemorrhagic stroke represented only 2% of the SPARCL trial, a Markov decision model recommended avoiding statins in patients with previous ICH, especially in those with previous lobar ICH[6].

Since then, in contrast with the findings of the SPARCL trial, the vast majority of statin trials have failed to demonstrate an association between hemorrhagic stroke and statins[7] and rather showed beneficial effects. Indeed, several ICH mouse models showed improved neurologic function, reduced cerebral edema, increased angiogenesis and neurogenesis, accelerated hematoma resolution, and decreased inflammatory cell infiltration in case of statin use[8]. Moreover, further clinical studies investigating the link between statins and ICH outcome showed improved ICH outcome in statin users[9] [10] [11] [12]. Nevertheless, all these studies were performed in heterogeneous populations, with a medical history of ischemic or hemorrhagic stroke of all causes, regardless of the ICH location (deep and lobar ICH).

The mechanism by which statins may increase the risk of ICH remains unknown. A correlation between lower cholesterol levels and increased incidence of hemorrhagic stroke has been suggested by several previous epidemiologic studies, although more recent studies have not found such a relationship[5] [13] [14]. Inhibition of platelet activity and the coagulation cascade, the so called pleiotropic effects of statins are other postulated

mechanisms for hemorrhagic stroke[15] [16]. Finally, statins may also indirectly interfere with APOE function. Indeed, A β clearance is dependent on the lipidation status of APOE and cellular cholesterol levels[17] [18]. Therefore, a dedicated study in a CAA population seems of practical interest, given the relationship between statins, APOE and A β clearance.

We aimed to assess the radiological and clinical impact of previous statin treatment on hemorrhagic markers (volume of ICH, number of CMB, presence and dissemination of CSS) in a CAA population during a first lobar ICH event.

METHODS:

Study design and participants:

A retrospective study was conducted between 2010 and 2021 at Rouen University Hospital, France. All consecutive adult patients admitted for a first spontaneous lobar ICH meeting the revised Boston criteria[19] for probable or definite CAA on MRI were included. In order to constitute a series with homogeneous disease duration, patients with an already known diagnosis of CAA were excluded (n=21). We retrieved from medical charts, baseline clinical and demographic data, medication use at admission (antiplatelet agents, anticoagulants and statins), laboratory results and systolic and diastolic blood pressure at admission and during the first 48 hours. We also collected Cerebrospinal Fluid (CSF) Alzheimer's disease (AD) biomarker levels and *APOE* genotype when available. Data regarding previous statin treatment such as agent, dose and duration of use were obtained by review of medical records and by calling general practitioners (GPs). The National Institutes of Health Stroke Scale (neurological outcome) and Rankin (functional outcome including death) scores at discharge, recurrence of lobar ICH during follow-up and mortality rates were also retrieved from medical records.

Ethical approval was obtained for data collection and publication from the institutional review board of Rouen University Hospital for retrospective non-interventional research (E2022-35).

Radiological interpretation:

The same neuroradiologist (JB), blinded to statin treatment status, analyzed each Computed Tomography (CT) scan and cerebral MRI scan available during the acute phase on DICOM image viewing software CARESTREAM Vue PACS (Carestream Health Inc., USA). ICH volume was measured on the initial CT scan at admission by semi-automatic software (Livewire), or on the 3D-TOF sequence of MRI in the absence of an available scanner. The MRI performed before the patient's discharge during the acute phase was used to rate the number of CMBs and the presence of CSS. The latter was categorized according to its location (adjacent or nonadjacent to hematoma) and its distribution, focal (≤ 3 sulci affected) or disseminated (>3 sulci).

Statistical analyses:

The ICH volume and other hemorrhagic markers on MRI were compared between patients who had previous statin treatment or not. Descriptive statistics are expressed as mean \pm standard deviation (SD). The two groups of patients were compared using a Mann Whitney

test or a Student Test for pairwise comparisons for quantitative data and a Fisher exact test or Chi2 test for qualitative data. The threshold for statistical significance was set at $p < 0.05$.

We performed a logistic regression with adjustment for age at ICH, antiplatelet treatment, and time from first symptoms to MRI (model 1). A second multivariate analysis was performed by adding the LDL-c level (model 2).

RESULTS:

Demographic and clinical data:

Ninety-nine probable CAA patients with a first lobar ICH were included, of whom 27.3% (n=27) had previous statin treatment. The majority of patients were treated with atorvastatin (n=10) and rosuvastatin (n= 9), the others with pravastatin (n=4), simvastatin (n=3) and fluvastatin (n=1). The average duration of statin treatment before ICH was 4.06 ± 1.57 years (data missing for 11 patients). Baseline characteristics are presented in Table 1. The mean age was similar in the two groups (statin-treated patients: 75.06 ± 9.62 years; non-statin treated patients: 76.26 ± 6.13 years; $p=0.82$). Patients treated with statins were more frequently male (74.07% vs 51.39%; $p=0.04$), with more frequent dyslipidemia (81.48% vs 29.17%; $p<0.001$), hypertension (77.78% vs 54.17%; $p= 0.03$) and type 2 diabetes (29.63% vs 6.94%; $p=0.01$). Patients treated with statins more frequently received antihypertensive agents (77.78% vs. 43.06%; $p=0.02$), but blood pressure at admission was comparable between the two groups. Patients treated with statins were more likely to be taking concomitant antiplatelet treatment (59.26% vs. 16.67%; $p<0.001$), but no difference regarding anticoagulant drugs was found between groups.

The median follow-up period was 220 days (range, 3 days–8 years). Clinical outcomes are presented in table 2. The NIHSS scores at discharge were similar between the two groups, as were modified Rankin scores at discharge (2.37 ± 1.78 vs 2.32 ± 1.72 ; $p=0.95$). Finally, eight patients in the statin treated group and 17 patients in the non-statin treated group had a recurrence of ICH during follow-up (29.63% vs 23.61%; $p=0.54$), with a time to recurrence for both groups of approximately 2 years (1.92 ± 1.85 years vs 1.97 ± 1.94 years; $p=0.89$). The mortality rate during the acute phase (7.41% vs 5.56%; $p=0.66$) or within 3 months (7.41% vs 9.72%, $p=1$) was similar between groups.

Total cholesterol (4.37 ± 0.85 mmol/l vs 5.34 ± 1.10 mmol/l; $p<0.001$) and LDL-c (1.25 ± 0.48 vs 3.11 ± 0.94 ; $p<0.001$) were lower in patients treated with statins.

All other biological data including CSF Alzheimer biomarkers were comparable between the two groups (Table 3). Only one *APOE* genotype was available in the statin treated group compared to 16 in the non-statin treated group, precluding any comparison.

Brain imaging analysis:

The mean ICH volume measured on CT-scan at admission was available for 86 (86.87%) patients, because 13 (13.1%) patients had brain MRI immediately in the emergency room. The mean volume of lobar ICH at admission did not differ according to statin treatment or not (23.31 ± 20.85 cc vs 17.5 ± 14.23 cc; $p=0.5$) (Table 4).

Time from onset of ICH symptoms to MRI was similar in both groups (11.43 ± 21.22 days vs 13.43 ± 26.07 days; $p=0.87$). Four cerebral MRIs in each group were not analyzable due to head movements and therefore were not considered for CMB and CSS ratings. The MRI analysis was performed in 23 probable CAA patients treated with statins and in 68 probable CAA patients not treated with statins. No difference was found between groups in terms of sequences used (T2*, SWI or SWAN). The mean number of lobar CMB per patient did not differ between the two groups either (37 ± 65 vs 35 ± 90 ; $p=0.76$). The majority of patients had more than 5 CMBs, with no significant difference between the two groups (69.57% vs 77.94%; $p=0.42$). Of note, only one patient (4.35%) in the statin group and three patients (4.41%) in the non-statin group had no CMB at all. The presence of CSS of any type (adjacent to the ICH or distant) was similar between groups (73.91% vs 67.65%; $p=0.57$). In contrast, statin treated patients were more likely to present disseminated CSS in univariate analysis (88.24% vs 56.52%; $p=0.019$) but this was no longer significant after adjustment for age at ICH occurrence, antiplatelet treatment, and time to MRI ($p=0.17$) (model 1), and LDL-c level ($p=0.98$) (model 2).

DISCUSSION:

This study describes the impact of previous statin treatment in a CAA population hospitalized for a first ICH event. Patients previously treated with statins did not show increased ICH volume or number of CMB but rather a trend for more frequent disseminated CSS compared to patients not treated with statins. These results are consistent with data from the literature regarding ICH in general: no association was found between statin treatment and ICH volume according to a recent meta-analysis[10]. The SPARCL study[4] originally assessed the risk of ICH recurrence and found an increased risk of recurrence with statin treatment. However, that study did not assess the severity of the ICH event itself. The association of CMB and statin treatment has been investigated in several studies[20], but none has focused specifically on CAA. The latest meta-analysis including seven eligible studies with >3500 patients with considerable heterogeneity (patients with history of ischemic stroke or TIA, spontaneous ICH of any location, oral anticoagulant use, etc.) concluded that there was no clear link between statins and CMB[21].

This present study suggested a more disseminated CSS, although not more frequent, in patients with previous statin treatment. However, this result was no longer significant after adjustment for antiplatelet treatment. Patients treated with statins are also more likely to have hypertension, diabetes, and therefore concomitant antiplatelets. Nevertheless, if the link between CMB and antiplatelets has been clearly established in the literature[22], the potential association with CSS is still unclear. A recent study by Charidimou and al.[23] aimed to evaluate CSS in CAA patients followed for cognitive impairment. A comparison of the clinical characteristics of patients with and without CSS showed that there was no significant difference in the use of antiplatelet treatment. In another study[24], the same team evaluated hemorrhagic markers in CAA patients with (n=54) or without ICH (n=51) and demonstrated that CSS, particularly disseminated CSS, was associated with a higher risk of ICH, as also shown in another study[25], with no difference in antiplatelet treatment between the two groups. It is therefore unclear if antiplatelet treatment alone explains the spread of CSS found in our study. The lack of power due to the small number of CAA patients may explain the loss of significance in multivariate analysis and further larger studies are needed to confirm the link between disseminated CSS and previous statin treatment.

Although not completely elucidated, it is now suspected that CSS and CMB result from different mechanisms. Indeed, recent studies found that CSS was not associated with lobar CMB[26] and even found opposing results[27]. Those potential distinct vascular mechanisms

for CSS and CMB could explain the different results obtained in our study. Two main mechanisms have been suggested for CSS: leakage from a lobar ICH into the subarachnoid space and/or rupture of meningeal vessels directly into the subarachnoid space[28]. Statins reduce cholesterol levels and thus the lipidation state of APOE, which prevents its binding to the A β protein. The clearance and degradation of A β protein may be consequently reduced, favoring its aggregation and deposition in the wall of leptomeningeal vessels. Weakened leptomeningeal vessels may be responsible for deposits of hemosiderin in the sulci[17]. This link between disseminated CSS and statins remains quite hypothetical and requires further confirmation. The action of statins on platelet aggregation could also contribute to the accumulation of hemosiderin in the sulci and thus to disseminated CSS[29].

As recently suggested[25], two phenotypes of CAA can be distinguished depending on the *APOE* genotype. *APOE 4* favors the involvement of cortical vessels and the presence of CMB, whereas *APOE 2* is more associated with damage to leptomeningeal vessels and the presence of CSS. *APOE 2* predisposes to larger volumes of ICH[30] and disseminated CSS[31]. Unfortunately, and this is a major limitation of the present study, the *APOE* status of our patients was only available in 17% precluding any specific analysis regarding genotype and statin treatment or ICH characteristics. Ultimately, the association between hemorrhage and statins seem reassuring, as shown recently in a specific population of cerebral cavernous malformations, demonstrating a lower risk of ICH with statin treatment[32].

Limitations here are the retrospective and single center design of this study, and the limited number of patients. Nevertheless, this series is rather homogeneous, all patients meeting the Boston criteria for probable CAA, with the same radiological assessment and analysis. The rating during the first ICH allowed homogeneous disease duration and follow-up between patients with few missing data, and notably the rate of ICH recurrence. Nevertheless, data regarding statins such as the duration of statin treatment before ICH occurrence were missing in 11 patients despite extensive investigation by calling GPs. Finally, early imaging analysis, performed at the first ICH event, may have led to non-significant results, reflecting a too short duration of the underlying CAA[33].

In this first study describing the impact of previous statin treatment in a selected CAA population, statin use did not appear to be associated with more severe ICH volume or number of CMB. However, a trend for more frequent disseminated CSS was found, present in 65% of patients who had previous statin treatment. Larger prospective studies are needed, especially because disseminated CSS is considered as the main risk factor for ICH in CAA

patients. Of note, a trial called SATURN[34], is currently underway to determine whether continuing or stopping statins after spontaneous lobar ICH is the best strategy; and whether this decision should be influenced by the *APOE* genotype.

Acknowledgments:

We are grateful to Nikki Sabourin-Gibbs, Rouen University Hospital, for her help in editing the manuscript.

No funding source:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

REFERENCES:

- [1] Yamada M. Cerebral Amyloid Angiopathy: Emerging Concepts. *J Stroke* 2015;17:17–30. <https://doi.org/10.5853/jos.2015.17.1.17>.
- [2] Schipper HM. Apolipoprotein E: implications for AD neurobiology, epidemiology and risk assessment. *Neurobiol Aging* 2011;32:778–90. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2009.04.021>.
- [3] Charidimou A, Boulouis G, Frosch MP, Baron J-C, Pasi M, Albuher JF, et al. The Boston criteria version 2.0 for cerebral amyloid angiopathy: a multicentre, retrospective, MRI-neuropathology diagnostic accuracy study. *Lancet Neurol* 2022;21:714–25. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(22\)00208-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(22)00208-3).
- [4] Amarenco P, Bogousslavsky J, Callahan A, Goldstein LB, Hennerici M, Rudolph AE, et al. High-dose atorvastatin after stroke or transient ischemic attack. *N Engl J Med* 2006;355:549–59. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa061894>.
- [5] Goldstein LB, Amarenco P, Szarek M, Callahan A, Hennerici M, Sillesen H, et al. Hemorrhagic stroke in the Stroke Prevention by Aggressive Reduction in Cholesterol Levels study. *Neurology* 2008;70:2364–70. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000296277.63350.77>.
- [6] Westover MB, Bianchi MT, Eckman MH, Greenberg SM. Statin use following intracerebral hemorrhage: a decision analysis. *Arch Neurol* 2011;68:573–9. <https://doi.org/10.1001/archneurol.2010.356>.
- [7] Endres M, Nolte CH, Scheitz JF. Statin Treatment in Patients With Intracerebral Hemorrhage. *Stroke* 2018;49:240–6. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.117.019322>.
- [8] Chen C-J, Ding D, Ironside N, Buell TJ, Elder LJ, Warren A, et al. Statins for neuroprotection in spontaneous intracerebral hemorrhage. *Neurology* 2019;93:1056–66. <https://doi.org/10.1212/WNL.00000000000008627>.
- [9] McKinney JS, Kostis WJ. Statin therapy and the risk of intracerebral hemorrhage: a meta-analysis of 31 randomized controlled trials. *Stroke* 2012;43:2149–56. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.112.655894>.
- [10] Lei C, Wu B, Liu M, Chen Y. Association between statin use and intracerebral hemorrhage: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Neurol* 2014;21:192–8. <https://doi.org/10.1111/ene.12273>.
- [11] Chen P-S, Cheng C-L, Chang Y-C, Kao Yang Y-H, Yeh P-S, Li Y-H. Early statin therapy in patients with acute intracerebral hemorrhage without prior statin use. *Eur J Neurol* 2015;22:773–80. <https://doi.org/10.1111/ene.12649>.
- [12] Li G, Wang S, Xiong Y, Gu H, Yang K, Yang X, et al. Prior statin and short-term outcomes of primary intracerebral hemorrhage: From a large-scale nationwide longitudinal registry. *CNS Neurosci Ther* 2022;28:1240–8. <https://doi.org/10.1111/cns.13868>.
- [13] Iso H, Jacobs DR, Wentworth D, Neaton JD, Cohen JD. Serum cholesterol levels and six-year mortality from stroke in 350,977 men screened for the multiple risk factor intervention trial. *N Engl J Med* 1989;320:904–10. <https://doi.org/10.1056/NEJM198904063201405>.
- [14] Wang X, Dong Y, Qi X, Huang C, Hou L. Cholesterol levels and risk of hemorrhagic stroke: a systematic review and meta-analysis. *Stroke* 2013;44:1833–9. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.113.001326>.
- [15] Laufs U, Gertz K, Huang P, Nickenig G, Böhm M, Dirnagl U, et al. Atorvastatin upregulates type III nitric oxide synthase in thrombocytes, decreases platelet activation, and protects from cerebral ischemia in normocholesterolemic mice. *Stroke* 2000;31:2442–9. <https://doi.org/10.1161/01.str.31.10.2442>.

- [16] Liu XS, Zhang ZG, Zhang L, Morris DC, Kapke A, Lu M, et al. Atorvastatin downregulates tissue plasminogen activator-aggravated genes mediating coagulation and vascular permeability in single cerebral endothelial cells captured by laser microdissection. *J Cereb Blood Flow Metab* 2006;26:787–96. <https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600227>.
- [17] Huynh T-PV, Davis AA, Ulrich JD, Holtzman DM. Apolipoprotein E and Alzheimer's disease: the influence of apolipoprotein E on amyloid- β and other amyloidogenic proteins. *J Lipid Res* 2017;58:824–36. <https://doi.org/10.1194/jlr.R075481>.
- [18] Jiang Q, Lee CYD, Mandrekar S, Wilkinson B, Cramer P, Zelcer N, et al. ApoE promotes the proteolytic degradation of A β . *Neuron* 2008;58:681–93. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.04.010>.
- [19] Linn J, Halpin A, Demaerel P, Ruhland J, Giese AD, Dichgans M, et al. Prevalence of superficial siderosis in patients with cerebral amyloid angiopathy. *Neurology* 2010;74:1346–50. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181dad605>.
- [20] Romero JR, Preis SR, Beiser A, DeCarli C, Viswanathan A, Martinez-Ramirez S, et al. Risk factors, stroke prevention treatments, and prevalence of cerebral microbleeds in the Framingham Heart Study. *Stroke* 2014;45:1492–4. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.114.004130>.
- [21] Katsanos AH, Lioutas V-A, Charidimou A, Catanese L, Ng KKH, Perera K, et al. Statin treatment and cerebral microbleeds: A systematic review and meta-analysis. *J Neurol Sci* 2021;420:117224. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2020.117224>.
- [22] Wilson D, Werring DJ. Antithrombotic therapy in patients with cerebral microbleeds. *Curr Opin Neurol* 2017;30:38–47. <https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000000411>.
- [23] Charidimou A, Ni J, Martinez-Ramirez S, Vashkevich A, Ayres A, Rosand J, et al. Cortical superficial siderosis in memory clinic patients: further evidence for underlying cerebral amyloid angiopathy. *Cerebrovasc Dis* 2016;41:156–62. <https://doi.org/10.1159/000442299>.
- [24] Charidimou A, Martinez-Ramirez S, Shoamanesh A, Oliveira-Filho J, Frosch M, Vashkevich A, et al. Cerebral amyloid angiopathy with and without hemorrhage. *Neurology* 2015;84:1206–12. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000001398>.
- [25] Charidimou A, Boulouis G, Greenberg SM, Viswanathan A. Cortical superficial siderosis and bleeding risk in cerebral amyloid angiopathy: A meta-analysis. *Neurology* 2019;93:e2192–202. <https://doi.org/10.1212/WNL.00000000000008590>.
- [26] Charidimou A, Peeters AP, Jäger R, Fox Z, Vandermeeren Y, Laloux P, et al. Cortical superficial siderosis and intracerebral hemorrhage risk in cerebral amyloid angiopathy. *Neurology* 2013;81:1666–73. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000435298.80023.7a>.
- [27] Shoamanesh A, Martinez-Ramirez S, Oliveira-Filho J, Reijmer Y, Falcone GJ, Ayres A, et al. Interrelationship of superficial siderosis and microbleeds in cerebral amyloid angiopathy. *Neurology* 2014;83:1838–43. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000000984>.
- [28] Charidimou A, Linn J, Vernooij MW, Opherk C, Akoudad S, Baron J-C, et al. Cortical superficial siderosis: detection and clinical significance in cerebral amyloid angiopathy and related conditions. *Brain* 2015;138:2126–39. <https://doi.org/10.1093/brain/awv162>.
- [29] Phipps RP, Blumberg N. Statin islands and PPAR ligands in platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29:620–1. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.184648>.
- [30] Brouwers HB, Biffi A, Ayres AM, Schwab K, Cortellini L, Romero JM, et al. Apolipoprotein E genotype predicts hematoma expansion in lobar intracerebral hemorrhage. *Stroke* 2012;43:1490–5. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.111.643262>.

- [31] Charidimou A, Boulouis G, Roongpiboonsopit D, Auriel E, Pasi M, Haley K, et al. Cortical superficial siderosis multifocality in cerebral amyloid angiopathy: A prospective study. *Neurology* 2017;89:2128–35. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000004665>.
- [32] Zuurbier SM, Hickman CR, Rinkel LA, Berg R, Sure U, Al-Shahi Salman R, et al. Association Between Beta-Blocker or Statin Drug Use and the Risk of Hemorrhage From Cerebral Cavernous Malformations. *Stroke* 2022;53:2521–7. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.121.037009>.
- [33] Joseph-Mathurin N, Wang G, Kantarci K, Jack CR, McDade E, Hassenstab J, et al. Longitudinal Accumulation of Cerebral Microhemorrhages in Dominantly Inherited Alzheimer Disease. *Neurology* 2021;96:e1632–45. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000011542>.
- [34] Essais cliniques sur Hémorragie intracérébrale: Statines - Registre des essais cliniques - ICH GCP n.d. <https://ichgcp.net/fr/clinical-trials-registry/NCT03936361> (accessed October 12, 2022).

TABLES:

Table 1. Baseline characteristics

	CAA statin treated patients (n=27)	CAA non-statin-treated patients(n=72)	p value
male, n (%)	20 (74.07%)	37 (51.39%)	*0.04
age at icht occurrence (years \pm sd)	76.26 \pm 6.13	75.06 \pm 9.62	0.82
follow-up duration (years \pm sd)	1.48 \pm 1.84	1.76 \pm 2.22	0.65
vascular risk factors			
hypertension, n (%)	21 (77.78%)	39 (54.17%)	*0.03
active smoking, n (%)	4 (14.81%)	4 (5.56%)	0.21
frequent alcohol use, n (%)	7 (25.93%)	10 (13.89%)	0.13
hypercholesterolemia, n (%)	22 (81.48%)	21 (29.17%)	*<0.001
type 2 diabetes, n (%)	8 (29.63%)	5 (6.94%)	*0.01
medical history			
familial history of ad and/or CAA, n (%)	1 (3.70%)	2 (2.78%)	1
previous cognitive impairment, n (%)	9 (33.33 %)	29 (40.28%)	0.53
previous ischemic stroke or TIA, n (%)	6 (28.57%)	9 (14.29%)	0.34
treatment			
antiplatelet agents, n (%)	16 (59.26%)	12 (16.67%)	*<0.001
anticoagulant agents, n (%)	3 (11.11%)	10 (13.89%)	1
blood pressure			
antihypertensive agents, n (%)	21 (77.78%)	31 (43.06%)	*0.02
number of antihypertensive agent s, n \pm sd	1.56 \pm 1.53	0.89 \pm 1.19	*0.02
use of nicardipine at admission, n (%)	10 (37.04%)	30 (41.66%)	0.68
blood pressure at admission			
systolic pressure, mean \pm sd	168 \pm 31	164 \pm 27	0.83
diastolic pressure, mean \pm sd	91 \pm 17	88 \pm 17	0.52
mean pressure, mean \pm sd	116 \pm 21	113 \pm 18	0.49
scales			
rankin before admission, mean \pm sd	0.52 \pm 0.98	0.61 \pm 1.03	0.84
NIHSS at admission, mean \pm sd	6.41 \pm 5.98	5.26 \pm 5.44	0.43

Results are expressed as mean \pm standard deviation (SD). Fisher exact test or Chi2 test for qualitative data and Mann Whitney test or Student Test for quantitative data were used to compare statin-treated group and non-statin-treated group.

**significant; AD: Alzheimer's disease, CAA: cerebral amyloid angiopathy, TIA: transient ischemic accident, ICH: intracerebral hemorrhage, NIHSS: National Institutes of Health Stroke Scale*

Table 2. Clinical outcomes

	CAA statin treated patients(n=27)	CAA non-statin-treated patients (n=72)	p value
modified rankin score at discharge, mean±sd	2.37 ±1.78	2.32 ±1.72	0.95
modified rankin score at 3 months, mean±sd	1 ±1.04	1 ±0.99	0.97
NIHSS at discharge	3.96 ±4.54	3.23 ±4.32	0.58
ICH recurrence, n (%)	8 (29.63%)	17 (23.61%)	0.54
time from ICH occurrence to recurrence, (years) mean±sd	1.92 ±1.85	1.97 ±1.94	0.89
death during hospitalization, n (%)	2 (7.41%)	4 (5.56%)	0.66
death within the first 3 months, n (%)	2 (7.41%)	7 (9.72%)	1

Results are expressed as mean ±standard deviation (SD). Fisher exact test or Chi2 test for qualitative data and Mann Whitney test or Student Test for quantitative data were used to compare statin-treated group and non-statin-treated group.

CAA: Cerebral Amyloid Angiopathy, ICH: Intracerebral Hemorrhage; NIHSS: National Institutes of Health Stroke Scale, Rankin: Functional outcome including death (modified Rankin Scale [mRS] scores 0–6)

Table 3. Comparison of biological and genetic data

biological	CAA statin treated patients(n=27)	CAA non-statin-treated patients(n=72)	p value
lipid profil			
total cholesterol (g/l), mean \pm sd	4.37 \pm 0.85	5.34 \pm 1.10	*<0.001
triglycerides (g/l), mean \pm sd	1.25 \pm 0.48	1.32 \pm 0.80	0.75
LDL-c (g/l), mean \pm sd	1.25 \pm 0.48	3.11 \pm 0.94	*<0.001
HDL-c (g/l), mean \pm sd	1.56 \pm 0.38	1.67 \pm 0.49	0.44
hemostasis			
platelets (g/l), mean \pm sd	231.96 \pm 60.47	234.06 \pm 72.06	0.97
PR (%), mean \pm sd	86.37 \pm 14.15	84.1 \pm 19.20	0.98
PTT (ratio), mean \pm sd	1.04 \pm 0.22	1.07 \pm 0.24	0.71
NRI (ratio), mean \pm sd	2.3 \pm 0	2.42 \pm 0.90	0.86
renal function			
clearance (ml/min), mean \pm sd	89.75 \pm 28.45	81.36 \pm 25.08	0.13
hepatic function			
AP (iu/l), mean \pm sd	71.52 \pm 25.57	66.47 \pm 17.80	0.57
GGT (iu/l), mean \pm sd	44.48 \pm 36.81	55.06 \pm 86.91	0.42
AST (iu/l), mean \pm sd	26.56 \pm 15.66	29.38 \pm 14.88	0.064
ALT (iu/l), mean \pm sd	24.56 \pm 15.32	23.08 \pm 13.1	0.64
bilirubin (mg/dl), mean \pm sd	13.54 \pm 6.57	13.09 \pm 11.20	0.12
CSF alzheimer biomarkers			
	CAA statin treated patients (=9)	CAA non-statin treated patients(n=20)	
time from ICH to LP (days)	135 \pm 106.27	240.87 \pm 316.33	0.29
tau (pg/ml), mean \pm sd	306.22 \pm 71.70	354.53 \pm 159.88	0.59
p-tau (pg/ml), mean \pm sd	53.33 \pm 14.59	57.53 \pm 21.95	0.71
a β 1-40 (pg/ml), mean \pm sd	10463.25 \pm 6278.11	9199.75 \pm 4847.92	0.86
a β 1-42 (pg/ml), mean \pm sd	574.89 \pm 286.21	515.95 \pm 306.22	0.22

Results are expressed as mean \pm standard deviation (SD). Fisher exact test or Chi2 test for qualitative data and Mann Whitney test or Student Test for quantitative data were used to compare statin-treated group and non-statin-treated group.

*Significant; CAA: Cerebral Amyloid Angiopathy; LDL-c: Low-Density Lipoprotein cholesterol; HDL-c: High-Density Lipoprotein cholesterol; PR: Prothrombin Ratio; PTT: partial thromboplastin time; NRI: Normalized Ration Index; AP: alkaline phosphatase; GGT: gamma glutamyl transpeptidase; AST: aspartate aminotransferase; ALT: alanine aminotransferase; CSF: CerebroSpinal Fluid; Tau: Tau protein; p-Tau: phosphorylated Tau; A β 1-40: Amyloid β 1-40 peptide; A β 1-42: Amyloid β 1-42 peptide; LP: Lumbar Puncture

Table 4. Comparison of radiological data

	CAA statin treated patients (n=27)	CAA non-statin - treated patients (n=72)	p value
ICH volume (cc), mean±sd	23.31 ±20.85	17.5 ±14.23	0.5
time from ICH occurrence to MRI (days), mean±sd	11.43 ±21.22	13.43 ±26.07	0.87
MRI only (n, %)	2 (7.4%)	11 (15.3%)	0.5
type of sequence			
T2*, n (%)	18 (78.26%)	50 (73.53%)	0.79
SWI, n (%)	2 (8.70%)	5 (7.35%)	
SWAN, n (%)	3 (13.04%)	13 (19.12%)	
microbleeds			
presence of CMB, n (%)	22 (95.65%)	65 (95.59%)	1
mean number of lobar CMB, n (%)	37 ±65	35 ±90	0.76
>5 CMB, n (%)	16 (69.57%)	53 (77.94%)	0.42
hemosiderosis			
no CSS, n (%)	6 (26.09%)	22 (32.35%)	0.57
presence of CSS (adjacent and/or distant from ICH), n (%)	17 (73.91%)	46 (67.65%)	
-including disseminated CSS distant from ICH, n (%)	15 (88.24%)	26 (56.52%)	*0.019
scheltens scale			
mean scheltens scale of right hippocampus, mean ±sd	1.78 ±1.09	1.88 ±1.03	0.34
mean scheltens scale of left hippocampus, mean ±sd	1.74 ±0.96	1.79 ±0.91	0.97
ischemic sequelae, n (%)	18 (78.26%)	43 (63.24%)	0.19
available diffusion sequence	CAA statin treated patients (n=13)	CAA non-statin treated patients (n=43)	
recent ischemia, n (%)	2 (15.38%)	11 (25.58%)	0.71
fazekas scale			
0, n (%)	0 (0%)	1 (1.47%)	1
1, n (%)	2 (8.70%)	12 (17.65%)	
2, n (%)	14 (60.87%)	33 (48.53%)	
3, n (%)	7 (30.43%)	22 (32.35%)	

Results are expressed as mean ±standard deviation (SD). Fisher exact test or Chi2 test for qualitative data and Mann Whitney test or Student Test for quantitative data were used to compare statin-treated group and non-statin-treated group.

SWI (Philips Healthcare); SWAN (GE Healthcare)

** Significant, CAA: Cerebral Amyloid Angiopathy, ICH: Intracerebral Hemorrhage, CMB: Cerebral Microbleeds, CSS: Cerebral Superficial Siderosis*

13. RÉFÉRENCES :

1. Pantoni L. Cerebral small vessel disease: from pathogenesis and clinical characteristics to therapeutic challenges. *Lancet Neurol.* 2010 Jul;9(7):689–701.
2. Charidimou A, Boulouis G, Frosch MP, Baron JC, Pasi M, Albuher JF, et al. The Boston criteria version 2.0 for cerebral amyloid angiopathy: a multicentre, retrospective, MRI–neuropathology diagnostic accuracy study. *Lancet Neurol.* 2022;21(8):714–725.
3. Manyam BV. What is and what is not “Fahr’s disease”. *Parkinsonism Relat Disord.* 2005 Mar;11(2):73–80.
4. Balck A, Schaake S, Kuhnke NS, Domingo A, Madoev H, Margolesky J, et al. Genotype–phenotype relations in primary familial brain calcification: systematic MDSGene review. *Mov Disord.* 2021;36(11):2468–2480.
5. Ramos EM, Oliveira J, Sobrido MJ, Coppola G. Primary familial brain calcification. *GeneReviews*@[Internet]. 2017;
6. Batla A, Tai XY, Schottlaender L, Erro R, Balint B, Bhatia KP. Deconstructing Fahr’s disease/syndrome of brain calcification in the era of new genes. *Parkinsonism Relat Disord.* 2017 Apr;37:1–10.
7. Yamada M, Asano T, Okamoto K, Hayashi Y, Kanematsu M, Hoshi H, et al. High frequency of calcification in basal ganglia on brain computed tomography images in Japanese older adults. *Geriatr Gerontol Int.* 2013 Jul;13(3):706–10.
8. Chen S, Cen Z, Fu F, Chen Y, Chen X, Yang D, et al. Underestimated disease prevalence and severe phenotypes in patients with biallelic variants: A cohort study of primary familial brain calcification from China. *Parkinsonism Relat Disord.* 2019 Jul;64:211–9.
9. Nicolas G, Charbonnier C, de Lemos RR, Richard AC, Guillin O, Wallon D, et al. Brain calcification process and phenotypes according to age and sex: Lessons from SLC20A2, PDGFB, and PDGFRB mutation carriers. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet Off Publ Int Soc Psychiatr Genet.* 2015 Oct;168(7):586–94.
10. López-Villegas D, Kulisevsky J, Deus J, Junqué C, Pujol J, Guardia E, et al. Neuropsychological alterations in patients with computed tomography-detected basal ganglia calcification. *Arch Neurol.* 1996 Mar;53(3):251–6.
11. Manyam BV, Walters AS, Narla KR. Bilateral striopallidodentate calcinosis: clinical characteristics of patients seen in a registry. *Mov Disord Off J Mov Disord Soc.* 2001 Mar;16(2):258–64.
12. Nicolas G, Pottier C, Charbonnier C, Guyant-Marechal L, Le Ber I, Pariente J, et al. Phenotypic spectrum of probable and genetically-confirmed idiopathic basal ganglia calcification. *Brain J Neurol.* 2013 Nov;136(Pt 11):3395–407.
13. Kozic D, Todorovic-Djilas L, Semnic R, Miucin-Vukadinovic I, Lucic M. MR imaging - an unreliable and potentially misleading diagnostic modality in patients with intracerebral calcium depositions. Case report. *Neuro Endocrinol Lett.* 2009;30(5):553–7.
14. Avrahami E, Cohn DF, Feibel M, Tadmor R. MRI demonstration and CT correlation of the brain in patients with idiopathic intracerebral calcification. *J Neurol.* 1994 May;241(6):381–4.
15. Ayrignac X, Nicolas G, Carra-Dallière C, Hannequin D, Labauge P. Brain calcifications in adult-onset genetic leukoencephalopathies: a review. *JAMA Neurol.* 2017;74(8):1000–1008.
16. Quintáns B, Oliveira J, Sobrido MJ. Primary familial brain calcifications. *Handb*

Clin Neurol. 2018;147:307–317.

17. Nicolas G, Hannequin D. Calcifications idiopathiques des noyaux gris centraux (maladie de Fahr). *Prat Neurol-FMC*. 2013;4(3):143–150.
18. Preusser M, Kitzwoegerer M, Budka H, Brugger S. Bilateral striopallidodentate calcification (Fahr's syndrome) and multiple system atrophy in a patient with longstanding hypoparathyroidism. *Neuropathol Off J Jpn Soc Neuropathol*. 2007 Oct;27(5):453–6.
19. Casanova MF, Araque JM. Mineralization of the basal ganglia: implications for neuropsychiatry, pathology and neuroimaging. *Psychiatry Res*. 2003 Nov 1;121(1):59–87.
20. Duckett S, Galle P, Escourolle R, Poirier J, Hauw JJ. Presence of zinc, aluminum, magnesium in striopallidodentate (SPD) calcifications (Fahr's disease): electron probe study. *Acta Neuropathol (Berl)*. 1977 Apr 29;38(1):7–10.
21. Miklossy J, Mackenzie IR, Dorovini-Zis K, Calne DB, Wszolek ZK, Klegeris A, et al. Severe vascular disturbance in a case of familial brain calcinosis. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2005 Jun;109(6):643–53.
22. Westenberger A, Balck A, Klein C. Primary familial brain calcifications: genetic and clinical update. *Curr Opin Neurol*. 2019 Aug;32(4):571–8.
23. Wang C, Li Y, Shi L, Ren J, Patti M, Wang T, et al. Mutations in SLC20A2 link familial idiopathic basal ganglia calcification with phosphate homeostasis. *Nat Genet*. 2012 Feb 12;44(3):254–6.
24. Keller A, Westenberger A, Sobrido MJ, Garcia-Murias M, Domingo A, Sears RL, et al. Mutations in the gene encoding PDGF-B cause brain calcifications in humans and mice. *Nat Genet*. 2013 Sep;45(9):1077–82.
25. Giachelli CM. The emerging role of phosphate in vascular calcification. *Kidney Int*. 2009 May;75(9):890–7.
26. Crouthamel MH, Lau WL, Leaf EM, Chavkin NW, Wallingford MC, Peterson DF, et al. Sodium-dependent phosphate cotransporters and phosphate-induced calcification of vascular smooth muscle cells: redundant roles for PiT-1 and PiT-2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33(11):2625–2632.
27. Lau WL, Festing MH, Giachelli CM. Phosphate and vascular calcification: Emerging role of the sodium-dependent phosphate co-transporter PiT-1. *Thromb Haemost*. 2010 Sep;104(3):464–70.
28. Lemos RR, Ramos EM, Legati A, Nicolas G, Jenkinson EM, Livingston JH, et al. Update and mutational analysis of SLC20A2: a major cause of primary familial brain calcification. *Hum Mutat*. 2015;36(5):489–495.
29. Hsu SC, Sears RL, Lemos RR, Quintans B, Huang A, Spiteri E, et al. Mutations in SLC20A2 are a major cause of familial idiopathic basal ganglia calcification. *Neurogenetics*. 2013 Feb;14(1):11–22.
30. Baker M, Strongosky AJ, Sanchez-Contreras MY, Yang S, Ferguson W, Calne DB, et al. SLC20A2 and THAP1 deletion in familial basal ganglia calcification with dystonia. *Neurogenetics*. 2014;15(1):23–30.
31. David S, Ferreira J, Quenez O, Rovelet-Lecrux A, Richard AC, Verin M, et al. Identification of partial SLC20A2 deletions in primary brain calcification using whole-exome sequencing. *Eur J Hum Genet EJHG*. 2016 Nov;24(11):1630–4.
32. Cassinari K, Rovelet-Lecrux A, Tury S, Quenez O, Richard AC, Charbonnier C, et al. Haploinsufficiency of the Primary Familial Brain Calcification Gene SLC20A2 Mediated by Disruption of a Regulatory Element. *Mov Disord Off J Mov Disord Soc*. 2020 Aug;35(8):1336–45.

33. Yamada M, Tanaka M, Takagi M, Kobayashi S, Taguchi Y, Takashima S, et al. Evaluation of SLC20A2 mutations that cause idiopathic basal ganglia calcification in Japan. *Neurology*. 2014 Feb 25;82(8):705–12.
34. Jensen N, Schrøder HD, Hejbøl EK, Thomsen JS, Brüel A, Larsen FT, et al. Mice Knocked Out for the Primary Brain Calcification-Associated Gene *Slc20a2* Show Unimpaired Prenatal Survival but Retarded Growth and Nodules in the Brain that Grow and Calcify Over Time. *Am J Pathol*. 2018 Aug;188(8):1865–81.
35. Jensen N, Autzen JK, Pedersen L. *Slc20a2* is critical for maintaining a physiologic inorganic phosphate level in cerebrospinal fluid. *Neurogenetics*. 2016 Apr;17(2):125–30.
36. Jensen N, Schrøder HD, Hejbøl EK, Füchtbauer EM, de Oliveira JRM, Pedersen L. Loss of function of *Slc20a2* associated with familial idiopathic Basal Ganglia calcification in humans causes brain calcifications in mice. *J Mol Neurosci MN*. 2013 Nov;51(3):994–9.
37. Yamada S, Wallingford MC, Borgeia S, Cox TC, Giachelli CM. Loss of *Pit-2* results in abnormal bone development and decreased bone mineral density and length in mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018 Jan 1;495(1):553–9.
38. Wallingford MC, Chia JJ, Leaf EM, Borgeia S, Chavkin NW, Sawangmake C, et al. SLC20A2 Deficiency in Mice Leads to Elevated Phosphate Levels in Cerebrospinal Fluid and Glymphatic Pathway-Associated Arteriolar Calcification, and Recapitulates Human Idiopathic Basal Ganglia Calcification. *Brain Pathol Zurich Switz*. 2017 Jan;27(1):64–76.
39. Funa K, Sasahara M. The roles of PDGF in development and during neurogenesis in the normal and diseased nervous system. *J Neuroimmune Pharmacol Off J Soc NeuroImmune Pharmacol*. 2014 Mar;9(2):168–81.
40. Gaengel K, Genové G, Armulik A, Betsholtz C. Endothelial-mural cell signaling in vascular development and angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009 May;29(5):630–8.
41. Andrae J, Gallini R, Betsholtz C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev*. 2008 May 15;22(10):1276–312.
42. Nicolas G, Pottier C, Maltete D, Coutant S, Rovelet-Lecrux A, Legallic S, et al. Mutation of the PDGFRB gene as a cause of idiopathic basal ganglia calcification. *Neurology*. 2013 Jan 8;80(2):181–7.
43. Arts FA, Velghe AI, Stevens M, Renauld JC, Essaghir A, Demoulin JB. Idiopathic basal ganglia calcification-associated PDGFRB mutations impair the receptor signalling. *J Cell Mol Med*. 2015 Jan;19(1):239–48.
44. Sanchez-Contreras M, Baker MC, Finch NA, Nicholson A, Wojtas A, Wszolek ZK, et al. Genetic screening and functional characterization of PDGFRB mutations associated with basal ganglia calcification of unknown etiology. *Hum Mutat*. 2014 Aug;35(8):964–71.
45. Johnston JJ, Sanchez-Contreras MY, Keppler-Noreuil KM, Sapp J, Crenshaw M, Finch NA, et al. A Point Mutation in PDGFRB Causes Autosomal-Dominant Penttinen Syndrome. *Am J Hum Genet*. 2015 Sep 3;97(3):465–74.
46. Hayashi T, Legati A, Nishikawa T, Coppola G. First Japanese family with primary familial brain calcification due to a mutation in the PDGFB gene: An exome analysis study. *Psychiatry Clin Neurosci*. 2015;69(2):77–83.
47. Keogh MJ, Pyle A, Daud D, Griffin H, Douroudis K, Eglon G, et al. Published Ahead of Print on April 1, 2015 as 10.1212/WNL.0000000000001517. *Neurology*. 2015;84:1.
48. Nicolas G, Rovelet-Lecrux A, Pottier C, Martinaud O, Wallon D, Vernier L, et al. PDGFB partial deletion: a new, rare mechanism causing brain calcification with

- leukoencephalopathy. *J Mol Neurosci* MN. 2014 Jun;53(2):171–5.
49. Betsholtz C, Keller A. PDGF, pericytes and the pathogenesis of idiopathic basal ganglia calcification (IBGC). *Brain Pathol Zurich Switz*. 2014 Jul;24(4):387–95.
 50. Giovannini D, Touhami J, Charnet P, Sitbon M, Battini JL. Inorganic phosphate export by the retrovirus receptor XPR1 in metazoans. *Cell Rep*. 2013 Jun 27;3(6):1866–73.
 51. Boller F, Boller M, Gilbert J. Familial idiopathic cerebral calcifications. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1977 Mar;40(3):280–5.
 52. Oliveira JRM, Spiteri E, Sobrido MJ, Hopfer S, Klepper J, Voit T, et al. Genetic heterogeneity in familial idiopathic basal ganglia calcification (Fahr disease). *Neurology*. 2004 Dec 14;63(11):2165–7.
 53. Legati A, Giovannini D, Nicolas G, López-Sánchez U, Quintáns B, Oliveira JRM, et al. Mutations in XPR1 cause primary familial brain calcification associated with altered phosphate export. *Nat Genet*. 2015 Jun;47(6):579–81.
 54. Anheim M, López-Sánchez U, Giovannini D, Richard AC, Touhami J, N’Guyen L, et al. XPR1 mutations are a rare cause of primary familial brain calcification. *J Neurol*. 2016 Aug;263(8):1559–64.
 55. Yao XP, Zhao M, Wang C, Guo XX, Su HZ, Dong EL, et al. Analysis of gene expression and functional characterization of XPR1: a pathogenic gene for primary familial brain calcification. *Cell Tissue Res*. 2017 Nov;370(2):267–73.
 56. Meireles AM, Shiao CE, Guenther CA, Sidik H, Kingsley DM, Talbot WS. The phosphate exporter *xpr1b* is required for differentiation of tissue-resident macrophages. *Cell Rep*. 2014 Sep 25;8(6):1659–67.
 57. Yao XP, Cheng X, Wang C, Zhao M, Guo XX, Su HZ, et al. Biallelic Mutations in MYORG Cause Autosomal Recessive Primary Familial Brain Calcification. *Neuron*. 2018 Jun;98(6):1116–1123.e5.
 58. Cen Z, Chen Y, Chen S, Wang H, Yang D, Zhang H, et al. Biallelic loss-of-function mutations in JAM2 cause primary familial brain calcification. *Brain*. 2020;143(2):491–502.
 59. Schottlaender LV, Abeti R, Jaunmuktane Z, Macmillan C, Chelban V, O’Callaghan B, et al. Bi-allelic JAM2 Variants Lead to Early-Onset Recessive Primary Familial Brain Calcification. *Am J Hum Genet*. 2020 Mar 5;106(3):412–21.
 60. Ferreira JB, Pimentel L, Keasey MP, Lemos RR, Santos LM, Oliveira MF, et al. First report of a de novo mutation at SLC20A2 in a patient with brain calcification. *J Mol Neurosci* MN. 2014 Dec;54(4):748–51.
 61. Yamada M. Cerebral Amyloid Angiopathy: Emerging Concepts. *J Stroke*. 2015 Jan;17(1):17–30.
 62. Revesz T, Holton JL, Lashley T, Plant G, Frangione B, Rostagno A, et al. Genetics and molecular pathogenesis of sporadic and hereditary cerebral amyloid angiopathies. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2009;118(1):115–130.
 63. Greenberg SM, Vonsattel JP. Diagnosis of cerebral amyloid angiopathy. Sensitivity and specificity of cortical biopsy. *Stroke*. 1997 Jul;28(7):1418–22.
 64. Greenberg SM, Bacskai BJ, Hernandez-Guillamon M, Pruzin J, Sperling R, van Veluw SJ. Cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer disease - one peptide, two pathways. *Nat Rev Neurol*. 2020 Jan;16(1):30–42.
 65. Tanskanen M, Mäkelä M, Myllykangas L, Notkola IL, Polvikoski T, Sulkava R, et al. Prevalence and severity of cerebral amyloid angiopathy: a population-based study on very elderly Finns (Vantaa 85+). *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2012 Jun;38(4):329–36.
 66. Robinson JL, Corrada MM, Kovacs GG, Dominique M, Caswell C, Xie SX, et al. Non-

- Alzheimer's contributions to dementia and cognitive resilience in The 90+ Study. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2018 Sep;136(3):377–88.
67. Joachim CL, Morris JH, Selkoe DJ. Clinically diagnosed Alzheimer's disease: autopsy results in 150 cases. *Ann Neurol*. 1988 Jul;24(1):50–6.
 68. Parker JCJ, Philpot J. Postmortem evaluation of Alzheimer's disease. *South Med J*. 1985 Dec;78(12):1411–3.
 69. Jäkel L, De Kort AM, Klijn CJ, Schreuder FH, Verbeek MM. Prevalence of cerebral amyloid angiopathy: A systematic review and meta-analysis. *Alzheimers Dement*. 2022;18(1):10–28.
 70. Charidimou A, Gang Q, Werring DJ. Sporadic cerebral amyloid angiopathy revisited: recent insights into pathophysiology and clinical spectrum. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2012 Feb;83(2):124–37.
 71. Béjot Y, Cordonnier C, Durier J, Aboa-Eboulé C, Rouaud O, Giroud M. Intracerebral haemorrhage profiles are changing: results from the Dijon population-based study. *Brain J Neurol*. 2013 Feb;136(Pt 2):658–64.
 72. Meretoja A, Strbian D, Putaala J, Curtze S, Haapaniemi E, Mustanoja S, et al. SMASH-U: A Proposal for Etiologic Classification of Intracerebral Hemorrhage. *Stroke*. 2012 Oct;43(10):2592–7.
 73. Olié V, Grave C, Tuppin P, Duloquin G, Béjot Y, Gabet A. Patients Hospitalized for Ischemic Stroke and Intracerebral Hemorrhage in France: Time Trends (2008–2019), In-Hospital Outcomes, Age and Sex Differences. *J Clin Med*. 2022;11(6):1669.
 74. Qureshi AI, Mendelow AD, Hanley DF. Intracerebral haemorrhage. *The Lancet*. 2009;373(9675):1632–1644.
 75. Rosand J, Muzikansky A, Kumar A, Wisco JJ, Smith EE, Betensky RA, et al. Spatial clustering of hemorrhages in probable cerebral amyloid angiopathy. *Ann Neurol*. 2005 Sep;58(3):459–62.
 76. Malhotra K, Theodorou A, Katsanos AH, Zompola C, Shoamanesh A, Boviatsis E, et al. Prevalence of Clinical and Neuroimaging Markers in Cerebral Amyloid Angiopathy: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Stroke*. 2022;STROKEAHA-121.
 77. Weimar C, Benemann J, Terborg C, Walter U, Weber R, Diener HC. Recurrent stroke after lobar and deep intracerebral hemorrhage: a hospital-based cohort study. *Cerebrovasc Dis Basel Switz*. 2011;32(3):283–8.
 78. Charidimou A, Imaizumi T, Moulin S, Biffi A, Samarasekera N, Yakushiji Y, et al. Brain hemorrhage recurrence, small vessel disease type, and cerebral microbleeds: A meta-analysis. *Neurology*. 2017 Aug 22;89(8):820–9.
 79. Boulouis G, Charidimou A, Pasi M, Roongpiboonsopit D, Xiong L, Auriel E, et al. Hemorrhage recurrence risk factors in cerebral amyloid angiopathy: Comparative analysis of the overall small vessel disease severity score versus individual neuroimaging markers. *J Neurol Sci*. 2017 Sep;380:64–7.
 80. Greenberg SM, Eng JA, Ning M, Smith EE, Rosand J. Hemorrhage burden predicts recurrent intracerebral hemorrhage after lobar hemorrhage. *Stroke*. 2004 Jun;35(6):1415–20.
 81. Charidimou A, Peeters A, Fox Z, Gregoire SM, Vandermeeren Y, Laloux P, et al. Spectrum of transient focal neurological episodes in cerebral amyloid angiopathy: multicentre magnetic resonance imaging cohort study and meta-analysis. *Stroke*. 2012 Sep;43(9):2324–30.
 82. Charidimou A, Jäger RH, Fox Z, Peeters A, Vandermeeren Y, Laloux P, et al. Prevalence and mechanisms of cortical superficial siderosis in cerebral amyloid angiopathy. *Neurology*. 2013 Aug 13;81(7):626–32.

83. Ni J, Auriel E, Jindal J, Ayres A, Schwab KM, Martinez-Ramirez S, et al. The characteristics of superficial siderosis and convexity subarachnoid hemorrhage and clinical relevance in suspected cerebral amyloid angiopathy. *Cerebrovasc Dis Basel Switz.* 2015;39(5–6):278–86.
84. Xiong L, Charidimou A, Pasi M, Boulouis G, Pongpitakmetha T, Schirmer MD, et al. Predictors for Late Post-Intracerebral Hemorrhage Dementia in Patients with Probable Cerebral Amyloid Angiopathy. *J Alzheimers Dis JAD.* 2019;71(2):435–42.
85. Xiong L, Boulouis G, Charidimou A, Roongpiboonsopit D, Jessel MJ, Pasi M, et al. Dementia incidence and predictors in cerebral amyloid angiopathy patients without intracerebral hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab.* 2018 Feb;38(2):241–9.
86. Boyle PA, Yu L, Nag S, Leurgans S, Wilson RS, Bennett DA, et al. Cerebral amyloid angiopathy and cognitive outcomes in community-based older persons. *Neurology.* 2015;85(22):1930–1936.
87. Smith EE. Cerebral amyloid angiopathy as a cause of neurodegeneration. *J Neurochem.* 2018 Mar;144(5):651–8.
88. Pathological correlates of late-onset dementia in a multicentre, community-based population in England and Wales. Neuropathology Group of the Medical Research Council Cognitive Function and Ageing Study (MRC CFAS). *Lancet Lond Engl.* 2001 Jan 20;357(9251):169–75.
89. Xiong L, van Veluw SJ, Bounemia N, Charidimou A, Pasi M, Boulouis G, et al. Cerebral Cortical Microinfarcts on Magnetic Resonance Imaging and Their Association With Cognition in Cerebral Amyloid Angiopathy. *Stroke.* 2018 Oct;49(10):2330–6.
90. Yates PA, Villemagne VL, Ellis KA, Desmond PM, Masters CL, Rowe CC. Cerebral Microbleeds: A Review of Clinical, Genetic, and Neuroimaging Associations. *Front Neurol* [Internet]. 2014 [cited 2021 Sep 11];4. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fneur.2013.00205/abstract>
91. Akoudad S, Wolters FJ, Viswanathan A, de Bruijn RF, van der Lugt A, Hofman A, et al. Association of Cerebral Microbleeds With Cognitive Decline and Dementia. *JAMA Neurol.* 2016 Aug 1;73(8):934–43.
92. Shams S, Martola J, Charidimou A, Cavallin L, Granberg T, Shams M, et al. Cortical superficial siderosis: Prevalence and biomarker profile in a memory clinic population. *Neurology.* 2016 Sep 13;87(11):1110–7.
93. Schrag M, Kirshner H. Neuropsychological Effects of Cerebral Amyloid Angiopathy. *Curr Neurol Neurosci Rep* [Internet]. 2016 Aug [cited 2020 Mar 20];16(8). Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11910-016-0674-1>
94. Case NF, Charlton A, Zwiers A, Batool S, McCreary CR, Hogan DB, et al. Cerebral Amyloid Angiopathy Is Associated With Executive Dysfunction and Mild Cognitive Impairment. *Stroke.* 2016 Aug;47(8):2010–6.
95. Planton M, Raposo N, Albucher JF, Pariente J. Cerebral amyloid angiopathy-related cognitive impairment: The search for a specific neuropsychological pattern. *Rev Neurol (Paris).* 2017 Nov;173(9):562–5.
96. Auriel E, Charidimou A, Gurol ME, Ni J, Van Etten ES, Martinez-Ramirez S, et al. Validation of Clinicoradiological Criteria for the Diagnosis of Cerebral Amyloid Angiopathy-Related Inflammation. *JAMA Neurol.* 2016 Feb;73(2):197–202.
97. Chu S, Xu F, Su Y, Chen H, Cheng X. Cerebral Amyloid Angiopathy (CAA)-Related Inflammation: Comparison of Inflammatory CAA and Amyloid- β -Related Angiitis. Yu J, editor. *J Alzheimers Dis.* 2016 Mar 15;51(2):525–32.
98. Wu JJ, Yao M, Ni J. Cerebral amyloid angiopathy-related inflammation: current

- status and future implications. *Chin Med J (Engl)*. 2021;134(6):646–654.
99. Scolding NJ, Joseph F, Kirby PA, Mazanti I, Gray F, Mikol J, et al. A β -related angiitis: primary angiitis of the central nervous system associated with cerebral amyloid angiopathy. *Brain*. 2005 Mar 1;128(3):500–15.
100. Szpak GM, Lewandowska E, Śliwińska A, Stępień T, Tarka S, Mendel T, et al. Inflammatory cerebral amyloid angiopathy: the overlap of perivascular (PAN-like) with vasculitic (A β -related angiitis) form: an autopsy case. *Folia Neuropathol*. :14.
101. Piazza F, Greenberg SM, Savoirdo M, Gardinetti M, Chiapparini L, Raicher I, et al. Anti-amyloid β autoantibodies in cerebral amyloid angiopathy-related inflammation: Implications for amyloid-modifying therapies. *Ann Neurol*. 2013;73(4):449–58.
102. Corovic A, Kelly S, Markus HS. Cerebral amyloid angiopathy associated with inflammation: A systematic review of clinical and imaging features and outcome. *Int J Stroke*. 2018 Apr;13(3):257–67.
103. Chung KK, Anderson NE, Hutchinson D, Synek B, Barber PA. Cerebral amyloid angiopathy related inflammation: three case reports and a review. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2011 Jan 1;82(1):20–6.
104. Corovic A, Kelly S, Markus HS. Cerebral amyloid angiopathy associated with inflammation: A systematic review of clinical and imaging features and outcome. *Int J Stroke*. 2018 Apr;13(3):257–67.
105. Castro Caldas A, Silva C, Albuquerque L, Pimentel J, Silva V, Ferro JM. Cerebral Amyloid Angiopathy Associated with Inflammation: Report of 3 Cases and Systematic Review. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2015 Sep;24(9):2039–48.
106. Regenhardt RW, Thon JM, Das AS, Thon OR, Charidimou A, Viswanathan A, et al. Association Between Immunosuppressive Treatment and Outcomes of Cerebral Amyloid Angiopathy-Related Inflammation. *JAMA Neurol*. 2020 Jun 22;77(10):1–10.
107. Antolini L, DiFrancesco JC, Zedde M, Basso G, Arighi A, Shima A, et al. Spontaneous ARIA-like Events in Cerebral Amyloid Angiopathy-Related Inflammation: A Multicenter Prospective Longitudinal Cohort Study. *Neurology*. 2021 Nov 2;97(18):e1809–22.
108. Sakaguchi H, Ueda A, Kosaka T, Yamashita S, Kimura E, Yamashita T, et al. Cerebral amyloid angiopathy-related inflammation presenting with steroid-responsive higher brain dysfunction: case report and review of the literature. *J Neuroinflammation*. 2011;8(1):116.
109. Cheng AL, Batool S, McCreary CR, Lauzon ML, Frayne R, Goyal M, et al. Susceptibility-weighted imaging is more reliable than T2*-weighted gradient-recalled echo MRI for detecting microbleeds. *Stroke*. 2013 Oct;44(10):2782–6.
110. Dierksen GA, Skehan ME, Khan MA, Jeng J, Nandigam RNK, Becker JA, et al. Spatial relation between microbleeds and amyloid deposits in amyloid angiopathy. *Ann Neurol*. 2010 Oct;68(4):545–8.
111. Lu D, Liu J, MacKinnon AD, Tozer DJ, Markus HS. Prevalence and Risk Factors of Cerebral Microbleeds: An Analysis From the UK Biobank. *Neurology*. 2021 Aug 18;
112. Roob G, Lechner A, Schmidt R, Flooh E, Hartung HP, Fazekas F. Frequency and location of microbleeds in patients with primary intracerebral hemorrhage. *Stroke*. 2000;31(11):2665–2669.
113. Blanc C, Viguier A, Calviere L, Planton M, Albucher JF, Rousseau V, et al. Underlying small vessel disease associated with mixed cerebral microbleeds. *Front Neurol*. 2019;10:1126.
114. Pasi M, Charidimou A, Boulouis G, Auriel E, Ayres A, Schwab KM, et al. Mixed-location cerebral hemorrhage/microbleeds: underlying microangiopathy and recurrence risk. *Neurology*. 2018;90(2):e119–e126.

115. Greenberg SM, Charidimou A. Diagnosis of cerebral amyloid angiopathy: evolution of the Boston criteria. *Stroke*. 2018;49(2):491–497.
116. Gregoire SM, Chaudhary UJ, Brown MM, Yousry TA, Kallis C, Jäger HR, et al. The Microbleed Anatomical Rating Scale (MARS): reliability of a tool to map brain microbleeds. *Neurology*. 2009 Nov 24;73(21):1759–66.
117. Greenberg SM, Vernooij MW, Cordonnier C, Viswanathan A, Al-Shahi Salman R, Warach S, et al. Cerebral microbleeds: a guide to detection and interpretation. *Lancet Neurol*. 2009 Feb;8(2):165–74.
118. Lauer A, van Veluw SJ, William CM, Charidimou A, Roongpiboonsopit D, Vashkevich A, et al. Microbleeds on MRI are associated with microinfarcts on autopsy in cerebral amyloid angiopathy. *Neurology*. 2016 Oct 4;87(14):1488–92.
119. van Veluw SJ, Charidimou A, van der Kouwe AJ, Lauer A, Reijmer YD, Costantino I, et al. Microbleed and microinfarct detection in amyloid angiopathy: a high-resolution MRI-histopathology study. *Brain*. 2016 Dec;139(12):3151–62.
120. van Veluw SJ, Biessels GJ, Klijn CJM, Rozemuller AJM. Heterogeneous histopathology of cortical microbleeds in cerebral amyloid angiopathy. *Neurology*. 2016 Mar 1;86(9):867–71.
121. Moulin S, Cordonnier C. Role of Cerebral Microbleeds for Intracerebral Haemorrhage and Dementia. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2019 Jun 19;19(8):51.
122. Charidimou A, Shams S, Romero JR, Ding J, Veltkamp R, Horstmann S, et al. Clinical significance of cerebral microbleeds on MRI: A comprehensive meta-analysis of risk of intracerebral hemorrhage, ischemic stroke, mortality, and dementia in cohort studies (v1). *Int J Stroke*. 2018;13(5):454–468.
123. Moulin S, Labreuche J, Bombois S, Rossi C, Boulouis G, Hénon H, et al. Dementia risk after spontaneous intracerebral haemorrhage: a prospective cohort study. *Lancet Neurol*. 2016 Jul;15(8):820–9.
124. Charidimou A, Linn J, Vernooij MW, Opherk C, Akoudad S, Baron JC, et al. Cortical superficial siderosis: detection and clinical significance in cerebral amyloid angiopathy and related conditions. *Brain*. 2015 Aug;138(8):2126–39.
125. Beitzke M, Enzinger C, Wünsch G, Aszlaber M, Gattringer T, Fazekas F. Contribution of convexal subarachnoid hemorrhage to disease progression in cerebral amyloid angiopathy. *Stroke*. 2015 Jun;46(6):1533–40.
126. Linn J, Halpin A, Demaerel P, Ruhland J, Giese AD, Dichgans M, et al. Prevalence of superficial siderosis in patients with cerebral amyloid angiopathy. *Neurology*. 2010;74(17):1346–1350.
127. Vernooij MW, Ikram MA, Hofman A, Krestin GP, Breteler MMB, van der Lugt A. Superficial siderosis in the general population. *Neurology*. 2009 Jul 21;73(3):202–5.
128. Shoamanesh A, Martinez-Ramirez S, Oliveira-Filho J, Reijmer Y, Falcone GJ, Ayres A, et al. Interrelationship of superficial siderosis and microbleeds in cerebral amyloid angiopathy. *Neurology*. 2014 Nov 11;83(20):1838–43.
129. Zonneveld HI, Goos JDC, Wattjes MP, Prins ND, Scheltens P, van der Flier WM, et al. Prevalence of cortical superficial siderosis in a memory clinic population. *Neurology*. 2014 Feb 25;82(8):698–704.
130. Wollenweber FA, Baykara E, Zedde M, Gesierich B, Achmüller M, Jouvent E, et al. Cortical Superficial Siderosis in Different Types of Cerebral Small Vessel Disease. *Stroke*. 2017 May;48(5):1404–7.
131. Charidimou A, Zonneveld HI, Shams S, Kantarci K, Shoamanesh A, Hilal S, et al. APOE and cortical superficial siderosis in CAA: Meta-analysis and potential mechanisms. *Neurology*. 2019 Jul 23;93(4):e358–71.

132. Linn J, Wollenweber FA, Lummel N, Bochmann K, Pfefferkorn T, Gschwendtner A, et al. Superficial siderosis is a warning sign for future intracranial hemorrhage. *J Neurol*. 2013;260(1):176–181.
133. Roongpiboonsopit D, Charidimou A, William CM, Lauer A, Falcone GJ, Martinez-Ramirez S, et al. Cortical superficial siderosis predicts early recurrent lobar hemorrhage. *Neurology*. 2016 Nov 1;87(18):1863–70.
134. Charidimou A, Boulouis G, Xiong L, Jessel MJ, Roongpiboonsopit D, Ayres A, et al. Cortical superficial siderosis and first-ever cerebral hemorrhage in cerebral amyloid angiopathy. *Neurology*. 2017 Apr 25;88(17):1607–14.
135. Yamada M. Cerebral Amyloid Angiopathy: Emerging Concepts. *J Stroke*. 2015;17(1):17.
136. Kumar S, Goddeau RPJ, Selim MH, Thomas A, Schlaug G, Alhazzani A, et al. Atraumatic convexal subarachnoid hemorrhage: clinical presentation, imaging patterns, and etiologies. *Neurology*. 2010 Mar 16;74(11):893–9.
137. Rodrigues MA, Samarasekera N, Lerpiniere C, Humphreys C, McCarron MO, White PM, et al. The Edinburgh CT and genetic diagnostic criteria for lobar intracerebral haemorrhage associated with cerebral amyloid angiopathy: model development and diagnostic test accuracy study. *Lancet Neurol*. 2018 Mar;17(3):232–40.
138. Raposo N, Charidimou A, Roongpiboonsopit D, Onyekaba M, Gurol ME, Rosand J, et al. Convexity subarachnoid hemorrhage in lobar intracerebral hemorrhage: A prognostic marker. *Neurology*. 2020 Mar 3;94(9):e968–77.
139. Ye X, Li G, Liu X, Song G, Jia Y, Wu C, et al. Apolipoprotein E genotype predicts subarachnoid extension in spontaneous intracerebral haemorrhage. *Eur J Neurol*. 2021 Jun;28(6):1992–9.
140. Maas MB, Nemeth AJ, Rosenberg NF, Kosteva AR, Guth JC, Liotta EM, et al. Subarachnoid extension of primary intracerebral hemorrhage is associated with poor outcomes. *Stroke*. 2013;44(3):653–657.
141. Gouw AA, Seewann A, Van Der Flier WM, Barkhof F, Rozemuller AM, Scheltens P, et al. Heterogeneity of small vessel disease: a systematic review of MRI and histopathology correlations. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2011;82(2):126–135.
142. Chen YW, Gurol ME, Rosand J, Viswanathan A, Rakich SM, Groover TR, et al. Progression of white matter lesions and hemorrhages in cerebral amyloid angiopathy. *Neurology*. 2006;67(1):83–87.
143. Gurol ME, Viswanathan A, Gidicsin C, Hedden T, Martinez-Ramirez S, Dumas A, et al. Cerebral amyloid angiopathy burden associated with leukoaraiosis: a positron emission tomography/magnetic resonance imaging study. *Ann Neurol*. 2013;73(4):529–536.
144. Verhaaren BF, Vernooij MW, de Boer R, Hofman A, Niessen WJ, van der Lugt A, et al. High blood pressure and cerebral white matter lesion progression in the general population. *Hypertension*. 2013;61(6):1354–1359.
145. Fazekas F, Barkhof F, Wahlund LO, Pantoni L, Erkinjuntti T, Scheltens P, et al. CT and MRI rating of white matter lesions. *Cerebrovasc Dis*. 2002;13(Suppl. 2):31–36.
146. Smith EE, Gurol ME, Eng JA, Engel CR, Nguyen TN, Rosand J, et al. White matter lesions, cognition, and recurrent hemorrhage in lobar intracerebral hemorrhage. *Neurology*. 2004 Nov 9;63(9):1606–12.
147. Kövari E, Herrmann FR, Hof PR, Bouras C. The relationship between cerebral amyloid angiopathy and cortical microinfarcts in brain ageing and Alzheimer's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2013 Aug;39(5):498–509.
148. van Veluw SJ, Lauer A, Charidimou A, Bounemia N, Xiong L, Boulouis G, et al.

- Evolution of DWI lesions in cerebral amyloid angiopathy: evidence for ischemia. *Neurology*. 2017;89(21):2136–2142.
149. Launer LJ, Hughes TM, White LR. Microinfarcts, brain atrophy, and cognitive function: the Honolulu Asia aging study autopsy study. *Ann Neurol*. 2011;70(5):774–780.
150. Gioia LC, Kate M, Choi V, Sivakumar L, Jeerakathil T, Kosior J, et al. Ischemia in intracerebral hemorrhage is associated with leukoaraiosis and hematoma volume, not blood pressure reduction. *Stroke*. 2015 Jun;46(6):1541–7.
151. Wu B, Yao X, Lei C, Liu M, Selim MH. Enlarged perivascular spaces and small diffusion-weighted lesions in intracerebral hemorrhage. *Neurology*. 2015 Dec 8;85(23):2045–52.
152. Gregoire SM, Charidimou A, Gadapa N, Dolan E, Antoun N, Peeters A, et al. Acute ischaemic brain lesions in intracerebral haemorrhage: multicentre cross-sectional magnetic resonance imaging study. *Brain J Neurol*. 2011 Aug;134(Pt 8):2376–86.
153. Van Dalen JW, Scuric EE, Van Veluw SJ, Caan MW, Nederveen AJ, Biessels GJ, et al. Cortical microinfarcts detected in vivo on 3 Tesla MRI: clinical and radiological correlates. *Stroke*. 2015;46(1):255–257.
154. Kimberly WT, Gilson A, Rost NS, Rosand J, Viswanathan A, Smith EE, et al. Silent ischemic infarcts are associated with hemorrhage burden in cerebral amyloid angiopathy. *Neurology*. 2009 Apr 7;72(14):1230–5.
155. van den Brink H, Zwiers A, Switzer AR, Charlton A, McCreary CR, Goodyear BG, et al. Cortical microinfarcts on 3T magnetic resonance imaging in cerebral amyloid angiopathy: relations with other magnetic resonance imaging markers of cerebral amyloid angiopathy and cognition. *Stroke*. 2018;49(8):1899–1905.
156. Soontornniyomkij V, Choi C, Pomakian J, Vinters HV. High-definition characterization of cerebral β -amyloid angiopathy in Alzheimer's disease. *Hum Pathol*. 2010;41(11):1601–1608.
157. Ferro DA, van den Brink H, Exalto LG, Boomsma JMF, Barkhof F, Prins ND, et al. Clinical relevance of acute cerebral microinfarcts in vascular cognitive impairment. *Neurology*. 2019 Apr 2;92(14):e1558–66.
158. Kidwell CS, Rosand J, Norato G, Dixon S, Worrall BB, James ML, et al. Ischemic lesions, blood pressure dysregulation, and poor outcomes in intracerebral hemorrhage. *Neurology*. 2017 Feb 21;88(8):782–8.
159. Cordonnier C, Al-Shahi Salman R, Wardlaw J. Spontaneous brain microbleeds: systematic review, subgroup analyses and standards for study design and reporting. *Brain*. 2007;130(8):1988–2003.
160. Martinez-Ramirez S, Pontes-Neto OM, Dumas AP, Auriel E, Halpin A, Quimby M, et al. Topography of dilated perivascular spaces in subjects from a memory clinic cohort. *Neurology*. 2013;80(17):1551–1556.
161. Martinez-Ramirez S, Van Rooden S, Charidimou A, van Opstal AM, Wermer M, Gurol ME, et al. Perivascular spaces volume in sporadic and hereditary (Dutch-type) cerebral amyloid angiopathy. *Stroke*. 2018;49(8):1913–1919.
162. Charidimou A, Boulouis G, Pasi M, Auriel E, van Etten ES, Haley K, et al. MRI-visible perivascular spaces in cerebral amyloid angiopathy and hypertensive arteriopathy. *Neurology*. 2017;88(12):1157–1164.
163. Charidimou A, Jaunmuktane Z, Baron JC, Burnell M, Varlet P, Peeters A, et al. White matter perivascular spaces: An MRI marker in pathology-proven cerebral amyloid angiopathy? *Neurology*. 2014 Jan 7;82(1):57–62.
164. Charidimou A, Meegahage R, Fox Z, Peeters A, Vandermeeren Y, Laloux P, et al.

- Enlarged perivascular spaces as a marker of underlying arteriopathy in intracerebral haemorrhage: a multicentre MRI cohort study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2013;84(6):624–629.
165. Charidimou A, Jäger RH, Peeters A, Vandermeeren Y, Laloux P, Baron JC, et al. White Matter Perivascular Spaces Are Related to Cortical Superficial Siderosis in Cerebral Amyloid Angiopathy. *Stroke*. 2014 Oct;45(10):2930–5.
166. Paradise M, Crawford JD, Lam BCP, Wen W, Kochan NA, Makkar S, et al. Association of Dilated Perivascular Spaces With Cognitive Decline and Incident Dementia. *Neurology*. 2021 Mar 16;96(11):e1501–11.
167. Perosa V, Oltmer J, Munting LP, Freeze WM, Auger CA, Scherlek AA, et al. Perivascular space dilation is associated with vascular amyloid- β accumulation in the overlying cortex. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2022 Mar;143(3):331–48.
168. Van Veluw SJ, Biessels GJ, Bouvy WH, Spliet WG, Zwanenburg JJ, Luijten PR, et al. Cerebral amyloid angiopathy severity is linked to dilation of juxtacortical perivascular spaces. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2016;36(3):576–580.
169. Duering M, Righart R, Csanadi E, Jouvent E, Hervé D, Chabriat H, et al. Incident subcortical infarcts induce focal thinning in connected cortical regions. *Neurology*. 2012 Nov 13;79(20):2025–8.
170. Tuladhar AM, Reid AT, Shumskaya E, de Laat KF, van Norden AGW, van Dijk EJ, et al. Relationship between white matter hyperintensities, cortical thickness, and cognition. *Stroke*. 2015 Feb;46(2):425–32.
171. Banerjee G, Jang H, Kim HJ, Kim ST, Kim JS, Lee JH, et al. Total MRI Small Vessel Disease Burden Correlates with Cognitive Performance, Cortical Atrophy, and Network Measures in a Memory Clinic Population. *J Alzheimers Dis JAD*. 2018;63(4):1485–97.
172. Fotiadis P, van Rooden S, van der Grond J, Schultz A, Martinez-Ramirez S, Auriel E, et al. Cortical atrophy in patients with cerebral amyloid angiopathy: a case-control study. *Lancet Neurol*. 2016;15(8):811–819.
173. Kozberg MG, Perosa V, Gurol ME, van Veluw SJ. A practical approach to the management of cerebral amyloid angiopathy. *Int J Stroke Off J Int Stroke Soc*. 2021 Jun;16(4):356–69.
174. Knudsen KA, Rosand J, Karluk D, Greenberg SM. Clinical diagnosis of cerebral amyloid angiopathy: Validation of the Boston Criteria. *Neurology*. 2001 Feb 27;56(4):537–9.
175. Martinez-Ramirez S, Romero JR, Shoamanesh A, McKee AC, Van Etten E, Pontes-Neto O, et al. Diagnostic value of lobar microbleeds in individuals without intracerebral hemorrhage. *Alzheimers Dement*. 2015 Dec;11(12):1480–8.
176. Seo SW, Ayakta N, Grinberg LT, Villeneuve S, Lehmann M, Reed B, et al. Regional correlations between [11C] PIB PET and post-mortem burden of amyloid-beta pathology in a diverse neuropathological cohort. *NeuroImage Clin*. 2017;13:130–137.
177. Budd Haeberlein S, O’Gorman J, Chiao P, Bussi ere T, von Rosenstiel P, Tian Y, et al. Clinical Development of Aducanumab, an Anti-A β Human Monoclonal Antibody Being Investigated for the Treatment of Early Alzheimer’s Disease. *J Prev Alzheimers Dis*. 2017;4(4):255–63.
178. Johnson KA, Gregas M, Becker JA, Kinnecom C, Salat DH, Moran EK, et al. Imaging of amyloid burden and distribution in cerebral amyloid angiopathy. *Ann Neurol*. 2007 Sep;62(3):229–34.
179. Fernandes S, Chong JJ, Paige SL, Iwata M, Torok-Storb B, Keller G, et al. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

180. McCarter SJ, Lesnick TG, Lowe V, Mielke MM, Constantopoulos E, Rabinstein AA, et al. Cerebral Amyloid Angiopathy Pathology and Its Association With Amyloid- β PET Signal. *Neurology*. 2021 Nov 2;97(18):e1799–808.
181. Planton M, Saint-Aubert L, Raposo N, Payoux P, Salabert AS, Albucher JF, et al. Florbetapir regional distribution in cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer's disease: a PET study. *J Alzheimers Dis*. 2020;73(4):1607–1614.
182. Zhang Q, Zhao X, Lei P, Kung HF, Yang Z, Zhu L, et al. Evaluating [68Ga] Ga-p14-032 as a Novel PET Tracer for Diagnosis Cerebral Amyloid Angiopathy. *Front Neurol*. 2021;1885.
183. Blennow K, Dubois B, Fagan AM, Lewczuk P, de Leon MJ, Hampel H. Clinical utility of cerebrospinal fluid biomarkers in the diagnosis of early Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2015 Jan;11(1):58–69.
184. Gabelle A, Dumurgier J, Vercausse O, Paquet C, Bombois S, Laplanche JL, et al. Impact of the 2008–2012 French Alzheimer Plan on the Use of Cerebrospinal Fluid Biomarkers in Research Memory Center: The PLM Study. *J Alzheimers Dis*. 2013 Feb 6;34(1):297–305.
185. Olsson B, Lautner R, Andreasson U, Öhrfelt A, Portelius E, Bjerke M, et al. CSF and blood biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol*. 2016 Jun;15(7):673–84.
186. Greenberg SM, Bacskai BJ, Hernandez-Guillamon M, Pruzin J, Sperling R, van Veluw SJ. Cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer disease—one peptide, two pathways. *Nat Rev Neurol*. 2019;1–13.
187. Masters CL, Bateman R, Blennow K, Rowe CC, Sperling RA, Cummings JL. Alzheimer's disease. *Nat Rev Dis Primer* [Internet]. 2015 Dec [cited 2020 Apr 14];1(1). Available from: <http://www.nature.com/articles/nrdp201556>
188. Charidimou A, Friedrich JO, Greenberg SM, Viswanathan A. Core cerebrospinal fluid biomarker profile in cerebral amyloid angiopathy: A meta-analysis. *Neurology*. 2018 Feb 27;90(9):e754–62.
189. Martínez-Lizana E, Carmona-Iragui M, Alcolea D, Gómez-Choco M, Vilaplana E, Sánchez-Saudinós MB, et al. Cerebral amyloid angiopathy-related atraumatic convexal subarachnoid hemorrhage: an ARIA before the tsunami. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2015;35(5):710–717.
190. Renard D, Gabelle A, Hirtz C, Demattei C, Thouvenot E, Lehmann S. Cerebrospinal Fluid Alzheimer's Disease Biomarkers in Isolated Supratentorial Cortical Superficial Siderosis. *J Alzheimers Dis*. 2016 Oct 18;54(4):1291–5.
191. Verbeek MM, Kremer BPH, Rikkert MO, Van Domburg PHMF, Skehan ME, Greenberg SM. Cerebrospinal fluid amyloid β_{40} is decreased in cerebral amyloid angiopathy. *Ann Neurol*. 2009 Aug;66(2):245–9.
192. Ishii K, Tamaoka A, Mizusawa H, Shoji S, Ohtake T, Fraser PE, et al. Abeta1-40 but not Abeta1-42 levels in cortex correlate with apolipoprotein E epsilon4 allele dosage in sporadic Alzheimer's disease. *Brain Res*. 1997 Feb 14;748(1–2):250–2.
193. Harper JD, Lieber CM, Lansbury PTJ. Atomic force microscopic imaging of seeded fibril formation and fibril branching by the Alzheimer's disease amyloid-beta protein. *Chem Biol*. 1997 Dec;4(12):951–9.
194. Kakuda N, Miyasaka T, Iwasaki N, Nirasawa T, Wada-Kakuda S, Takahashi-Fujigasaki J, et al. Distinct deposition of amyloid- β species in brains with Alzheimer's disease pathology visualized with MALDI imaging mass spectrometry. *Acta Neuropathol Commun*. 2017 Oct 16;5(1):73.
195. Tarasoff-Conway JM, Carare RO, Osorio RS, Glodzik L, Butler T, Fieremans E, et al.

- Clearance systems in the brain—implications for Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol*. 2015;11(8):457–470.
196. Mestre H, Tithof J, Du T, Song W, Peng W, Sweeney AM, et al. Flow of cerebrospinal fluid is driven by arterial pulsations and is reduced in hypertension. *Nat Commun*. 2018 Nov 19;9(1):4878.
197. van Veluw SJ, Hou SS, Calvo-Rodriguez M, Arbel-Ornath M, Snyder AC, Frosch MP, et al. Vasomotion as a Driving Force for Paravascular Clearance in the Awake Mouse Brain. *Neuron*. 2020 Feb 5;105(3):549–561.e5.
198. Wilcock DM, Vitek MP, Colton CA. Vascular amyloid alters astrocytic water and potassium channels in mouse models and humans with Alzheimer’s disease. *Neuroscience*. 2009 Mar 31;159(3):1055–69.
199. Kress BT, Iliff JJ, Xia M, Wang M, Wei HS, Zeppenfeld D, et al. Impairment of paravascular clearance pathways in the aging brain. *Ann Neurol*. 2014;76(6):845–861.
200. Weller RO, Massey A, Newman TA, Hutchings M, Kuo YM, Roher AE. Cerebral amyloid angiopathy. *brain*. 2000;12:14.
201. Weller RO, Subash M, Preston SD, Mazanti I, Carare RO. Perivascular drainage of amyloid-beta peptides from the brain and its failure in cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer’s disease. *Brain Pathol Zurich Switz*. 2008;18(2):253–266.
202. Rovelet-Lecrux A, Hannequin D, Raux G, Le Meur N, Laquerrière A, Vital A, et al. APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. *Nat Genet*. 2006 Jan;38(1):24–6.
203. Wisniewski HM, Wegiel J. Beta-amyloid formation by myocytes of leptomeningeal vessels. *Acta Neuropathol (Berl)*. 1994;87(3):233–41.
204. Davis J, Cribbs DH, Cotman CW, Van Nostrand WE. Pathogenic amyloid beta-protein induces apoptosis in cultured human cerebrovascular smooth muscle cells. *Amyloid Int J Exp Clin Investig Off J Int Soc Amyloidosis*. 1999 Sep;6(3):157–64.
205. Dietrich HH, Xiang C, Han BH, Zipfel GJ, Holtzman DM. Soluble amyloid-beta, effect on cerebral arteriolar regulation and vascular cells. *Mol Neurodegener*. 2010 Apr 13;5:15.
206. Paris D, Humphrey J, Quadros A, Patel N, Crescentini R, Crawford F, et al. Vasoactive effects of A beta in isolated human cerebrovessels and in a transgenic mouse model of Alzheimer’s disease: role of inflammation. *Neurol Res*. 2003 Sep;25(6):642–51.
207. Zipfel GJ, Han H, Ford AL, Lee JM. Cerebral amyloid angiopathy: progressive disruption of the neurovascular unit. *Stroke*. 2009 Mar;40(3 Suppl):S16–19.
208. Christie R, Yamada M, Moskowitz M, Hyman B. Structural and functional disruption of vascular smooth muscle cells in a transgenic mouse model of amyloid angiopathy. *Am J Pathol*. 2001 Mar;158(3):1065–71.
209. Gentile MT, Vecchione C, Maffei A, Aretini A, Marino G, Poulet R, et al. Mechanisms of soluble beta-amyloid impairment of endothelial function. *J Biol Chem*. 2004 Nov 12;279(46):48135–42.
210. Hamel E, Nicolakakis N, Aboukassim T, Ongali B, Tong XK. Oxidative stress and cerebrovascular dysfunction in mouse models of Alzheimer’s disease. *Exp Physiol*. 2008 Jan;93(1):116–20.
211. Cheng X, He P, Yao H, Dong Q, Li R, Shen Y. Occludin deficiency with BACE1 elevation in cerebral amyloid angiopathy. *Neurology*. 2014;82(19):1707–1715.
212. van Opstal AM, van Rooden S, van Harten T, Ghariq E, Labadie G, Fotiadis P, et al. Cerebrovascular function in presymptomatic and symptomatic individuals with hereditary cerebral amyloid angiopathy: a case-control study. *Lancet Neurol*. 2017 Feb;16(2):115–22.

213. Dumas A, Dierksen GA, Gurol ME, Halpin A, Martinez-Ramirez S, Schwab K, et al. Functional magnetic resonance imaging detection of vascular reactivity in cerebral amyloid angiopathy. *Ann Neurol*. 2012;72(1):76–81.
214. van Dijk SE, van der Grond J, Lak J, van den Berg-Huysmans A, Labadie G, Terwindt GM, et al. Longitudinal Progression of Magnetic Resonance Imaging Markers and Cognition in Dutch-Type Hereditary Cerebral Amyloid Angiopathy. *Stroke*. 2022;53(6):2006–2015.
215. Hartz AM, Bauer B, Soldner EL, Wolf A, Boy S, Backhaus R, et al. Amyloid- β s Contributes to Blood–Brain Barrier Leakage in Transgenic Human Amyloid Precursor Protein Mice and in Humans With Cerebral Amyloid Angiopathy. 2011;
216. Lee JM, Yin KJ, Hsin I, Chen S, Fryer JD, Holtzman DM, et al. Matrix metalloproteinase-9 and spontaneous hemorrhage in an animal model of cerebral amyloid angiopathy. *Ann Neurol*. 2003 Sep;54(3):379–82.
217. Blaise R, Mateo V, Rouxel C, Zaccarini F, Glorian M, Béréziat G, et al. Wild-type amyloid beta 1-40 peptide induces vascular smooth muscle cell death independently from matrix metalloprotease activity. *Aging Cell*. 2012 Jun;11(3):384–93.
218. Attems J. Sporadic cerebral amyloid angiopathy: pathology, clinical implications, and possible pathomechanisms. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2005 Oct;110(4):345–59.
219. Greenberg SM, Vonsattel JP. Diagnosis of cerebral amyloid angiopathy. Sensitivity and specificity of cortical biopsy. *Stroke*. 1997 Jul;28(7):1418–22.
220. Thal DR, Ghebremedhin E, Rüb U, Yamaguchi H, Del Tredici K, Braak H. Two types of sporadic cerebral amyloid angiopathy. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2002 Mar;61(3):282–93.
221. Thal DR, Griffin WST, de Vos RAI, Ghebremedhin E. Cerebral amyloid angiopathy and its relationship to Alzheimer’s disease. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2008 Jun;115(6):599–609.
222. Calhoun ME, Burgermeister P, Phinney AL, Stalder M, Tolnay M, Wiederhold KH, et al. Neuronal overexpression of mutant amyloid precursor protein results in prominent deposition of cerebrovascular amyloid. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Nov 23;96(24):14088–93.
223. Weller RO, Massey A, Newman TA, Hutchings M, Kuo YM, Roher AE. Cerebral amyloid angiopathy: amyloid beta accumulates in putative interstitial fluid drainage pathways in Alzheimer’s disease. *Am J Pathol*. 1998 Sep;153(3):725–33.
224. Burgermeister P, Calhoun ME, Winkler DT, Jucker M. Mechanisms of cerebrovascular amyloid deposition: lessons from mouse models. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;903(1):307–316.
225. Kalaria RN, Premkumar DR, Pax AB, Cohen DL, Lieberburg I. Production and increased detection of amyloid β protein and amyloidogenic fragments in brain microvessels, meningeal vessels and choroid plexus in Alzheimer’s disease. *Mol Brain Res*. 1996;35(1–2):58–68.
226. Yi Y, Xiaobin Y, Hui C, Yufa Z, Qiaowei Z, Xingyue H, et al. An APP mutation family exhibiting white matter hyperintensities and cortical calcification in East China. *Neurol Sci Off J Ital Neurol Soc Ital Soc Clin Neurophysiol*. 2020 Oct;41(10):2921–8.
227. Kalampokini S, Georgouli D, Patrikiou E, Provas A, Valotassiou V, Georgoulas P, et al. The Greek Variant in APP Gene: The Phenotypic Spectrum of APP Mutations. *Int J Mol Sci*. 2021 Nov 16;22(22).
228. Biffi A, Plourde A, Shen Y, Onofrio R, Smith EE, Frosch M, et al. Screening for Familial APP Mutations in Sporadic Cerebral Amyloid Angiopathy. Winkler C, editor. *PLoS ONE*. 2010 Nov 11;5(11):e13949.

229. Schultz AP, Kloet RW, Sohrabi HR, van der Weerd L, van Rooden S, Wermer MJH, et al. Amyloid imaging of dutch-type hereditary cerebral amyloid angiopathy carriers. *Ann Neurol*. 2019 Oct;86(4):616–25.
230. Bornebroek M, Haan J, Maat-Schieman ML, Van Duinen SG, Roos RA. Hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis-Dutch type (HCHWA-D): I--A review of clinical, radiologic and genetic aspects. *Brain Pathol Zurich Switz*. 1996 Apr;6(2):111–4.
231. Wattendorff AR, Bots GT, Went LN, Endtz LJ. Familial cerebral amyloid angiopathy presenting as recurrent cerebral haemorrhage. *J Neurol Sci*. 1982 Aug;55(2):121–35.
232. Koemans EA, Voigt S, Rasing I, van Etten ES, van Zwet EW, van Walderveen MAA, et al. Migraine With Aura as Early Disease Marker in Hereditary Dutch-Type Cerebral Amyloid Angiopathy. *Stroke*. 2020 Apr;51(4):1094–9.
233. Haan J, Bakker E, Jennekens-Schinkel A, Roos RA. Progressive dementia, without cerebral hemorrhage, in a patient with hereditary cerebral amyloid angiopathy. *Clin Neurol Neurosurg*. 1992;94(4):317–8.
234. Natté R, Maat-Schieman ML, Haan J, Bornebroek M, Roos RA, van Duinen SG. Dementia in hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis-Dutch type is associated with cerebral amyloid angiopathy but is independent of plaques and neurofibrillary tangles. *Ann Neurol*. 2001 Dec;50(6):765–72.
235. Hendriks L, van Duijn CM, Cras P, Cruts M, Van Hul W, van Harskamp F, et al. Presenile dementia and cerebral haemorrhage linked to a mutation at codon 692 of the beta-amyloid precursor protein gene. *Nat Genet*. 1992 Jun;1(3):218–21.
236. Brooks WS, Kwok JBJ, Halliday GM, Godbolt AK, Rossor MN, Creasey H, et al. Hemorrhage is uncommon in new Alzheimer family with Flemish amyloid precursor protein mutation. *Neurology*. 2004 Nov 9;63(9):1613–7.
237. Roks G, Van Harskamp F, De Koning I, Cruts M, De Jonghe C, Kumar-Singh S, et al. Presentation of amyloidosis in carriers of the codon 692 mutation in the amyloid precursor protein gene (APP692). *Brain J Neurol*. 2000 Oct;123 (Pt 10):2130–40.
238. Sellal F, Wallon D, Martinez-Almoyna L, Marelli C, Dhar A, Oesterle H, et al. APP Mutations in Cerebral Amyloid Angiopathy with or without Cortical Calcifications: Report of Three Families and a Literature Review. *J Alzheimers Dis JAD*. 2017;56(1):37–46.
239. Kumar-Singh S, Cras P, Wang R, Kros JM, van Swieten J, Lübke U, et al. Dense-core senile plaques in the Flemish variant of Alzheimer’s disease are vasocentric. *Am J Pathol*. 2002 Aug;161(2):507–20.
240. Bugiani O, Giaccone G, Rossi G, Mangieri M, Capobianco R, Morbin M, et al. Hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis associated with the E693K mutation of APP. *Arch Neurol*. 2010;67(8):987–995.
241. Basun H, Bogdanovic N, Ingelsson M, Almkvist O, Näslund J, Axelman K, et al. Clinical and neuropathological features of the arctic APP gene mutation causing early-onset Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 2008 Apr;65(4):499–505.
242. Nilsberth C, Westlind-Danielsson A, Eckman CB, Condron MM, Axelman K, Forsell C, et al. The “Arctic” APP mutation (E693G) causes Alzheimer’s disease by enhanced Abeta protofibril formation. *Nat Neurosci*. 2001 Sep;4(9):887–93.
243. Kamino K, Orr HT, Payami H, Wijsman EM, Alonso ME, Pulst SM, et al. Linkage and mutational analysis of familial Alzheimer disease kindreds for the APP gene region. *Am J Hum Genet*. 1992 Nov;51(5):998–1014.
244. Kalimo H, Lalowski M, Bogdanovic N, Philipson O, Bird TD, Nochlin D, et al. The Arctic AβPP mutation leads to Alzheimer’s disease pathology with highly variable

- topographic deposition of differentially truncated A β . *Acta Neuropathol Commun*. 2013 Sep 10;1:60.
245. Greenberg SM, Shin Y, Grabowski TJ, Cooper GE, Rebeck GW, Iglesias S, et al. Hemorrhagic stroke associated with the Iowa amyloid precursor protein mutation. *Neurology*. 2003 Mar 25;60(6):1020–2.
246. Iglesias S, Chapon F, Baron JC. Familial occipital calcifications, hemorrhagic strokes, leukoencephalopathy, dementia, and external carotid dysplasia. *Neurology*. 2000 Dec 12;55(11):1661–7.
247. Obici L, Demarchi A, de Rosa G, Bellotti V, Marciano S, Donadei S, et al. A novel AbetaPP mutation exclusively associated with cerebral amyloid angiopathy. *Ann Neurol*. 2005 Oct;58(4):639–44.
248. Koemans EA, van Etten ES, van Opstal AM, Labadie G, Terwindt GM, Wermer MJH, et al. Innovative Magnetic Resonance Imaging Markers of Hereditary Cerebral Amyloid Angiopathy at 7 Tesla. *Stroke*. 2018 Jun;49(6):1518–20.
249. Rasing I, Voigt S, Koemans EA, van Zwet E, de Kruijff PC, van Harten TW, et al. Occipital Cortical Calcifications in Cerebral Amyloid Angiopathy. *Stroke*. 2021 May;52(5):1851–5.
250. Nicolas G, Wallon D, Goupil C, Richard AC, Pottier C, Dorval V, et al. Mutation in the 3'untranslated region of APP as a genetic determinant of cerebral amyloid angiopathy. *Eur J Hum Genet EJHG*. 2016 Jan;24(1):92–8.
251. Pottier C, Wallon D, Lecrux AR, Maltete D, Bombois S, Jurici S, et al. Amyloid- β Protein Precursor Gene Expression in Alzheimer's Disease and Other Conditions. *J Alzheimers Dis*. 2012 Feb 7;28(3):561–6.
252. Sleegers K, Brouwers N, Gijssels I, Theuns J, Goossens D, Wauters J, et al. APP duplication is sufficient to cause early onset Alzheimer's dementia with cerebral amyloid angiopathy. *Brain*. 2006 Sep 29;129(11):2977–83.
253. Remes AM, Finnilä S, Mononen H, Tuominen H, Takalo R, Herva R, et al. Hereditary dementia with intracerebral hemorrhages and cerebral amyloid angiopathy. *Neurology*. 2004;63(2):234–240.
254. Cabrejo L, Guyant-Marechal L, Laquerriere A, Vercelletto M, De La Fourniere F, Thomas-Anterion C, et al. Phenotype associated with APP duplication in five families. *Brain*. 2006 Sep 29;129(11):2966–76.
255. Zarea A, Charbonnier C, Rovelet-Lecrux A, Nicolas G, Rousseau S, Borden A, et al. Seizures in dominantly inherited Alzheimer disease. *Neurology*. 2016 Aug 30;87(9):912–9.
256. Guyant-Marechal I, Berger E, Laquerriere A, Rovelet-Lecrux A, Viennet G, Frebourg T, et al. Intrafamilial diversity of phenotype associated with app duplication. *Neurology*. 2008;71(23):1925–1926.
257. Chamard L, Wallon D, Pijoff A, Berger E, Viennet G, Hannequin D, et al. Amyloid-Related Imaging Abnormalities in A β PP Duplication Carriers. *J Alzheimers Dis*. 2013 Oct 10;37(4):789–93.
258. Buss L, Fisher E, Hardy J, Nizetic D, Groet J, Pulford L, et al. Intracerebral haemorrhage in Down syndrome: protected or predisposed? *F1000Research*. 2016;5.
259. Sobey CG, Judkins CP, Sundararajan V, Phan TG, Drummond GR, Srikanth VK. Risk of Major Cardiovascular Events in People with Down Syndrome. *PloS One*. 2015;10(9):e0137093.
260. Neale N, Padilla C, Fonseca LM, Holland T, Zaman S. Neuroimaging and other modalities to assess Alzheimer's disease in Down syndrome. *NeuroImage Clin*. 2018;17:263–71.

261. Lao PJ, Gutierrez J, Keator D, Rizvi B, Banerjee A, Igwe KC, et al. Alzheimer-Related Cerebrovascular Disease in Down Syndrome. *Ann Neurol*. 2020 Dec;88(6):1165–77.
262. Mann DMA, Davidson YS, Robinson AC, Allen N, Hashimoto T, Richardson A, et al. Patterns and severity of vascular amyloid in Alzheimer's disease associated with duplications and missense mutations in APP gene, Down syndrome and sporadic Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2018 Oct;136(4):569–87.
263. Lanoiselee HM, Nicolas G, Wallon D, Rovelet-Lecrux A, Lacour M, Rousseau S, et al. APP, PSEN1, and PSEN2 mutations in early-onset Alzheimer disease: A genetic screening study of familial and sporadic cases. *PLoS Med*. 2017 Mar;14(3):e1002270.
264. Rovelet-Lecrux A, Charbonnier C, Wallon D, Nicolas G, Seaman MNJ, Pottier C, et al. De novo deleterious genetic variations target a biological network centered on Aβ peptide in early-onset Alzheimer disease. *Mol Psychiatry*. 2015 Sep;20(9):1046–56.
265. Wallon D, Rousseau S, Rovelet-Lecrux A, Quillard-Muraine M, Guyant-Marechal L, Martinaud O, et al. The French series of autosomal dominant early onset Alzheimer's disease cases: mutation spectrum and cerebrospinal fluid biomarkers. *J Alzheimers Dis JAD*. 2012;30(4):847–56.
266. Rovelet-Lecrux A, Frebourg T, Tuominen H, Majamaa K, Campion D, Remes AM. APP locus duplication in a Finnish family with dementia and intracerebral haemorrhage. *J Neurol Neurosurg Amp Psychiatry*. 2007 Oct 1;78(10):1158–9.
267. Kasuga K, Shimohata T, Nishimura A, Shiga A, Mizuguchi T, Tokunaga J, et al. Identification of independent APP locus duplication in Japanese patients with early-onset Alzheimer disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2009 Sep 1;80(9):1050–2.
268. Lladó A, Grau-Rivera O, Sánchez-Valle R, Balasa M, Obach V, Amaro S, et al. Large APP locus duplication in a sporadic case of cerebral haemorrhage. *neurogenetics*. 2014 May;15(2):145–9.
269. McNaughton D, Knight W, Guerreiro R, Ryan N, Lowe J, Poulter M, et al. Duplication of amyloid precursor protein (APP), but not prion protein (PRNP) gene is a significant cause of early onset dementia in a large UK series. *Neurobiol Aging*. 2012 Feb;33(2):426.e13-426.e21.
270. Thonberg H, Fallström M, Björkström J, Schoumans J, Nennesmo I, Graff C. Mutation screening of patients with Alzheimer disease identifies APP locus duplication in a Swedish patient. *BMC Res Notes*. 2011;4(1):1–9.
271. Antonell A, Gelpi E, Sánchez-Valle R, Martínez R, Molinuevo JL, Lladó A. Breakpoint sequence analysis of an AβPP locus duplication associated with autosomal dominant Alzheimer's disease and severe cerebral amyloid angiopathy. *J Alzheimers Dis JAD*. 2012;28(2):303–8.
272. Tang M, Ryman DC, McDade E, Jasielec MS, Buckles VD, Cairns NJ, et al. Neurological manifestations of autosomal dominant familial Alzheimer's disease: a comparison of the published literature with the Dominantly Inherited Alzheimer Network observational study (DIAN-OBS). *Lancet Neurol*. 2016 Dec;15(13):1317–25.
273. Mann DM, Pickering-Brown SM, Takeuchi A, Iwatsubo T, Group members of the FADPS. Amyloid angiopathy and variability in amyloid β deposition is determined by mutation position in presenilin-1-linked Alzheimer's disease. *Am J Pathol*. 2001;158(6):2165–2175.
274. Ringman JM, Monsell S, Ng DW, Zhou Y, Nguyen A, Coppola G, et al. Neuropathology of Autosomal Dominant Alzheimer Disease in the National Alzheimer Coordinating Center Database. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2016 Mar;75(3):284–90.
275. Dumanchin C, Tournier I, Martin C, Didic M, Belliard S, Carlander B, et al.

- Biological effects of four PSEN1 gene mutations causing Alzheimer disease with spastic paraparesis and cotton wool plaques. *Hum Mutat.* 2006 Oct;27(10):1063.
276. Sánchez-Valle R, Lladó A, Ezquerra M, Rey MJ, Rami L, Molinuevo JL. A novel mutation in the PSEN1 gene (L286P) associated with familial early-onset dementia of Alzheimer type and lobar haematomas. *Eur J Neurol.* 2007 Dec;14(12):1409–12.
277. Palmieri I, Valente M, Farina LM, Gana S, Minafra B, Zangaglia R, et al. PSEN1 Compound Heterozygous Mutations Associated with Cerebral Amyloid Angiopathy and Cognitive Decline Phenotype. *Int J Mol Sci.* 2021 Apr 8;22(8).
278. Jayadev S, Leverenz JB, Steinbart E, Stahl J, Klunk W, Yu CE, et al. Alzheimer's disease phenotypes and genotypes associated with mutations in presenilin 2. *Brain J Neurol.* 2010 Apr;133(Pt 4):1143–54.
279. Nochlin D, Bird TD, Nemens EJ, Ball MJ, Sumi SM. Amyloid angiopathy in a Volga German family with Alzheimer's disease and a presenilin-2 mutation (N141I). *Ann Neurol.* 1998 Jan;43(1):131–5.
280. Canevelli M, Piscopo P, Talarico G, Vanacore N, Blasimme A, Crestini A, et al. Familial Alzheimer's disease sustained by presenilin 2 mutations: systematic review of literature and genotype-phenotype correlation. *Neurosci Biobehav Rev.* 2014 May;42:170–9.
281. Schipper HM. Apolipoprotein E: implications for AD neurobiology, epidemiology and risk assessment. *Neurobiol Aging.* 2011 May;32(5):778–90.
282. Wu L, Zhao L. ApoE2 and Alzheimer's disease: time to take a closer look. *Neural Regen Res.* 2016;11(3):412.
283. Corbo RM, Scacchi R. Apolipoprotein E (APOE) allele distribution in the world. Is APOE* 4 a “thrifty” allele? *Ann Hum Genet.* 1999;63(4):301–310.
284. Liu Y, Yu JT, Wang HF, Han PR, Tan CC, Wang C, et al. APOE genotype and neuroimaging markers of Alzheimer's disease: systematic review and meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2015;86(2):127–134.
285. Nicoll JA, Burnett C, Love S, Graham DI, Dewar D, Ironside JW, et al. High frequency of apolipoprotein E epsilon 2 allele in hemorrhage due to cerebral amyloid angiopathy. *Ann Neurol.* 1997 Jun;41(6):716–21.
286. Premkumar DR, Cohen DL, Hedera P, Friedland RP, Kalaria RN. Apolipoprotein E-epsilon4 alleles in cerebral amyloid angiopathy and cerebrovascular pathology associated with Alzheimer's disease. *Am J Pathol.* 1996 Jun;148(6):2083–95.
287. Biffi A, Sonni A, Anderson CD, Kissela B, Jagiella JM, Schmidt H, et al. Variants at APOE influence risk of deep and lobar intracerebral hemorrhage. *Ann Neurol.* 2010 Dec;68(6):934–43.
288. Biffi A, Anderson CD, Jagiella JM, Schmidt H, Kissela B, Hansen BM, et al. APOE genotype and extent of bleeding and outcome in lobar intracerebral haemorrhage: a genetic association study. *Lancet Neurol.* 2011 Aug;10(8):702–9.
289. Brouwers HB, Biffi A, Ayres AM, Schwab K, Cortellini L, Romero JM, et al. Apolipoprotein E genotype predicts hematoma expansion in lobar intracerebral hemorrhage. *Stroke.* 2012 Jun;43(6):1490–5.
290. Charidimou A, Zonneveld HI, Shams S, Kantarci K, Shoamanesh A, Hilal S, et al. APOE and cortical superficial siderosis in CAA: Meta-analysis and potential mechanisms. *Neurology.* 2019 Jul 23;93(4):e358–71.
291. McCarron MO, Nicoll JA, Ironside JW, Love S, Alberts MJ, Bone I. Cerebral Amyloid Angiopathy-Related Hemorrhage: Interaction of APOE ε2 With Putative Clinical Risk Factors. *Stroke.* 1999;30(8):1643–1646.
292. Namba Y, Tomonaga M, Kawasaki H, Otomo E, Ikeda K. Apolipoprotein E

- immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain Res.* 1991 Feb 8;541(1):163–6.
293. Deane R, Sagare A, Hamm K, Parisi M, Lane S, Finn MB, et al. apoE isoform-specific disruption of amyloid beta peptide clearance from mouse brain. *J Clin Invest.* 2008 Dec;118(12):4002–13.
294. Huynh TPV, Davis AA, Ulrich JD, Holtzman DM. Apolipoprotein E and Alzheimer's disease: the influence of apolipoprotein E on amyloid- β and other amyloidogenic proteins. *J Lipid Res.* 2017 May;58(5):824–36.
295. Liz MA, Coelho T, Bellotti V, Fernandez-Arias MI, Mallaina P, Obici L. A Narrative Review of the Role of Transthyretin in Health and Disease. *Neurol Ther.* 2020 Dec;9(2):395–402.
296. Sekijima Y. Transthyretin (ATTR) amyloidosis: clinical spectrum, molecular pathogenesis and disease-modifying treatments. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2015 Sep;86(9):1036–43.
297. Goren H, Steinberg MC, Farboody GH. Familial oculoleptomeningeal amyloidosis. *Brain J Neurol.* 1980 Sep;103(3):473–95.
298. Martin SE, Benson MD, Hattab EM. The pathologic spectrum of oculoleptomeningeal amyloidosis with Val30Gly transthyretin gene mutation in a postmortem case. *Hum Pathol.* 2014 May;45(5):1105–8.
299. Garzuly F, Vidal R, Wisniewski T, Brittig F, Budka H. Familial meningocerebrovascular amyloidosis, Hungarian type, with mutant transthyretin (TTR Asp18Gly). *Neurology.* 1996 Dec;47(6):1562–7.
300. McColgan P, Viegas S, Gandhi S, Bull K, Tudor R, Sheikh F, et al. Oculoleptomeningeal Amyloidosis associated with transthyretin Leu12Pro in an African patient. *J Neurol.* 2015 Jan;262(1):228–34.
301. Brett M, Persey MR, Reilly MM, Revesz T, Booth DR, Booth SE, et al. Transthyretin Leu12Pro is associated with systemic, neuropathic and leptomeningeal amyloidosis. *Brain J Neurol.* 1999 Feb;122 (Pt 2):183–90.
302. Herrick MK, DeBruyne K, Horoupian DS, Skare J, Vanefsky MA, Ong T. Massive leptomeningeal amyloidosis associated with a Val30Met transthyretin gene. *Neurology.* 1996 Oct;47(4):988–92.
303. Uitti RJ, Donat JR, Rozdilsky B, Schneider RJ, Koeppe AH. Familial oculoleptomeningeal amyloidosis. Report of a new family with unusual features. *Arch Neurol.* 1988 Oct;45(10):1118–22.
304. Mascalchi M, Salvi F, Pirini MG, D'Errico A, Ferlini A, Lolli F, et al. Transthyretin amyloidosis and superficial siderosis of the CNS. *Neurology.* 1999 Oct 22;53(7):1498–503.
305. Bevers MB, McGuone D, Jerath NU, Musolino PL. Leptomeningeal transthyretin-type amyloidosis presenting as acute hydrocephalus and subarachnoid hemorrhage. *J Clin Neurosci Off J Neurosurg Soc Australas.* 2016 Jul;29:203–5.
306. Ziskin JL, Greicius MD, Zhu W, Okumu AN, Adams CM, Plowey ED. Neuropathologic analysis of Tyr69His TTR variant meningovascular amyloidosis with dementia. *Acta Neuropathol Commun.* 2015 Jul 10;3:43.
307. Jin K, Sato S, Takahashi T, Nakazaki H, Date Y, Nakazato M, et al. Familial leptomeningeal amyloidosis with a transthyretin variant Asp18Gly representing repeated subarachnoid haemorrhages with superficial siderosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2004 Oct;75(10):1463–6.
308. Urban PP, Hertkorn C, Schattenberg JM, Gawehn J, Hägele S, Wunsch M, et al.

- Leptomeningeal familial amyloidosis: A rare differential diagnosis of leptomeningeal enhancement in MRI. *J Neurol*. 2006 Sep;253(9):1238–40.
309. Gudmundsson G, Hallgrímsson J, Jónasson TA, Bjarnason O. Hereditary cerebral haemorrhage with amyloidosis. *Brain J Neurol*. 1972;95(2):387–404.
310. Jensson O, Gudmundsson G, Arnason A, Blöndal H, Petursdottir I, Thorsteinsson L, et al. Hereditary cystatin C (gamma-trace) amyloid angiopathy of the CNS causing cerebral hemorrhage. *Acta Neurol Scand*. 1987 Aug;76(2):102–14.
311. Palsdottir A, Abrahamson M, Thorsteinsson L, Arnason A, Olafsson I, Grubb A, et al. Mutation in cystatin C gene causes hereditary brain haemorrhage. *Lancet Lond Engl*. 1988 Sep 10;2(8611):603–4.
312. Palsdottir A, Snorraddottir AO, Thorsteinsson L. Hereditary cystatin C amyloid angiopathy: genetic, clinical, and pathological aspects. *Brain Pathol Zurich Switz*. 2006 Jan;16(1):55–9.
313. Palsdottir A, Helgason A, Pálsson S, Björnsson HT, Bragason BT, Gretarsdottir S, et al. A drastic reduction in the life span of cystatin C L68Q carriers due to life-style changes during the last two centuries. *PLoS Genet*. 2008 Jun 20;4(6):e1000099.
314. Jensson O, Palsdottir A, Thorsteinsson L, Arnason A. The saga of cystatin C gene mutation causing amyloid angiopathy and brain hemorrhage--clinical genetics in Iceland. *Clin Genet*. 1989 Nov;36(5):368–77.
315. Sveinbjörnsdóttir S, Blöndal H, Gudmundsson G, Kjartansson O, Jónsdóttir S, Gudmundsson G. Progressive dementia and leucoencephalopathy as the initial presentation of late onset hereditary cystatin-C amyloidosis. Clinicopathological presentation of two cases. *J Neurol Sci*. 1996 Sep 1;140(1–2):101–8.
316. Solomon JP, Page LJ, Balch WE, Kelly JW. Gelsolin amyloidosis: genetics, biochemistry, pathology and possible strategies for therapeutic intervention. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2012 Jun;47(3):282–96.
317. Mullany S, Souzeau E, Klebe S, Zhou T, Knight LSW, Qassim A, et al. A novel GSN variant outside the G2 calcium-binding domain associated with Amyloidosis of the Finnish type. *Hum Mutat*. 2021 Jul;42(7):818–26.
318. Potrč M, Volk M, de Rosa M, Pižem J, Teran N, Jaklič H, et al. Clinical and Histopathological Features of Gelsolin Amyloidosis Associated with a Novel GSN Variant p.Glu580Lys. *Int J Mol Sci*. 2021 Jan 22;22(3).
319. Koskelainen S, Pihlmaa T, Suominen S, Zhao F, Salo T, Risteli J, et al. Gelsolin amyloid angiopathy causes severe disruption of the arterial wall. *APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand*. 2016 Aug;124(8):639–48.
320. Kiuru S, Salonen O, Haltia M. Gelsolin-related spinal and cerebral amyloid angiopathy. *Ann Neurol*. 1999 Mar;45(3):305–11.
321. Schmidt EK, Mustonen T, Kiuru-Enari S, Kivelä TT, Atula S. Finnish gelsolin amyloidosis causes significant disease burden but does not affect survival: FIN-GAR phase II study. *Orphanet J Rare Dis*. 2020 Jan 17;15(1):19.
322. Cheong EN, Paik W, Choi YC, Lim YM, Kim H, Shim WH, et al. Clinical Features and Brain MRI Findings in Korean Patients with AGel Amyloidosis. *Yonsei Med J*. 2021 May;62(5):431–8.
323. Kantanen M, Kiuru-Enari S, Salonen O, Kaipainen M, Hokkanen L. Subtle neuropsychiatric and neurocognitive changes in hereditary gelsolin amyloidosis (AGel amyloidosis). *PeerJ*. 2014;2:e493.
324. Kim SH, Wang R, Gordon DJ, Bass J, Steiner DF, Thinakaran G, et al. Familial British dementia: expression and metabolism of BRI. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;920:93–9.
325. Mead S, James-Galton M, Revesz T, Doshi RB, Harwood G, Pan EL, et al. Familial

- British dementia with amyloid angiopathy: early clinical, neuropsychological and imaging findings. *Brain J Neurol.* 2000 May;123 (Pt 5):975–91.
326. Harris MJ, Lane CA, Coath W, Malone IB, Cash DM, Barnes J, et al. Familial British dementia: a clinical and multi-modal imaging case study. *J Neurol.* 2022 Jul;269(7):3926–30.
327. Strömngren E, Dalby A, Dalby MA, Ranheim B. Cataract, deafness, cerebellar ataxia, psychosis and dementia--a new syndrome. *Acta Neurol Scand.* 1970;46(S43):261–2.
328. Ghiso JA, Holton J, Miravalle L, Calero M, Lashley T, Vidal R, et al. Systemic amyloid deposits in familial British dementia. *J Biol Chem.* 2001 Nov 23;276(47):43909–14.
329. Holton JL, Lashley T, Ghiso J, Braendgaard H, Vidal R, Guerin CJ, et al. Familial Danish dementia: a novel form of cerebral amyloidosis associated with deposition of both amyloid-Dan and amyloid-beta. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2002 Mar;61(3):254–67.
330. Ghetti B, Piccardo P, Spillantini MG, Ichimiya Y, Porro M, Perini F, et al. Vascular variant of prion protein cerebral amyloidosis with tau-positive neurofibrillary tangles: the phenotype of the stop codon 145 mutation in PRNP. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Jan 23;93(2):744–8.
331. Capellari S, Baiardi S, Rinaldi R, Bartoletti-Stella A, Graziano C, Piras S, et al. Two novel PRNP truncating mutations broaden the spectrum of prion amyloidosis. *Ann Clin Transl Neurol.* 2018 Jun;5(6):777–83.
332. Matsuzono K, Honda H, Sato K, Morihara R, Deguchi K, Hishikawa N, et al. “PrP systemic deposition disease”: clinical and pathological characteristics of novel familial prion disease with 2-bp deletion in codon 178. *Eur J Neurol.* 2016 Jan;23(1):196–200.
333. Ghetti B, Piccardo P, Frangione B, Bugiani O, Giaccone G, Young K, et al. Prion protein amyloidosis. *Brain Pathol Zurich Switz.* 1996 Apr;6(2):127–45.
334. Cacace R, Slegers K, Van Broeckhoven C. Molecular genetics of early-onset Alzheimer’s disease revisited. *Alzheimers Dement.* 2016 Jun;12(6):733–48.
335. Hendriks S, Peetoom K, Bakker C, van der Flier WM, Papma JM, Koopmans R, et al. Global Prevalence of Young-Onset Dementia: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Neurol.* 2021 Sep 1;78(9):1080.
336. Lacour M, Quenez O, Rovelet-Lecrux A, Salomon B, Rousseau S, Richard AC, et al. Causative Mutations and Genetic Risk Factors in Sporadic Early Onset Alzheimer’s Disease Before 51 Years. *J Alzheimers Dis JAD.* 2019;71(1):227–43.
337. Rannikmäe K, Samarasekera N, Martínez-González NA, Al-Shahi Salman R, Sudlow CLM. Genetics of cerebral amyloid angiopathy: systematic review and meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2013 Aug;84(8):901–8.
338. Purro SA, Farrow MA, Linehan J, Nazari T, Thomas DX, Chen Z, et al. Transmission of amyloid- β protein pathology from cadaveric pituitary growth hormone. *Nature.* 2018 Dec;564(7736):415–9.
339. Lauwers E, Lalli G, Brandner S, Collinge J, Compennolle V, Duyckaerts C, et al. Potential human transmission of amyloid β pathology: surveillance and risks. *Lancet Neurol.* 2020 Oct;19(10):872–8.
340. Hervé D, Porché M, Cabrejo L, Guidoux C, Tournier-Lasserre E, Nicolas G, et al. Fatal A β cerebral amyloid angiopathy 4 decades after a dural graft at the age of 2 years. *Acta Neuropathol (Berl).* 2018 May;135(5):801–3.
341. Banerjee G, Samra K, Adams ME, Jaunmuktane Z, Parry-Jones AR, Grieve J, et al. Iatrogenic cerebral amyloid angiopathy: an emerging clinical phenomenon. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2022 May 16;
342. Knol MJ, Lu D, Traylor M, Adams HHH, Romero JRJ, Smith AV, et al. Association of

- common genetic variants with brain microbleeds: A genome-wide association study. *Neurology*. 2020 Dec 15;95(24):e3331–43.
343. Gentile MT, Poulet R, Di Pardo A, Cifelli G, Maffei A, Vecchione C, et al. Beta-amyloid deposition in brain is enhanced in mouse models of arterial hypertension. *Neurobiol Aging*. 2009 Feb;30(2):222–8.
344. Takeda S, Sato N, Uchio-Yamada K, Sawada K, Kunieda T, Takeuchi D, et al. Diabetes-accelerated memory dysfunction via cerebrovascular inflammation and Abeta deposition in an Alzheimer mouse model with diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Apr 13;107(15):7036–41.
345. Okamoto Y, Yamamoto T, Kalaria RN, Senzaki H, Maki T, Hase Y, et al. Cerebral hypoperfusion accelerates cerebral amyloid angiopathy and promotes cortical microinfarcts. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2012 Mar;123(3):381–94.
346. Biffi A, Anderson CD, Battey TWK, Ayres AM, Greenberg SM, Viswanathan A, et al. Association Between Blood Pressure Control and Risk of Recurrent Intracerebral Hemorrhage. *JAMA*. 2015 Sep 1;314(9):904–12.
347. Arima H, Tzourio C, Anderson C, Woodward M, Bousser MG, MacMahon S, et al. Effects of perindopril-based lowering of blood pressure on intracerebral hemorrhage related to amyloid angiopathy: the PROGRESS trial. *Stroke*. 2010 Feb;41(2):394–6.
348. Li W, Jin C, Vaidya A, Wu Y, Rexrode K, Zheng X, et al. Blood Pressure Trajectories and the Risk of Intracerebral Hemorrhage and Cerebral Infarction: A Prospective Study. *Hypertens Dallas Tex 1979*. 2017 Sep;70(3):508–14.
349. Liu W, Liu R, Sun W, Peng Q, Zhang W, Xu E, et al. Different impacts of blood pressure variability on the progression of cerebral microbleeds and white matter lesions. *Stroke*. 2012 Nov;43(11):2916–22.
350. Jin C, Li G, Rexrode KM, Gurol ME, Yuan X, Hui Y, et al. Prospective Study of Fasting Blood Glucose and Intracerebral Hemorrhagic Risk. *Stroke*. 2018 Jan;49(1):27–33.
351. Saxena A, Anderson CS, Wang X, Sato S, Arima H, Chan E, et al. Prognostic Significance of Hyperglycemia in Acute Intracerebral Hemorrhage: The INTERACT2 Study. *Stroke*. 2016 Mar;47(3):682–8.
352. Sturgeon JD, Folsom AR, Longstreth WTJ, Shahar E, Rosamond WD, Cushman M. Risk factors for intracerebral hemorrhage in a pooled prospective study. *Stroke*. 2007 Oct;38(10):2718–25.
353. Noda H, Iso H, Irie F, Sairenchi T, Ohtaka E, Doi M, et al. Low-density lipoprotein cholesterol concentrations and death due to intraparenchymal hemorrhage: the Ibaraki Prefectural Health Study. *Circulation*. 2009 Apr 28;119(16):2136–45.
354. Lauer A, Greenberg SM, Gurol ME. Statins in Intracerebral Hemorrhage. *Curr Atheroscler Rep*. 2015 Aug;17(8):46.
355. Westover MB, Bianchi MT, Eckman MH, Greenberg SM. Statin use following intracerebral hemorrhage: a decision analysis. *Arch Neurol*. 2011 May;68(5):573–9.
356. Bailey RD, Hart RG, Benavente O, Pearce LA. Recurrent brain hemorrhage is more frequent than ischemic stroke after intracranial hemorrhage. *Neurology*. 2001 Mar 27;56(6):773–7.
357. O'Donnell HC, Rosand J, Knudsen KA, Furie KL, Segal AZ, Chiu RI, et al. Apolipoprotein E genotype and the risk of recurrent lobar intracerebral hemorrhage. *N Engl J Med*. 2000 Jan 27;342(4):240–5.
358. Endres M, Nolte CH, Scheitz JF. Statin Treatment in Patients With Intracerebral Hemorrhage. *Stroke*. 2018 Jan;49(1):240–6.
359. McKinney JS, Kostis WJ. Statin therapy and the risk of intracerebral hemorrhage:

- a meta-analysis of 31 randomized controlled trials. *Stroke*. 2012 Aug;43(8):2149–56.
360. Hackam DG, Woodward M, Newby LK, Bhatt DL, Shao M, Smith EE, et al. Statins and intracerebral hemorrhage: collaborative systematic review and meta-analysis. *Circulation*. 2011 Nov 15;124(20):2233–42.
361. Chen PS, Cheng CL, Chang YC, Kao Yang YH, Yeh PS, Li YH. Early statin therapy in patients with acute intracerebral hemorrhage without prior statin use. *Eur J Neurol*. 2015 May;22(5):773–80.
362. Arnett DK, Blumenthal RS, Albert MA, Buroker AB, Goldberger ZD, Hahn EJ, et al. 2019 ACC/AHA Guideline on the Primary Prevention of Cardiovascular Disease: Executive Summary: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol*. 2019 Sep 10;74(10):1376–414.
363. Vernooij MW, Haag MDM, van der Lugt A, Hofman A, Krestin GP, Stricker BH, et al. Use of antithrombotic drugs and the presence of cerebral microbleeds: the Rotterdam Scan Study. *Arch Neurol*. 2009 Jun;66(6):714–20.
364. Wong KS, Chan YL, Liu JY, Gao S, Lam WWM. Asymptomatic microbleeds as a risk factor for aspirin-associated intracerebral hemorrhages. *Neurology*. 2003 Feb 11;60(3):511–3.
365. Wong KS, Mok V, Lam WW, Kay R, Tang A, Chan YL, et al. Aspirin-associated intracerebral hemorrhage: clinical and radiologic features. *Neurology*. 2000 Jun 27;54(12):2298–301.
366. Effects of antiplatelet therapy after stroke due to intracerebral haemorrhage (RESTART): a randomised, open-label trial. *Lancet Lond Engl*. 2019 Jun 29;393(10191):2613–23.
367. Gurol ME. Nonpharmacological Management of Atrial Fibrillation in Patients at High Intracranial Hemorrhage Risk. *Stroke*. 2018 Jan;49(1):247–54.
368. Tawfik A, Bielecki JM, Krahn M, Dorian P, Hoch JS, Boon H, et al. Systematic review and network meta-analysis of stroke prevention treatments in patients with atrial fibrillation. *Clin Pharmacol Adv Appl*. 2016;8:93–107.
369. Wilson D, Hostettler IC, Ambler G, Banerjee G, Jäger HR, Werring DJ. Convexity subarachnoid haemorrhage has a high risk of intracerebral haemorrhage in suspected cerebral amyloid angiopathy. *J Neurol*. 2017 Apr;264(4):664–73.
370. Hemphill JC 3rd, Greenberg SM, Anderson CS, Becker K, Bendok BR, Cushman M, et al. Guidelines for the Management of Spontaneous Intracerebral Hemorrhage: A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2015 Jul;46(7):2032–60.
371. Biffi A, Urday S, Kubiszewski P, Gilkerson L, Sekar P, Rodriguez-Torres A, et al. Combining Imaging and Genetics to Predict Recurrence of Anticoagulation-Associated Intracerebral Hemorrhage. *Stroke*. 2020 Jul;51(7):2153–60.
372. Nielsen PB, Larsen TB, Skjøth F, Gorst-Rasmussen A, Rasmussen LH, Lip GY. Restarting anticoagulant treatment after intracranial hemorrhage in patients with atrial fibrillation and the impact on recurrent stroke, mortality, and bleeding: a nationwide cohort study. *Circulation*. 2015;132(6):517–525.
373. Kuramatsu JB, Gerner ST, Schellinger PD, Glahn J, Endres M, Sobesky J, et al. Anticoagulant reversal, blood pressure levels, and anticoagulant resumption in patients with anticoagulation-related intracerebral hemorrhage. *Jama*. 2015;313(8):824–836.
374. Mehndiratta P, Manjila S, Ostergard T, Eisele S, Cohen ML, Sila C, et al. Cerebral amyloid angiopathy-associated intracerebral hemorrhage: pathology and management. *Neurosurg Focus*. 2012 Apr;32(4):E7.

375. Iwata N, Mizukami H, Shirotani K, Takaki Y, Muramatsu S ichi, Lu B, et al. Presynaptic localization of neprilysin contributes to efficient clearance of amyloid-beta peptide in mouse brain. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2004 Jan 28;24(4):991–8.
376. Inoue Y, Ueda M, Masuda T, Misumi Y, Yamashita T, Ando Y. Memantine, a Noncompetitive N-Methyl-D-Aspartate Receptor Antagonist, Attenuates Cerebral Amyloid Angiopathy by Increasing Insulin-Degrading Enzyme Expression. *Mol Neurobiol*. 2019 Dec;56(12):8573–88.
377. Du J, Chang J, Guo S, Zhang Q, Wang Z. ApoE 4 reduces the expression of Abeta degrading enzyme IDE by activating the NMDA receptor in hippocampal neurons. *Neurosci Lett*. 2009 Oct 23;464(2):140–5.
378. Kanekiyo T, Liu CC, Shinohara M, Li J, Bu G. LRP1 in brain vascular smooth muscle cells mediates local clearance of Alzheimer's amyloid- β . *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2012 Nov 14;32(46):16458–65.
379. Kanekiyo T, Cirrito JR, Liu CC, Shinohara M, Li J, Schuler DR, et al. Neuronal clearance of amyloid- β by endocytic receptor LRP1. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2013 Dec 4;33(49):19276–83.
380. Abuznait AH, Qosa H, Busnena BA, El Sayed KA, Kaddoumi A. Olive-oil-derived oleocanthal enhances β -amyloid clearance as a potential neuroprotective mechanism against Alzheimer's disease: in vitro and in vivo studies. *ACS Chem Neurosci*. 2013 Jun 19;4(6):973–82.
381. Qosa H, Batarseh YS, Mohyeldin MM, El Sayed KA, Keller JN, Kaddoumi A. Oleocanthal enhances amyloid- β clearance from the brains of TgSwDI mice and in vitro across a human blood-brain barrier model. *ACS Chem Neurosci*. 2015 Nov 18;6(11):1849–59.
382. Gilman S, Koller M, Black RS, Jenkins L, Griffith SG, Fox NC, et al. Clinical effects of Abeta immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial. *Neurology*. 2005 May 10;64(9):1553–62.
383. Orgogozo JM, Gilman S, Dartigues JF, Laurent B, Puel M, Kirby LC, et al. Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after Abeta42 immunization. *Neurology*. 2003 Jul 8;61(1):46–54.
384. Nicoll JAR, Wilkinson D, Holmes C, Steart P, Markham H, Weller RO. Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid-beta peptide: a case report. *Nat Med*. 2003 Apr;9(4):448–52.
385. Sperling RA, Jack CRJ, Black SE, Frosch MP, Greenberg SM, Hyman BT, et al. Amyloid-related imaging abnormalities in amyloid-modifying therapeutic trials: recommendations from the Alzheimer's Association Research Roundtable Workgroup. *Alzheimers Dement J Alzheimers Assoc*. 2011 Jul;7(4):367–85.
386. Sevigny J, Chiao P, Bussière T, Weinreb PH, Williams L, Maier M, et al. The antibody aducanumab reduces A β plaques in Alzheimer's disease. *Nature*. 2016 Sep 1;537(7618):50–6.
387. Swanson CJ, Zhang Y, Dhadda S, Wang J, Kaplow J, Lai RY, et al. A randomized, double-blind, phase 2b proof-of-concept clinical trial in early Alzheimer's disease with lecanemab, an anti-A β protofibril antibody. *Alzheimers Res Ther*. 2021;13(1):1–14.
388. Leurent C, Goodman JA, Zhang Y, He P, Polimeni JR, Gurol ME, et al. Immunotherapy with ponezumab for probable cerebral amyloid angiopathy. *Ann Clin Transl Neurol*. 2019;6(4):795–806.
389. Schley D, Carare-Nnadi R, Please CP, Perry VH, Weller RO. Mechanisms to explain the reverse perivascular transport of solutes out of the brain. *J Theor Biol*. 2006 Feb 21;238(4):962–74.

390. Morris AW, Sharp MM, Albargothy NJ, Fernandes R, Hawkes CA, Verma A, et al. Vascular basement membranes as pathways for the passage of fluid into and out of the brain. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2016;131(5):725–736.
391. Maki T, Okamoto Y, Carare RO, Hase Y, Hattori Y, Hawkes CA, et al. Phosphodiesterase III inhibitor promotes drainage of cerebrovascular β -amyloid. *Ann Clin Transl Neurol*. 2014 Aug;1(8):519–33.
392. Saito S, Yamamoto Y, Maki T, Hattori Y, Ito H, Mizuno K, et al. Taxifolin inhibits amyloid- β oligomer formation and fully restores vascular integrity and memory in cerebral amyloid angiopathy. *Acta Neuropathol Commun*. 2017 Apr 4;5(1):26.
393. Yan P, Zhu A, Liao F, Xiao Q, Kraft A, Gonzales E, et al. Minocycline reduces spontaneous hemorrhage in mouse models of cerebral amyloid angiopathy. *Stroke*. 2015 Jun;46(6):1633–40.
394. Evers MM, Toonen LJA, van Roon-Mom WMC. Antisense oligonucleotides in therapy for neurodegenerative disorders. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015 Jun 29;87:90–103.
395. Xiong M, Jiang H, Serrano JR, Gonzales ER, Wang C, Gratuze M, et al. APOE immunotherapy reduces cerebral amyloid angiopathy and amyloid plaques while improving cerebrovascular function. *Sci Transl Med*. 2021 Feb 17;13(581).
396. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet*. 2015 May;17(5):405–24.
397. Chung KK, Anderson NE, Hutchinson D, Synek B, Barber PA. Cerebral amyloid angiopathy related inflammation: three case reports and a review. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2011 Jan 1;82(1):20–6.
398. Brenowitz WD, Nelson PT, Besser LM, Heller KB, Kukull WA. Cerebral amyloid angiopathy and its co-occurrence with Alzheimer's disease and other cerebrovascular neuropathologic changes. *Neurobiol Aging*. 2015 Oct;36(10):2702–8.
399. Mouton-Liger F, Wallon D, Troussière AC, Yatimi R, Dumurgier J, Magnin E, et al. Impact of cerebro-spinal fluid biomarkers of Alzheimer's disease in clinical practice: a multicentric study. *J Neurol*. 2014 Jan;261(1):144–51.
400. Charidimou A. Cerebrospinal Fluid Biomarkers for Cerebral Amyloid Angiopathy Diagnosis. *J Alzheimers Dis JAD*. 2022;87(2):803–5.
401. Margraf NG, Jensen-Kondering U, Weiler C, Leypoldt F, Maetzler W, Philippen S, et al. Cerebrospinal Fluid Biomarkers in Cerebral Amyloid Angiopathy: New Data and Quantitative Meta-Analysis. *Front Aging Neurosci [Internet]*. 2022 Feb 14 [cited 2022 Apr 15];14. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnagi.2022.783996/full>
402. Feigin VL, Lawes CMM, Bennett DA, Barker-Collo SL, Parag V. Worldwide stroke incidence and early case fatality reported in 56 population-based studies: a systematic review. *Lancet Neurol*. 2009 Apr;8(4):355–69.
403. Sembill JA, Knott M, Xu M, Roeder SS, Hagen M, Sprügel MI, et al. Simplified Edinburgh CT Criteria for Identification of Lobar Intracerebral Hemorrhage Associated With Cerebral Amyloid Angiopathy. *Neurology*. 2022 May 17;98(20):e1997–2004.
404. Blom ES, Viswanathan J, Kilander L, Helisalmi S, Soininen H, Lannfelt L, et al. Low prevalence of APP duplications in Swedish and Finnish patients with early-onset Alzheimer's disease. *Eur J Hum Genet EJHG*. 2008 Feb;16(2):171–5.
405. Fuchs J, Nilsson C, Kachergus J, Munz M, Larsson EM, Schüle B, et al. Phenotypic variation in a large Swedish pedigree due to *SNCA* duplication and triplication.

- Neurology. 2007 Mar 20;68(12):916–22.
406. Lee S, Abecasis GR, Boehnke M, Lin X. Rare-variant association analysis: study designs and statistical tests. *Am J Hum Genet.* 2014;95(1):5–23.
407. Bellenguez C, Charbonnier C, Grenier-Boley B, Quenez O, Le Guennec K, Nicolas G, et al. Contribution to Alzheimer’s disease risk of rare variants in TREM2, SORL1, and ABCA7 in 1779 cases and 1273 controls. *Neurobiol Aging.* 2017 Nov;59:220.e1-220.e9.
408. Holstege H, Hulsman M, Charbonnier C, Grenier-Boley B, Quenez O, Grozeva D, et al. Exome sequencing identifies rare damaging variants in ATP8B4 and ABCA1 as novel risk factors for Alzheimers Disease.
409. Champion D, Charbonnier C, Nicolas G. SORL1 genetic variants and Alzheimer disease risk: a literature review and meta-analysis of sequencing data. *Acta Neuropathol (Berl).* 2019 Aug;138(2):173–86.
410. Le Guennec K, Nicolas G, Quenez O, Charbonnier C, Wallon D, Bellenguez C, et al. ABCA7 rare variants and Alzheimer disease risk. *Neurology.* 2016;86(23):2134–2137.
411. Cirulli ET. The increasing importance of gene-based analyses. *PLoS Genet.* 2016;12(4):e1005852.
412. De Kort AM, Kuiperij HB, Kersten I, Versleijen AA, Schreuder FH, Van Nostrand WE, et al. Normal cerebrospinal fluid concentrations of PDGFR β in patients with cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer’s disease. *Alzheimers Dement.* 2021;
413. Banerjee G, Ambler G, Keshavan A, Paterson RW, Foiani MS, Toombs J, et al. Cerebrospinal Fluid Biomarkers in Cerebral Amyloid Angiopathy. *J Alzheimers Dis.* 2020 Mar 11;1–13.
414. Yuen RKC, Thiruvahindrapuram B, Merico D, Walker S, Tammimies K, Hoang N, et al. Whole-genome sequencing of quartet families with autism spectrum disorder. *Nat Med.* 2015 Feb;21(2):185–91.
415. Daoutsali E, Buijsen RA, van de Pas S, Mikkers H, Brands T, Eussen B, et al. Generation of 3 human induced pluripotent stem cell lines LUMCi005-A, B and C from a Hereditary Cerebral Hemorrhage with Amyloidosis-Dutch type patient. *Stem Cell Res.* 2019;34:101359.
416. Rovelet-Lecrux A, Feuillette S, Miguel L, Schramm C, Pernet S, Quenez O, et al. Impaired SorLA maturation and trafficking as a new mechanism for SORL1 missense variants in Alzheimer disease. *Acta Neuropathol Commun.* 2021 Dec 18;9(1):196.
417. Miguel L, Rovelet-Lecrux A, Chambon P, Joly-Helas G, Rousseau S, Wallon D, et al. Generation of 17q21.31 duplication iPSC-derived neurons as a model for primary tauopathies. *Stem Cell Res.* 2022 May;61:102762.
418. Miguel L, Rovelet-Lecrux A, Feyeux M, Frebourg T, Nassoy P, Champion D, et al. Detection of all adult Tau isoforms in a 3D culture model of iPSC-derived neurons. *Stem Cell Res.* 2019 Oct;40:101541.
419. Auboyer L, Monzo C, Wallon D, Rovelet-Lecrux A, Gabelle A, Gazagne I, et al. Generation of induced pluripotent stem cells (iPSCs) IRMBi002-A from an Alzheimer’s disease patient carrying a D694N mutation in the APP gene. *Stem Cell Res.* 2019 May;37:101438.
420. Blanchard JW, Bula M, Davila-Velderrain J, Akay LA, Zhu L, Frank A, et al. Reconstruction of the human blood–brain barrier in vitro reveals a pathogenic mechanism of APOE4 in pericytes. *Nat Med.* 2020;26(6):952–963.
421. Raut S, Patel R, Pervaiz I, Al-Ahmad AJ. Abeta peptides disrupt the barrier integrity and glucose metabolism of human induced pluripotent stem cell-derived brain microvascular endothelial cells. *Neurotoxicology.* 2022 Mar;89:110–20.

Diversité clinico-radiologique des microangiopathies cérébrales : Etude phénotypique et génétique de l'angiopathie amyloïde cérébrale et des calcifications cérébrales primaires

Résumé

L'angiopathie amyloïde cérébrale (AAC) et les calcifications cérébrales primaires (CCP) sont deux types de microangiopathie cérébrale caractérisées par des dépôts au niveau de la paroi des petits vaisseaux (respectivement dépôts de peptide A β ou dépôts phosphocalciques). Ces entités recouvrent une importante hétérogénéité clinique malgré une convergence sur le plan physiopathologique vers des altérations de l'unité neuro-vasculaire dans les deux cas. Une meilleure caractérisation des phénotypes cliniques, radiologiques et biologiques permettrait d'améliorer la précision du diagnostic et la connaissance des facteurs pronostiques de l'AAC et des CCP. De plus une meilleure compréhension des facteurs génétiques impliqués contribuerait à l'identification des mécanismes sous-jacents impliqués, étape nécessaire pour identifier de futures cibles thérapeutiques. Les deux objectifs généraux de ce travail ont été l'étude de la diversité clinico-radiologique de plusieurs formes de ces microangiopathies et l'étude de leur déterminisme génétique.

Dans un premier temps, nous avons pu identifier un phénotype bien reconnaissable, incluant des signes moteurs au premier plan avec dysarthrie initiale, atrophie cérébelleuse et un pattern de calcifications sévères avec atteinte pontique du tronc cérébral dans une forme autosomique récessive de CCP liée à des mutations nouvellement décrites de *MYORG* (n=16 patients). Concernant ensuite les AAC, une étude visant à mieux caractériser un phénotype particulier d'AAC, les formes inflammatoires et concernant 48 patients, a permis de les intégrer comme un sous-type d'AAC notamment favorisé par la présence d'un génotype *APOE ϵ 4*. À l'inverse, une importante hétérogénéité clinique et radiologique a pu être décrite chez 24 porteurs de duplications du gène *APP*, une forme héréditaire de maladie d'Alzheimer et d'AAC. La recherche de variations génétiques impliquant le gène *APP* ou les gènes adjacents n'a pas permis d'expliquer cette variabilité d'expression qui semble donc potentiellement liée à d'autres modulateurs d'expression clinique. Pour palier cette importante hétérogénéité, il était important de rechercher d'autres marqueurs, non cliniques, contribuant à établir un diagnostic précoce et de précision. Ainsi les biomarqueurs du liquide cérébro-spinal (LCS) et plus particulièrement le dosage du peptide A β 40 chez n=63 patients, ont montré une altération dans plus de 85% des cas d'AAC et pourraient améliorer les performances des critères radiologiques modifiés de Boston qui à ce jour ne tiennent pas compte de cette information. De plus certaines caractéristiques d'un hématome lobaire, visibles déjà sur le scanner sans injection comme l'extension en doigt de gant et l'hémorragie sous-arachnoïdienne aiguë associée contribuent également au diagnostic d'AAC comme le montre le travail réalisé chez 102 patients aux urgences avec hémorragie intracérébrale. Par ailleurs, le déterminisme génétique de l'AAC est actuellement insuffisamment investigué. L'identification pour la première fois d'une triplification du gène *APP* souligne l'importance de la recherche systématique de mutations causales mais aussi d'anomalie du nombre de copies de ce gène en cas d'AAC précoce. Néanmoins, ces formes exceptionnelles ne sauraient expliquer l'ensemble des formes d'AAC, majoritairement sporadiques. Dans l'objectif d'explorer l'hypothèse d'une contribution polygénique dans l'AAC, avec intervention de facteurs de risque génétiques, un premier travail a permis de connaître la distribution des variants pathogènes concernant *SORL1*, *TREM2*, *ABCA7*, *ABCA1* et *ATP8B4*, tous liés à la voie amyloïde (production ou clairance du peptide A β) et déjà identifiés dans la maladie d'Alzheimer. À l'avenir, une étude cas-témoin avec l'objectif de recruter une cohorte de 100 patients permettra de préciser l'impact des variants rares au sein de ces gènes et définir les risques qu'ils confèrent. En outre, la poursuite d'analyses pangénomiques de cas d'AAC très précoces, notamment par comparaison du cas index avec ces 2 parents indemnes (n=4 actuellement disponibles) constitueront une opportunité d'identifier de nouveaux gènes et potentiellement de nouveaux mécanismes physiopathologiques de l'AAC.

Abstract

Cerebral amyloid angiopathy (CAA) and primary brain calcifications (PBC) are two types of cerebral microangiopathy characterized by deposits in the wall of small vessels (A β peptide deposits or phosphocalcic deposits). These entities are related to an important clinical heterogeneity despite a convergence on the pathophysiological level as the alterations of the neuro-vascular unit in both cases. A better characterization of the clinical, radiological and biological phenotype would improve the accuracy of the diagnosis and the knowledge of prognostic factors in CAA and PBC. Furthermore, a better understanding of the genetic factors would contribute to the identification of the underlying mechanisms involved, a necessary step to future therapeutic targets. To contribute to this goal, the two general aims of this work were to study the clinical-radiological diversity of several forms of these microangiopathies and to study their genetic determinism. First, we were able to identify a distinct phenotype, including major motor signs with initial dysarthria, cerebellar atrophy and extensive calcifications, notably pontine in an autosomal recessive PCC linked to *MYORG* mutations (n=16 patients). A study focusing on CAA inflammatory forms gathered 48 patients and has integrated them as a subtype of CAA, possibly promoted by the presence of an *APOE ϵ 4* genotype. Conversely, significant clinical and radiological heterogeneity was described in 24 patients carrying duplication of the *APP* gene, an inherited form of Alzheimer's disease and CAA. The search for genetic variations involving the *APP* gene or adjacent genes did not explain this variability in expression, which therefore seems to be potentially linked to other modulators of clinical expression. To overcome this significant heterogeneity, it was important to search for other, non-clinical, markers to help in early and accurate diagnosis. Thus, cerebrospinal fluid (CSF) biomarkers, and more particularly the determination of A β 40 peptide in n=63 patients, showed an alteration in more than 85% of CAA cases and could improve the performance of the modified Boston radiological criteria which to date do not take this information into account. In addition, certain characteristics of a lobar hematoma, already seen on the non-contrast CT scan, such as finger-like extension and associated subarachnoid hemorrhage also contribute to the diagnosis of CAA, as shown by the study of 102 emergency patients with intracerebral hemorrhage. Furthermore, the genetic determinism of CAA is currently insufficiently investigated. The identification for the first time of a triplification of the *APP* gene underlines the importance of systematically searching for punctual mutations but also for copy number variation of this gene in early-onset CAA. Nevertheless, these rare cases cannot explain the majority of sporadic forms of CAA. We therefore studied the polygenic hypothesis with the involvement of several genetic risk factors in CAA. In order to explore the hypothesis of a polygenic contribution in CAA, with the intervention of genetic risk factors, a first work was performed to know the distribution of pathogenic variants within *SORL1*, *TREM2*, *ABCA7*, *ABCA1* and *ATP8B4* genes, all of them linked to the amyloid pathway (production or clearance of A β peptide) and already identified in Alzheimer's disease. In the future, a case-control study with the objective of recruiting a cohort of 100 patients should allow to specify the impact of rare variants within these genes and to better define the risks they confer. In addition, the pursuit of genome-wide analyses of very early CAA cases, in particular by comparing the index case with its two unaffected relatives (n=4 currently available), will provide an opportunity to identify new genes and potentially new pathophysiological mechanisms of CAA.