

Université de Montréal

**Statut vitaminique K et fonctions cérébrales chez le rat : études
comportementales et mécanistiques**

par Pierre Allaire

Département de Sciences Biomédicales
Faculté de Médecine

Mémoire présenté
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise
en Sciences Biomédicales
option Sciences du vieillissement

Août 2016

© Pierre Allaire, 2016

Résumé

De plus en plus d'études montrent un lien entre la teneur en vitamine K (VK) dans l'organisme et la cognition. Certaines études effectuées *in vitro* ont montré l'effet de la VK au niveau moléculaire, mais très peu *in vivo*. Une étude récente de Tamadon-Nejad a montré qu'un traitement de 14mg/kg/jr de warfarine, un antagoniste de la VK, administré simultanément à des injections sous-cutanées de 85mg/kg/jr de phylloquinone entraînait une diminution significative de la concentration de MK-4 du cerveau, résultant en une diminution significative du statut vitaminique K au cerveau, une altération de la cognition, du comportement exploratoire et de la locomotion [1]. Dans la présente étude, le traitement de Tamadon-Nejad a été modifié et les doses de phylloquinone ont été augmentées à 120mg/kg/jr (WVK) ce qui a maintenu une diminution significative de la concentration de la concentration de MK-4 dans le cerveau, mais a entraîné une surcompensation par la phylloquinone, résultant en une augmentation significative du statut vitaminique K au cerveau. Ce statut a été associé à une mémoire de reconnaissance intacte et corrélé à une amélioration de la mémoire spatiale des rats WVK. Le traitement a aussi été associé à une augmentation significative de l'anxiété et au rétablissement du comportement exploratoire et de la locomotion des rats WVK comparativement à l'étude de Tamadon-Nejad [1]. Dans l'hippocampe des rats WVK, l'amélioration de la cognition et le rehaussement du statut vitaminique K du cerveau n'ont pas induit de variation significative de l'activation des protéines dépendantes de la VK Gas6 et Protéine S, mais ont été associés à une augmentation significative de l'activation de la voie MAPK, à une inhibition de l'apoptose et à une présence accrue de la microglie. En somme, cette étude confirme le rôle modulateur de la VK dans le cerveau sur la cognition et la survie cellulaire.

Mots-clés : vitamine K, phylloquinone, MK-4, warfarine, cognition, cerveau, hippocampe, rat, Gas6, protéine S, MAPK, caspase, microglie

Abstract

There is growing evidence that vitamin K (VK) plays a role in cognition. Some *in vitro* studies have shown how VK affects different molecular pathways in brain cells, but few *in vivo* studies have been conducted. Recently, a study from Tamadon- Nejad showed that a treatment of 14mg/kg/d of warfarine, a VK antagonist, given simultaneously with subcutaneous injections of 85mg/kg/d lead to a significant decrease in MK-4 concentration in brain, resulting in a significant decrease of VK status in brain, and perturbation in cognition, exploratory behaviour and locomotion [1]. In the present study, we modified the treatment used in Tamadon-Nejad and increased the phylloquinone doses to 120mg/kg/d which maintained the significant decrease in MK-4 concentration in brain, but lead to an overcompensation of phylloquinone that resulted in an increase of VK status in brain. This status was associated with an intact recognition memory and correlated with an improvement in spatial memory of WVK rats. The treatment was also associated with a significant increase in anxiety and recovery of exploratory behavior and locomotion compared to rats in the Tamadon-Nejad study [1]. In WVK rat hippocampi, cognition improvement and increased VK status were not associated with significant variation in VK dependant proteins (VKDP) Gas6 and Protein S activation, but were associated with an increase in the MAPK activation pathway, an inhibition of apoptosis and, an increased presence of microglia. In summary, this study confirms the modulatory role of VK in brain in cognition and cell survival.

Keywords : vitamin K, phylloquinone, MK-4, warfarin, cognition, brain, hippocampus, rat, Gas6, protein S, MAPK, caspase, microglia

Table des matières

Résumé.....	ii
Abstract.....	iii
Table des matières.....	iv
Liste des figures.....	vii
Liste des abréviations.....	ix
Remerciements.....	xi
Introduction :.....	1
Revue de la littérature :.....	3
1. Vitamine K.....	3
1.1 Structure et origine.....	3
1.2 Sources alimentaires de vitamine K.....	5
1.3 Métabolisme de la vitamine K.....	5
1.3.1 Absorption et biodisponibilité.....	6
1.3.2 Transport et assimilation.....	7
1.3.3 Distribution tissulaire.....	7
1.3.4 Catabolisme et excrétion.....	8
1.4 Carboxylation dépendante de la vitamine K.....	8
1.5 Les protéines dépendantes de la vitamine K.....	10
1.5.1 Les protéines impliquées dans la coagulation sanguine.....	10
1.5.2 L'Ostéocalcine et la <i>Matrix Gla Protein</i>	11
1.5.3 Les autres protéines dépendantes de la vitamine K.....	13
2. La vitamine K et les fonctions cérébrales.....	14
2.1 Les protéines dépendantes de la vitamine K dans le cerveau.....	15
2.1.1 Gas6.....	15
2.1.2 Protéine S.....	17

2.2 Vitamine K et sphingolipides.....	17
2.3 Autres actions de la vitamine K.....	19
2.4 Vitamine K et cognition.....	19
3.0 Tests de comportement.....	21
3.1 Test de la piscine de Morris, version classique (PM classique).....	21
3.2 Test de la piscine de Morris, version modifiée avec plateforme mobile (PM modifié)	23
3.3 Test du labyrinthe en croix surélevé (LCS).....	23
3.4 Test du Champ Ouvert (CO).....	24
3.5 Test de la reconnaissance d'objet (RO).....	25
4.0 Warfarine – modèle de déplétion de la vitamine K.....	27
4.1 Carence vitaminique K induite par un traitement à la warfarine - description d'un modèle expérimental.....	27
Objectifs.....	29
Méthodologie.....	30
Animaux.....	30
Tests de comportements.....	31
Version classique du test de la PM.....	31
Version modifiée du test de la PM.....	32
Labyrinthe en croix surélevé.....	33
Test du Champ ouvert.....	33
Test de la reconnaissance d'objet.....	33
Immunobuvardage.....	34
Dosage des vitamines K.....	35
Analyse statistiques.....	35
Résultats.....	37
Effets du traitement sur le poids, la consommation d'eau et de nourriture et la coagulation sanguine.....	37
Effets du traitement sur la cognition, l'anxiété et le comportement exploratoire.....	38
Test de la piscine de Morris (PM) version classique.....	38

Test de la piscine de Morris (PM) version modifiée.....	41
Test du labyrinthe en croix surélevé (LCS)	42
Test du champ ouvert (CO).....	43
Test de la reconnaissance d'objet (RO)	44
Analyses Biochimiques.....	47
Vitamine K dans les régions clés du cerveau.....	48
Corrélation entre vitamine K cérébrale et la cognition.....	50
Immunobuvardage	51
Protéines dépendantes de la vitamine K	51
Apoptose	53
Voies pro survie	54
Marqueurs neuronaux	56
Discussion.....	57
Analyse du poids, de la coagulation et de la consommation d'eau et de nourriture.....	57
Analyse du comportement	57
Analyses biochimiques	60
Limites de l'étude	64
Conclusion	66
Bibliographie.....	i
Annexe 1	i

Liste des figures

Figure 1. Structure moléculaire des différentes formes de vitamine K [15].....	4
Figure 2. Réaction de synthèse de la MK-4 via l'enzyme UBIAD1 [23].....	4
Figure 3. Cycle de la vitamine K lors de la réaction de carboxylation et sites d'action des AVK (adapté de Tie et al.) [61].	9
Figure 4. Gas6 active la voie de prolifération MAPK et la voie de survie PI3K/Akt via les récepteurs TAM [99].....	16
Figure 5. Représentation de la piscine de Morris et des parcours d'un rongeur à différents moments de l'expérience [129].....	22
Figure 6. Appareil du labyrinthe en croix surélevé [135].....	24
Figure 7. Appareil du test du champ ouvert [141].....	25
Figure 8. Principe du test de la reconnaissance d'objet nouveau [145].....	26
Figure 9. Effets du traitement sur le poids, les temps de coagulation et la consommation d'eau et de nourriture.	38
Figure 10. Test de la piscine de Morris, version classique.....	40
Figure 11. Test de la piscine de Morris, version modifiée.....	42
Figure 12. Test du labyrinthe en croix surélevé.	43
Figure 13. Test du champ ouvert.	44
Figure 14. Index de reconnaissance.	45
Figure 15. Index de discrimination.	46
Figure 16. Index d'habituation.....	47
Figure 17. Vitamine K dans les régions clés du cerveau.	49
Figure 18. Ratio de la MK-4 par rapport à la vitamine K totale dans chaque région du cerveau.	50
Figure 19. Corrélation entre la cognition et la concentration de vitamine K dans le cerveau.	51
Figure 20. Activation de Gas6 et Protéine S dans l'hippocampe.....	52
Figure 21. Apoptose.....	53
Figure 22. Activation des voies pErk 1/2 et pAkt.	55

Figure 23.	Marqueurs neuronaux.....	56
Figure 24.	Vitesse de nage des rats dans le test de la PM version classique.....	i
Figure 25.	Vitesse de nage des rats dans le test de la PM version modifiée.....	i
Figure 26.	Vitesse de marche des rats dans le LCS.	ii
Figure 27.	Vitesse de marche des rats dans le test du CO.	ii
Figure 28.	Vitesse de marche des rats pendant le test de la RO.....	iii

Liste des abréviations

ApoE : Apolipoprotéine E

AUC : Aire sous la courbe (*Area Under the curve*)

AVK : Antagonistes de la vitamine K

BDNF : *Brain-Derived Neurotrophic Factor*

Ca²⁺ : Calcium réduit

CD40 : *Cluster of Differentiation 40*

CO : Champ Ouvert (*Open Field*)

CO₂ : Dioxyde de carbone

CREB : *cAMP response element-binding protein*

Cys : Cystéine

DTT : Dithiothréitol

EDTA : Acide éthylène diamine tétra-acétique

Gas6 : *Growth arrest-specific 6*

GFAP : *Glial fibrillary acidic protein*

GGCX : γ -glutamyle-carboxylase

GGP: Geranylgeranyl pyrophosphate

Gla : Acide glutamique γ -carboxylé

Glu : Acide glutamique

GRP : *Gla Rich Protein*

HPLC : Chromatographie liquide à haute performance (*High Performance Liquid Chromatography*)

ICAM-1 : molécule d'adhésion cellulaire-1

ID : Index de discrimination

IH : Index d'habituation

IL-6 : Interleukine-6

IR : Index de reconnaissance

LCS : Labyrinthe en croix surélevée (*Elevated Plus Maze*)

LDL : Lipoprotéine à densité faible (*Low Density Lipoprotein*)
LRT : Lipoprotéine riche en triglycérides
MAPK : *Mitogen-Activated Protein Kinase*
MGP : *Matrix Gla Protein*
MgCl₂ : Chlorure de Magnésium
MK : Ménaquinone
mTOR : *Mammalian Target of Rapamycin*
NaCl : Chlorure de sodium
NADPH : Nicotinamide adénide dinucléotide phosphate
NaF : Fluorure de sodium
NF-κB : *Nuclear Factor-Kappa B*
O₂ : Oxygène
OC : Ostéocalcine
PDVK : Protéine dépendante de la vitamine K
pH : potentiel Hydrogène
PI3K : phosphoinositide 3-kinase
PKC : Protéine Kinase C
PM : Piscine de Morris (*Morris Water Maze*)
PMSF : Fluorure de phénylméthylsulfonyle
PVDF : Polyfluorure de vinylidène
RO : Reconnaissance d'objet (*Novel Object Recognition*)
Rpm : Rotation par minute
TAM : Tyro3-Axl-Mer
TNF : Facteur de nécrose tumorale
TP : Température Pièce
UBIAD1: *UBiA prenyltransferase domain-containing protein 1*
VKOR : *Vitamine K-epoxide reductase*
VKORL : *Vitamin K-epoxide reductase-like 1*
VLDL : Lipoprotéine à très faible densité (*Very Low Density Lipoprotein*)
WVK : Traité à la warfarine et à la vitamine K

Remerciements

Je remercie tout d'abord Guylaine Ferland de m'avoir permis de réaliser ce projet de maîtrise. Je tiens aussi à souligner spécialement le soutien, autant moral que technique, de Bouchra et d'Élisabeth, ses assistantes de recherche.

De plus, je veux remercier le département de sciences biomédicales pour les deux bourses qu'il m'a octroyées et la Fondation Desjardins pour la bourse qu'elle m'a octroyée.

Je tiens aussi à remercier toutes les personnes du centre de recherche de l'hôpital Sacré-Cœur de Montréal sans qui mes journées n'auraient pu être aussi ensoleillées et mémorables et qui ont même su partager leur matériel de laboratoire pour l'accomplissement de mon projet : Mélanie, Houda, Zeinab, Raja, Mervé, Marie-Claude, Gervais et Ginette.

Enfin, je veux terminer ces remerciements en nommant ma fiancée, Véronique, ainsi que ma famille et la sienne qui ont su être aussi un soutien attentionné et inestimable pendant ces deux intenses années de maîtrise.

Introduction :

Prenant en compte le vieillissement de la population [2], la perte de capacités cognitives qui peut y être associé [3] et le rôle de la nutrition dans l'activité synaptique et le métabolisme cérébral [4], il y a intérêt à approfondir nos connaissances sur le rôle de la vitamine K dans le cerveau. La vitamine K est un nutriment reconnu pour son rôle dans la coagulation. Les études des dernières années lui ont attribué un rôle important dans les fonctions cérébrales, dont un effet bénéfique sur la cognition. En effet, une étude de Carrié et al. sur l'animal a montré qu'une diète pauvre en vitamine K entraînait de moins bonnes capacités cognitives avec l'âge [5]. Une étude plus récente chez des rats traités à la warfarine, un antagoniste de la vitamine K (AVK), a montré qu'une diminution importante de la vitamine K du cerveau était associée à des perturbations cognitives et comportementales et des altérations dans le métabolisme des sphingolipides dans le cerveau [1].

Chez l'humain, une étude longitudinale de Presse et al. a montré une association entre un plus haut taux de vitamine K sérique et une meilleure mémoire épisodique verbale chez des sujets âgés sains [6]. Une autre étude du même auteur a montré qu'un apport plus faible en vitamine K par la diète était associé au déclin cognitif de sujets atteints des premiers stades de la maladie d'Alzheimer [7].

La prise d'AVK comme la warfarine, par les personnes âgées pour diminuer leur risque de thrombose ou d'embolie, a aussi été associée à des perturbations cognitives [8], un volume cérébral plus petit [9], une moins bonne mémoire de travail et une moins bonne aisance verbale, sans toutefois être associée avec le fonctionnement cognitif global [10]. Une autre étude a aussi montré qu'une diète riche en vitamine K était associée à moins de plaintes de pertes de mémoire chez des personnes âgées [11]. Ainsi, la vitamine K pourrait avoir un rôle sur les fonctions cognitives cérébrales, mais son mécanisme d'action reste à élucider.

Dans le cerveau, la vitamine K est déjà connue pour son rôle dans l'activation de plusieurs voies de signalisation cellulaire par l'activation de la protéine Gas6 et de la protéine S [12]. De plus, elle affecte le métabolisme des sphingolipides qui pourrait aussi moduler la signalisation cellulaire cérébrale [1, 13] Enfin, des études ont montré un rôle spécifique de la vitamine K dans la diminution de l'inflammation et l'augmentation de la survie de cellules cérébrales [14]. Or, jusqu'à maintenant, les effets moléculaires de la vitamine K sur le cerveau ont surtout été démontrés *in vitro*, mais peu encore *in vivo*.

Cette étude a donc pour objectif d'approfondir les aspects mécanistiques de l'effet de la vitamine K sur les fonctions cognitives et comportementales *in vivo*. Comme le rat est un modèle souvent utilisé pour étudier la vitamine K et le système nerveux, c'est la population cible qui sera retenue pour cette nouvelle étude *in vivo*. Plus précisément, les aspects moléculaires analysés seront l'activation des protéines dépendantes de la vitamine K, l'activation de certaines protéines de signalisation cellulaire, ainsi que la présence de marqueurs d'intégrité des cellules neuronales. Les aspects comportementaux analysés seront la cognition, l'anxiété, le comportement exploratoire et la motricité.

Revue de la littérature :

1. Vitamine K

La vitamine K a d'abord été découverte pour son rôle dans la coagulation sanguine. En 1929, le biochimiste Henrik Dam de l'université de Copenhague constata des hémorragies chez des poulets nourris avec une diète sans gras ni cholestérol. Son équipe découvrit par la suite que cela était causé par l'absence de cette vitamine liposoluble dans la diète. Nommée vitamine K pour la première lettre du mot coagulation en langue scandinave, ses caractéristiques furent d'abord étudiées sous sa forme phylloquinone (vitamine K₁) en 1939, puis sous sa forme ménaquinone (vitamine K₂) en 1940 [15].

1.1 Structure et origine

La vitamine K se trouve dans la nature sous plusieurs formes. Toutes ces formes se caractérisent par un noyau central commun de 2-méthyl 1,4 naphthoquinone ou ménadione (vitamine K₃) (figure 1). Elles se différencient par la chaîne de carbones en position 3 du noyau naphthoquinone. Les deux principales formes de la vitamine K sont la vitamine K₁, nommée aussi phylloquinone, et la vitamine K₂ représentant la famille des ménaquinones (MKs). La phylloquinone, que l'on retrouve principalement dans les plantes vertes [16-18] possède une chaîne phytyle en position 3 tandis que les MKs, lesquelles sont principalement produites par les bactéries intestinales [16], possèdent différentes longueurs de chaîne d'isoprénoïdes. Elles sont d'ailleurs nommées MK-n où n correspond au nombre d'isoprénoïdes présents dans leur chaîne.

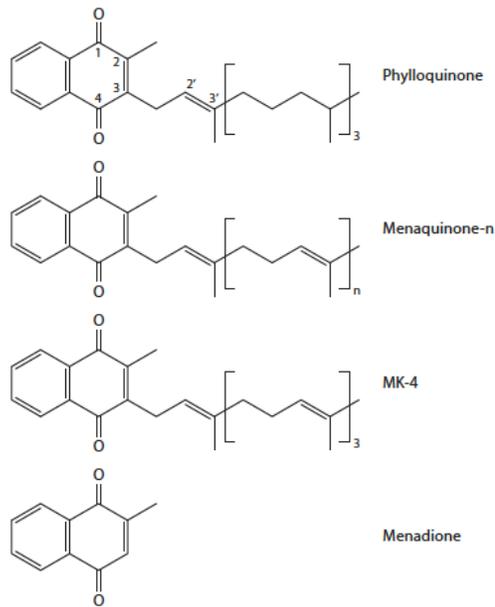


Figure 1. **Structure moléculaire des différentes formes de vitamine K [15].**

La MK-4 diffère des autres MKs, car elle n'est pas synthétisée par les bactéries intestinales [19], mais dans les tissus à partir de la phylloquinone [20, 21]. L'enzyme endoplasmique transmembranaire *UBiA prenyltransferase domain-containing protein 1* (UBIAD1) est responsable de la synthèse de la MK-4 [15]. Plus spécifiquement, l'enzyme, localisée au réticulum endoplasmique et à l'appareil de Golgi [22], clive la chaîne prénylée en position 3 de la phylloquinone qui redevient ménadione. La ménadione est de nouveau prénylée avec une chaîne geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP), un dérivé de la voie des mévalonates, pour enfin devenir MK-4 (Fig. 2) [23].

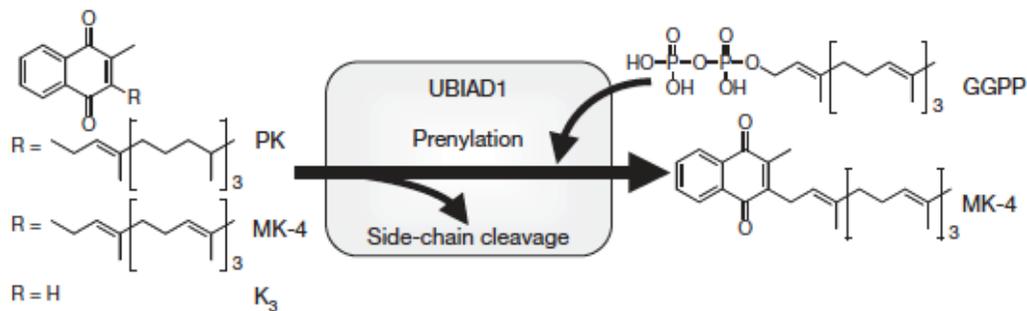


Figure 2. **Réaction de synthèse de la MK-4 via l'enzyme UBIAD1 [23].**

1.2 Sources alimentaires de vitamine K

Les sources alimentaires de vitamine K varient selon les vitamères. Pour la quantifier dans les aliments, la méthode la plus appropriée est la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) [24]. Santé Canada a proposé une consommation quotidienne de vitamine K qui varie de 2 à 120 µg selon l'âge, le poids, et le genre [25].

La phylloquinone constitue la principale source alimentaire de vitamine K. Elle se retrouve en grande quantité dans les légumes verts comme les épinards, le brocoli et le chou frisé. La phylloquinone se trouve également dans les huiles végétales utilisées pour la cuisson, telles que l'huile de soja, de canola et la margarine. Bien que leur teneur en phylloquinone soit très faible, les tomates, les pommes de terre et les carottes peuvent aussi contribuer à l'apport quotidien de phylloquinone, car elles sont souvent consommées en grande quantité [26, 27].

Les MKs provenant de source alimentaire, quant à elles, participent moindrement à l'apport quotidien de vitamine K (12-25%), car elles sont présentes en petite quantité dans les aliments [25, 28]. On en trouve en faible quantité dans la viande et dans les produits dérivés des animaux, comme le beurre, les œufs et le fromage. Par exemple, le fromage est l'aliment qui contribue le plus à l'apport en MKs et il contient surtout de la MK-8 et de la MK-9 [20, 29].

1.3 Métabolisme de la vitamine K

Les principales composantes métaboliques de la vitamine K i.e. absorption, transport, distribution tissulaire, catabolisme et excrétion, sont décrites ci-après.

1.3.1 Absorption et biodisponibilité

La vitamine K est absorbée par une voie similaire à celle des autres lipides. Dans les intestins, elle est incorporée à des micelles avec les sels biliaires et les produits de lipolyse des enzymes pancréatiques. Puis, les micelles sont internalisées par les entérocytes du petit intestin et appariées aux chylomicrons. Ces derniers sont exportés dans les capillaires lymphatiques puis dans les vaisseaux lymphatiques plus larges avant d'être déversés dans le conduit thoracique et la circulation sanguine [30].

Lorsqu'elle provient de la consommation de légumes verts, la phylloquinone est très peu absorbée [31-33]. Ceci s'explique par le fait que la phylloquinone est fortement attachée à la membrane thylacoïdale des chloroplastes dans les cellules végétales [16]. Par contre, l'ajout d'huile végétale ou de beurre lors de la consommation de légumes verts, augmente son absorption [32, 34]. De plus, la phylloquinone est mieux absorbée lorsqu'elle provient de la consommation exclusive d'huile que lorsqu'elle provient de la consommation exclusive de légumes verts [33, 35]. Enfin, l'absorption de la phylloquinone est la plus efficace (jusqu'à 80% d'absorption) [27] lorsqu'elle est ingérée sous forme de comprimé [30-32, 34]. Une étude récente a aussi montré un impact globalement négatif de la présence d'autres vitamines liposolubles dans la diète sur l'absorption de la vitamine K [36].

Très peu d'études se sont penchées sur le métabolisme des MKs. Il est possible qu'elles empruntent une voie similaire à celle de la phylloquinone [30, 37]. Toutefois, leur biodisponibilité peut varier. Selon certaines études, la MK-4 en présence de beurre [32] et la MK-7 contenue dans le natto [38] seraient mieux absorbées que la phylloquinone provenant de légumes verts comme l'épinard [16]. Cependant, une étude menée auprès de 7 hommes a plutôt montré que l'absorption de la MK-4 et de la MK-9 était plus faible que l'absorption de la phylloquinone [39].

1.3.2 Transport et assimilation

Lorsqu'elle est transportée dans la lymphe puis dans le sang, la vitamine K circule dans les lipoprotéines riches en triglycérides (LRTs) [40] composées de chylomicrons. La vitamine K liée aux LRTs atteint sa concentration plasmatique maximale entre 4 et 10h après ingestion selon le vitamère et la source vitaminique [20]. La phylloquinone est normalement présente en faible quantité dans le sang en comparaison aux autres vitamines liposolubles et Sadowski et al. ont proposé une plage de concentration dans le sang allant de 0,25-2,7nmol/L [41], les concentrations normales des ménaquinones restant à être déterminées [16]. La durée où la vitamine K est détectable dans le sang varie selon la quantité de vitamine K ingérée, la source alimentaire et les variations métaboliques interindividuelles [16, 20, 29, 30].

Lors de l'assimilation cellulaire dans les tissus, la présence de l'apolipoprotéine E (apoE) facilite la liaison des LRTs aux récepteurs des *LDL* et des *VLDL*. Puis, la vitamine K est internalisée dans les cellules par sa dissociation des chylomicrons à la surface de la cellule [30].

1.3.3 Distribution tissulaire

Suite à plusieurs études réalisées chez le rat, nous savons maintenant que la concentration de la vitamine K varie d'un organe à l'autre [42-44], et que les concentrations tissulaires diffèrent selon la souche [21, 42, 45, 46], la diète [5, 45, 47], le sexe [21, 48, 49] et l'âge [5, 45, 48] des animaux. Lorsque la phylloquinone est l'unique source de vitamine K dans la diète, la phylloquinone est stockée en plus grande quantité dans le foie, le cœur et les os, tandis que le cerveau, les glandes salivaires et le pancréas stockent davantage de MK-4. Les deux vitamères sont présents dans les tissus mentionnés, mais les proportions varient [42]. Un traitement à la warfarine diminue la concentration de MK-4 dans les organes et augmente celle de sa forme époxyde (décrite dans la section suivante) [1, 50].

Dans le cerveau, la vitamine K se trouve essentiellement sous forme de MK-4, laquelle représente >95% de la vitamine K totale. Les régions myélinisées sont celles qui contiennent les plus grandes concentrations de vitamine K avec, en ordre décroissant, le mésencéphale, le cortex frontal, l'hippocampe, le striatum et dans une moindre mesure, le cervelet [1, 5, 13, 45].

1.3.4 Catabolisme et excrétion

La vitamine K est dégradée dans le foie et est excrétée principalement dans les fèces (40-50%), mais aussi dans l'urine (20%) [16, 51]. En présence de warfarine, la vitamine K est excrétée davantage dans l'urine que dans les fèces [29, 52].

La dégradation de la phylloquinone et de la ménaquinone entraîne la formation de deux principaux métabolites : le 7-C-aglycone (métabolite I) et 5-C-aglycone (métabolite II) [53]. La vitamine K serait d'abord hydroxylée sur son carbone ω par l'enzyme cytochrome P450 CYP4F2, puis, la chaîne isoprényle ou phytyle serait rétrécie par la voie de la β -oxydation [54]. Le métabolite II est le métabolite le plus abondant puisqu'il représente 75% de l'excrétion totale de la vitamine K [55].

La durée de la présence postprandiale de la vitamine K dans le sang varie selon le vitamère. Par exemple, Erkkila et al. ont montré que la phylloquinone peut demeurer dans le sang pour une durée de 24h [56], tandis que Shurgers et Vermeer ont montré que la MK-7 provenant du natto peut rester dans la circulation sanguine jusqu'à 72h après ingestion [57].

1.4 Carboxylation dépendante de la vitamine K

Au plan moléculaire, la vitamine K participe à une réaction de carboxylation post-traductionnelle qui a pour but de transformer les résidus d'acide glutamique (Glu) contenus dans certaines protéines, en acide glutamique γ -carboxylé (Gla); on réfère à ces protéines comme aux protéines dépendantes de la vitamine K (PDVKs). Cette modification confère aux

autre enzyme similaire à VKOR a récemment été identifiée, la *Vitamin K-epoxide reductase-like 1* (VKORL), toutefois son rôle ne serait pas aussi primordial selon une étude *in vivo* [63].

Les dérivés coumariniques dont un des plus connus est la warfarine, bloquent la liaison de la vitamine K (i.e. formes époxyde ou quinone) à VKOR, empêchant ainsi le recyclage de la vitamine (c.f. AVK de la figure 3). Par contre, dans le foie, une quinone réductase NADPH-dépendante résistante à la warfarine permet la réduction de la forme quinone de la vitamine mais pas la réduction de sa forme époxyde [16]. Ces effets pharmacologiques de la warfarine sont à la base de ses effets anticoagulants (cf. section suivante) et ont aussi permis de développer différents modèles expérimentaux permettant d'étudier le métabolisme de la vitamine dans les divers organes (discuté plus en détails à la section 4).

1.5 Les protéines dépendantes de la vitamine K

La vitamine K participe à l'activation de plusieurs protéines impliquées dans la cascade de la coagulation et de sa régulation. D'autres PDVKs comme l'ostéocalcine et la *Matrix Gla Protein* jouent un rôle important dans la santé vasculaire et osseuse. La protéine S et la protéine *Growth Arrest Specific Gene 6* sont impliquées dans la signalisation cellulaire et ont des effets bénéfiques dans le cerveau dans plusieurs circonstances. La vitamine K agit aussi sur d'autres protéines dont les rôles restent encore à définir.

1.5.1 Les protéines impliquées dans la coagulation sanguine

La vitamine K participe à l'activation des facteurs de coagulation VII, IX, X et de la prothrombine, des sérines protéases aux actions pro-coagulantes. Ces protéines, d'origine hépatique, possèdent entre 10-12 résidus Gla [64] ce qui permet leur liaison aux phospholipides des plaquettes et des cellules endothéliales au site de blessure. L'activité protéolytique des facteurs VII et IX participe respectivement aux voies extrinsèque et

intrinsèque de la cascade d'activation du facteur X. Ce dernier clive ensuite la prothrombine, libère la thrombine qui, à son tour, participe à la formation d'un caillot de fibrine.

Synthétisées au foie, les protéines C, S et Z jouent quant à elles un rôle de rétroinhibition sur la cascade de la coagulation [16]. La protéine Z lie une protéase dépendante de la protéine Z et, ensemble, inhibent le facteur Xa. La sérine protéase C est activée par la thrombine liée à la thrombomoduline et ensemble, elles inhibent les facteurs Va et VIIIa. La protéine S agit comme cofacteur de la protéine C, ce qui accélère son action d'inhibition des facteurs Va et VIIIa [58]. Griffin et al. ont aussi rapporté que la forme activée de la protéine C avait des effets neuroprotecteurs et anti-apoptotiques lorsqu'étudiée sur des cellules endothéliales cérébrales ou administrée à des souris ayant subi un infarctus cérébral [65]. La protéine S a aussi d'autres fonctions dans le cerveau qui seront discutées plus en détail dans la section 2.1.2.

1.5.2 L'Ostéocalcine et la *Matrix Gla Protein*

La vitamine K participe à l'activation de l'ostéocalcine (OC) et de la *Matrix Gla Protein* (MGP) qui toutes deux, jouent un rôle dans le métabolisme du calcium. L'OC participe au remodelage osseux et un nombre limité d'études lui attribuent un rôle endocrinien. Synthétisée par les ostéoblastes, l'OC est sécrétée dans la circulation et la forme totale de la protéine constitue un marqueur de la formation osseuse [66]. Plusieurs études *in vitro* ont montré que ses résidus Gla lui permettent de lier l'hydroxyapatite. Par contre, en présence de warfarine ou d'une carence de vitamine K, l'OC perd sa capacité de lier l'hydroxyapatite et s'accumule sous forme non-carboxylée dans le sang [67]. Selon les études réalisées à ce jour, l'OC carboxylée agirait comme inhibiteur de la formation osseuse en limitant la formation d'un noyau d'hydroxyapatite. Chez l'humain, les études ont rapporté des associations négatives entre les apports alimentaires de vitamine K et les concentrations d'OC sous-carboxylée dans le sang. Les études d'intervention de supplémentation réalisées ces récentes années ont présenté des résultats très variables qui empêche pour le moment de penser qu'une supplémentation en

vitamine K pourrait protéger contre la déminéralisation osseuse associée à l'âge et/ou réduire les risques de fracture [66].

Au niveau endocrinien, l'OC a plus récemment été associée au métabolisme du glucose et à la signalisation de l'insuline. En effet, des études *in vitro* et *in vivo* réalisées à partir de modèles murins, ont démontré que lors de la déminéralisation de l'os, l'acidité produite décarboxyle un des résidu Gla et que cette forme sous-carboxylée confère à l'OC son rôle endocrinien. Plus précisément, l'OC augmenterait la prolifération des cellules β du pancréas, la production et la sécrétion d'insuline, améliorerait la sensibilité à l'insuline et augmenterait les dépenses énergétiques [68]. Les études effectuées chez l'humain ne sont toutefois pas concluantes, puisqu'elles ne prennent pas en considération tous les marqueurs osseux ou n'analysent pas les différentes formes d'OC (totale, carboxylée et sous-carboxylée). Par ailleurs, les travaux réalisés chez la souris, lesquels attribuent l'action endocrinienne à la forme sous-carboxylée de l'OC, sous-entendent un effet bénéfique d'un statut vitaminique K diminué. Or, au contraire, plusieurs études réalisées chez l'humain suggèrent un effet protecteur d'apports élevés de vitamine K en regard de la résistance à l'insuline [66]. Ainsi, l'action de l'OC au niveau du métabolisme du glucose reste controversé et requiert davantage d'investigation.

En lien avec son rôle dans le métabolisme de l'insuline, l'OC pourrait, selon certains auteurs, représenter un biomarqueur pour les maladies métaboliques et cardiovasculaires [69]. Enfin, des rôles ont récemment été suggérés pour l'OC dans la fertilité et le développement cognitif. Dans une étude de Oury et al., l'OC a été impliquée dans la fertilité des mâles en activant des gènes responsables de la production de testostérone [70]. Dans une seconde étude de cette même équipe, l'administration d'ostéocalcine à des souris knockout pour le gène codant cette protéine a permis de prévenir l'anxiété, favoriser l'apprentissage et la mémoire indépendamment de ses fonctions métaboliques. [71].

Nous savons à partir de nombreuses études réalisées chez le rat et la souris que la MGP est présente dans plusieurs tissus, notamment dans les tissus vasculaires où elle joue un rôle important dans la prévention de la calcification artérielle [72]. En effet, sous sa forme active, (5 résidus Gla), elle lie le phosphate de calcium et prévient la calcification au niveau cellulaire

[73]. Son rôle a d'abord été découvert dans des souris dont le gène codant pour la MGP avait été inactivé ; ces souris mouraient 2 mois après leur naissance suite à une calcification massive de leurs artères [74]. Aussi, il a été montré qu'un traitement à la warfarine était associé à la calcification artérielle chez la souris [75] et le rat [76]. Plus tard, Schurgers et al. ont montré qu'une supplémentation en vitamine K chez le rat via la diète, entraînait une régression de la calcification induite par la warfarine [77]. Chez l'humain, certaines études ont montré des associations entre la concentration plasmatique de la forme non carboxylée de la MGP et un apport élevé en vitamine K [72]. D'autres études ont montré une association entre des apports élevés de vitamine K et une réduction du risque de certaines maladies cardiovasculaires, mais elles ne sont pas toutes consistantes et nécessitent donc approfondissement [16, 72].

1.5.3 Les autres protéines dépendantes de la vitamine K

La vitamine K active aussi une famille de quatre protéines nommées *transmembrane Gla family* qui ne sont pas sécrétées mais ancrées à la membrane plasmique. Une étude *in vitro* sur l'une d'elles, la protéine Gla riche en proline 2 (*Proline-rich Gla protein 2*), a montré sa capacité à lier le facteur de transcription de la *Yes-associated protein* [78], ce qui suggère un rôle dans la signalisation cellulaire, mais ceci reste à élucider *in vivo* [16].

La vitamine K active aussi une protéine contenant 16 résidus Gla, nommée protéine riche en Gla (*Gla-rich protein*). Son expression dans le cartilage, dans les cellules responsables du remodelage osseux, sa capacité à lier le calcium [79] et son accumulation dans les sites pathologiques de calcification [80] suggèrent un rôle dans la régulation du calcium. Une récente étude *in vitro* par Viegas et al. a montré que la GRP sous sa forme carboxylée avait un effet inhibiteur de la calcification sur des cellules aortiques humaines [81] et une étude encore plus récente du même auteur a révélé un effet bénéfique anti-inflammatoire dans un modèle cellulaire d'ostéoarthrite [82]. Collectivement, ces études suggèrent des effets protecteurs de la GRP en regard de la calcification et de l'inflammation, ce qui reste à démontrer *in vivo*.

En 2008, Coutu et al. ont présenté des données à l'effet que la périostine contenait des résidus gla et que l'expression de ces résidus était dépendante de l'action de la vitamine K [83]. Toutefois, ceci a récemment été infirmé par Douglas et al. [84]. D'autres études sont donc nécessaires pour statuer sur le caractère vitamine K-dépendant de cette protéine impliquée dans la guérison des plaies [85]. De plus, cette protéine constitue un biomarqueur de l'asthme [86] et serait impliquée dans le développement de certains cancers [87].

Enfin, la transthyrétine, un transporteur de la vitamine A et de la thyroxine dans le sang et dans le fluide cébrospinal [88] contient aussi des résidus Gla [89]. Son agrégation peut entraîner, entre autres, l'amyloïdose cardiaque avec symptôme de cardiomyopathie et l'amyloïdose du système nerveux central. Le principal traitement contre ces formes d'amyloïdose est la molécule tafamidis qui stabilise le tétramère de la transthyrétine [90]. Enfin, la protéine Gas6 et la protéine S sont impliquées au niveau du cerveau et seront présentées plus en détail dans la prochaine section.

2. La vitamine K et les fonctions cérébrales

Distribuée de façon différentielle dans les régions du cerveau, la vitamine K est présente principalement sous forme de MK-4 tandis que la phylloquinone y est présente en très faible quantité. Une étude effectuée sur de jeunes rats [13] et une autre sur des rats vieillissants [5] ont montré que 98% de la vitamine K présente dans le cerveau était sous forme MK-4. Le rôle de la vitamine K dans le cerveau reste peu caractérisé. Les études à ce jour suggèrent qu'elle participe à l'activation des protéines S et Gas6, qu'elle module la synthèse des sphingolipides, qu'elle aurait un effet neuroprotecteur indépendant de son action sur les PDVKs et les sphingolipides, et qu'elle est associée à la cognition [12].

2.1 Les protéines dépendantes de la vitamine K dans le cerveau

Les protéines S et Gas6 sont deux protéines qui partagent 44% d'homologie de séquence. Au niveau fonctionnel, ces protéines lient les récepteurs Tyro 3, Axl et Mer, composantes de la famille de récepteurs TAM [91].

2.1.1 Gas6

La protéine Gas6 est largement distribuée dans le cerveau [92] et ses concentrations varient en fonction de l'âge. Une étude effectuée sur des synaptosomes de rats a en effet montré une diminution des concentrations de Gas6 dans le striatum, l'hippocampe et le cortex frontal chez des rats âgés [93]. Au niveau physiologique, Gas6 a des effets anti-apoptotiques et pro-survie sur les neurones et les cellules gliales. Elle a aussi été décrite comme ayant un rôle dans l'activation de la microglie et dans la diminution de l'inflammation. Des études *in vitro* ont montré que Gas6 prévient l'apoptose et augmente la survie des neurones de l'hippocampe [94] et des cellules neuronales produisant l'hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires (*Gonadotrophin Releasing Hormone*) [95]. Ces deux études ont notamment fourni de l'évidence à l'effet que Gas6 agissait par l'activation de la voie de la *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) et la voie phosphoinositide 3-kinase (*phosphatidylinositol 3-kinase* : PI3K)/Akt. Dans une étude réalisée sur des cellules corticales et des cellules de l'hippocampe, Prieto et al. ont montré que l'activation de la voie MAPK par la liaison de Gas6 au récepteur Tyro3 entraînait la phosphorylation et l'activation des facteurs de transcription de la kinase S6 (*S6 kinase*) et de la protéine se fixant aux éléments de réponse cAMP (*cAMP response element-binding protein* : CREB) qui sont deux marqueurs de prolifération et de survie cellulaire. La même étude a aussi montré que l'activation de la voie PI3K/Akt entraînait le recrutement de la protéine cible de la rapamycine chez les mammifères (*mammalian target of Rapamycin* : mTOR), un autre marqueur de survie cellulaire [96]. Il est aussi intéressant de noter que CREB et les phosphatases des MAPKs modulent l'activité de BDNF, un facteur de croissance neuronal impliqué dans la plasticité synaptique [14, 97]. Finalement, une étude

pertinente à la maladie d'Alzheimer a montré que l'apoptose neuronale causée par la bêta-amyloïde est diminuée lorsque les cellules sont exposées à des concentrations élevées de Gas6 [98]. Ainsi, par sa liaison aux récepteurs TAM, Gas6 active les voies MAPK et PI3K/Akt et contribue à la prolifération cellulaire et à la diminution de l'apoptose (figure 4).

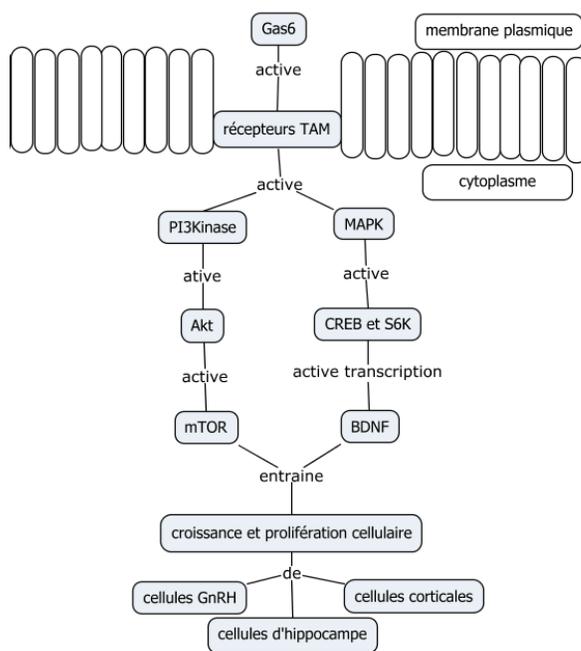


Figure 4. **Gas6 active la voie de prolifération MAPK et la voie de survie PI3K/Akt via les récepteurs TAM [99].**

Gas6 module aussi l'activation de la glie et de la microglie ainsi que la survies des cellules qui les constituent. En effet, une étude *in vitro* a montré que Gas6, par sa liaison au récepteur Axl et l'activation de la voie PI3K/Akt, permet de réduire l'apoptose des oligodendrocytes induite par la présence du facteur de nécrose tumorale TNF- α [100]. Binder et coll. ont montré *in vitro* [101] et *in vivo* [102] que l'absence de Gas6 entraînait une perte des oligodendrocytes suite à un traitement à la cuprizone. *In vitro*, ils ont aussi montré que Gas6 diminuait la prolifération de la microglie activée par les lipopolysaccharides [101]. Ceci concorde avec une étude de Grommes et al. qui ont montré que Gas6 diminue l'expression des marqueurs de l'inflammation IL1- β et iNOs suite à l'activation de la microglie par les lipopolysaccharides

[103] Les deux études de Binder et al. et une autre étude réalisée chez la souris par Tshiperson et al. [104] ont aussi montré que Gas6 améliore la remyélinisation des axones suite à un traitement à la cuprizone. Collectivement, ces études suggèrent un effet bénéfique de Gas6 dans la survie des cellules neuronales, l'activation de la microglie et un effet anti-inflammatoire dans le cerveau [12, 14].

2.1.2 Protéine S

Bien que son rôle dans le cerveau reste à approfondir, quelques études ont montré un effet neuroprotecteur de la protéine S dans un contexte d'hypoxie suite à un AVC. En effet, dans un modèle murin *in vivo*, Liu et al. ont montré que l'injection de protéine S suite à l'induction d'un AVC améliorait les capacités motrices, diminuait l'œdème, les dépôts de fibrines, l'infiltration des neutrophiles et l'apoptose des neurones, un effet aussi constaté sur des neurones *in vitro* [105]. Plus récemment, Zhong et al. ont montré que la protéine S protégeait les neurones de l'apoptose suite à l'activation des récepteurs NMDA. Ils ont aussi montré que cela se produisait par l'activation du récepteur Tyro 3, entraînant l'activation de la voie PI3K/Akt, [106]. Ces études suggèrent un rôle bénéfique de la protéine S sur le système nerveux central [12].

2.2 Vitamine K et sphingolipides

La vitamine K est aussi impliquée dans la synthèse des sphingolipides, un groupe de lipides complexes, composant la membrane plasmique des cellules chez les mammifères [12]. Certains sphingolipides : céramide, sphingomyéline, cérébroside, sulfatide et ganglioside sont notamment présents en grande concentration dans le système nerveux central [107]. Certaines études suggèrent un rôle des sphingolipides comme suppresseurs de tumeur, comme agent pro-inflammatoire, comme contributeur à la résistance à l'insuline [108]. D'autres travaux suggèrent un rôle des sphingolipides dans le vieillissement [109] et les maladies dégénératives

telles que l'Alzheimer et la maladie de Parkinson [110, 111]. Or, certaines études réalisées par Lev M et coll. ont montré que la vitamine K peut agir directement dans la synthèse des sphingolipides en activant la 3-kéto-dihydrosphingosine synthase, l'enzyme responsable de la première étape de la synthèse des sphingolipides, et en activant la sulfotransférase qui permet la synthèse des sulfatides. De plus, lorsque des rongeurs étaient traités à la warfarine, l'activité de ces enzymes et la concentration de certains sphingolipides diminuaient dans le cerveau, des effets qui ont pu être renversés suite à l'administration de vitamine K [12].

Plus récemment, Carrié et al. ont montré que dans le cerveau de rats Sprague Dawley recevant des quantités faibles ou adéquates de phylloquinone dans leurs diètes, la MK-4 était corrélée positivement avec les concentrations de sulfatides et de sphingomyéline, et négativement avec les concentrations de ganglioside [13]. Une autre équipe a aussi montré une corrélation positive entre la MK-4 et la concentration de sulfatide dans l'hippocampe et le cortex de rats Fisher 344 âgés de 12 et 24 mois [45]. Carrié et al. ont par la suite montré que chez leurs rats âgés de 20 mois, ceux ayant reçu une diète faible en phylloquinone depuis le sevrage présentaient de plus grandes concentrations de céramides dans l'hippocampe et de moins grandes concentrations de gangliosides dans le bulbe pont et le mésencéphale, comparativement aux rats ayant reçu une diète adéquate ou élevée en phylloquinone [5]. De plus, ces changements dans la concentration des sphingolipides étaient associés à de moins bonnes performances cognitives. Des travaux ont montré que dans certains contextes, les céramides contribuent aux processus inflammatoires [112], activent l'apoptose [113, 114], inhibent la voie PI3K/Akt [115] et favorisent la production de radicaux libres [110]. Bien que des liens directs restent à établir, ces actions des céramides pourraient nuire à la cognition [12]. Dans une étude récente de Tamadon-Nejad et al., l'administration de fortes doses de warfarine à des rats Wistar a été associée à de moins bonnes capacités cognitives et à des changements au niveau des sphingolipides du cerveau [1]. Globalement, ces études appuient un rôle de la vitamine K dans la synthèse des sphingolipides et les études de Carrié et Tamadon-Nejad suggèrent une association entre les sphingolipides et la cognition.

2.3 Autres actions de la vitamine K

Il a été démontré que la vitamine K, sous sa forme phylloquinone et MK-4, peut jouer un rôle neuroprotecteur, indépendamment des PDVKs. En effet, *in vitro*, une étude a montré que les deux vitamines augmentaient la croissance des axones via l'activation de la voie MAPK et de la voie protéine kinase C (PKC) qui est activée par la voie PI3K [116]. De plus, quelques études *in vitro* ont montré que la MK-4 pouvait protéger les oligodendrocytes ainsi que les neurones de la toxicité induite par les radicaux libres [117-119].

La vitamine K pourrait aussi avoir un effet anti-inflammatoire. En effet, *in vitro*, une étude réalisée par Reddi et al. a montré que la vitamine K inhibait la production d'IL-6 par des fibroblastes traités aux lipopolysaccharides [120]. De plus, une étude sur un modèle animal de sclérose en plaques a montré qu'une administration prophylactique de MK-4 diminuait l'inflammation et l'expression de l'enzyme iNOS, productrice de radicaux libres [121]. Les études d'Ohsaki et al. *in vitro* ont aussi montré que la phylloquinone diminuait l'inflammation suite à un traitement de lipopolysaccharides sur des macrophages [122], en inhibant l'activité du facteur nucléaire NF- κ B [123]. Enfin chez l'humain, des corrélations inverses ont été observées entre les taux sanguins de vitamine K et ceux de certains marqueurs de l'inflammation dont IL-6, CD40, ICAM-1 et le récepteur 2 de TNF [124, 125]. Collectivement, ces études suggèrent un effet anti-inflammatoire de la vitamine K et potentiellement un effet neuroprotecteur.

2.4 Vitamine K et cognition

En marge de ses actions au plan moléculaire, la vitamine K aurait la capacité d'influencer les capacités d'apprentissage et la mémoire. En effet, des études chez les personnes âgées ont associé les apports de vitamine K aux capacités d'apprentissage [126] ou ont associé un plus grande concentration sérique de vitamine K à une meilleure mémoire épisodique verbale [6]. De plus, une étude récente a montré qu'une consommation accrue de vitamine K était associée

à un nombre significativement moindre de plaintes subjectives de mémoire dans un groupe de personnes âgées [11]. La vitamine K a aussi été étudiée en lien avec la maladie d'Alzheimer (MA). Dans une première étude impliquant des patients dans les premiers stades de la maladie, les auteurs ont rapporté des apports habituels de vitamine K plus faibles comparativement à ceux de sujets cognitivement sains. Les apports plus faibles des patients s'expliquaient par une consommation plus faible de légumes verts [7]. Dans une seconde étude, Sato et al. ont montré que les patients atteints de la MA présentaient des taux sanguins de phylloquinone plus faibles et que ces derniers étaient associés à l'état cognitif des patients tel qu'évalué par le *Mini Mental State test (MMSE)* [127].

Des travaux récents ont aussi évalué l'impact de la prise d'antagonistes de la vitamine K (AVK) sur la cognition. Dans une première étude réalisée dans un groupe de patients gériatriques, la prise d'AVK était associée à une plus grande prévalence de troubles cognitifs lorsqu'évalués par le MMSE [8]. Dans une seconde étude impliquant des sujets âgés cognitivement sains, la prise d'AVK était associée à une moins bonne mémoire visuelle et une moins bonne aisance verbale, sans toutefois avoir d'impact sur ces fonctions sur une période de 10 ans [10]. Ces études suggèrent que les AVKs pourraient affecter les capacités d'apprentissage et la mémoire chez les personnes âgées toutefois, d'autres études sont nécessaires avant de pouvoir statuer sur le sujet de manière définitive.

Chez les rongeurs, il a été montré qu'une déficience de la vitamine K induite par un traitement à la warfarine ou par l'absence de vitamine K dans la diète entraînait une diminution des capacités cognitives avec l'âge et une diminution du comportement exploratoire [1, 128]. Une autre étude a démontré qu'une faible diète en phylloquinone entraînait des pertes cognitives avec l'âge sans affecter les capacités motrices et exploratoires [5]. Ces études ont, entre autres, utilisé les tests du labyrinthe en croix surélevé et du champ ouvert pour évaluer le comportement exploratoire tandis que le test de la piscine de Morris et le test du labyrinthe à bras radial ont été utilisés pour l'évaluation de la cognition. Aussi, tant les études chez l'humain et que celles chez le rongeur suggèrent une implication de la vitamine K dans la cognition. Toutefois, les mécanismes par lesquels la vitamine K module la cognition reste à déterminer.

3.0 Tests de comportement

Chez les rongeurs, plusieurs tests sont utilisés pour évaluer la cognition et le comportement. Les principaux tests évaluant la cognition sont le test de la piscine de Morris (PM) [129] et le test de la reconnaissance d'objet (RO) [130]. Le test du labyrinthe en croix surélevé (LCS) est utilisé pour évaluer l'anxiété et le test du champ ouvert (CO) pour évaluer le comportement exploratoire [131].

3.1 Test de la piscine de Morris, version classique (PM classique)

Le test de la PM a souvent été utilisé pour étudier l'effet de l'âge, des lésions cérébrales et des médicaments sur la mémoire spatiale des rongeurs [129], et est associée à la région de l'hippocampe [132]. Ce test, développé par Richard Morris en 1984, vise à évaluer la capacité des rongeurs à trouver une plateforme submergée sous l'eau à partir de repères géométriques placés autour de la piscine [133].

La piscine, d'un diamètre de 150 cm, est remplie d'eau jusqu'à environ 1 cm au dessus d'une plateforme fixe. La piscine est divisée par un logiciel informatique en 4 quadrants égaux nommés Nord-Ouest (NO), Nord-Est (NE), Sud-Ouest (SO) et Sud-est (SE). La plateforme est placée au centre d'un des quadrants. Au dessus de chaque quadrant, autour de la piscine, y est associé un symbole géométrique i.e. cercle, triangle, carré, etc. [129]. Le parcours de l'animal est généralement analysé par une caméra placée au dessus de la piscine et reliée à un logiciel. Les test se déroule normalement sur une période variant entre 5 et 6 jours, les animaux disposant généralement de 2 ou 3 essais par jour pour localiser la plateforme. Les capacités d'apprentissage de l'animal sont habituellement déterminées par le temps ou latence (en

secondes), ou la distance (en centimètres) que met l'animal à trouver la plateforme dans le cadran cible

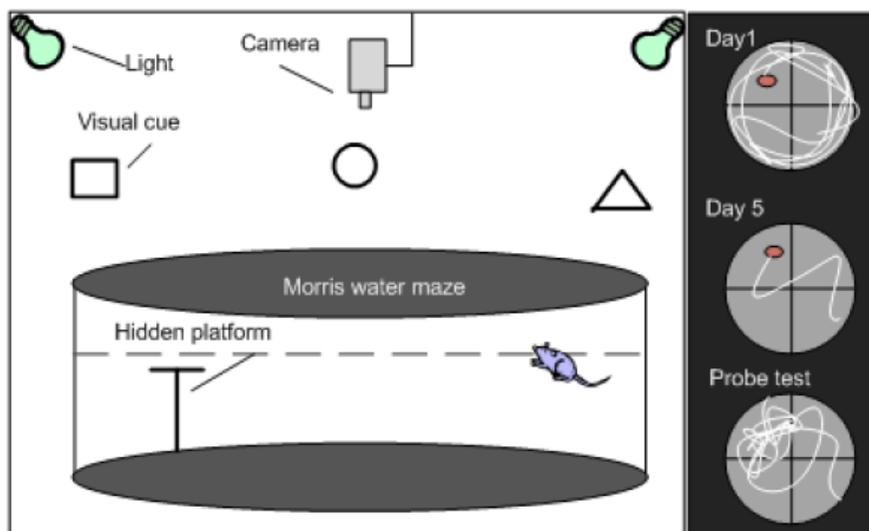


Figure 5. Représentation de la piscine de Morris et des parcours d'un rongeur à différents moments de l'expérience [129].

Le lendemain du dernier jour d'apprentissage, les animaux sont généralement soumis à une épreuve de rétention mnésique (*Probe test*) pour estimer l'exactitude de leur mémorisation de l'emplacement de la plateforme. Il consiste à retirer la plateforme et à évaluer le temps passé (en secondes) ou la distance (en centimètres) parcourue par l'animal dans le quadrant où était située la plateforme (c.f. figure 5 *Probe test*). Le nombre de fois que l'animal traverse l'emplacement où se trouvait la plateforme est aussi une variable souvent étudiée. Le test de la PM comprend aussi un test d'acuité visuelle (*Cue test*) lequel est effectué immédiatement après le test de rétention mnésique. Il consiste à placer l'animal dans la piscine alors que la plateforme est bien visible i.e. en abaissant le niveau de l'eau. Les variables associées au parcours de l'animal jusqu'à la plateforme (i.e. latence, distance, etc) sont analysées comme pour les volets apprentissage et rétention mnésique. Ce test sert à confirmer que l'animal a une bonne capacité visuelle pour utiliser les symboles géométriques comme repères [129, 132].

3.2 Test de la piscine de Morris, version modifiée avec plateforme mobile (PM modifié)

Une variante du test de la PM classique, le test de la PM modifié évalue la mémoire de travail (mémoire à court terme) du rongeur. Cette version du test est plus exigeante, puisque la plateforme change de quadrant à chaque jour et que les animaux n'ont que deux essais par jour pour localiser la plateforme et se remémorer sa localisation [132]. Les variables associées au parcours de l'animal jusqu'à la plateforme (i.e. latence, distance, etc) sont analysées comme pour la version classique.

3.3 Test du labyrinthe en croix surélevé (LCS)

L'appareil du LCS a été initialement décrit par Handley et Mithani comme étant en forme de croix, surélevé du sol par quatre pattes et composé de deux corridors avec parois, perpendiculaires à deux corridors sans parois (figure 6) [134]. Le test du LCS consiste à placer un animal au centre de l'appareil pendant 5 minutes et à évaluer le temps qu'il passe (en secondes) ou la distance qu'il parcourt (en centimètres) dans les corridors avec ou sans parois. Si l'animal est anxieux, il aura tendance à demeurer plus longtemps dans les corridors avec parois que ceux sans parois, et inversement pour un animal exempt d'anxiété [135, 136]. Le comportement de l'animal est analysé par une caméra placée au dessus de l'appareil et relié à un logiciel informatique.

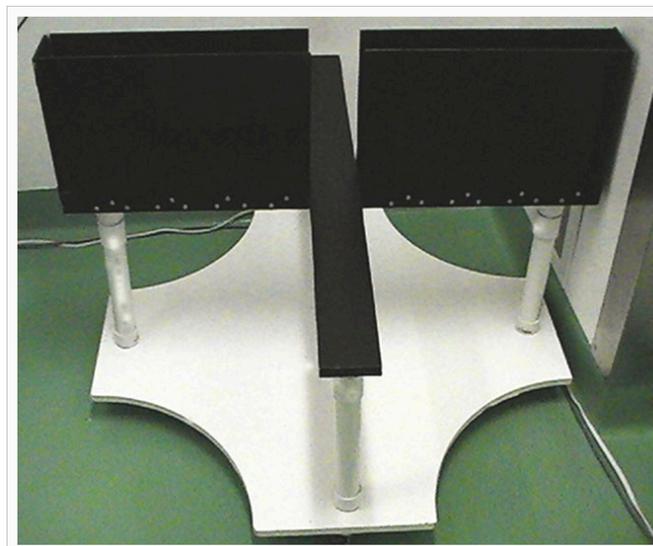


Figure 6. **Appareil du labyrinthe en croix surélevé [135].**

Le test du LCS a été beaucoup utilisé pour évaluer l'effet anxiolytique et anxiogène des produits pharmaceutiques, l'effet de différents agents stressants et investiguer les régions du cerveau et les mécanismes liés à la peur [135]. La peur a été associée dans le cerveau aux régions de l'amygdale, de l'hippocampe et du striatum [137, 138] des régions qui seront ainsi impliquées dans le test du LCS.

3.4 Test du Champ Ouvert (CO)

Le test du CO est utilisé pour évaluer le comportement exploratoire des rongeurs [139]. Principalement, le test consiste à déposer l'animal dans une boîte noire généralement d'une dimension 50 x 50 x 50 centimètres (figure 7) et de le laisser explorer. Le parcours de l'animal est documenté par une caméra placée au dessus de la boîte et reliée à un logiciel informatique qui divise la boîte en 3 zones carrés: la zone centrale, la zone intermédiaire ou en bordure et la zone en périphérie. Le logiciel évalue le temps (en secondes), la distance parcourue (en centimètres) et le nombre d'entrées dans chaque zone. Les rongeurs vont normalement passer plus de temps en périphérie qu'au centre de l'enceinte [140].



Figure 7. **Appareil du test du champ ouvert [141].**

3.5 Test de la reconnaissance d'objet (RO)

Développé par Ennaceur et Delacour, ce test évalue la mémoire visuelle principalement par les capacités exploratoires, sans composante de référence, contrairement au test de la piscine de Morris qui nécessite des repères [142]. Dans le test de la RO, le rat doit différencier un ancien stimulus d'un nouveau stimulus, ce qui rend ce modèle très semblable aux tests évaluant l'amnésie chez l'humain [143]. Dans ce test, les régions de l'hippocampe et du cortex perirhinal sont liées aux capacités d'apprentissage et la région parahippocampique dans le lobe temporal est liée à la reconnaissance de stimulation visuelle [130].

Le test de la RO comprend 3 étapes : la familiarisation avec l'environnement, l'exposition aux objets et la phase de test. Le test du CO sert à la familiarisation avec l'appareil pour éviter l'ambiguïté causale provoquée par la nouveauté de l'environnement. Le rat est ensuite exposé à 2 objets dans la boîte avec lesquels il se familiarise (c.f. figure 8). La phase 'test' du test consiste à mettre une troisième fois le rat dans la boîte et à remplacer un des deux objets par un nouvel objet. Contrairement à la figure 8, les 2 objets sont normalement posés de façon

symétrique et équidistante de deux coins opposés de la boîte [144]. La phase 'test' est parfois répétée à quelques reprises. Le temps passé avec les objets est analysé par une caméra reliée à un logiciel.

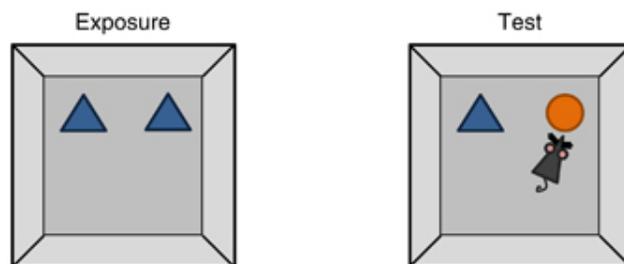


Figure 8. **Principe du test de la reconnaissance d'objet nouveau [145].**

En général, il est attendu que les rats passent davantage de temps avec l'objet nouveau (T_N) que l'objet familier (T_F). Trois index ont été développés pour analyser le comportement des rats : l'index de reconnaissance (IR) [130], l'index de discrimination (ID) et l'index d'habituation globale (IH) [142]. L'IR sert à déterminer si le rat reconnaît l'objet nouveau et consiste à faire le ratio entre le temps passé avec l'objet nouveau et le temps d'exploration totale des deux objets, soit $IR = [T_N / (T_N + T_F)]$. L>ID consiste à calculer la différence entre le temps passé avec l'objet nouveau et le temps passé avec l'objet familier sur le temps d'exploration total des deux objets, soit $ID = (T_N - T_F) / (T_N + T_F)$. L'IH sert à déterminer la capacité du rat à s'habituer au test et s'exprime par le ratio du temps passé avec les objets par rapport au temps total du test (T_{Total}) : $IH = (T_N + T_F) / T_{Total}$. Dans leur étude, Ennaceur et Delacour n'ont trouvé de corrélation ni entre cet index et la durée des essais ni entre cet index et le délai entre les essais [142]. Cela suggère que la durée des essais ou le délai entre chacun des essais n'affecte pas la capacité du rat à s'habituer au test.

4.0 Warfarine – modèle de déplétion de la vitamine K

La warfarine est l'anticoagulant oral le plus prescrit chez l'humain et son efficacité clinique est bien documentée [146]. Elle est utilisée en prévention primaire et secondaire de la thrombose veineuse et de son aggravation, l'embolie pulmonaire, ainsi que des complications thromboemboliques associées à la fibrillation auriculaire. L'action anticoagulante des AVK est mesurée par l'*International Normalized Ratio* (INR), lequel doit être maintenu à l'intérieur d'un intervalle étroit déterminé selon la condition clinique du patient. L'instabilité du traitement se définit par des valeurs d'INR se trouvant sous ou au-delà de l'intervalle cible, augmentant respectivement les risques de thromboses ou de complications hémorragiques [147].

Aussi, parce qu'elle bloque le cycle de la vitamine K, la warfarine a permis ces récentes années le développement d'un modèle animal expérimental permettant d'étudier le métabolisme de la vitamine dans différents tissus. La section suivante décrit ce modèle.

4.1 Carence vitaminique K induite par un traitement à la warfarine - description d'un modèle expérimental

En 1981, Price et Williamson [148] ont décrit un modèle permettant d'induire une carence de vitamine K dans les tissus extra hépatiques, tout en maintenant une coagulation normale. Ce modèle, lequel consiste à administrer concurremment de la warfarine et de la phylloquinone, prend avantage de la présence de la quinone NADPH réductase présente exclusivement dans le foie. Cette dernière étant insensible à l'action de la warfarine, elle permet le recyclage de la phylloquinone au niveau hépatique et assure ainsi l'activation des PDVK de la coagulation. Depuis sa publication, ce modèle expérimental a été appliqué à différentes souches de rats [76, 149] et de souris [75, 150, 151], et a notamment servi à mieux comprendre l'action anti-calcifiante de la *Matrix Gla Protein* dans les vaisseaux sanguins. Ce modèle a aussi permis

d'établir qu'une calcification découlant de doses massives de warfarine peut être renversée par l'administration subséquente de phylloquinone et de MK-4 [77], cette dernière ayant été trouvée plus efficace que la phylloquinone à contrer la calcification [152].

Plus récemment, le modèle de Price et Williamson a été adapté par l'équipe de Moreau et al. permettant de simplifier la logistique des manipulations. Dans le modèle original, les animaux recevaient des doses quotidiennes de warfarine et vitamine K. En faisant appel au rat Wistar, l'équipe de Moreau a proposé des modalités expérimentales moins lourdes i.e. doses de warfarine et phylloquinone 3X/sem plutôt que quotidiennement (décrites en détail à la section Méthodologie), tout en assurant la carence vitaminique K au plan systémique [153]. Aussi, dans une étude récente de notre laboratoire, une carence vitaminique K induite par l'administration concurrente de 14mg/kg/jr de warfarine et 85 mg/kg/jr de phylloquinone pendant huit semaines a été associée à de moins bonnes performances cognitives et à une altération du métabolisme des sphingolipides cérébraux chez le rat. Plus précisément, ce protocole entraînait beaucoup de perte d'animaux qui mourraient d'hémorragie. Sur les rats ayant survécu au protocole, le traitement a entraîné une perte de poids, une diminution de la consommation de nourriture, une diminution de 48-75% de la MK-4 dans le cerveau selon les régions, une diminution des capacités cognitives évaluées par le test de la PM version classique, une diminution du comportement exploratoire évaluée par le test du CO et aucune variation significative de l'anxiété évaluée par le test du LCS [1].

Objectifs

L'objectif primaire de la présente étude est de vérifier si les conséquences néfastes observées au niveau de la cognition dans une étude antérieure ayant fait appel au modèle de Price et Williamson [148, 153] peuvent être contrecarrées en rehaussant le statut vitaminique K des animaux.

Considérant une bonification du statut vitaminique K, les objectifs secondaires sont :

- 1) d'évaluer ses effets sur la mémoire (spatiale et de travail), l'anxiété, le comportement exploratoire, et la mobilité;
- 2) de dégager des mécanismes moléculaires i.e. activité des PDVK, signalisation cellulaire, intégrité neuronale, en lien avec la cognition.

Méthodologie

Cette expérience a été effectuée sur des rats qui ont reçu un traitement de 8 semaines à la warfarine et à la vitamine K. Pendant le traitement, le poids, le temps de coagulation, la consommation d'eau et de nourriture ont été évaluées. Au terme du traitement, les rats ont été soumis à différents tests de comportement pour évaluer la cognition, l'anxiété et le comportement exploratoire et les cerveaux des animaux ont été recueillis pour les différentes analyses biochimiques.

Animaux

Le comité d'éthique pour les animaux de l'Hôpital Sacré-Cœur de Montréal a approuvé toutes les procédures expérimentales selon les règles du Conseil canadien de protection des animaux. Les rats étaient logés dans une pièce d'une température de 22°C et soumise à l'alternance de 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Tout au long de l'étude, les animaux ont été maintenus en cage individuelle afin de monitorer la consommation d'eau de chaque rat et ainsi ajuster son traitement à la warfarine (cf. ci-après). Tous les rats recevaient une diète contenant 750 µg phylloquinone/kg de diète soit les quantités standard contenues dans les diètes commerciales. Un total de 13 rats mâles Wistar âgés de 2 mois (Charles Rivers Canada, St-Constant, QC) ont été répartis en 2 groupes : le groupe contrôle (n=6) et le groupe traité à la warfarine et à la vitamine K (WVK) (n=7). Les rats WVK ont d'abord reçu, pendant deux semaines, 150 mg/kg/jr de phylloquinone par voie sous-cutanée (sc) afin de saturer le tissu hépatique. Ensuite, et pendant 8 semaines, ils ont reçu l'équivalent de 14 mg/kg/jr de warfarine dans l'eau de boisson et 120 mg/kg/jr de phylloquinone par injection sc. La phylloquinone était injectée dans le dos des animaux, à raison de trois fois par semaine. Les doses de warfarine étaient ajustées en fonction des quantités d'eau consommée. Les rats du groupe contrôle consommait de l'eau normale et étaient soumis au même protocole d'injections que les

rats du groupe expérimental mais recevaient des injections de saline. Le poids des animaux était noté 3 fois par semaine et la consommation de nourriture, une fois par semaine. La coagulation sanguine i.e. INR était vérifiée chaque semaine à l'aide d'un appareil CoaguCheck XS Sytem (Roche Diagnostics, Canada).

Tests de comportements

Après les 8 semaines de traitement, les rats ont été testés pour leur cognition par les tests suivants : le test de la piscine de Morris (PM) [133], une version modifiée du test de la PM [129] et le test de la reconnaissance d'objet (RO) [142]. Ils ont aussi été testés pour l'anxiété le test du labyrinthe en croix surélevé (LCS) [134] et leur comportement exploratoire par le test du champ ouvert (CO) [139]. Tous les tests de comportement ont été filmés par une caméra Panasonic placée au dessus des enceintes des tests et les données ont été analysées avec le logiciel SMART v3.0 (Panlab/Harvard Apparatus, Barcelone, Espagne).

Version classique du test de la PM

La piscine, d'un diamètre de 150 cm, était remplie d'eau (19°C) jusqu'à 2 cm au-dessus d'une plateforme de 10 cm² placée au centre d'un des quadrants. Des symboles géométriques i.e. cercle, triangle, carré et losange étaient posées sur les quatre murs entourant la piscine et servaient de repères visuels pour les animaux. Le test s'est déroulé sur une période de 5 jours et les rats disposaient de 3 essais de 90 secondes/jour pour localiser la plateforme. Dans le cas où un rat ne trouvait pas la plateforme après 90 secondes, il était manuellement déposé sur la plateforme pendant 15 secondes pour lui permettre de s'orienter.

Au 6^e jour du test, la plateforme a été retirée et la rétention mnésique (*Probe test*) a été évaluée pour chaque animal, les rats disposant de 2 essais de 30 secondes pour ce test. Après le test de

réention mnésique, l'eau de la piscine était abaissée et la plateforme ré-introduite dans le cadran cible pour le test de l'acuité visuelle, chaque rat disposant de 2 essais de 30 secondes pour ce test.

La capacité d'apprentissage des animaux a été établie en considérant la distance parcourue pour atteindre la plateforme (cm) de chaque essai, de chacun des jours. La distance a été utilisée plutôt que la latence i.e. temps en seconde pour atteindre la plateforme en raison du fait que la vitesse de nage (cm/sec) était différente dans les deux groupes. Les capacités d'apprentissage ont aussi considéré la distance moyenne de la plateforme (cm) et la distance parcourue en bordure de la piscine (pourcentage de la distance totale). La réention mnésique a été déterminée en calculant la distance parcourue dans le cadran cible (cm) et le nombre de croisement de la plateforme. L'acuité visuelle a été déterminée selon la capacité du rat à trouver la plateforme au moins une fois dans les deux essais et la distance parcourue à la plateforme (cm) a été calculée.

Version modifiée du test de la PM

Une semaine après la passation de la version classique du test de la PM, les rats étaient réévalués dans les mêmes conditions i.e. piscine, plateforme, repères géométriques dans la forme modifiée du test. Spécifiquement, les rats disposaient de 2 essais de 90 secondes par jour pour trouver la plateforme, laquelle se trouvait dans un quadrant différent à chaque jour. Les mêmes données que pour la piscine de Morris ont été analysées: la vitesse de nage (cm/sec), la distance pour atteindre la plateforme (cm), la distance moyenne de la plateforme (cm) et la distance parcourue en bordure de la piscine (pourcentage de la distance totale).

Labyrinthe en croix surélevé

L'appareil du LCS était composé de 2 couloirs fermés par des parois de 13,5 cm de haut et de 2 couloirs ouvert sans parois, le tout surélevé à 61 cm du sol. Les couloirs sans parois et ceux avec parois mesuraient tous deux 98 cm de long et 9,5 cm de large. Le test consistait à placer le rat au centre de l'appareil et de le laisser explorer pendant 5 minutes. La distance parcourue dans les couloirs sans parois et dans ceux avec parois étaient enregistrés (pourcentage de la distance totale), ainsi que la vitesse de marche (pouce/sec) et la distance totale parcourue (pouce).

Test du Champ ouvert

Le test du CO consistait à placer le rat dans un des coins d'une boîte noire en bois (60 x 50 x 50 cm) et à le laisser explorer pendant 5 minutes. La boîte était divisée en 3 zones : zone périphérique, zone de bordure et zone centrale. Le temps de mobilité (pourcentage de temps total), la latence jusqu'à la première entrée dans la zone centrale (sec), la distance parcourue dans la zone centrale (pouce) et la vitesse de marche (pouce/sec) ont été analysés.

Test de la reconnaissance d'objet

Le test de la RO a été administré en utilisant la même boîte noire que celle utilisée pour le test du CO. Pour ce test, deux objets étaient placés à distance égale de deux coins opposés de la boîte tel que décrit par Ménard et al. [154]. Au début de chaque essai, le rat était déposé dans un coin de la boîte entre les deux objets. Le premier jour, le rat disposait d'un premier essai de 5 minutes pour se familiariser avec les deux objets après quoi il était retourné dans sa cage pendant une heure. Il était ensuite retourné dans l'enceinte pour un second essai de 3 minutes où l'un des deux objets avait été changé par un objet nouveau, l'objet familier n'ayant pas été

bougé. Le lendemain, le rat disposait de deux essais de trois minutes intercalés d'une pause de cinq minutes. À chaque essai le nouvel objet était changé. La vitesse de marche (pouce/sec), ainsi que le temps passé avec l'objet nouveau (T_N) (sec), l'objet familier (T_F) (sec) et le temps total du test (T_{Total}) (sec) était enregistré pour calculer les index de discrimination $[(T_N - T_F) / (T_N + T_F)]$, de reconnaissance $[T_N / (T_N + T_F)]$ et d'habituation $[(T_N + T_F) / T_{Total}]$.

Immunobuvardage

Une fois les tests de comportement effectués, les rats ont été anesthésiés par injection intra péritonéale d'un mélange de Kétamine/Xylazine (100/10 mg/kg) puis sacrifiés à la guillotine. Les cerveaux ont été disséqués, les régions d'intérêt plongées dans l'azote liquide (mésencéphale, cervelet, hippocampe, cortex frontal et striatum), puis conservées à -80°C . La région cérébrale de l'hippocampe a été mélangée à un tampon de lyse [(50mM Tris, 150mM NaCl, 4,5mM MgCl_2 à pH 7,6 ; adapté de Prieto et al. [92] à un ratio 1ml tampon de lyse/50 μg tissu. Le tampon de lyse contenait aussi des inhibiteurs de protéases (EDTA 0,5 M, PMSF 0,5 M, Pepstatin 0,7 mg/mL, Leupeptin 2 mg/mL, Aprotinin 10mg/mL and Benzamidine 0,5M) et des inhibiteurs de phosphatases (β -glycérophosphate 20 mM, NaF 20 mM, OrtoVanadate 1 mM). Le mélange a ensuite été soniqué à 1.5 V pendant 30 secondes, sur la glace, puis laissé reposer 30 minutes. Les échantillons ont ensuite été centrifugés à 12 000 rpm, 10 min à 4°C , puis le surnageant récupéré et le culot jeté. La concentration en protéines des échantillons a été déterminée par la méthode de Lowry.

Pour effectuer l'immunobuvardage, 50 μg de protéines ont été mélangés à une solution Laemili/DTT, chauffée à 100°C pendant 3 min, et chargée sur un gel d'acrylamide. Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane PVDF (Millipore) à 100V, pendant une heure à 4°C . Puis, la membrane a été incubée dans une solution de blocage (lait écrémé 5% TBST) pendant une heure à température pièce (TP) et incubée avec le 1^{er} anticorps (Ac) toute la nuit à 4°C . La membrane a ensuite été incubée avec le 2^e Ac pendant une heure à TP et

finalement révélée par chimiluminescence (General HealthCare). Les anticorps primaires utilisés étaient contre Gas6 [sc-1935, Santa Cruz (SC)], Protéine S (sc-25836, SC), Gla (3570 SC Kiusi Diagnostic), Caspase 3 [9662 Cell Signaling (CS)], Caspase 8p18 (sc-7890 SC), Caspase 12 (3282-100 Biovision), Erk 1/2 (sc-94 SC), pErk 1/2 (9106S CS), Akt (9272 CS), pAkt (4060S CS), GFAP (sc-2020 SC), BDNF (Millipore AB1534), CD11b/c (CL042AP Cedarlane) et β -actine (sc-47778 SC). Le deuxième anticorps était soit anti-souris (sc-2005 SC), anti-lapin (7074 CS) ou anti-chèvre (sc-2020 SC) selon l'origine animale du premier anticorps. Les résultats ont été analysés par le logiciel ImageJ version 1.51f, Wayne Rasband, National Institutes of Health, États-Unis.

Dosage des vitamines K

La phylloquinone et la MK-4 ont été quantifiées par HPLC en phase inverse dans l'hippocampe, le cortex frontal, le cervelet et le mésencéphale tel que décrit par Carrié et al. [13] Les tissus étaient séchés et moulus dans du Na_2SO_4 . Les échantillons étaient ensuite extraits 1h dans 10mL d'acétone contenant le standard interne 2',3'-dihydrophylloquinone [K1(25)] à 2ng/50 μL . Les extraits étaient ensuite centrifugés à 500 g pour 10 min à 4°C, séchés à 45°C sous l'azote, mélangés à 6mL d'hexane et 2 mL d'eau pour 3 min. Après centrifugation, la phase lipidique présente dans l'hexane était séchée sous l'azote et redissoute dans 2 mL d'hexane et ensuite purifiée sur colonne en gel de silice. Enfin, l'échantillon de vitamine K fut quantifié en passant au travers d'une colonne C18 en phase inverse dans le HPLC avec détecteur à fluorescence.

Analyse statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel Graphpad Prism (version 6). Le poids, la consommation de nourriture et d'eau, les tests de la piscine de Morris version

classique et modifiée ont été analysés avec le test Anova à 2 facteurs pour mesures répétées, où le temps était le facteur répété et le traitement à la warfarine le facteur principal suivi du test post-hoc de Bonferoni. Les index de la RO et les ratios MK-4/vitamine K totale ont été analysés par le test ANOVA suivi du test post-hoc de Bonferoni. Les mesures d'INR, les vitesses de marche et de nage, les tests de rétention mnésique et d'acuité visuelle, les distance parcourues dans le test du LCS, la latence, la distance parcourue et la mobilité dans le test du CO, la concentration de vitamines dans les différentes régions du cerveau ainsi que les mesures relatives aux protéines (expression et activation) par immunobuvardage ont été analysés par le test de T en fonction du groupe traité à la warfarine. Les corrélations entre capacités d'apprentissage et concentration de vitamine K dans le cerveau, et celle entre la mobilité et la concentration de vitamine K dans le cervelet ont été analysées par le test de corrélation de Pearson. Les résultats exprimés sont les moyennes et leur SEM. Les tests étaient considérés significatifs si $p < 0,05$.

Résultats

Effets du traitement sur le poids, la consommation d'eau et de nourriture et la coagulation sanguine.

Comme l'indique la figure 9A, tous les rats ont pris du poids au cours de l'étude ($p < 0,001$) et la différence entre les groupes n'était pas statistiquement significative ($p = 0,552$). Tel qu'illustré à la figure 9B, les temps de coagulation étaient statistiquement supérieurs dans le groupe traité à la warfarine et phylloquinone (test de T sur la moyenne globale : $p = 0,003$). Les consommations de nourriture ($p = 0,756$) et d'eau ($p = 0,881$) n'étaient pas statistiquement différentes entre les groupes (figures 9C et 9D).

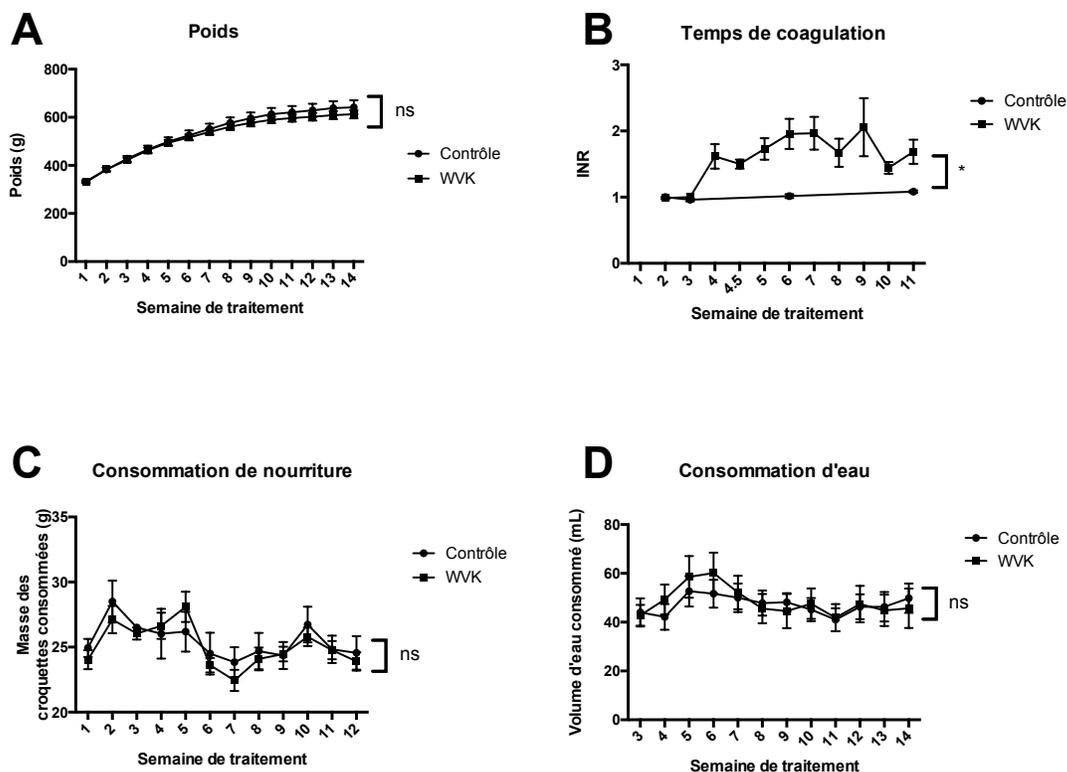


Figure 9. **Effets du traitement sur le poids, les temps de coagulation et la consommation d'eau et de nourriture.** **A.** Le poids n'est pas statistiquement différent entre les groupes ($p=0,552$) **B.** Le temps de coagulation (INR) est statistiquement supérieur dans le groupe WVK (test de T sur la moyenne globale : $p=0,003$). **C.** La consommation de nourriture n'est pas statistiquement différente entre les groupes ($p=0,756$). **D.** La consommation d'eau n'est pas statistiquement différente entre les groupes ($p=0,8806$).
Contrôle : $n=6$; WVK : $n=7$.

Effets du traitement sur la cognition, l'anxiété et le comportement exploratoire.

Test de la piscine de Morris (PM) version classique

La mémoire spatiale a été évaluée à l'aide du test de la PM, version classique. Comme la vitesse de nage était statistiquement différente entre les groupes aux jours 3 et 4 (respectivement, $p=0,024$ et $p=0,019$, Annexe 1, figure 24) la distance pour atteindre la plateforme a été utilisée comme mesure d'apprentissage (plutôt que la latence). La figure 10A montre qu'au fil des jours, la distance pour atteindre la plateforme a diminué dans les deux groupes ($p<0,001$), indiquant que tous les rats ont appris où se situait la plateforme. Par contre, les rats WVK ont parcouru des distances significativement inférieures à celles des rats contrôles ($p=0,039$; $p<0,05$ jour 3), ce qui indique de meilleure capacité d'apprentissage. La figure 10B montre aussi que la distance des rats par rapport à la plateforme, diminuait avec le temps ($p<0,001$), mais la distance moyenne de la plateforme des rats WVK était significativement plus petite ($p=0,033$; $p<0,05$ jour 4), ce qui indique qu'ils nageaient davantage à proximité de la plateforme que les rats contrôles, surtout au jour 4. Par ailleurs, la figure 10C montre qu'au fil des jours, les rats parcouraient de moins en moins de distance en bordure de la piscine ($p<0,001$), ce qui suggère une stratégie d'orientation plus efficace par rapport à la plateforme. De plus, les rats du groupe WVK avaient tendance à parcourir une distance plus petite en bordure de la piscine que les rats contrôles au jour 3 (test de T, $p=0,081$), suggérant une meilleure capacité à utiliser les repères visuels pour trouver la plateforme.

La rétention mnésique des animaux a été testée au jour 6. Comme le montre la figure 10 D et E respectivement, la distance parcourue dans ce quadrant ($p=0,563$) et le nombre de croisements de la plateforme ($p=0,685$) n'étaient pas significativement différents entre les groupes. Ceci confirme que les deux groupes ont appris à localiser la plateforme. Finalement, le test d'acuité visuelle n'a dégagé aucune anomalie, tous les rats ayant réussi à trouver la plateforme en moins de 30 secondes à chaque essai. Toutefois, la distance pour atteindre la plateforme était significativement inférieure pour les rats WVK que pour les rats du groupe contrôle ($p=0,011$) (figure 10F).

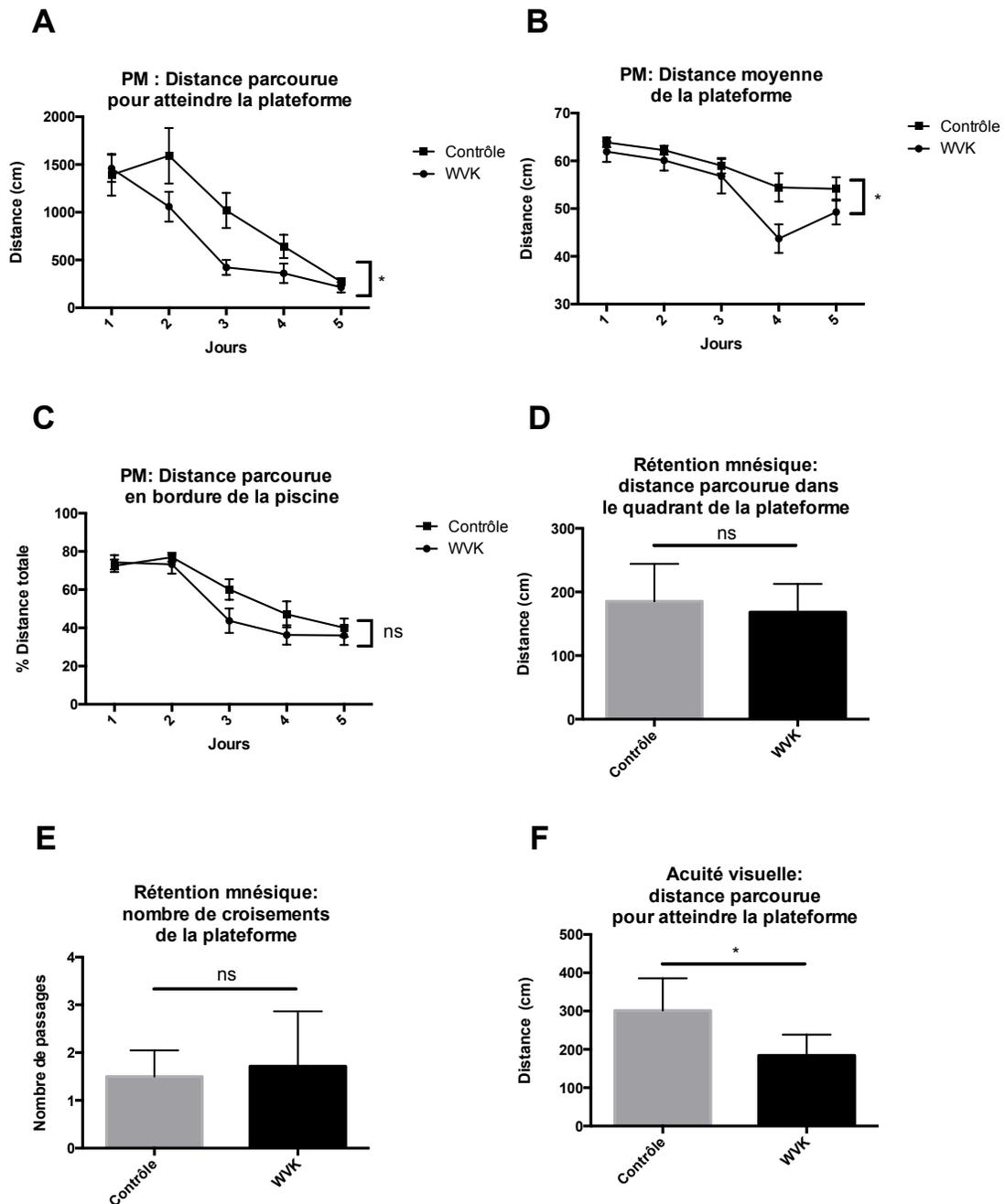


Figure 10. **Test de la piscine de Morris, version classique.** **A** PM : La distance parcourue pour atteindre la plateforme est statistiquement inférieure pour le groupe WVK (ANOVA, $p=0,033$; $p<0,05$ jour 3). **B** PM : La distance moyenne de la plateforme est statistiquement inférieure pour le groupe WVK (ANOVA, $p=0,033$; $p<0,05$ jour 4) **C** PM : La distance parcourue en bordure de la piscine n'est pas statistiquement différente entre les groupes ($p=0,840$). **D** La rétention mnésique - distance parcourue dans le quadrant de la plateforme - n'est pas statistiquement différente entre les groupes ($p=0,563$). **E** La rétention mnésique - nombre de croisements de la plateforme - n'est pas statistiquement différente entre les groupes ($p=0,685$). **F** Dans le test de l'acuité visuelle, la distance parcourue pour atteindre la plateforme est statistiquement inférieure pour le groupe WVK ($p=0,011$). Contrôle : $n=6$; WVK : $n=7$

Test de la piscine de Morris (PM) version modifiée

La mémoire de travail a été évaluée à l'aide la version modifiée du test de la PM. Comme la vitesse de nage des rats des deux groupes variait avec le temps ($p=0,021$, Annexe 1 figure 25), la distance pour atteindre la plateforme a été utilisée comme variable dépendante. La figure 11 (A et B) montre des distances significativement inférieures pour atteindre la plateforme entre les 2 essais pour le groupe WVK ($p=0,003$), suggérant une meilleure capacité de mémorisation. La figure 11C montre que la distance moyenne de la plateforme était significativement plus petite pour les rats WVK à l'essai 1 ($p=0,004$), ce qui indique qu'ils nageaient davantage à proximité de la plateforme que les rats contrôles. La figure 11D montre que les rats WVK parcouraient une distance plus petite que les rats contrôles ($p<0,001$) en bordure de la piscine, ce qui indique une stratégie d'orientation plus efficace par rapport à la plateforme. Ainsi, la version modifiée de la piscine de Morris corrobore ce qui a été constaté avec la version classique soit que les rats WVK avaient une meilleure capacité d'apprentissage que les rats contrôles.

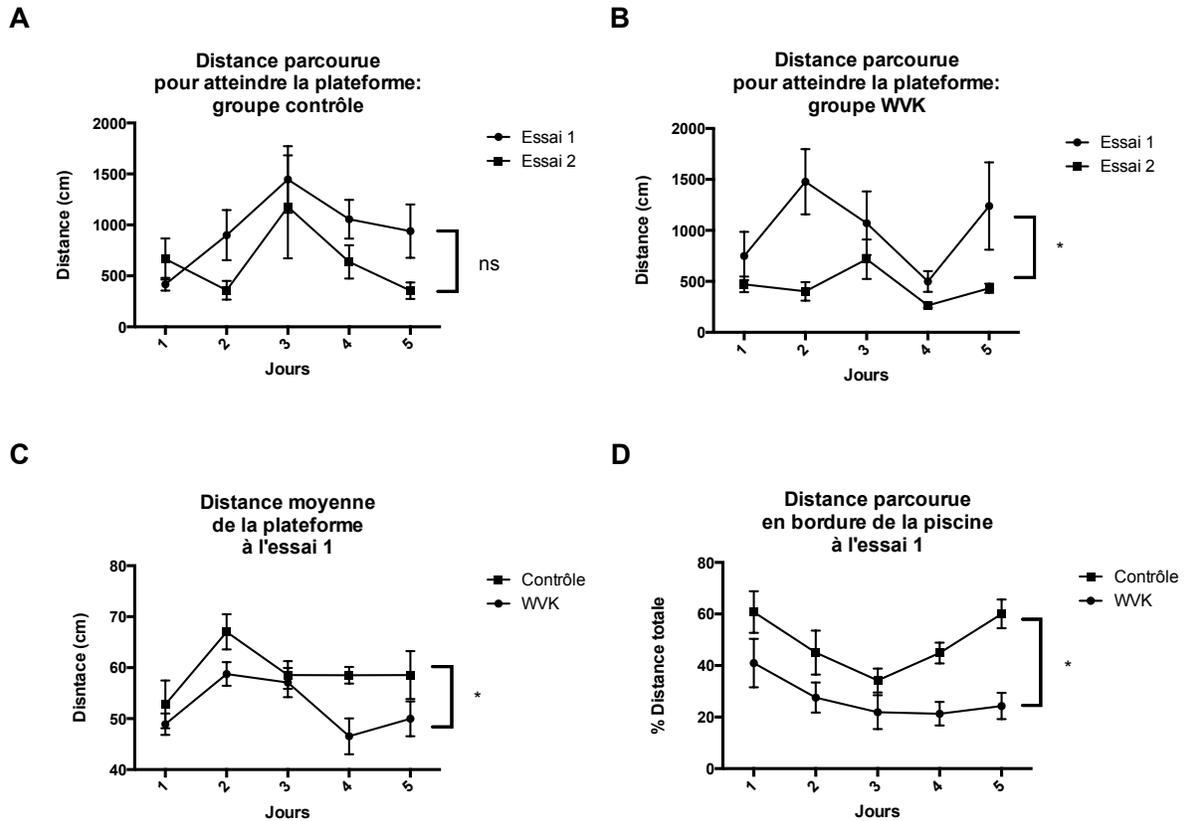


Figure 11. **Test de la piscine de Morris, version modifiée.** **A** La distance parcourue pour atteindre la plateforme par le groupe contrôle n'est pas significativement différente entre les essais ($p=0,051$). **B** La distance parcourue pour atteindre la plateforme par le groupe WVK est statiquement inférieure au deuxième essai ($p<0,001$; $p<0,05$ jour 2). **C** La distance moyenne de la plateforme à l'essai 1 est significativement inférieure pour le groupe WVK ($p=0,004$). **D** La distance parcourue en bordure de la piscine à l'essai 1 est significativement inférieure pour le groupe WVK ($p<0,001$; $p<0,05$ jour 5). Contrôle : $n=6$; WVK : $n=7$.

Test du labyrinthe en croix surélevé (LCS)

L'anxiété a été évaluée par le test LCS. Comme la vitesse de marche variait significativement entre les groupes ($p=0,005$, Annexe 1 figure 26), la distance parcourue a été utilisée comme variable dépendante. Comme le montre la figure 12, les rats WVK parcouraient une distance moins grande dans les couloirs sans parois ($p=0,016$), une distance plus grande dans les couloirs avec parois ($p=0,014$) et il n'y avait pas de différence significative entre les groupes

pour la distance parcourue dans la zone centrale. Ainsi, ces résultats indiquent que les rats WVK étaient plus anxieux et préféraient demeurer dans un environnement fermé.

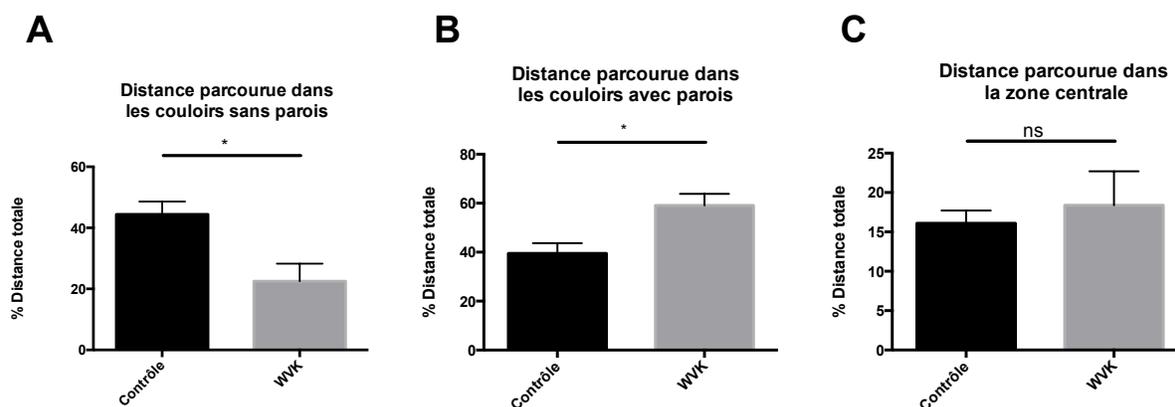


Figure 12. **Test du labyrinthe en croix surélevé.** Distance parcourue dans (A) les couloirs sans parois, (B) les couloirs avec parois et (C) la zone centrale. Le groupe WVK parcourt une distance significativement inférieure dans les couloirs sans parois ($p=0,016$), supérieure dans les couloirs avec parois ($p=0,014$), mais pas significativement différente dans la zone centrale ($p=0,297$). Contrôle : $n=5$; WVK : $n=6$.

Test du champ ouvert (CO)

Le comportement exploratoire et l'activité locomotrice ont été évalués à l'aide du test du CO. La latence jusqu'à la première entrée dans la zone centrale ($p=0,413$) et la distance parcourue dans la zone centrale ($p=0,418$), marquant le comportement exploratoire, ainsi que la distance totale parcourue ($p=0,289$) et la mobilité ($p=0,122$), marquant l'activité locomotrice, n'ont pas varié significativement entre les groupes (figure 13).

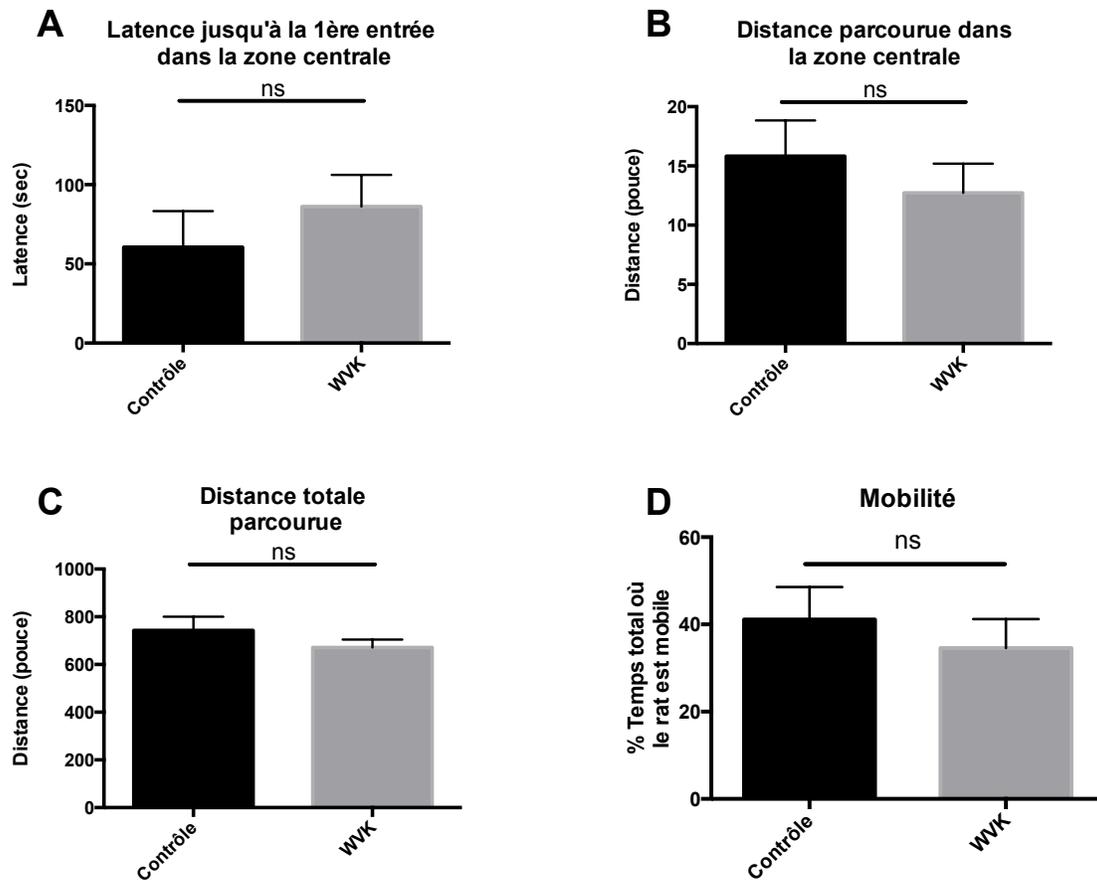


Figure 13. **Test du champ ouvert.** **A** Latence jusqu'à la 1^{ère} entrée dans la zone centrale ($p=0,413$). **B** Distance parcourue dans la zone centrale ($p=0,438$). **C** Distance totale parcourue ($p=0,289$). **D** Mobilité ($p=0,122$). Il n'y a pas de différence significative entre les groupes. Contrôle : $n=6$; WVK : $n=7$.

Test de la reconnaissance d'objet (RO)

La mémoire de reconnaissance a été évaluée par le test de la RO. La figure 14 montre l'index de reconnaissance de l'objet familier et de l'objet nouveau. Il n'y a pas de différence significative entre les groupes ($p>0,999$). Ainsi les résultats suggèrent que les rats WVK ont maintenu des capacités similaires d'apprentissage aux rats contrôles.

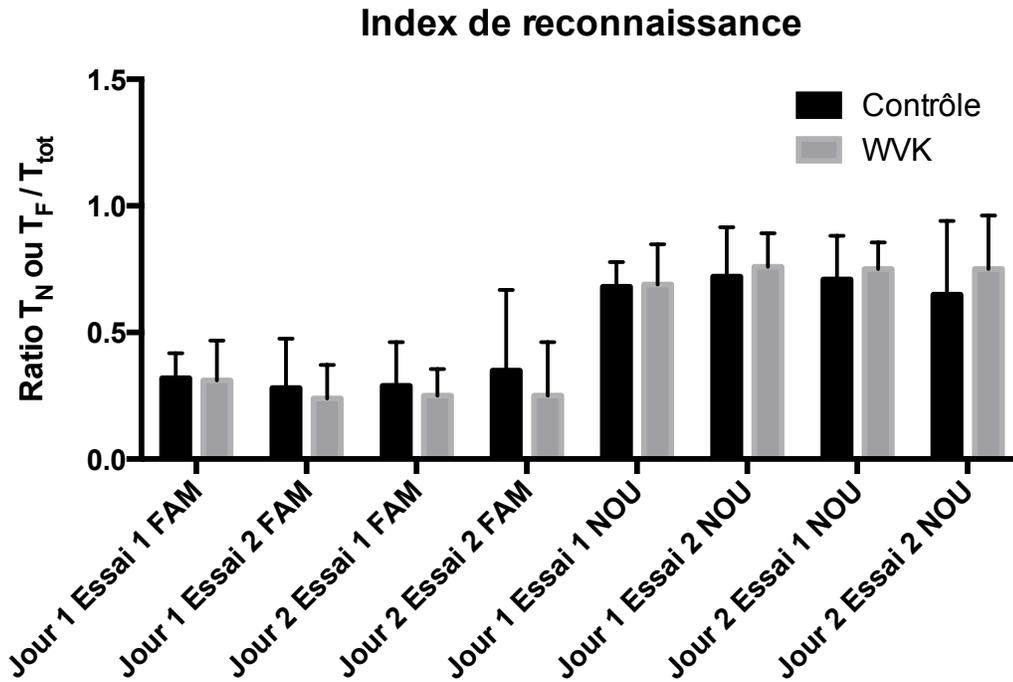


Figure 14. **Index de reconnaissance.** Il n'y a pas de différence statistiquement significative entre les groupes ($p > 0,999$). FAM : objet familier; NOU : objet nouveau. Contrôle : $n=6$; WVK : $n=7$.

L'index de discrimination (ID) a aussi été évalué. La figure 15 montre qu'il n'y a pas de différence statistiquement significative entre les groupes, pour chaque essai ($p=0,669$). Par contre, les rats passent plus de temps avec l'objet nouveau comme le montre la valeur positive de l'ID pour chaque essai, ce qui suggère une capacité des rats des deux groupes à discriminer l'objet nouveau de l'objet familier.

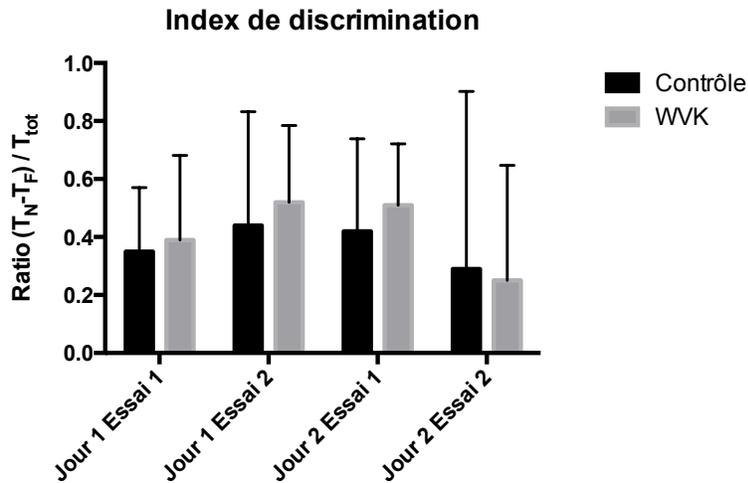


Figure 15. **Index de discrimination.** Il n'y a pas de différence statistiquement significative entre les groupes ($p=0,669$). Par contre les rats passent plus de temps avec l'objet nouveau comme le montre la valeur positive de l'ID pour chacun des essais. Contrôle : $n=6$; WVK : $n=7$.

Finalement, l'évaluation de l'index d'habituation devait diminuer avec les essais, comme les rats s'habituent au stimulus, d'un essai à l'autre. La figure 16 montre qu'il n'y a pas de différence des index d'habituation entre les groupes ($p=0,284$), ce qui indique qu'il n'y a pas de désensibilisation au stimulus plus grande d'un groupe à l'autre. Il n'y avait pas de variation significative avec le temps non plus ($p=0,123$), ce qui indique que les rats demeuraient stimulés par l'expérience à chaque essai.

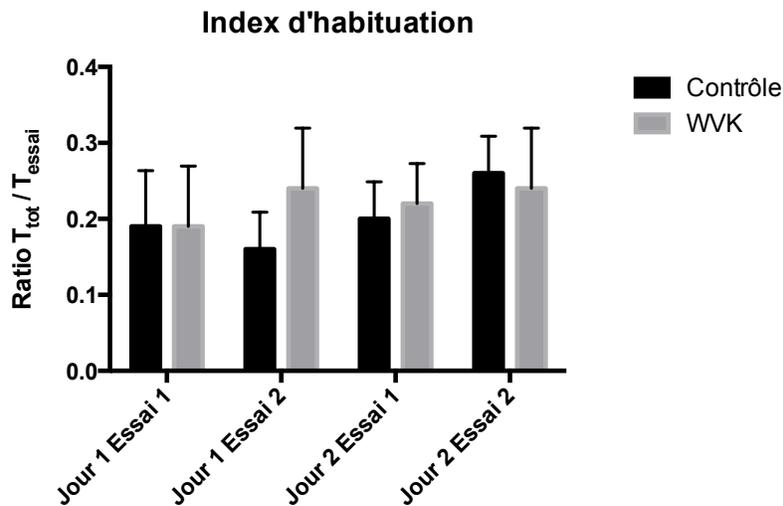


Figure 16. **Index d'habituatation.** Il n'y a pas de différence statistiquement significative entre les groupes ($p=0,284$), ni avec le temps ($p=0,123$). Contrôle : $n=6$; WVK : $n=7$.

Ainsi, les deux groupes ont, à chaque essai, passé une durée de temps similaire avec les deux objets ensemble (IH), avec chaque objet à chaque essai (IR), mais avaient une préférence pour l'objet nouveau (ID). Collectivement, ces résultats montrent que les rats WVK avaient une mémoire de reconnaissance visuelle similaire à celle des rats du groupe contrôle.

Analyses Biochimiques

La vitamine K a été quantifiée dans le cervelet, le mésencéphale, l'hippocampe, le cortex frontal et le striatum. L'expression et l'activation des PDVKs, l'activation des voies de signalisation apoptotiques et de pro-survie, ainsi que des marqueurs neuronaux ont aussi été évaluées dans l'hippocampe.

Vitamine K dans les régions clés du cerveau

La phylloquinone et la MK-4 ont été quantifiées dans le cervelet, le mésencéphale, l'hippocampe, le cortex frontal et le striatum. En comparaison avec le groupe contrôle, la figure 17 indique dans le cerveau des rats WVK, les concentrations de MK-4 étaient statistiquement inférieures dans le cervelet ($p=0,002$), le mésencéphale ($p<0,001$), l'hippocampe ($p=0,001$), le cortex frontal ($p=0,001$) et le striatum ($p=0,039$) alors que les concentrations de phylloquinone étaient statistiquement supérieures dans ces mêmes régions [cervelet ($p=0,021$); mésencéphale ($p<0,001$); hippocampe ($p<0,001$); cortex frontal ($p<0,001$); striatum ($p=0,006$)]. Le groupe WVK avaient une concentration de vitamine K totale statistiquement supérieure dans l'hippocampe ($p=0,016$) et le cortex frontal ($p<0,001$), mais la concentration de vitamine K totale n'était pas statistiquement différente entre les groupes dans le striatum ($p=0,079$), le cervelet ($p=0,559$) et le mésencéphale ($p=0,369$). La figure 17 montre aussi que le principal vitamère dans chaque région du groupe contrôle est la MK-4. La vitamine K totale du groupe contrôle était distribuée de façon différentielle entre les régions, en ordre décroissant : mésencéphale, cortex frontal, hippocampe, striatum et cervelet et cet ordre est altéré dans les régions du groupe WVK.

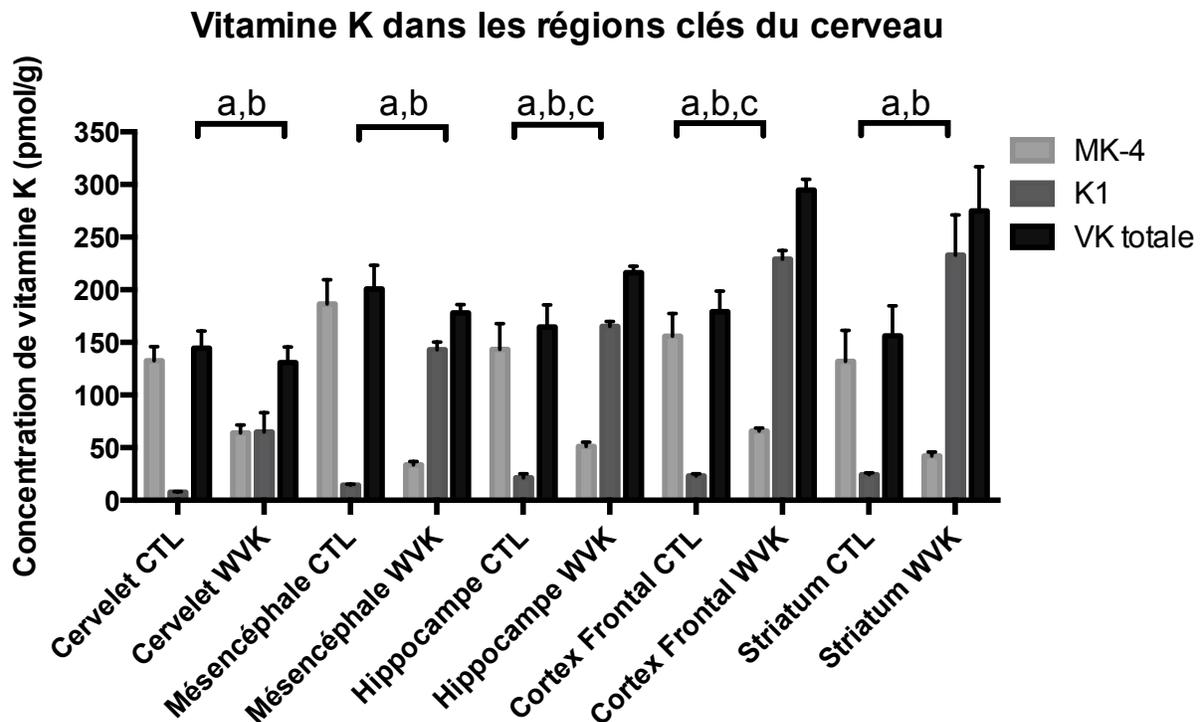


Figure 17. **Vitamine K dans les régions clés du cerveau.** Dans le groupe WVK, la concentration de MK-4 est statistiquement inférieure dans toutes les régions: cervelet ($p=0,002$), mésencéphale ($p<0,001$), hippocampe ($p=0,001$), cortex frontal ($p=0,001$) et striatum ($p=0,039$); la concentration de phylloquinone est statistiquement supérieure dans toutes les régions : cervelet ($p=0,021$); mésencéphale ($p<0,001$); hippocampe ($p<0,001$); cortex frontal ($p<0,001$); striatum ($p=0,006$); la concentration de vitamine K totale est statistiquement supérieure dans l'hippocampe ($p=0,016$) et le cortex frontal ($p<0,001$), mais il n'y a pas de différence significative entre les groupes pour la concentration de vitamine K totale dans le cervelet ($p=0,559$), le mésencéphale ($p=0,369$) et le striatum ($p=0,079$). a : différence significative pour la MK-4; b : différence significative pour la phylloquinone; c : différence significative pour la vitamine K totale; CTL : contrôle. N=3-6.

Le ratio MK-4/VK total a été analysé. La figure 18 montre qu'il était de l'ordre de 87% dans le cerveau chez les rats contrôles, et entre 16 et 53% dans celui des rats WVK selon les régions. Il y a une différence significative entre les groupes pour chaque région ($p<0,001$)

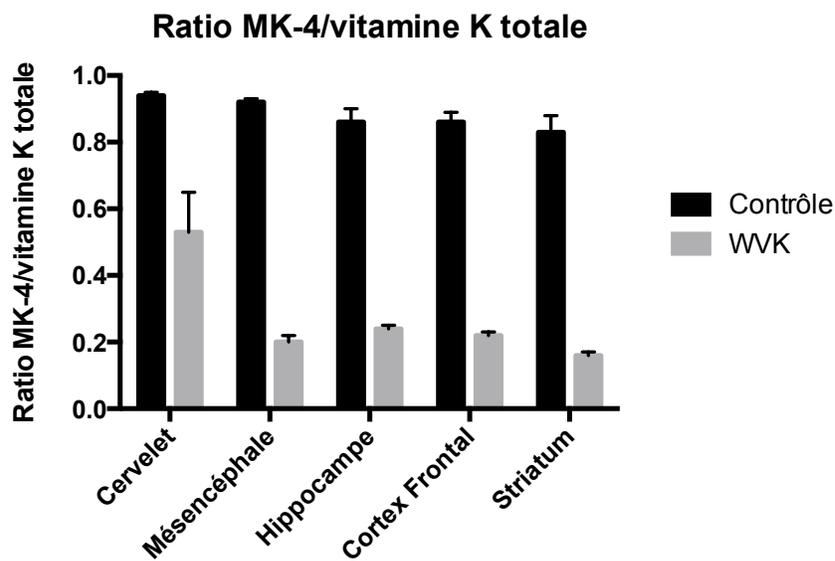


Figure 18. Ratio de la MK-4 par rapport à la vitamine K totale dans chaque région du cerveau. Il y a une différence significative entre les groupes pour chaque région ($p < 0,001$). N= 3-6

Corrélation entre vitamine K cérébrale et la cognition

Une corrélation entre le statut vitaminique K du cerveau (régions étudiées sauf le cervelet) et la cognition telle qu'évaluée par les valeurs de distance au test de PM classique au cours des trois premiers jours a été établie pour l'ensemble des animaux. Comme le montre la figure 19, une corrélation linéaire positive entre ces variables a été observée ($r^2 = 0,675$ et $p = 0,001$), suggérant un lien entre le statut vitaminique K cérébral et la cognition.

Corrélation entre la cognition et la concentration de vitamine K dans le cerveau

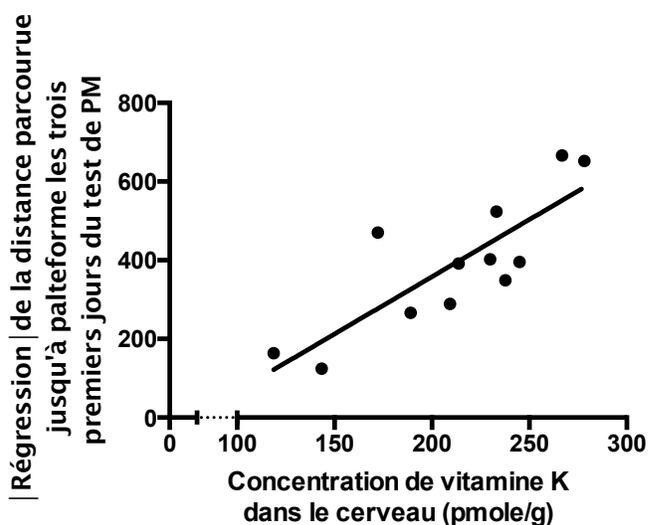


Figure 19. **Corrélation entre la cognition et la concentration de vitamine K dans le cerveau.** Il y a une corrélation linéaire positive significative entre les deux facteurs ($r^2= 0,675$ et $p= 0,001$); $n=12$.

Immunobuvardage

L'expression et l'activation des PDVKs, l'activation des voies de signalisation apoptotiques et de survie cellulaire, ainsi que l'expression de certains marqueurs neuronaux ont été évaluées afin de mieux saisir les mécanismes d'action de la vitamine K dans l'hippocampe, région particulièrement impliquée dans la cognition.

Protéines dépendantes de la vitamine K

L'expression et l'activation des protéines Gas6 et de protéine S ont été analysées par immunobuvardage dans l'hippocampe. L'expression des protéines a été déterminée par le ratio entre l'intensité des bandes des protéines et celle de la β -actine, alors que leur activation a été

établie par le ratio des mesures de Gla par rapport à celles des protéines totales. Comme le montre la figure 20, le traitement n'a pas été associé à des différences significatives entre les groupes pour l'expression et l'activation de ces protéines dans l'hippocampe (Gas6 totale : $p=0,746$; Gla/Gas6 : $p=0,074$; Protéine S totale : $p=0,309$. D Gla/Protéine S : $p=0,800$).

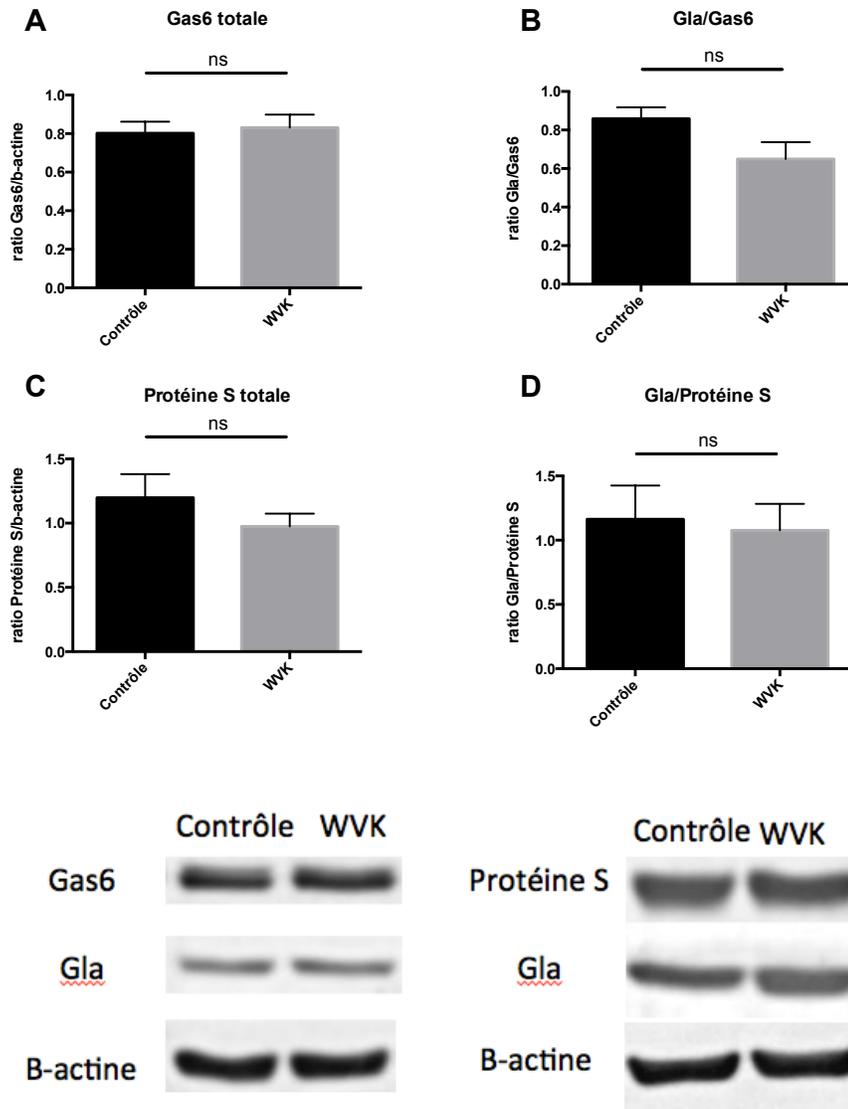


Figure 20. **Activation de Gas6 et Protéine S dans l'hippocampe.** **A** Gas6 totale ($p=0,746$) **B.** Gla/Gas6 ($p=0,074$). **C** Protéine S totale ($p=0,309$). **D** Gla/Protéine S ($p=0,800$). Il n'y a pas de différence significative entre les groupes. Contrôle : $n=6$; WVK : $n=6$.

Apoptose

Les voies d'activation des caspases ont été analysées par immunobuvardage. Le ratio d'intensité entre la forme active (clivée) et la forme inactive (pro) de la caspase 8 et de la caspase 12 représente l'activation de ces voies pro-apoptotiques. Le ratio de la forme inactive (pro) de la caspase exécutive caspase 3 sur la β -actine représente l'activation de l'apoptose par toutes les voies confondues. Comme le montre la figure 21A, le traitement, a été associé à une expression statistiquement supérieure de la caspase 3 sous forme pro ($p=0,008$) chez les rats WVK, ce qui suggère moins d'apoptose dans leur hippocampe. En revanche, aucune différence statistiquement significative n'a été observée entre les groupes pour le clivage des caspases 8 ($p=0,419$) et 12 ($p=0,505$), comme le montre la figure 21 (B et C), ce qui indique que ces deux voies apoptotiques n'ont pas été davantage activées dans un groupe que dans l'autre.

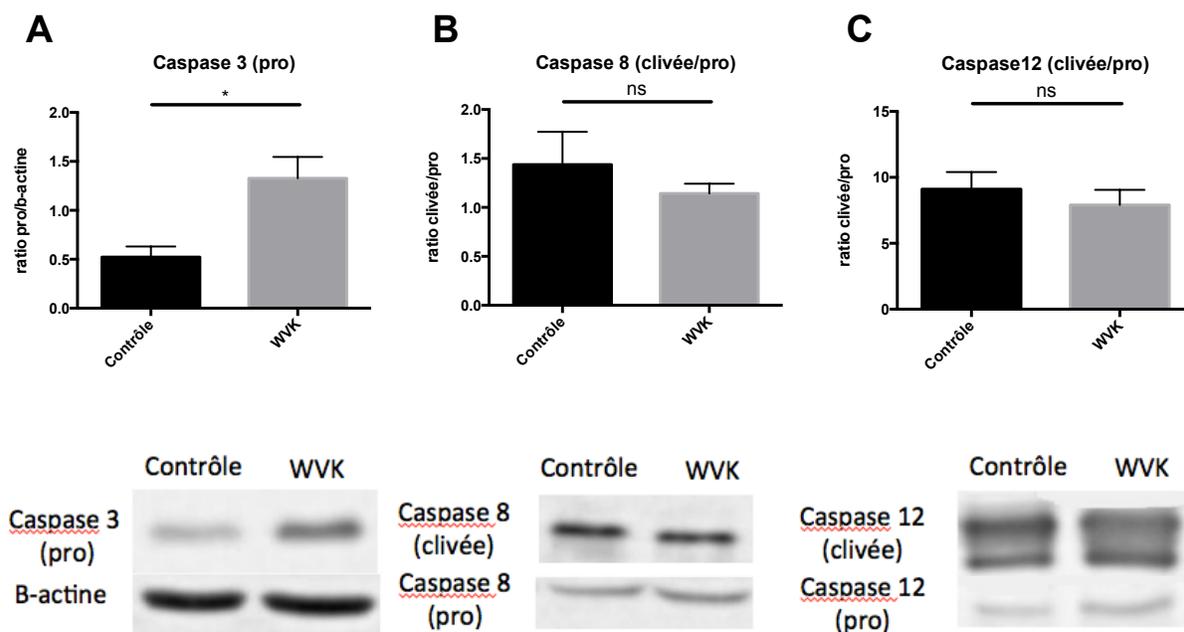


Figure 21. **Apoptose.** **A** L'expression de la caspase 3 (pro) est statistiquement supérieure dans l'hippocampe des rats WVK ($p=0,008$). **B** Caspase 8 (clivée/pro). Il n'y a pas de différence significative entre les groupes ($p=0,419$). **C** Caspase 12 (clivée/pro). Il n'y a pas de différence significative entre les groupes ($p=0,505$). Contrôle : $n=6$; WVK : $n=6$.

Voies pro survie

La survie cellulaire a été évaluée en déterminant l'activation des voies Akt et Erk par immunobuvardage. L'activation des deux voies est exprimée par le ratio de l'intensité des bandes de la forme active (phosphorylée) d'Akt (pAkt) et d'Erk (pErk 1/2) sur la forme totale. L'expression des deux protéines a été évaluée par le ratio de l'intensité des bandes de la forme totale sur celle de la β -actine. Le traitement a été associé à une phosphorylation statistiquement supérieure d'Erk 1/2 dans l'hippocampe des rats WVK ($p=0,004$) (figure 22A), mais n'a pas affecté la phosphorylation d'Akt ($p=0,055$) (figure 22B). L'expression d'Erk 1/2 ($p=0,409$) (figure 22C) et d'Akt ($p=0,768$) (figure 22D) n'était pas statistiquement différente entre les groupes. Ainsi, ces résultats suggèrent que le traitement entraîne l'activation préférentielle de la voie pro-survie Erk1/2 à la voie Akt, sans affecter l'expression de ces protéines.

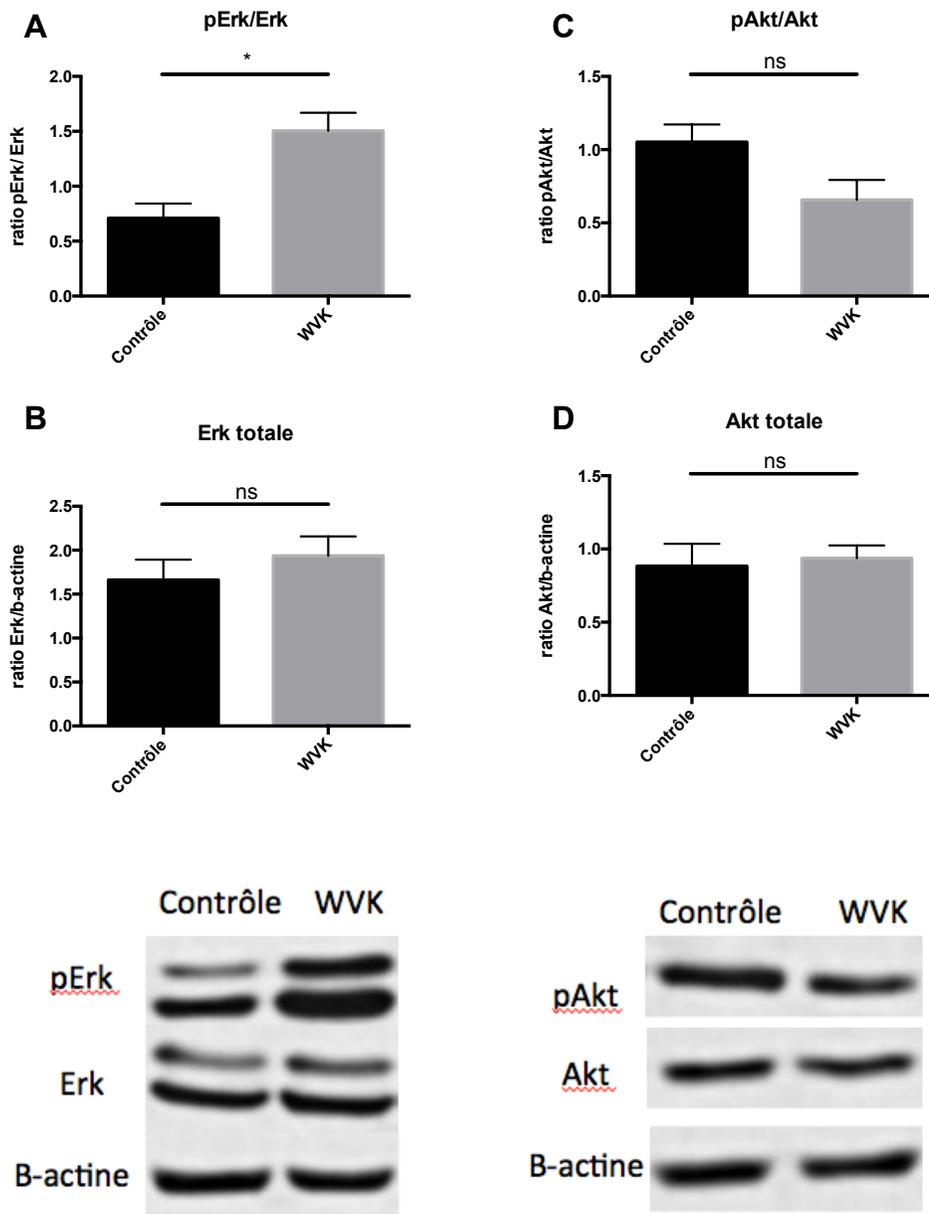


Figure 22. **Activation des voies pErk 1/2 et pAkt.** **A** pErk 1/2 **B** Erk 1/2 **C** pAkt **D** Akt La phosphorylation d'Erk 1/2 est statistiquement supérieure dans l'hippocampe du groupe WVK ($p=0,004$). Il n'y a pas de différence significative entre les groupes pour pAkt ($p=0,055$), Erk 1/2 ($p=0,409$) et Akt ($p=0,768$). Contrôle : $n=6$; WVK : $n=6$.

Marqueurs neuronaux

Le facteur de croissance neuronale BDNF, une protéine constitutive des astrocytes GFAP et un marqueur de la microglie CD11b/c ont été analysés par immunobuvardage. L'expression des protéines a été évaluée par le ratio de l'intensité des bandes de la protéine d'intérêt sur celle de la β -actine. Le traitement n'a pas entraîné de variation statistiquement significative dans l'expression de BDNF ($p=0,795$) (figure 23A) et de GFAP ($p>0,999$) (figure 23B). Toutefois, une augmentation significative a été observée pour la protéine CD11b/c ($p=0,039$) (figure 23C). Ainsi, ces résultats suggèrent que le traitement n'a pas affecté la survie des astrocytes, mais a entraîné une présence accrue de microglie.

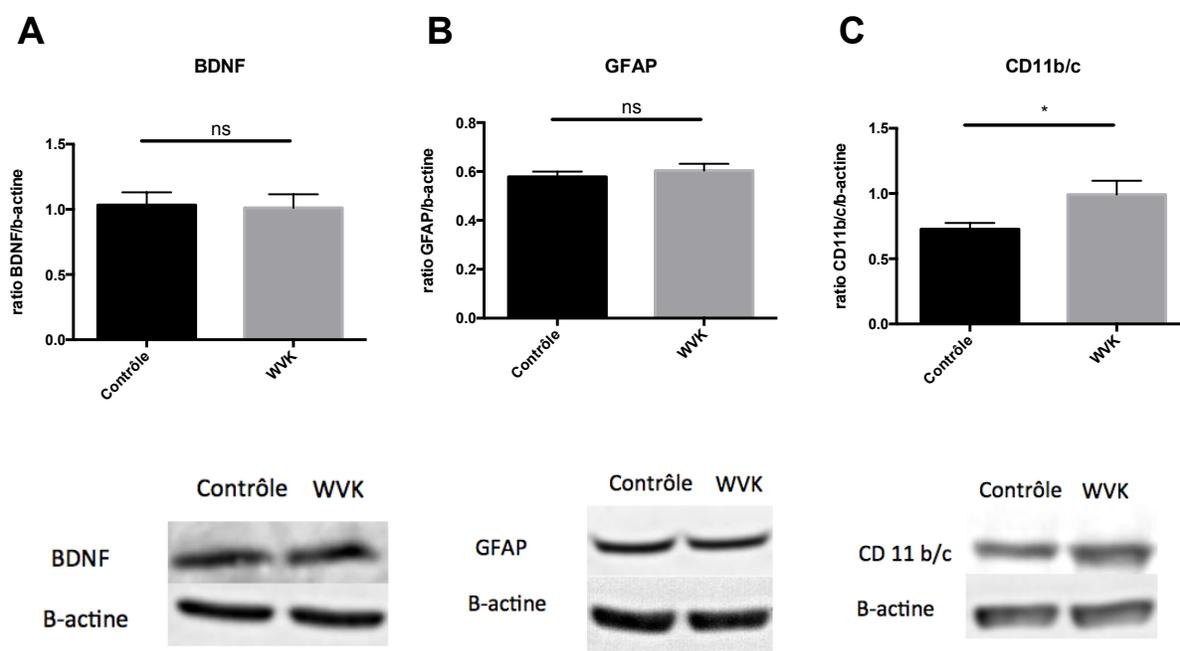


Figure 23. **Marqueurs neuronaux.** **A** BDNF : facteur de croissance neuronale. **B** GFAP : marqueur d'astrocytes. **C** CD 11 b/c : marqueur de la microglie. Il n'y a pas de différence statistiquement significative entre les groupes pour BDNF ($p=0,795$) et GFAP ($p>0,999$), mais davantage de CD 11 b/c chez les rats WVK ($p=0,039$). Contrôle : $n=6$; WVK : $n=5$.

Discussion

Cette étude a investigué les effets d'une augmentation des doses de phylloquinone injectées simultanément à un traitement à la warfarine, sur la cognition et le comportement, en comparaison avec l'étude de Tamadon-Njead [1] et sur les mécanisme moléculaires de la vitamine K dans l'hippocampe.

Analyse du poids, de la coagulation et de la consommation d'eau et de nourriture

Le traitement a été associé à un rétablissement de la consommation de nourriture et du gain de poids des rats par rapport à l'étude de Tamadon-Nejad (cf. revue de littérature, section 4.1). Cela concorde aussi avec une autre étude de Spronk et al. qui n'a pas trouvé de différence significative entre le gain de poids ou la consommation de nourriture entre les groupes contrôle et traité à la warfarine, dans un autre modèle de déplétion du statut vitaminique K i.e. administration de la vitamine K et de la warfarine via la nourriture [152].

Dans notre étude, aucun rat n'a souffert ni n'est mort d'hémorragie pendant toute la durée du traitement. En effet, la surcompensation par la phylloquinone a permis de maintenir une coagulation stable bien que les INRs du groupe WVK étaient statistiquement supérieurs (i.e. entre 1 et 3) à ceux des rats du groupe contrôle.

Analyse du comportement

Alors que l'étude de Tamadon-Nejad rapportait une diminution significative des capacités d'apprentissage chez les rats WVK suite au test de la PM version classique, notre étude a

montré une amélioration de la cognition avec le même test. Cette divergence est sans doute attribuable à l'augmentation de la dose de phylloquinone injectée aux rats WVK à 120mg/kg/jr dans notre étude plutôt que 85mg/kg/jr dans l'étude de Tamadon-Nejad [1]. En effet, notre étude a montré une surcompensation de la phylloquinone dans l'hippocampe et une corrélation entre la concentration vitamine K totale dans le cerveau et la cognition. Ces résultats appuient l'étude de Carrié et al qui a montré un rôle bénéfique de la vitamine K sur la cognition avec l'âge. Dans cette étude, une diète pauvre en phylloquinone, donnée à des rats depuis leur sevrage, a entraîné une diminution significative de la vitamine K dans l'hippocampe et a été associée à une diminution significative de la cognition évaluée par le test de la piscine de Morris à l'âge de 20 mois [5]. En somme, ces résultats suggèrent que la vitamine K est importante pour maintenir une bonne cognition.

Les résultats du test de la version modifiée de la PM appuient ceux du test de la version classique. Les rats WVK avaient une meilleure mémoire au 2^e essai par rapport au premier, que les rats contrôles. Ils avaient une meilleure stratégie d'apprentissage en ciblant leur recherche de la plateforme plus près de celle-ci que les rats contrôles qui avaient plutôt tendance à nager sur les pourtours de la piscine. Ces trois observations appuient une meilleure cognition [155, 156]. Ainsi ces deux tests de cognition ont montré que le traitement de cette étude améliore les capacités cognitives des rats.

Les résultats du test du LCS suggèrent que le traitement entraîne davantage d'anxiété chez les rats WVK. Cette observation est différente des études de Tamadon-Nejad et de Carrié et al. qui n'ont montré aucune différence significative d'anxiété avec leur modèle respectif [1, 5]. Ces résultats divergents pourraient s'expliquer par le fait que dans ces études, l'anxiété a été mesurée en considérant le temps passé dans les couloirs et non la distance parcourue. De plus, ces études n'ont pas tenu compte de la vitesse de marche des rats, ce qui aurait pu occasionner un biais d'interprétation. Comme notre traitement a entraîné une diminution significative de MK-4 dans le cerveau, il serait intéressant de répéter l'expérience en reproduisant le modèle de Tamadon-Nejad [1] et en le compensant avec de la MK-4 pour élucider si l'anxiété observée dans notre étude est associée à l'effet de la MK-4 dans le cerveau.

Les résultats du test du CO n'ont montré aucune différence significative quant au comportement exploratoire et à la locomotion des rats contrairement à l'étude de Tamadon Nejad et al laquelle rapporte une diminution significative au premier jour du test du CO [1], en concordance avec les résultats de Cochetto et al. qui ont observé un effet comparable sur des rats assujettis à une diète réduite en vitamine K [128]. Dans notre étude, le rehaussement du statut vitaminique K du cerveau suite au traitement pourrait être à l'origine du rétablissement du comportement exploratoire et de la locomotion des rats WVK.

Les résultats du test de la RO suggèrent que le rehaussement du statut vitaminique K cérébral suite au traitement ait pu éviter une perte de cognition chez les rats WVK. Comme ce test n'a pas été effectué dans l'étude de Tamadon-Nejad, il serait bon de reproduire le modèle afin de vérifier si la carence vitaminique K non compensée, est associée à un effet néfaste sur la mémoire de reconnaissance. Les résultats observés dans la présente étude au test de la RO sont divergents de ceux obtenus au test de la PM, toutefois, ceci a été aussi observé dans l'étude de Ménard et al. qui a vu un effet de l'âge sur la mémoire spatiale (évaluée par le test de la PM) mais pas d'effet sur la mémoire de reconnaissance telle qu'évaluée par le test de la RO [154]. Ainsi, la mémoire spatiale pourrait s'avérer plus modulable que la mémoire de reconnaissance. Par ailleurs, la divergence des résultats pourrait s'expliquer par le fait que ces deux tests ne font pas appel aux mêmes régions du cerveau, la PM étant associée à l'hippocampe [132, 157] et le test de la RO au cortex périrhinal [158].

La vitesse de nage et de marche a été analysée afin d'identifier si elle pouvait être un facteur confondant à la latence observée, mais les tests de comportement ne sont pas des tests conçus pour évaluer la vitesse de déplacement des rats. À cette fin, le test de motricité rotarod [159] serait pertinent. Dans le test de la PM, la différence significative de vitesse observée signifie d'abord que la latence ne peut être utilisée comme marqueur de la mémoire spatiale, puisqu'elle est biaisée par la vitesse. Une hypothèse qui puisse expliquer ce phénomène pourrait être un effet négatif de la warfarine sur la coordination motrice des rats WVK. Les résultats de vitesse obtenus dans les tests du LCS et du CO n'ont été générés qu'à titre exploratoire. La diminution significative de vitesse observée chez les rats WVK dans le test du LCS pourrait être attribuée à leur anxiété ou encore à une capacité locomotrice affaiblie

[160]. Par contre, l'absence de différence de vitesse entre les groupes dans le test du CO pourrait indiquer que la locomotion plus faible soit attribuable à l'anxiété observée dans l'EPM plutôt qu'à la motricité. Mais encore une fois, comme ces tests ne sont pas conçus pour déterminer la capacité motrice des rats, le test de motricité rotarod serait pertinent pour approfondir ces résultats.

Analyses biochimiques

Le dosage de la vitamine K a montré une diminution significative de la MK-4 dans chacune des régions du cerveau analysées, contrebalancée par une augmentation significative de phylloquinone dans le groupe WVK, résultant en une augmentation du statut vitaminique K chez ces animaux. La distribution des différents vitamères variait d'une région à l'autre. Les variations de la concentration de la vitamine K totale observées dans les régions des études de Carrié et al. [5, 13] et dans les régions du groupe contrôle de l'étude de Tamadon-Nejad [1] (c.f. section 1.3.3 de la revue de littérature) sont similaires à celles du groupe contrôle de notre étude, en ordre décroissant de concentration de vitamine K totale : mésencéphale, cortex frontal, hippocampe, striatum et cervelet, la MK-4 étant le vitamère le plus abondant. Par contre, suite au traitement, notre étude a montré que cet ordre était modifié, avec en ordre décroissant de vitamine K totale : cortex frontal, striatum, hippocampe, mésencéphale et cervelet.

Le traitement a entraîné une diminution importante de MK-4 allant de 62-73% selon les régions du cerveau. Comme l'enzyme UBIAD1 est responsable de la synthèse de la MK-4, cette diminution importante pourrait être attribuée à son inhibition dans le cerveau par la warfarine. Cette hypothèse concorde avec l'étude de Tamadon-Nejad et al. où le traitement à la warfarine avait aussi entraîné une diminution de l'ordre de 75% de la MK-4 selon les régions du cerveau. De même, Thijssen et al. et Taggart et al. ont rapporté que la conversion de la phylloquinone et de la ménadione en MK-4 était diminuée en présence de warfarine chez le rat [43, 161]. Cependant, une autre étude, effectuée par Nakagawa et al., n'a montré aucun effet de la warfarine sur la synthèse de la MK-4 par UBIAD1, à partir de la ménadione,

toutefois cette étude a été réalisée *in vitro*, sur des cellules du papillon *Spodoptera frugiperda* (cellules sf9) [23]. Ainsi nos résultats concordent avec les études *in vivo* réalisées antérieurement chez le rat.

À ce jour, nous n'avons aucune donnée sur le métabolisme de la K1 en regard de la barrière hématoencéphalique. Étudier l'effet de la warfarine sur la barrière hématoencéphalique pourrait aider à mieux comprendre comment la phylloquinone s'est retrouvée en plus grande concentration dans les régions plus près de la barrière hématoencéphalique.

Alors que la MK-4 prédomine majoritairement dans le cerveau des rats du groupe contrôle, il y a eu une augmentation de phylloquinone dans l'hippocampe des rats du groupe WVK, ce qui pourrait être relié aux concentrations importantes de phylloquinone injectées aux rats périodiquement. L'inhibition de l'enzyme UBIAD1 par la warfarine, entraînant une diminution de la conversion de la phylloquinone en MK-4, pourrait aussi expliquer l'augmentation de la concentration de phylloquinone dans l'hippocampe des rats WVK. Il serait intéressant de réaliser une autre étude avec une dose d'injection de phylloquinone plus faible pour pouvoir étudier l'effet de la déplétion de MK-4, sans compensation par la phylloquinone, sur la signalisation cellulaire. De même, il serait intéressant de voir l'effet d'une supplémentation en MK-4 dans les mêmes conditions pour pouvoir comparer son effet à celui de la phylloquinone suggérée par la présente étude. Enfin, il serait intéressant de pouvoir quantifier l'activité de l'enzyme UBIAD1 en présence et absence du traitement à la warfarine, pour approfondir son effet sur la concentration des différents vitamères dans le cerveau.

Seules quelques études *in vitro* ont montré que la vitamine K, sous sa forme phylloquinone et MK-4, puisse jouer un rôle neuroprotecteur, indépendamment des PDVKs en affectant certaines voies de signalisation cellulaire. Une étude de Tsang et al. a montré que la présence des deux vitamères entraînait une augmentation de la croissance des cellules PC12D. Cette étude suggère que la vitamine K, sous ces deux formes, agit sur la croissance neuronale par l'activation de la voie MAPK et de la voie PKC [116]. Une autre étude a aussi vu un effet bénéfique de l'ajout de la phylloquinone autant que de la MK-4 à la croissance de neurones d'embryon de rats *in vitro* [162]. Ensemble, leurs résultats suggèrent que la phylloquinone et

la MK-4 pourraient activer des voies similaires de signalisation cellulaire dans les neurones du cerveau.

Alors que des études ont déjà montré une association entre la vitamine K, la cognition et les sphingolipides [1, 5, 13], la présente étude est la première à associer l'effet de la vitamine K à l'activation de certaines voies de signalisation cellulaire dans l'hippocampe, *in vivo*.

Les résultats d'immunobuvardage n'ont dégagé aucune différence significative entre les groupes pour ce qui est de l'activation des protéines Gas6 et S, suggérant que le rehaussement du statut vitaminique K tel qu'étudié dans la présente étude n'a pas permis d'augmenter l'activité de ces protéines au niveau de l'hippocampe.

En revanche, le traitement a été associé à une augmentation significative de l'expression de la forme *pro* de la caspase 3, suggérant une activation moindre de l'apoptose. Ceci concorde avec l'augmentation de l'activation de la voie MAPK et les meilleures capacités d'apprentissage observées avec les deux versions du test de la PM. Cela concorde aussi avec des études qui ont montré un impact positif des flavonoïdes et des antioxydants alimentaires tel le cacao [163], sur la mémoire des rats évaluée par le test de la PM et qui activent la voie MAPK et inhibent la voie de la caspase 3 [164, 165].

L'apoptose présente dans l'hippocampe des rats contrôle est normale. Plusieurs études soulignent que l'apoptose est essentielle à l'homéostasie des organismes multicellulaires, surtout depuis que l'on sait qu'elle est sujet à un contrôle génétique et que son dérèglement peut entraîner le cancer, des maladies autoimmunes ou dégénératives [166-168]. De même, l'apoptose est aussi importante pour le maintien de l'homéostasie des cellules neuronales [169].

L'apoptose peut être déclenchée par la voie intrinsèque ou extrinsèque. L'activation de la voie intrinsèque se réalise par la libération de cytochromes c de la mitochondrie qui vont interagir avec la protéine Apaf1 et la caspase 9 pour former un apoptosome, entraînant l'activation de la caspase 3 qui entraîne à son tour la mort programmée de la cellule [166]. L'activation

extrinsèque de l'apoptose se fait par un signal extérieur à la cellule, par l'activation d'un récepteur (par exemple récepteur du Fas-Ligand) qui entraîne l'activation de la caspase 8, entraînant directement l'activation de la caspase 3 qui mène à l'apoptose [170]. Ainsi, l'absence d'activation de la caspase 8 n'exclut pas la possibilité que la voie intrinsèque de l'apoptose ait été activée davantage. Il serait intéressant de pouvoir étudier l'activation de la caspase 9 dans ces conditions expérimentales pour confirmer ou infirmer l'activation de la caspase 3 par la voie intrinsèque. Comme la caspase 2 peut aussi activer la caspase 9 [170], l'observation de son activation pourrait aussi être envisagée.

L'apoptose peut aussi être activée par la caspase 12 sous l'effet du stress du réticulum endoplasmique [171]. L'absence d'activation de la caspase 12 chez les rats WVK suggère que l'apoptose présente chez les rats du groupe contrôle ne serait pas causée par le stress du réticulum endoplasmique.

L'augmentation significative de l'activation de la voie MAPK (pErk) dans l'hippocampe des rats WVK, peut être un signe d'une plus grande survie neuronale, responsable de l'amélioration de la cognition. L'association entre ces facteurs concorde avec les études de Sweatt et al. qui ont lié l'activation de la voie MAPK à la plasticité synaptique et à la mémoire [172, 173].

Nos résultats n'ont pas montré de différence significative de l'activation d'Akt. Les études mentionnées précédemment [116, 162] qui ont regardé l'effet de la vitamine K sur des cellules de cerveau in vitro n'ont pas regardé l'activation d'Akt. Par contre certaines études in vitro sur l'effet de Gas6 et Protéine S ont montré que leur effet bénéfique sur la survie des cellules du cerveau était associé à l'activation d'Akt [94-96, 100, 106]. Dans la présente étude, comme le traitement n'a pas affecté l'activation de Gas6 et protéine S, cela pourrait expliquer que la voie Akt n'ait point été activée davantage.

Nos résultats n'ont pas montré de différence significative entre les groupes pour l'expression de BDNF, suggérant que l'association entre le rehaussement du statut vitaminique K, la

cognition et l'activation de la voie MAPK, tel qu'étudiés dans la présente étude, ne sont pas associés à BDNF. Ceci est inattendu, comme la voie MAPK peut augmenter l'expression de BDNF [14] [97] et que BDNF a déjà été associée à une amélioration de la mémoire spatiale par les flavonoïdes [174] ou par l'administration simultanée de vitamine B12 et d'acides gras oméga-3 [175]. Cependant, une étude *in vitro* a déjà montré que la phylloquinone et la MK-4 entraînaient la prolifération de cellules neuronales par le facteur de croissance neuronal (*Nerve Growth Factor*) et l'activation de la voie MAPK [116]. Il serait donc pertinent de répéter cette étude pour déterminer si nos résultats sont associés à l'expression du facteur de croissance neuronale.

Notre étude a aussi montré que le traitement n'entraînait pas de modification de l'expression de la protéine GFAP, suggérant que l'intégrité des astrocytes était intacte. Il serait intéressant de répéter le modèle de Tamadon-Nejad pour évaluer si l'intégrité des astrocytes est affectée lorsque la carence de MK-4 n'est pas compensée.

Finalement, notre étude a montré que le traitement entraînait une présence accrue de la microglie dans l'hippocampe des rats WVK. Normalement une activation chronique de la microglie entraîne la libération de radicaux libres et de cytokines pro-inflammatoires qui ont un effet néfaste sur la cognition [176], tel qu'observé dans les maladies de Huntington, de Parkinson et d'Alzheimer [177]. Ce résultat n'est donc pas cohérent avec l'amélioration de la cognition constatée dans cette étude et reste actuellement inexplicé. Il sera nécessaire de répéter l'expérience et d'analyser davantage de marqueurs de l'inflammation pour tenter d'obtenir une explication à ce phénomène.

Limites de l'étude

Le principal point limitant de cette étude est le faible nombre de rats par groupe. En effet, les tests de comportement ont été effectués avec un n maximal de 6 ou 7, ce qui diminue la puissance statistique et la représentativité des résultats. De plus, le nombre restreint de rats a

limité la quantité de matériel disponible pour les analyses biochimiques empêchant ainsi l'analyse d'autres marqueurs importants tels ceux de l'inflammation ou le facteur de croissance neuronale tel que discuté précédemment.

L'anticorps utilisé pour identifier la présence de la caspase 3 [9662 Cell Signaling (CS)] ne permettait pas de voir la présence de la forme clivée. Il aurait été intéressant d'avoir un anticorps qui permette aussi de voir la forme clivée afin de s'assurer que l'augmentation de la pro-caspase-3 observée ne soit pas due à une augmentation de l'expression de cette enzyme.

Conclusion

Dans cette étude, la modification du traitement de Tamadon-Nejad en augmentant uniquement les doses de phylloquinone à 120mg/kg/jr (WVK) a entraîné une diminution significative de la concentration de la concentration de MK-4 dans le cerveau, mais une surcompensation par la phylloquinone, résultant en une augmentation significative du statut vitaminiq K du cerveau. Ce statut a été associé à une mémoire de reconnaissance intacte et corrélé à une amélioration de la mémoire spatiale des rats WVK. Le traitement a aussi entraîné une augmentation significative de l'anxiété et le rétablissement du comportement exploratoire et de la locomotion des rats WVK comparativement à l'étude de Tamadon-Nejad [1]. Dans l'hippocampe des rats WVK, l'amélioration de la cognition et le rehaussement du statut vitaminiq K du cerveau n'ont pas induit de variation significative de l'activation des protéines dépendantes de la VK Gas6 et Protéine S, mais ont été associés à une présence accrue de la microglie et à une inhibition de l'apoptose prévenue par une augmentation significative de l'activation de la voie MAPK et le maintien de l'activation de la voie Akt. En somme, cette étude confirme le rôle modulateur de la VK dans le cerveau sur la cognition et la survie cellulaire.

Bibliographie

1. Tamadon-nejad S: **Warfarin-induced vitamin K deficiency is associated with cognitive and behavioral perturbations, and alterations in brain sphingolipids in rats.** In. Edited by Montréal Ud; 2014.
2. **Annuaire du Canada 2012**; 2012.
3. Agüero-Torres H, Winblad B: **Alzheimer's Disease and Vascular Dementia: Some Points of Confluence.** *Annals NY Acad Sci* 2000, **903**(1 VASCULAR FACT):547-552.
4. Gómez-Pinilla F: **Brain foods: the effects of nutrients on brain function.** *Nat Rev Neurosci* 2008, **9**(7):568-578.
5. Carrie I, Belanger E, Portoukalian J, Rochford J, Ferland G: **Lifelong low-phyloquinone intake is associated with cognitive impairments in old rats.** *The Journal of nutrition* 2011, **141**(8):1495-1501.
6. Presse N, Belleville S, Gaudreau P, Greenwood CE, Kergoat M-J, Morais JA, Payette H, Shatenstein B, Ferland G: **Vitamin K status and cognitive function in healthy older adults.** *Neurobiology of aging* 2013, **34**(12):2777-2783.
7. Presse N, Shatenstein B, Kergoat M-J, Ferland G: **Low vitamin K intakes in community-dwelling elders at an early stage of Alzheimer's disease.** *Journal of the American Dietetic Association* 2008, **108**(12):2095-2099.
8. Annweiler C, Ferland G, Barberger-Gateau P, Brangier A, Rolland Y, Beauchet O: **Vitamin K antagonists and cognitive impairment: results from a cross-sectional pilot study among geriatric patients.** *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences* 2015, **70**(1):97-101.
9. Annweiler C, Denis S, Duval G, Ferland G, Bartha R, Beauchet O: **Use of Vitamin K Antagonists and Brain Volumetry in Older Adults: Preliminary Results From the GAIT Study.** *Journal of the American Geriatrics Society* 2015, **63**(10):2199-2202.
10. Ferland G, Féart C, Presse N, Lorrain S, Bazin F, Helmer C, Berr C, Annweiler C, Rouaud O, Dartigues J-F *et al*: **Vitamin K Antagonists and Cognitive Function in**

- Older Adults: The Three-City Cohort Study.** *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences* 2015.
11. Soutif-Veillon A, Ferland G, Rolland Y, Presse N, Boucher K, Fearf C, Annweiler C: **Increased dietary vitamin K intake is associated with less severe subjective memory complaint among older adults.** *Maturitas* 2016.
 12. Ferland G: **Vitamin K, an emerging nutrient in brain function.** *BioFactors* 2012, **38(2):151-157.**
 13. Carrie I, Portoukalian J, Vicaretti R, Rochford J, Potvin S, Ferland G: **Menaquinone-4 concentration is correlated with sphingolipid concentrations in rat brain.** *The Journal of nutrition* 2004, **134(1):167-172.**
 14. Ferland G: **Vitamin K and the nervous system: an overview of its actions.** *Advances in nutrition* 2012, **3(2):204-212.**
 15. Ferland G: **The discovery of vitamin K and its clinical applications.** *Annals of nutrition & metabolism* 2012, **61(3):213-218.**
 16. Ferland, G. **Vitamine K.** Dans Erdman, J.W., Macdonald, I.A., et Zeisel, S.H., **Present Knowledge in Nutrition** 2012, 10^e édition : 230-247 Wiley-Blackwell, IOWA, USA.
 17. Shearer MJ, Newman P: **Metabolism and cell biology of vitamin K.** *Thromb Haemost* 2008, **100(4):530-547.**
 18. Booth SL, Pennington JAT, Sadowski JA: **Food Sources and Dietary Intakes of Vitamin K-1 (Phylloquinone) in the American Diet: Data From the PDA Total Diet Study.** *Journal of the American Dietetic Association* 1996, **96(2):149-154.**
 19. Davidson RT: **Conversion of Phylloquinone to Menaquinone-4 Chickens, Rats and Cultured Cells;** 1998.
 20. Beulens JWJ, Booth SL, van den Heuvel EGHM, Stoecklin E, Baka A, Vermeer C: **The role of menaquinones (vitamin K₂) in human health.** *Br J Nutr* 2013, **110(8):1357-1368.**
 21. Ferland G, Doucet I, Mainville D: **Phylloquinone and Menaquinone-4 Tissue Distribution at Different Life Stages in Male and Female Sprague-Dawley Rats**

- Fed Different VK Levels Since Weaning or Subjected to a 40% Calorie Restriction since Adulthood.** *Nutrients* 2016, **8**(3):141.
22. Hirota Y, Nakagawa K, Sawada N, Okuda N, Suhara Y, Uchino Y, Kimoto T, Funahashi N, Kamao M, Tsugawa N *et al*: **Functional characterization of the vitamin K2 biosynthetic enzyme UBIAD1.** *PLoS ONE* 2015, **10**(4):e0125737.
 23. Nakagawa K, Hirota Y, Sawada N, Yuge N, Watanabe M, Uchino Y, Okuda N, Shimomura Y, Suhara Y, Okano T: **Identification of UBIAD1 as a novel human menaquinone-4 biosynthetic enzyme.** *Nature* 2010, **468**(7320):117-121.
 24. Davidson KW, Sadowski JA: **Determination of vitamin K compounds in plasma or serum by high-performance liquid chromatography using postcolumn chemical reduction and fluorimetric detection.** *Meth Enzymol* 1997, **282**:408-421.
 25. Intakes SCotSEoDR, Micronutrients Po, Intakes SoURLoN, of I, Use of Dietary R, Board F, Nutrition, Institute of M: **Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc:** National Academies Press; 2002.
 26. Booth SL, Suttie JW: **Dietary intake and adequacy of vitamin K1.** 1998.
 27. Shearer MJ: **Chemistry, nutritional sources, tissue distribution and metabolism of vitamin K with special reference to bone health.** *The Journal of nutrition* 1996.
 28. Johnson MA: **Influence of vitamin K on anticoagulant therapy depends on vitamin K status and the source and chemical forms of vitamin K.** *Nutrition reviews* 2005, **63**(3):91-97.
 29. Suttie JW: **Vitamin K in Health and Disease:** CRC Press; 2009.
 30. Shearer MJ, Fu X, Booth SL: **Vitamin K nutrition, metabolism, and requirements: current concepts and future research.** *Advances in nutrition (Bethesda, Md)* 2012, **3**(2):182-195.
 31. Garber AK, Binkley NC, Krueger DC, Suttie JW: **Comparison of phylloquinone bioavailability from food sources or a supplement in human subjects.** *The Journal of nutrition* 1999, **129**(6):1201-1203.
 32. Gijsbers BL, Jie KS, Vermeer C: **Effect of food composition on vitamin K absorption in human volunteers.** *Br J Nutr* 1996, **76**(2):223-229.

33. Booth SL, Lichtenstein AH, Dallal GE: **Phylloquinone absorption from phylloquinone-fortified oil is greater than from a vegetable in younger and older men and women.** *The Journal of nutrition* 2002, **132**(9):2609-2612.
34. Novotny JA, Kurilich AC, Britz SJ: **Vitamin K absorption and kinetics in human subjects after consumption of 13 C-labelled phylloquinone from kale.** *British Journal of Nutrition* 2010, **104**(06):858-862.
35. Jones KS, Bluck LJC, Wang LY, Stephen AM, Prynne CJ, Coward WA: **The effect of different meals on the absorption of stable isotope-labelled phylloquinone.** *Br J Nutr* 2009, **102**(8):1195-1202.
36. Goncalves A, Roi S, Nowicki M, Dhaussy A, Huertas A, Amiot M-J, Reboul E: **Fat-soluble vitamin intestinal absorption: absorption sites in the intestine and interactions for absorption.** *Food Chem* 2015, **172**:155-160.
37. Walther B, Karl JP, Booth SL, Boyaval P: **Menaquinones, bacteria, and the food supply: the relevance of dairy and fermented food products to vitamin K requirements.** *Advances in nutrition (Bethesda, Md)* 2013, **4**(4):463-473.
38. Hirauchi K, Sakano T, Notsumoto S, Nagaoka T, Morimoto A, Fujimoto K, Masuda S, Suzuki Y: **Measurement of K vitamins in animal tissues by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection.** *J Chromatogr* 1989, **497**:131-137.
39. Schurgers LJ, Vermeer C: **Differential lipoprotein transport pathways of K-vitamins in healthy subjects.** *Biochim Biophys Acta* 2002, **1570**(1):27-32.
40. Cham BE, Smith JL, Colquhoun DM: **Interdependence of serum concentrations of vitamin K 1, vitamin E, lipids, apolipoprotein A 1, and apolipoprotein B: importance in assessing vitamin status.** *Clinica chimica acta* 1999.
41. Sadowski JA, Hood SJ, Dallal GE, Garry PJ: **Phylloquinone in plasma from elderly and young adults: factors influencing its concentration.** *The American journal of clinical nutrition* 1989, **50**(1):100-108.
42. Thijssen HH, Drittij-Reijnders MJ: **Vitamin K distribution in rat tissues: dietary phylloquinone is a source of tissue menaquinone-4.** *Br J Nutr* 1994, **72**(3):415-425.

43. Thijssen HH, Drittij-Reijnders MJ, Fischer MA: **Phylloquinone and menaquinone-4 distribution in rats: synthesis rather than uptake determines menaquinone-4 organ concentrations.** *The Journal of nutrition* 1996, **126**(2):537-543.
44. Al Rajabi A, Booth SL, Peterson JW, Choi SW, Suttie JW, Shea MK, Miao B, Grusak MA, Fu X: **Deuterium-labeled phylloquinone has tissue-specific conversion to menaquinone-4 among Fischer 344 male rats.** *Journal of Nutrition* 2012, **142**(5):841-845.
45. Booth SL, Peterson JW, Smith D, Shea MK, Chamberland J, Crivello N: **Age and dietary form of vitamin K affect menaquinone-4 concentrations in male Fischer 344 rats.** *Journal of Nutrition* 2008, **138**(3):492-496.
46. Sato T, Ozaki R, Kamo S, Hara Y, Konishi S, Isobe Y, Saitoh S, Harada H: **The biological activity and tissue distribution of 2',3'-dihydrophylloquinone in rats.** *Biochim Biophys Acta* 2003, **1622**(3):145-150.
47. Ronden J: **Tissue distribution of K-vitamins under different nutritional regimens in the rat.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1998, **1379**(1):16-22.
48. Huber AM, Davidson KW, O'Brien-Morse ME, Sadowski JA: **Tissue phylloquinone and menaquinones in rats are affected by age and gender.** *The Journal of nutrition* 1999, **129**(5):1039-1044.
49. Huber AM, Davidson KW, O'Brien-Morse ME, Sadowski JA: **Gender differences in hepatic phylloquinone and menaquinones in the vitamin K-deficient and -supplemented rat.** *Biochim Biophys Acta* 1999, **1426**(1):43-52.
50. Thijssen HH, Drittij-Reijnders MJ: **Vitamin K status in human tissues: tissue-specific accumulation of phylloquinone and menaquinone-4.** *Br J Nutr* 1996, **75**(1):121-127.
51. Shearer MJ, Newman P: **Recent trends in the metabolism and cell biology of vitamin K with special reference to vitamin K cycling and MK-4 biosynthesis.** *J Lipid Res* 2014, **55**(3):345-362.
52. Card DJ, Gorska R, Cutler J, Harrington DJ: **Vitamin K metabolism: current knowledge and future research.** *Mol Nutr Food Res* 2014, **58**(8):1590-1600.

53. Shearer MJ, McBurney A, Barkhan P: **Studies on the absorption and metabolism of phylloquinone (vitamin K1) in man.** *Vitam Horm* 1974, **32**:513-542.
54. Harrington DJ, Soper R, Edwards C, Savidge GF, Hodges SJ, Shearer MJ: **Determination of the urinary aglycone metabolites of vitamin K by HPLC with redox-mode electrochemical detection.** *J Lipid Res* 2005, **46**(5):1053-1060.
55. Harrington DJ, Booth SL, Card DJ, Shearer MJ: **Excretion of the urinary 5C- and 7C-aglycone metabolites of vitamin K by young adults responds to changes in dietary phylloquinone and dihydrophylloquinone intakes.** *The Journal of nutrition* 2007, **137**(7):1763-1768.
56. Erkkila AT, Lichtenstein AH, Dolnikowski GG, Grusak MA, Jalbert SM, Aquino KA, Peterson JW, Booth SL: **Plasma transport of vitamin K in men using deuterium-labeled collard greens.** *Metabolism* 2004, **53**(2):215-221.
57. Schurgers LJ, Vermeer C: **Determination of phylloquinone and menaquinones in food. Effect of food matrix on circulating vitamin K concentrations.** *Haemostasis* 2000, **30**(6):298-307.
58. Berkner KL, Runge KW: **The physiology of vitamin K nutriture and vitamin K-dependent protein function in atherosclerosis.** *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2004, **2**(12):2118-2132.
59. Dowd P, Ham SW, Naganathan S, Hershline R: **The mechanism of action of vitamin K.** *Annu Rev Nutr* 1995, **15**:419-440.
60. Berkner KL: **Vitamin K-dependent carboxylation.** *Vitam Horm* 2008, **78**:131-156.
61. Tie JK, Jin DY, Straight DL, Stafford DW: **Functional study of the vitamin K cycle in mammalian cells.** *Blood* 2011, **117**(10):2967-2974.
62. Jin D-Y, Tie J-K, Stafford DW: **The conversion of vitamin K epoxide to vitamin K quinone and vitamin K quinone to vitamin K hydroquinone uses the same active site cysteines.** *Biochemistry* 2007, **46**(24):7279-7283.
63. Tie JK, Stafford DW: **Structural and functional insights into enzymes of the vitamin K cycle.** *J Thromb Haemost* 2016, **14**(2):236-247.
64. Versteeg HH, Heemskerk JWM, Levi M: **New fundamentals in hemostasis.** *Physiological reviews* 2013, **93**(1):327-358.

65. Griffin JH, Fernandez JA, Liu D, Cheng T, Guo H, Zlokovic BV: **Activated protein C and ischemic stroke.** *Crit Care Med* 2004, **32**(5 Suppl):S247-253.
66. Gundberg CM, Lian JB, Booth SL: **Vitamin K-dependent carboxylation of osteocalcin: friend or foe?** *Advances in nutrition* 2012, **3**(2):149-157.
67. Hauschka PV, Lian JB, Cole DE, Gundberg CM: **Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone.** *Physiol Rev* 1989, **69**(3):990-1047.
68. Ferron M, Lacombe J: **Regulation of energy metabolism by the skeleton: osteocalcin and beyond.** *Arch Biochem Biophys* 2014, **561**:137-146.
69. Magni P, Macchi C, Sirtori CR, Corsi Romanelli MM: **Osteocalcin as a potential risk biomarker for cardiovascular and metabolic diseases.** *Clin Chem Lab Med* 2016.
70. Oury F, Sumara G, Sumara O, Ferron M, Chang H, Smith CE, Hermo L, Suarez S, Roth BL, Ducy P *et al*: **Endocrine regulation of male fertility by the skeleton.** *Cell* 2011, **144**(5):796-809.
71. Oury F, Khrimian L, Denny CA, Gardin A, Chamouni A, Goeden N, Huang Y-y, Lee H, Srinivas P, Gao X-B *et al*: **Maternal and offspring pools of osteocalcin influence brain development and functions.** *Cell* 2013, **155**(1):228-241.
72. Wuyts J, Dhondt A: **The role of vitamin K in vascular calcification of patients with chronic kidney disease.** *Acta Clin Belg* 2016:1-6.
73. Poterucha TJ, Goldhaber SZ: **Warfarin and Vascular Calcification.** *Am J Med* 2015.
74. Luo G, Ducy P, McKee MD, Pinero GJ, Loyer E, Behringer RR, Karsenty G: **Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein.** *Nature* 1997, **386**(6620):78-81.
75. Krüger T, Oelenberg S, Kaesler N, Schurgers LJ, van de Sandt AM, Boor P, Schlieper G, Brandenburg VM, Fekete BC, Veulemans V *et al*: **Warfarin induces cardiovascular damage in mice.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013, **33**(11):2618-2624.
76. Price PA, Faus SA, Williamson MK: **Warfarin causes rapid calcification of the elastic lamellae in rat arteries and heart valves.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998, **18**(9):1400-1407.

77. Schurgers LJ, Spronk HMH, Soute BAM, Schiffers PM, DeMey JGR, Vermeer C: **Regression of warfarin-induced medial elastocalcinosis by high intake of vitamin K in rats.** *Blood* 2007, **109**(7):2823-2831.
78. Kulman JD, Harris JE, Xie L, Davie EW: **Proline-rich Gla protein 2 is a cell-surface vitamin K-dependent protein that binds to the transcriptional coactivator Yes-associated protein.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**(21):8767-8772.
79. Viegas CSB, Simes DC, Laizé V, Williamson MK, Price PA, Cancela ML: **Gla-rich protein (GRP), a new vitamin K-dependent protein identified from sturgeon cartilage and highly conserved in vertebrates.** *J Biol Chem* 2008, **283**(52):36655-36664.
80. Viegas CSB, Cavaco S, Neves PL, Ferreira A, João A, Williamson MK, Price PA, Cancela ML, Simes DC: **Gla-rich protein is a novel vitamin K-dependent protein present in serum that accumulates at sites of pathological calcifications.** *Am J Pathol* 2009, **175**(6):2288-2298.
81. Viegas CS, Rafael MS, Enriquez JL, Teixeira A, Vitorino R, Luis IM, Costa RM, Santos S, Cavaco S, Neves J *et al*: **Gla-rich protein acts as a calcification inhibitor in the human cardiovascular system.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2015, **35**(2):399-408.
82. Cavaco S, Viegas CS, Rafael MS, Ramos A, Magalhaes J, Blanco FJ, Vermeer C, Simes DC: **Gla-rich protein is involved in the cross-talk between calcification and inflammation in osteoarthritis.** *Cell Mol Life Sci* 2016, **73**(5):1051-1065.
83. Coutu DL, Wu JH, Monette A, Rivard G-E, Blostein MD, Galipeau J: **Periostin, a member of a novel family of vitamin K-dependent proteins, is expressed by mesenchymal stromal cells.** *J Biol Chem* 2008, **283**(26):17991-18001.
84. Annis DS, Ma H, Balas DM, Kumfer KT, Sandbo N, Potts GK, Coon JJ, Mosher DF: **Absence of Vitamin K-Dependent gamma-Carboxylation in Human Periostin Extracted from Fibrotic Lung or Secreted from a Cell Line Engineered to Optimize gamma-Carboxylation.** *PLoS ONE* 2015, **10**(8):e0135374.
85. Walker JT, McLeod K, Kim S, Conway SJ, Hamilton DW: **Periostin as a multifunctional modulator of the wound healing response.** *Cell Tissue Res* 2016.

86. Wan XC, Woodruff PG: **Biomarkers in Severe Asthma.** *Immunol Allergy Clin North Am* 2016, **36**(3):547-557.
87. Moniuszko T, Wincewicz A, Koda M, Domyslawska I, Sulkowski S: **Role of periostin in esophageal, gastric and colon cancer.** *Oncol Lett* 2016, **12**(2):783-787.
88. Rüggeberg S, Horn P, Li X, Vajkoczy P, Franz T: **Detection of a gamma-carboxy-glutamate as novel post-translational modification of human transthyretin.** *Protein Pept Lett* 2008, **15**(1):43-46.
89. Zheng F, Kim YJ, Moran TH, Li H, Bi S: **Central transthyretin acts to decrease food intake and body weight.** *Sci Rep* 2016, **6**:24238.
90. Ankarcróna M, Winblad B, Monteiro C, Fearn C, Powers ET, Johansson J, Westermark GT, Presto J, Ericzon BG, Kelly JW: **Current and future treatment of amyloid diseases.** *J Intern Med* 2016.
91. Stitt TN, Conn G, Goret M, Lai C, Bruno J: **The anticoagulation factor protein S and its relative, Gas6, are ligands for the Tyro 3/Axl family of receptor tyrosine kinases.** *Cell* 1995.
92. Prieto AL, Weber JL, Tracy S, Heeb MJ, Lai C: **Gas6, a ligand for the receptor protein-tyrosine kinase Tyro-3, is widely expressed in the central nervous system.** *Brain Res* 1999, **816**(2):646-661.
93. Tsaïoun KI, Denisova, N. A., Obin M., Joseph J.: **Novel Growth Factor Gas6, Phosphatidylserine And Their Age-Related Changes In The Rat Brain.** *Neuroscience* 2000, **26**(2):112-1222.
94. Funakoshi H, Yonemasu T, Nakano T, Matumoto K, Nakamura T: **Identification of Gas6, a putative ligand for Sky and Axl receptor tyrosine kinases, as a novel neurotrophic factor for hippocampal neurons.** *J Neurosci Res* 2002, **68**(2):150-160.
95. Allen MP, Zeng C, Schneider K, Xiong X, Meintzer MK, Bellosta P, Basilico C, Varnum B, Heidenreich KA, Wierman ME: **Growth Arrest-Specific Gene 6 (Gas6)/Adhesion Related Kinase (Ark) Signaling Promotes Gonadotropin-Releasing Hormone Neuronal Survival via Extracellular Signal-Regulated Kinase (ERK) and Akt.** *Molecular Endocrinology* 1999.

96. Prieto AL, O'Dell S, Varnum B, Lai C: **Localization and signaling of the receptor protein tyrosine kinase Tyro3 in cortical and hippocampal neurons.** *Neuroscience* 2007, **150**(2):319-334.
97. Jeanneteau F, Deinhardt K, Miyoshi G, Bennett AM, Chao MV: **The MAP kinase phosphatase MKP-1 regulates BDNF-induced axon branching.** *Nat Neurosci* 2010, **13**(11):1373-1379.
98. Yagami T: **Gas6 rescues cortical neurons from amyloid β protein-induced apoptosis.** *Neuropharmacology* 2002, **43**(8):1289-1296.
99. Ji R, Meng L, Li Q, Lu Q: **TAM receptor deficiency affects adult hippocampal neurogenesis.** *Metabolic brain disease* 2015.
100. Shankar SL, O'Guin K, Kim M, Varnum B: **Gas6/Axl signaling activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt1 survival pathway to protect oligodendrocytes from tumor necrosis factor α -induced apoptosis.** *The Journal of Neuroscience* 2006, **26**(21):5638-5648.
101. Binder MD, Cate HS, Prieto AL, Kemper D: **Gas6 Deficiency Increases Oligodendrocyte Loss and Microglial Activation in Response to Cuprizone-Induced Demyelination.** *The Journal of Neuroscience* 2008, **28**(20):5195-5206.
102. Binder MD, Xiao J, Kemper D, Ma GZM, Murray SS, Kilpatrick TJ: **Gas6 increases myelination by oligodendrocytes and its deficiency delays recovery following cuprizone-induced demyelination.** *PLoS ONE* 2011, **6**(3):e17727.
103. Grommes C, Lee CYD, Wilkinson BL, Jiang Q, Koenigsnecht-Talboo JL, Varnum B, Landreth GE: **Regulation of microglial phagocytosis and inflammatory gene expression by Gas6 acting on the Axl/Mer family of tyrosine kinases.** *J Neuroimmune Pharmacol* 2008, **3**(2):130-140.
104. Tshiperson V, Li X, Schwartz GJ, Raine CS, Shafit-Zagardo B: **GAS6 enhances repair following cuprizone-induced demyelination.** *PLoS ONE* 2010, **5**(12):e15748.
105. Liu D, Guo H, Griffin JH, Fernández JA, Zlokovic BV: **Protein S confers neuronal protection during ischemic/hypoxic injury in mice.** *Circulation* 2003, **107**(13):1791-1796.
106. Zhong Z, Wang Y, Guo H, Sagare A, Fernández JA, Bell RD, Barrett TM, Griffin JH, Freeman RS, Zlokovic BV: **Protein S protects neurons from excitotoxic injury by**

- activating the TAM receptor Tyro3-phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway through its sex hormone-binding globulin-like region.** *J Neurosci* 2010, **30**(46):15521-15534.
107. Bartke N, Hannun YA: **Bioactive sphingolipids: metabolism and function.** *J Lipid Res* 2009, **50 Suppl**:S91-96.
108. Zeidan YH, Hannun YA: **Translational aspects of sphingolipid metabolism.** *Trends Mol Med* 2007, **13**(8):327-336.
109. Cutler RG, Kelly J, Storie K, Pedersen WA, Tammara A, Hatanpaa K, Troncoso JC, Mattson MP: **Involvement of oxidative stress-induced abnormalities in ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer's disease.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, **101**(7):2070-2075.
110. Jana A, Hogan EL, Pahan K: **Ceramide and neurodegeneration: susceptibility of neurons and oligodendrocytes to cell damage and death.** *J Neurol Sci* 2009, **278**(1-2):5-15.
111. Posse de Chaves E, Sipione S: **Sphingolipids and gangliosides of the nervous system in membrane function and dysfunction.** *FEBS Lett* 2010, **584**(9):1748-1759.
112. Ballou LR, Lauderkind SJ, Rosloniec EF, Raghov R: **Ceramide signalling and the immune response.** *Biochim Biophys Acta* 1996, **1301**(3):273-287.
113. Movsesyan VA, Yakovlev AG, Dabaghyan EA, Stoica BA, Faden AI: **Ceramide induces neuronal apoptosis through the caspase-9/caspase-3 pathway.** *Biochem Biophys Res Commun* 2002, **299**(2):201-207.
114. Stoica BA, Movsesyan VA, Lea PM, Faden AI: **Ceramide-induced neuronal apoptosis is associated with dephosphorylation of Akt, BAD, FKHR, GSK-3beta, and induction of the mitochondrial-dependent intrinsic caspase pathway.** *Mol Cell Neurosci* 2003, **22**(3):365-382.
115. Arboleda G, Morales LC, Benitez B, Arboleda H: **Regulation of ceramide-induced neuronal death: cell metabolism meets neurodegeneration.** *Brain Res Rev* 2009, **59**(2):333-346.
116. Tsang CK, Kamei Y: **Novel effect of vitamin K(1) (phylloquinone) and vitamin K(2) (menaquinone) on promoting nerve growth factor-mediated neurite outgrowth from PC12D cells.** *Neurosci Lett* 2002, **323**(1):9-12.

117. Li J, Lin JC, Wang H, Peterson JW, Furie BC, Furie B, Booth SL, Volpe JJ, Rosenberg PA: **Novel role of vitamin k in preventing oxidative injury to developing oligodendrocytes and neurons.** *J Neurosci* 2003, **23**(13):5816-5826.
118. Li J, Wang H, Rosenberg PA: **Vitamin K prevents oxidative cell death by inhibiting activation of 12-lipoxygenase in developing oligodendrocytes.** *J Neurosci Res* 2009, **87**(9):1997-2005.
119. Sakaue M, Mori N, Okazaki M, Kadowaki E, Kaneko T, Hemmi N, Sekiguchi H, Maki T, Ozawa A, Hara S *et al*: **Vitamin K has the potential to protect neurons from methylmercury-induced cell death in vitro.** *J Neurosci Res* 2011, **89**(7):1052-1058.
120. Reddi K, Henderson B, Meghji S, Wilson M, Poole S, Hopper C, Harris M, Hodges SJ: **Interleukin 6 production by lipopolysaccharide-stimulated human fibroblasts is potently inhibited by naphthoquinone (vitamin K) compounds.** *Cytokine* 1995, **7**(3):287-290.
121. Moriya M, Nakatsuji Y, Okuno T, Hamasaki T, Sawada M, Sakoda S: **Vitamin K2 ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats.** *Journal of Neuroimmunology* 2005, **170**(1-2):11-20.
122. Ohsaki Y, Shirakawa H, Hiwatashi K, Furukawa Y, Mizutani T, Komai M: **Vitamin K suppresses lipopolysaccharide-induced inflammation in the rat.** *Biosci Biotechnol Biochem* 2006, **70**(4):926-932.
123. Ohsaki Y, Shirakawa H, Miura A, Giriwono PE, Sato S, Ohashi A, Iribe M, Goto T, Komai M: **Vitamin K suppresses the lipopolysaccharide-induced expression of inflammatory cytokines in cultured macrophage-like cells via the inhibition of the activation of nuclear factor κ B through the repression of IKK α / β phosphorylation.** *J Nutr Biochem* 2010, **21**(11):1120-1126.
124. Shea MK, Booth SL, Massaro JM, Jacques PF, D'Agostino RB, Dawson-Hughes B, Ordovas JM, O'Donnell CJ, Kathiresan S, Keaney JF *et al*: **Vitamin K and vitamin D status: associations with inflammatory markers in the Framingham Offspring Study.** *Am J Epidemiol* 2008, **167**(3):313-320.
125. Shea MK, Dallal GE, Dawson-Hughes B, Ordovas JM, O'Donnell CJ, Gundberg CM, Peterson JW, Booth SL: **Vitamin K, circulating cytokines, and bone mineral**

- density in older men and women.** *The American journal of clinical nutrition* 2008, **88**(2):356-363.
126. Chouet J, Ferland G, Feart C, Rolland Y, Presse N, Boucher K, Barberger-Gateau P, Beauchet O, Annweiler C: **Dietary Vitamin K Intake Is Associated with Cognition and Behaviour among Geriatric Patients: The CLIP Study.** *Nutrients* 2015, **7**(8):6739-6750.
127. Sato Y, Honda Y, Hayashida N, Iwamoto J, Kanoko T, Satoh K: **Vitamin K deficiency and osteopenia in elderly women with Alzheimer's disease.** *Arch Phys Med Rehabil* 2005, **86**(3):576-581.
128. Cocchetto DM, Miller DB, Miller LL, Bjornsson TD: **Behavioral perturbations in the vitamin K-deficient rat.** *Physiology & behavior* 1985, **34**(5):727-734.
129. Terry AV: **Spatial Navigation (Water Maze) Tasks.** In: *Methods of Behavior Analysis in Neurosciences*. 2nd eddition edn. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2009.
130. Antunes M, Biala G: **The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications.** *Cogn Process* 2012, **13**(2):93-110.
131. Campos AC, Fogaca MV, Aguiar DC, Guimaraes FS: **Animal models of anxiety disorders and stress.** *Rev Bras Psiquiatr* 2013, **35 Suppl 2**:S101-111.
132. Kapadia M, Xu J, Sakic B: **The water maze paradigm in experimental studies of chronic cognitive disorders: Theory, protocols, analysis, and inference.** *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 2016.
133. Morris R: **Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat.** *Journal of neuroscience methods* 1984, **11**(1):47-60.
134. Handley SL, Mithani S: **Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour.** *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1984, **327**(1):1-5.
135. Walf AA, Frye CA: **The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents.** *Nat Protoc* 2007, **2**(2):322-328.
136. Treit D, Engin E, McEown K: **Animal models of anxiety and anxiolytic drug action.** *Curr Top Behav Neurosci* 2010, **2**:121-160.

137. Sandner G, Oberling P, Silveira MC, Di Scala G, Rocha B, Bagri A, Depoortere R: **What brain structures are active during emotions? Effects of brain stimulation elicited aversion on c-fos immunoreactivity and behavior.** *Behav Brain Res* 1993, **58**(1-2):9-18.
138. Silveira MC, Sandner G, Graeff FG: **Induction of Fos immunoreactivity in the brain by exposure to the elevated plus-maze.** *Behav Brain Res* 1993, **56**(1):115-118.
139. Bailey KR, Crawley JN: **Anxiety-related behaviors in mice.** 2009.
140. Prut L, Belzung C: **The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review.** *Eur J Pharmacol* 2003, **463**(1-3):3-33.
141. Karakas A, Tolekova A, Nephew BC, Kolcz J, Mbarek S, Sumiyoshi T, Munesue T, Leventieva-Necheva E, Coskun H, Higashida H *et al*: **Intraamygdalar Melatonin Administration and Pinealectomy Affect Anxiety Like Behavior and Spatial Memory:** INTECH Open Access Publisher; 2012.
142. Ennaceur A, Delacour J: **A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data.** *Behav Brain Res* 1988, **31**(1):47-59.
143. Baxter MG: **"I've seen it all before": explaining age-related impairments in object recognition. Theoretical comment on Burke et al. (2010).** *Behav Neurosci* 2010, **124**(5):706-709.
144. Hammond RS, Tull LE, Stackman RW: **On the delay-dependent involvement of the hippocampus in object recognition memory.** *Neurobiol Learn Mem* 2004, **82**(1):26-34.
145. Barkus C, Sanderson DJ, Rawlins JNP: **What causes aberrant salience in schizophrenia? A role for impaired short-term habituation and the GRIA1 (GluA1) AMPA receptor subunit.** *Molecular psychiatry* 2014, **19**(10):1060-1070.
146. Božina N: **The pharmacogenetics of warfarin in clinical practice.** *Biochemia Medica* 2010, **20**(1):33-44.
147. Leblanc C, Presse N, Lalonde G, Dumas S, Ferland G: **Higher vitamin K intake is associated with better INR control and a decreased need for INR tests in long-term warfarin therapy.** *Thrombosis research* 2014, **134**(1):210-212.
148. Price PA, Williamson MK: **Effects of warfarin on bone. Studies on the vitamin K-dependent protein of rat bone.** *J Biol Chem* 1981, **256**(24):12754-12759.

149. Howe AM, Webster WS: **Warfarin exposure and calcification of the arterial system in the rat.** *Int J Exp Pathol* 2000, **81**(1):51-56.
150. Li Q, Guo H, Chou DW, Harrington DJ, Schurgers LJ, Terry SF, Uitto J: **Warfarin accelerates ectopic mineralization in Abcc6(-/-) mice: clinical relevance to pseudoxanthoma elasticum.** *Am J Pathol* 2013, **182**(4):1139-1150.
151. Schurgers LJ, Joosen IA, Laufer EM, Chatrou MLL, Herfs M, Winkens MHM, Westenfeld R, Veulemans V, Krueger T, Shanahan CM *et al*: **Vitamin K-antagonists accelerate atherosclerotic calcification and induce a vulnerable plaque phenotype.** *PLoS ONE* 2012, **7**(8):e43229.
152. Spronk HMH, Soute BAM, Schurgers LJ, Thijssen HHW, De Mey JGR, Vermeer C: **Tissue-specific utilization of menaquinone-4 results in the prevention of arterial calcification in warfarin-treated rats.** *J Vasc Res* 2003, **40**(6):531-537.
153. Essalihi R: **A new model of isolated systolic hypertension induced by chronic warfarin and vitamin K1 treatment.** *Am J Hypertens* 2003, **16**(2):103-110.
154. Menard C, Quirion R, Bouchard S, Ferland G, Gaudreau P: **Glutamatergic signaling and low prodynorphin expression are associated with intact memory and reduced anxiety in rat models of healthy aging.** *Frontiers in aging neuroscience* 2014, **6**:81.
155. Biessels GJ, Kamal A, Urban IJ, Spruijt BM, Erkelens DW, Gispen WH: **Water maze learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-diabetic rats: effects of insulin treatment.** *Brain Res* 1998, **800**(1):125-135.
156. Gallagher M, Burwell R, Burchinal M: **Severity of spatial learning impairment in aging: development of a learning index for performance in the Morris water maze.** *Behav Neurosci* 1993, **107**(4):618-626.
157. Morris RG, Hagan JJ, Rawlins JN: **Allocentric spatial learning by hippocampectomised rats: a further test of the "spatial mapping" and "working memory" theories of hippocampal function.** *Q J Exp Psychol B* 1986, **38**(4):365-395.
158. Burke SN, Ryan L, Barnes CA: **Characterizing cognitive aging of recognition memory and related processes in animal models and in humans.** *Frontiers in aging neuroscience* 2012, **4**:15.

159. Brooks SP, & Dunnett, S. B.: **Tests to assess motor phenotype in mice: a user's guide.** *Nat Rev Neurosci* 2009, **10**(7):519-529.
160. Dawson GR, & Tricklebank, M. D.: **Use of the elevated plus maze in the search for novel anxiolytic agents.** *Trends Pharmacol Sci* 1995, **16**(2):33-36.
161. Taggart WV, Matschiner JT: **Metabolism of menadione-6,7-3H in the rat.** *Biochemistry* 1969, **8**(3):1141-1146.
162. Nakajima M, Furukawa, S., Hayashi, K., Yamada, A., Kawashima, T., & Hayashi, Y.: **Age-dependent survival-promoting activity of vitamin K on cultured CNS neurons.** *Developmental brain research* 1993, **73**(1):17-23.
163. Nehlig A: **The neuroprotective effects of cocoa flavonol and its influence on cognitive performance.** *British Journal of clinical pharmacology* 2013, **75**(3):716-727.
164. Rendeiro C, Guerreiro JD, Williams CM, Spencer JP: **Flavonoids as modulators of memory and learning: molecular interactions resulting in behavioural effects.** *Proc Nutr Soc* 2012, **71**(2):246-262.
165. Spencer JP: **Beyond antioxidants: the cellular and molecular interactions of flavonoids and how these underpin their actions on the brain.** *Proc Nutr Soc* 2010, **69**(2):244-260.
166. Strasser A, O'Connor, L., & Dixit, V. M. : **Apoptosis signaling.** *Annual review of biochemistry* 2000, **69**(1):217-245.
167. Ravagnan L, Roumier, T., & Kroemer, G. : **Mitochondria, the killer organelles and their weapons.** *Journal of cellular physiology* 2002, **192**(2):131-137.
168. Ouyang L, Shi, Z., Zhao, S., Wang, F. T., Zhou, T. T., Liu, B., & Bao, J. K. : **Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis.** *Cell proliferation* 2012, **45**(6):487-498.
169. Yu SP, Canzoniero, L. M., & Choi, D. W. : **Ion homeostasis and apoptosis.** . *Current Opinion in Cell Biology* 2001, **13**(4):405-411.
170. Parrish AB, Freel, C. D., & Kornbluth, S. : **Cellular mechanisms controlling caspase activation and function.** . *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2013, **5**(6):a008672.

171. De la Cadena SG, & Massieu, L. : **Caspases and their role in inflammation and ischemic neuronal death. Focus on caspase-12.** . *Apoptosis* 2016:1-12.
172. Sweatt JD: **The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory.** *J Neurochem* 2001, **76**(1):1-10.
173. Sweatt JD: **Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory.** *Curr Opin Neurobiol* 2004, **14**(3):311-317.
174. Rendeiro C, Vauzour D, Rattray M, Waffo-Teguo P, Merillon JM, Butler LT, Williams CM, Spencer JP: **Dietary levels of pure flavonoids improve spatial memory performance and increase hippocampal brain-derived neurotrophic factor.** *PLoS ONE* 2013, **8**(5):e63535.
175. Rathod RS, Khaire AA, Kale AA, Joshi SR: **Effect of vitamin B12 and omega-3 fatty acid supplementation on brain neurotrophins and cognition in rats: A multigeneration study.** *Biochimie* 2016, **128-129**:201-208.
176. Block ML, Hong JS: **Chronic microglial activation and progressive dopaminergic neurotoxicity.** *Biochem Soc Trans* 2007, **35**(Pt 5):1127-1132.
177. Lull ME, Block ML: **Microglial activation and chronic neurodegeneration.** *Neurotherapeutics* 2010, **7**(4):354-365.

Annexe 1

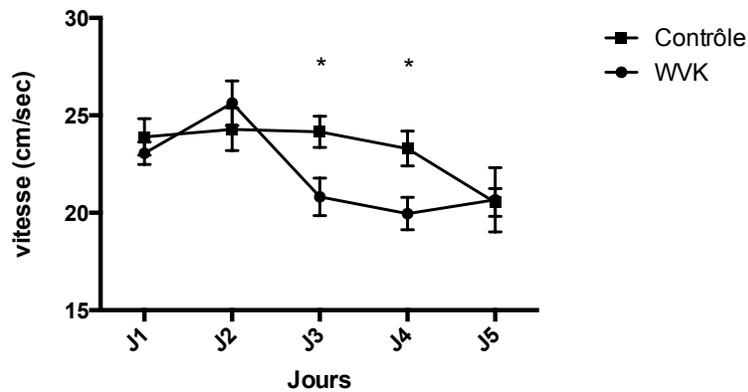


Figure 24.

Vitesse de nage des rats dans le test de la PM version classique. Les rats WVK nagent moins rapidement que les rats contrôles aux jours 3 et 4 (respectivement $p=0,024$ et $p=0,019$). Les résultats présentés sont les moyennes par groupes et les SEM. Contrôle : $n=6$; WVK : $n=7$.

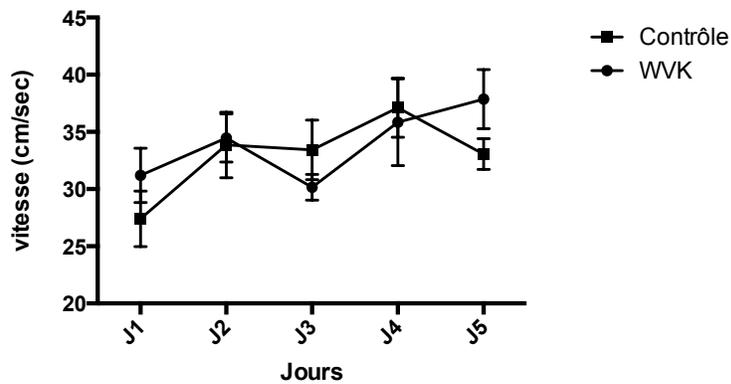


Figure 25.

Vitesse de nage des rats dans le test de la PM version modifiée. Il y a une différence de vitesse de nage significative avec le temps ($p=0,021$), mais pas de différence significative entre les groupes. Les résultats présentés sont les moyennes par groupes et les SEM. Contrôle : $n=6$; WVK : $n=7$.

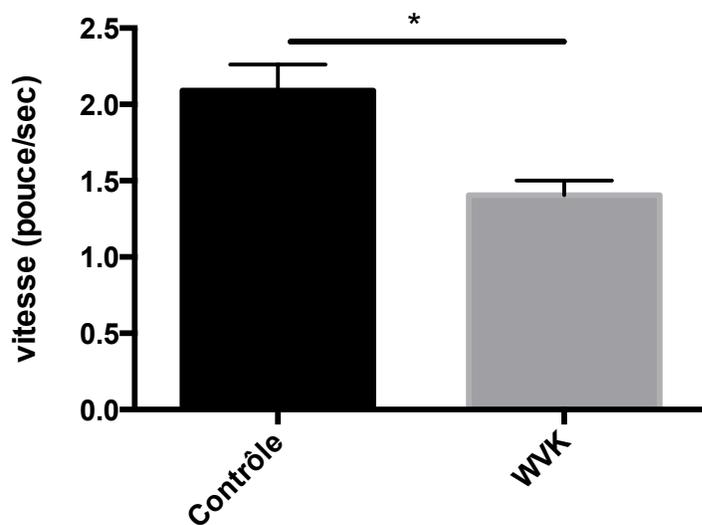


Figure 26. **Vitesse de marche des rats dans le LCS.** Il y a une différence significative entre les groupes ($p=0,005$). Les résultats présentés sont les moyennes par groupes et les SEM. Contrôle : $n=5$; WVK : $n=6$.

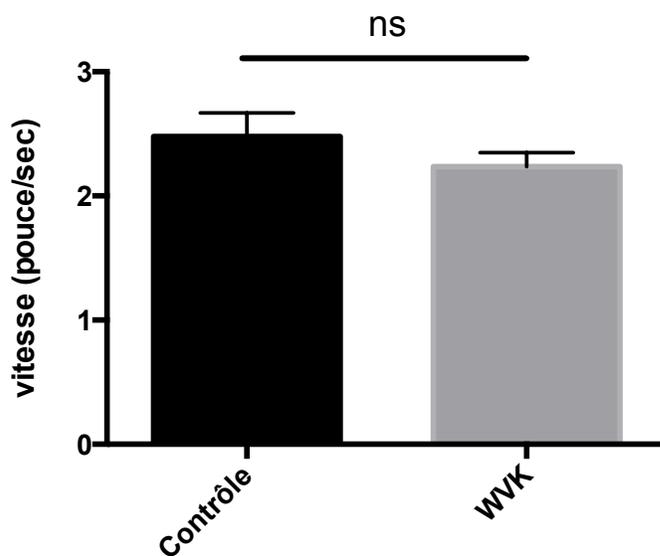


Figure 27. **Vitesse de marche des rats dans le test du CO.** Il n'y a pas de différence significative entre les groupes, mais une tendance des rats WVK à marcher plus lentement que les rats contrôles. Les résultats présentés sont les moyennes par groupes et les SEM. Contrôle : $n=6$; WVK : $n=7$.

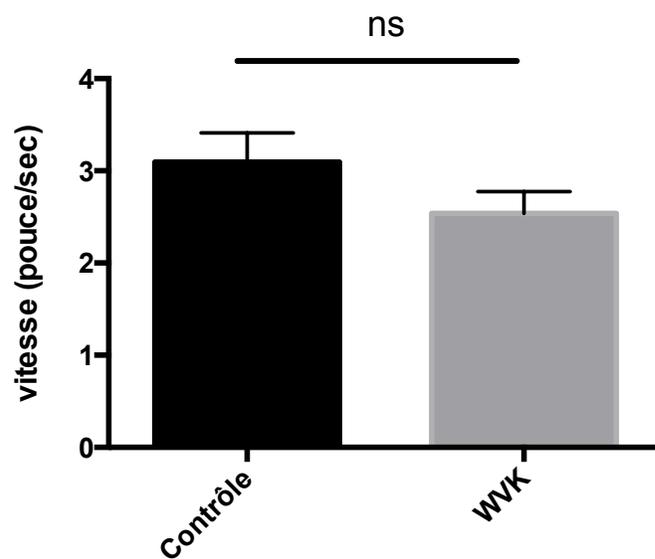


Figure 28.

Vitesse de marche des rats pendant le test de la RO. Il n'y a pas de différence significative entre les groupes, mais une tendance des rats WVK à marcher plus lentement que les rats contrôles. Les résultats présentés sont les moyennes par groupes et les SEM. Contrôle : n=6; WVK : n=7.

