

Université de Sherbrooke

**Modulation neuroinflammatoire développementale ^{dans} la physiopathologie des lésions
cérébrales néonatales**

Par
Marie-Elsa Brochu
Département de pédiatrie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention
du grade de maître ès sciences (M.Sc.) en immunologie

Sherbrooke, Québec, Canada
Avril 2011

Membres du jury d'évaluation
Guillaume Sébire, Programmes d'immunologie et de physiologie, UdeS
Claire Dubois, Programme d'immunologie, UdeS
Sylvain Grignon, Programme de physiologie, UdeS



Library and Archives
Canada

Published Heritage
Branch

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Direction du
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 978-0-494-88790-5

Our file Notre référence

ISBN: 978-0-494-88790-5

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

Canada

Modulation neuroinflammatoire développementale dans la physiopathologie des lésions cérébrales néonatales

Par Marie-Elsa Brochu
Département de pédiatrie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.) en immunologie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Qc, Canada, J1H 5N4

Introduction : Les lésions cérébrales du nouveau-né sont majoritairement causées par un manque d'oxygène et/ou une infection périnatale. Le profil des lésions cérébrales retrouvées chez le nouveau-né prématuré diffère de celui retrouvé à terme, malgré les mêmes facteurs de risque qui sont décrits. Une corrélation positive de l'expression de cytokines et la présence de dommages cérébraux est établie. Pourtant, bien qu'il soit connu que la réponse anti-inflammatoire vienne contrebalancer les effets pro-inflammatoires pouvant être délétères, très peu de données sont disponibles sur l'expression intracérébrale de cytokines anti-inflammatoires dans le contexte de lésions cérébrales du nouveau-né. De plus l'apport de l'immunité systémique est connu dans les dommages cérébraux chez l'adulte, mais peu connu chez le nouveau-né. Ce projet a pour but de comparer la réponse neuroinflammatoire dans les lésions cérébrales d'un cerveau prématuré versus à terme.

Méthodes : Dans un modèle animal de rats ayant une maturation cérébrale correspondant à un humain prématuré (jour post-natal (P)1) versus un humain à terme (P12), l'expression intracérébrale de cytokines anti-inflammatoires (IL-6, TGF β 1, IL-10 et IL-1ra) et pro-inflammatoires (IL-1 β et du TNF α) est déterminée par ELISA et IHC suite à une exposition au LPS et/ou à l'HI postnatale. L'expression des chimiokines CINC-1 et MCP-1 respectivement impliquée dans le recrutement des neutrophiles et des macrophages sera étudiée, en plus des cellules infiltrantes elles-mêmes.

Résultats : Le cerveau de rats à P1 ne démontre aucune augmentation de l'expression de ces cytokines anti-inflammatoires, contrairement aux cerveaux à P12 des rats exposés à l'HI et au LPS+HI qui présente une augmentation de cytokines dans l'hémisphère ipsilatérale à l'ischémie. Cette augmentation est détectée autant dans la substance grise que blanche. L'augmentation des cytokines pro-inflammatoires est retrouvée seulement par IHC à P1 dans les conditions HI et LPS+HI, mais est retrouvé aussi à P12. Le recrutement de neutrophiles et macrophages est détecté à P12 suite à l'exposition à l'HI avec ou sans LPS.

Conclusion : Notre travail démontre que la réponse neuroinflammatoire chez le prématuré est immature, comparativement à celle chez le nouveau-né à terme exposé à de mêmes agressions.

Mots clés : Dommages cérébraux, développement, prématurité, hypoxie-ischémie, LPS, cytokines, chimiokines.

*La réussite, c'est un peu de savoir,
un peu de savoir-faire
et beaucoup de faire-savoir.*

– Jean NOHAIN

Table des matières

A. Introduction

1. Système nerveux central	p.1
1.1 Substance grise	p.1
1.2 Substance blanche	p.2
1.3 Composants cellulaires	p.3
2. Paralyse cérébrale	p.6
2.1 Les lésions cérébrales chez le nouveau-né prématuré	p.7
2.2 Les lésions cérébrales chez le nouveau-né à terme	p.8
2.3 Traitement et prévention de la PC	p.10
3. Modèles animaux de dommages cérébraux	p.10
3.1 Modèle animaux d'exposition à l'hypoxie-ischémie	p.11
3.2 Modèle animaux d'exposition au LPS	p.13
3.3 Modèle animaux d'exposition combinant LPS+HI	p.14
4. Cytokines anti-inflammatoires et/ou neurotrophiques	p.16
4.1 L'interleukine-6 dans le SNC	p.16
4.2 Le <i>Transforming Growth Factor β1</i> dans le SNC	p.20
4.3 L'interleukine-10 dans le SNC	p.24
4.4 L'interleukine-1ra dans le SNC	p.27
5. Chimiokines et recrutement cellulaire cérébral de macrophages et neutrophiles dans le contexte néonatal	p.27
6. Hypothèses et objectifs de recherche	p.29

B. Article

Avant-propos	p.31
Résumé	p.31
Article	p.33

C. Discussion et conclusion

p.56

D. Remerciements

p.66

E. Liste des références

p.67

F. Annexes

p.77

1. Matériel et méthodes supplémentaires	p.77
2. Résultats supplémentaires	p.81
3. Discussion des résultats supplémentaires	p.83

Liste des tableaux

Tableau 1. Résumé des résultats à P1 et P12.	p.57
Tableau 2. Amorces et programmes pour les réactions d'amplification en chaîne	p.77

Liste des figures

A. Introduction

Figure 1. Anatomie du cerveau humain	p.2
Figure 2. Maturation des oligodendrocytes.	p.7
Figure 3. Incidence des lésions cérébrales périnatales selon la maturité développementale.	p.9
Figure 4. Voies de signalisation de l'IL-6.	p.17
Figure 5. Structure du TGF β en association avec ses protéines de latence	p.21
Figure 6. Voies de signalisation du TGF β 1.	p.23
Figure 7. Voies de signalisation de l'IL-10.	p.25

B. Article

Figure 1. Comparison between P1 and P12 ELISA titrations of brain anti-inflammatory cytokines.	p.38
Figure 2. Comparison between P1 and P12 immunostaining intensities of IL-6 and IL-10 in brain.	p.40
Figure 3. Comparison between P1 and P12 immunostaining intensities of IL-1ra and TGF- β 1 in brain.	p.41
Figure 4. P1 versus P12 ELISA titrations and immunostaining intensities of cerebral pro-inflammatory cytokines, IL-1 β and TNF- α .	p.43
Figure 5. P1 versus P12 intracerebral expressions of CINC-1 and levels of neutrophil infiltrations.	p.45
Figure 6. P1 versus P12 intracerebral expressions of MCP-1, levels of neutrophil infiltrations, and BBB leakage.	p.47

C. Discussion et conclusion

Figure 8. Événements séquentiels hypothétiques suite à l'induction de lésions cérébrales chez le rat à P12 p.63

Figure 9. Événements séquentiels hypothétiques suite à l'induction de lésions cérébrales chez le rat à P12 p.64

F. Annexe

Figure 1. Analyse de l'intensité de marquage IHC. p.81

Figure 2. Expression intracérébrale de l'ARNm de l'IL-6 l'IL-10 et du TGF β 1. p.82

Figure 3. Expression intracérébrale d'IL-6 et de TGF β 1 à P1. p.83

Liste des abréviations

AVC	Accident vasculaire cérébral
CINC-1	Cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1
E. coli	Escherichia Coli
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate dehydrogenase
H	Hypoxie
HIF	Hypoxia inducible factor
I	Ischémie
i.p.	Intrapéritonéal
IF	Immunofluorescence
IHC	Immunohistochimie
IL	Interleukine
IL-1ra	Antagoniste du récepteur à l'IL-1
IL-10R	Récepteur de l'IL-10
IL-6R	Récepteur de l'IL-6
LAP	latency-associated peptide
LPS	Lipopolysaccharide
LPV	Leucomalaciques périventriculaires
LTBP	Latent TGF binding protein
MCAO	Occlusion de l'artère cérébrale moyenne
MCP-1	Macrophage chemoattractant protein-1
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
NNS	Nécrose neuronale sélective
NO	Oxide nitrique
OL	Oligodendrocyte
P1	Jour postnatal 1
P12	Jour postnatal 12
PC	Paralysie cérébrale
PMN	Polymorphonucléaire
SB	Substance blanche
SOCS	Suppressor of cytokine signalling proteins
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TGF	Transforming growth factor
TGFR	Récepteur du TGF β
TLR4	Toll-like receptor 4

A. INTRODUCTION

Une part importante des troubles neurodéveloppementaux, comme l'autisme, les troubles d'apprentissage, l'épilepsie ou encore la paralysie cérébrale, résultent de dommages cérébraux périnataux et sont des problèmes de santé majeurs qui affectent le fonctionnement du cerveau principalement aux niveaux cognitif et moteur. Certaines de ces conditions ont des répercussions importantes tout au long de la vie des personnes atteintes. La recherche en neurologie pédiatrique est d'une importance capitale pour mieux comprendre leurs physiopathologies. Un prérequis d'une telle recherche est d'abord une bonne compréhension de l'organe le plus complexe de l'organisme, le cerveau, qui fait partie du système nerveux central.

1. SYSTÈME NERVEUX CENTRAL

De pair avec le système nerveux périphérique, le système nerveux central (SNC) a pour rôle de coordonner le fonctionnement du corps humain entier et de l'adapter à une immense variété de circonstances de la vie. Il contient tous les noyaux et les centres de coordination et de motricité et est donc au centre de nos pensées, actions, faits et gestes. Le SNC est constitué de l'encéphale, du tronc cérébral, du cervelet, et de la moelle épinière. Le cerveau est irrigué par deux artères carotides internes et deux artères vertébrales. Le SNC peut se diviser en deux parties en termes de coloration macroscopique de ses principaux tissus, soit la substance grise et la substance blanche.

1.1 Substance grise

Dans le cerveau, la substance grise se situe dans la partie externe, soit juste en dessous de la boîte crânienne, et constitue principalement le cortex cérébral. Elle contient majoritairement une forte densité de corps cellulaires neuronaux et de capillaires d'où la couleur gris-brun de cette matière. Les ganglions (ou noyaux gris) de la base sont une autre partie de la substance grise, constituant un ensemble de noyaux regroupant entre autre, le thalamus et le striatum (c.f. Figure 1). Ils sont situés au centre de chacun des hémisphères.

Ils sont impliqués, entre autre, dans un système de contrôle de la coordination des mouvements.

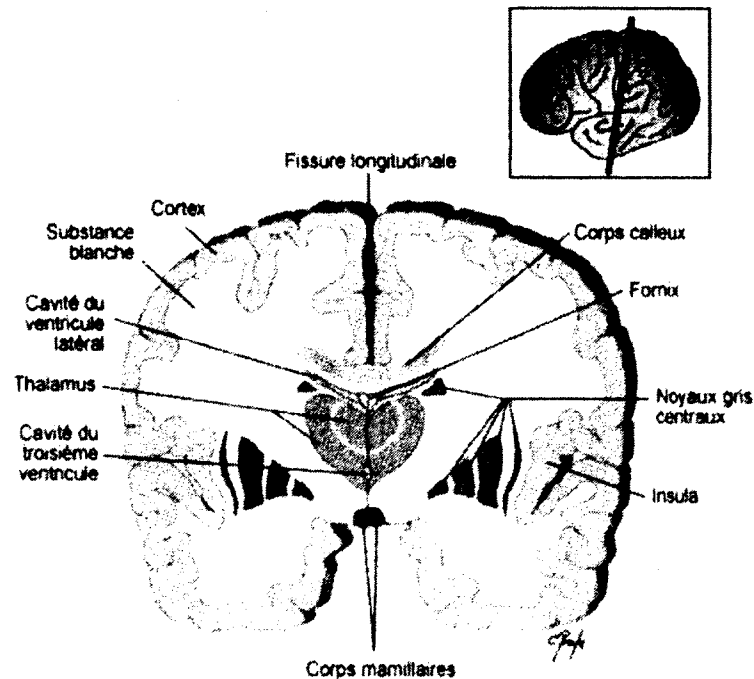


Figure 1. Anatomie du cerveau humain. Différentes structures du cerveau humain sont représentées sur une coupe coronale, notamment la substance blanche, comprenant le corps calleux, et la substance grise, contenant le cortex et les noyaux gris centraux.

1.2 Substance blanche

La substance blanche est située au niveau du cerveau entre les noyaux gris de la base et le cortex, et aussi au niveau de faisceaux commissuraux (corps calleux par exemple) ou de projections (corticospinal par exemple). Elle est principalement composée de prolongements axonaux myélinisés et d'oligodendrocytes ce qui lui confère sa coloration blanchâtre. Le corps calleux est une partie de la substance blanche qui traverse la quasi-totalité du cerveau de l'avant vers l'arrière et qui fait le pont entre les deux hémisphères cérébraux (c.f. Figure 1).

1.3 Composants cellulaires

Deux catégories cellulaires sont principalement retrouvées dans le SNC, les neurones, qui sont les premières cellules à se différencier chez l'embryon, et les cellules gliales qui se développent par la suite. Ensemble, ces cellules interagissent afin d'orchestrer le bon fonctionnement du SNC.

Neurones

Les neurones sont des cellules hautement différenciées, connues comme étant les unités fonctionnelles du SN. Elles forment un large réseau à la grandeur du corps et sont spécialisées dans la réception, l'intégration et transmission de l'information. L'axone est entouré d'une gaine de myéline, produite par l'oligodendrocyte, qui rend la conduction de l'influx nerveux rapide et efficace. Les trois derniers mois de gestation sont très critiques pour le développement cérébral, puisque les neurones y développent leurs prolongements puis se connectent entre eux et aussi avec les autres cellules du cerveau. La capacité de remplacement des neurones est faible. Ainsi, après une lésion cérébrale, les neurones endommagés ne seront pas tous remplacés.

Cellules gliales

Les cellules gliales sont dix fois plus nombreuses que les neurones et sont reconnues comme étant les cellules de soutien du SN. Elles font le lien avec les vaisseaux sanguins, rentrant dans la constitution de la BHE, et fournissent l'apport de nutriments aux cellules nerveuses. Contrairement aux neurones, ces cellules sont plus facilement renouvelables. Il existe trois types principaux de cellules gliales dans le SNC : astrocyte, microglie et oligodendrocyte.

Astrocytes

Les astrocytes ont une forme étoilée et leur cytoplasme ainsi que leurs prolongements sont faits de filaments riches en protéine glio-fibrillaire acide (GFAP) — utilisée couramment comme marqueur astrocytaire — et en glycogène, réserve énergétique principale du SNC (Seth et Koul, 2008). Les astrocytes forment un large réseau entre les neurones, et sont ainsi bien positionnés pour mettre en œuvre leur fonction de support trophique neuronal. Les jonctions intercellulaires étroites et serrées entre les pieds astrocytaires bordant les cellules endothéliales des capillaires cérébraux constituent la barrière hématoencéphalique et empêchent plusieurs substances de pénétrer le cerveau via le système sanguin qui est la seule porte d'entrée vers le cerveau (Kaur et Ling, 2008).

Lors de lésions cérébrales, les astrocytes aident à la survie neuronale en synthétisant et fournissant les nutriments essentiels aux neurones. D'autre part, les astrocytes participent à la cicatrisation des dommages du tissu cérébral. Dans des contextes pathologiques, les astrocytes s'activent, deviennent hypertrophiés et/ou hyperplasiés et prolifèrent de manière à combler le vide laissé par les neurones qui n'ont pu être rescapés, un phénomène appelé astrogliose (Sen et Levison, 2006).

Microglie

La cellule microgliale est le macrophage résident du SNC et est exprimée de manière ubiquitaire dans le SNC. La microglie peut se retrouver sous deux différentes formes, soit ramifiée ou améboïde.

La forme ramifiée est adoptée par la microglie qui n'a pas reçu de stimulus d'activation. Sous cette forme, la cellule a des prolongements qui permettent une mobilité constante à travers le SNC. Elle a un rôle au niveau du maintien de l'homéostasie du SNC, de la surveillance cérébrale pour répondre rapidement aux pathogènes et/ou à leurs toxines, ou tout autres types de dommages cérébraux, ou encore pour éliminer les débris cellulaires par

phagocytose. Elle détecte donc les dérangements de l'intégrité fonctionnelle et structurale au sein du SNC.

La microglie peut être activée par différents stimuli, entre autre, par l'ADN bactérien ou viral, ou par le lipopolysaccharide (LPS), un composant de la paroi des bactéries Gram négatif. Certaines cytokines ont également la capacité d'activer la microglie. Activée, elle perd ses ramifications et prend une forme améboïde. Sous cette forme, la cellule microgliale est donc active. Elle prolifère, exprime plus d'antigène de surface, secrète un nombre plus élevé de cytokines pro- et anti-inflammatoire et relâche différents facteurs de croissance et des facteurs neurotrophiques (Nelson *et al.*, 2002, Soulet et Rivest, 2008).

La microglie peut également contribuer à aggraver des dommages cérébraux. En fait, si la microglie est suractivée, de façon aigüe ou chronique, sa réponse sera inadéquate et cela peut être néfaste pour les autres cellules gliales et les neurones environnants. La microglie relâche entre autre, des cytokines pro-inflammatoires, des radicaux libres, des métalloprotéases, et du NO, qui en grande quantité, peuvent endommager les neurones, les oligodendrocytes et la matrice extracellulaire (Kim et De Vellis, 2005).

Oligodendrocytes

Les oligodendrocytes sont de petites cellules dont la grande majorité est située dans la substance blanche. Leur principal rôle est de produire la myéline par leurs fins prolongements qui entourent les axones. Un bris dans la myélinisation peut entraîner une désorganisation dans la transmission de l'influx nerveux. Ce dérèglement mène à des troubles de nombreuses fonctions cérébrales, mais particulièrement marquées souvent au début de ce type de maladie au niveau de la motricité comme observées au cours de la sclérose en plaques ou de la paralysie cérébrale (Miller, 2002).

2. PARALYSIE CÉRÉBRALE

La paralysie cérébrale (PC), aussi appelée déficience motrice cérébrale, est un désordre neurologique non évolutif et non héréditaire, qui résulte principalement de lésions cérébrales acquises durant la période périnatale. Ce désordre neurologique est caractérisé principalement par des déficits moteurs engendrant des troubles de coordination et de contrôle musculaire, et peut également mener à des problèmes de posture ou encore à des troubles d'équilibre. Des troubles cognitifs menant à des difficultés d'apprentissage peuvent être également présents chez le sujet atteint de PC (Jacobsson et Hagberg, 2004, Nelson, 2003).

La PC touche en moyenne de 2 à 3 nouveau-nés sur 1000 dans les pays développés (Jacobsson et Hagberg, 2004). Cette incidence s'accroît à mesure que le temps de grossesse diminue. La prématurité du nouveau-né est donc un facteur de risque majeur dans la prédisposition à la PC. Entre autre, les enfants nés à moins de 28 semaines de gestation ont un risque 100 fois plus élevé que les enfants nés à terme (O'shea, 2008). Pourtant, près de la moitié des enfants atteints de PC sont nés à terme, les naissances à terme étant beaucoup plus nombreuses que celles qui sont prématurées (Nelson, 2003). Il est donc tout aussi important de considérer les deux conditions – prématuré et à terme — dans l'analyse des mécanismes physiopathologiques et donc aussi dans l'élaboration de modèles précliniques.

Mise à part la prématurité, le manque d'oxygénation et l'ischémie cérébrale ont longtemps été presque exclusivement associés au développement de lésions cérébrales menant à la PC. Mais, en dépit du progrès dans les soins néonataux visant à contrôler l'oxygénation cérébrale du nouveau-né, l'incidence de la PC n'a pas diminuée. Il a d'ailleurs été récemment démontré que les manques d'oxygénation sévères et purs seraient en cause dans moins de 10 % des cas de PC (O'shea, 2008). Depuis environ 10 ans, un lien entre les infections bactériennes périnatales et la PC a été progressivement établi, offrant une nouvelle avenue de recherche qui s'avère prometteuse. Les infections durant la gestation ou directement chez le nouveau-né, par exemple les infections bactériennes à *Escherichia Coli*, sont corrélées avec le développement subséquent de la PC (Wang *et al.*, 2006).

On peut également mentionner parmi les autres facteurs de risque de PC l'incompatibilité rhésus menant à la jaunisse, aujourd'hui contrôlée grâce à des traitements préventifs, ou encore l'exposition à l'alcool et/ou la drogue durant la grossesse, certaines infections virales, la malnutrition et les grossesses multiples. Cependant, ce sont tous des facteurs de moindre importance en terme de fréquence (Jacobsson et Hagberg, 2004).

2.1 Lésions cérébrales chez le nouveau-né prématuré

De nombreuses pathologies peuvent survenir au niveau cérébral chez le prématuré, comme l'hémorragie intraventriculaire ou encore des dommages au cervelet, mais les lésions de la substance blanche cérébrale, notamment les leucomalacies périventriculaires (LPV) demeurent prédominantes et mènent principalement à la PC (Khwaja et Volpe, 2008). Les LPV sont caractérisées par des lésions de la substance blanche, plus particulièrement dans la région adjacente aux ventricules latéraux correspondant à la zone sous-ventriculaire (Back et Rivkees, 2004, Yager et Ashwal, 2009). Les LPV existent sous deux formes, soit focales, soit diffuses. La composante focale est une nécrose profonde causant une perte cellulaire souvent macroscopique, tandis que les LPV diffuses sont caractérisées par une réaction de gliose avec une diminution du nombre d'OL affectant l'ensemble de la substance blanche (Volpe, 2009).

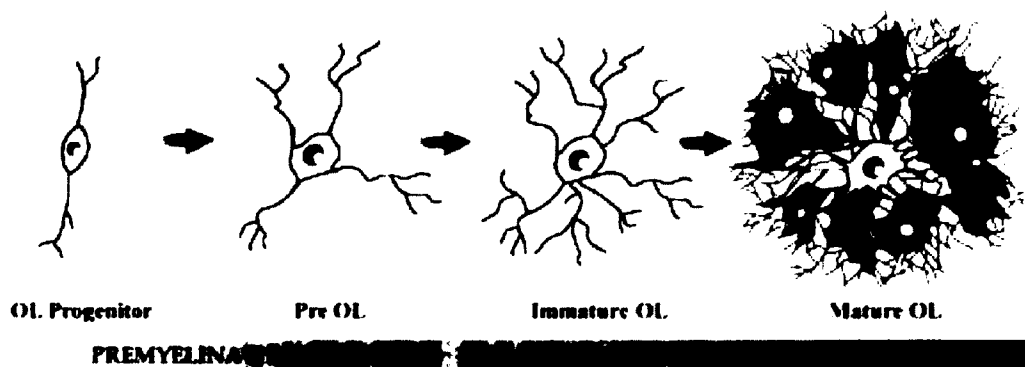


Figure 2. Maturation des oligodendrocytes. Les cellules précurseurs des oligodendrocytes sont incapables de myéliniser les neurones qui les entoure. Cette fonction vient avec la maturation cellulaire lors du développement cérébral.

Selon certaines hypothèses, la formation de ces lésions pourrait être en partie expliquée par l'immaturation des oligodendrocytes qui sont présents dans la substance blanche périventriculaire (Wyatt, 2007). En fait, lors du développement cérébral, les oligodendrocytes n'ont pas encore atteint leur forme mature (c.f. Figure 2). Ils sont à un stade où ils ne produisent pas encore de myéline et un dommage les empêcherait donc de devenir matures. Par ailleurs, certains travaux montrent une vulnérabilité particulière des oligodendrocytes immatures à l'hypoxie (Back et al, 2006). Le risque de développer des LPV semble corrélé avec le niveau de maturation des OL; elles sont donc moins fréquentes chez l'enfant né à terme qui présente d'autres patrons de lésions décrites dans la section suivante (Marret, 2003) (c.f. Figure 3). Des phénomènes de nécrose et de gliose dans la substance grise peuvent aussi être présents parallèlement avec les LPV, entre autre dans les ganglions de la base, le thalamus et le cortex cérébral (Volpe, 2009). En effet, les axones traversant les zones de LPV sont endommagés par ces lésions, ce qui peut mener à la dégénérescence du corps cellulaire des neurones dont ils proviennent. Des atteintes directes des neurones sont aussi observées chez les prématurés, à distance des dommages de la substance blanche (lésions dites de nécrose neuronale sélective). Plusieurs facteurs sont soupçonnés d'être impliqués dans la genèse des dommages de la substance blanche, au-delà des situations d'hypoxie, notamment les cytokines inflammatoires, les radicaux libres et le glutamate, ce dernier produisant des lésions dites excitotoxiques (Back et Rivkees, 2004).

2.2 Lésions cérébrales chez le nouveau-né à terme

Bien qu'ils aient une prédisposition moins élevée à développer des dommages cérébraux que les prématurés, certains nouveau-nés à terme développent tout de même des dommages, et ceux-ci sont souvent beaucoup plus étendus que chez le prématuré. Comparativement aux enfants prématurés qui ont majoritairement des atteintes de la substance blanche, les enfants nés à terme ont plutôt une susceptibilité à développer des dommages de la substance grise, souvent retrouvés sous forme de nécroses neuronales étendues formant des infarctus cavitaires (c.f. Figure 3). Les ganglions de la base, le cortex, et la substance blanche sous jacente au cortex sont les principales régions atteintes, particulièrement dans la région parasagittale (ou frontopariétale) de l'encéphale (Wyatt,

2007). Il est possible selon certaines hypothèses que, les neurones encore peu différenciés des nouveau-nés prématurés, et consommant moins d'oxygène, soient moins sensibles aux agressions, notamment de type hypoxique ou ischémique, ce qui fait en sorte que les dommages de la substance grise chez ces nouveau-nés prématurés soient moins importants que ceux retrouvés chez le nouveau-né à terme (Towfighi *et al.*, 1997). Les lésions cérébrales chez les nouveau-nés à terme peuvent être causées suite à une période d'asphyxie aigüe pure (par exemple lors d'une compression du cordon ombilical (procidence) ou d'un décollement placentaire), mais d'autres facteurs notamment infectieux/inflammatoires sont aussi corrélés avec le développement de dommages cérébraux chez ces nouveau-nés à terme (Fatemi *et al.*, 2009, Wyatt, 2007). Comme dans les dommages cérébraux du prématuré, l'excitotoxicité, le glutamate et les médiateurs inflammatoires, tels que les cytokines, sont associés avec les lésions cérébrales (Fatemi *et al.*, 2009).

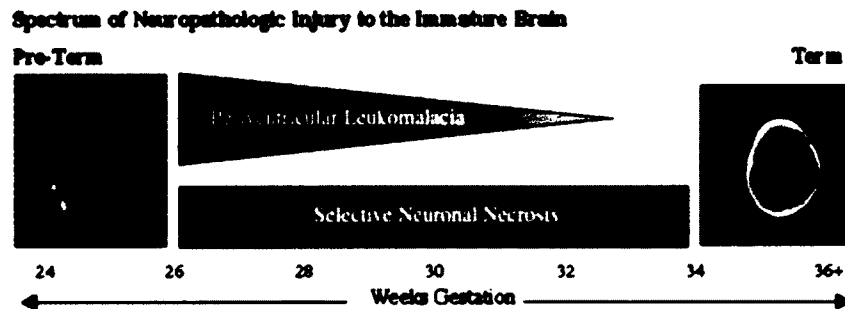


Figure 3. Incidence des lésions cérébrales périnatales selon la maturité développementale. Les LPV sont prédominantes chez le grand prématuré, son incidence étant inversement proportionnelle à la durée de gestation. Les nécroses neuronales sélectives sont présentes peu importe le niveau de développement du nouveau-né.

2.3 Traitement et prévention de la PC

À ce jour, l'hypothermie contrôlée (environ 35-36°C) est utilisée chez les nouveau-nés à terme présentant une encéphalopathie néonatale sévère et semble avoir un certain effet neuroprotecteur. Par contre ce procédé n'est applicable que sur une mince population atteinte de la PC; soit ceux nés à terme, ayant accès rapidement à ce type de soin, et ayant des symptômes sévères dès la naissance qui sont présents seulement chez une minorité de patients qui développeront ultérieurement la PC. Les glucocorticoïdes sont utilisés contre les infections, conjointement avec les antibiotiques, mais ont beaucoup d'effets secondaires pouvant être néfastes chez le nouveau-né, et leur bénéfice neurologique est controversé (O'shea, 2008). La différence entre le profil des lésions cérébrales retrouvées chez le nouveau-né à terme et le prématuré est probablement sous-tendue par des causes similaires (hypoxie et/ou infection/inflammation) mais activant des mécanismes physiopathologiques – au moins en partie – différents, notamment, selon notre hypothèse, au niveau du profil de réponse inflammatoire induite à chaque âge.

La PC reste donc une condition sans traitement préventif ni curatif nettement efficace. La poursuite des études pour une meilleure compréhension de la physiopathologie est un prérequis nécessaire à l'amélioration des traitements. Entre autre, les modèles animaux dits « précliniques » reflétant les différents timing et mécanismes physiopathologiques de la PC sont d'une importance capitale pour l'avancement de la connaissance des mécanismes et le développement de nouveaux traitements de la PC.

3. MODÈLES ANIMAUX DE DOMMAGES CÉRÉBRAUX

Il est connu que l'HI peut causer des dommages cérébraux dans les modèles animaux, semblables à ce qu'on retrouve chez les enfants atteints de la PC. De plus, l'infection et/ou l'inflammation est également corrélée avec le développement de lésions cérébrales. Depuis longtemps, l'étude des lésions cérébrales adultes se fait par l'utilisation de modèles d'accidents vasculaire-cérébraux (AVC) et d'exposition au LPS chez le rat qui ont servi de références pour mettre au point des modèles murins de lésions cérébrales chez le nouveau-

né. Mis à part le rat et la souris, certains modèles sont développés chez l'ovine, le lapin ou encore chez le cochon, utilisant l'HI et l'infection ou l'exposition à des fragments de pathogènes, afin de reproduire des dommages cérébraux périnataux. Le rat reste cependant l'espèce la plus étudiée (Hagberg *et al.*, 2002, Yager et Ashwal, 2009).

3.1 Modèles animaux d'exposition à l'hypoxie et/ou ischémie (HI)

L'équipe de Robert et Susan Vannucci est pionnière dans le développement de modèles animaux de dommages cérébraux néonataux via l'exposition à l'hypoxie-ischémie (Rice *et al.*, 1981). Leur modèle a été développé à P7 chez le rat étant donné le stade de développement cérébral similaire à celui du fœtus humain préterme, soit 32-34 semaines de gestation. Dans un même comparatif, un cerveau de raton à P12-13 correspond à un niveau de développement correspondant au nouveau-né humain à terme (Vannucci *et al.*, 1999). De façon générale, une ligature unilatérale permanente ou une occlusion temporaire de l'artère carotide commune droite est faite chez le rat nouveau-né (P5-P12) suivi d'une période d'incubation à faible taux d'oxygène, soit ~6-10% selon les groupes de recherche, pour des durées générales variant de 30 à 270 min (Bona *et al.*, 1999, Eklind *et al.*, 2001, Hagberg *et al.*, 1996, Van Den Tweel *et al.*, 2006).

Dans ces différents modèles animaux, l'HI cause d'importants dommages dans l'hémisphère ipsilatéral à l'ischémie. Les principales régions affectées sont le cortex cérébral, la substance blanche périventriculaire, le striatum et les hippocampes, qui présentent une combinaison de gliose, et de mort neuronale pouvant aboutir à des lésions cavitaires (Vannucci *et al.*, 1999, Yager et Ashwal, 2009). La topographie des lésions varie légèrement selon le niveau de développement dans cet intervalle de temps P5-P12. Par exemple, les lésions de l'hippocampe sont moins marquées à P5 qu'à un âge plus avancé (Towfighi *et al.*, 1997).

Le manque d'oxygène mène d'abord, dans une première vague nocive, à un changement du métabolisme énergétique avec un défaut de synthèse d'ATP créant par exemple un dysfonctionnement des pompes ioniques et éventuellement la mort cellulaire. Le défaut

métabolique oxydatif cause aussi une accumulation de glutamate dans les fentes synaptiques et une suractivation des récepteurs NMDA – dont le glutamate est un ligand — à la surface des neurones qui peut mener à la mort neuronale, par un processus nommé excitotoxicité. Cela peut affecter des voies menant à la génération de radicaux libres qui sont toxiques pour les membranes et l'ADN des cellules qui les produisent et aussi des cellules environnantes. Parmi ces radicaux libres figure par exemple le NO produit via l'activation de la NO synthase (Leonardo et Pennypacker, 2009, Shalak et Perlman, 2004).

Dans une deuxième vague nocive, les médiateurs inflammatoires jouent un rôle neurotoxique. La réaction gliale, soit dans un premier temps l'activation, puis la prolifération des astrocytes et des cellules microgliales, font partie des phénomènes déclenchés par l'HI. Ces cellules activées relâchent différents facteurs pouvant être bénéfiques à la réparation tissulaire, mais en trop grande quantité, la relâche de facteurs, comme les cytokines pro-inflammatoires, est probablement néfaste. L'augmentation de certaines cytokines pro-inflammatoires est également parmi les effets associés à l'HI retrouvés majoritairement dans l'hémisphère ipsilatéral à l'ischémie exclusivement. Entre autre, l'IL-1 β et le TNF α sont les plus étudiés; suite à une agression HI chez le rat adulte, mais aussi chez le raton à P7, ces cytokines sont régulées à la hausse dans le cerveau de ces derniers (Arvin *et al.*, 1996, Silverstein *et al.*, 1997). Par contre, bien qu'il soit connu que les cytokines anti-inflammatoires ont un rôle crucial pour venir contrebalancer la réponse pro-inflammatoire, elles restent peu étudiées dans des modèles de lésions cérébrales chez l'adulte et encore moins chez le nouveau-né. Les quelques études seront présentées dans les sections suivantes. Le recrutement de cellules immunitaires systémiques a également été associé à l'HI adulte, mais semble très différent chez le nouveau-né, où il reste peu étudié comparativement à l'adulte.

Quelques modèles animaux de lésions cérébrales induites par l'HI ont aussi été construits chez le raton à P1-P3, qui a une maturation cérébrale équivalente à celle d'un grand prématuré chez l'homme (G28-32). Notre laboratoire a développé un modèle chez le rat à P1. Ces différentes études ont démontré des lésions cérébrales différentes de ce qui est retrouvé à P7-12, soit des dommages dominant au niveau de la substance blanche, et sous

forme de nécrose neuronale sélective laminaire ou en colonne, comme ce qui est retrouvé en clinique chez le grand prématuré. L'immaturation du développement cérébral pourrait expliquer ces différences avec les modèles animaux plus âgés (Larouche *et al.*, 2005, Sizonenko *et al.*, 2003).

3.2 Modèles animaux d'exposition au lipopolysaccharide (LPS)

Le LPS est un composé structural de la paroi de bactéries Gram (-) comme *E. Coli*, qui induit une forte réponse immunitaire innée. Ses effets font suite à son interaction avec un membre de la famille des Toll-like receptor (TLR), le TLR4. La signalisation de ce dernier peut se faire via une voie dépendante de MyD88, une molécule adaptatrice, ou via la voie indépendante de MyD88 (Lu *et al.*, 2008).

L'injection directe intracérébrale du LPS au niveau de la substance blanche a été faite dans des modèles animaux chez le raton à P5-7 et a démontré des dommages dans cette région. Une réduction du marquage des précurseurs d'OL et de la myélinisation, une dilatation des ventricules et de l'astrogliose dans la substance blanche ont été observés à 3 jours et à 3 semaines post-injection. Une augmentation de l'IL-1 β , du TNF α et de l'IL-6 a également été détectée dans cette région dans les 24h suivant l'injection (Cai *et al.*, 2003, Lehnardt *et al.*, 2002, Pang *et al.*, 2003). Une limitation de ces modèles est liée à la nécessité d'une injection, donc d'une agression traumatique du tissu cérébral venant se combiner avec l'effet du LPS. Leur pertinence est aussi critiquable puisque dans le contexte des lésions cérébrales périnatales humaines générant la PC, il n'y a pas – ou rarement, dans les cas de méningite – de pénétration cérébrale des bactéries.

Des modèles d'infections intra-utérines par l'injection de LPS chez la rate gestante —en fin de gestation — ont été développés afin d'étudier l'effet de l'infection maternelle sur les lésions cérébrales chez le nouveau-né et pour tenter de reproduire la situation clinique très commune d'infection gestationnelle, par exemple au *E. coli*. Ces injections sont faites chez la rate gestante entre le jour 14 de gestation (G14) et la mise bas et à des doses variant entre 0,1 mg/kg et 5 mg/kg, selon les études (Wang *et al.*, 2006). Ce type d'agression mène à la

détection de cytokines pro-inflammatoires dans le placenta (IL-1 β , TNF α , IL-6), le liquide amniotique, mais aussi au sein du cerveau des ratons dans les heures suivant l'agression et peut perdurer jusqu'à environ 1 semaine (Bell *et al.*, 2004, Cai *et al.*, 2000, Gayle *et al.*, 2004, Paintlia *et al.*, 2004).

Les infections bactériennes se produisant directement chez le nouveau-né sont également parmi les facteurs de risque de développement de lésions cérébrales. Des modèles d'infection postnatale dans les premiers jours de vie de raton ont été faits, par contre ces injections sont souvent combinées à l'HI et seront donc discutées ci-dessous.

3.3 Modèles animaux combinant le LPS et l'HI

La combinaison de l'exposition au LPS et à l'HI est peu étudiée dans le contexte des lésions cérébrales périnatales, alors qu'elle correspond à une des situations cliniques les plus fréquentes tant chez le nouveau-né prématuré qu'à terme. Tout de même, il est connu que de façon générale, une exposition systémique au LPS mène à une sensibilisation des animaux à une agression HI subséquente, et donc à une amplification des dommages cérébraux chez le raton (Coumans *et al.*, 2003, Eklind *et al.*, 2001, Wang *et al.*, 2010).

Le développement et la caractérisation d'un modèle murin de lésions cérébrales induites par l'exposition anténatale au LPS et à l'HI à P1 ont été fait au laboratoire (Larouche *et al.*, 2005). De plus, les travaux de Karine Lavoie, M.Sc. au laboratoire ont mené à un modèle similaire de lésions cérébrales à P12 par l'exposition postnatale au LPS et à l'HI. Dans le modèle original développé dans notre laboratoire de combinaison de LPS anténatal suivie d'une HI à P1, des déficits moteurs ont été démontrés. Il a également été montré dans ce modèle, suite à l'HI postnatale, ou à la combinaison LPS+HI, un débalancement dans l'expression intracérébrale du système de l'IL-1, avec une augmentation de l'IL-1 β contrastant avec une diminution de l'IL-1 α . De plus, dans ce modèle il n'y a aucune augmentation du TNF α dans ces conditions expérimentales (Girard *et al.*, 2009, Girard *et al.*, 2008, Roy *et al.*, 2009). Ces résultats indiquent que la réponse neuroinflammatoire à P1 semble bien différente de celle observée chez les animaux légèrement plus matures et chez

l'adulte. Ceci incite à explorer plus avant les particularités de la réponse neuroinflammatoire selon le niveau de développement cérébral et ses liens éventuels avec les variations d'incidence et de pattern de lésions cérébrales du nouveau-né prématuré versus à terme que nous avons détaillées ci-dessus.

Les cytokines sont un point d'intérêt majeur dans l'étude des dommages cérébraux périnataux, mais la majorité des études se limitent à l'étude du TNF α et de l'IL-1 β . Cependant l'étude de Girard et al. qui démontre un déficit dans la production de l'IL-1ra comparativement à la production d'IL-1 β montre bien l'importance de l'étude des systèmes anti-inflammatoires qui viennent normalement atténuer la réponse pro-inflammatoire via une cascade d'interactions réciproques (Girard *et al.*, 2008). Parmi ces cytokines anti-inflammatoires figurent l'IL-6, le TGF β 1, l'IL-10 et l'IL-1ra. Cette dernière est la seule qui ait déjà été étudiée dans notre laboratoire, dans un modèle d'infection prénatale combinée à l'HI postnatale.

Cytokines anti-inflammatoires systémiques chez le nouveau-né

Au niveau systémique, le profil de réponse des cytokines anti-inflammatoires chez le nouveau-né humain a été beaucoup plus étudié que dans le cerveau. Des travaux ont permis de mettre en évidence les particularités du système immunitaire des nouveau-nés. Entre autre, la balance entre la production des cytokines pro- et anti-inflammatoires est un sujet d'intérêt majeur dans l'étude des nouveau-nés. Brièvement, la production de cytokines lymphocytaires CD4 de type Th1 est faible chez le nouveau-né, ce qui mène à une réponse inflammatoire polarisée vers la réponse Th2. Ce débalancement Th1/Th2 est âge-dépendant et un stimulus peut accélérer la maturation du système. Paradoxalement très peu de données sont disponibles sur les cytokines anti-inflammatoires dans le cerveau néonatal (Levy, 2007).

4. CYTOKINES ANTI-INFLAMMATOIRES ET/OU NEUROTROPHIQUES DANS LE SNC

4.1 L'interleukine-6 dans le SNC

L'interleukine-6, d'un poids moléculaire de 25 à 30 kDa, est une cytokine multifonctionnelle qui fait partie de la famille portant son propre nom, soit la famille de l'IL-6. Cette famille de cytokines comprend le CNTF, LIF, oncostatine M, la cardiotrophine-1, GPA et l'IL-11 dont les récepteurs partagent tous la chaîne commune gp130 comme molécule d'association et de translocation de signal intracellulaire. Certains effets sont donc redondants entre ces différentes molécules, par exemple au niveau de l'hématopoïèse et de la réponse immune, et notamment, des effets neurotrophiques (Taga et Kishimoto, 1997).

L'IL-6 est exprimée dans tous les tissus et fluides de l'organisme et est produite par une panoplie de cellules du corps humain. Au sein du SNC, tous les types cellulaires peuvent en produire lors de stimulation par différents facteurs, par exemple une stimulation d'autres cytokines, lors d'infections ou toutes formes de dommages tissulaires, comme l'ischémie induite par les AVC. Plus précisément, le neurone, l'astrocyte et la microglie produisent de l'IL-6 lorsqu'il y a stimulation par l'IL-1 β et le TNF α . L'IFN et des pathogènes viraux et bactériens, comme le LPS et des neurotransmetteurs peuvent aussi stimuler la production d'IL-6 par les cellules du SNC (Gadient et Otten, 1997).

Signalisation

L'IL-6 produit ses effets via sa liaison à son récepteur, soit l'IL-6R α . Lorsque l'IL-6 se lie à son récepteur, ce dernier se lie avec le gp130. Différentes cascades de signalisation sont activées via le gp130, comme la voie des MAP kinases, mais la voie des Jak/Stat est la principale. La liaison de l'IL-6 au récepteur induit la dimérisation puis la phosphorylation (Jak) de gp130 qui mène à la phosphorylation des Stat qui dimérisent par la suite pour

transloquer au noyau afin d'activer différents gènes (c.f. Figure 4). La Stat3 est la principale Stat impliquée dans la cascade de signalisation de l'IL-6 (Suzuki *et al.*, 2009).

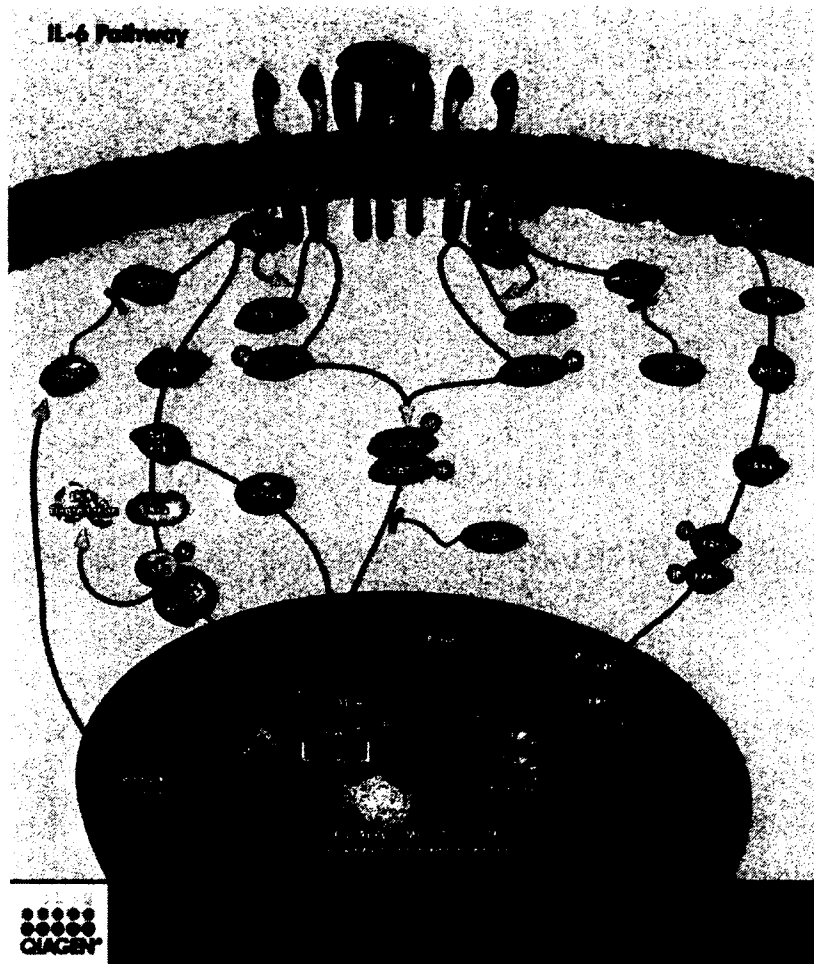


Figure 4. Voies de signalisation de l'IL-6. L'IL-6 lie son récepteur qui se couple au récepteur gp130 afin de produire son action via la voie des Jak/Stat. La Stat3 est la principale voie activée et la dimérisation des Stats permet leur translocation au noyau afin d'activer différents gènes.

Effets de l'IL-6 dans le SNC

En général, l'IL-6 est connu pour ses effets pro-inflammatoires dans un contexte pathologique. Son principal rôle en périphérie est de réguler la réponse immunitaire et inflammatoire, entre autre, en stimulant la différenciation et l'activation des lymphocytes et macrophages. Dans le cerveau, l'IL-6 stimule la gliose, mais selon les études, les effets nets de l'IL-6 restent ambivalents. D'une part des études démontrent son pouvoir délétère pour le tissu cérébral, tandis que dans d'autres conditions ses effets sont bénéfiques pour la protection neuronale.

En effet, plusieurs études du SNC démontrent les effets bénéfiques de l'IL-6. Ces effets sont surtout neurotrophiques. L'IL-6 augmente la différenciation et la survie neuronale (Kushima *et al.*, 1992, Marz *et al.*, 1998). Il stimule aussi la croissance des neurites (Ihara *et al.*, 1996, Wu et Bradshaw, 1996). De plus, il protège les neurones contre les effets néfastes du NMDA et du glutamate (Toulmond *et al.*, 1992, Yamada et Hatanaka, 1994).

Des effets bénéfiques de l'IL-6 sur les cellules gliales sont aussi répertoriés. L'IL-6 stimule la prolifération astrocytaire et inhibe leur production de TNF α en culture (Benveniste *et al.*, 1995, Selmaj *et al.*, 1990). L'IL-6, en combinaison avec d'autres facteurs trophiques, comme LIF et CNTF, augmente le taux de survie des oligodendrocytes en culture cellulaire (Barres *et al.*, 1993).

L'IL-6 aurait aussi des effets directement anti-inflammatoires. Un lien entre la présence d'IL-6 et l'induction de la synthèse d'IL-1ra et du récepteur soluble p55 du TNF α - qui sont respectivement des antagonistes de l'IL-1 et du TNF α - dans le plasma des patients qui reçoivent un traitement de recombinant de l'IL-6 a été démontré (Tilg *et al.*, 1994).

Plusieurs effets de l'IL-6 ont également été décrits comme étant à l'opposé à ce qui est décrit ci-haut. En fait, les effets de l'IL-6 semblent dépendre du contexte pathologique, et possiblement aussi du niveau et de la durée (aigüe ou chronique) de son hyperexpression.

L'IL-6 est exprimée, dans plusieurs désordres du SNC, comme l'Alzheimer, le parkinson et la sclérose en plaques et les AVC (Gadient et Otten, 1997), et semble jouer un rôle dans la physiopathologie de certaines de ces maladies humaines.

Lors de dommages cérébraux chez l'adulte, l'expression de l'IL-6 est régulée à la hausse par rapport aux conditions normales autant dans le sang que dans le cerveau. En fait, plusieurs groupes ont démontré une augmentation de l'IL-6 dans le sérum de patient très rapidement après un AVC (Suzuki *et al.*, 2009). Cette augmentation qui débute vers les 24h et qui perdure jusqu'à 4 jours est proportionnelle avec la taille de la lésion cérébrale. D'autres études ont démontré une augmentation de l'IL-6 dans le liquide céphalorachidien (LCR) de ces patients victimes d'AVC. Le niveau d'IL-6 détecté dans le LCR est plus élevé que celui du sérum, ce qui suggère que l'apport cérébral dans la production d'IL-6 induit par un AVC est plus important que celui systémique (Suzuki *et al.*, 2009). Dans le cas de lésions cérébrales chez le nouveau-né humain, peu de données sont disponibles. Dans certaines études, une augmentation de l'IL-6 est détectée dans le sang de cordon ombilical, dans le liquide amniotique, dans le liquide céphalorachidien et directement dans certains échantillons de cerveau de nouveau-nés prématurés ayant une LPV comparativement aux nouveau-nés indemnes de LPV (Ellison *et al.*, 2005, Yoon *et al.*, 1997, Yoon *et al.*, 1996). Ce résultat est controversé, car d'autres études montrent une corrélation inverse entre le niveau d'IL-6 dans le sang du cordon et le risque de survenue de lésions cérébrales (Kaukola *et al.*, 2006), et une faible expression d'IL-6 dans les lésions de LPV (Kadhim *et al.*, 2001).

Les modèles animaux permettent d'appuyer, mais surtout d'approfondir ces données humaines. L'ischémie cérébrale induite par l'occlusion de l'artère cérébrale moyenne, dans des modèles animaux adultes, mène à l'augmentation de l'IL-6 dans le cerveau, IL-6 provenant surtout des neurones du cortex. En plus d'avoir des données controversées chez l'animal adulte à propos du rôle potentiel de l'IL-6 dans les lésions cérébrales, très peu de données sont disponibles sur la modulation de l'IL-6 et son effet cérébral chez l'animal nouveau-né.

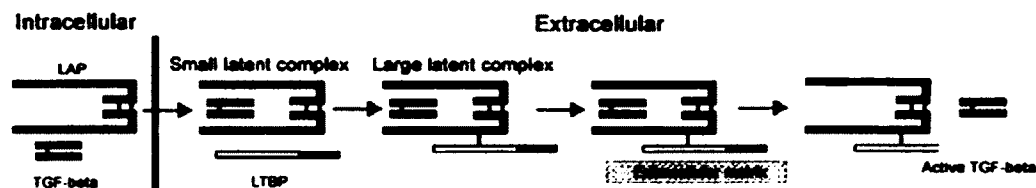
4.2 *Transforming Growth Factor* β 1 dans le SNC

Le *transforming growth factor* β (TGF β) est un facteur de croissance qui est connu sous 3 isoformes soit TGF β 1 -2 et -3 ayant environ 70-80% d'homologie entre leurs séquences et qui partagent les mêmes récepteurs. Leurs rôles sont donc parfois redondants. Cependant, le TGF β 1 est le plus étudié des trois et semble le plus impliqué au niveau développemental. Il est également étudié pour ses effets post-ischémie qui semblent prometteurs au point de vue de la neuroprotection (Bottner *et al.*, 2000).

Le TGF β 1 est produit dans plusieurs organes comme le cœur, le foie et la rate et il est également détecté dans le cerveau en développement. Il peut être produit autant par les neurones que les cellules gliales. Lorsque le TGF β 1 est produit, il est associé à une protéine appelée le peptide latent associé (LAP). Le TGF β 1 et la LAP, sont assemblés chacun sous forme d'homodimères liés par des ponts disulfure. Puis ces homodimères s'associent de manière non-covalente pour former un tétramère, qu'on appelle le petit complexe latent, qui regroupe donc deux molécules de TGF β 1 et deux de LAP (c.f. Figure 5). La LAP facilite la sécrétion du complexe à l'extérieur de la cellule et permet d'assurer une grande disponibilité du TGF β 1 extracellulaire en le protégeant de sa dégradation. Une autre molécule de latence peut s'associer au petit complexe latent par un pont disulfure pour former le grand complexe latent, soit la *latency-TGF-binding-protein* (LTBP) (c.f. Figure 5). La LTBP permet de faciliter la sortie du grand complexe latent hors des cellules productrices. La LTBP peut aussi s'associer à la matrice extracellulaire qui permet la localisation du grand complexe à la matrice et sa stabilisation (Flanders *et al.*, 1998, Taylor, 2009).

L'activation du TGF β 1 est l'étape cruciale dans la régulation de ses divers effets, c'est-à-dire qu'il doit se libérer de la LTBP et de la LAP. Le TGF β 1 est facilement activé par un changement de pH (élevé ou faible), la chaleur, l'irradiation ou encore par des molécules endogènes comme la plasmine, la trombospondine-1, la furine. Une fois libre, le TGF β 1 peut se lier à son récepteur et exercer ses effets biologiques (Hyytiainen *et al.*, 2004).

A.



B.

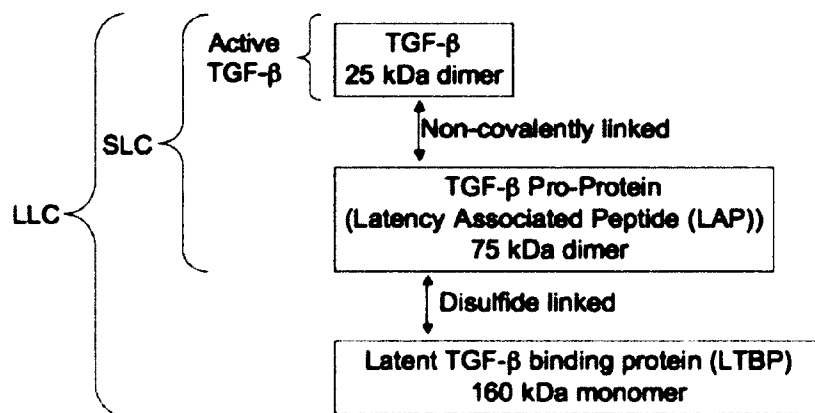


Figure 5. Structure du TGF β 1 en association avec ses protéines de latence. Le TGF β 1 lié avec la protéine LAP forme le petit complexe latent (SLC : small latent complex). Ce complexe en association avec le LTBP forme le grand complexe latent (LLC : large latent complexe). Ce LTBP permet entre autre au TGF β 1 de s'associer à la matrice extracellulaire pour stabiliser le complexe.

Signalisation

Il existe 3 types de récepteurs pour le TGF β 1, soit le TGF β R1, le TGF β R2 et le TGF β R3 qui sont partagés avec le TGF β 2 et -3. Le T β R1 et le T β R2 font partie de la famille de récepteurs transmembranaire sérine-thréonine kinases. Le TGF β 1 se lie au T β R2 en premier lieu et le complexe ainsi formé recrute le T β R1, permettant la phosphorylation du récepteur T β R1. Ceci permet l'activation de la voie des Smad. Les Smad sont des protéines adaptatrices. La famille des Smad contient plusieurs membres qui se répartissent en 3 sous-familles : les r-Smad (Smad1, -2, -3, -5, -8), les co-Smad (Smad4) et les i-Smad (Smad6 et -7). La signalisation du TGF β 1 se fait via Smad2 ou 3 qui est recruté lors de la

transphosphorylation du récepteur. Les Smad phosphorylés forment alors un complexe hétéromérique avec Smad4. Ce complexe transloque ensuite au noyau afin d'activer les gènes cibles (c.f. Figure 6). L'endogline et le T β RIII (aussi appelé betaglycan) sont des protéoglycans de haut poids moléculaire qui lient le TGF β , mais qui n'induisent pas de cascade de signalisation, étant donné qu'ils ne possèdent aucun domaine kinase. Ces récepteurs servent entre autre à présenter le TGF β I au T β RII pour ainsi faciliter son activation (Govinden et Bhoola, 2003).

Effets dans le SNC

Le TGF β I est multifonctionnel et peut jouer un rôle dans des fonctions tissulaires et cellulaires importantes comme la croissance et la différenciation, l'angiogenèse, l'hématopoïèse et la production de matrice extracellulaire. Toutes ces fonctions contrôlées par le TGF β I sont opérantes à la fois dans l'inflammation et dans plusieurs étapes du développement cérébral (Bottner *et al.*, 2000, Massague, 1998). Dans le cerveau, le TGF β I a principalement des effets neurotrophiques. Il participe, entre autre, à la spécification régionale et fonctionnelle des cellules souches, à la migration neuronale vers le cortex cérébral, au contrôle de la balance survie/mort neuronale et aussi au contrôle de la prolifération des cellules gliales (Gomes *et al.*, 2005). Ces effets cruciaux pour le développement du cerveau et le maintien de la trophicité de ses cellules pourraient aussi supporter la survie neuronale dans un contexte pathologique.

(Dhandapani et Brann, 2003). Cependant, le système du TGF β reste très peu étudié chez le nouveau-né. Une étude clinique indique néanmoins par immunohistochimie que le cerveau nouveau-né atteint de LPV exprime, au sein de ces lésions, plus de TGF β 1 que les cerveaux de nouveau-nés sains (Meng et Takashima, 1999).

4.3. IL-10 dans le SNC

L'IL-10 est la cytokine anti-inflammatoire la plus connue. Plusieurs cellules peuvent en produire, comme les lymphocytes, les macrophages et également des cellules du SNC, soit l'astrocyte et la microglie. Sa production est normalement induite par les cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-1 et le TNF. Son principal rôle étant de contrebalancer la réponse pro-inflammatoire, l'IL-10 est capable de produire plusieurs effets via son récepteur visant à atténuer cette réponse, par exemple, l'inhibition de la production de l'IL-1 et du TNF ou encore la réduction de l'expression de leur récepteur respectif à la surface cellulaire (Moore *et al.*, 2001, Strle *et al.*, 2001).

Signalisation

Le récepteur de l'IL-10 est un tétramère composé de deux sous-unités de liaison, soit deux molécules d'IL-10RI et de deux sous-unités accessoires, soit deux molécules d'IL-10RII. L'IL-10R est présent sur les cellules gliales. La signalisation de l'IL-10 via son interaction avec son récepteur inhibe ou active plusieurs voies de signalisation, incluant les voies des Jak/Stat, PI3k, MAPK, SOCS, NF- κ B, mais l'IL-10 agit principalement via la voie des Jak/Stat, dont les membres sont exprimés dans le SNC. L'IL-10RI est lié à Jak1 et l'IL-10RII à Tyk2 et l'activation du récepteur par son ligand permet la phosphorylation de la chaîne intracellulaire de l'IL-10RI sur des résidus tyrosines (c.f. Figure 7). Par la suite, les Stats sont recrutées et se lient par leur domaine de liaison SH2 (Strle *et al.*, 2001).

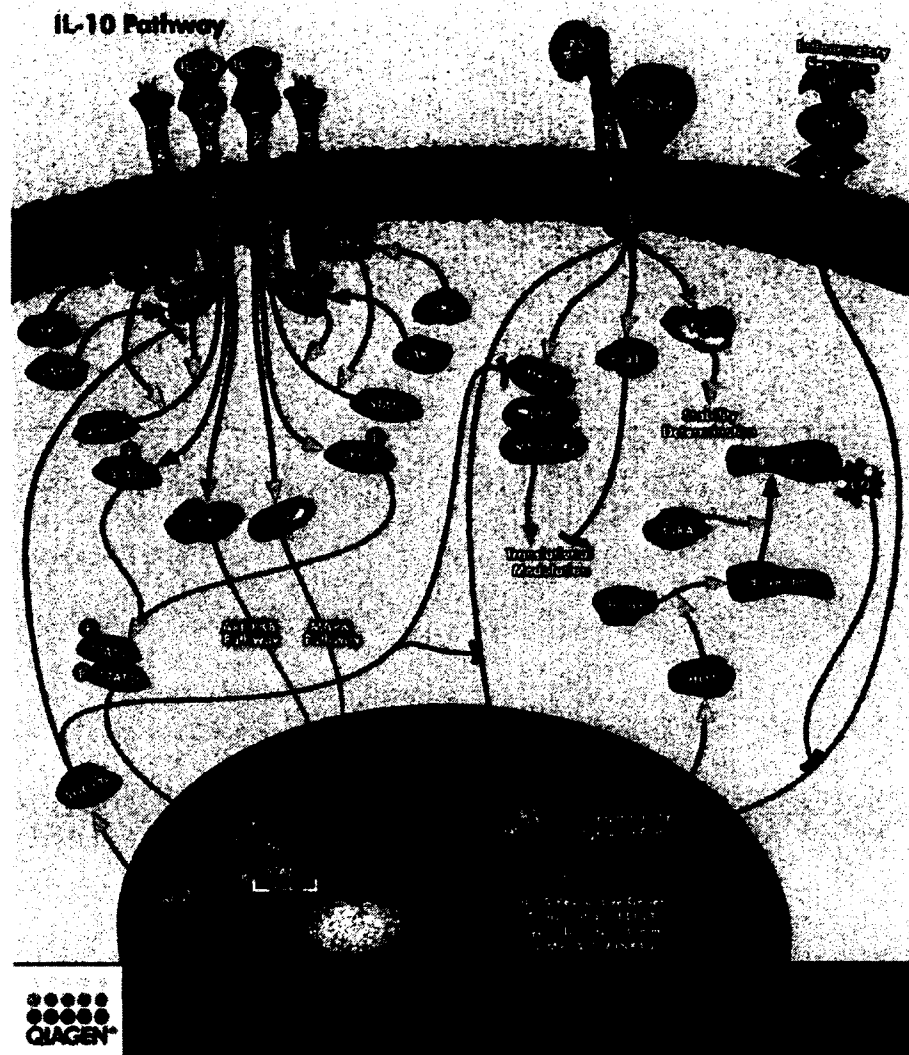


Figure 7. Voies de signalisation de l'IL-10. L'IL-10 lie son récepteur tétramérique afin d'induire la signalisation des Jak/Stat. La dimérisation des Stats permet leur translocation au noyau et l'induction de la transcription de gènes.

Parmi les Stats, les Stats 3 sont principalement recrutées, mais Stat 1 et 5 peuvent également l'être dans certaines cellules. Une fois phosphorylées, les Stats se dimérisent et transloquent au noyau afin de lier différents promoteurs pour moduler la transcription de plusieurs gènes. Les Stats sont entre autre impliquées dans la division cellulaire, la différenciation et la survie des neurones et des cellules gliales embryonnaires, les effets

anti-inflammatoires, et les activités régulant le cycle et la mort cellulaire selon le pattern de gènes qui seront activés. L'IL-10 vient réguler les voies des MAPKs et JNK, p38 et ERK1-2 qui sont impliquées dans l'activité anti-inflammatoire et immunosuppressive de l'IL-10. De plus, l'IL-10 inhibe le NF-kB et active SOCS2 et -3 qui inhibent l'IFN- γ , l'IFN- α , l'IL-6 et l'IL-10 et supprime l'activité de membres des Jak/Stats. Ces deux actions mènent donc à l'inhibition de la production de cytokines pro-inflammatoires (Strle *et al.*, 2001).

Effets de l'IL-10 dans le SNC

Le rôle principal de l'IL-10 est de contrebalancer la réponse pro-inflammatoire dans une réponse immune et il en est de même dans le cerveau. L'IL-10 semble impliquée dans la majorité des maladies du SNC et est potentiellement d'une grande importance dans ce contexte pour inhiber la production de cytokines, supprimer l'immunité cellulaire via la réduction de composant permettant l'interaction cellule-cellule et favoriser la survie neuronale et gliale via des facteurs neurotrophiques, par exemple le NGF (Strle *et al.*, 2001).

Dans les lésions cérébrales, il est connu que l'IL-10 est modulée à la hausse dans le cerveau de rats adultes ayant subi une MCAO. L'injection d'IL-10 est principalement faite dans des modèles animaux afin d'étudier ses effets neuroprotecteurs potentiels. Son administration autant intracérébroventriculaire (i.c.v.) que systémique mène à une réduction de la taille de l'infarctus cavitaire suite à une ischémie cérébrale (Spera *et al.*, 1998). Malgré ces quelques données, les données chez le nouveau-né au sein de lésions cérébrales sont rares concernant l'IL-10. Une étude animale montre néanmoins chez le rat à P9 une augmentation d'IL-10 suite à une injection au NMDA dans le cortex cérébral, injection de NMDA qui réplique la suractivation des récepteurs du glutamate qui est impliquée dans les premières étapes excitotoxiques de la neurotoxicité liée à l'HI.

4.4 Antagoniste du récepteur d'interleukine-1 (IL-1ra)

L'IL-1ra est une cytokine anti-inflammatoire faisant partie de la famille de l'IL-1. Comme son nom l'indique, il s'agit d'un compétiteur hautement sélectif de l'IL-1 à son récepteur. Dans le SNC, cette cytokine est principalement produite par la microglie, mais peut aussi l'être par l'astrocyte. Son effet est d'inhiber l'action de l'IL-1 et aucun effet indépendant ne lui est connu. Dans le contexte de dommages cérébraux chez l'animal adulte, l'IL-1ra est modulé, tout comme l'IL-1 β , suite à une MCAO et son rôle protecteur a été démontré par son inhibition ou son ajout qui respectivement aggrave ou améliore les dommages cérébraux dans ce contexte pathologique (Loddick *et al.*, 1997).

Cependant, cette cytokine a déjà été étudiée à notre laboratoire dans un modèle d'exposition prénatale à des fragments de pathogène, par administration de LPS combiné à l'HI et comme mentionné précédemment, un déséquilibre entre la production de l'IL-1 β et l'IL-1ra est détecté dans le cerveau de rats nouveau-nés exposés au LPS anténatal et HI à P1 (Girard *et al.*, 2008). Les travaux de Karine Lavoie au laboratoire ont par contre démontré que l'IL-1ra est induite rapidement à la hausse, parallèlement à l'IL-1 β , dans le cerveau de rats exposés au LPS et/ou à l'HI à P12. L'effet de l'exposition postnatale au LPS sur l'IL-1ra et son impact subséquent sur le cerveau immature (P1) n'ont pas été étudiés.

5. CHIMIOKINES ET RECRUTEMENT CÉRÉBRAL DE MACROPHAGES ET POLYNUCLÉAIRES NEUTROPHILES DANS LE CONTEXTE NÉONATAL

Les chimiokines sont des cytokines chimiotactiques qui ont pour rôle immunitaire principal le recrutement cellulaire systémique vers un site tissulaire lésé. Ces chimiokines sont catégorisées selon leur motif structural, dont les plus communs sont CC ou CXC. L'IL-8 (CXCL1) est une chimiokine humaine connue pour sa propriété d'attraction des neutrophiles. Chez l'animal, cette chimiokine est connue sous le nom CINC-1. MCP-1 (CCL2) est la principale chimiokine associée au recrutement des monocytes et des macrophages.

Différentes études se sont consacrées à l'étude du neutrophile chez le nouveau-né. En cas de sepsis, le nouveau-né présente un défaut de production de neutrophiles comparativement à l'adulte. De plus, il a été démontré qu'au plan fonctionnel, la capacité de migration, de phagocytose, et de production de facteurs bactéricides, tels les radicaux libres, de même que la production de réseaux de fibres extracellulaire — nommées *neutrophil extracellular traps* (NETs) — par ces cellules granulocytaires chez le prématuré est fortement réduite comparativement au nouveau-né à terme (Falconer *et al.*, 1995, Kallman *et al.*, 1998, Yost *et al.*, 2009). De plus, une faible expression de protéines importantes dans le roulement et l'adhésion des neutrophiles, principalement des sélectines et des intégrines, sont détectées chez le nouveau-né, particulièrement chez le prématuré (Carr, 2000).

Chez l'animal adulte ayant subi une MCAO, les neutrophiles sont les premières cellules à infiltrer la région ischémique, tandis que l'infiltration de macrophages et l'activation de microglie est détectée plus tardivement (Jin *et al.*, 2010). Le CINC-1 et le MCP-1 peuvent être produits principalement par les microglies et les astrocytes dans le cerveau (Conductier *et al.*, 2010, Semple *et al.*, 2010), et sont induits lors d'une agression HI (Conductier *et al.*, 2010, Kim *et al.*, 1995, Semple *et al.*, 2010, Yamasaki *et al.*, 1997). De plus, des études ont démontré que l'IL-1 pouvait induire MCP1, et ce, dans le contexte de lésions cérébrales. Il a aussi été démontré que MCP-1 pourrait être impliqué dans la modulation plus globale de la perméabilité de la barrière hématoencéphalique, qui permettrait donc par la suite l'entrée de cellules systémiques autres que les macrophages dans le cerveau (Anthony *et al.*, 1998, Anthony *et al.*, 1997).

6. HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS DE RECHERCHE

Selon notre hypothèse, un déséquilibre du profil de production intracérébrale de cytokines pro- versus anti- inflammatoires induite par les infections bactériennes périnatales et/ou l'hypoxie-ischémie joue un rôle central dans la genèse des lésions responsables de la paralysie cérébrale. De façon plus précise, notre hypothèse est que la modulation de ces cytokines suite à ces différentes agressions diffère selon le stade de développement cérébral. La réponse immunitaire innée des nouveau-nés prématurés étant immature, elle occasionnerait un profil particulier de production de cytokines à ce stade de développement, profil différent de celui du nouveau-né à terme. Ces différences développementales dans la réaction neuroinflammatoire pourraient jouer un rôle clé dans la genèse des lésions cérébrales périnatales et aussi dans leurs variations selon le niveau de développement, prématuré versus à terme.

Objectifs

Ce projet a pour but d'étudier l'expression cérébrale de cytokines anti-inflammatoires (IL-6, IL-10, TGF β 1 et IL-1ra) chez le nouveau-né via l'utilisation de modèles de lésions cérébrales périnatales induites chez le rat par diverses combinaisons d'agressions à différents stades développementaux.

L'objectif central sera de comparer les réponses anti-inflammatoires au LPS et/ou à l'HI postnatal dans un modèle de lésions cérébrales chez le raton à un âge correspondant à un niveau de développement cérébral du prématuré humain (P1) versus un modèle correspondant au niveau de maturation cérébrale comparable à nouveau-né humain à terme (P12).

Pour approfondir les résultats, l'expression de cytokines pro-inflammatoire (IL-1 β et TNF α) sera étudiée parallèlement à celle des anti-inflammatoires, et ce, comparativement dans nos modèles à P1 et P12, suite aux agressions par un composant de pathogène (LPS) et/ou l'HI.

Finalemment, l'effet net de la balance des productions pro- et anti-inflammatoires sera étudié comparativement à P1 et P12 sur la production de chimiokines et le recrutement cérébral de cellules immunitaires systémiques - neutrophiles et macrophage — via de l'expression de leurs principales chimiokines respectives CINC-1 et MCP1.

B. ARTICLE

Developmental regulation of the neuroinflammatory responses to LPS and/or hypoxia-ischemia between preterm and term neonates: An experimental study

Marie-Elsa Brochu, Sylvie Girard, Karine Lavoie, Guillaume Sébire

*Soumis dans *Journal of Neuroinflammation*

Avant-propos

L'article intitulé « Developmental regulation of the neuroinflammatory responses to LPS and/or hypoxia-ischemia between preterm and term neonates: An experimental study » présentement soumis dans *Journal of Neuroinflammation* traite principalement de mon projet de recherche, mais s'y ajoute également une partie du projet de Sylvie Girard, étudiante au doctorat qui est co-premier auteur de cet article, ainsi qu'une partie du projet de Karine Lavoie, étudiante à la maîtrise au laboratoire qui figure également parmi les auteurs. Les travaux ont été supervisés par mon directeur de recherche Dr. Guillaume Sébire.

J'ai effectué la majorité du travail de laboratoire contenu dans cet article dans le cadre de mon projet de maîtrise. Certains résultats sont obtenus en collaboration avec Sylvie Girard et Karine Lavoie. Les manipulations techniques, l'analyse des résultats, l'élaboration des figures et la rédaction du manuscrit ont fait partie de mes tâches au laboratoire. Sylvie a grandement collaboré à l'écriture du manuscrit et la supervision du projet, le tout sous la direction du Dr. Sébire. Je tiens également à ajouter qu'une partie de mes résultats ont été obtenus grâce à la participation de Sinziana Briota, une stagiaire d'été au laboratoire qui m'a été d'une grande aide.

Résumé de l'article

Introduction. Les nouveau-nés prématurés et à terme sont grandement susceptibles à développer des dommages cérébraux, pouvant mener à la paralysie cérébrale et à des

difficultés d'apprentissage. L'hypoxie-ischémie (HI) et l'exposition à des pathogènes, et l'augmentation subséquentes de cytokines pro-inflammatoires sont associées avec de tels dommages cérébraux. Toutefois, la balance entre l'expression de cytokines pro- et anti-inflammatoires, ses variations potentielles et leur effets au cours du développement demeurent inconnus. **Méthodes.** En utilisant un modèle animal de lésions cérébrales induites par exposition au lipopolysaccharide (LPS) et/ou à l'HI, nous avons comparé l'expression de cytokines entre un niveau de développement cérébral comparable à soit un nouveau-né prématuré (P1), soit à un nouveau-né à terme (P12). **Résultats.** À P1, l'expression des cytokines anti-inflammatoires n'est pas modulé (IL-10 et IL-6) ou est même régulé à la baisse (TGF β 1 et IL-1ra) dans le cerveau de rats exposés au LPS+HI. Au contraire, à P12, les rats exposés aux mêmes agressions montrent une augmentation de l'expression de ces cytokines anti-inflammatoires. Parallèlement, l'IL-1 β est la principale cytokine pro-inflammatoire dont l'expression augmente à P1 et P12, de pair avec une faible augmentation du TNF- α . Cette réaction inflammatoire dépendante du stade développemental s'accompagne à P12 par la combinaison de: (i) l'expression des chimiokines CINC-1 et MCP-1, (ii) la perméabilisation de la barrière hémato-encéphalique et (iii) par le recrutement de cellules immunitaires systémiques, tel les neutrophiles. **Conclusion.** L'HI et le LPS+HI induisent une réponse immunitaire de type pro-inflammatoire autant dans un cerveau équivalant à un nouveau-né prématuré et à terme, avec une réponse maximale obtenue avec la combinaison du LPS+HI. Cependant, le profil de ces réponses neuroinflammatoires présente des différences majeures selon l'âge : aucune ou une diminution de la réponse anti-inflammatoire associée principalement avec une relâche d'IL-1 dans le cerveau équivalant au prématuré (P1), contrairement au cerveau correspondant à un nouveau-né à terme (P12) qui présente une forte réponse anti- et pro-inflammatoire, incluant une relâche d'IL-1 β et de TNF α et un bris de la barrière hémato-encéphalique. Ces différences développementales en terme de réponse neuroinflammatoires pourraient contribuer au profil différentiel des lésions observées selon la durée de gestation. De plus, ces différences démontrent la nécessité de prendre en considération le stade de maturation, autant un niveau cérébral que systémique, afin d'étudier la population de nouveau-né dans le but de développer de nouveaux traitements neuroprotecteurs adéquats.

such as neutrophils. **Conclusion.** HI and LPS+HI induce pro-inflammatory oriented immune responses in both preterm and term like brains, with a maximal inflammatory response triggered by the combination of LPS+HI. However, the profile of these neuroinflammatory responses presented striking variations according to age: no or down-regulated anti-inflammatory responses associated with mainly IL-1 β release in preterm-like brains (P1), in sharp contrast to term-like brains (P12) presenting stronger anti-and pro-inflammatory responses, including both IL-1 β and TNF- α releases, and BBB leakage. These developmental-dependant variations of neuroinflammatory response could contribute to the differential pattern of brain lesions observed across gestational ages in humans. This also highlights the necessity to take into consideration the maturation stage, of both brain and immune systems, in order to develop new anti-inflammatory neuroprotective strategies.

Background

Human newborns, especially preterm, are at high risk of brain damage [1-4]. Decreased oxygen and other blood nutrient supply to the brain, remote pathogen exposure, or both combined, and the associated neuroinflammatory responses are the most important perinatal risk factors associated with brain injury and subsequent cerebral palsy and/or learning and behavioral impairments [1-3]. The incidence of these forms of neonatal brain damage is inversely proportional to gestation age and thus higher in preterm than in term newborn [4]. Type and distribution of brain lesions differ markedly between preterm and term newborns [4, 5]. This is attributed to different levels of brain maturity and vulnerability to aggression due to regional and age-specific metabolic needs [1, 2, 4, 5]. Accordingly, our hypothesis is that developmental differences in neuroinflammatory reactions also contribute to the age-specific patterns of brain injury.

Pro-inflammatory cytokine expression within the brain, especially IL-1 β and TNF- α , has been implicated in perinatal brain damage induced by pathogen components and/or hypoxia-ischemia (HI) both in experimental model [6-11] and the human newborn brain [12-22]. On the other hand, relatively little is known about anti-inflammatory and neurotrophic cytokine responses in such perinatal brain damage. Anti-inflammatory cytokines are already known either to be constitutively expressed to support brain

development, or to be induced in pathological conditions to counterbalance the pro-inflammatory response and to promote neuronal survival [23-33].

To uncover potential differences between term and preterm neuroinflammatory responses to neonatal insults, we used rat models of brain damage induced at different stages of brain development. Postnatal day 1 (P1), corresponds, in terms of brain development, to the of very preterm human brain (26-32 weeks of gestation), whereas P12, corresponds to the term human neonate brain [34]. We compared the intracerebral profiles of pro- and anti-inflammatory cytokines responses, chemokines responses and related immune cell recruitments at both developmental stages.

Methods

Animals

Gestational Lewis rats were purchased from Charles River Laboratories (Saint-Constant, Quebec, Canada) at embryonic day 16 (E16) and gave birth naturally. At P1 or P12, rat pups were injected intraperitoneally (ip) either with lipopolysaccharide (LPS; 200µg/kg, *Escherichia coli*, 0127:B8; Sigma, ON, Canada) diluted in 50 µl of saline, or saline only. HI was induced 4h after the LPS injection by permanent ligation of the right common carotid artery followed by exposure to 8% O₂/N₂ for 210 min at P1 or 90 min at P12 in a chamber at 36°C as described previously [35]. The duration of hypoxia was decreased at P12 because of higher mortality rates of pups during hypoxia. The P1 and P12 pups were randomized into five groups: (1) control, (2) sham, (3) HI, (4) LPS, (5) LPS+HI. Pups were sacrificed by decapitation at 4, 24 and 48h post-HI and brain were either frozen and kept at -80°C for protein extraction or fixed in paraformaldehyde and embedded in paraffin for immunohistochemistry (IHC) (see below for details). Since there was no difference between control and sham animals, both groups were combined. This protocol was duly approved by the appropriate institutional Animal Research Ethics Board and conducted in accordance with all applicable laws and regulations.

Brain cytokines quantification

Both cerebral hemispheres were studied in combination at P1 as we previously showed the presence of bilateral brain damage [35]. At P12, however, cerebral hemispheres were studied separately since brain damage is mostly unilateral. Proteins were extracted and concentrations determined as previously described [36]. Cytokines (IL-1 β , TNF- α , IL-10, IL-1ra, IL-6, TGF- β 1) and chemokines (MCP1 and CINC-1) were quantified using ELISA kits (R&D System, MN, US; except for MCP-1: BD Biosciences, NJ, US) according to manufacturer's instruction. ELISA for IL-1ra detection was performed as described previously [6]. All samples were analyzed in duplicate. Western blotting was used to detect specific variation in the mature form of IL-1 β as previously described [36].

Immunohistochemistry

Total brains were embedded in paraffin and 5 μ m-thick sections were mounted on silanized slides. Brain sections were prepared as previously described [36]. Sections were incubated overnight at 4°C with the following primary antibodies directed against the following: IL-1 β (Serotec, NC, US), TNF- α (Chemicon, ON, Canada), IL-10 (R&D System, MN, US), IL-1ra (Santa Cruz Biotechnology, CA, US), IL-6 (R&D System, MN, US), TGF- β 1 (Santa Cruz Biotechnology, CA, US), MCP-1 (Chemicon, ON, Canada), CINC-1 (LifeSpan Biosciences, WA, US), CD68 (Chemicon, ON, Canada), and with adsorbed antiserum directed against rat neutrophils (Cedarlane, ON, Canada). For albumin detection, sections were incubated 2h at room temperature with IgG albumin fraction (MP Biomedicals, OH, US) after blocking overnight with 10% milk. The appropriate HRP-conjugated secondary antibodies (anti-mouse, Cell Signaling Technology, MA, US; anti-rabbit, Serotec, NC, US; anti-swine, Cedarlane, ON, Canada) were used for each primary antibody and incubated for 1h at room temperature. Labeling was revealed using diaminobenzidine (DAB) (Roche, Qc, Canada). Cytokine and chemokine staining intensities were measured in brain cortex striatum and adjacent subcortical/periventricular white matter (corpus callosum and external capsule) using Image J program (NIH) as described previously [22]. Quantitative comparisons were performed between staining intensities from LPS +/- HI conditions compared to control. Neutrophils and CD68+ macrophages were counted in coronal

sections at bregma level -0.36 mm in the brain hemisphere ipsilateral to ischemia, as previously described [37].

Statistical analyses

Data are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM). Comparisons between groups were performed using one-way analysis of variance (ANOVA) with the Student–Newman–Keuls post test and the unpaired t-test with Welch correction. The significance level was set at $p < 0.05$.

Results

A. Comparison of brain anti-inflammatory responses at P1 and P12 after LPS and/or HI exposure

We first assessed the impact of exposures to LPS and/or HI on the expression of anti-inflammatory cytokines in P1 and P12 pup brains. We quantified IL-10, IL-1ra, IL-6 and TGF- β 1 expressions in cerebral hemispheres by ELISA. LPS and/or HI did not induce the expression of any of the anti-inflammatory cytokines studied (IL-10, IL-1ra, IL-6 and TGF- β 1) in P1 brain at 4h, 24h, or 48h post-HI (the latter shown in Fig 1). Brain from P1 rat pups exposed to combined LPS+HI presented a decreased expression of TGF- β 1 (Fig 1D) compared to control level. In contrast, brain from P12 pups exposed to HI and LPS+HI, had up-regulated levels of all anti-inflammatory cytokines in the hemisphere ipsilateral to ischemia, as compared to control animals (Fig 1A-D), or to the contralateral hemisphere (data not shown), both having similar levels of expression. This induction of IL-6 and TGF- β 1 at P12 was detected as early as 4h post-HI and maintained until 48h (Fig 1C, D), expression peaking at 48h. On the other hand, IL-1ra and IL-10 expressions at P12 were delayed, with a transient IL-1ra increase at 24h (Fig 1B), and up-regulation of IL-10 at 48h post-HI (Fig 1A). Administration of LPS prior to HI did not lead, at P12, to any further increase of any anti-inflammatory cytokines (IL-10, IL-1ra, IL-6, TGF- β 1) compared to HI alone.

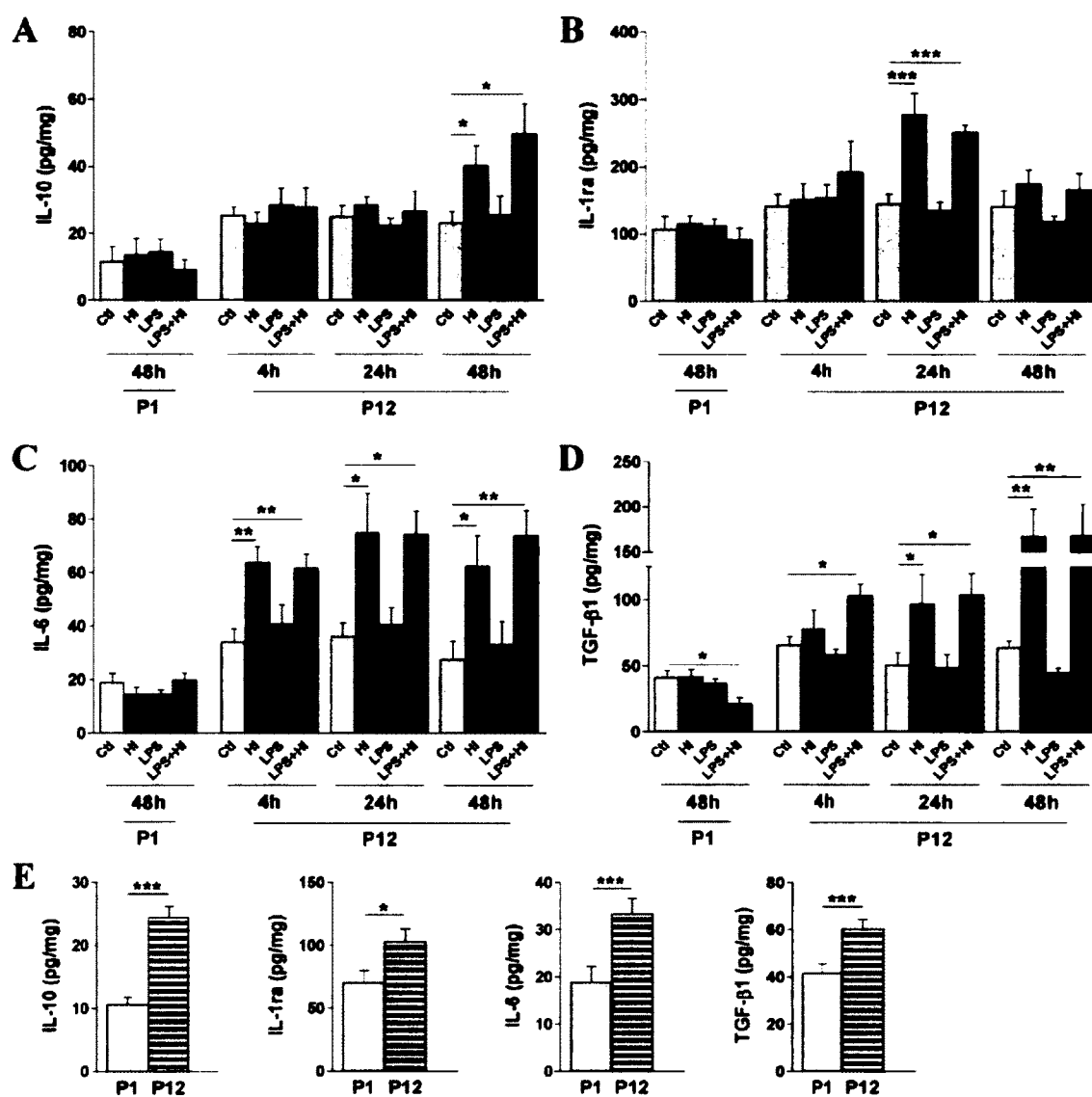


Figure 1. Comparison between P1 and P12 ELISA titrations of brain anti-inflammatory cytokines. Developmentally regulated induction of anti-inflammatory cytokines was shown after exposure to HI +/- LPS. An increased expression was detected after LPS and/or HI exposures at P12, but not at P1, for IL-10 (A), IL-1ra (B), IL-6 (C) and TGF-β1 (D). At P1, since the induction pattern is the same at 4, 24 or 48h post-HI, only 48h was shown. Basal levels (E) of intracerebral cytokine titers were compared between P1 and P12. Protein detection was performed on 3 to 6 brains assayed in duplicate at each time point under each experimental condition. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, one-way ANOVA with Newman-Keuls post test (A-D) and t test with Welch correction (E).

The weaker induction of anti-inflammatory cytokines at P1 compared to P12, *i.e.* at a developmental stage corresponding to preterm versus term human brains, likely reflects the immaturity of the intracerebral immune response of the premature brain. This is further supported by the basal intracerebral expression of anti-inflammatory cytokines, which was also developmentally regulated. Indeed, constitutive levels of expression were higher at P12 than at P1 for all anti-inflammatory cytokines studied (Fig 1E).

We then studied, by *in situ* IHC, the localization of cytokine expression in different brain region, with a special focus on those affected in human perinatal brain damage, *i.e.* superficial (cortex) and deep (striatum) gray matter and adjacent white matter, at 48h (Fig 2A-D). At P1, no differences were detected in both gray and white matter, in IL-6 (Fig 2A) and IL-10 (Fig 2C) staining intensity under LPS and/or HI conditions compared to control. At P12, HI and LPS+HI increased IL-10 expression in both hemispheric gray and white matters ipsilateral to ischemia (Fig 2C, D). IL-6 expression (Fig 2B) at P12 followed a pattern similar to IL-10 but was increased in both ipsi and contralateral white matter under HI and LPS+HI conditions as compared to control (data not shown). TGF- β 1 expression at P1 was down-regulated in the gray matter of rat exposed to LPS+HI (Fig 3A, B). In contrast, at P12, TGF- β 1 up-regulation was detected in both gray and white matters ipsilateral to ischemia (Fig 3C) as well as in white matter contralateral to ischemia. Intracerebral IL-1ra expression was decreased in P1 pups 48h after exposure to HI, LPS or both combined (Fig 3D, E). Conversely, an IL-1ra increase was detected in P12 rats at 48h post-HI and LPS+HI, but only in the gray matter of the hemisphere ipsilateral to ischemia (Fig 3F).

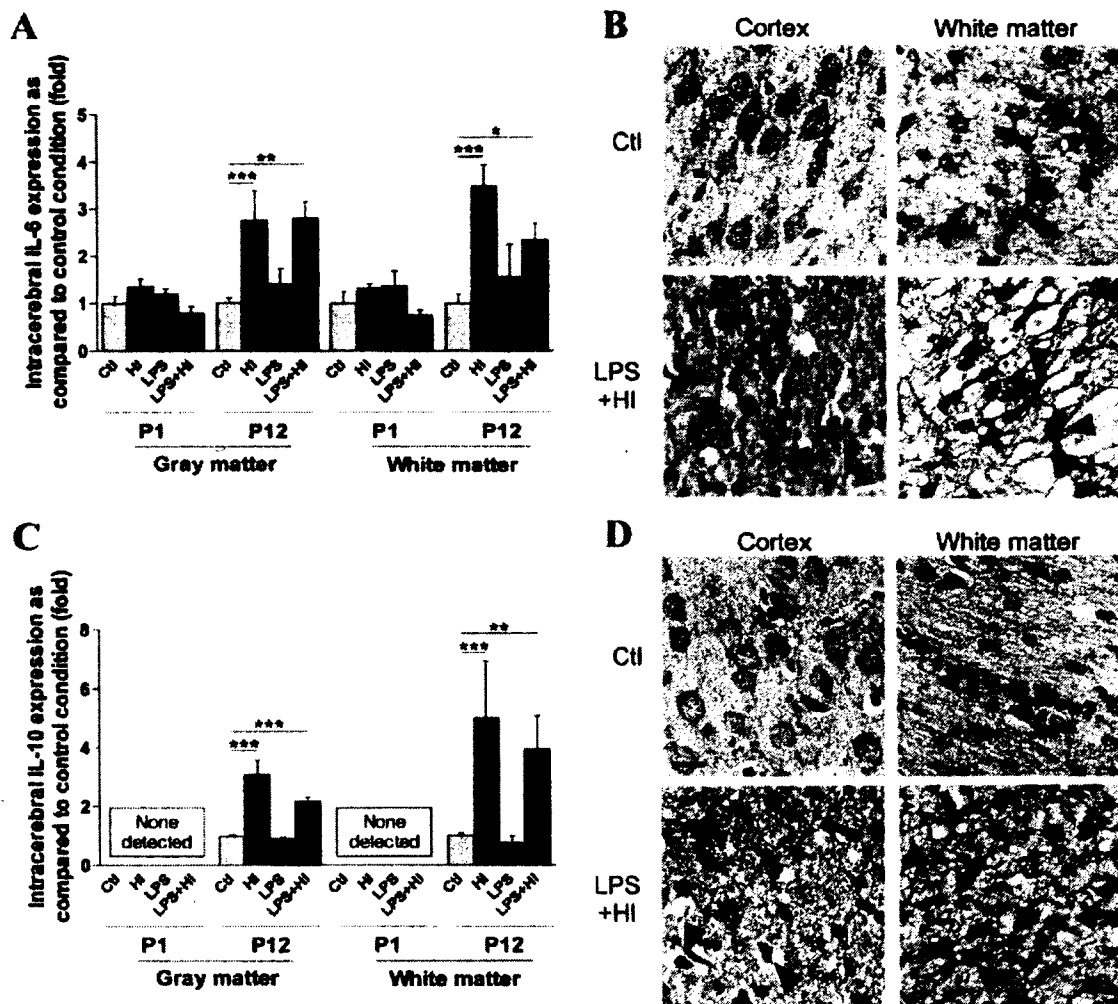


Figure 2. Comparison between P1 and P12 immunostaining intensities of IL-6 and IL-10 in brain. IL-6 and IL-10 expressions were increased only at P12 in brains of rat pups exposed to HI \pm LPS. Data are presented (A, C) as fold increase of IL-6 and IL-10 expressions compared to control (set at 1). (B) Increased IL-6 staining (arrowheads) in P1 spongiotic frontal cortex and underlying external capsule exposed to LPS+HI compared to control. (D) Increased IL-10 staining (arrowheads) in P12 lesioned frontal cortex and underlying external capsule exposed to LPS+HI compared to control. IHC was performed at 48h post-HI, in 3 to 4 brains under each experimental condition. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, one-way ANOVA with Newman-Keuls post test. Scale bars = 15 μ m (B, D)

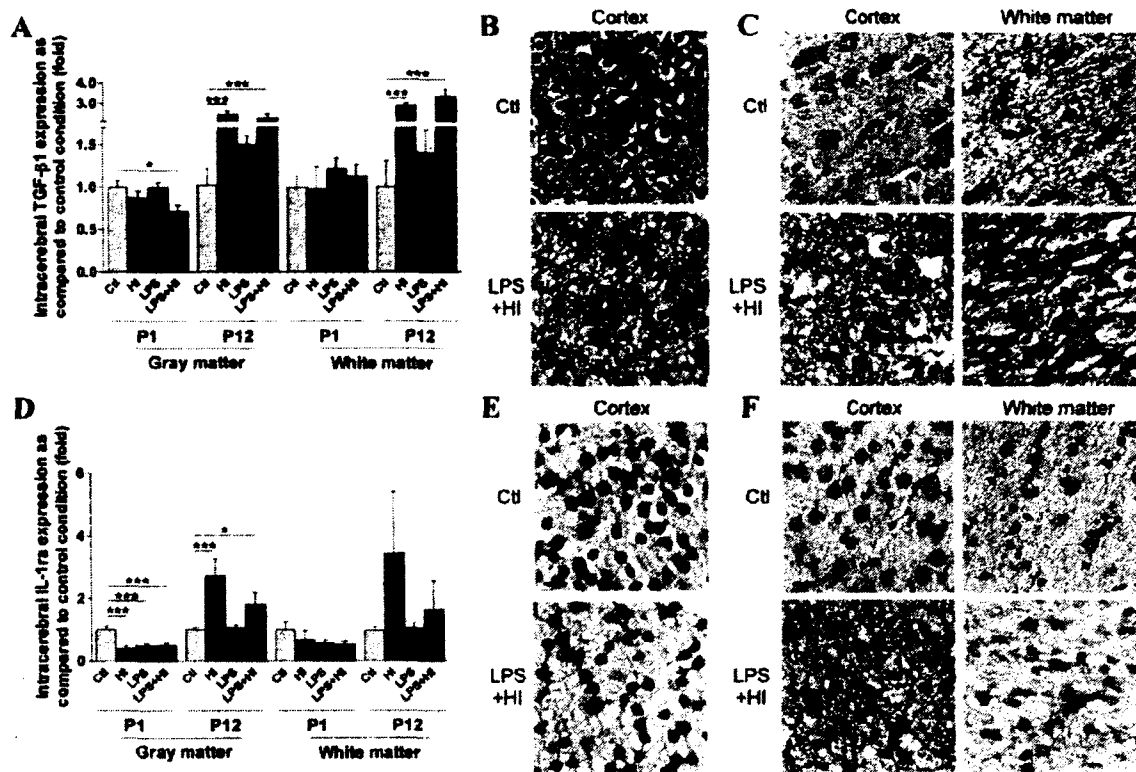


Figure 3. Comparison between P1 and P12 immunostaining intensities of IL-1ra and TGF-β1 in brain. IL-1ra and TGF-β1 expressions were decreased at P1 and conversely increased at P12 in brains of rat pups exposed to HI and/or LPS. Data are presented (A, D) as fold increase of IL-1ra and TGF-β1 expressions compared to control (set at 1). Decreased TGF-β1 (B) and IL-1ra (E) staining in P1 frontal cortex exposed to LPS plus HI versus control. Increased TGF-β1 (C) and IL-1ra (F) staining (arrowheads) in P12 lesioned frontal cortex and underlying external capsule exposed to LPS+/-HI versus control. IHC was performed at 48h post-HI, in 3 to 4 brains under each experimental condition. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, one-way ANOVA with Newman-Keuls post test. Scale bars = 15 μm (B, C, E, F).

B. Comparison between P1 and P12 intracerebral pro-inflammatory responses to LPS and/or HI

The balance between pro and anti-inflammatory mediators and their interactions is known to determine the magnitude of the inflammatory reaction. Thus, in addition to anti-inflammatory responses, we also used ELISA to study neurodevelopmental modulation of

expression of pro-inflammatory cytokines, namely IL-1 β and TNF- α , following LPS and/or HI exposures. At P1, we detected no TNF- α or modulation of total IL-1 β levels by ELISA in the brain (Fig 4A, B). However, using western blotting to further distinguish between pro and active forms of IL-1 β , we detected a slight increase of the active form of IL-1 β (17kDa) in brains exposed to HI and LPS+HI (data not shown). In contrast, both IL-1 β and TNF- α were up-regulated (IL-1 β at a much higher level than TNF- α) in P12 brains exposed to HI and LPS+HI at 4, 24 and 48h post-HI.

Using IHC, we then studied the distribution of pro-inflammatory cytokines. Some rare foci of slight TNF- α expression were detected by IHC at P1, only after combined exposures to LPS+HI, in both gray and white matter at 48h (Fig 4C). At P12, TNF- α expression was increased after exposure to HI or combined LPS+HI at 4h and 48h post-HI in both gray and white matter (Fig C). IL-1 β expression was also induced at P1, in both gray and white matter of animals exposed to HI and LPS+HI, and also in animals exposed to LPS alone, but only in white matter (Fig 4D). At P12, increased IL-1 β immunoreactivity was detected at 48h in ipsilateral gray and white matters after HI or LPS+HI (Fig 4D) as well as in contralateral white matter, albeit to a lesser extent under the same experimental conditions (data not shown).

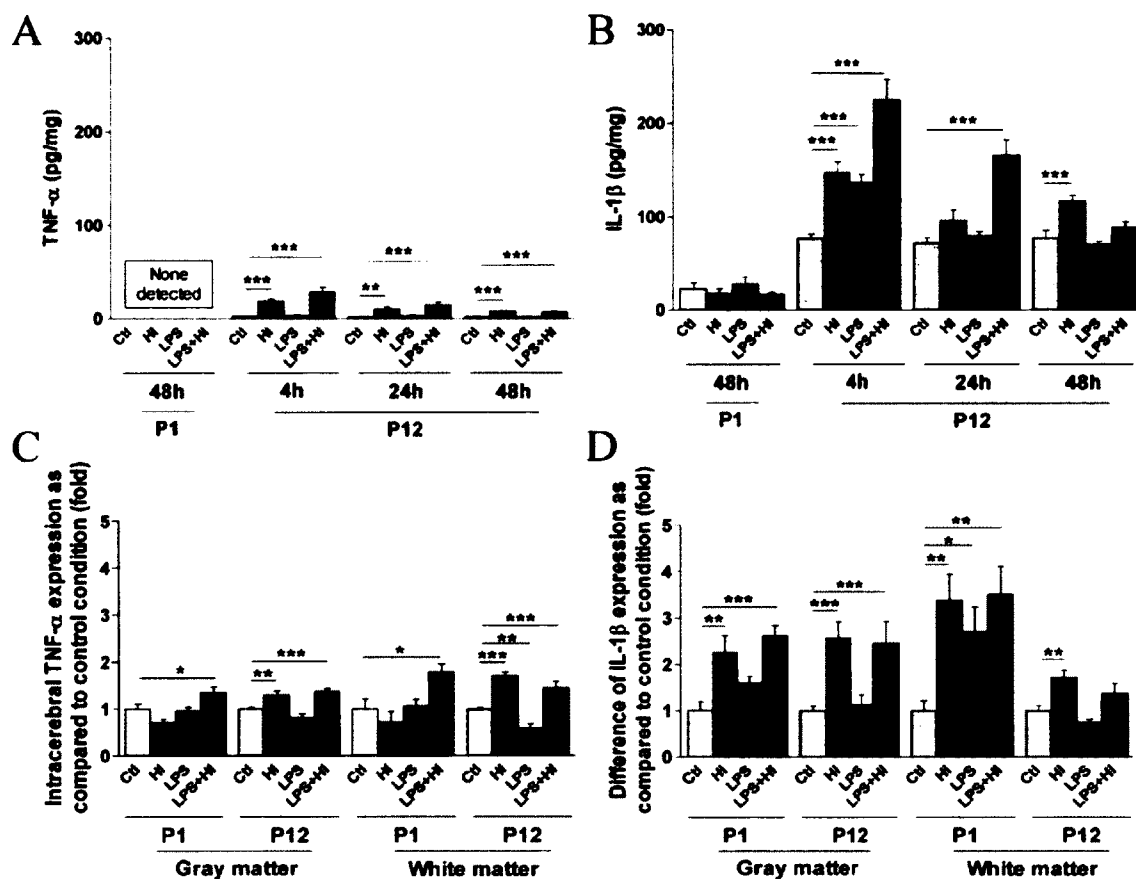


Figure 4. P1 versus P12 ELISA titrations and immunostaining intensities of cerebral pro-inflammatory cytokines, IL-1 β and TNF- α . TNF- α was not detected by ELISA at P1 but an up-regulation – weaker than the one observed for IL-1 β – was detected at P12 after HI and LPS+HI exposures by ELISA (A) and IHC in both white and gray matters (C). No modulation of IL-1 β was detected by ELISA at P1 (B), whereas some foci of increased IL-1 immunostaining were detected by IHC in brain exposed to HI or LPS+HI, at 48h post-HI (D). At P12, IHC results confirmed an increased IL-1 β expression localised especially in gray, and in a lesser extent in white matter, of brains exposed to HI and LPS+HI (D) and a TNF- α increase was detected only in the LPS+HI brains (C) at P1. Protein detection was performed by ELISA on 3 to 4 brains assayed in duplicate, at each time point under each experimental condition. IHC was performed at 48h post-HI, in 3 to 4 brains in each experimental condition. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001, one-way ANOVA with Newman-Keuls post test.

C. BBB permeability and systemic immune cell recruitment

A systemic contribution of infiltrating macrophages and neutrophils to the neuroinflammatory response has been associated with HI induced brain damage, especially in adult models. We therefore studied the intracerebral recruitment of circulating immune cells and the expression of related chemokines. Using ELISA on brain extract, we quantified the expression of CINC-1 and MCP-1, which are known to mediate the recruitment of neutrophils and macrophages respectively. CINC-1 expression was induced in both P1 and P12 pups brains after exposure to LPS+HI at 4h (Fig 5A; data not shown at P1) and, to a lesser extent only at P12 at 48h post-HI (Fig 5A). However, this CINC-1 induction was greater in P12 than P1 brains (2 fold higher). Those results were confirmed by IHC showing at P12 – but not at P1 - an induction of CINC-1 expression in the gray matter only, at 48h post HI and LPS+HI (Fig 5B, C). Infiltrating neutrophils were detected at 48h (but not at 4h) after the aggressions, in P12 brains exposed to HI (mean number of cells counted in one section from ipsilateral hemisphere: 35 ± 28) or LPS+HI (mean number of cells counted in one section from ipsilateral hemisphere: 110 ± 45) (Fig 5D). In contrast, no neutrophils were detected in P1 brain exposed to LPS and/or HI. No neutrophil was detected in the hemisphere contralateral to ischemia at P12 in any of the experimental conditions used. Neutrophils were distributed throughout the lesioned area (both gray and white matter of the hemisphere ipsilateral to ischemia) and their number was correlated with the extent of the histological damage (data not shown), which was more severe following LPS+HI compared to HI alone (Fig 5E).

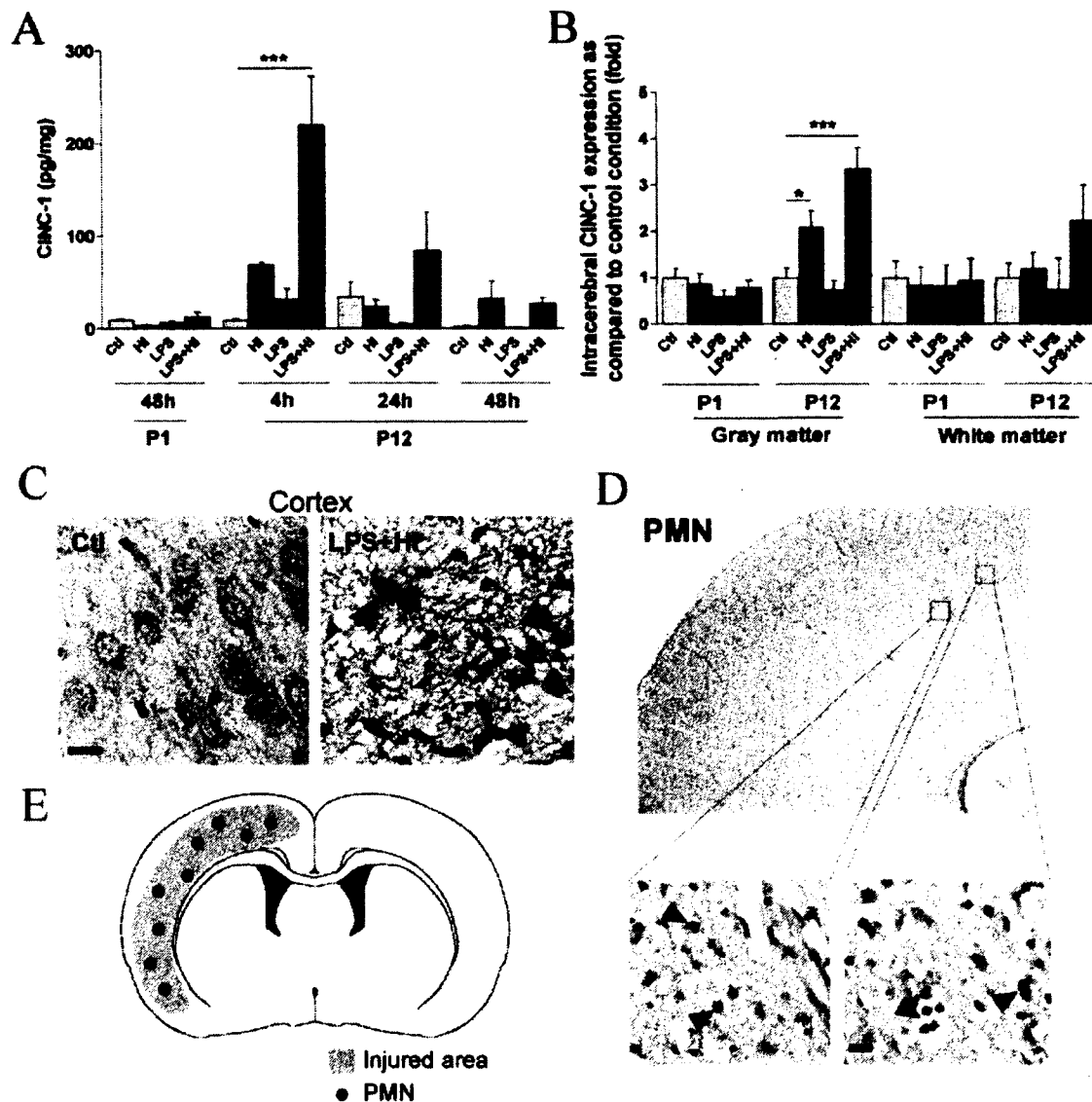


Figure 5. P1 versus P12 intracerebral expressions of CINC-1 and levels of neutrophil infiltrations. No CINC-1 was detected at 48h after HI at P1 in brains exposed or unexposed to LPS+/-HI either by ELISA (A) or IHC (data not shown) 48h post-HI. In contrast, following HI or LPS+HI at P12, CINC-1 was up-regulated in brains at 4, 24 and 48h post-HI as shown by ELISA (A) and IHC experiments (B, C) showed that this increase of CINC-1 intracerebral expression (C, arrowhead) at P12 was limited to the neocortical gray matter (C), but not in the underlying white matter. Neutrophils (D, arrowheads) were detected only at P12 – not at P1 –, at 48h post LPS+HI, in the neocortex ipsilateral to ischemia, *i.e.* in the areas of neocortical damage as illustrated in a schema (E). Protein detection was performed by ELISA on 3 to 4 brains assayed in duplicate at each time point under each experimental condition. IHC was performed at 48h post-HI, in 3 to 4 brains under each experimental condition. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, one-way ANOVA with Newman-Keuls post test. Scale bars = 15 μ m (C, D).

MCP-1 expression was induced early at P1 (only at 4h) and only after exposure to LPS or LPS+HI (data not shown), but not HI alone. At P12, MCP-1 levels were significantly up-regulated, 4h after exposure to HI, LPS, or both combined, and this induction was more important than at P1 (4 fold higher at P12, Fig 6A). MCP-1 expression further increased and peaked at 24h after HI, and at 48h after LPS+HI exposures. The combined LPS+HI aggression led to more sustained expression than did HI alone (Fig 6A). Using IHC, we confirmed that although MCP-1 levels were induced by LPS and LPS+HI at early time points at P1, no change was detected in intracerebral MCP-1 expression at 48h and no CD68+ cells were detected (Fig 6B). In contrast, at P12, we detected a significant increase, but only in gray matter, of MCP-1 expression at 4h and 48h (Fig 6C). The distribution of MCP-1 staining correlated with the lesioned area and also with the area displaying CD68+ infiltrating cells (Fig 6D, E). Some CD68+ cells were also detected in the white matter of the hemisphere contralateral to ischemia (data not shown).

Another major regulator of immune cell recruitment is the integrity of the blood-brain barrier (BBB), which can be altered by pro-inflammatory cytokines [38, 39]. We found that exposure to HI with or without LPS led to a breakdown of the BBB at P12 only, as shown by albumin extravasation into the brain parenchyma detected 48h post-HI (Fig 6F). This was displayed to a greater extent in the gray matter than in the white matter. This BBB breakdown was more pronounced within the brains of LPS+HI exposed animals than in those of animals exposed to HI alone and this distribution was the same for infiltrating immune cells (Fig 6G, see also 5E and 6D for each cell type distribution separately). The distribution of BBB disruption spatially matched the infarcted area as seen at 8 days post-HI (data not shown). No staining and no change in albumin extravasation was detected in either gray or white matter – in any of the experimental conditions used - at earlier time points (i.e. 4h at P12) or at P1. No mast cell infiltration was detected in P1 or P12 brains in any of the experimental conditions used (data not shown).

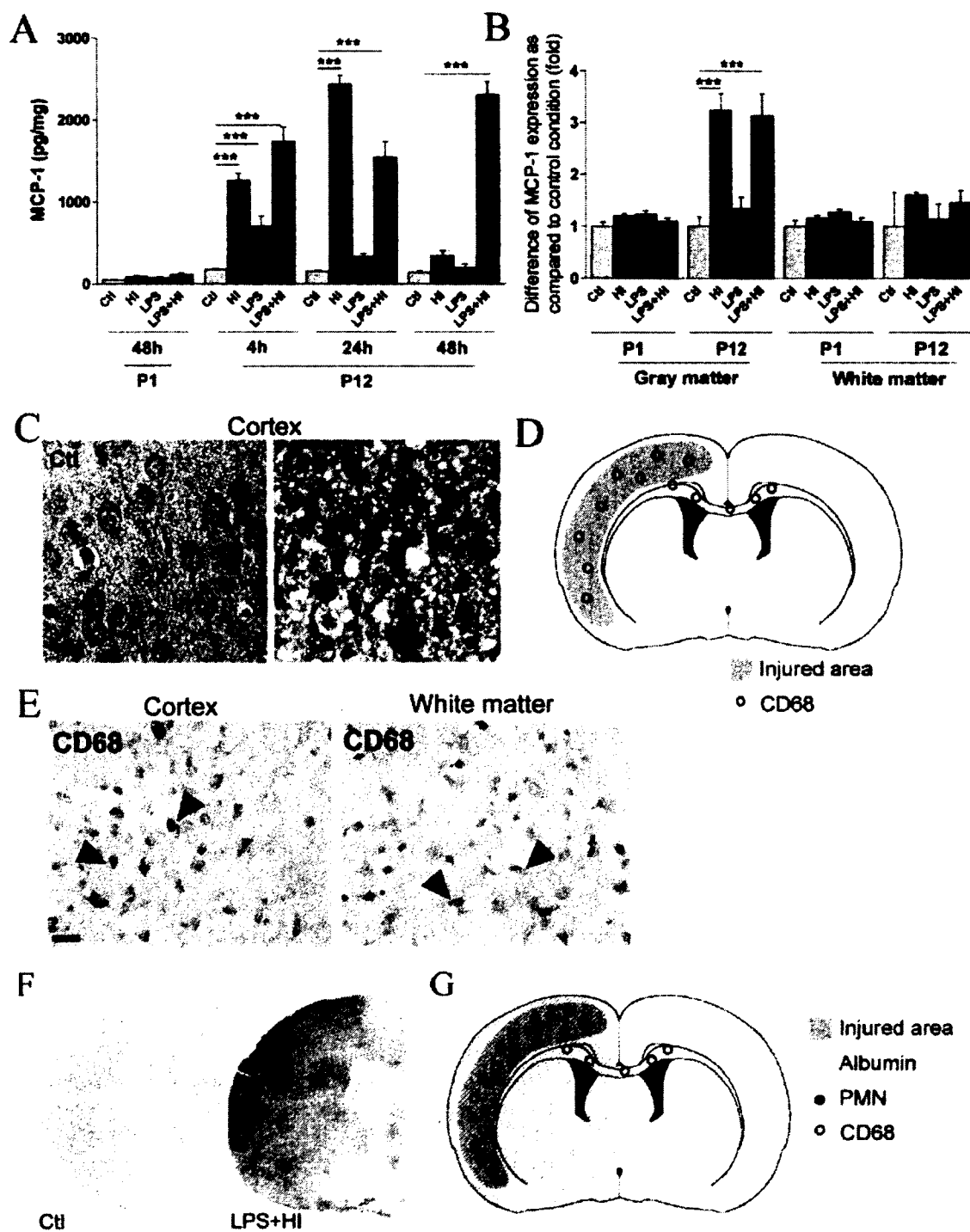


Figure 6. P1 versus P12 intracerebral expressions of MCP-1, levels of neutrophil infiltrations, and BBB leakage. No MCP-1 was detected 48h after HI at P1 in brains exposed or unexposed to LPS+/-HI either by ELISA (A) or IHC (data not shown) at 48h post-HI. In contrast, following HI or LPS+HI at P12, MCP-1 was up-regulated in brains at

4, 24 and 48h post-HI as shown by ELISA (A). IHC experiments (B, C) showed that this increased intracerebral MCP-1 expression (C, arrowhead) at P12 was only detected in the neocortex (C), but not in the underlying white matter. CD68+ cells (E, arrowheads) were detected only at P12 – not at P1 – at 48h post LPS+HI in the neocortex ipsilateral to ischemia, *i.e.* in the areas of neocortical damage as illustrated in a schema (D). Increased albumin staining in right hemispheric gray and white matters of LPS+HI exposed P12 brains compared to control (F). Schematic presentation of distribution of BBB leakage at P12, including albumin extravasations, PMN and CD68+ cells infiltration in HI and LPS+HI brains showing a topographic correlation between all these components of neuroinflammatory response and brain damage (G). Protein detection was performed by ELISA on 3 to 4 brains assayed in duplicate at each time point under each experimental condition. IHC was performed at 48h post-HI, in 3 to 4 brains under each experimental condition. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, one-way ANOVA with Newman-Keuls post test. Scale bars = 15 μm (C, E)

DISCUSSION

Using animal models of brain insults occurring at neurodevelopmental stages equivalent to the *preterm* (P1) and *term* (P12) human brain [34], we showed that exposures to a bacterial endotoxin (LPS) and/or HI led to distinct patterns of neuroinflammatory responses depending on the stage of brain maturation, and on the type of insult. At P1, the neuroinflammatory reaction triggered by HI or LPS+HI was limited to IL-1 β – with no TNF- α – over-expression, without any concomitant induction of classic counteracting anti-inflammatory cytokines. IL-1 β expression at P1 was more prominent within the cerebral white matter than in the grey matter, thus correlating with predominant white matter damage occurrence previously described by us under our P1 experimental conditions in rodents [37], and as also typically seen in premature human newborns [4, 40]. At P1, anti-inflammatory cytokines' responses were absent (IL-6, IL-10), or even down-regulated (IL-1ra, TGF- β 1) under HI or LPS+HI conditions. Lack of anti-inflammatory response at P1 might deprive the challenged brain of neurotrophic factors – such as TGF- β 1, IL-10, IL-1ra and IL-6 – involved in neuronal survival and brain tissue repair following brain injuries [6, 41-50].

At P12, in sharp contrast to P1, both pro- (IL-1 β peaking 8-fold higher than TNF- α at 4h post LPS+HI) and anti-inflammatory cytokines (namely IL-1ra, IL-6, IL-10 and TGF- β 1) were over-expressed within brains exposed to HI or LPS+HI. Despite the combined

induction of pro- and anti-inflammatory cytokines at P12, the balance of pro/anti effect remained strongly oriented towards inflammation, at a neurodevelopmental stage equivalent to that the term human brain. Thus, HI- or LPS+HI-induced chemokine responses (MCP-1 and CINC-1), known to derive in part from the activation of the IL-1 β pathway [51, 52], were much more prominent at P12 than at P1 - particularly under LPS+HI conditions compared to HI alone. Combined, and likely interacting, IL-1 β and chemokine induction were also associated at P12 (but not at P1) with BBB leakage and massive neutrophil infiltration within HI and LPS+HI damaged brain areas.

After identical endotoxin and/or HI exposures, premature human newborn commonly present patchy areas of white matter damage whereas term newborns display major cortico-subcortical infarcts associated with BBB disruption and leukocyte infiltration [4]. The distinct neuroinflammatory responses to similar aggressions were documented in both preterm- (P1) and term-like (P12) brains and their mechanistic features might contribute to the strikingly different age-dependent neuropathological differences of perinatal brain damage observed in rodents [35, 37, 53] as well as between preterm and term human newborns [4].

Systemic adaptive and innate immune responses of the human neonates are known to differ from the adult's one in several ways, such as a bias towards Th2 response, and peripheral blood monocyte stimulation from pathogens leading to higher IL-6, and IL-10 responses, but lower TNF- α expression than in the adults [54, 55]. Certain developmental comparisons have already been performed between neonatal and adult neuroinflammatory responses and across neonatal period [56, 57]. For instance, a "window of susceptibility" to intracerebral IL-1 β exposure was detected in juvenile (2-6 week-old) as opposed to neonatal (P1) or adult (P90) rats, with juvenile rats displaying a peculiar age-dependent hyper-response in term of neutrophil infiltration and neural cell damage [58, 59]. Our experimental data further delineate that over a short time frame, the P1 brain reacts differently than the P12 brain following exposure to systemic endotoxin and/or HI aggressions. The neuroinflammatory response, even when induced at both neurodevelopmental stages, was weaker in P1 than in P12 brains in its neurotoxic, as well as neuroprotective components. In agreement with these experimental results, both IL-1ra,

IL-1 β , and subsequent MMP-9 expressions were shown *in situ*, to be more weakly expressed in preterm than in term damaged white matter from *human* brains [6]. In addition, studies testing the transmigration across barriers of peripheral immune cells showed only modest capacities for circulating leucocytes, such as neutrophils, to migrate into the brain of preterm human newborns as compared to term newborns [55]. This is known to be linked to immature adhesion molecule expression by blood or BBB cells. In addition, the reduced P1 (preterm-like) expression of chemokines we showed at the most immature stage of postnatal brain development might also contribute to the weak preterm recruitment of systemic cells within the brain in our model, as also observed by others [53, 58]. In close correlation with the age-dependant level of CINC-1 production we showed, neutrophils are already known to be implicated in perinatal ischemic brain damage in rodents but only after P7, with a peak of deleterious effects at P12-P30 [34, 58]. Recent data showed that the neonatal BBB is more mature than previously thought, and that after an inflammatory challenge at P1, the BBB was less permeable than later on [58, 60]. This is in keeping with our observations showing that albumin extravasation and leucocytes infiltrations across the BBB were abundant in rat brains exposed to HI, or LPS+HI, at P12, but absent following the same insults at P1.

CONCLUSION

In sum, following HI and combined LPS+HI, the predominant pro-inflammatory IL-1 β response within the brains of preterm- and term-like neonates – whatever the level of anti-inflammatory cytokine response - may have damaging effects at both stages of development. However, the magnitude of the neuroinflammatory response seems to be proportional to the intensity of the IL-1 response as well as to the age-dependent consequences on BBB permeability, chemokines responses, and neutrophil infiltration.

COMPETING INTEREST

We have no financial or non-financial competing interests to disclose.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

MEB and SG are co-first authors with equivalent contributions. MEB, SG and KL carried out the experiments and performed statistical analyses. MEB and SG drafted the manuscript. GS conceived the study. GS and SG designed and coordinated the project. GS helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

ACKNOWLEDGEMENTS AND FUNDING

We thank Monique Sullivan for her help in editing the manuscript. We thank Sinziana Briota for her technical assistance. This work was supported by the CIHR, FRSQ, Foundation of Stars, and the “*Centre des Neurosciences de l'Université de Sherbrooke*”, Canada.

REFERENCES

1. Yuan TM, Sun Y, Zhan CY, Yu HM: **Intrauterine infection/inflammation and perinatal brain damage: role of glial cells and Toll-like receptor signaling.** *J Neuroimmunol* 2010, **229**:16-25.
2. Nelson KB: **Can we prevent cerebral palsy?** *N Engl J Med* 2003, **349**:1765-1769.
3. Ferriero DM: **Neonatal brain injury.** *N Engl J Med* 2004, **351**:1985-1995.
4. Volpe JJ: **Brain injury in premature infants: a complex amalgam of destructive and developmental disturbances.** *Lancet Neurol* 2009, **8**:110-124.
5. Back SA, Riddle A, McClure MM: **Maturation-dependent vulnerability of perinatal white matter in premature birth.** *Stroke* 2007, **38**:724-730.
6. Girard S, Tremblay L, Lepage M, Sebire G: **IL-1 receptor antagonist protects against placental and neurodevelopmental defects induced by maternal inflammation.** *J Immunol* 2010, **184**:3997-4005.
7. Fan LW, Tien LT, Zheng B, Pang Y, Rhodes PG, Cai Z: **Interleukin-1beta-induced brain injury and neurobehavioral dysfunctions in juvenile rats can be attenuated by alpha-phenyl-n-tert-butyl-nitrone.** *Neuroscience* 2010, **168**:240-252.
8. Wang X, Stridh L, Li W, Dean J, Elmgren A, Gan L, Eriksson K, Hagberg H, Mallard C: **Lipopolysaccharide sensitizes neonatal hypoxic-ischemic brain injury in a MyD88-dependent manner.** *J Immunol* 2009, **183**:7471-7477.
9. Aden U, Favrais G, Plaisant F, Winerdal M, Felderhoff-Mueser U, Lampa J, Lelievre V, Gressens P: **Systemic inflammation sensitizes the neonatal brain to**

- excitotoxicity through a pro-/anti-inflammatory imbalance: key role of TNFalpha pathway and protection by etanercept.** *Brain Behav Immun* 2010, **24**:747-758.
10. Fan LW, Mitchell HJ, Tien LT, Rhodes PG, Cai Z: **Interleukin-1beta-induced brain injury in the neonatal rat can be ameliorated by alpha-phenyl-n-tert-butyl-nitrone.** *Exp Neurol* 2009, **220**:143-153.
 11. Cai Z, Lin S, Pang Y, Rhodes PG: **Brain injury induced by intracerebral injection of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha in the neonatal rat.** *Pediatr Res* 2004, **56**:377-384.
 12. Dammann O, Leviton A: **Inflammatory brain damage in preterm newborns--dry numbers, wet lab, and causal inferences.** *Early Hum Dev* 2004, **79**:1-15.
 13. Baud O, Emilie D, Pelletier E, Lacaze-Masmonteil T, Zupan V, Fernandez H, Dehan M, Frydman R, Ville Y: **Amniotic fluid concentrations of interleukin-1beta, interleukin-6 and TNF-alpha in chorioamnionitis before 32 weeks of gestation: histological associations and neonatal outcome.** *Br J Obstet Gynaecol* 1999, **106**:72-77.
 14. Bracci R, Buonocore G: **Chorioamnionitis: a risk factor for fetal and neonatal morbidity.** *Biol Neonate* 2003, **83**:85-96.
 15. Grether JK, Nelson KB: **Maternal infection and cerebral palsy in infants of normal birth weight.** *JAMA* 1997, **278**:207-211.
 16. Kadhim H, Tabarki B, De Prez C, Sebire G: **Cytokine immunoreactivity in cortical and subcortical neurons in periventricular leukomalacia: are cytokines implicated in neuronal dysfunction in cerebral palsy?** *Acta Neuropathol* 2003, **105**:209-216.
 17. Kadhim H, Tabarki B, Verellen G, De Prez C, Rona AM, Sebire G: **Inflammatory cytokines in the pathogenesis of periventricular leukomalacia.** *Neurology* 2001, **56**:1278-1284.
 18. Nelson KB, Grether JK, Dambrosia JM, Walsh E, Kohler S, Satyanarayana G, Nelson PG, Dickens BF, Phillips TM: **Neonatal cytokines and cerebral palsy in very preterm infants.** *Pediatr Res* 2003, **53**:600-607.
 19. Wu YW, Escobar GJ, Grether JK, Croen LA, Greene JD, Newman TB: **Chorioamnionitis and cerebral palsy in term and near-term infants.** *JAMA* 2003, **290**:2677-2684.
 20. Yoon BH, Park CW, Chaiworapongsa T: **Intrauterine infection and the development of cerebral palsy.** *BJOG* 2003, **110 Suppl 20**:124-127.
 21. Kadhim H, Khalifa M, Deltenre P, Casimir G, Sebire G: **Molecular mechanisms of cell death in periventricular leukomalacia.** *Neurology* 2006, **67**:293-299.
 22. Girard S, Sebire G, Kadhim H: **Proinflammatory orientation of the interleukin 1 system and downstream induction of matrix metalloproteinase 9 in the pathophysiology of human perinatal white matter damage.** *J Neuropathol Exp Neurol* 2010, **69**:1116-1129.

23. Meng SZ, Takashima S: **Expression of transforming growth factor-beta 1 in periventricular leukomalacia.** *J Child Neurol* 1999, **14**:377-381.
24. Pang Y, Fan LW, Zheng B, Cai Z, Rhodes PG: **Role of interleukin-6 in lipopolysaccharide-induced brain injury and behavioral dysfunction in neonatal rats.** *Neuroscience* 2006, **141**:745-755.
25. Mecha M, Rabadan MA, Pena-Melian A, Valencia M, Mondejar T, Blanco MJ: **Expression of TGF-betas in the embryonic nervous system: analysis of interbalance between isoforms.** *Dev Dyn* 2008, **237**:1709-1717.
26. Gadiant RA, Otten U: **Expression of interleukin-6 (IL-6) and interleukin-6 receptor (IL-6R) mRNAs in rat brain during postnatal development.** *Brain Res* 1994, **637**:10-14.
27. Marz P, Heese K, Dimitriadis-Schmutz B, Rose-John S, Otten U: **Role of interleukin-6 and soluble IL-6 receptor in region-specific induction of astrocytic differentiation and neurotrophin expression.** *Glia* 1999, **26**:191-200.
28. Zhao B, Schwartz JP: **Involvement of cytokines in normal CNS development and neurological diseases: recent progress and perspectives.** *J Neurosci Res* 1998, **52**:7-16.
29. Zocchia C, Spiga G, Rabin SJ, Grekova M, Richert J, Chernyshev O, Colton C, Mocchetti I: **Biological activity of interleukin-10 in the central nervous system.** *Neurochem Int* 1997, **30**:433-439.
30. Knoblach SM, Faden AI: **Interleukin-10 improves outcome and alters proinflammatory cytokine expression after experimental traumatic brain injury.** *Exp Neurol* 1998, **153**:143-151.
31. Mehler MF, Kessler JA: **Cytokines in brain development and function.** *Adv Protein Chem* 1998, **52**:223-251.
32. Pang Y, Rodts-Palenik S, Cai Z, Bennett WA, Rhodes PG: **Suppression of glial activation is involved in the protection of IL-10 on maternal E. coli induced neonatal white matter injury.** *Brain Res Dev Brain Res* 2005, **157**:141-149.
33. Mesples B, Plaisant F, Gressens P: **Effects of interleukin-10 on neonatal excitotoxic brain lesions in mice.** *Brain Res Dev Brain Res* 2003, **141**:25-32.
34. Vannucci RC, Connor JR, Mauger DT, Palmer C, Smith MB, Towfighi J, Vannucci SJ: **Rat model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage.** *J Neurosci Res* 1999, **55**:158-163.
35. Larouche A, Roy M, Kadhim H, Tsanaclis AM, Fortin D, Sebire G: **Neuronal injuries induced by perinatal hypoxic-ischemic insults are potentiated by prenatal exposure to lipopolysaccharide: animal model for perinatally acquired encephalopathy.** *Dev Neurosci* 2005, **27**:134-142.
36. Girard S, Kadhim H, Larouche A, Roy M, Gobeil F, Sebire G: **Pro-inflammatory disequilibrium of the IL-1 beta/IL-1ra ratio in an experimental model of perinatal brain damages induced by lipopolysaccharide and hypoxia-ischemia.** *Cytokine* 2008, **43**:54-62.

37. Girard S, Kadhim H, Beaudet N, Sarret P, Sebire G: **Developmental motor deficits induced by combined fetal exposure to lipopolysaccharide and early neonatal hypoxia/ischemia: a novel animal model for cerebral palsy in very premature infants.** *Neuroscience* 2009, **158**:673-682.
38. Blamire AM, Anthony DC, Rajagopalan B, Sibson NR, Perry VH, Styles P: **Interleukin-1beta -induced changes in blood-brain barrier permeability, apparent diffusion coefficient, and cerebral blood volume in the rat brain: a magnetic resonance study.** *J Neurosci* 2000, **20**:8153-8159.
39. Anthony D, Dempster R, Fearn S, Clements J, Wells G, Perry VH, Walker K: **CXC chemokines generate age-related increases in neutrophil-mediated brain inflammation and blood-brain barrier breakdown.** *Curr Biol* 1998, **8**:923-926.
40. Folkerth RD: **Neuropathologic substrate of cerebral palsy.** *J Child Neurol* 2005, **20**:940-949.
41. Zhu Y, Yang GY, Ahlemeyer B, Pang L, Che XM, Culmsee C, Klumpp S, Kriegstein J: **Transforming growth factor-beta 1 increases bad phosphorylation and protects neurons against damage.** *J Neurosci* 2002, **22**:3898-3909.
42. Boche D, Cunningham C, Gauldie J, Perry VH: **Transforming growth factor-beta 1-mediated neuroprotection against excitotoxic injury in vivo.** *J Cereb Blood Flow Metab* 2003, **23**:1174-1182.
43. Henrich-Noack P, Prehn JH, Kriegstein J: **TGF-beta 1 protects hippocampal neurons against degeneration caused by transient global ischemia. Dose-response relationship and potential neuroprotective mechanisms.** *Stroke* 1996, **27**:1609-1614; discussion 1615.
44. Herrmann O, Tarabin V, Suzuki S, Attigah N, Coserea I, Schneider A, Vogel J, Prinz S, Schwab S, Monyer H, et al: **Regulation of body temperature and neuroprotection by endogenous interleukin-6 in cerebral ischemia.** *J Cereb Blood Flow Metab* 2003, **23**:406-415.
45. Mulcahy NJ, Ross J, Rothwell NJ, Loddick SA: **Delayed administration of interleukin-1 receptor antagonist protects against transient cerebral ischaemia in the rat.** *Br J Pharmacol* 2003, **140**:471-476.
46. Froen JF, Munkeby BH, Stray-Pedersen B, Saugstad OD: **Interleukin-10 reverses acute detrimental effects of endotoxin-induced inflammation on perinatal cerebral hypoxia-ischemia.** *Brain Res* 2002, **942**:87-94.
47. Spera PA, Ellison JA, Feuerstein GZ, Barone FC: **IL-10 reduces rat brain injury following focal stroke.** *Neurosci Lett* 1998, **251**:189-192.
48. Ali C, Nicole O, Docagne F, Lesne S, MacKenzie ET, Nouvelot A, Buisson A, Vivien D: **Ischemia-induced interleukin-6 as a potential endogenous neuroprotective cytokine against NMDA receptor-mediated excitotoxicity in the brain.** *J Cereb Blood Flow Metab* 2000, **20**:956-966.

49. Clark WM, Rinker LG, Lessov NS, Hazel K, Hill JK, Stenzel-Poore M, Eckenstein F: **Lack of interleukin-6 expression is not protective against focal central nervous system ischemia.** *Stroke* 2000, **31**:1715-1720.
50. Loddick SA, Turnbull AV, Rothwell NJ: **Cerebral interleukin-6 is neuroprotective during permanent focal cerebral ischemia in the rat.** *J Cereb Blood Flow Metab* 1998, **18**:176-179.
51. Campbell SJ, Wilcockson DC, Butchart AG, Perry VH, Anthony DC: **Altered chemokine expression in the spinal cord and brain contributes to differential interleukin-1beta-induced neutrophil recruitment.** *J Neurochem* 2002, **83**:432-441.
52. Campbell SJ, Perry VH, Pitossi FJ, Butchart AG, Chertoff M, Waters S, Dempster R, Anthony DC: **Central nervous system injury triggers hepatic CC and CXC chemokine expression that is associated with leukocyte mobilization and recruitment to both the central nervous system and the liver.** *Am J Pathol* 2005, **166**:1487-1497.
53. Towfighi J, Mauger D, Vannucci RC, Vannucci SJ: **Influence of age on the cerebral lesions in an immature rat model of cerebral hypoxia-ischemia: a light microscopic study.** *Brain Res Dev Brain Res* 1997, **100**:149-160.
54. Schultz C, Temming P, Bucsky P, Gopel W, Strunk T, Hartel C: **Immature anti-inflammatory response in neonates.** *Clin Exp Immunol* 2004, **135**:130-136.
55. Levy O: **Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates.** *Nat Rev Immunol* 2007, **7**:379-390.
56. Leviton A, Fichorova R, Yamamoto Y, Allred EN, Dammann O, Hecht J, Kuban K, McElrath T, O'Shea TM, Paneth N: **Inflammation-related proteins in the blood of extremely low gestational age newborns. The contribution of inflammation to the appearance of developmental regulation.** *Cytokine* 2011, **53**:66-73.
57. Qiu L, Zhu C, Wang X, Xu F, Eriksson PS, Nilsson M, Cooper-Kuhn CM, Kuhn HG, Blomgren K: **Less neurogenesis and inflammation in the immature than in the juvenile brain after cerebral hypoxia-ischemia.** *J Cereb Blood Flow Metab* 2007, **27**:785-794.
58. Anthony DC, Bolton SJ, Fearn S, Perry VH: **Age-related effects of interleukin-1 beta on polymorphonuclear neutrophil-dependent increases in blood-brain barrier permeability in rats.** *Brain* 1997, **120** (Pt 3):435-444.
59. Lawson LJ, Perry VH: **The unique characteristics of inflammatory responses in mouse brain are acquired during postnatal development.** *Eur J Neurosci* 1995, **7**:1584-1595.
60. Vexler ZS, Yenari MA: **Does inflammation after stroke affect the developing brain differently than adult brain?** *Dev Neurosci* 2009, **31**:378-393.

C. DISCUSSIONS ET CONCLUSIONS

Les cytokines pro-inflammatoires jouent un rôle dans la pathophysiologie des dommages cérébraux périnataux (Girard *et al.*, 2010). Les cytokines anti-inflammatoires connues pour limiter et diminuer l'expression de l'IL-1 β et du TNF α sont des médiateurs potentiellement importants. En effet, sachant que le niveau de développement cérébral du rat à P1 correspond à un grand prématuré humain, tandis qu'à P12 il correspond à un nouveau-né à terme, nous avons démontré qu'en réponse au LPS et/ou à l'HI la réponse cytokinique anti-inflammatoire est absente à P1, voire diminuée par rapport au niveau constitutif chez le prématuré, dans plusieurs types d'agression impliquant le LPS et/ou l'HI. Par contre, à P12, l'expression intracérébrale de cytokines anti-inflammatoires est nettement activée suite aux agressions HI ou LPS+HI, tandis qu'aucune induction n'est observée avec le LPS seul. Malgré cette réponse anti-inflammatoire accrue à P12 par rapport à P1, la réponse pro-inflammatoire est non seulement présente à P12, mais également à P1, quoi qu'à P12 les niveaux se situent même à un niveau nettement supérieur par rapport à P1. Une production de chimiokines est également détectée à P12 – mais pas à P1 – dans le cerveau des rats exposés à l'HI avec ou sans LPS. Un recrutement massif de polynucléaires neutrophiles et de macrophages infiltrant le tissu cérébral est également détecté à P12 dans les régions lésées du cerveau, mais pas à P1. Dans ces régions lésées, uniquement à P12, la BHE est perméable concomitamment à l'infiltration cellulaire (Tableau 1).

		P1	P12
Cytokines pro-inflammatoires	IL-1 β	↑	↑
	TNF α	↑	↑
Cytokines anti-inflammatoires	IL-6	-	↑
	IL-10	-	↑
	TGF β 1	↓	↑
	IL-1ra	↓	↑
Chimiokines	CINC1	-	↑
	MCP1	-	↑
Cellules infiltrantes	PMN	-	↑
	M Φ	-	↑
Perméabilité de la BHE		non	oui

Tableau 1. Résumé des résultats à P1 et P12. Induction des différentes molécules étudiées à P1 et P12 dans la condition LPS+HI à 48h post-HI par rapport au groupe contrôle. La réponse inflammatoire qui est plus forte à P12 corrèle avec l'infiltration de cellules immunitaires systémiques et un bris de barrière.

Niveau basal d'expression de cytokines

Des travaux se sont concentrés à déterminer l'expression basale de cytokines systémique dans un but comparatif entre le nouveau-né prématuré et celui à terme. En fait, le système immunitaire du nouveau-né est décrit comme étant orienté vers une réponse Th2 (Levy, 2007). Des différences de réponses immunitaires systémiques sont aussi présentes entre le nouveau-né prématuré et celui à terme (Georgeson *et al.*, 2001, Kallman *et al.*, 1998), mais les éventuelles particularités des réponses neuroinflammatoires restent mal connues. Notre travail clarifie le profil d'expression intracérébrale de cytokines en réponse aux expositions à des fragments de pathogènes et/ou à l'HI postnatale. L'étude de cerveaux contrôles montre que toutes les cytokines pro- et anti-inflammatoires étudiées sont constitutivement

produites, mais à un faible niveau, dans le cerveau immature. Le niveau basal d'expression intracérébrale de cytokines est proportionnel au stade de développement cérébral du nouveau-né. Il est possible que cette production constitutive de cytokines anti-inflammatoires participe à la répression de la production de cytokines pro-inflammatoires lors des agressions à P1, mais d'autres facteurs doivent intervenir puisqu'un tel phénomène d'atténuation de la réponse pro-inflammatoire n'est pas constaté à P12, alors que la réponse anti-inflammatoire est beaucoup plus marquée qu'à P1. Il semble donc que la faible production de cytokines pro- et anti-inflammatoires à P1, comparativement à P12, soit probablement liée à une immaturité du développement des cellules neuroimmunes.

Évolution de la balance pro- versus anti-inflammatoire entre P1 et P12

Nos résultats confirment, lors d'agressions LPS+/- HI post-natales, des études montrant à P1 un débalancement pro-inflammatoire particulier de l'IL-1 β /IL-1ra (Girard *et al.*, 2008) et l'absence de production de TNF- α (Roy *et al.*, 2009) dans un modèle d'exposition *prénatale* au LPS combiné à l'HI postnatale. Ce déséquilibre IL-1/IL-1ra et la faible production d'autres cytokines anti-inflammatoire constatés à P1 s'inversent à P12, où l'on constate une surexpression intracérébrale d'IL-6, IL-10, TGF β 1 et IL-1ra suite à l'HI ou LPS+HI, comparativement au contrôle. La production de cytokines pro-inflammatoires s'intensifie également à P12 où une réponse TNF- α , et surtout IL-1 β très intense, sont constatés. La faible réponse pro-inflammatoire à P1 ne semble donc pas due à une surexpression constitutive ni induite de cytokines anti-inflammatoires, mais plutôt à une immaturité globale des capacités des cellules cérébrales à produire tous types cytokines sauf l'IL-1 β . À P12, malgré des aptitudes accrues des cellules cérébrales à produire des cytokines anti-inflammatoires, la réponse pro-inflammatoire est plus intense qu'à P1.

Réponse anti-inflammatoire à P1

Nos résultats démontrent que l'exposition au LPS et/ou à l'HI à P1 ne mène à aucune variation de l'expression de l'IL-6 et de l'IL-10 par rapport au contrôle et à une diminution

de l'IL-1ra et du TGFβ1 à des niveaux inférieurs à celui des niveaux de base dans les contrôles. Cette diminution pourrait s'expliquer par quelques hypothèses.

Pour le TGFβ1 en ELISA, l'hypothèse se base sur le fait qu'il ne s'agit pas d'un défaut global d'expression de protéine, puisque d'autres protéines augmentent (par exemple l'IL-1β). Ainsi, la quantité de TGFβ1, malgré qu'elle reste stable, se reflète par un ratio plus faible par rapport à la quantité totale de protéine ce qui résulte en une diminution apparente de la protéine. Par contre les données d'IHC démontrent que le TGFβ1 diminue dans la condition LPS+HI à P1 ce qui confirme la diminution.

Une autre hypothèse est que parmi les protéines augmentées, celles impliquées dans la dégradation du TGFβ1 et de l'IL-1ra en fait parti. Ainsi, bien que la production des cytokines ne soit pas modulée, leur dégradation est déclenchée. Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait étudier l'expression de protéines qui sont responsables de la dégradation du TGFβ1 et de l'IL-1ra dans ce même contexte.

La biologie des cytokines fonctionne en réseau. La diminution ou l'augmentation d'une cytokine résulte de l'effet de plusieurs autres cytokines. Dans le cas du TGFβ1, d'autres membres de la grande famille du TGFβ et peuvent également être régulés à la hausse par ces agression et ainsi activer des voies de rétroinhibition qui agissent aussi sur la répression de production du TGFβ1. Par exemple l'IFN induit d'expression de Smad7 qui interfère avec la phosphorylation du récepteur TGFβ ce qui réduit la capacité d'auto-induction des membres de la famille du TGFβ (Massague, 1998). L'étude des récepteurs du TGFβ1 et de l'IL-1ra pourrait également vérifier cette hypothèse, puisqu'une baisse d'expression de ceux-ci est reliée à la diminution d'expression de son ligand.

De façon globale, la diminution de l'IL-1ra et du TGFβ1 est probablement due à l'immaturation de l'immunité innée du nouveau-né prématuré, mais rien ne permet de confirmer le mécanisme pour l'instant.

Effet de la maturation cellulaire

Le niveau de maturation cellulaire durant le développement pourrait donc être impliqué dans les variations de production de cytokines. Il est connu qu'à P1 les cellules microgliales encore peu différenciées exprimeraient peu ou pas TLR-4 (Harju *et al.*, 2001), le récepteur principal du LPS. On sait aussi que la tolérance à l'HI des cellules cérébrales est documentée comme étant meilleure à P1 qu'à P12, avec possiblement une moindre activation de la voie HIF qui est inductrice de cytokines (Alvarez-Diaz *et al.*, 2007, Hagberg *et al.*, 2002). Ceci pourrait influencer le niveau de réponse cytokinique induite par l'HI. Enfin, nos résultats montrent un défaut de production de chimiokines CINC-1 et MCP-1 à P1, ainsi qu'un maintien de la perméabilité de la BHE, et une absence d'infiltration du tissu cérébral par les polynucléaires neutrophiles, alors que l'inverse est observé pour chacun de ces points à P12. L'absence de perméabilisation de la barrière et donc de contribution systémique à la neuroinflammation fournit également une explication à la plus faible réponse neuroinflammatoire à P1 qu'à P12.

Effet additif du LPS

Des études ont démontré que le LPS injecté avant l'exposition à l'HI agit comme agent de préconditionnement dans le cerveau. En fait, le préconditionnement est le fait qu'un agent agresseur amène la tolérance à une agression subséquente, et ainsi, minimise les dommages cérébraux (Lin *et al.*, 2009, Mallard et Hagberg, 2007). Au contraire, certaines études démontrent plutôt une sensibilisation à l'HI par le LPS, soit une amplification de la réaction qui cause l'augmentation des lésions cérébrales (Eklind *et al.*, 2005, Girard *et al.*, 2009). Tout dépend de la dose donnée et surtout du temps qui espace les agressions. Cependant, dans plusieurs de nos résultats, le LPS n'a pas d'effet additif ou répressif à l'HI, ni même d'effet seul. En systémique, il est décrit que le LPS chez le nouveau-né donne de moins grandes réactions immunitaires que chez l'adulte. La fonction de TLR4 qui n'est pas mature chez le nouveau-né pourrait expliquer l'absence de réaction inflammatoire chez les rats (Sadeghi *et al.*, 2007).

Expression de cytokines uni- ou bi-latérale

Nous avons démontré que l'expression de cytokines est répandue dans les deux hémisphères à P1 et qu'aucune différence d'expression de ces cytokines n'est retrouvée entre ces deux hémisphères à P1. Au contraire, à P12, l'expression de cytokines est uniquement dans l'hémisphère ipsilatéral à l'ischémie. Parmi les agressions infligées aux animaux, l'exposition au LPS et l'hypoxie sont des phénomènes qui affectent l'organisme entier. Il n'est donc pas inattendu de détecter des dommages dans les deux hémisphères cérébraux comme c'est le cas à P1. Le cerveau des ratons à P1 est connu pour mieux compenser la ligature permanente d'une artère carotide commune, et réussir à maintenir un meilleur flux sanguin que le cerveau plus mature grâce à un flux sanguin artériel se faisant via des artères collatérales encore très efficaces à ce stade de développement ce qui atténue l'impact de l'agression, au prix d'une réduction globale (bilatérale) – même si asymétrique – du flux sanguin (Alvarez-Diaz *et al.*, 2007). Par contre, l'effet de l'ischémie (la ligature permanente de la carotide commune) en terme de chute de débit sanguin cérébral ipsilatéral à la ligature est beaucoup plus important à P12 qu'à P1, en raison d'un affaiblissement des possibilités de circulation collatérale de suppléance, ce qui explique que les dommages cérébraux ne sont détectés que dans l'hémisphère ipsilatéral à l'ischémie, et ce de façon plus sévère qu'à P1, tandis que l'hémisphère controlatéral est préservé, puisqu'il conserve intact son débit cérébral, non dévié, comme à P1, pour suppléer à la ligature. Le fait de ne pas retrouver de dommages dans l'hémisphère controlatéral pourrait aussi être expliqué par le fait qu'une augmentation de certaines cytokines anti-inflammatoires détectée dans la substance blanche de cet hémisphère controlatéral à l'ischémie qui viendrait protéger l'autre hémisphère de dommages cérébraux. Nos résultats démontrent aussi la présence de cellules microgliales qui pourrait être à l'origine de la production de ces cytokines dans cette région.

Validité du modèle animal

Nos modèles animaux représentent bien ce qui est retrouvé en clinique chez les patients atteints de dommages cérébraux. Notre modèle à P1 reproduit les lésions à la substance

blanche tout comme ce qui est vu chez le grand prématuré humain (Deng, 2010). Tandis qu'à P12, l'étendue et la profondeur des dommages reflètent bien les dommages très sévères, cavitaires, touchant le cortex, la substance blanche et les noyaux gris de la base retrouvés chez le nouveau-né à terme (Wyatt, 2007). Les modèles animaux de dommages cérébraux faits chez le rat à P7 correspondant à un nouveau-né prématuré, proche du terme (34-37 semaines de gestation chez l'homme), donnent plutôt des lésions similaires à ce que nous avons produit à P12, soit principalement des dommages neuronaux ipsilatéral à l'ischémie (Hagberg *et al.*, 1997, Hu *et al.*, 2000). Il était donc nécessaire d'utiliser un modèle d'âge plus précoce, soit P1, afin de bien saisir les différences entre les deux modèles dans le but de comprendre les différences chez le nouveau-né prématuré versus à terme. L'utilisation du LPS est adéquate pour cette étude, puisque les infections à *E.coli* sont fréquentes en fin de grossesse (par exemple les infections placentaires qui produisent une chorioamnionite) et sont corrélées à la survenue de lésions cérébrales chez le nouveau-né aussi bien prématuré qu'à terme (Wang *et al.*, 2006). De plus, le LPS est un composé utilisé couramment pour étudier différents systèmes d'inflammation et ses modalités d'utilisation et ses mécanismes d'action sont donc très documentés. L'HI est bien connu dans le domaine des dommages cérébraux et nos méthodes ont été adaptées selon l'âge développemental du rat, pour les raisons décrites précédemment. Ainsi, notre modèle est fiable et peut servir de base pour l'étude comparative du prématuré et du nouveau-né à terme, comme dans notre cas où nous avons décrit les différences de réactions neuroinflammatoires entre ces deux populations.

Séquence d'évènement à P1 et P12

Selon nos résultats, nous pouvons poser l'hypothèse quant à la séquence des évènements qui se produisent à P1 et P12. D'après nos résultats, le manque d'oxygène et d'apport sanguin à P12 avec ou sans composant bactérien, les cytokines pro- inflammatoires sont les premières à être exprimées dans la circulation systémique, mais également au cerveau du côté ipsilatéral à l'agression. Les cytokines anti-inflammatoires sont ensuite induites pour venir atténuer la réponse et parallèlement, les chimiokines sont très précocement et fortement induites, probablement - entre autre - par l'effet de l'IL-1 β autant au niveau

systémique que cérébral, ce qui déclenche le recrutement de neutrophiles et macrophages au cerveau. Cette cascade inflammatoire participerait aux lésions des neurones dans le cerveau à terme et subséquemment, à des dommages de la substance grise dans la région où une réponse neuroinflammatoire extrême a lieu, comparativement à ce qui est observé à P1 (c.f. Figure 8). Notre hypothèse explicative des événements à P1 est que la gliose et la production de cytokine pro-inflammatoire qui se fait dans chacun des hémisphères contribue aux dommages des oligodendrocytes (une des principales cellules de la substance blanche) étant donné leur vulnérabilité à l'inflammation et à l'HI dans le cerveau immature (Kinney et Back, 1998). L'IL-1 β semble la principale cytokine pro-inflammatoire impliquée dans le contexte des dommages cérébraux du nouveau-né prématuré. Son effet est probablement amplifié à ce stade de développement par la diminution paradoxale de la synthèse d'IL-1ra et par l'absence ou la diminution de synthèse des autres cytokines anti-inflammatoires. Le défaut de production de l'IL-6 et du TGF β 1 dans le cerveau à P1 exposé au LPS et/ou à l'HI pourrait induire un manque de support trophique intervenant dans la réparation du tissu neural. On sait en effet que l'IL-6 et le TGF β 1 ont un rôle neurotrophique direct ou indirect (via l'induction de la synthèse d'autres facteurs neurotrophiques) qui est fondamental dans la limitation des lésions ischémiques du cerveau adulte et aussi dans leur réparation, via notamment certains mécanismes de plasticité/réparation cérébrale (c.f. Figure 9).

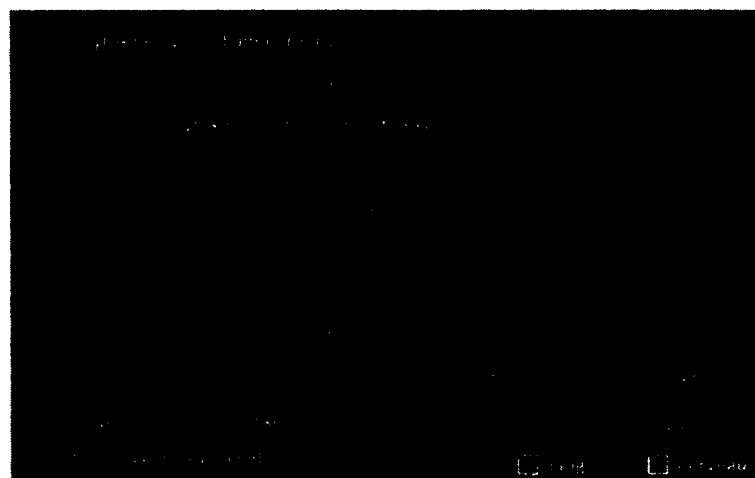


Figure 8. Événements séquentiels hypothétiques suite à l'induction de lésions cérébrales chez le rat à P12. La réponse inflammatoire se retrouve d'abord au niveau

sanguin et l'induction de cytokines et chimiokines au cerveau permettent le phénomène de gliose ainsi que l'entrée de cellules immunitaires systémiques. Les neurones sont les principales cellules atteintes, menant ainsi à des dommages de la substance grise majoritairement.

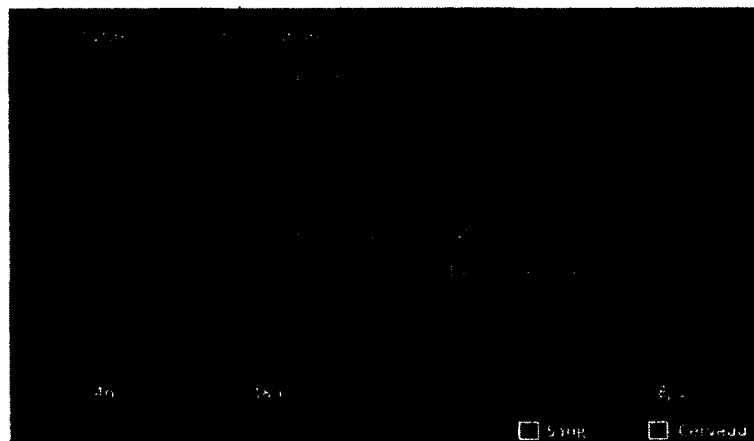


Figure 9. Événements séquentiels hypothétiques suite à l'induction de lésions cérébrales chez le rat à P1. La réponse inflammatoire est faible et n'implique pas l'immunité systémique. Les oligodendrocytes sont principalement affecté, d'où les dommages à la substance blanche.

Perspectives

Pour confirmer nos hypothèses sur le rôle différencié des cytokines pro- et anti-inflammatoire à P1 versus P12, il serait intéressant de regarder l'effet de bloqueur de neutrophiles sur l'étendue des lésions à P12, et l'effet de bloquant de l'IL-1 et de TNF- α à P1 et à P12, voire l'effet protecteur de l'administration de cytokines anti-inflammatoire comme l'IL-10 qui n'est pas produite à P1. Dans des modèles animaux de dommages cérébraux ischémiques chez l'adulte, l'utilisation de bloquant de neutrophiles ou encore de molécules associées à leur infiltration, tel la chimiokine CINC-1 ou les molécules d'adhésion comme ICAM-1, sont utilisés et réduisent la mortalité, la taille de la lésion, ainsi que les déficits moteurs (Cao *et al.*, 2009, Jin *et al.*, 2009). Il serait tout aussi intéressant d'approfondir la voie par laquelle les cellules sont normalement recrutées, afin

de déterminer si l'immaturation du prématuré affecte l'ensemble de la production des molécules impliquées ou si la déficience d'une d'entre elle cause l'absence des autres. Le blocage de cytokines pro-inflammatoires dans les deux populations pourrait être intéressant afin de déterminer l'implication de chacune d'entre elle, à savoir si effectivement l'absence de cytokine pro-inflammatoire améliore l'état des lésions et au contraire que l'absence d'une cytokine anti-inflammatoire mène nécessairement à l'aggravation du dommage. Des études ont déjà démontré au laboratoire des effets bénéfiques de l'IL-1ra recombinant humain dans un modèle d'infection gestationnelle (Girard *et al.*, 2010). La co-localisation des cytokines et chimiokines avec les différentes populations cellulaires au cerveau serait pertinente à regarder afin de bien comprendre le phénomène. À P12, Karine Lavoie, MSc, a démontré que très peu de cellules marquées à l'IL-1 β ou au TNF α étaient positives pour un marquage astrocytaire ou microglial, ce qui suggère la participation des cellules infiltrantes, notamment des macrophages et des neutrophiles. L'expression systémique des différentes molécules et cellules inflammatoires à P12 serait pertinente à approfondir dans le but de connaître le « time course » de ces molécules. De plus, le lien plus clair entre la réaction systémique et le SNC pourrait être approfondi parallèlement.

Conclusion

Nos résultats démontrent que la différence de réaction inflammatoire âge-dépendante suite à l'exposition au LPS+HI pourrait contribuer aux différences de profil lésionnel entre le nouveau-né prématuré et celui à terme et démontre donc l'importance de considérer la population des nouveau-nés prématurés séparément de ceux nés à terme. Il est également tout aussi important de considérer le stade de développement cérébral, que le stade de maturation du système immunitaire dans l'étude physiopathologique et les essais de traitements neuroprotecteurs des lésions cérébrales périnatales.

D. REMERCIEMENTS

Je tiens premièrement à remercier mon directeur de recherche, Dr. Guillaume Sébire, de m'avoir donné l'opportunité de faire ma maîtrise parmi son équipe de recherche. Je le remercie pour son support autant intellectuel que moral, ses encouragements et son partage de connaissances scientifiques, mais aussi pour sa confiance qui me permet d'obtenir mon premier emploi dans le domaine de la recherche au sein de son laboratoire.

Merci à mes collègues, Karine et Sylvie. D'abord merci à Karine qui a été mon égal dans le laboratoire. Nous avons pu s'encourager l'une et l'autre, discuter et réfléchir à nos projets qui s'entrecroisaient tout au long de nos stages et de notre maîtrise. J'ai apprécié tous nos échanges, autant scientifiques que personnels. Un énorme merci à Sylvie de m'avoir formé dès mon premier stage. Elle m'a fait connaître la recherche et m'a suivi jusqu'à la fin de ma maîtrise, et je n'aurais pas pu espérer une personne plus passionnée et motivante pour m'initier dans le domaine. Je la remercie pour tous les conseils, aide, support et aussi pour nos discussions sur la science, sur nos cours de pédagogie et aussi sur la vie de tous les jours. Elle a été pour moi un mentor exceptionnel et je suis convaincue qu'une grande carrière scientifique l'attend, je lui souhaite le meilleur des succès.

Merci à Hélène, sans qui le laboratoire n'aurait pas été le même. Travailler avec une personne aussi généreuse et efficace est toujours très agréable.

Merci aux membres de mon jury d'évaluation de prendre le temps de m'apporter critiques et commentaires à mon projet.

Merci à ma famille et à mes amis pour leur support moral, mais surtout pour le divertissement durant mes études.

Je tiens également à remercier tous ceux qui ont collaborés de près ou de loin à ce projet que je n'aurais pas mentionné ici.

E. LISTE DES RÉFÉRENCES

Aden U, Favrais G, Plaisant F, Winerdal M, Felderhoff-Mueser U, Lampa J, et al. Systemic inflammation sensitizes the neonatal brain to excitotoxicity through a pro-/anti-inflammatory imbalance: key role of TNFalpha pathway and protection by etanercept. *Brain Behav Immun*. 2010;24(5):747-58.

Ali C, Nicole O, Docagne F, Lesne S, MacKenzie ET, Nouvelot A, et al. Ischemia-induced interleukin-6 as a potential endogenous neuroprotective cytokine against NMDA receptor-mediated excitotoxicity in the brain. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2000;20(6):956-66.

Alvarez-Diaz A, Hilario E, de Cerio FG, Valls-i-Soler A, Alvarez-Diaz FJ. Hypoxic-ischemic injury in the immature brain--key vascular and cellular players. *Neonatology*. 2007;92(4):227-35.

Anthony D, Dempster R, Fearn S, Clements J, Wells G, Perry VH, et al. CXC chemokines generate age-related increases in neutrophil-mediated brain inflammation and blood-brain barrier breakdown. *Curr Biol*. 1998;8(16):923-6.

Anthony DC, Bolton SJ, Fearn S, Perry VH. Age-related effects of interleukin-1 beta on polymorphonuclear neutrophil-dependent increases in blood-brain barrier permeability in rats. *Brain*. 1997;120 (Pt 3):435-44.

Arvin B, Neville LF, Barone FC, Feuerstein GZ. The role of inflammation and cytokines in brain injury. *Neurosci Biobehav Rev*. 1996;20(3):445-52.

Back SA, Riddle A, McClure MM. Maturation-dependent vulnerability of perinatal white matter in premature birth. *Stroke*. 2007;38(2 Suppl):724-30.

Back SA, Rivkees SA. Emerging concepts in periventricular white matter injury. *Semin Perinatol*. 2004;28(6):405-14.

Barres BA, Schmid R, Sendtner M, Raff MC. Multiple extracellular signals are required for long-term oligodendrocyte survival. *Development*. 1993;118(1):283-95.

Baud O, Emilie D, Pelletier E, Lacaze-Masmonteil T, Zupan V, Fernandez H, et al. Amniotic fluid concentrations of interleukin-1beta, interleukin-6 and TNF-alpha in chorioamnionitis before 32 weeks of gestation: histological associations and neonatal outcome. *Br J Obstet Gynaecol*. 1999;106(1):72-7.

Bell MJ, Hallenbeck JM, Gallo V. Determining the fetal inflammatory response in an experimental model of intrauterine inflammation in rats. *Pediatr Res*. 2004;56(4):541-6.

Benveniste EN, Tang LP, Law RM. Differential regulation of astrocyte TNF-alpha expression by the cytokines TGF-beta, IL-6 and IL-10. *Int J Dev Neurosci*. 1995;13(3-4):341-9.

Blamire AM, Anthony DC, Rajagopalan B, Sibson NR, Perry VH, Styles P. Interleukin-1beta -induced changes in blood-brain barrier permeability, apparent diffusion coefficient, and cerebral blood volume in the rat brain: a magnetic resonance study. *J Neurosci*. 2000;20(21):8153-9.

- Boche D, Cunningham C, Gauldie J, Perry VH. Transforming growth factor-beta 1-mediated neuroprotection against excitotoxic injury in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2003;23(10):1174-82.
- Bona E, Andersson AL, Blomgren K, Gilland E, Puka-Sundvall M, Gustafson K, et al. Chemokine and inflammatory cell response to hypoxia-ischemia in immature rats. *Pediatr Res.* 1999;45(4 Pt 1):500-9.
- Bottner M, Krieglstein K, Unsicker K. The transforming growth factor-betas: structure, signaling, and roles in nervous system development and functions. *J Neurochem.* 2000;75(6):2227-40.
- Bracci R, Buonocore G. Chorioamnionitis: a risk factor for fetal and neonatal morbidity. *Biol Neonate.* 2003;83(2):85-96.
- Cai Z, Lin S, Pang Y, Rhodes PG. Brain injury induced by intracerebral injection of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha in the neonatal rat. *Pediatr Res.* 2004;56(3):377-84.
- Cai Z, Pan ZL, Pang Y, Evans OB, Rhodes PG. Cytokine induction in fetal rat brains and brain injury in neonatal rats after maternal lipopolysaccharide administration. *Pediatr Res.* 2000;47(1):64-72.
- Cai Z, Pang Y, Lin S, Rhodes PG. Differential roles of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta in lipopolysaccharide-induced brain injury in the neonatal rat. *Brain Res.* 2003;975(1-2):37-47.
- Campbell SJ, Perry VH, Pitossi FJ, Butchart AG, Chertoff M, Waters S, et al. Central nervous system injury triggers hepatic CC and CXC chemokine expression that is associated with leukocyte mobilization and recruitment to both the central nervous system and the liver. *Am J Pathol.* 2005;166(5):1487-97.
- Campbell SJ, Wilcockson DC, Butchart AG, Perry VH, Anthony DC. Altered chemokine expression in the spinal cord and brain contributes to differential interleukin-1beta-induced neutrophil recruitment. *J Neurochem.* 2002;83(2):432-41.
- Cao J, Shi X, Li W, Liu J, Miao X, Xu J. Protective effect of anti-intercellular adhesion molecule-1 antibody on global cerebral ischemia/reperfusion injury in the rat. *Biosci Trends.* 2009;3(2):48-52.
- Carr R. Neutrophil production and function in newborn infants. *Br J Haematol.* 2000;110(1):18-28.
- Clark WM, Rinker LG, Lessov NS, Hazel K, Hill JK, Stenzel-Poore M, et al. Lack of interleukin-6 expression is not protective against focal central nervous system ischemia. *Stroke.* 2000;31(7):1715-20.
- Conductier G, Blondeau N, Guyon A, Nahon JL, Rovere C. The role of monocyte chemoattractant protein MCP1/CCL2 in neuroinflammatory diseases. *J Neuroimmunol.* 2010.
- Coumans AB, Middelans JS, Garnier Y, Vaihinger HM, Leib SL, Von Duering MU, et al. Intracisternal application of endotoxin enhances the susceptibility to subsequent hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats. *Pediatr Res.* 2003;53(5):770-5.

- Dammann O, Leviton A. Inflammatory brain damage in preterm newborns--dry numbers, wet lab, and causal inferences. *Early Hum Dev.* 2004;79(1):1-15.
- Deng W. Neurobiology of injury to the developing brain. *Nat Rev Neurol.* 2010;6(6):328-36.
- Dhandapani KM, Brann DW. Transforming growth factor-beta: a neuroprotective factor in cerebral ischemia. *Cell Biochem Biophys.* 2003;39(1):13-22.
- Eklind S, Mallard C, Arvidsson P, Hagberg H. Lipopolysaccharide induces both a primary and a secondary phase of sensitization in the developing rat brain. *Pediatr Res.* 2005;58(1):112-6.
- Eklind S, Mallard C, Leverin AL, Gilland E, Blomgren K, Mattsby-Baltzer I, et al. Bacterial endotoxin sensitizes the immature brain to hypoxic--ischaemic injury. *Eur J Neurosci.* 2001;13(6):1101-6.
- Ellison VJ, Mocatta TJ, Winterbourn CC, Darlow BA, Volpe JJ, Inder TE. The relationship of CSF and plasma cytokine levels to cerebral white matter injury in the premature newborn. *Pediatr Res.* 2005;57(2):282-6.
- Falconer AE, Carr R, Edwards SW. Impaired neutrophil phagocytosis in preterm neonates: lack of correlation with expression of immunoglobulin or complement receptors. *Biol Neonate.* 1995;68(4):264-9.
- Fan LW, Mitchell HJ, Tien LT, Rhodes PG, Cai Z. Interleukin-1beta-induced brain injury in the neonatal rat can be ameliorated by alpha-phenyl-n-tert-butyl-nitron. *Exp Neurol.* 2009;220(1):143-53.
- Fan LW, Tien LT, Zheng B, Pang Y, Rhodes PG, Cai Z. Interleukin-1beta-induced brain injury and neurobehavioral dysfunctions in juvenile rats can be attenuated by alpha-phenyl-n-tert-butyl-nitron. *Neuroscience.* 2010;168(1):240-52.
- Fatemi A, Wilson MA, Johnston MV. Hypoxic-ischemic encephalopathy in the term infant. *Clin Perinatol.* 2009;36(4):835-58, vii.
- Ferriero DM. Neonatal brain injury. *N Engl J Med.* 2004;351(19):1985-95.
- Flanders KC, Ren RF, Lippa CF. Transforming growth factor-betas in neurodegenerative disease. *Prog Neurobiol.* 1998;54(1):71-85.
- Folkerth RD. Neuropathologic substrate of cerebral palsy. *J Child Neurol.* 2005;20(12):940-9.
- Froen JF, Munkeby BH, Stray-Pedersen B, Saugstad OD. Interleukin-10 reverses acute detrimental effects of endotoxin-induced inflammation on perinatal cerebral hypoxia-ischemia. *Brain Res.* 2002;942(1-2):87-94.
- Gadient RA, Otten U. Expression of interleukin-6 (IL-6) and interleukin-6 receptor (IL-6R) mRNAs in rat brain during postnatal development. *Brain Res.* 1994;637(1-2):10-4.
- Gadient RA, Otten UH. Interleukin-6 (IL-6)--a molecule with both beneficial and destructive potentials. *Prog Neurobiol.* 1997;52(5):379-90.

- Gayle DA, Beloosesky R, Desai M, Amidi F, Nunez SE, Ross MG. Maternal LPS induces cytokines in the amniotic fluid and corticotropin releasing hormone in the fetal rat brain. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004;286(6):R1024-9.
- Georgeson GD, Szony BJ, Streitman K, Kovacs A, Kovacs L, Laszlo A. Natural killer cell cytotoxicity is deficient in newborns with sepsis and recurrent infections. *Eur J Pediatr*. 2001;160(8):478-82.
- Girard S, Kadhim H, Beaudet N, Sarret P, Sebire G. Developmental motor deficits induced by combined fetal exposure to lipopolysaccharide and early neonatal hypoxia/ischemia: a novel animal model for cerebral palsy in very premature infants. *Neuroscience*. 2009;158(2):673-82.
- Girard S, Kadhim H, Larouche A, Roy M, Gobeil F, Sebire G. Pro-inflammatory disequilibrium of the IL-1 beta/IL-1ra ratio in an experimental model of perinatal brain damages induced by lipopolysaccharide and hypoxia-ischemia. *Cytokine*. 2008;43(1):54-62.
- Girard S, Sebire G, Kadhim H. Proinflammatory orientation of the interleukin 1 system and downstream induction of matrix metalloproteinase 9 in the pathophysiology of human perinatal white matter damage. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2010;69(11):1116-29.
- Girard S, Tremblay L, Lepage M, Sebire G. IL-1 receptor antagonist protects against placental and neurodevelopmental defects induced by maternal inflammation. *J Immunol*. 2010;184(7):3997-4005.
- Gomes FC, Sousa Vde O, Romao L. Emerging roles for TGF-beta1 in nervous system development. *Int J Dev Neurosci*. 2005;23(5):413-24.
- Govinden R, Bhoola KD. Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor-beta. *Pharmacol Ther*. 2003;98(2):257-65.
- Grether JK, Nelson KB. Maternal infection and cerebral palsy in infants of normal birth weight. *JAMA*. 1997;278(3):207-11.
- Hagberg H, Bona E, Gilland E, Puka-Sundvall M. Hypoxia-ischaemia model in the 7-day-old rat: possibilities and shortcomings. *Acta Paediatr Suppl*. 1997;422:85-8.
- Hagberg H, Gilland E, Bona E, Hanson LA, Hahin-Zoric M, Blennow M, et al. Enhanced expression of interleukin (IL)-1 and IL-6 messenger RNA and bioactive protein after hypoxia-ischemia in neonatal rats. *Pediatr Res*. 1996;40(4):603-9.
- Hagberg H, Peebles D, Mallard C. Models of white matter injury: comparison of infectious, hypoxic-ischemic, and excitotoxic insults. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*. 2002;8(1):30-8.
- Harju K, Glumoff V, Hallman M. Ontogeny of Toll-like receptors Tlr2 and Tlr4 in mice. *Pediatr Res*. 2001;49(1):81-3.
- Henrich-Noack P, Prehn JH, Kriegstein J. TGF-beta 1 protects hippocampal neurons against degeneration caused by transient global ischemia. Dose-response relationship and potential neuroprotective mechanisms. *Stroke*. 1996;27(9):1609-14; discussion 15.

- Herrmann O, Tarabin V, Suzuki S, Attigah N, Coserea I, Schneider A, et al. Regulation of body temperature and neuroprotection by endogenous interleukin-6 in cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2003;23(4):406-15.
- Hu BR, Liu CL, Ouyang Y, Blomgren K, Siesjo BK. Involvement of caspase-3 in cell death after hypoxia-ischemia declines during brain maturation. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2000;20(9):1294-300.
- Hyytiainen M, Penttinen C, Keski-Oja J. Latent TGF-beta binding proteins: extracellular matrix association and roles in TGF-beta activation. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2004;41(3):233-64.
- Ihara S, Iwamatsu A, Fujiyoshi T, Komi A, Yamori T, Fukui Y. Identification of interleukin-6 as a factor that induces neurite outgrowth by PC12 cells primed with NGF. *J Biochem.* 1996;120(5):865-8.
- Jacobsson B, Hagberg G. Antenatal risk factors for cerebral palsy. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2004;18(3):425-36.
- Jin G, Tsuji K, Xing C, Yang YG, Wang X, Lo EH. CD47 gene knockout protects against transient focal cerebral ischemia in mice. *Exp Neurol.* 2009;217(1):165-70.
- Jin R, Yang G, Li G. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells. *J Leukoc Biol.* 2010;87(5):779-89.
- Kadhim H, Khalifa M, Deltenre P, Casimir G, Sebire G. Molecular mechanisms of cell death in periventricular leukomalacia. *Neurology.* 2006;67(2):293-9.
- Kadhim H, Tabarki B, De Prez C, Sebire G. Cytokine immunoreactivity in cortical and subcortical neurons in periventricular leukomalacia: are cytokines implicated in neuronal dysfunction in cerebral palsy? *Acta Neuropathol.* 2003;105(3):209-16.
- Kadhim H, Tabarki B, Verellen G, De Prez C, Rona AM, Sebire G. Inflammatory cytokines in the pathogenesis of periventricular leukomalacia. *Neurology.* 2001;56(10):1278-84.
- Kallman J, Schollin J, Schalen C, Erlandsson A, Kihlstrom E. Impaired phagocytosis and opsonisation towards group B streptococci in preterm neonates. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 1998;78(1):F46-50.
- Kaukola T, Herva R, Perhomaa M, Paakko E, Kingsmore S, Vainionpaa L, et al. Population cohort associating chorioamnionitis, cord inflammatory cytokines and neurologic outcome in very preterm, extremely low birth weight infants. *Pediatr Res.* 2006;59(3):478-83.
- Kaur C, Ling EA. Blood brain barrier in hypoxic-ischemic conditions. *Curr Neurovasc Res.* 2008;5(1):71-81.
- Khwaja O, Volpe JJ. Pathogenesis of cerebral white matter injury of prematurity. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2008;93(2):F153-61.
- Kim JS, Gautam SC, Chopp M, Zaloga C, Jones ML, Ward PA, et al. Expression of monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage inflammatory protein-1 after focal cerebral ischemia in the rat. *J Neuroimmunol.* 1995;56(2):127-34.
- Kim SU, de Vellis J. Microglia in health and disease. *J Neurosci Res.* 2005;81(3):302-13.

- Kinney HC, Back SA. Human oligodendroglial development: relationship to periventricular leukomalacia. *Semin Pediatr Neurol.* 1998;5(3):180-9.
- Knobloch SM, Faden AI. Interleukin-10 improves outcome and alters proinflammatory cytokine expression after experimental traumatic brain injury. *Exp Neurol.* 1998;153(1):143-51.
- Krupinski J, Kumar P, Kumar S, Kaluza J. Increased expression of TGF-beta 1 in brain tissue after ischemic stroke in humans. *Stroke.* 1996;27(5):852-7.
- Kushima Y, Hama T, Hatanaka H. Interleukin-6 as a neurotrophic factor for promoting the survival of cultured catecholaminergic neurons in a chemically defined medium from fetal and postnatal rat midbrains. *Neurosci Res.* 1992;13(4):267-80.
- Larouche A, Roy M, Kadhim H, Tsanaclis AM, Fortin D, Sebire G. Neuronal injuries induced by perinatal hypoxic-ischemic insults are potentiated by prenatal exposure to lipopolysaccharide: animal model for perinatally acquired encephalopathy. *Dev Neurosci.* 2005;27(2-4):134-42.
- Lawson LJ, Perry VH. The unique characteristics of inflammatory responses in mouse brain are acquired during postnatal development. *Eur J Neurosci.* 1995;7(7):1584-95.
- Lehnardt S, Lachance C, Patrizi S, Lefebvre S, Follett PL, Jensen FE, et al. The toll-like receptor TLR4 is necessary for lipopolysaccharide-induced oligodendrocyte injury in the CNS. *J Neurosci.* 2002;22(7):2478-86.
- Leonardo CC, Pennypacker KR. Neuroinflammation and MMPs: potential therapeutic targets in neonatal hypoxic-ischemic injury. *J Neuroinflammation.* 2009;6:13.
- Leviton A, Fichorova R, Yamamoto Y, Allred EN, Dammann O, Hecht J, et al. Inflammation-related proteins in the blood of extremely low gestational age newborns. The contribution of inflammation to the appearance of developmental regulation. *Cytokine.* 2011;53(1):66-73.
- Levy O. Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(5):379-90.
- Lin HY, Huang CC, Chang KF. Lipopolysaccharide preconditioning reduces neuroinflammation against hypoxic ischemia and provides long-term outcome of neuroprotection in neonatal rat. *Pediatr Res.* 2009;66(3):254-9.
- Loddick SA, Turnbull AV, Rothwell NJ. Cerebral interleukin-6 is neuroprotective during permanent focal cerebral ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1998;18(2):176-9.
- Loddick SA, Wong ML, Bongiorno PB, Gold PW, Licinio J, Rothwell NJ. Endogenous interleukin-1 receptor antagonist is neuroprotective. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;234(1):211-5.
- Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine.* 2008;42(2):145-51.
- Mallard C, Hagberg H. Inflammation-induced preconditioning in the immature brain. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2007;12(4):280-6.

- Marret S. [Physiopathology of periventricular leukomalacia]. *Rev Med Brux.* 2003;24(5):416-9.
- Marz P, Cheng JG, Gadiant RA, Patterson PH, Stoyan T, Otten U, et al. Sympathetic neurons can produce and respond to interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(6):3251-6.
- Marz P, Heese K, Dimitriades-Schmutz B, Rose-John S, Otten U. Role of interleukin-6 and soluble IL-6 receptor in region-specific induction of astrocytic differentiation and neurotrophin expression. *Glia.* 1999;26(3):191-200.
- Massague J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem.* 1998;67:753-91.
- Mecha M, Rabadan MA, Pena-Melian A, Valencia M, Mondejar T, Blanco MJ. Expression of TGF-betas in the embryonic nervous system: analysis of interbalance between isoforms. *Dev Dyn.* 2008;237(6):1709-17.
- Mehler MF, Kessler JA. Cytokines in brain development and function. *Adv Protein Chem.* 1998;52:223-51.
- Meng SZ, Takashima S. Expression of transforming growth factor-beta 1 in periventricular leukomalacia. *J Child Neurol.* 1999;14(6):377-81.
- Mesples B, Plaisant F, Gressens P. Effects of interleukin-10 on neonatal excitotoxic brain lesions in mice. *Brain Res Dev Brain Res.* 2003;141(1-2):25-32.
- Miller RH. Regulation of oligodendrocyte development in the vertebrate CNS. *Prog Neurobiol.* 2002;67(6):451-67.
- Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol.* 2001;19:683-765.
- Mulcahy NJ, Ross J, Rothwell NJ, Loddick SA. Delayed administration of interleukin-1 receptor antagonist protects against transient cerebral ischaemia in the rat. *Br J Pharmacol.* 2003;140(3):471-6.
- Nelson KB. Can we prevent cerebral palsy? *N Engl J Med.* 2003;349(18):1765-9.
- Nelson KB, Grether JK, Dambrosia JM, Walsh E, Kohler S, Satyanarayana G, et al. Neonatal cytokines and cerebral palsy in very preterm infants. *Pediatr Res.* 2003;53(4):600-7.
- Nelson PT, Soma LA, Lavi E. Microglia in diseases of the central nervous system. *Ann Med.* 2002;34(7-8):491-500.
- O'Shea TM. Diagnosis, treatment, and prevention of cerebral palsy. *Clin Obstet Gynecol.* 2008;51(4):816-28.
- Paintlia MK, Paintlia AS, Barbosa E, Singh I, Singh AK. N-acetylcysteine prevents endotoxin-induced degeneration of oligodendrocyte progenitors and hypomyelination in developing rat brain. *J Neurosci Res.* 2004;78(3):347-61.
- Pang Y, Cai Z, Rhodes PG. Disturbance of oligodendrocyte development, hypomyelination and white matter injury in the neonatal rat brain after intracerebral injection of lipopolysaccharide. *Brain Res Dev Brain Res.* 2003;140(2):205-14.

- Pang Y, Fan LW, Zheng B, Cai Z, Rhodes PG. Role of interleukin-6 in lipopolysaccharide-induced brain injury and behavioral dysfunction in neonatal rats. *Neuroscience*. 2006;141(2):745-55.
- Pang Y, Rodts-Palenik S, Cai Z, Bennett WA, Rhodes PG. Suppression of glial activation is involved in the protection of IL-10 on maternal E. coli induced neonatal white matter injury. *Brain Res Dev Brain Res*. 2005;157(2):141-9.
- Qiu L, Zhu C, Wang X, Xu F, Eriksson PS, Nilsson M, et al. Less neurogenesis and inflammation in the immature than in the juvenile brain after cerebral hypoxia-ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2007;27(4):785-94.
- Rice JE, 3rd, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol*. 1981;9(2):131-41.
- Roy M, Girard S, Larouche A, Kadhim H, Sebire G. TNF-alpha system response in a rat model of very preterm brain injuries induced by lipopolysaccharide and/or hypoxia-ischemia. *Am J Obstet Gynecol*. 2009;201(5):493 e1-10.
- Sadeghi K, Berger A, Langgartner M, Prusa AR, Hayde M, Herkner K, et al. Immaturity of infection control in preterm and term newborns is associated with impaired toll-like receptor signaling. *J Infect Dis*. 2007;195(2):296-302.
- Schultz C, Temming P, Bucszy P, Gopel W, Strunk T, Hartel C. Immature anti-inflammatory response in neonates. *Clin Exp Immunol*. 2004;135(1):130-6.
- Selmaj KW, Farooq M, Norton WT, Raine CS, Brosnan CF. Proliferation of astrocytes in vitro in response to cytokines. A primary role for tumor necrosis factor. *J Immunol*. 1990;144(1):129-35.
- Semple BD, Kossmann T, Morganti-Kossmann MC. Role of chemokines in CNS health and pathology: a focus on the CCL2/CCR2 and CXCL8/CXCR2 networks. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2010;30(3):459-73.
- Sen E, Levison SW. Astrocytes and developmental white matter disorders. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*. 2006;12(2):97-104.
- Seth P, Koul N. Astrocyte, the star avatar: redefined. *J Biosci*. 2008;33(3):405-21.
- Shalak L, Perlman JM. Hypoxic-ischemic brain injury in the term infant-current concepts. *Early Hum Dev*. 2004;80(2):125-41.
- Silverstein FS, Barks JD, Hagan P, Liu XH, Ivacko J, Szaflarski J. Cytokines and perinatal brain injury. *Neurochem Int*. 1997;30(4-5):375-83.
- Sizonenko SV, Sirimanne E, Mayall Y, Gluckman PD, Inder T, Williams C. Selective cortical alteration after hypoxic-ischemic injury in the very immature rat brain. *Pediatr Res*. 2003;54(2):263-9.
- Soulet D, Rivest S. Microglia. *Curr Biol*. 2008;18(12):R506-8.
- Spera PA, Ellison JA, Feuerstein GZ, Barone FC. IL-10 reduces rat brain injury following focal stroke. *Neurosci Lett*. 1998;251(3):189-92.
- Strle K, Zhou JH, Shen WH, Broussard SR, Johnson RW, Freund GG, et al. Interleukin-10 in the brain. *Crit Rev Immunol*. 2001;21(5):427-49.

- Suzuki S, Tanaka K, Suzuki N. Ambivalent aspects of interleukin-6 in cerebral ischemia: inflammatory versus neurotrophic aspects. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2009;29(3):464-79.
- Taga T, Kishimoto T. Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu Rev Immunol.* 1997;15:797-819.
- Taylor AW. Review of the activation of TGF-beta in immunity. *J Leukoc Biol.* 2009;85(1):29-33.
- Tilg H, Trehu E, Atkins MB, Dinarello CA, Mier JW. Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55. *Blood.* 1994;83(1):113-8.
- Toulmond S, Vige X, Fage D, Benavides J. Local infusion of interleukin-6 attenuates the neurotoxic effects of NMDA on rat striatal cholinergic neurons. *Neurosci Lett.* 1992;144(1-2):49-52.
- Towfighi J, Mauger D, Vannucci RC, Vannucci SJ. Influence of age on the cerebral lesions in an immature rat model of cerebral hypoxia-ischemia: a light microscopic study. *Brain Res Dev Brain Res.* 1997;100(2):149-60.
- van den Tweel ER, Kavelaars A, Lombardi MS, Groenendaal F, May M, Heijnen CJ, et al. Selective inhibition of nuclear factor-kappaB activation after hypoxia/ischemia in neonatal rats is not neuroprotective. *Pediatr Res.* 2006;59(2):232-6.
- Vannucci RC, Connor JR, Mauger DT, Palmer C, Smith MB, Towfighi J, et al. Rat model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *J Neurosci Res.* 1999;55(2):158-63.
- Vexler ZS, Yenari MA. Does inflammation after stroke affect the developing brain differently than adult brain? *Dev Neurosci.* 2009;31(5):378-93.
- Volpe JJ. Brain injury in premature infants: a complex amalgam of destructive and developmental disturbances. *Lancet Neurol.* 2009;8(1):110-24.
- Wang LW, Chang YC, Lin CY, Hong JS, Huang CC. Low-dose lipopolysaccharide selectively sensitizes hypoxic ischemia-induced white matter injury in the immature brain. *Pediatr Res.* 2010;68(1):41-7.
- Wang X, Rousset CI, Hagberg H, Mallard C. Lipopolysaccharide-induced inflammation and perinatal brain injury. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2006;11(5):343-53.
- Wang X, Stridh L, Li W, Dean J, Elmgren A, Gan L, et al. Lipopolysaccharide sensitizes neonatal hypoxic-ischemic brain injury in a MyD88-dependent manner. *J Immunol.* 2009;183(11):7471-7.
- Wu YW, Escobar GJ, Grether JK, Croen LA, Greene JD, Newman TB. Chorioamnionitis and cerebral palsy in term and near-term infants. *JAMA.* 2003;290(20):2677-84.
- Wu YY, Bradshaw RA. Induction of neurite outgrowth by interleukin-6 is accompanied by activation of Stat3 signaling pathway in a variant PC12 cell (E2) line. *J Biol Chem.* 1996;271(22):13023-32.
- Wyatt JS. Mechanisms of brain injury in the newborn. *Eye (Lond).* 2007;21(10):1261-3.
- Yager JY, Ashwal S. Animal models of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *Pediatr Neurol.* 2009;40(3):156-67.

- Yamada M, Hatanaka H. Interleukin-6 protects cultured rat hippocampal neurons against glutamate-induced cell death. *Brain Res.* 1994;643(1-2):173-80.
- Yamasaki Y, Matsuo Y, Zagorski J, Matsuura N, Onodera H, Itoyama Y, et al. New therapeutic possibility of blocking cytokine-induced neutrophil chemoattractant on transient ischemic brain damage in rats. *Brain Res.* 1997;759(1):103-11.
- Yoon BH, Park CW, Chaiworapongsa T. Intrauterine infection and the development of cerebral palsy. *BJOG.* 2003;110 Suppl 20:124-7.
- Yoon BH, Romero R, Kim CJ, Koo JN, Choe G, Syn HC, et al. High expression of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in periventricular leukomalacia. *Am J Obstet Gynecol.* 1997;177(2):406-11.
- Yoon BH, Romero R, Yang SH, Jun JK, Kim IO, Choi JH, et al. Interleukin-6 concentrations in umbilical cord plasma are elevated in neonates with white matter lesions associated with periventricular leukomalacia. *Am J Obstet Gynecol.* 1996;174(5):1433-40.
- Yost CC, Cody MJ, Harris ES, Thornton NL, McInturff AM, Martinez ML, et al. Impaired neutrophil extracellular trap (NET) formation: a novel innate immune deficiency of human neonates. *Blood.* 2009;113(25):6419-27.
- Yuan TM, Sun Y, Zhan CY, Yu HM. Intrauterine infection/inflammation and perinatal brain damage: role of glial cells and Toll-like receptor signaling. *J Neuroimmunol.* 2010;229(1-2):16-25.
- Zhao B, Schwartz JP. Involvement of cytokines in normal CNS development and neurological diseases: recent progress and perspectives. *J Neurosci Res.* 1998;52(1):7-16.
- Zhu Y, Yang GY, Ahlemeyer B, Pang L, Che XM, Culmsee C, et al. Transforming growth factor-beta 1 increases bad phosphorylation and protects neurons against damage. *J Neurosci.* 2002;22(10):3898-909.
- Zocchia C, Spiga G, Rabin SJ, Grekova M, Richert J, Chernyshev O, et al. Biological activity of interleukin-10 in the central nervous system. *Neurochem Int.* 1997;30(4-5):433-9.

F. ANNEXES

1. MATÉRIEL ET MÉTHODES SUPPLÉMENTAIRES

Notre laboratoire s'intéresse aux dommages cérébraux du nouveau-né et un axe important des recherches vise à comprendre l'impact d'une inflammation gestationnelle, connue pour être un facteur de risque à de subséquentes lésions cérébrales. L'induction de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β et TNF α), ainsi que l'IL-1ra a déjà été étudiée au laboratoire dans un modèle d'exposition au LPS en fin de gestation. Ces résultats démontrent une faible production de TNF α et un débalancement du système de l'IL-1 dans le cerveau des rats à P1 (Girard *et al.*, 2008, Roy *et al.*, 2009). On s'est donc également posé la question à savoir si ce déséquilibre pouvait impliquer également les cytokines anti-inflammatoires (IL-10, IL-6 et TGF β 1), étant donné nos résultats obtenus avec l'exposition au LPS directement à P1, pour déterminer s'il pourrait y avoir une contribution du système immunitaire inné maternel.

Modèle animal d'exposition au LPS prénatal

Les rates gestantes sont injectées de façon intrapéritonéale avec 100 μ L de LPS (200 μ g/kg dilué dans 100 μ L de solution saline exempt de pyrogène, d'*Escherichia Coli*, 0127:B8; Sigma, ON, Canada) ou de solution saline, et ce aux 12 heures, en fin de gestation pour un total de 4 à 6 injections. Par la suite, les animaux à P1 sont soumis à l'HI, tel que décrit précédemment, l'hypoxie étant d'une durée de 3h30 (Larouche *et al.*, 2005). Pour éviter les confusions avec les groupes exposés au LPS postnatal retrouvés dans l'article, les animaux provenant de mère exposés au LPS seront nommés LPS_m.

Extraction d'ARN total

Les animaux sont euthanasiés par décapitation. Les deux hémisphères cérébraux des rats ont été prélevés séparément, fixés dans le méthylbutane et entreposés à -80°C jusqu'au moment de l'extraction d'ARN totale ou encore de l'extraction de protéines. L'ARN total

des hémisphères cérébraux est extrait avec le TRIzol (Invitrogen Gibco, ON, Canada), selon les directives du manufacturier. En résumé, les cerveaux sont homogénéisés dans du TRIzol® Reagent. L'addition de chloroforme permet la séparation de la phase aqueuse et de la phase organique, tandis que l'ajout subséquent d'isopropanol permet la précipitation de l'ARN. Finalement un lavage à l'éthanol est fait, puis l'ARN est dissous dans de l'eau DEPC. L'ARN a été quantifié par spectrophotométrie (NanoDrop) standard, puis conservé à -80°C en aliquots.

Transcription inverse (RT)

Pour transformer l'ARN en ADN, 200 µg/mL d'amorces aléatoires (Roche, Qc, Canada) est ajouté à 2 µg d'ARN pour être chauffé 5 min à 70°C. Ensuite, 1 mM de chaque dNTP (Roche, Qc, Canada), 20U d'inhibiteurs d'ARNase (Roche, Qc, Canada) et 30 U de transcriptase inverse (AMW; Roche, Qc, Canada) sont ajoutés et incubés 60 min à 42°C et 5 min à 94°C dans un appareil thermocycleurs Biometra TGradient (Montreal Biotech, Qc, Canada)

Réaction en Chaîne par Polymérase (PCR)

L'ADNc obtenu de la RT est amplifié par PCR. Pour 1 µL de produit de RT, 0.4mM de chaque dNTP est ajouté, 1 U de la polymérase à ADN Taq (Roche, Qc, Canada) et 1 mM de chaque paire d'amorces (tableau 1). La réaction d'amplification en chaîne pour chacune des réactions débute par une dénaturation de 2 min à 94°C et termine avec une extension finale de 7 min à 72°C. Le détail de chacune des réactions se retrouve dans le tableau 2.

Tableau 2. Amorces et programmes pour les réactions d'amplification en chaîne

IL-6, 259 pb (Invitrogen, Qiagen)		Programme (25 cycles)
Sens	5'-TAC CAC TTC ACA AGT CCG AGG CTT-3'	94°C 1 min
Non-sens	5'-ACT CCA GGT AGA AAC GGA ACT CAA-3'	60°C 40 sec
		72°C 40 sec
IL-10, 279 pb (Invitrogen, Qiagen)		Programme (25 cycles)
Sens	5'-ATA ACT GCT CCC ACT TCC CAG TCA-3'	94°C 1 min
Non-sens	5'-TCT TCA GTC TCT CTC CCA GGG AAT-3'	60°C 40 sec
		72°C 40 sec
TGF-β1, 183 pb (IDT Inc, IA)		Programme (25 cycles)
Sens	5'-ATA CGC CTG AGT GGC TGT CT-3'	94°C 30 min
Non-sens	5'-TGG GAC TGA TCC CAT TGA TT-3'	57°C 30 sec
		72°C 30 sec
GAPDH, 497 pb (IDT Inc, IA)		Programme (25 cycles)
Sens	5'-CCA AAG TTG TCA TGG ATG AC-3'	94°C 1 min
Non-sens	5'-GTG AAG GGT GTG AAC GG-3'	60°C 40 sec
		72°C 40 sec

Les produits de PCR sont déposés sur gel d'agarose 2 % avec bromure d'éthidium pour la migration pour être observé sous UV. Une analyse semi-quantitative est faite en calculant le ratio entre l'expression de l'ARNm d'intérêt et l'expression de la GAPDH respective. Par la suite, les données du groupe contrôle sont normalisées à 1, afin d'exprimer les résultats en variation par rapport au contrôle.

Détails sur l'analyse d'intensité de marquage immunohistochimique

Suite à l'IHC, des photos sont prises sur les coupes à l'aide d'un microscope muni d'une caméra à un grossissement de 400x. Les photos sont traitées avec le programme Image J. La macro « *Colour Deconvolution* » est utilisée afin de séparer le marquage brun (DAB) du reste des couleurs retrouvées sur l'image. Dans ce cas-ci, l'option « HDAB » (H : hématoxyline DAB : diaminobenzidine) est choisie, étant donné que nous voulons séparer les couleurs de l'hématoxyline, avec laquelle la contre-coloration a été faite, à celle du DAB. L'image se divise donc en trois images, soit une en brun, une en bleu-mauve et une

en vert pâle. L'image brune est utilisée puisqu'elle représente le marquage en DAB qui nous intéresse. Le seuil de détection de ce marquage est établi sur une photo provenant d'un animal du groupe Ctl (c.f. Figure 1). Le même seuil est conservé pour toutes les images que nous voulons comparer entre elles. Une fois le seuil établi, il suffit de prendre la mesure en cliquant sur « *Measure* ». Par la suite, le ratio de chacune des données par rapport à la moyenne des données Ctl est fait; cette moyenne étant établie à 1.

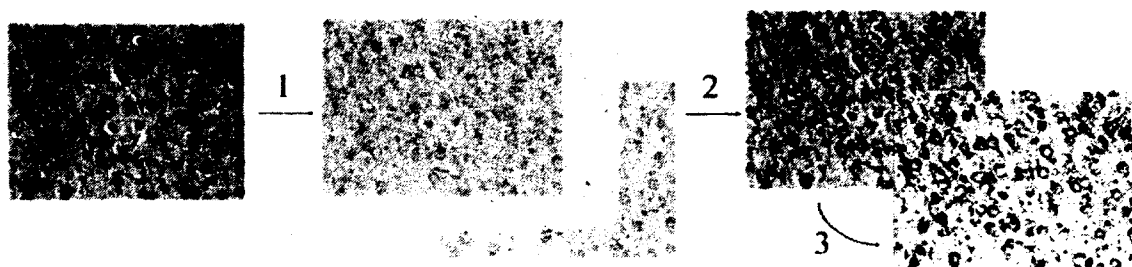


Figure 1. Analyse de l'intensité de marquage IHC. Les photos sont prises sur les coupes à un grossissement de 400x pour être analysées par le programme Image J. La macro « *Colour Deconvolution* » est employée afin de séparer les différentes couleurs de la photo. L'option « HDAB » est choisie (H : hématoxyline DAB : diaminobenzidine) et le résultat est démontré par flèche 1. L'image brune obtenue représente le marquage au DAB. Le seuil de détection est déterminé sur une coupe Ctl et est appliqué à toutes les photos à analyser (flèche 2, seuil en rouge). Une fois le seuil établi et accepté, l'image passe du rouge au noir (flèche 3) et la mesure d'intensité se fait en appuyant sur « *Measure* ».

2. RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES

Expression intracérébrale de l'ARNm de l'IL-6, l'IL-10 et du TGFβ1

L'expression de l'ARNm de l'IL-6, de l'IL-10 et du TGFβ dans le cerveau des rats exposés au LPS maternel (LPS_m) et/ou à l'HI à P1 (Figure 2). L'expression de l'ARNm de l'IL-6 est augmentée de manière significative par rapport au groupe contrôle à 4 et 18h post-HI (Figure 2A et D). La combinaison du LPS_m avec l'HI postnatal induit un accroissement similaire d'ARNm de l'IL-6 que le LPS_m seul, ou l'HI seule. L'expression de l'ARNm de l'IL-10 diminue 24h post-HI dans le cerveau des rats exposés au LPS_m et/ou à l'HI à P1 (Figure 2B et D). Le LPS_m et l'HI à P1 ne causent pas d'augmentation de l'ARNm du TGFβ1 post-HI à l'exception de l'HI seule qui induit une faible augmentation du TGFβ1 en ARNm à 4h (Figure 2C et D).

Expression intracérébrale de l'IL-6, l'IL-10 et du TGFβ1

En protéine, la localisation régionale de chacune des cytokines étudiées a été faite par IHC. Les régions d'intérêt sont la substance grise (cortex et le striatum regroupés) et la substance blanche. Comme pour l'ARNm de l'IL-6, la protéine est également modulée à la hausse dans le cerveau des rats exposés au LPS_m+HI, mais plus tardivement que son ARNm, soit 48 h post-HI. Cette augmentation d'IL-6 est détectée seulement dans la substance grise, pas dans la substance blanche. Par contre, aucune augmentation d'IL-6 n'est détectée dans le cerveau des rats exposés au LPS postnatal combiné à l'HI (Figure 3A). La combinaison du LPS_m à l'HI à P1 mène à l'augmentation intracérébrale de l'expression du TGFβ1, plus particulièrement dans la substance grise (Figure 3B). Cet effet est inverse de celui détecté lorsque l'exposition au LPS est postnatale, où l'expression du TGFβ1 diminue dans la substance grise des rats qui ont eu cette exposition combinée à l'HI. L'IL-10 intracérébral est indétectable par IHC 48 h post-HI.

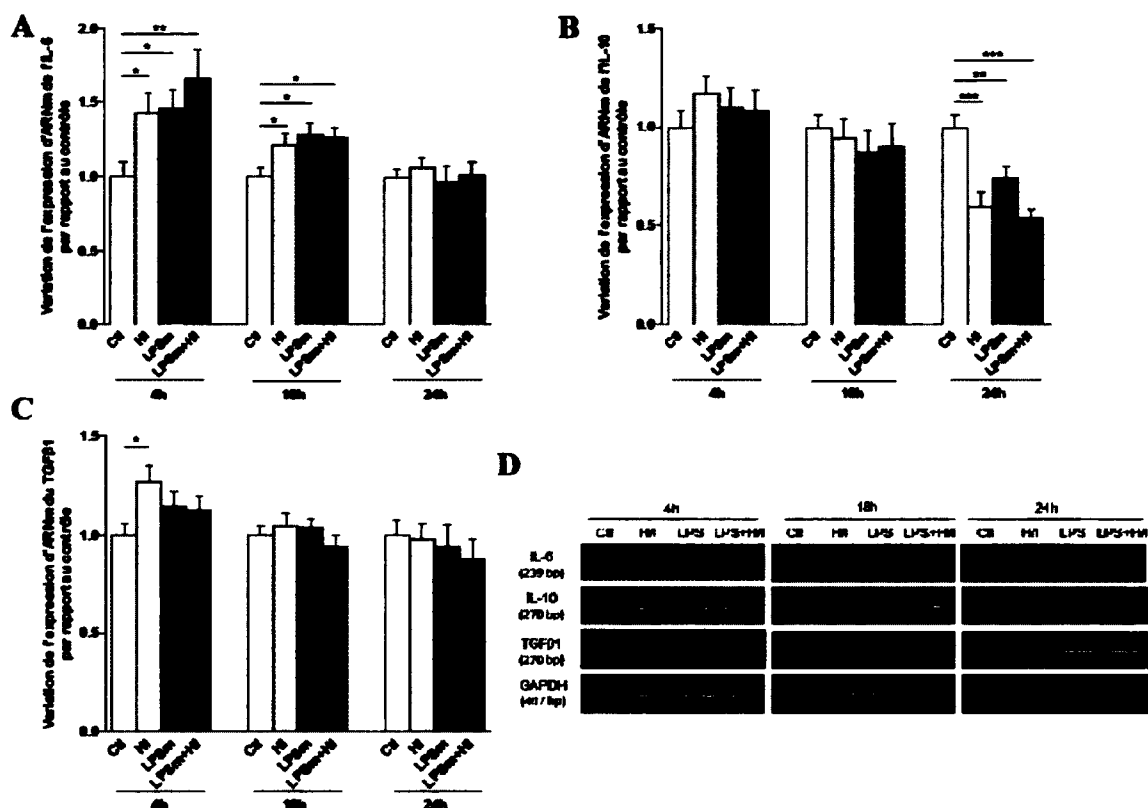


Figure 2. Expression intracérébrale de l'ARNm de l'IL-6 l'IL-10 et du TGFβ1. Les rats ont été exposés au LPS anténatal (LPS_m) et à l'HI à P1. Le ratio entre l'intensité de la bande correspondant à l'IL-6 (A), l'IL-10 (B) et du TGFβ1 (C) par rapport à la GAPDH, le gène rapporteur, a été fait et les données provenant des groupes contrôle sont ramenés à la valeur 1. Les échantillons ont migré sur un gel d'agarose et ont été exposés aux UVs (D). Les échantillons ont été testés en duplicata sur 4 à 6 animaux par condition. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 par le test ANOVA de Newman-Keul.

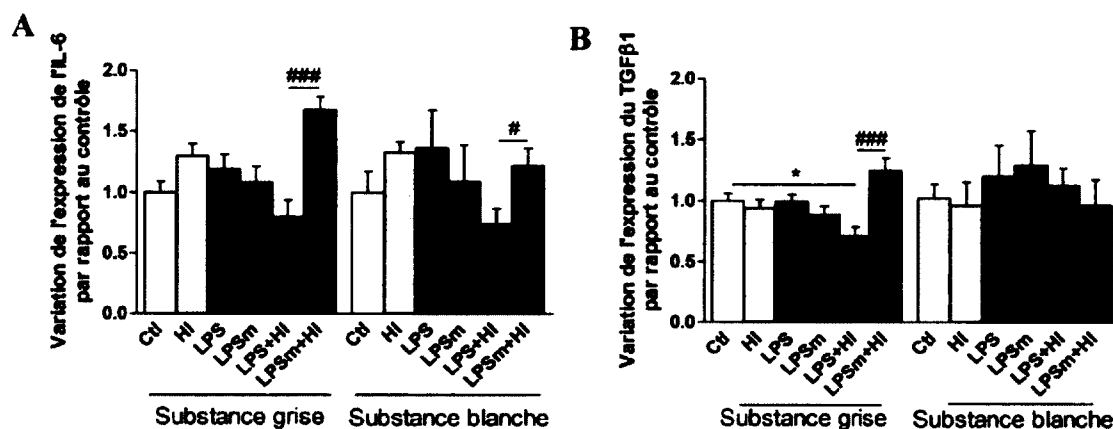


Figure 3. Expression intracérébrale d'IL-6 et de TGFβ1 à P1. L'expression de l'IL-6 et du TGFβ1 a été détecté par IHC à 48h post-HI sur 3 à 4 échantillon de cerveau. * $p < 0.05$ par le test ANOVA et Newman-Keul et ### $p > 0.001$, # $p > 0.05$ par le test de t avec correction de Welch.

3. DISCUSSION DES RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES

Nous avons démontré l'effet différentiel de l'exposition à l'infection prénatale versus postnatale sur l'expression de cytokines anti-inflammatoires au cerveau d'un prématuré. L'exposition au LPS durant la gestation donnant des niveaux de cytokines plus élevés dans le cerveau des ratons à P1 pourrait être expliquée par l'apport de la mère. D'ailleurs, des études portant sur le placenta au laboratoire démontrent que le côté fœtal du placenta est celui atteint par l'inflammation qui pourrait donc être véhiculé par le sang fœtal jusqu'au cerveau. Des études comparatives plus avancées entre l'effet de l'exposition à des fragments de pathogène prénatal versus post-natal seraient nécessaires afin de mieux comprendre ces mécanismes.