

Université de Sherbrooke

Streptocoque de groupe B et lésions cérébrales périnatales : effets de genre et traits autistiques dans la progéniture

Par
Julie Bergeron
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 physiologie

Sherbrooke, Québec, Canada
Mars, 2013

Membre du jury d'évaluation
Professeur Guillaume Sébire, Programme de Physiologie
Professeur Louis Gendron, Programme de Physiologie
Professeur Marek Rola-Pleszczynski, Programme d'Immunologie



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: 978-0-499-00370-6

Our file Notre référence

ISBN: 978-0-499-00370-6

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

Streptocoque de groupe B et lésions cérébrales périnatales : effets de genre et traits autistiques dans la progéniture

Par
Julie Bergeron
Département de pédiatrie

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

Bien que le streptocoque de groupe B (SGB) soit une des bactéries les plus fréquentes au cours de la grossesse, l'impact de l'inflammation maternelle induite par le SGB sur le cerveau en développement n'a jamais été étudié. Selon notre hypothèse, l'activation immunitaire maternelle relevant de la présence du SGB en fin de grossesse joue un rôle dans la genèse des dommages cérébraux périnataux et des troubles neuro-développementaux qui en découlent, par exemple l'autisme. D'ailleurs, la génétique ne permet d'expliquer qu'environ 10 à 20% des cas d'autisme. De plus en plus d'études épidémiologiques tendent à montrer que les facteurs environnementaux sont aussi à considérer dans les origines de l'autisme. Nos résultats, issus d'un nouveau modèle animal pré-clinique d'inflammation maternelle induite chez le rat par le SGB, montrent des dommages à la fois placentaires et cérébraux ainsi que des troubles comportementaux dans la progéniture. Contrairement aux résultats obtenus à l'aide d'autres modèles d'inflammation prénatale induite par des bactéries Gram négatives (agissant principalement via le Toll-like receptor (TLR)-4) ou par des composants viraux (TLR-3), l'inflammation maternelle induite par la bactérie Gram positive (TLR-2) SGB entraîne un patron distinctif de chorioamnionite et de lésions cérébrales. Une dysmyélinisation sous-corticale est observée dans le prosencéphale mais toutefois, il n'y a aucune prolifération des cellules gliales. Des traits comportementaux associés à l'autisme, notamment des déficits de la communication et de la socialisation, ont été remarqués dans la progéniture exposée au SGB. Cette combinaison de traits associés à l'autisme est présente seulement chez les mâles. Nos résultats montrent pour la première fois que la réponse inflammatoire maternofoetale au SGB joue un rôle dans l'induction de lésions placentaires et cérébrales, et récapitule plusieurs caractéristiques cardinales de l'autisme chez l'humain telle que la susceptibilité liée au genre, la dysconnectivité cérébrale ainsi que plusieurs traits comportementaux typiques. Cela demeure un défi de modéliser les troubles du spectre autistique, cependant, ces résultats appuient les théories selon lesquelles, au-delà de l'influence génétique, les facteurs environnementaux jouent un rôle dans l'autisme et sa prévalence selon le genre.

Mots-clés : Streptocoque de groupe B, Neuroinflammation, Autisme, Lésions cérébrales périnatales, Prématurité, Chorioamnionite

Streptocoque de groupe B et lésions cérébrales périnatales : effets de genre et traits autistiques dans la progéniture

Par
Julie Bergeron
Département de pédiatrie

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

Paradoxically, the impact of group B streptococcus (GBS)-induced maternal inflammation on offspring's brain has not yet been investigated despite GBS being one of the most frequent bacteria colonizing or infecting pregnant women. According to our hypothesis GBS-induced maternal immune activation plays a role in offspring perinatal brain damage and subsequent neurodisabilities such as autism. Our results using a new preclinical model of maternal inflammation triggered by inactivated GBS uncovered its placental, neuropathological, and behavioral impacts on offspring. GBS-exposed placentas presented cystic lesions and polymorphonuclear infiltration located within the decidual/maternal side of the placenta, contrasting with macrophagic infiltration and necrotic areas located in the labyrinth/fetal compartment of the placenta following lipopolysaccharide (LPS)-induced maternal inflammation. Brain damage featured lateral ventricles widening, predominating in male, reduction of periventricular external capsules thickness, oligodendrocyte loss, and disorganization of fronto-parietal sub-cortical connectivity without any glial proliferation. Autistic hallmarks were found in offspring exposed to GBS, namely deficits in motor behavior variability, social and communicative impairments, *i.e.* profound defects in the integration and response to both acoustic and chemical signals that are both predominant modes of communication in rats. Surprisingly, only male offspring were affected by these combined autistic-like traits. Our results show for the first time that materno-fetal inflammatory response to GBS plays a role in the induction of placental and cerebral insults, remarkably recapitulating cardinal features of human autism, such as gender dichotomy, brain dysconnectivity, and neurobehavioral traits. As opposed to other models of prenatal inflammatory brain damage - driven by viral/toll-like receptor (TLR) 3 - or Gram-negative/TLR4 -, maternal inflammation resulting from GBS/TLR2 interactions induced a distinctive pattern of chorioamnionitis and cerebral injuries. These results also provide important evidence that beyond genetic influences, modifiable environmental factors play a role in both the occurrence of autism, and in its gender unbalance.

Key words: Group B Streptococcus, Neuroinflammation, Autism, Perinatal cerebral lesions, Prematurity, Chorioamnionitis

*Il m'aura peut-être fallu un peu plus de temps,
certainement plus d'efforts,
mais ça en aura valu la peine*

Table des matières

Résumé (français)	II
Résumé (anglais)	III
Table des matières	VI
Liste de figures	VII
Liste des tableaux	VIII
Liste des abbréviations	IX
Chapitre 1. Introduction	1
1.1. Dommages cérébraux périnataux	1
1.1.1. Caractéristiques neuropathologiques des dommages de la substance blanche cérébrale des nouveau-nés prématurés	3
1.1.2. Conséquences cliniques des dommages périnataux de la substance blanche	6
1.1.3. Hypothèses physiopathologiques concernant les dommages périnataux de la substance blanche cérébrale	7
1.2. De l'inflammation gestationnelle aux dommages cérébraux	9
1.2.1. Modélisation animale d'inflammations gestationnelles mimant les dommages de la substance blanche périnatale, et leurs conséquences cliniques.	9
1.2.2. SGB en périnatal	20
1.3. L'autisme : un problème de santé publique	22
1.3.1. Risques prénataux	23
1.3.2. Risques périnataux	23
1.4. Modélisation animale de l'autisme	24
Chapitre 2. Hypothèse de recherche et objectifs	28
2.1 Hypothèse de recherche	28
2.2 Objectif 1	28
2.3 Objectif 2	28
Chapitre 3. Article	29
Chapitre 4. Discussion	63
4.1. Pertinence des résultats	63
4.2. Unicité des lésions obtenues dans le modèle animal	64
4.3. SGB et potentiel inflammatoire	65
4.4. Différences de genre : hypothèses de causes potentielles?	66
4.5. Traits autistiques et modélisation animale	67
4.6. Modèle animal d'exposition au SGB et pratiques médicales	68
4.7. Limitations du modèle animal	69
Chapitre 5. Conclusion	71
Chapitre 6. Remerciements	72
Chapitre 7. Références	74
Annexe	80

Liste de figures

Figure 1. Inter-relations présumées entre infections, inflammation, prématurité et dommages cérébraux.....	2
Figure 2. Leucomalacies périventriculaires d'un cerveau humain néonatal.....	3
Figure 3. Leucomalacies périventriculaires dans un cerveau humain de nouveau-né prématuré.....	4
Figure 4. Effet du renforcement des mesures thérapeutiques, en l'occurrence la césarienne, sur les conséquences cliniques telles que la paralysie cérébrale	9
Figure 5. Schéma de la signalisation cellulaire suite à la liaison du lipopolysaccharide (LPS) au <i>Toll-like receptor</i> (TLR) 4.....	11
Figure 6. Signalisation intracellulaire du <i>Toll-like receptor</i> (TLR)-4 jusqu'à l'activation de la transcription de gènes de la réponse immunitaire.....	12
Figure 7. Lésions cavitaires placentaires	14
Figure 8. Marquage immunohistochimique (Ac CD68) d'une coupe de placenta suite à une exposition systémique au LPS.....	15
Figure 9. Élargissement des ventricules cérébraux latéraux.....	16
Figure 10. Coupes coronales de cerveau de rats (P25) exposés à une inflammation maternelle induite par le lipopolysaccharide d'E. coli	16
Figure 11. Schéma récapitulatif de la réaction inflammatoire maternelle déclenchée par le LPS et néonatale (systémique néonatale et cérébrale néonatale).....	19
Figure 12. Retard de reconnaissance de (ou d'attraction/intérêt pour) l'odeur maternelle des rats à P9 suite à l'exposition maternelle au valproate à G12.5	25
Figure 13. Test de l'inhibition du réflexe de sursaut à l'adolescence et à l'âge adulte chez les rats exposés au valproate.....	26
Figure 14. Diminution du comportement exploratoire chez les rats exposés au valproate autant à l'adolescence qu'à l'âge adulte	26

Liste des tableaux

Tableau 1. Facteurs de risques associés aux troubles du spectre autistique.....7
Tableau 2. Réponse inflammatoire des annexes fœtales et du fœtus suite à l'exposition gestationnelle au lipopolysaccharide (LPS) d'*E. coli*.....13
Tableau 3. Déficits comportementaux résultants d'une exposition gestationnelle au lipopolysaccharide (LPS) d'*E. coli* à différents moments au cours de la gestation.....17

Liste des abbréviations

µg	microgramme
Ac	anticorps
cc	corps calleux
CD	<i>cluster differentiation</i> (utilisé en combinaison avec un chiffre)
Con	contrôle
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
g	gramme
G	jour de gestation
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
H&E	hématoxyline et éosine
ic	<i>internal capsule</i>
IL	interleukine (utilisé en combinaison avec un chiffre)
IL-1ra	<i>interleukin-1 receptor antagonist</i>
IRAK	<i>interleukin-1 receptor-associated kinase</i>
IRM	imagerie par résonance magnétique
jctz	zone jonctionnelle
kg	kilogramme
Lb	labyrinthe
LPS	lipopolysaccharide
M-CHAT	<i>the modified checklist for autism in toddlers</i>
min	minute
MMP-9	<i>matrix metalloproteinase 9</i>
ms	milliseconde
NFκβ	<i>nuclear factor kappa beta</i>
NO	oxyde nitrique
P	jour post-natal
Poly (I : C)	<i>polyinosinic: polycytidylic acid</i>
PPI	<i>prepulse inhibition</i>
s	seconde
SGB	streptocoque de groupe B
TDAH	trouble de l'attention avec ou sans hyperactivité
TLR	<i>toll-like receptor</i> (utilisé en combinaison avec un chiffre)
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TRAF	<i>tumor necrosis factor receptor associated factor</i> (utilisé en combinaison avec un chiffre)
TSA	troubles du spectre autistique
VPA	valproate

Chapitre 1. Introduction

1.1. Dommages cérébraux périnataux

Bien que les soins prodigués aux nouveau-nés prématurés se soient grandement améliorés au cours des dernières décennies, des questions surgissent quant à la qualité de vie de ces enfants nés trop tôt. La prématurité, par définition, survient quand la naissance a lieu avant la 37^e semaine d'aménorrhée versus la 41^e semaine, qui correspond à la durée normale de la grossesse chez l'homme. Une étude prospective contrôlée, l'étude EPIPAGE (Étude épidémiologique sur les Petits Âges Gestationnels), a investigué le développement neurologique d'enfants âgés de 5 ans, nés avant 33 semaines de gestation, souvent appelés « grands prématurés » (Larroque *et al.*, 2011). Près de 50% de ces enfants nés grands prématurés (24-32 semaines de gestation) conservent à l'âge de 5 ans des difficultés neuro-développementales, incluant des séquelles neurologiques sévères qui perdureront à long terme, comparativement à 10% des nouveau-nés à terme (Larroque *et al.*, 2008). Ces séquelles vont de problématiques relativement bénignes comme les troubles d'attention avec ou sans hyperactivité (TDAH), à d'autres plus sévères comme les troubles du spectre autistique (TSA) ou la paralysie cérébrale (Larroque *et al.*, 2008; Kuban *et al.*, 2009; Pinto-Martin *et al.*, 2011; Atladottir *et al.*, 2012; Stephens *et al.*, 2012). L'amélioration des soins intensifs en néonatalogie permet la survie d'environ 90% des 50.000 enfants nés prématurément aux États-Unis, chaque année, avec un poids de naissance inférieur à 1500 g. Mais, environ 5 à 10% des survivants auront des déficits moteurs importants alors que 25% à 50% des autres vivent avec des déficits cognitifs et neuro-développementaux (Deng *et al.*, 2008).

Les mécanismes physiopathologiques déterminant les dommages cérébraux des nouveau-nés, prématurés ou à terme, restent mal connus. Outre la prématurité, un autre facteur de risque associé aux dommages cérébraux périnataux est l'inflammation gestationnelle, souvent déclenchée par des infections maternelles. L'inflammation gestationnelle est aussi associée à la prématurité, et semble jouer un rôle majeur dans son déclenchement (voir lien 1, figure 1). Tel que montré sur le schéma suivant (Figure

1), il existe une hypothèse selon laquelle les morbidités neurologiques et les troubles moteurs et neuro-développementaux associés dériveraient de dommages à la substance blanche cérébrale formés suite à une infection intra-utérine et à l'inflammation qui en découle (voir lien 3, figure 1).

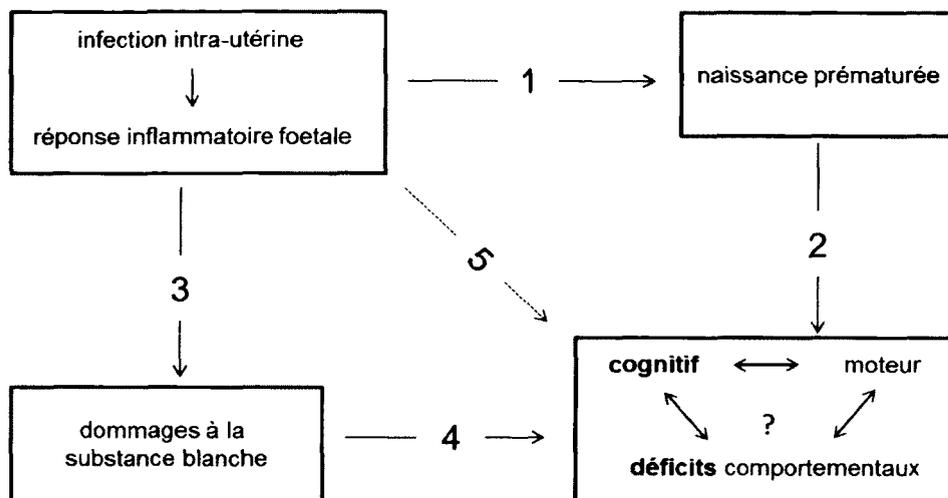


Figure 1. Inter-relations présumées entre infections, inflammation, prématurité et dommages cérébraux. Les liens 1 à 4 représentent les associations découlant d'études épidémiologiques. La flèche correspondant au chiffre 5 est hachurée puisque peu de publications sont disponibles pour documenter le lien direct entre l'infection/l'inflammation et les déficits comportementaux et/ou cognitifs comme déficit majeur. Adapté de Dammann *et al.* 2002.

Le risque de souffrir de dommages à la substance blanche d'un enfant dont le placenta de la mère présentait des signes de chorioamnionite histologique (infiltration de polymorphonucléaires s'étendant jusqu'au cordon ombilical et à la plaque chorionique) est 11 fois plus élevé que pour un enfant dont le placenta ne présente aucune trace d'infection/inflammation (Leviton *et al.*, 1999). Plusieurs autres études subséquentes ont confirmé que l'inflammation gestationnelle périnatale, soit d'origine infectieuse (placentaire, voies urinaires, gingivite, par exemples), soit d'origine autre (maladies auto-immunes) est un facteur de risque indépendant de dommages cérébraux périnataux (Girard *et al.*, 2009). Ces résultats ont ouvert une avenue de recherche intéressante afin d'étudier si cette association démontrée épidémiologiquement chez l'homme est de nature causale. L'approche de recherche fondée sur des modèles animaux pré-cliniques offre la possibilité de tester une telle hypothèse.

1.1.1. Caractéristiques neuropathologiques des dommages de la substance blanche cérébrale des nouveau-nés prématurés

La leucomalacie périventriculaire est l'entité neuro-pathologique prédominante des dommages cérébraux touchant les enfants prématurés. Elle a pour conséquence la paralysie cérébrale, mais est aussi associée à des désordres cognitifs et/ou comportementaux (Deng *et al.*, 2008). Les leucomalacies périventriculaires se présentent soit sous forme de lésions focales, soit de lésions diffuses, prédominant dans la substance blanche profonde du cerveau, plus précisément dans le tissu cérébral avoisinant l'épithélium sous-épendymaire adjacent aux cavités ventriculaires latérales du prosencéphale (Friede, 1989; Folkerth, 2006; Volpe, 2009). Il y a une tendance à un gradient antéro-postérieur de ces dommages, avec des lésions plus fréquentes et/ou plus sévères dans les régions pariéto-occipitales, bien que l'atteinte des régions antérieures fronto-temporales soit aussi très fréquemment observée. Les formes focales de leucomalacies périventriculaires sont souvent cavitaires, telles que présentées sur la coupe coronale de cerveau humain néonatal de la figure 2.

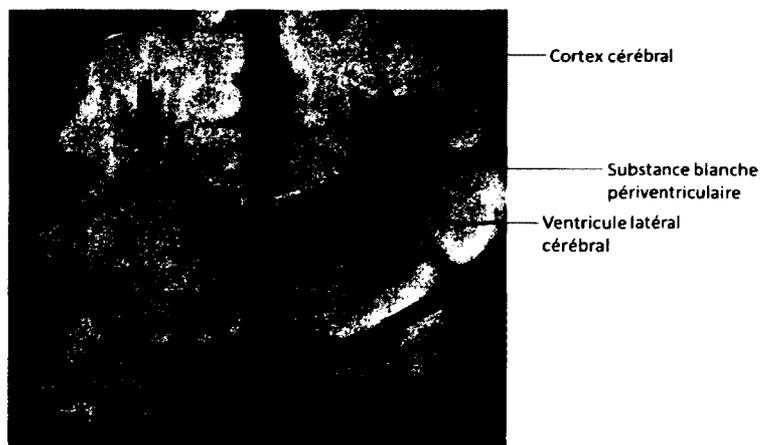


Figure 2. Leucomalacies périventriculaires d'un cerveau humain néonatal. Dommages de la substance blanche frontale profonde du prématuré de type leucomalacie périventriculaire cavitaire bifocales (flèches). Tiré de Friede, 1989.

Macroscopiquement, les lésions de leucomalacies périventriculaires se présentent sous forme de plaques jaunâtres d'environ 2-6 mm de diamètre, bilatéralement sans une symétrie stricte, à proximité des ventricules latéraux. Les plaques – lésions focales - ramollissent pour former dans les 7-14 jours suivant leur apparition des cavités remplies de fluide blanchâtre dû à la présence de macrophage spumeux, chargés en débris

lipidiques (Friede, 1989). Une fraction des cavités leucomalaciques se collabent et forment des cicatrices gliales visibles microscopiquement. Celles-ci incluent astroglie (soit une prolifération des astrocytes) et microglie : prolifération de cellules microgliales, soit les macrophages résidents du système nerveux central, qui s'initie très rapidement dès l'apparition des lésions et se poursuit durant la phase cicatricielle. Les leucomalaciques présentent aussi des foyers de microcalcifications, et une perte axonale provoquant une dégénérescence rétrograde (dites aussi dégénérescence walérienne) des corps cellulaires neuronaux sus-jacents.

Les formes diffuses de leucomalaciques périventriculaires se présentent souvent par une réduction globale ou multifocale du volume de la substance blanche. Elles présentent les mêmes caractéristiques microscopiques que les formes focales. Telle que décrits ci-dessus. En imagerie par résonance magnétique (IRM), en séquence T1, les lésions focales, cavitaires ou de type cicatricielles gliales, se traduisent par un hypersignal, tel que montré sur la figure 3 (Friede, 1989; Folkerth, 2006; Deng *et al.*, 2008). Cet hypersignal est atypique par rapport à celui de dommages apparentés du cerveau adulte et serait lié à la présence de débris lipidiques surchargeant les macrophages et/ou à la présence de microhémorragies entraînant des dépôts métalliques (fer).

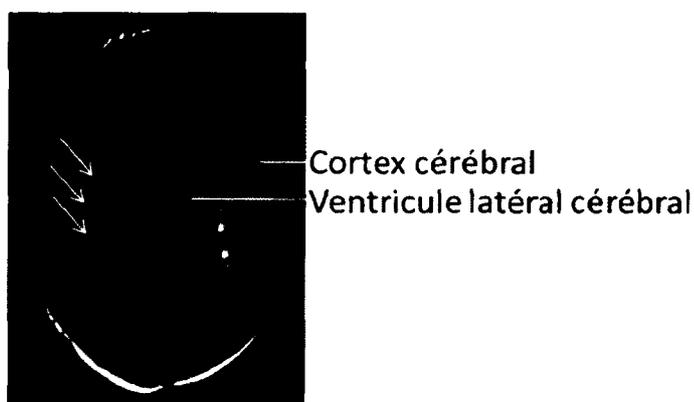


Figure 3. Leucomalaciques périventriculaires dans un cerveau humain de nouveau-né prématuré. Aspect typique des foyers multifocaux frontopariétaux, asymétriques, de leucomalaciques périventriculaires (flèches), visualisés à la phase aigüe (nécrose de coagulation), durant la période néonatale chez un nouveau-né prématuré, en IRM (coupe axiale, pondérée T1). Noter le gradient antéropostérieur avec une prédominance postérieure (pariétale) des dommages. Tiré de Counsell, 2003.

Les dommages les plus sévères, de type cavitaires ou diffus, persistent et mènent à une diminution du volume cérébral (microcéphalie), via une réduction globale du volume de

la substance blanche, un amincissement du corps calleux, associés à une ventriculomégalie, soit un élargissement des ventricules dit *a vacuo*, ce qui signifie que l'élargissement ventriculaire équilibre partiellement la perte de volume tissulaire adjacente.

D'un point de vu plus physiopathologique, la formation de la lésion cavitaire débute par une nécrose de coagulation caractérisée par une perte de l'architecture cellulaire du tissu ainsi que de tous les types cellulaires et la présence d'axones enflés et nécrotiques. Une diminution drastique du nombre d'oligodendrocytes immatures est observée ainsi qu'une augmentation très précoce et importante de microglies activées dès la phase initiale des lésions, ce qui suggère un rôle actif de ces cellules inflammatoires dans l'induction des dommages (Friede, 1989). La production de molécules toxiques tels que les radicaux libres, les cytokines pro-inflammatoires, le NO, relâchées suite à l'activation des microglies pourrait contribuer à la mort des oligodendrocytes (Kadhim *et al.*, 2001; Folkerth, 2006; Deng *et al.*, 2008). En marquage immunohistochimique, on remarque une augmentation de la prolifération des microglies et des astrocytes, supportée par une augmentation du marquage CD68 (marqueur des granules lysosomiales des macrophages) et *glial fibrillary acidic protein* – GFAP (marqueur du cytosquelette des astrocytes) (Folkerth, 2006).

Les leucomalacies périventriculaires, en raison de leur distribution multifocale, voire diffuse, vont endommager les faisceaux de connections neuronales, donc les réseaux neuronaux sous-tendant un vaste spectre de fonctions cérébrales appartenant autant à la cognition, au comportement, qu'aux fonctions motrices ou sensorielles. Le profil des désordres neurocomportementaux induits dépendra de la distribution et de l'étendue des lésions au sein du cerveau. L'atteinte postérieure, pariétooccipitale affectera surtout l'intégration et le traitement des informations sensorielles, y compris les fonctions visuospatiales. Des dommages plus médians toucheront la voie corticospinale soit une des voies principales du contrôle moteur, impliquées particulièrement chez l'homme dans le contrôle des segments distaux des membres incluant l'habileté manuelle et la marche. L'atteinte des régions antérieures fronto-temporales, et de leurs boucles cortico-striato-corticales produira des désordres cognitifs et comportementaux, touchant

notamment les fonctions exécutives frontales (attention, mémoire de travail, planification) et le langage.

1.1.2. Conséquences cliniques des dommages périnataux de la substance blanche

Les leucomalacies périventriculaires sont la cause la plus commune de paralysie cérébrale chez les enfants prématurés (Deng *et al.*, 2008). L'incidence de la paralysie cérébrale est d'environ 3/1000, avec une incidence 10 fois plus haute chez les prématurés que chez les nouveaux nés à terme, bien que les deux populations soient affectées. Les garçons sont deux à trois fois plus touchés que les filles, pour des raisons qui restent encore incomprises (Girard *et al.*, 2009; Devesa *et al.*, 2010). Environ 5 à 10% des enfants prématurés présentant des lésions à la substance blanche auront pour conséquences des déficits moteurs majeurs (Volpe, 2009). Selon le patron de distribution des lésions, les conséquences cliniques peuvent être différentes. Par exemple, les formes unilatérales et focales seront associées davantage à une hémiplégie, soit la paralysie des membres d'un côté du corps seulement, alors que les formes diffuses seront associées à la quadriplégie, soit la paralysie des quatre membres du corps. Cependant, les déficits cognitifs sans déficits moteurs majeurs sont de loin les conséquences les plus répandues chez les enfants présentant des lésions périnatales à la substance blanche. La dysconnectivité associée aux formes diffuses mais d'intensité modérée est plutôt associée aux dysfonctionnements des réseaux neuronaux supportant les capacités d'apprentissage, le comportement social et la communication, produisant donc certaines formes d'autisme. Ces déficits cognitifs et/ou comportementaux, incluant les déficits d'attention, affectent 25 à 50% des patients (Volpe, 2009), soit de façon isolés, soit en association avec des difficultés neurologiques autres. Parmi l'ensemble des troubles neuro-développementaux touchant l'enfant, c'est l'autisme qui est le plus prévalent. Ainsi, Limperopoulos *et al.* ont montré une association entre les dommages périnataux de la substance blanche diagnostiqués par IRM et les troubles du spectre de l'autisme (TSA). Sur une cohorte de 85 enfants nés prématurément et âgés entre 9 et 10 mois ($39,2 \pm 3,9$ semaines), 67% ont des IRM cérébrales normales alors que 33% ont obtenus des résultats anormaux incluant des leucomalacies périventriculaires diffuses et un élargissement des ventricules cérébraux latéraux (Limperopoulos *et al.*, 2008). L'évaluation de cette cohorte d'enfants avec le M-CHAT (un outil diagnostique des

TSA) entre l'âge de 16 et 30 mois, montre une association significative (*odds ratio* : 0.1) entre les anomalies IRM et le développement de TSA, tel que montré à la table 1.

Univariate Predictors of Abnormal M-CHAT Screening Scores (n = 91)

Variable	OR	95% CI	p
MRI	0.133	0.047–0.382	.0002
Gender	3.016	1.004–9.059	.0491
Chorioamnionitis	9.669	3.302–28.310	<.0001
Maternal temperature \leq 100.4°F	2.538	0.834–7.724	.1011
Acute intrapartum or antepartum hemorrhage	3.729	1.275–10.904	.0162
Preterm labor	1.840	0.606–5.588	.2820
Gestational age	0.731	0.541–0.987	.0406
Birth weight	0.996	0.994–0.999	.0044
SNAP-II	1.276	1.145–1.422	<.0001
Maternal age	1.017	0.947–1.093	.6356
Length of oxygen requirement	1.018	1.003–1.033	.0174

OR indicates odds ratio; CI, confidence interval.

Tableau 1. Facteurs de risques associés aux troubles du spectre autistique. Parmi les différents facteurs de risque reliés à l'autisme, les résultats anormaux obtenus suite à un examen d'imagerie par résonance magnétique ainsi que les chorioamnionites augmentent tous deux significativement les risques de l'enfant de souffrir de troubles du spectre autistique. Tiré de Limperopoulos *et al.* 2008.

Selon cette même étude, les enfants nés prématurément dont la mère a souffert d'une chorioamnionite durant la grossesse sont aussi significativement plus à risque (risque multiplié par facteur 10) de développer des TSA.

1.1.3. Hypothèses physiopathologiques concernant les dommages périnataux de la substance blanche cérébrale

Jusqu'au milieu de la décennie 90, les médecins présumaient que la majorité des dommages à la substance blanche des nouveaux nés prématurés étaient causés par des mécanismes hypoxiques-ischémiques, résultant principalement d'asphyxies et de désordres circulatoires périnataux. Les mécanismes hypoxiques-ischémiques périnataux

au sens strict comprennent principalement la procidence du cordon ombilical, et le décollement placentaire souvent via un hématome rétro-placentaire. La procidence du cordon est sa sortie par le col de l'utérus lors de la rupture de la poche des eaux. Le cordon peut alors se trouver comprimé entre les os du bassin et la tête ou une autre partie du corps du bébé et la circulation sanguine dans le cordon peut être bloquée, privant ainsi le bébé d'apport en nutriments, dont l'oxygène, et l'entraînant dans un état ischémique. Un autre exemple de mécanisme hypoxique-ischémique est le décollement placentaire. Puisque le placenta est l'organe responsable des échanges materno-fœtaux, lorsqu'il y a décollement, ces échanges sont perturbés et le fœtus peut se retrouver en situation de manque d'apport sanguin, donc en défaut de circulation cérébrale (ischémie) et en manque d'oxygène (hypoxie voire anoxie). Cependant, des études épidémiologiques s'interrogeant sur les origines de la paralysie cérébrale ont montré que seulement 5-10% des cas de paralysie cérébrale étaient associés à des mécanismes de ce type (Nelson, 2002; Nelson, 2003). De plus, les mesures activement adoptées dans les centres hospitaliers afin de prévenir, ou du moins amoindrir, les épisodes d'hypoxie-ischémie chez les nouveaux nés lors de l'accouchement, notamment via la césarienne, n'ont pas significativement réduits l'incidence des dommages cérébraux et de leurs conséquences neuro-fonctionnelles (Nelson, 2003). La figure 4 présente la dichotomie existant entre l'augmentation en flèche du recours à la césarienne à travers les dernières décennies versus le taux de paralysie cérébrale, qui lui, demeure constant malgré tout. Tout ceci indique que d'autres facteurs qu'hypoxiques-ischémiques – facteurs dont la nature reste à découvrir - jouent un rôle majeur dans le déterminisme des lésions cérébrales périnatales.

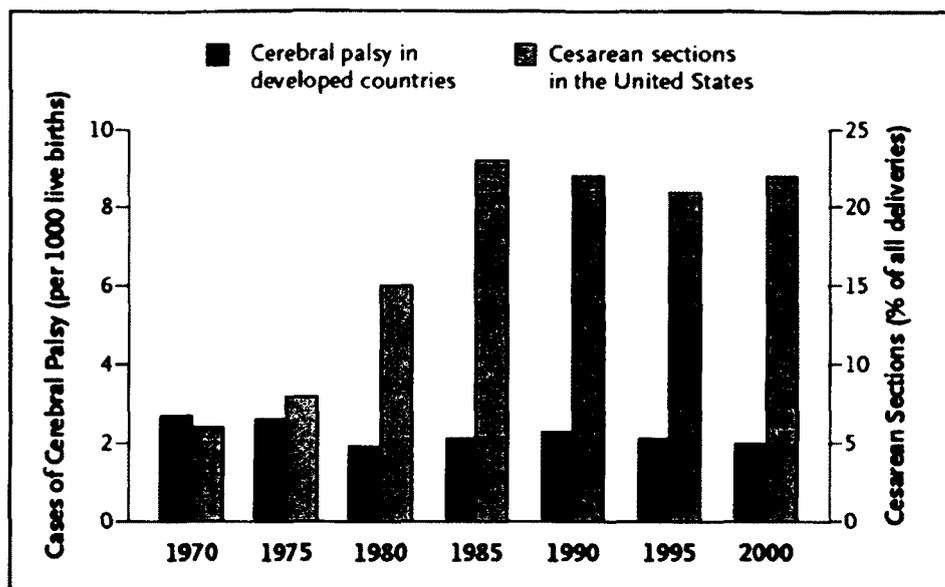


Figure 4. Effet du renforcement des mesures thérapeutiques, en l'occurrence la césarienne, sur les conséquences cliniques telles que la paralysie cérébrale. Malgré le renforcement des mesures thérapeutiques visant à prévenir les lésions cérébrales périnatales, les conséquences cliniques stagnent depuis plusieurs années, comme quoi le manque d'oxygène à la naissance ne serait pas le seul facteur à considérer dans la genèse de lésions cérébrales périnatales. Tiré de Nelson, 2003.

Même le renforcement des mesures de prise en charge des naissances telles que le monitoring cardiaque fœtal utilisé avant et/ou pendant le travail, puis dès la naissance, en salle de travail, puis en unité de soins intensifs néonataux (ventilation assistée, support cardiaque, optimisation par monitoring constants de l'oxygénation cérébrale) n'ont pas réduit la fréquence ni la sévérité de la paralysie cérébrale. Cela renforce donc l'hypothèse qu'un, ou plusieurs facteurs, autre que l'hypoxie-ischémie joueraient un rôle crucial dans le développement de lésions cérébrales périnatales.

1.2. De l'inflammation gestationnelle aux dommages cérébraux

1.2.1. Modélisation animale d'inflammations gestationnelles mimant les dommages de la substance blanche périnatale, et leurs conséquences cliniques.

L'association entre les infections prénatales et les désordres psychiatriques et neurologiques tels que l'autisme, la schizophrénie et la paralysie cérébrale a été montrée

à maintes reprises (Nelson et Willoughby, 2000; Dammann *et al.*, 2002; Edwards et Tan, 2006; Limperopoulos *et al.*, 2008; Atladottir *et al.*, 2012; Hagberg *et al.*, 2012). La modélisation animale permet, au-delà des associations démontrées par ces approches épidémiologiques, d'investiguer les éventuels liens de cause à effet qui tardent à être démontré. La majorité des modèles animaux visant à déterminer l'effet de l'inflammation gestationnelle sur le développement cérébral périnatal de la progéniture sont faits chez le rongeur, soit la souris ou le rat. Dans le cadre de ce mémoire, nous nous intéresserons seulement aux modèles de rats. Trois principaux composants de pathogènes, ou molécules les mimant, ont été utilisées dans les modèles d'inflammation gestationnelle, soit le lipopolysaccharide (LPS) de *E. coli*, le virus influenza ou encore le polyinosinic :polycytidylic acid (poly (I : C)), un composé de synthèse mimant les acides nucléiques viraux. Cependant, le virus influenza et le poly (I : C) induisant plutôt un phénotype schizophrénique qu'autistique, et n'étant pas connu pour induire des lésions bien notables de la substance blanche périnatale, nous nous concentrerons sur les modèles animaux d'inflammation gestationnelle impliquant le LPS puisque ceux-ci reconstituent assez fidèlement chez le rongeur les lésions cérébrales du prématuré humain. Les modèles d'inflammation systémique adulte (sepsis) induite par le LPS, ou d'activation par le LPS de cellules du système immunitaire en culture, sont des modèles d'inflammation bien caractérisés sur le plan mécanistique et clinique. L'injection systémique de LPS chez la femelle gestante mène à l'activation du système immunitaire inné qui entraîne la production de cytokines pro-inflammatoires, d'activation de la cascade du complément, l'activation de l'axe hypothalamo-hypophysaire puis des glandes surrénales pour mener aux symptômes cliniques des maladies inflammatoires, telles que par exemple la fièvre, puis à leur résolution. Cette réaction systémique chez la mère est potentiellement dommageable pour le cerveau en développement du fœtus et susceptible de provoquer des séquelles neurologiques à long terme. D'abord, examinons la cascade inflammatoire déclenchée par une exposition au LPS. Tel que montré sur le schéma de la figure 5, le LPS sera « opsonisé » par la protéine LBP (*LPS-Binding Protein*) puis le complexe se liera au récepteur d'« opsonisation » CD14. Le complexe tertiaire LPS-LBP-CD14 activera ainsi le *Toll-like receptor (TLR) 4*, qui signalera via la protéine MyD88 et la sérine kinase IRAK (Aderem et Ulevitch, 2000).

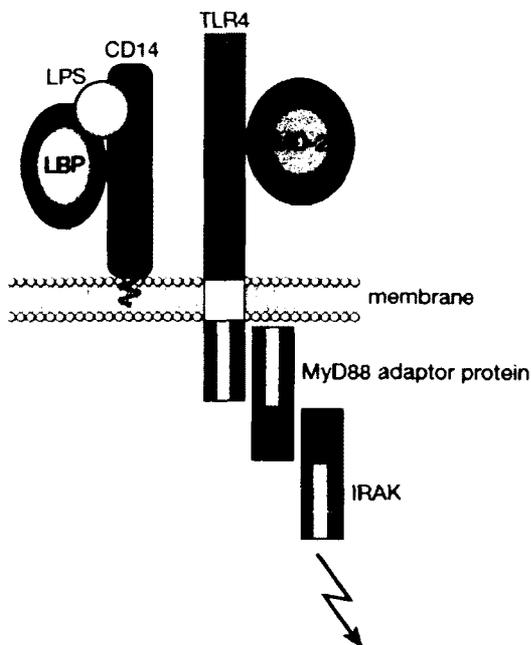


Figure 5. Schéma de la signalisation cellulaire suite à la liaison du lipopolysaccharide (LPS) au *Toll-like récepteur* (TLR) 4. Le LPS est « opsonisé » par LBP et le complexe est reconnu par le récepteur d' « opsonisation », CD14, à la surface du macrophage. Le complexe LPS-LBP-CD14 active le TLR4. La protéine adaptatrice MyD88 ainsi que la sérine kinase IRAK entraîne la propagation du signal. Tiré d'Aderem, 2000.

Sur la figure 6, la signalisation intracellulaire du *Toll-like récepteur 4* est illustrée un peu plus en détails. Chez les vertébrés, les TLRs possèdent un domaine intracellulaire TIR qui se lie à une protéine adaptatrice, MyD88, qui contient un *death-domain*. Ce *death-domain* interagit avec un domaine semblable dans la sérine kinase IRAK. Cette dernière interagit par la suite avec un adaptateur nommé TRAF6. Puis via d'autres activateurs et adaptateurs, le facteur de transcription $\text{NF}\kappa\beta$ devient activé. Une fois activé, il transloquera au noyau et la transcription de gènes de la réponse immunitaire pourra être amorcée (Aderem et Ulevitch, 2000).

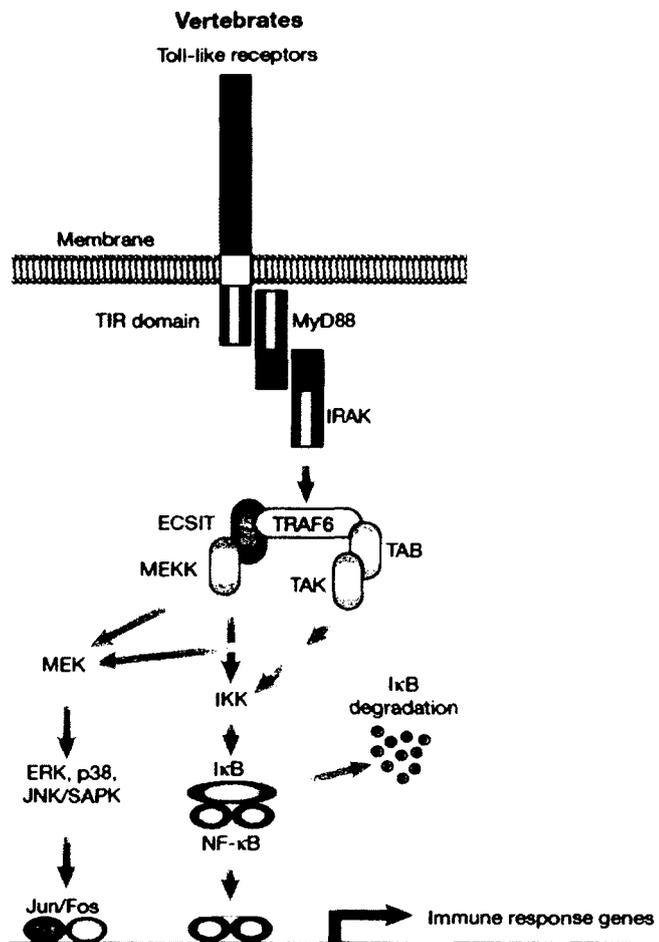


Figure 6. Signalisation intracellulaire du *Toll-like receptor* (TLR)-4 jusqu'à l'activation de la transcription de gènes de la réponse immunitaire. Les TLRs possèdent un domaine intracellulaire TIR qui se lie à une protéine adaptatrice, MyD88, qui contient un *death-domain*. Ce *death-domain* interagit avec un domaine semblable dans la sérine kinase IRAK. IRAK interagit avec un adaptateur nommé TRAF6, puis via d'autres activateurs et adaptateurs, le facteur de transcription NFκβ s'active. Il transloquera ensuite au noyau où la transcription de gènes de la réponse immunitaire s'amorcera. Adapté d'Aderem, 2000.

Parmi les modèles d'inflammation gestationnelle systémique impliquant le LPS, plusieurs variations existent entre eux, notamment dans les doses injectées, et la fenêtre de temps d'exposition. Dans le tableau 2, les principaux éléments du devis expérimental de ces modèles sont résumés, ainsi que les résultats essentiels qu'ils ont apporté (Boksa, 2010), concernant la caractérisation des molécules impliquées dans la réaction inflammatoire fœtale. Les modèles présentés ci-dessous ont comme point commun le fait que l'exposition au LPS a lieu en fin de gestation, afin de se conformer à la fenêtre

de temps durant laquelle surviennent les infections maternelles associées aux lésions cérébrales périnatales. Cette période d'exposition est notamment pertinente par rapport aux chorioamnionites (infections impliquant principalement *E. coli* et SGB) qui prédominent en fin de grossesse. Tout comme l'indiquaient les schémas de signalisations du LPS ainsi que du TLR-4, plusieurs cytokines pro-inflammatoires sont relâchées dont le TNF- α , l'IL-1 et l'IL-6. Certaines de ces cytokines comme le TNF- α et l'IL-6 ont été décelées dès 2h post-injection maternelle de LPS intra-péritonéale dans le liquide amniotique suivant l'exposition maternelle au LPS (Urakubo *et al.*, 2001). Une étude a aussi montré la présence d'IL-1 β dans le plasma fœtal dès 4h suivant l'injection de LPS maternel (Ashdown *et al.*, 2006).

Reponse inflammatoire	Environnement foetal implique	Dose LPS, Voie d'administration	Jour gestationnel (G) d'exposition	References
↑ IL-6, TNF- α	Placenta	2,5 mg/kg, ip	G16	Urakubo et al. (2001)
↑ TNF- α (2h)	Liquide amniotique			
↑ IL-1 β , IL-6, TNF- α	Placenta	500 μ g/kg, ip	G16	Urakubo et al. (2001)
↑ IL-6 (2h, 8h)	Liquide amniotique			
↑ IL-1 β , IL-6, TNF- α (2h, 8h)	Placenta	50 μ g/kg, ip	G18	Ashdown et al. (2006)
↑ IL-1 β (4h)	Plasma foetal			
↑ IL-1 β , IL-6, IL-1ra	Placenta	200 μ g/kg, ip	Deux fois par jour, aux 12h, de G17 à la naissance	Girard et al. (2010)

Tableau 2. Réponse inflammatoire des annexes fœtales et du foetus suite à l'exposition gestationnelle au lipopolysaccharide (LPS) d'*E. coli*. Suite à l'injection systémique de LPS chez la rate gestante, une augmentation des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , IL-6 et TNF- α est observée dans les placentas selon plusieurs modèles animaux. L'élévation des mêmes cytokines a aussi été reportée dans le liquide amniotique et le plasma fœtal dans certains de ces modèles. Adapté de Boska, 2010.

L'exposition en fin de gestation au LPS (200 μ g/kg, voie intra-péritonéale, aux 12h, entre G17 et la fin de gestation) entraîne des dommages placentaires, en plus de la

relâche de cytokines pro-inflammatoires tel que discuté ci-haut (Girard *et al.*, 2010; Girard *et al.*, 2012). Les placentas présentent des lésions cavitaires au niveau du labyrinthe, une zone fœtale du placenta où ont lieu les échanges entre le sang de la mère et celui du fœtus (figure 7).

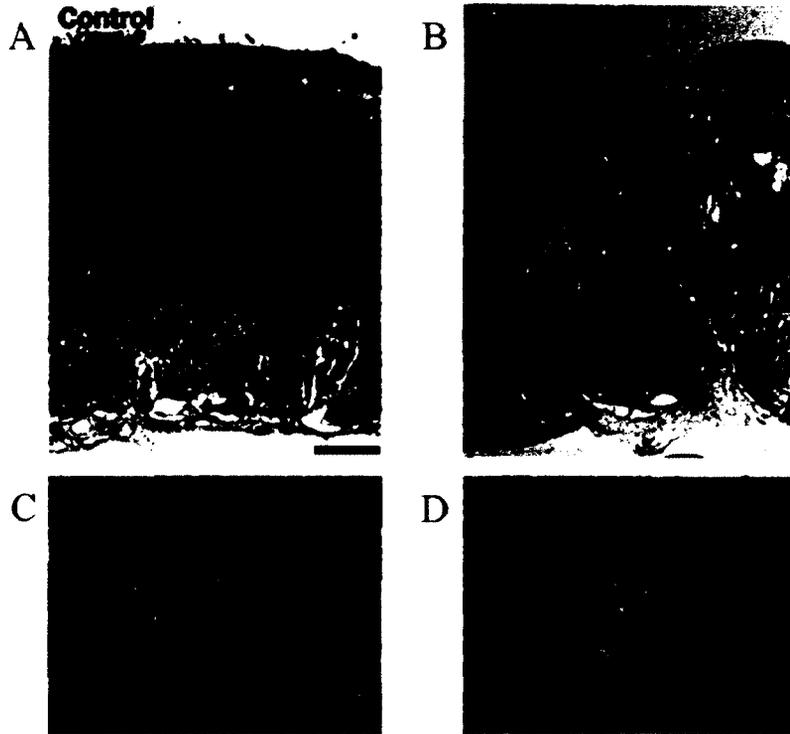


Figure 7. Lésions cavitaires placentaires. Lésions placentaires cavitaires situées dans le labyrinthe (lb) (7B) (tête de flèche), développées suite à l'exposition au LPS d'*E. coli* (7D) en fin de gestation, comparativement au contrôle. Coloration H&E. Échelle (A) : 1 mm; grossissement (C et D) : X 400. Adapté de Girard *et al.*, 2010.

De plus, les placentas provenant des rates gestantes exposées au LPS présentent aussi des infiltrations macrophagiques importantes au niveau du labyrinthe (Figure 8). Ces lésions placentaires sont caractéristiques d'un diagnostic de chorioamnionite. L'étude du placenta *in vivo* par IRM a montré une diminution de sa perfusion (Girard *et al.*, 2010) suite à l'injection de LPS.

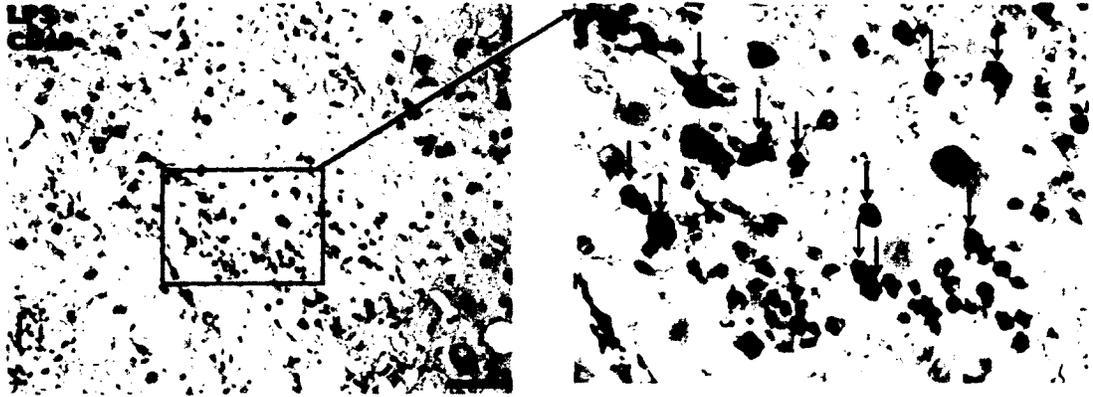


Figure 8. Marquage immunohistochimique (Ac CD68) d'une coupe de placenta suite à une exposition systémique au LPS. Cette coupe montre une infiltration macrophagique (flèches) dans le labyrinthe. Échelle : 100 μm ; grossissement : X 200. Adapté de Girard et al. , 2010.

L'étude de ce modèle animal a aussi permis la caractérisation des lésions cérébrales subséquentes à cette exposition au LPS en fin de gestation. Les foetus exposés à l'inflammation gestationnelle causée par le LPS en fin de gestation et combiné à une hypoxie-ischémie au jour post-natal (P) 1 présentent un élargissement des ventricules à P25 (figure 9), un amincissement du corps calleux (figure 10 A-B) ainsi qu'un défaut de myélinisation de la capsule interne (figure 10 C-D) (Girard *et al.*, 2009). Une prolifération des cellules microgliales et des astrocytes est aussi observée (Girard *et al.*, 2009). Un pattern analogue de lésion, mais dans une moindre mesure, est observé suite à l'exposition gestationnelle au LPS seul (Pang *et al.*, 2000; Bell et Hallenbeck, 2002; Rousset *et al.*, 2006).

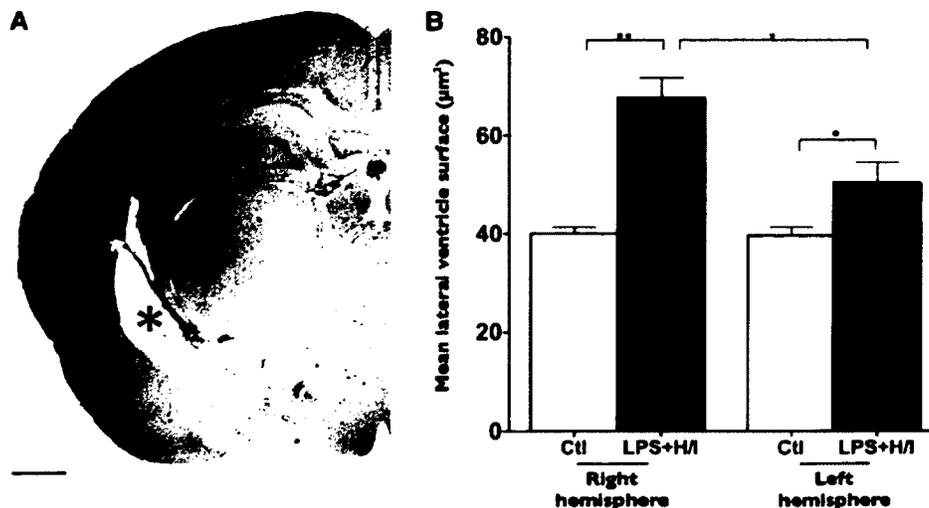


Figure 9. Élargissement des ventricules cérébraux latéraux. Élargissement des ventricules cérébraux latéraux (*) dans les cerveaux de rats exposés au LPS en fin de gestation et à un épisode d'hypoxie-ischémie périnatale (A). Quantification de l'élargissement des ventricules cérébraux latéraux (B). Échelle : 1 mm. Adapté de Girard et al. , 2009.

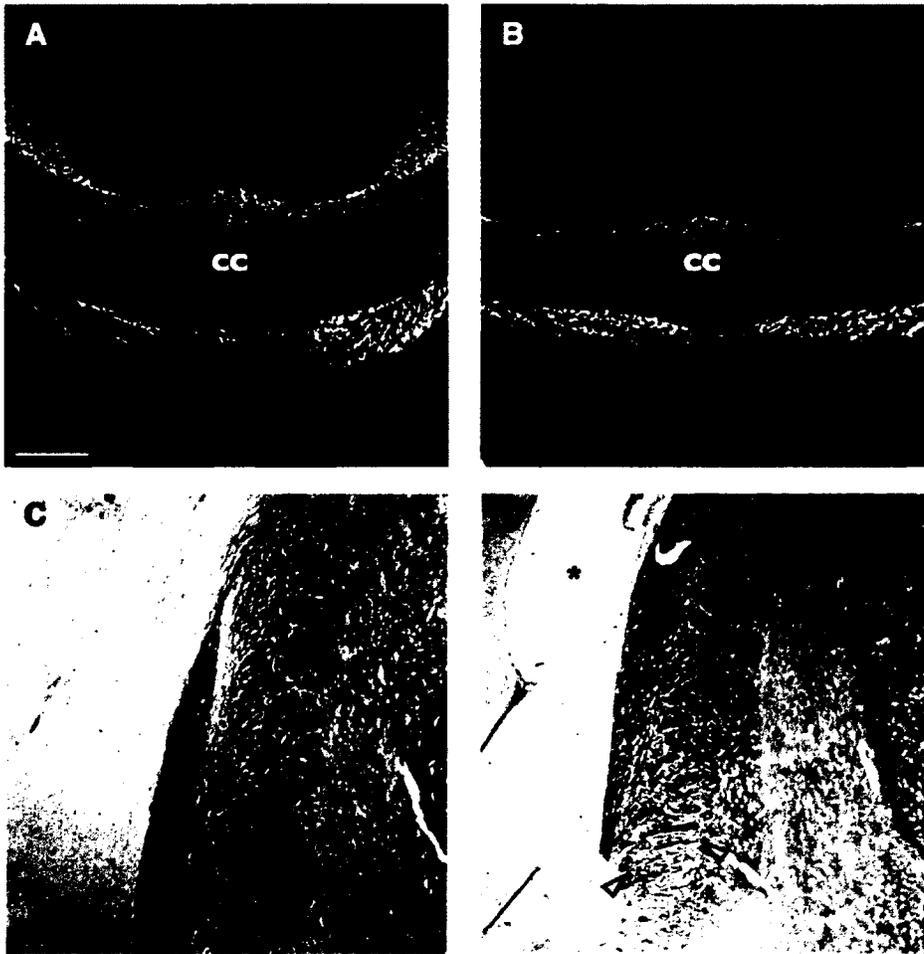


Figure 10. Coupes coronales de cerveau de rats (P25) exposés à une inflammation maternelle induite par le lipopolysaccharide d'E. coli. Coupes coronales montrant des dommages de la substance blanche : amincissement du corps calleux (cc) (A-B) et décoloration de la capsule interne (ci) (C-D). Segment juxtaventriculaire du faisceau corticospinal (C-D) où il y a perte de coloration bleutée (D) (tête de flèches) au *luxol fast blue*, colorant spécifique de la myéline. Échelle : 1 mm (A-B) ; 500 μ m (C-D). Tiré de Girard et al. , 2009.

Ces résultats, et ceux d'autres groupes (Duncan *et al.*, 2002; Lehnardt *et al.*, 2002; Mallard *et al.*, 2003; Pang *et al.*, 2003; Garnier *et al.*, 2006), récapitulent d'une manière remarquable les lésions cérébrales présentes en clinique dans les cerveaux des enfants

prématurés. Comme mentionné précédemment, ces lésions cérébrales sont associées à des déficits moteurs et/ou neuro-développementaux. Le tableau 3 présente une synthèse des déficits comportementaux de la progéniture, issue de mères exposées au LPS durant la gestation.

Modifications comportementales	Dose LPS, Voie d'administration	Jour gestationnel (G) d'exposition	Références
↓ PPI (P70, P100, P180)	1 mg/kg, sc	Jours en alternance durant toute la durée de la gestation	Borrell et al. (2002)
↑ PPI (P35, P70, P170, P180, P400)	2 mg/kg, sc	Une fois par jour durant toute la grossesse	Romero et al. (2007, 2010)
↓ Activité locomotrice (P90)	1 mg/kg, ip	G10.5-G11	Ling et al. (2009)
↓ Activité locomotrice (P400)			
↓ PPI (P70)	100 µg/kg, ip	G15-G16	Fortier et al. (2007)
↓ Temps de latence avant la chute; Rotarod (P30, P35, P40)	200 µg/kg, ip	Deux fois par jour, aux 12h, de G17 jusqu'à la naissance	Girard et al. (2009, 2010)
↓ Apprentissage spatial; Morris Water Maze (P28)	500 µg/kg, ip	G19	Lanté et al. (2007, 2008)

Tableau 3. Déficiences comportementales résultant d'une exposition gestationnelle au lipopolysaccharide (LPS) d'*E. coli* à différents moments au cours de la gestation. Les expositions chroniques au cours de toute la gestation semblent induire des déficits au niveau du couplage sensorimoteur (test PPI) alors que les expositions soutenues en fin de gestation entraînent plutôt des déficits touchant la motricité. G : Jour de gestation; P : Jours post-natal; PPI : *Prepulse inhibition*. Adapté de Boska, 2010.

Il est intéressant de noter que les effets sur le comportement de la progéniture varient selon le moment d'exposition au LPS au cours de la gestation. Les expositions chroniques durant toute la gestation semblent entraîner des modifications de réponse au test de *prepulse inhibition* (PPI) (Borrell *et al.*, 2002; Romero *et al.*, 2007; Romero *et al.*, 2010). Ce test mesure le couplage sensorimoteur (*sensorimotor gating*). Il est utilisé dans la caractérisation de la schizophrénie et de l'autisme, autant en clinique que dans la caractérisation des traits relatifs à ces pathologies humaines dans les modèles animaux (Perry *et al.*, 2007; Giakoumaki, 2012). Par contre, lorsque l'exposition est aiguë et en

fin de gestation, les déficits observés touchent plutôt la motricité, avec des déficits moteurs précoces rappelant ceux de la paralysie cérébrale. Le développement cérébral in utero couvre naturellement une période de changements importants où l'organisation cérébrale évolue énormément et très rapidement, avec des spécificités propres à chaque phase du développement que l'on peut brièvement segmenter en phases de prolifération neuronale puis gliale (premier tiers de gestation), phase migratoire des cellules neurales (milieu de gestation), phase d'extension des réseaux de connexions et synaptogenèse (fin de gestation, puis phase de myélinisation axonale (déjà en très grande partie post-natale)). Il n'est donc pas surprenant qu'une même agression ou une agression similaire survenant à différents moments au cours de la gestation mène à des effets neuro-développementaux et comportementaux distincts.

Lorsque l'on confronte le tableau 2 au tableau 3, on note que peu d'études se sont intéressées à la fois à la réaction inflammatoire survenant dans l'environnement fœtal ainsi qu'aux liens entre cette inflammation et, à la fois, le développement morphologique et comportemental cérébral de la progéniture. Cependant, les études déjà menées au sein du laboratoire, publiées par Girard et al. , et d'autres (Cai *et al.*, 2003) ont permis par exemple de démontrer l'implication mécanistique de l'IL-1 via l'utilisation de son antagoniste naturel, soit l'antagoniste du récepteur de l'IL-1(IL-1ra).

En résumé, tel que proposé sur la figure 11, l'exposition maternelle au LPS entraîne une activation du système immunitaire de la mère, puis : (1) des dommages au placenta incluant une augmentation de l'IL-1 β , (2) une infiltration macrophagique, et enfin (3) une perte de l'intégrité du tissu foetal. Le développement cérébral sera altéré notamment via une relâche de cytokines pro-inflammatoires, notamment l'IL-1 β , en réaction à la fois à la réaction inflammatoire déclenchée durant la gestation ainsi qu'à l'épisode d'hypoxie-ischémie cérébral survenant peu après la naissance. L'IL-1 β semble jouer un rôle clé dans la pathophysiologie des dommages cérébraux dans ce contexte puisque l'administration maternelle d'antagoniste au récepteur de l'IL-1(6), l'IL-1ra, a montré des effets majeurs de protection placentaires et aussi sur le cerveau des ratons en développement (Girard, 2010).

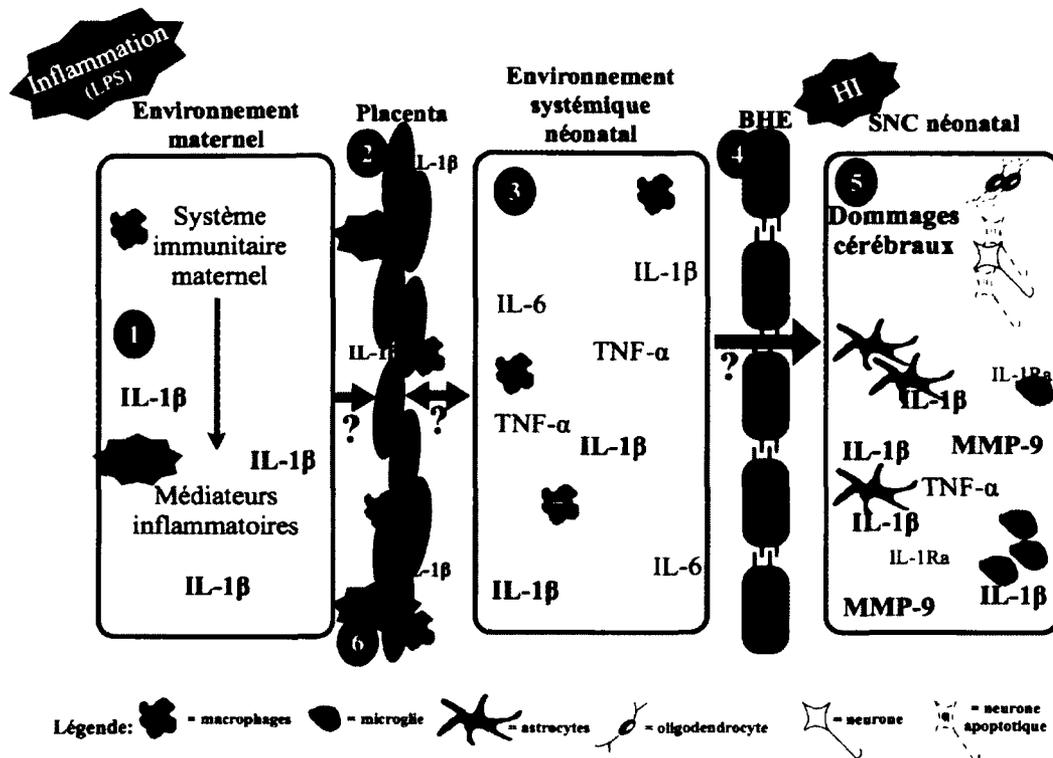


Figure 11. Schéma récapitulatif de la réaction inflammatoire maternelle déclenchée par le LPS et néonatale (systémique néonatale et cérébrale néonatale). L'exposition maternelle au LPS entraîne une activation du système immunitaire de la mère, puis : (1) des dommages au placenta incluant une augmentation de l' $IL-1\beta$, (2) une infiltration macrophagique, et enfin (3) une perte de l'intégrité du tissu dans le versant foetal. Le développement cérébral sera altéré via une relâche de cytokines pro-inflammatoires, notamment l' $IL-1\beta$, en réaction à la fois à la réaction inflammatoire déclenchée durant la gestation ainsi qu'à l'épisode d'hypoxie-ischémie cérébral survenant peu après la naissance. Tiré de Girard, S. Thèse de doctorat en immunologie, 2010.

1.2.1.1. Limitations des données issues de la modélisation animale de l'inflammation gestationnelle et des dommages de la substance blanche périnatale, et leurs conséquences cliniques.

En conclusion, malgré tous les apports importants des modèles d'inflammation maternelle fondés sur l'injection systémique de LPS d'*E. coli*, certaines limitations de cette approche doivent être soulignées :

- Un aspect n'est que très rarement traité dans les modèles d'exposition à l'inflammation gestationnelle causée par le LPS : les différences de vulnérabilité cérébrale néonatale selon le genre qui sont pourtant solidement établies chez l'homme.

Dans un contexte de morbidité neurologique néonatale, on ne peut faire abstraction de ce *sex ratio* débalancé – dans le sens d'une nette surmorbidity masculine - dans plusieurs entités résultant en grande partie des dommages cérébraux périnataux, bien que telles que les TSA (*sex ratio* 1 :4) et la paralysie cérébrale (1 :2) (Kuban et Leviton, 1994).

- Bien qu'*E. coli* soit une bactérie responsable d'une partie des chorioamnionites, elle n'est pas la bactérie la plus couramment présente dans un contexte de grossesse. En effet, le streptocoque de groupe B (SGB) est plus prévalente. Ceci supporte, dans le cadre de ce projet de recherche, l'induction de l'inflammation gestationnelle par exposition au SGB.

- L'effet direct ou purement indirect – via les cytokines - du LPS sur le placenta n'est pas complètement clarifié. Il est possible aussi que le LPS franchisse la barrière placentaire enflammée, et agisse ainsi directement sur le cerveau fœtal. Néanmoins, les expériences menées sur le placenta sain indiquent plutôt qu'il ne permet pas le passage fœtal du LPS (Dahlgren *et al.*, 2006).

1.2.2. SGB en périnatal

Le SGB est une bactérie gram positif qui colonise 10 à 30% des femmes enceintes au niveau du tractus vaginal et gastro-intestinal. Elle est responsable d'infections néonatales sévères lorsque contractées durant la période périnatale par le nouveau-né et pouvant mener à des conséquences catastrophiques telles que méningite, sepsis et éventuellement décès du nouveau-né (0-28 jours de vie), voire du nourrisson dans les formes tardives, se produisant jusqu'au 3^e mois. Les infections néonatales peuvent se produire de différentes manières. Par exemple, s'il y a rupture prolongée des membranes, la bactérie peut accéder au liquide amniotique et infecter le fœtus. Il a été démontré que le SGB peut aussi transloquer dans le compartiment utérin même si les membranes sont intactes (Desa et Trevenen, 1984; Katz et Bowes, 1988). Le fœtus peut alors s'infecter après la déglutition du liquide amniotique contaminé. Le SGB peut aussi être inhalé par les poumons dans lesquels circule le liquide amniotique. Le nouveau-né peut aussi s'infecter par contact cutané lors de son passage dans la filière vaginale. Aux États-Unis en 1970, le SGB était la première cause infectieuse de morbidité et mortalité infantile dans la première semaine de vie. Près de 50% des nourrissons infectés par le

SGB décédaient des conséquences de l'infection. Dans les années 1980, des études ont montré que l'administration d'antibiotiques à la mère durant le travail pouvait réduire de manière remarquable les risques d'infections du nouveau-né dans la première semaine de vie. Grâce aux efforts des professionnels de la santé, une recommandation officielle d'administration d'antibiotiques est lancée en 1996 par *American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG)*, puis par le Center for disease control (CDC) et l'*American Academy of Pediatrics (AAP)*. En 2002, lors de l'évaluation des mesures adoptées en 1996, une mesure de dépistage vaginal du SGB entre la 35^{ème} et la 37^{ème} semaine de grossesse est instaurée afin d'optimiser l'identification des femmes colonisées afin qu'elles reçoivent le traitement antibiotique lors de l'accouchement à terme (41 semaines), donc plusieurs semaines après la détection de la colonisation (voir figure 2 ; CDC 2010). Tel que montré sur la figure 1, les cas d'infections du nouveau-né dans la première semaine de vie a chuté de manière considérable suite à la mise en place des recommandations préventives via l'administration maternelle d'antibiotiques. Pour ce qui est des infections au SGB qui surviennent après la première semaine de vie du nouveau-né, l'incidence est demeurée stable depuis les 20 dernières années.

Cependant, bien que le dépistage systématique puis le traitement antibiotique couvrent le risque de transmission néonatale d'une colonisation par le SGB du nouveau-né à terme, aucune prise en charge n'est actuellement effectuée concernant le potentiel inflammatoire nocif de l'exposition durant la grossesse. Puisque le SGB est aussi associé au développement de chorioamnionite (inflammation du placenta et/ou des membranes fœtales), on peut se questionner sur l'effet d'une exposition gestationnelle au SGB sur le développement fœtal et les conséquences à long terme d'une telle exposition.

De plus, tel qu'expliqué ci-dessus, en cas de menace d'accouchement prématuré les infections/inflammations, notamment placentaires, étant souvent présentes, les femmes reçoivent le plus souvent, outre les mesures classiques visant à stopper les contractions utérines, un traitement antibiotique. Or, l'essai thérapeutique randomisé contrôlé mené en Grande Bretagne montre que cette administration d'antibiotique ne réduit pas le risque de complication neuro-développementale dans la progéniture, voire même l'augmente (Kenyon *et al.*, 2008). Cet accroissement paradoxal d'incidence de

morbidity neurologique pourrait, selon notre hypothèse, s'expliquer par un pic majeur de relâche de fragments bactériens post-antibiotique et le déclenchement d'un « orage » inflammatoire (« *cytokine storm* ») délétère pour le cerveau fœtal.

En conclusion, malgré la prédominance du SGB dans l'environnement fœtal comparativement aux autres bactéries dont *E. coli*, les effets de cette bactérie sur l'inflammation materno-foetale n'ont fait l'objet d'aucune modélisation animale à ce jour.

1.3. L'autisme : un problème de santé publique

Leo Kanner fut le premier à décrire cliniquement le syndrome de l'autisme en 1943 (Kanner, 1968). Les TSA, tels que décrits par l'American Psychiatric Association et les critères diagnostique du DSM-IV, sont un trouble global du développement qui se traduit par des anomalies dans trois sphères du comportement de l'enfant : déficit de la communication (verbale et non-verbale), déficit dans les interactions sociales et une augmentation des comportements répétitifs/stéréotypés (Guinchat *et al.*, 2012). Les TSA sont très hétérogènes, dû à la présence fréquente de co-morbidités très variées chez l'enfant, dont déficit intellectuel, troubles de l'attention, agressivité, troubles affectifs et troubles de modulation sensorielle (Matson et Nebel-Schwalm, 2007; Maski *et al.*, 2011).

Parmi tous les troubles neuro-développementaux chez l'enfant, ce sont les TSA qui sont le plus fréquents. L'autisme a connu une hausse marquée au cours des dernières années. Environ 1 enfant sur 110 était atteint en 2006, alors que la prévalence a augmentée à 1 enfant sur 88 en 2012, aux États-Unis (*Center for Disease Control*). Quant aux statistiques canadiennes, il est très difficile de connaître l'évolution globale actuelle de la prévalence de l'autisme au Canada puisqu'aucun système homogène et populationnel de surveillance national n'existe (Société Canadienne sur l'Autisme). Cependant, les données fragmentaires obtenues dans certaines provinces comme Terre-Neuve, le Labrador ainsi que l'Île du Prince Édouard suivent les mêmes tendances que les données provenant des États-Unis, ce qui appuie que les TSA représentent un problème

de santé publique non seulement majeur par sa fréquence, mais aussi en accroissement très rapide durant la dernière décennie. Les progrès du diagnostic précoce, et l'aide d'outils plus sensibles, ne semblent pas expliquer à eux seuls des hausses aussi grandes de prévalence des TSA : 39% à 204% de hausses entre 2003 et 2008, dépendant des groupes d'âge (Société Canadienne sur l'Autisme). Une telle pente d'accroissement ne peut pas non plus être expliquée que par des déterminants purement génétiques, et soulève plutôt la question de l'influence de facteurs environnementaux infectieux/inflammatoires ou toxiques. De plus, on parle de quatre garçons atteints pour une fille ; dans certaines formes d'autisme, ce *sex ratio* peut même être débalancé jusqu'à 9 :1, pour des raisons qui ne peuvent être élucidées par la seule contribution des remaniements génétiques liés au chromosome X, affectant plus les garçons.

De toutes ces statistiques naissent deux questions : quels sont les facteurs de risque et les causes non-génétiques des TSA? Pourquoi ce syndrome affecte-t-il plus les garçons que les filles?

1.3.1. Risques prénataux

Plusieurs facteurs de risques prénataux sont souvent associés à l'autisme, par exemple l'âge avancé des parents, la primiparité, les métrorragies ainsi que la pré-éclampsie font aussi partie des facteurs de risques. La génétique, longtemps suspectée d'être en partie responsable d'autisme, permet en l'état des connaissances actuelles, pourtant très avancées (plusieurs centaines de gènes déterminant des TSA ont été découverts), d'expliquer qu'environ 10 à 20% des cas d'autisme (Devlin et Scherer, 2012). Quant aux autres facteurs énumérés ci-haut, il s'agit d'associations, mais le lien de causalité n'est pas démontré.

1.3.2. Risques périnataux

La prématurité, la présentation du nouveau-né par le siège et les césariennes planifiées sont des facteurs de risques associés à l'autisme, tout comme le petit poids de naissance, le faible score d'Apgar (score de vitalité néonatale), l'hyperbilirubinémie, le

retard de croissance et la survenue d'une encéphalopathie néonatale. Cependant, un lien de causalité entre l'autisme et aucun de ces facteurs pris individuellement n'a pu être encore démontré (Guinchat *et al.*, 2012).

En somme, ces résultats indiquent qu'une fraction importante des TSA pourrait résulter de facteurs environnementaux encore mal connus. Les associations épidémiologiques entre l'autisme, les infections gestationnelles, et la prématurité – qui est aussi souvent associée aux infections par le SGB - fournissent le rationnel supportant l'hypothèse de travail de notre projet de recherche.

1.4. Modélisation animale de l'autisme

À ce jour, plusieurs modèles animaux d'autisme ont été développés. Plusieurs s'appuient sur des défauts génétiques, cependant, puisque le travail faisant objet du présent mémoire porte sur l'hypothèse de déterminants environnementaux, nous limiterons notre revue de la littérature aux principaux modèles d'origine non génétique. Outre les traits autistiques versus schizophréniques induits par le LPS déjà décrits ci-dessus (cf Chapitre 1, section 1.2.1), c'est l'exposition gestationnelle à un médicament (acide valproïque (valproate)) qui a donné naissance à un modèle de référence d'autisme chez le rat. Ce modèle classique a été décrit pour la première fois en 2005 (Schneider et Przewlocki, 2005). Le valproate est injecté à raison de 600mg/kg à G12 à des rates Wistar, par voie intra-péritonéale. Les ratons issus des mères exposées au valproate ont un retard de croissance staturo-pondérale persistant et aussi un retard de développement neurologique, notamment au niveau de l'ouverture des yeux. Lors de tests comportementaux, ces mêmes ratons ont révélés des traits associés à l'autisme. D'abord, dans un test de reconnaissance d'odeur maternelle, les ratons exposés au valproate avaient un temps de latence plus élevée avant de rejoindre le compartiment correspondant à l'odeur maternelle (figure 12) à P9.

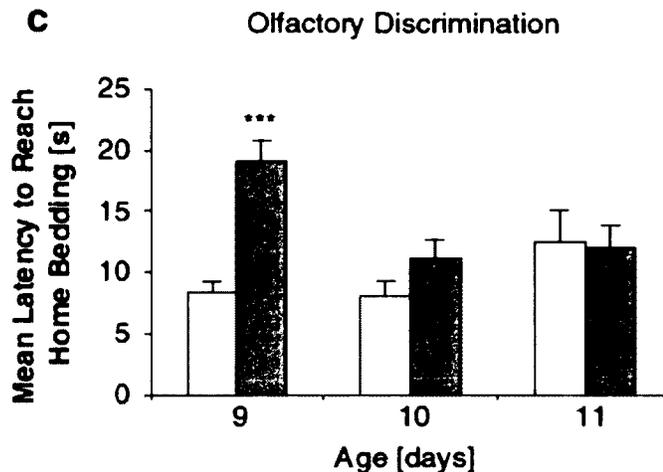


Figure 12. Retard de reconnaissance de (ou d'attraction/intérêt pour) l'odeur maternelle des rats à P9 suite à l'exposition maternelle au valproate à G12.5. Ce résultat suggère que le valproate entraîne un retard de maturation des différents systèmes des rats, d'où le retard de capacité de reconnaissance de l'odeur maternelle médiée via le système olfactif. Colonne blanche : groupe contrôle; colonne grise : groupe exposé au valproate. Tiré de Schneider et Przewlocki, 2005.

Ce test est associé à la sphère de la communication, qui est très affectée chez les enfants autistes. Lors du test du PPI réalisé à l'adolescence, les rats ont montré un déficit d'inhibition du réflexe de sursaut passager, puisqu'à l'âge adulte, ils ont obtenus des résultats similaires au groupe contrôle (figure 13).

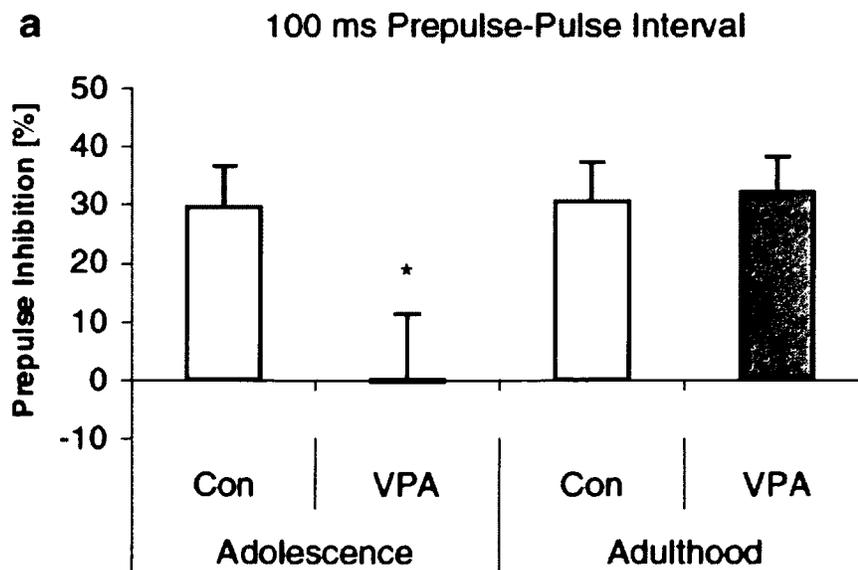


Figure 13. Test de l'inhibition du réflexe de sursaut à l'adolescence et à l'âge adulte chez les rats exposés au valproate.Défaut d'inhibition du réflexe de sursaut en réponse à un stimulus acoustique (*prepulse inhibition of acoustic startle*) à l'adolescence chez les rats exposés au valproate. Le délai entre le *prepulse* et le *pulse* est de 100 ms. Ce résultat indique une anomalie au niveau de l'intégration sensori-motrice chez les rats adolescents exposés au valproate *in-utero*. Con : Contrôle, VPA : valproate. Tiré de Schneider et Przewlocki, 2005.

Ce test, tel que décrit précédemment, permet d'évaluer le couplage sensori-moteur qui est aussi affecté dans le syndrome de l'autisme. Les rats exposés au valproate montrent aussi une augmentation des comportements stéréotypés, autant dans le nombre d'évènements que dans la durée des évènements de stéréotypies. Il y a une diminution du comportement exploratoire du rat lors d'un test comportemental réalisé dans une boîte dont les parois sont trouées à intervalles réguliers. Le nombre de fois où le rat explore les trous avec son museau (*hole-pokings*) ainsi que le nombre de fois où le raton s'est redressé autour des trous est comptabilisé (figure 14).

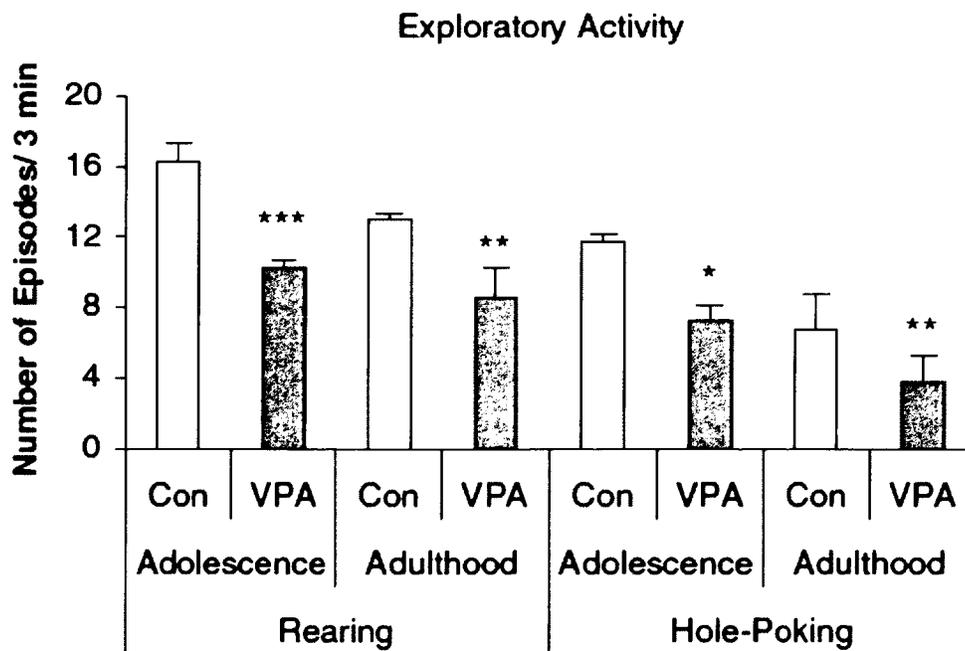


Figure 14. Diminution du comportement exploratoire chez les rats exposés au valproate autant à l'adolescence qu'à l'âge adulte. Les comportements d'exploration tels que les redressements (*rearing*) et l'exploration de trous avec le museau (*hole-*

poking) ont été comptabilisés pendant 3 minutes dans le test de l'*open field*, qui consiste en l'exploration par les rats d'un nouvel environnement. Con : Contrôle; VPA : Valproate. Tiré de Schneider et Przewlocki, 2005.

Lors des tests d'interactions sociales, les rats exposés au valproate ont montré un déficit dans leurs comportements d'exploration sociale (Schneider et Przewlocki, 2005).

Bien sûr, modéliser l'autisme n'est pas une tâche facile. Plusieurs des résultats présentés ci-haut pourraient relever de d'autres types de désordres psychiatriques, par exemple les troubles anxieux ou encore la schizophrénie. D'un point de vue observationnel clinique humain, les troubles anxieux sont relativement moins présents, ou moins sévères, au sein des patients juvéniles comparativement aux adolescents et adultes, y compris ceux atteints de TSA. La schizophrénie, quant à elle, est généralement déclenchée et diagnostiquée vers le début de la vie adulte. Le modèle d'exposition au valproate est reconnu comme un modèle d'autisme puisque la plupart des anomalies comportementales sont présentes et décelées à un jeune âge, la majorité d'entre eux étant constaté avant la puberté, ce qui corrèle bien avec l'autisme, dont les premiers signes cliniques apparaissent autour de 12 à 18 mois chez les bambins.

Chapitre 2. Hypothèse de recherche et objectifs

2.1 Hypothèse de recherche

L'inflammation gestationnelle induite par le SGB inactivé entraîne, via une réaction inflammatoire maternelle, des dommages au placenta ainsi que des lésions cérébrales périnatales dans la progéniture causant des troubles neuro-développementaux.

2.2 Objectif 1

Étudier les lésions placentaires et cérébrales subséquentes à l'exposition au SGB inactivé en fin de gestation.

2.3 Objectif 2

Caractériser les troubles neuro-développementaux présents dans la progéniture selon le genre.

Chapitre 3. Article

Dysconnectivity and autism in male following B streptococcal inflammation

Julie DL Bergeron, Jessica Deslauriers, Sylvain Grignon, Louis-Charles Fortier, Claire Poyart et Guillaume Sébire.

Article soumis à *Annals of Neurology*

La conception de l'étude a été faite par le directeur de recherche en collaboration active avec l'étudiante. La totalité des expérimentations présentées dans cet article ont été réalisées par l'étudiante. L'étudiante s'est chargée de toute l'analyse des résultats et de la préparation des figures sous la supervision du Dr Sébire. La première version de l'article a été rédigée par l'étudiante, puis élaborée et finalisée par les soins de l'étudiante, sous la supervision de Dr Sébire et des autres co-auteurs.

Résumé

Paradoxalement, l'impact de l'inflammation maternelle induite par le streptocoque de groupe B (SGB) sur le cerveau en développement du nouveau-né n'a jamais été étudié malgré le fait que le SGB soit la bactérie colonisant, ou infectant, le plus fréquemment les femmes enceintes et leur progéniture. Selon notre hypothèse, l'activation immunitaire maternelle relevant de la présence du SGB durant la grossesse joue un rôle dans les dommages cérébraux périnataux et les troubles neuro-développementaux subséquents, comme par exemple l'autisme. Nos résultats, issus d'un nouveau modèle murin - conçu et développé par nos soins - d'inflammation maternelle induite chez le rat par le SGB, révèlent des dommages à la fois placentaires et cérébraux ainsi que des troubles comportementaux dans la progéniture. Contrairement aux résultats établis à l'aide de modèles classiques d'inflammation prénatale induite par des bactéries Gram négatives (empruntant principalement la voie de transduction de signal *Toll-like receptor* (TLR) 4) ou par des composants viraux (voie TLR3), l'inflammation maternelle induite par la bactérie Gram positive (TLR2) SGB entraîne un patron distinctif de chorioamnionite et de lésions cérébrales. Une dysmyélinisation sous-corticale, affectant principalement la capsule externe, est observée, sans aucune prolifération des cellules gliales. Des traits comportementaux associés à l'autisme, notamment des déficits d'intégration sensorielle, de communication, et de socialisation, sont présents dans la progéniture exposée au SGB. Ces déficits traduisent de profonds défauts dans l'intégration et la réponse à des stimuli sensitifs acoustiques ou chimiques qui sont des signaux prédominants dans la communication des rats. Cette combinaison de traits associés à l'autisme n'a été détectée que chez les mâles. Nos résultats montrent donc pour la première fois que la réponse inflammatoire materno-foetale au SGB joue un rôle dans l'induction de lésions placentaires et cérébrales, et récapitule plusieurs traits cardinaux du phénotype autistique humain tels que : sa vulnérabilité neuro-développementale liée au genre masculin, ses défauts cérébraux de type dysconnectifs prosencéphaliques, ainsi que ses traits comportementaux sensorimoteurs et socio-communicationnels. Ces résultats amènent des évidences comme quoi, au-delà de l'influence génétique, les facteurs environnementaux jouent un rôle dans l'autisme et dans sa prévalence selon le genre.

Abstract

Paradoxically, the impact of group B streptococcus (GBS)-induced maternal inflammation on offspring's brain has not yet been investigated despite GBS being one of the most frequent bacteria colonizing or infecting pregnant women. According to our hypothesis GBS-induced maternal immune activation plays a role in offspring perinatal brain damage and subsequent neurodisabilities such as autism. Our results using a new preclinical model of maternal inflammation triggered by inactivated GBS uncovered its placental, neuropathological, and behavioral impacts on offspring. As opposed to other models of prenatal inflammatory brain damage driven by viral/toll-like receptor (TLR)3 - or Gram-negative/TLR4 -, maternal inflammation induced by Gram-positive cocci and driven by TLR2 produced a distinctive pattern of chorioamnionitis and cerebral injuries. Brain damage featured subcortical dysmyelination, without any glial proliferation. Autistic hallmarks were found in offspring exposed to GBS, namely deficits in motor behavior variability, social and communicative impairments, *i.e.* profound defects in the integration and response to acoustic as well as chemical signals which are both predominant modes of communication in rats. Surprisingly, only male offspring were affected by these combined autistic-like traits. Our results show for the first time that maternofetal inflammatory response to GBS plays a role in the induction of placental and cerebral insults, remarkably recapitulating cardinal features of human autism, such as gender dichotomy, brain dysconnectivity, and neurobehavioral traits. These results also provide important evidence that beyond genetic influences, modifiable environmental factors play a role in both the occurrence of autism, and in its gender unbalance.

**Dysconnective white matter injury and autistic-like behavior
predominantly affecting male offspring exposed to group B
streptococcal maternal inflammation**

Bergeron J.D.L.^a, Deslauriers J.^b, Grignon S.^{b,c}, Fortier L.C.^d, Poyart C.^{e,f,g},
Sébire G.^a

^a Département de Pédiatrie, ^b Département de Physiologie et Biophysique, ^c Département de Psychiatrie, ^d Département de Microbiologie, Université de Sherbrooke, Qc, Canada; ^e Institut Cochin, Université Sorbonne Paris Descartes, ^f Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, INSERM U1016, ^g Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Service de Bactériologie, Centre National de Référence des Streptocoques, Hôpitaux Universitaires Paris Centre Cochin-Hôtel Dieu-Broca, F-75014, Paris, France.

Running head: Brain dysconnectivity and autism-like behavior in male following B streptococcal inflammation

Corresponding author: Guillaume Sébire, 3001 12ème avenue Nord, J1H5N4 Sherbrooke, Canada. Phone: +1 819 346 1110 ext. 14132. Fax: +1 819 564 5398. E-mail: Guillaume.Sebire@USherbrooke.ca

Key words: Autism, group B streptococcus, dysmyelination, gestational inflammation

Abstract

Paradoxically, the impact of group B streptococcus (GBS)-induced maternal inflammation on offspring's brain has not yet been investigated despite GBS being one of the most frequent bacteria colonizing or infecting pregnant women. According to our hypothesis GBS-induced maternal immune activation plays a role in offspring perinatal brain damage and subsequent neurodisabilities such as autism. Our results using a new preclinical model of maternal inflammation triggered by inactivated GBS uncovered its placental, neuropathological, and behavioral impacts on offspring. GBS-exposed placentas presented cystic lesions and polymorphonuclear infiltration located within the decidual/maternal side of the placenta, contrasting with macrophagic infiltration and necrotic areas located in the labyrinth/fetal compartment of the placenta following lipopolysaccharide (LPS)-induced maternal inflammation. Brain damage featured lateral ventricles widening, predominating in male, reduction of periventricular external capsules thickness, oligodendrocyte loss, and disorganization of fronto-parietal sub-cortical connectivity without any glial proliferation. Autistic hallmarks were found in offspring exposed to GBS, namely deficits in motor behavior variability, social and communicative impairments, *i.e.* profound defects in the integration and response to both acoustic and chemical signals that are both predominant modes of communication in rats. Surprisingly, only male offspring were affected by these combined autistic-like traits. Our results show for the first time that materno-fetal inflammatory response to GBS plays a role in the induction of placental and cerebral insults, remarkably recapitulating cardinal features of human autism, such as gender dichotomy, brain dysconnectivity, and neurobehavioral traits. As opposed to other models of prenatal inflammatory brain damage - driven by viral/toll-like receptor (TLR) 3 - or Gram-negative/TLR4 -, maternal

inflammation resulting from GBS/TLR2 interactions induced a distinctive pattern of chorioamnionitis and cerebral injuries. These results also provide important evidence that beyond genetic influences, modifiable environmental factors play a role in both the occurrence of autism, and in its gender unbalance.

Introduction

Perinatal brain injury is a major public health problem affecting about 50% of very preterm neonates, in addition to a significant proportion of more mature newborns [1]. Perinatal brain injury is associated with a high risk of life-long neurobehavioral disabilities such as cerebral palsy, learning impairments, and autism spectrum disorders (ASD) [1-5]. First established thanks to preclinical data, the causal link between pathogen-induced gestational inflammation and perinatal brain damage was also supported by human epidemiological and observational evidence [6, 7]. However, the potentially distinct impacts on fetal brains of individual pathogens involved in maternal inflammation, as well as the mechanistic pathways whereby they exert their respective noxious effects, remain largely unknown [8, 9]. Most experimental designs have used either polyinosinic:polycytidylic acid (poly I:C), a synthetic analog of double-stranded RNA, which mimics toll like receptor 3 (TLR3)-induced viral infection, or lipopolysaccharide (LPS) from *E. coli* as a paradigm of Gram-negative pathogen-induced maternal inflammation [6, 10-12]. LPS from *E. coli* acts mainly on monocyte-macrophages through TLR4.

Group B streptococcus (GBS) (*Streptococcus agalactiae*), a Gram-positive bacterium, is the most frequently encountered pathogen in the fetal environment [13]. GBS colonizes the genital tract in 10-30% of pregnant women [14]. GBS infections, such as urinary infections or chorioamnionitis, are major causes of maternal infections, especially at the end of gestation [13]. Paradoxically, the impact of GBS-induced maternal inflammation on offspring's brain has not yet been investigated despite its crucial importance given that in sharp contrast to *E. coli*, GBS mainly activates distinct TLR2 driven inflammatory pathways and might thus inflict its own specific pattern of insult to the immature brain [15]. A new preclinical rat model of maternal inflammation triggered by inactivated GBS was used to uncover its placental, neuropathological, and behavioral impacts on offspring.

Materials and Methods

Bacteria

A strain of Group B Streptococcus (GBS) serotype Ia, isolated at CHUS-Fleurimont from a pregnant patient, and a reference strain A909 (GBS Ia) [16] were used throughout the experiments. Both strains were stored at -80°C in brain heart infusion (BHI) broth (BD Biosciences, California) and 15% glycerol. Prior to the injection of dams, bacteria were grown in BHI broth for 15 h at 37°C. Culture was diluted 1:100 and grown in BHI broth at 37°C until culture reaches mid exponential phase (optical density at 600 nm between 0.5 and 0.7). Enumeration of the suspension was performed by counting the colony forming units (CFU) on BHI agar plates. Then, bacteria were harvested by centrifugation at 3220 g and inactivated in a solution of formaldehyde 10% for 24 hours (h). Bacteria

were washed 3 times with sterile saline solution. Bacteria were then harvested and suspended in sterile saline at a density of 1×10^9 CFU/100 μ l; 50 μ l of the inactivated suspension was plated in duplicatas on BHI agar plates and incubated at 37°C overnight after inactivation to verify that all bacteria were killed. Comparison between the effects of the two GBS strains were identical in all of the physiological, pathological or neurobehavioral outcome measures tested. Therefore, results from these two strains were pooled.

Rat model

Dams obtained from Charles River Laboratories (Saint-Constant, QC, Canada) at gestational day (G)14 were allowed to acclimatize to our animal facility prior to experimental manipulations. Rats were reared at 20-23°C environmental temperature with a 12 h light/dark cycle and access to food and water *ad libitum*. Experimental protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Université de Sherbrooke in accordance with the Canadian Council on Animal Care guidelines. Dams were randomized into two groups: dams (n = 26) from the GBS group were injected intraperitoneally every 12 h (\pm 2 h) with GBS (1×10^9 CFU of inactivated GBS suspended in 100 μ l of sterile saline) from G19 to the end of gestation; dams (n = 12) from the control group were injected intraperitoneally every 12 h (\pm 2 h) with 100 μ l of saline solution, from G19 to the end of gestation. In certain experiments placentas from dams exposed (n = 12) or unexposed (n = 3) to GBS were removed by cesarean sections performed at G22. We measured the increase in weight of dams per 24 h from G19 to G22. The number of pups per litter was counted at post-natal day (P) 1. The

weight gain per 24 h of each pup was measured daily between P1 and P10, and thereafter at P15, P20, P30 and P40.

Tissue preparation and histological procedures

Pups were euthanized by decapitation at P40. Brains were immediately removed, fixed (formaldehyde 4%, glutaraldehyde 0.1%) and paraffin-embedded. Cesarean sections were performed at G22 to remove placentas that were fixed as previously described [7].

Classic staining techniques, namely hematoxylin & eosin (H&E) and luxol fast blue (LFB) were performed, as described [17].

Histology, immunohistochemistry (IHC) and immunofluorescence (IF)

Five \square m-thick coronal sections of brains (-2.56 to -3.14 mm from the bregma) and placentas were used for IHC and IF experiments, as already described [18]. Briefly, sections were mounted on silanized slides (VWR, Mississauga, ON, Canada). Primary antibodies included monoclonal antibodies against: ionized calcium binding adapter protein 1 (Iba-1; 1:250, Wako Chemicals, VA) to detect macrophage/microglia, glial fibrillary acid protein (GFAP; 1:100, Chemicon, ON, Canada) to detect astrocytes, myelin basic protein (MBP; 1:500, Chemicon, ON, Canada), cc-1 (1:500, Abcam, ON, Canada) to detect mature oligodendrocytes. A polyclonal anti-polymorphonuclear (PMN) antibody (PMN, 1:250, Cederlane, ON, Canada) was used to detect PMN. Negative controls consisted of additional sets of sections treated in a similar way but without the primary antibody.

Counting of labeled cells in the brain (astrocytes, microglial cells and oligodendrocytes) was performed by counting two fields per brain in the lesioned - or equivalent areas in unlesioned - periventricular external capsule, internal capsule, and corpus callosum at 400X magnification using Image J software application cell counter, as previously described [18]. All values for percentage of positive cells from the readings were tabulated and used for data analysis. The staining intensities of MBP and LFB staining were studied by colorimetric analysis performed with Image J software as previously described [18]. The surface of lateral ventricles and thickness of the neocortex and of white matter structures were measured on coronal sections – located between -2.56 and -3.14 mm from the bregma - using Image J software as previously described [17].

Behavioral experiments

Olfactory discrimination

This test was performed at P9, as previously described [19]. The apparatus consisted of a cage (26.1 cm x 17.1 cm x 14.5 cm) separated in three equal zones. One end of the cage was covered by clean bedding and the other end was covered by home cage bedding. The animal was placed in the center of the cage in the neutral zone. If the animal walked into (front paws and head) the zone filled with home cage bedding, 1 point score was given. The time of latency before entering the home bedding zone was also measured. Each pup had two trials, separated by 1 minute (min). The home bedding was used for at least 3 days at the time of the test. This test is based on a nest-seeking response mediated by the olfactory system [20].

Social interactions

Animals were tested at P40 using Open field test apparatus. Prior to testing, the animals were acclimated to the apparatus for 10 min once a day for 2 days. The test consisted in measuring for 5 min the number and duration of active social interactions (sniffing, grooming, playing or chasing) between a pair of rats of the same sex, both exposed to the same experimental condition but from different litters [19]. The body weights of each pair did not differ by more than 15 grams (g). Simple passive physical contacts between the animals were not considered as social interactions, as previously described [21].

Motor testing and exploratory behavior

Spontaneous locomotion experiments were performed at P15, 20, and 25 using the Open field test. Data recorded were the total travelled distance and the time of mobility of the animal. Motor behavioral experiments were performed at P30, 35 and 40 using the Rotarod (Stoelting Co., IL, USA) test. Time of latency to fall was measured. Both tests were performed as previously described [22].

Sensorimotor gating - Prepulse inhibition (PPI)

The apparatus used (SR-LAB; San Diego Instruments, CA, USA) consisted of an animal enclosure of transparent plexiglass mounted on a movable platform floor attached to a piezoelectric transducer, recording the startle movements of the animal. PPI was performed as previously described [23]. The first part of the test began with the animal placed in the apparatus for a 5 min acclimatization period, and exposed to 71 decibels (dB) background noise. Following habituation, each rat was confronted to 4 test sessions.

The first session consisted of 6 pulses of 120 dB (40 msec). During the second session, the tested rat was exposed to 30 trials: five pulses alone trials (120 dB for 40 msec), five null trials (no stimulation) and five prepulse plus pulse trials at four different intensities. The prepulse plus pulse trials consisted of a 20 msec prepulse of 75, 79, 83 and 87 dB (4, 8, 12 and 16 dB over background noise, respectively), followed by a 80 msec delay and a startle pulse (120 dB for 40 msec). The trials were presented in a randomized order and the time between each trial varied from 10 to 20 sec. The third session of the test was separated from the second session by 60 sec delay. The third part consisted of 30 trials as in the second session and, finally at the end, the rat was exposed to 6 pulses of 120 dB for the last session. PPI was calculated as the percentage of inhibition of the startle amplitude elicited by pulse alone: $(1 - [\text{startle amplitude on prepulse plus pulse trial} / \text{mean startle amplitude on pulse alone trials}]) \times 100$.

Statistical analyses

Data are presented as means \pm SEM. Comparisons were performed using the unpaired t test with Welch correction. Fisher's Exact Test was used to analyze the sex ratio. Two-Way analysis of variance (ANOVA), evaluating the interaction of PPI and treatment, was used to analyze PPI results. The significance level was set at $p = 0.05$ for both tests.

Results

Effects of inactivated GBS injected to the dam on general physiological parameters of dams and pups

From G19 to G22, GBS dams gained a mean weight \pm SEM of $15.1 \text{ g} \pm 2.2$ ($5.9\% \pm 0.9$) compared to $26.6 \text{ g} \pm 1.0$ ($10.3\% \pm 0.3$) in control dams (Fig 1A). Dams exposed to GBS gave birth to a mean \pm SEM number of pups per litter of 6.1 ± 0.6 compared to 8.9 ± 0.7 in control litter (Fig 1B). No difference was observed in term of sex ratio between control and GBS litters. Pups issued from GBS dams presented a slightly decreased neonatal weight, but this difference disappeared after 3 to 5 days (Fig 1C). The observation of pups' behavior did not show any sign of neonatal encephalopathy or any other apparent clinical anomaly.

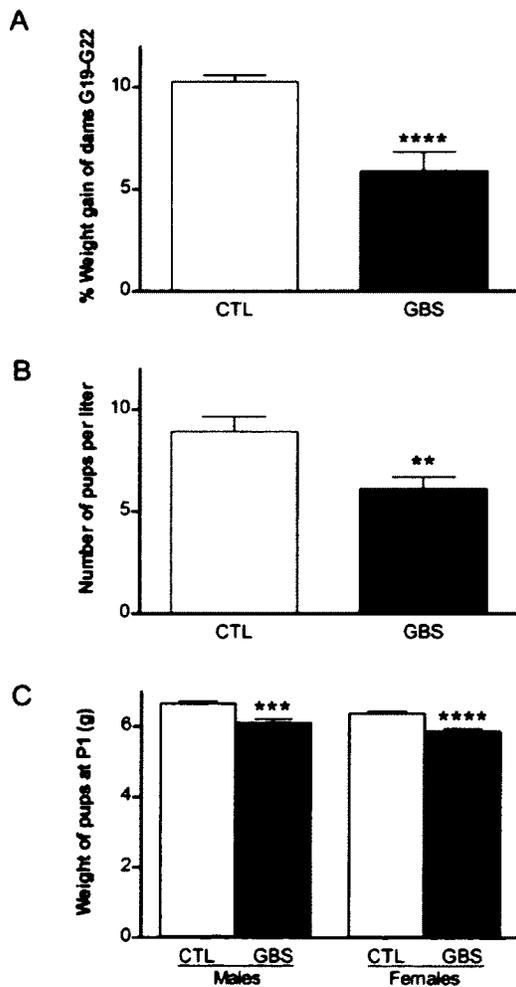


Figure 1. GBS effects on general physiological parameters of dams and pups: mean \pm SEM weight gain in dams exposed or unexposed to GBS from G19 to G22 (A), mean \pm SEM number of pups per GBS versus control litter (B) and mean \pm SEM weight of GBS versus control pups at birth (C). Number of dams: control (n = 12), GBS (n = 24); number of litters: control (n = 12), GBS (n = 26); number of pups: control (n = 30-41), GBS (n=41-49). **p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001 by t test with Welch correction. CTL, control; G, gestational day; GBS, group B streptococcus; P, postnatal day.

Placental damage induced by inactivated GBS

Ninety-one % of GBS-exposed placentas presented cystic lesions located within the decidua (Fig 2A). Focal or diffuse decidual PMN infiltration was observed in 75% of GBS-exposed placentas (Fig 2C-E), with a significant 2 fold increase of PMN within GBS-exposed decidua compared to controls (Fig 2G). PMN infiltration was also occasionally seen within - and adjacent to the amniotic membranes from GBS-exposed placentas. The number of CD68+ or Iba-1+ macrophages was identical in GBS-exposed and non-exposed placental labyrinths (data not shown). In addition, 47% of GBS-exposed placentas displayed malpighian metaplasia of membranes (Fig 2H). Neither malpighian metaplasia, nor cavitory lesion was observed in control placentas.

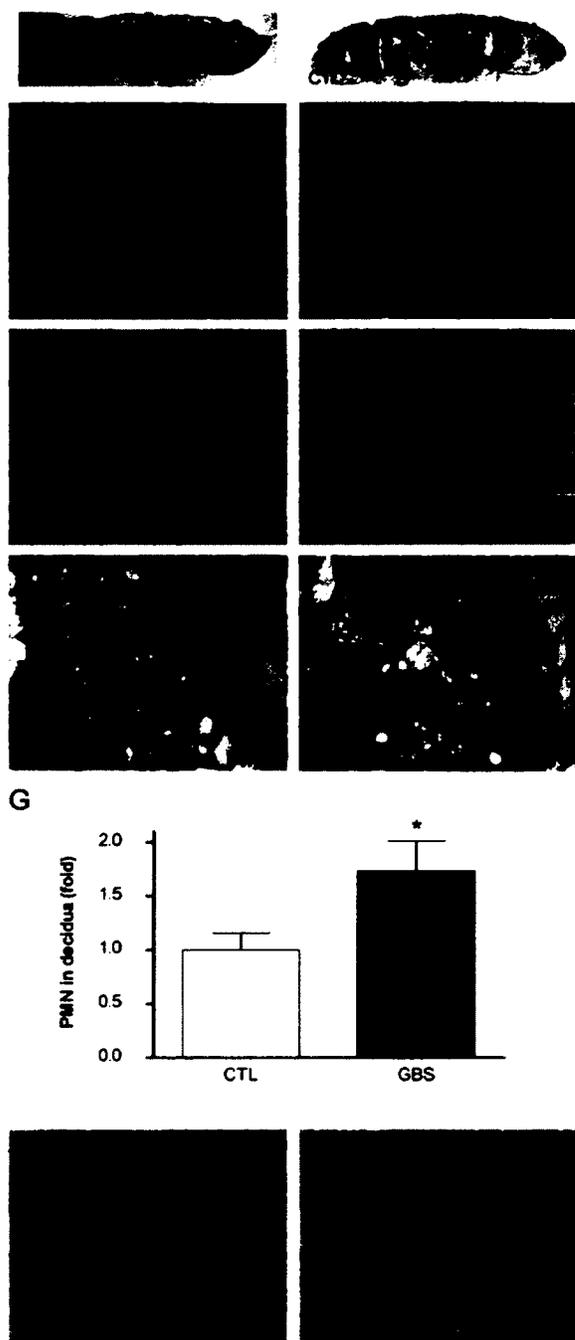


Figure 2. Histological and IHC aspects of placentas: placentas exposed to GBS showed cystic lesions (*cl*) (A) compared to control (B); H&E staining showing decidual PMN infiltration (arrow heads) following GBS exposure (C) versus control (D); IHC confirming decidual PMN infiltration (arrow heads) following GBS exposure (E-G)

compared to control (F-G); malpighian metaplasia (arrow heads) of the membranes (H) compared to control (I). Number of placentas: control (n = 3), GBS (n = 12). *p<0.05 by t test with Welch correction. *cl*, cystic lesion; CTL, control; Dc, decidua; GBS, group B streptococcus; H&E, hematoxylin-eosin; Lb, labyrinth; Mb, membranes. Scale bar (A-D; H-I) = 100 μm ; (B-C) = 50 μm .

Long term GBS-induced white matter (WM) damage

GBS-exposed forebrains from male – but not females - at postnatal day (P) 40 showed a significant enlargement of lateral ventricles (Fig 3A), *i.e.* a 2.5 fold increase in GBS-exposed compared to unexposed male rats (Fig 3C). Animals of both sexes exposed to GBS showed a significantly reduced thickness of the periventricular external capsule: 16.0% reduction and 20.4% reduction for male and female pups, respectively (Fig 3D-F). LFB, MBP, and cc-1 staining displayed within the external capsules, from both sex, a dysmyelinated aspect including a reduced myelin density and a disorganized architecture of oligodendrocytes characterized by a misalignment of their nuclei (Fig 3H-J). MBP immunostaining intensity within the lesioned areas of periventricular external capsules was reduced in females, but not males, exposed to GBS compared to unexposed rats (Fig 3G).

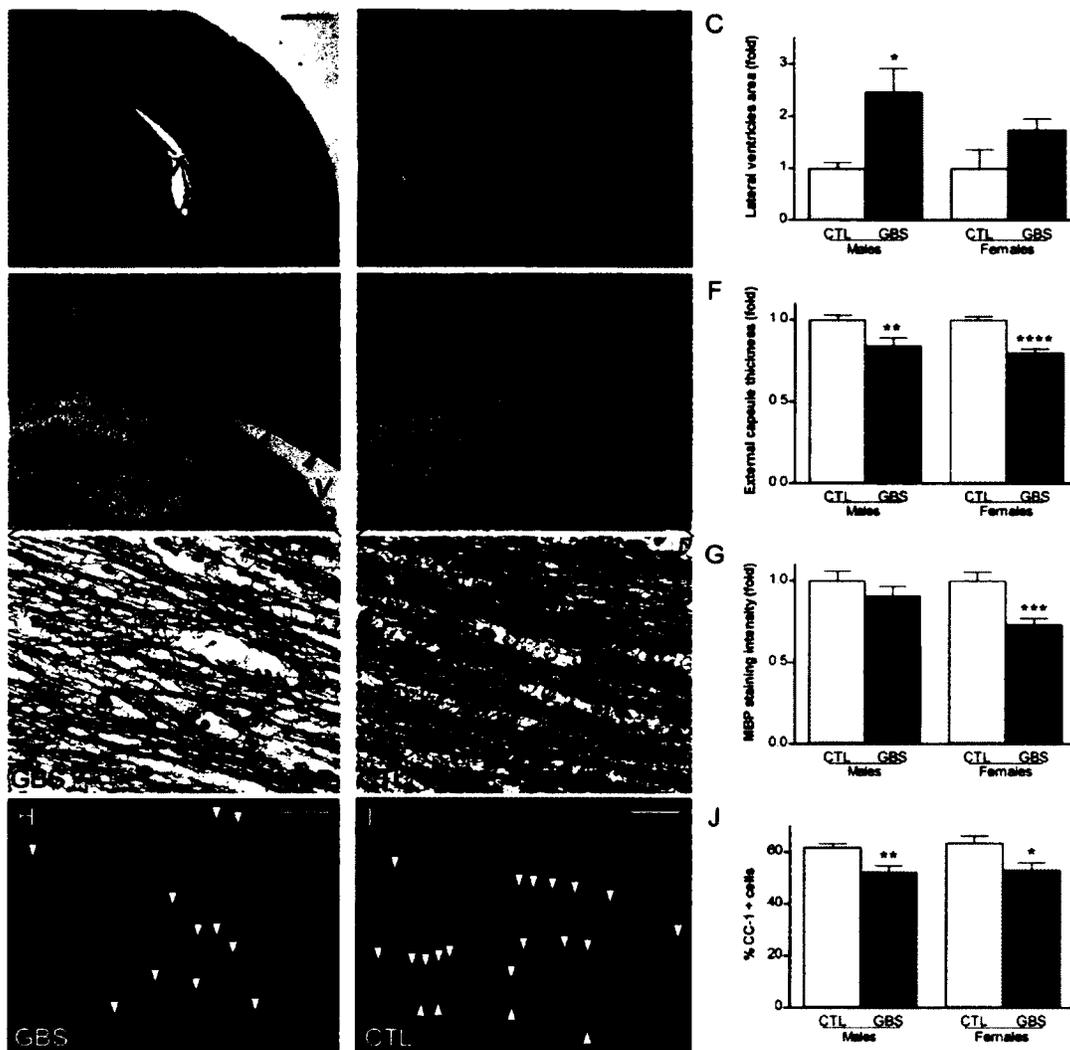


Figure 3. Histological and IHC aspects of forebrains at P40: Enlargement of GBS-exposed lateral ventricles (v) (A) in GBS-exposed male compared to unexposed male (B). Quantification of lateral ventricles enlargement in GBS-exposed versus control rats (C). Reduced thickness of the periventricular external capsule (arrow heads) exposed to GBS (D) compared to control (E). Quantification of external capsule thickness in GBS-exposed versus control (F). Decrease of myelinated fibers in the external capsule of a female exposed to GBS (D) compared to female control (E) as shown by MBP immunostaining. Colorimetric quantification of MBP staining in GBS-exposed versus

unexposed animals (G). Oligodendrocyte (arrow heads) loss and misalignment of oligodendrocyte nuclei in GBS-exposed (H) versus unexposed brains (I). Cc-1+ oligodendrocytes count in GBS-exposed versus unexposed brains (J). Number of brains: control (n = 4-7), GBS (n = 5-9). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ by t test with Welch correction. CTL, control; GBS, group B streptococcus; LFB, luxol fast blue; MBP, myelin basic protein; v, ventricle. Scale bar (A-B) = 1 mm; (D-E) = 500 μm ; (H-I) = 30 μm .

Microglial and astroglial density remained identical in GBS compared to control rats at P40 (Fig 4D-E).

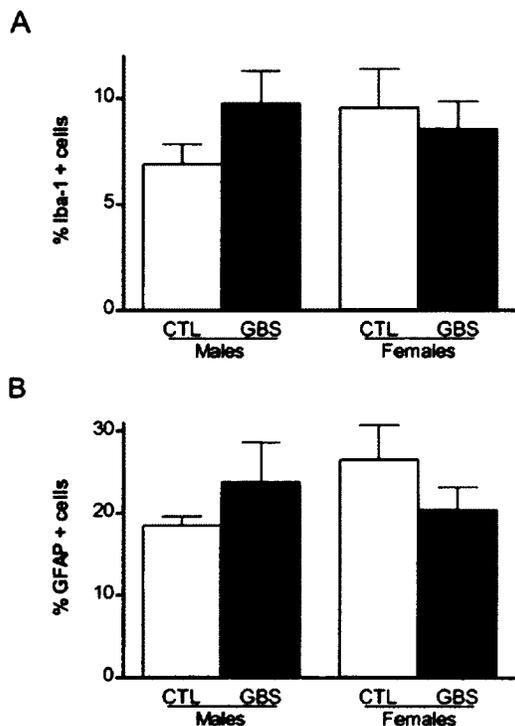


Figure 4. Glial cells in lesioned external capsules at P40: Iba-1+ microglia (A) and GFAP+ astroglial cell counts (B) did not differ between experimental conditions. Number

of brains: control (n = 4-5), GBS (n = 5-10). Statistics analysis by t test with Welch correction. CTL, control; GBS, group B streptococcus; P, postnatal day.

LFB or MBP staining intensities were identical in the corpus callosum and the internal capsule from GBS-exposed compared to control animals. No significant difference was observed in the thickness of the corpus callosum between GBS-exposed versus unexposed males or females. Thickness of sensorimotor neocortex adjacent to lesioned external capsules was similar in GBS-exposed versus unexposed males or females at P40 (data not shown). In addition, histological observation of neocortex and hippocampus (H&E or LFB staining, and microglial and astrocyte IHC) did not reveal any visible damage in these neuronal areas.

Combination of autistic-like traits in male offspring

Total duration (Fig 5A) and number of episodes (Fig 5B) of social interactions at P35 were dramatically decreased between male - but not female - exposed to GBS versus control.

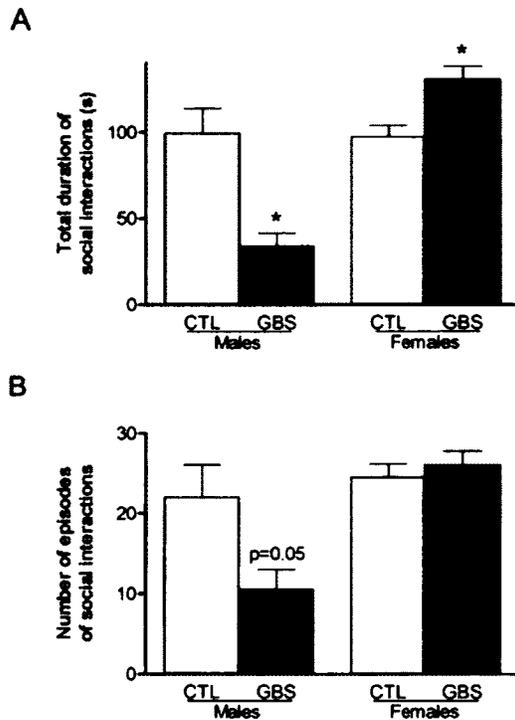


Figure 5. Social interactions at P35: Duration (A) and number of episodes (B) of social interactions were decreased in male GBS compared to male control animals. Number of rats: control (n = 8), GBS (n = 8). * $p < 0.05$ by t test with Welch correction. CTL, control; GBS, group B streptococcus; P, postnatal day; s, second.

At P9, the olfactory discrimination of home bedding odor, and nest-seeking behavior based on olfactory clues, were both impaired in GBS-exposed rats compared to controls, without any significant difference between genders (Fig 6A). Longer time of latency to reach maternal odor was observed in GBS-exposed animals compared to controls (Fig 6B). As physiologically expected, in each sex and experimental group, PPI grew when prepulse intensity increased from 75 dB to 87 dB (Fig. 6C). However, only male pups exposed to GBS showed a significantly reduced mean PPI, at P30-35, compared to controls (Fig 6D).

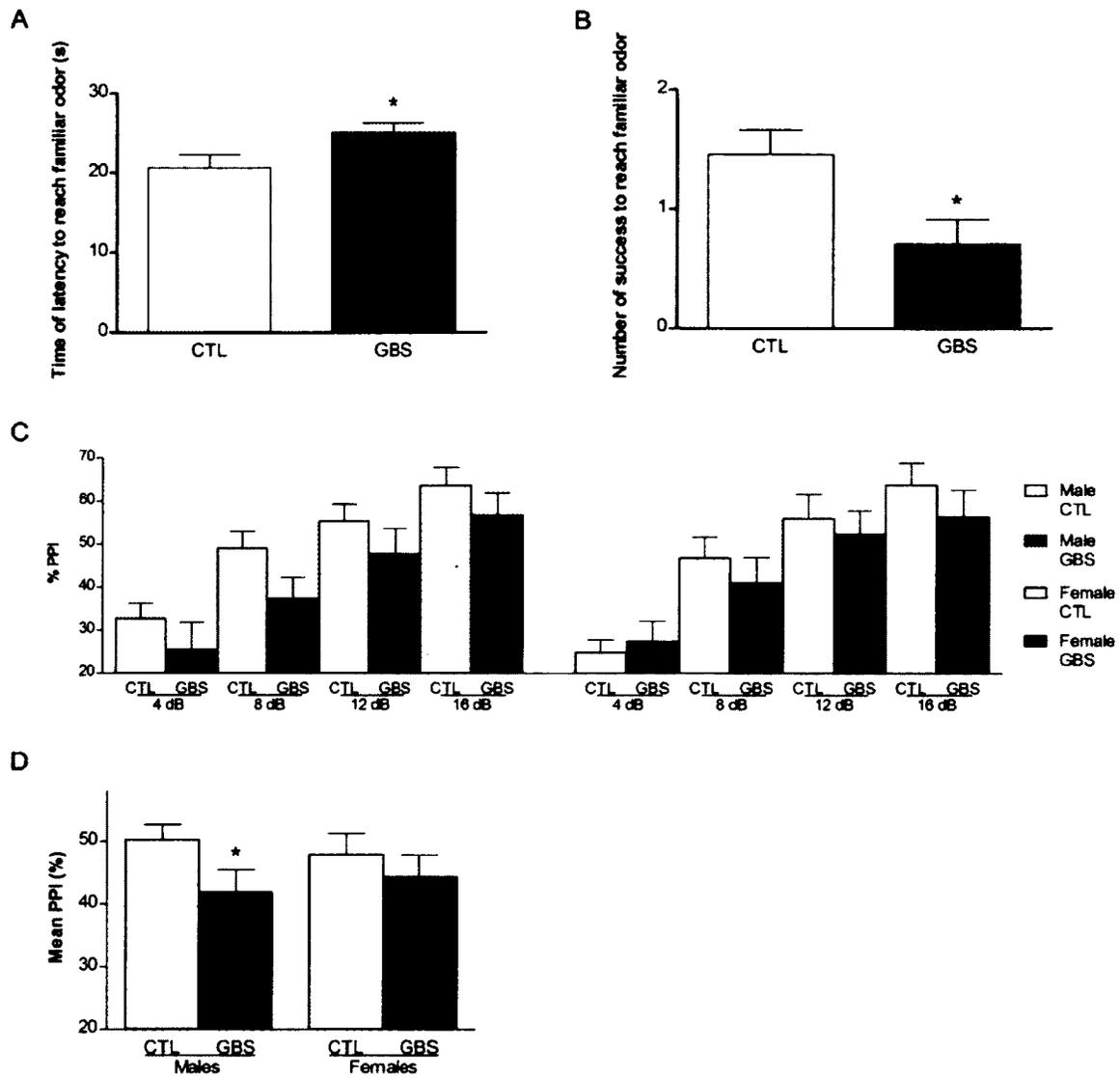


Figure 6. Sensory integration: Decreased ability to recognize maternal odor (A) and increased delay to reach home-bedding compartment (B) in GBS-exposed versus unexposed pups at P9. Number of pups: control (n = 11), GBS (n = 17). Sensorimotor gating assessment by PPI test (C-D). Number of rats: control (n = 9), GBS (n = 13). * $p < 0.05$ by t test with Welch correction (A-B); * $p < 0.05$ by test with Bonferroni multiple comparisons (C-D). CTL, control; GBS, group B streptococcus; dB, decibel; P, postnatal day; PPI, prepulse inhibition; s, second.

Despite the absence of significant difference from clinical observation of walking, grooming, rearing and other basic movements, exploratory behavior was significantly impaired in male – not female - pups exposed to GBS, as shown by the shorter total distance travelled, shorter time of mobility, and the limited coverage of the accessible field (Fig 7A-C). After an initial phase of mobility, GBS-exposed males gradually slowed, ceased exploration, and then remained inert and passive in one corner of the field (Fig 7B). Supporting such exploratory behavior impairment in GBS-exposed males, instead of primary motor dysfunctions, was also the minimal difference observed between males, exposed or unexposed to GBS, in the challenging Rotarod test (Fig 7E).

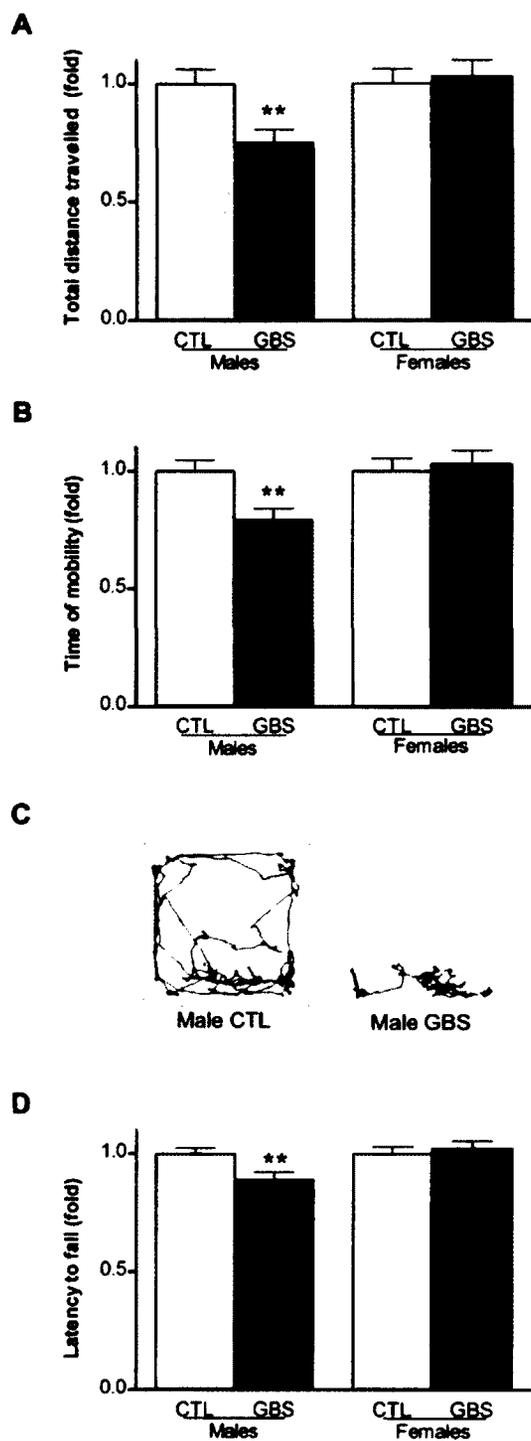


Figure 7. Exploratory behavior and motricity: Quantifications of decreased total distance (A) travelled and decreased time of mobility (B) in males, but not females, in the Open

field test at P15-25. Poor exploratory behavior illustrated by typical trackplots from male exposed to GBS (C) compared to male control (D). Number of pups: control (n = 25-28), GBS (n = 24-28). Slightly decreased latency to fall (E) of animals exposed to GBS compared to controls in Rotarod test at P30-40. Number of rats: control (n = 15-17), GBS (n = 13-17). **p<0.01 by t test with Welch correction. CTL, control; GBS, group B streptococcus; P, postnatal day.

Discussion

GBS-induced maternal inflammation at the end of gestation led aseptically to chorioamnionitis, and also induced a dichotomic gender effect on offsprings' forebrain damage. This damage was characterized by lateral ventricles widening, predominating in male, reduction of periventricular external capsules thickness, oligodendrocyte loss, and disorganization of fronto-parietal sub-cortical connectivity. This inflammatory driven periventricular under-connectivity was also tightly associated with the presence of several autistic-like traits in males but not females.

These preclinical results are the first, to our knowledge, establishing a link between GBS-induced maternal inflammation, subcortical dysconnectivity and male autistic-like behavior in an animal model [24-26]. Limperopoulos et al. had previously found, in a series of 91 preterm human newborns, a much higher proportion of ASD (26%) than in the general population [27]. Among these ASD preterm newborns, 78% were male (versus 54% of males in non-ASD), 76% had a positive history of chorioamnionitis (versus 22% of non-ASD), and 68% had abnormal MRI (versus 19% of non-ASD)

mainly characterized by periventricular WM damage and ventriculomegaly [27]. Other reports of epidemiological studies have found an association between ASD and unspecified bacterial infections, or prolonged fever during the second trimester, or elevated cytokines titers in maternal blood and amniotic fluid [5, 28, 29]. In our model, GBS-exposed males presented a wide set of well-recognized autistic-like traits, *i.e.* present both in affected humans and in established animal models [19, 30]. In addition to social behavior impairments, GBS-exposed males also presented impaired integration and treatment of sensory information as shown by *(i)* defective maternal odour identification, *(ii)* reduced PPI of acoustic startle, and *(iii)* poor exploratory behavior. Importantly, these social and sensory behavioral impairments recapitulate most of those previously described in established rat models of ASD, such as those induced by environmental exposure to valproate at mid-gestation [19], or by genetic defects [31]. This newly established link between GBS-induced maternal immune activation and autistic-like behavior in rodents raises several neuroinflammatory issues of potential importance in humans. *Firstly*, human perinatal inflammatory aggressions might contribute to the biased male:female sex ratio well-documented in ASD (4:1) [32]. However, the molecular mechanisms underlying this gender bias remain to be defined. *Secondly*, our results challenge some classical clinical treatments of gestational GBS infections. Systematic prenatal screening for GBS colonization became routine during the last decade, in most developed countries, has led to more frequent maternal antibiotic administration and this was shown to efficiently prevent postnatal infections [13]. However, such antibiotherapy, especially following sometimes long-lasting and discrete GBS infections, might trigger the sudden and massive release of pathogen components

triggering a surge in circulating inflammatory mediators potentially deleterious to the foetal environment. Such indirect causation of neural damage via infectious stimulation of innate immunity was established previously in GBS as well as in many other infectious contexts such as bacterial meningitis [33, 34]. Further support of this hypothesis in the field of perinataly acquired brain impairments, came from the results of ORACLE II trial comparing the use of antibiotic versus placebo in pregnant women with spontaneous preterm labour. This trial showed that prenatal antibiotic exposure had a negative impact – compared to placebo – on a composite score reflecting neurofunctional impairment at 7 years of age [35]. Therefore, co-administration of antibiotic and targeted anti-inflammatory drugs might be effective in preventing the presumed collateral damage due to inflammation accompanying prenatal infection itself and/or its treatment with antibiotic.

The underlying causes and molecular mechanistic link between gestational inflammation and perinatal brain damage have yet to be completely uncovered. Of note, it was shown that post-natal exposure to a synthetic TLR2 agonist (systemic injection of Pam(3)CSK(4); single dose of 5 mg/kg/d, from P3 to P11), induced a transient short term, but no long term, gray and WM damage [36]. Such differential outcome between pre- and post-natal exposures to TLR2 agonists support a key role of the maternal/placental inflammatory response in the pathophysiological mechanisms leading to durable neuromorbidities following perinatal exposure to GBS. Interestingly, our model of GBS-induced maternal inflammation results in a distinctive set of placental and fetal brain injuries, as well as in specific neurobehavioral impairments, compared to

TLR4/*E. Coli*, and TLR3/viral synthetic double-strand RNA driven maternal inflammation [37]. *Firstly*, TLR2 driven rat chorioamnionitis is characterized by PMN infiltration and necrosis located in the decidual maternal side, in sharp contrast with macrophagic infiltration and cavitory lesions located in the labyrinth (fetal side) following TLR4 activation [7]. GBS-induced brain damage also seemed limited to the periventricular WM underlying mid-frontal and parietal lobes, and was not associated with any micro- or astro-gliosis. In contrast, LPS-induced brain damage extends well beyond external capsule WM, involving the internal capsule and corpus callosum, and presents an important component of WM astroglial and microglial proliferations [7, 38-41]. Poly I:C-induced lesions are another specific pattern of brain damage affecting hippocampal neurons and also involving underlying myelin and oligodendrocytes [42]. Certain autistic-like traits have been reported following TLR3 and 4, as well as in our GBS/TLR2 model of maternal immune activations, however TLR3 activation is considered more relevant to schizophrenia [12], whereas TLR4 activation is more tightly linked to motor impairments [17, 41, 43-45]. A gender effect, as the one reported here following GBS exposure, has only been reported in a limited fraction of the data concerning TLR3 and 4 activations [10, 46, 47]. This is perhaps in part due to the lack of overall attention paid to gender comparisons in most studies [10]. In humans, the male gender has been linked to perinatal neuromorbidities arising likely more from environmental factors, or mixed genetic and environmental factors, rather than from solely genetic determinants, such as in cerebral palsy and perinatal stroke [48]. The male gender bias observed in perinatal neuromorbidities and resulting at least in part from maternal immune activation, especially when triggered by GBS, might derive from: (i)

male-specific placental vulnerability to maternal inflammatory response, secondary alteration of placental exchange, and neurotrophic factor synthesis; (ii) male/female dichotomic placental-fetal inflammatory response, male inflammatory profile being possibly more neurotoxic than females', as recently suggested by the stronger pro-inflammatory cytokine response, such as IL-1 β , found in male versus female human cord blood stimulated *ex-vivo* by LPS [49]; (iii) fetal brain vulnerability being intrinsically higher in males than females to a similar combination of detrimental factors, such as pro-inflammatory response and/or defective placental nutrients.

Altogether, data from animal models showed that the distinct neuropsychiatric outcomes, resulting from maternal immune activation, are rooted in specific TLRs driven materno-fetal responses. Investigation of specific types of pathogens involved in maternal infections, such as in chorioamnionitis, has been either neglected, or limited by microbiological diagnostic challenges. Human epidemiological and pathophysiological studies attempting to link maternal infection and fetal brain damage should henceforth take into account specific pathogen types with much more emphasis [9]. Differences in terms of neurological impacts between specific pathogen types as observed in preclinical animal models might prove critically important and should thus be taken into account in future clinical research, instead of considering chorioamnionitis as a whole indiscriminate of etiology. This kind of approach might contribute to reconciling many of the apparent discrepancies between epidemiological works studying the link between perinatal placental inflammation and neurological outcomes [50]. Such an approach might also shed a new light on the underlying determinants and molecular mechanisms leading to

the heavy burden of neurodevelopmental morbidities resulting from perinatal aggressions.

Some limitations of our study will need to be addressed in further studies. *First*, even if behavioral markers characterizing autistic-traits in animals are well established, their delineation with the clinical expression of other neuropsychiatric diseases affecting social, sensory, and some aspects motor/exploratory behaviors are not perfectly clear-cut. This implies that translation of behavioral anomalies in animals, and their strict assignment, to specific human diseases must be cautious. *Secondly*, the apparent differences between gestational TLR2 activation, through inactivated GBS, and TLR3 and TLR4 activation using LPS and poly I:C, need to be further validated by mechanistic studies. A possible avenue to address such issue would aim to profile the patterns of key inflammatory cytokine released in placenta, fetal blood, and forebrains, and to compare such molecular profiles between end-gestational exposures to different doses of each of these distinct pathogen associated molecular patterns (PAMP).

Acknowledgment: This work was supported by a *Fonds de la Recherche du Québec-Santé* (FRQ-S) scholarship, a grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), and a grant from the Foundation of Stars to GS. GS, LCF and SG are members of the FRSQ-funded *Centre de Recherche Clinique Étienne Le Bel du CHUS*. GS and SG are members of the *Centre de Neurosciences de l'Université de Sherbrooke*. GS is a member of the *Centre de Recherche Mère&Enfant de l'Université de Sherbrooke*

Part of this work was presented as poster presentations at the American Academy of Pediatrics/Society for Pediatric Research meeting (May, 2012, Boston, MA), and at the Child Neurology Society meeting (September 2012, Huntington Beach, CA).

We thank Marie-Elsa Brochu, Marie-Julie Allard, Karine Belleville, Alexandre Parent and Philippe Sarret for their assistance and Monique Sullivan for her help in editing the manuscript.

References

1. Larroque B, Ancel PY, Marret S, Marchand L, Andre M, Arnaud C, Pierrat V, Roze JC, Messer J, Thiriez G, Burguet A, Picaud JC, Breart G and Kaminski M: Neurodevelopmental disabilities and special care of 5-year-old children born before 33 weeks of gestation (the EPIPAGE study): a longitudinal cohort study. *Lancet* 2008; 371:813-820.
2. Pinto-Martin JA, Levy SE, Feldman JF, Lorenz JM, Paneth N and Whitaker AH: Prevalence of autism spectrum disorder in adolescents born weighing <2000 grams. *Pediatrics* 2011; 128:883-891.
3. Stephens BE, Bann CM, Watson VE, Sheinkopf SJ, Peralta-Carcelen M, Bodnar A, Yolton K, Goldstein RF, Dusick AM, Wilson-Costello DE, Acarregui MJ, Pappas A, Adams-Chapman I, McGowan EC, Heyne RJ, Hintz SR, Ehrenkranz RA, Fuller J, Das A, Higgins RD, Vohr BR, Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network: Screening for autism spectrum disorders in extremely preterm infants. *J Dev Behav Pediatr* 2012; 33:535-541.
4. Kuban KC, O'Shea TM, Allred EN, Tager-Flusberg H, Goldstein DJ and Leviton A: Positive screening on the Modified Checklist for Autism in Toddlers (M-CHAT) in extremely low gestational age newborns. *J Pediatr* 2009; 154:535-540 e531.
5. Atladottir HO, Henriksen TB, Schendel DE and Parner ET: Autism after infection, febrile episodes, and antibiotic use during pregnancy: an exploratory study. *Pediatrics* 2012; 130:e1447-1454.
6. Hagberg H, Gressens P and Mallard C: Inflammation during fetal and neonatal life: implications for neurologic and neuropsychiatric disease in children and adults. *Ann Neurol* 2012; 71:444-457.
7. Girard S, Tremblay L, Lepage M and Sebire G: IL-1 receptor antagonist protects against placental and neurodevelopmental defects induced by maternal inflammation. *J Immunol* 2010; 184:3997-4005.
8. Fichorova RN, Onderdonk AB, Yamamoto H, Delaney ML, DuBois AM, Allred E, Leviton A and Extremely Low Gestation Age Newborns Study I: Maternal microbe-specific modulation of inflammatory response in extremely low-gestational-age newborns. *MBio* 2011; 2:e00280-00210.
9. Leviton A, Allred EN, Kuban KC, Hecht JL, Onderdonk AB, O'Shea T M and Paneth N: Microbiologic and histologic characteristics of the extremely preterm infant's placenta predict white matter damage and later cerebral palsy. the ELGAN study. *Pediatr Res* 2010; 67:95-101.
10. Boksa P: Effects of prenatal infection on brain development and behavior: a review of findings from animal models. *Brain Behav Immun* 2010; 24:881-897.
11. Smith SE, Li J, Garbett K, Mirnics K and Patterson PH: Maternal immune activation alters fetal brain development through interleukin-6. *J Neurosci* 2007; 27:10695-10702.
12. Meyer U and Feldon J: To poly(I:C) or not to poly(I:C): advancing preclinical schizophrenia research through the use of prenatal immune activation models. *Neuropharmacology* 2012; 62:1308-1321.

13. Larsen JW and Sever JL: Group B Streptococcus and pregnancy: a review. *Am J Obstet Gynecol* 2008; 198:440-448; discussion 448-450.
14. Wennekamp J and Henneke P: Induction and termination of inflammatory signaling in group B streptococcal sepsis. *Immunol Rev* 2008; 225:114-127.
15. Henneke P, Dramsi S, Mancuso G, Chraibi K, Pellegrini E, Theilacker C, Hubner J, Santos-Sierra S, Teti G, Golenbock DT, Poyart C and Trieu-Cuot P: Lipoproteins are critical TLR2 activating toxins in group B streptococcal sepsis. *J Immunol* 2008; 180:6149-6158.
16. Lancefield RC, McCarty M and Everly WN: Multiple mouse-protective antibodies directed against group B streptococci. Special reference to antibodies effective against protein antigens. *J Exp Med* 1975; 142:165-179.
17. Girard S, Kadhim H, Beaudet N, Sarret P and 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.
18. Brochu ME, Girard S, Lavoie K and Sebire G: Developmental regulation of the neuroinflammatory responses to LPS and/or hypoxia-ischemia between preterm and term neonates: An experimental study. *J Neuroinflammation* 2011; 8:55.
19. Schneider T and Przewlocki R: Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism. *Neuropsychopharmacology* 2005; 30:80-89.
20. Gregory EH and Pfaff DW: Development of olfactory-guided behavior in infant rats. *Physiol Behav* 1971; 6:573-576.
21. Parent AJ, Beaudet N, Beaudry H, Bergeron J, Berube P, Drolet G, Sarret P and Gendron L: Increased anxiety-like behaviors in rats experiencing chronic inflammatory pain. *Behav Brain Res* 2012; 229:160-167.
22. Girard S, Sebire H, Brochu ME, Briota S, Sarret P and Sebire G: Postnatal administration of IL-1Ra exerts neuroprotective effects following perinatal inflammation and/or hypoxic-ischemic injuries. *Brain Behav Immun* 2012; 26:1331-1339.
23. Swerdlow NR, Weber M, Qu Y, Light GA and Braff DL: Realistic expectations of prepulse inhibition in translational models for schizophrenia research. *Psychopharmacology (Berl)* 2008; 199:331-388.
24. McAlonan GM, Cheung V, Cheung C, Suckling J, Lam GY, Tai KS, Yip L, Murphy DG and Chua SE: Mapping the brain in autism. A voxel-based MRI study of volumetric differences and intercorrelations in autism. *Brain* 2005; 128:268-276.
25. Barnea-Goraly N, Lotspeich LJ and Reiss AL: Similar white matter aberrations in children with autism and their unaffected siblings: a diffusion tensor imaging study using tract-based spatial statistics. *Arch Gen Psychiatry* 2010; 67:1052-1060.
26. Wass S: Distortions and disconnections: disrupted brain connectivity in autism. *Brain Cogn* 2011; 75:18-28.
27. Limperopoulos C, Bassan H, Sullivan NR, Soul JS, Robertson RL, Jr., Moore M, Ringer SA, Volpe JJ and du Plessis AJ: Positive screening for autism in ex-preterm infants: prevalence and risk factors. *Pediatrics* 2008; 121:758-765.
28. Atladottir HO, Thorsen P, Ostergaard L, Schendel DE, Lemcke S, Abdallah M and Parner ET: Maternal infection requiring hospitalization during pregnancy and autism spectrum disorders. *J Autism Dev Disord* 2010; 40:1423-1430.

29. Abdallah MW, Hougaard DM, Norgaard-Pedersen B, Grove J, Bonefeld-Jorgensen EC and Mortensen EL: [Infections During Pregnancy and After Birth, and the Risk of Autism Spectrum Disorders: A Register-based Study Utilizing a Danish Historic Birth Cohort]. *Turk Psikiyatri Derg* 2012; 23:229-236.
30. Perry W, Minassian A, Lopez B, Maron L and Lincoln A: Sensorimotor gating deficits in adults with autism. *Biol Psychiatry* 2007; 61:482-486.
31. Umeda T, Takashima N, Nakagawa R, Maekawa M, Ikegami S, Yoshikawa T, Kobayashi K, Okanoya K, Inokuchi K and Osumi N: Evaluation of Pax6 mutant rat as a model for autism. *PLoS One* 2010; 5:e15500.
32. Devlin B and Scherer SW: Genetic architecture in autism spectrum disorder. *Curr Opin Genet Dev* 2012; 22:229-237.
33. Kak V, Sundareshan V, Modi J and Khardori NM: Immunotherapies in infectious diseases. *Med Clin North Am* 2012; 96:455-474, ix.
34. Waldorf KM, Gravett MG, McAdams RM, Paoletta LJ, Gough GM, Carl DJ, Bansal A, Liggitt HD, Kapur RP, Reitz FB and Rubens CE: Choriodecidual group B streptococcal inoculation induces fetal lung injury without intra-amniotic infection and preterm labor in *Macaca nemestrina*. *PLoS One* 2011; 6:e28972.
35. Kenyon S, Pike K, Jones DR, Brocklehurst P, Marlow N, Salt A and Taylor DJ: Childhood outcomes after prescription of antibiotics to pregnant women with spontaneous preterm labour: 7-year follow-up of the ORACLE II trial. *Lancet* 2008; 372:1319-1327.
36. Du X, Fleiss B, Li H, D'Angelo B, Sun Y, Zhu C, Hagberg H, Levy O, Mallard C and Wang X: Systemic stimulation of TLR2 impairs neonatal mouse brain development. *PLoS One* 2011; 6:e19583.
37. Fortier ME, Luheshi GN and Boksa P: Effects of prenatal infection on prepulse inhibition in the rat depend on the nature of the infectious agent and the stage of pregnancy. *Behav Brain Res* 2007; 181:270-277.
38. Rousset CI, Chalon S, Cantagrel S, Bodard S, Andres C, Gressens P and Saliba E: Maternal exposure to LPS induces hypomyelination in the internal capsule and programmed cell death in the deep gray matter in newborn rats. *Pediatr Res* 2006; 59:428-433.
39. Bell MJ and Hallenbeck JM: Effects of intrauterine inflammation on developing rat brain. *J Neurosci Res* 2002; 70:570-579.
40. Pang Y, Cai Z and Rhodes PG: Effects of lipopolysaccharide on oligodendrocyte progenitor cells are mediated by astrocytes and microglia. *J Neurosci Res* 2000; 62:510-520.
41. Kannan S, Dai H, Navath RS, Balakrishnan B, Jyoti A, Janisse J, Romero R and Kannan RM: Dendrimer-based postnatal therapy for neuroinflammation and cerebral palsy in a rabbit model. *Sci Transl Med* 2012; 4:130ra146.
42. Makinodan M, Tatsumi K, Manabe T, Yamauchi T, Makinodan E, Matsuyoshi H, Shimoda S, Noriyama Y, Kishimoto T and Wanaka A: Maternal immune activation in mice delays myelination and axonal development in the hippocampus of the offspring. *J Neurosci Res* 2008; 86:2190-2200.
43. Kannan S, Saadani-Makki F, Balakrishnan B, Chakraborty P, Janisse J, Lu X, Muzik O, Romero R and Chugani DC: Magnitude of [(11)C]PK11195 binding is related to severity of motor deficits in a rabbit model of cerebral palsy induced by intrauterine endotoxin exposure. *Dev Neurosci* 2011; 33:231-240.

44. Saadani-Makki F, Kannan S, Lu X, Janisse J, Dawe E, Edwin S, Romero R and Chugani D: Intrauterine administration of endotoxin leads to motor deficits in a rabbit model: a link between prenatal infection and cerebral palsy. *Am J Obstet Gynecol* 2008; 199:651 e651-657.
45. Granholm AC, Zaman V, Godbee J, Smith M, Ramadan R, Umphlet C, Randall P, Bhat NR, Rohrer B, Middaugh LD and Boger HA: Prenatal LPS increases inflammation in the substantia nigra of Gdnf heterozygous mice. *Brain Pathol* 2011; 21:330-348.
46. Baharnoori M, Bhardwaj SK and Srivastava LK: Neonatal behavioral changes in rats with gestational exposure to lipopolysaccharide: a prenatal infection model for developmental neuropsychiatric disorders. *Schizophr Bull* 2012; 38:444-456.
47. Malkova NV, Yu CZ, Hsiao EY, Moore MJ and Patterson PH: Maternal immune activation yields offspring displaying mouse versions of the three core symptoms of autism. *Brain Behav Immun* 2012; 26:607-616.
48. Chabrier S, Saliba E, Nguyen The Tich S, Charollais A, Varlet MN, Tardy B, Presles E, Renaud C, Allard D, Husson B and Landrieu P: Obstetrical and neonatal characteristics vary with birthweight in a cohort of 100 term newborns with symptomatic arterial ischemic stroke. *Eur J Paediatr Neurol* 2010; 14:206-213.
49. Kim-Fine S, Regnault TR, Lee JS, Gimbel SA, Greenspoon JA, Fairbairn J, Summers K and de Vrijer B: Male gender promotes an increased inflammatory response to lipopolysaccharide in umbilical vein blood. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2012; 25:2470-2474.
50. Nelson KB and Willoughby RE: Infection, inflammation and the risk of cerebral palsy. *Curr Opin Neurol* 2000; 13:133-139

Chapitre 4. Discussion

La réaction inflammatoire induite en fin de gestation par le SGB mène à une chorioamnionite aseptique et induit des dommages au cerveau de la progéniture différenciés selon le genre. Ces dommages au cerveau sont caractérisés par un élargissement des ventricules cérébraux latéraux chez le mâle ainsi qu'un amincissement de la capsule externe périventriculaire. Cette même région montre des anomalies de la substance blanche (dysconnectivité dans la myéline) ainsi qu'une perte d'oligodendrocytes. Cette dysconnectivité sous-corticale prédominante chez le mâle est associée étroitement à la présence de plusieurs traits autistiques qui sont absents chez les femelles.

4.1. Pertinence des résultats

Ces résultats sont les premiers, à notre connaissance, à établir un lien entre l'inflammation gestationnelle induite par le SGB, la dysconnectivité sous-corticale ainsi que les traits autistiques prédominants chez le mâle dans un modèle animal de recherche préclinique. L'équipe de Limperopoulos *et al.* a montré, dans une cohorte de 91 nouveau-nés humains prématurés, une plus grande proportion d'enfants présentant des TSA (26%) que dans la population générale (Limperopoulos *et al.*, 2008). Parmi ces enfants nés prématurés et présentant des TSA, 78% d'entre eux étaient des garçons (versus 54% chez les enfants non-TSA). 68% des enfants qui ont obtenu des résultats anormaux en imagerie par résonance magnétique, caractérisés principalement par un élargissement des ventricules ainsi que des dommages à la substance blanche (Limperopoulos *et al.*, 2008), avaient des traits autistiques. Aussi, une chorioamnionite avait été diagnostiquée chez 76% des enfants présentant des TSA (versus 22% chez les enfants non-TSA). D'autres études épidémiologiques ont aussi montré une association entre les TSA et des facteurs inflammatoires, soient des infections bactériennes non-spécifiées, de la fièvre prolongée durant le deuxième trimestre de grossesse, ou des cytokines élevées dans le sang maternel ou le liquide amniotique (Atladdottir *et al.*, 2010; Abdallah *et al.*, 2012; Atladdottir *et al.*, 2012). Les causes et les mécanismes moléculaires sous-jacents au lien entre l'inflammation

gestationnelle et les dommages cérébraux périnataux menant au TSA ne sont pas encore complètement élucidés.

4.2. Unicité des lésions obtenues dans le modèle animal

Un point intéressant de notre modèle est qu'il produit un patron de lésions bien particulier tant au niveau placentaire, cérébral que neuro-développemental comparativement aux autres modèles d'inflammation maternelle utilisant par exemple une stimulation TLR-4 (*E. coli*) ou TLR-3 (ARN viral synthétique double-brin) (Fortier *et al.*, 2007). Premièrement, la chorioamnionite observée chez le rat suite à une exposition au SGB est caractérisée par une infiltration de PMN ainsi qu'une nécrose cavitaire située dans le compartiment maternel de la décidua placentaire. Ceci contraste avec la chorioamnionite induite par le LPS dont les stigmates histologiques étaient plutôt une infiltration de macrophages ainsi que des lésions cavitaires situées dans le compartiment foetal du placenta (Girard *et al.*, 2010). Les dommages cérébraux induits par le SGB semblent n'être présents qu'au niveau de la substance blanche périventriculaire; ils ne sont pas associés avec une astro- ou une micro-gliose. Quant au modèle d'exposition gestationnelle au LPS, les dommages cérébraux sont beaucoup plus étendus puisqu'ils s'étendent au-delà de la capsule externe, à la capsule interne et aussi au corps calleux. Il y avait aussi présence d'astro-gliose et de micro-gliose dans la substance blanche (Pang *et al.*, 2000; Bell et Hallenbeck, 2002; Girard *et al.*, 2010; Kannan *et al.*, 2012). Les lésions induites suite à l'administration maternelle d'acide polyinosinique-polycytidylique (Poly I:C) (stimulant TLR-3) sont situées au niveau des neurones de l'hippocampe et affectent également la myéline et les oligodendrocytes sous-jacents (Makinodan *et al.*, 2008). Bien que certains traits associés à l'autisme aient été observés dans les modèles d'activation TLR-4 ou TLR-3, l'activation de TLR-3 est associée majoritairement à la schizophrénie (Meyer et Feldon, 2012) alors que l'activation TLR-4 est associée étroitement avec le développement de troubles moteurs (Saadani-Makki *et al.*, 2008; Girard *et al.*, 2009; Granholm *et al.*, 2011; Kannan *et al.*, 2011; Kannan *et al.*, 2012). De plus, les effets de genre tels que ceux observés dans notre modèle d'exposition gestationnelle au SGB n'ont été signalés qu'à quelques reprises dans les autres modèles

stimulant TLR-3 ou TLR-4 (Boksa, 2010; Baharnoori *et al.*, 2012; Malkova *et al.*, 2012). Peut-être que cela est dû au manque d'attention aux différences de genre dans la plupart des études faites sur ce type de modèles animaux (Boksa, 2010).

4.3. SGB et potentiel inflammatoire

Jusqu'à maintenant, la réaction inflammatoire sous-jacente à l'exposition maternelle au SGB dans ce modèle animal n'a pas été étudiée. Généralement, les bactéries à gram positif sont reconnues par les TLR-2 (Takeuchi *et al.*, 1999). Cependant, dans le cas précis du SGB, les déterminants inflammatoires de cette bactérie ne sont pas encore élucidés complètement. Selon nos connaissances et nos recherches dans la littérature, il existe peu de documentation sur les déterminants inflammatoires du SGB. Des études ont montré qu'il y avait une activation de TLR-2 lorsque la bactérie vivante est mise en contact avec des macrophages, cependant, une toxine relâchée par la bactérie dans le milieu environnant pourrait aussi être responsable de l'activation TLR-2, plus que la bactérie directement (Henneke *et al.*, 2001). Lorsque la bactérie est inactivée et que seules les parois sont utilisées, il y a aussi production de cytokines pro-inflammatoires en présence de macrophages. Par contre, le ou les TLRs impliqués ne sont pas encore élucidés (Henneke *et al.*, 2001; Henneke *et al.*, 2002). Dans notre modèle, l'avantage de travailler avec la bactérie inactivée par le formaldéhyde comparativement à une inactivation à la chaleur est que l'on conserve la paroi bactérienne intacte. La chaleur peut dénaturer certaines protéines et donc mener à la perte de certains antigènes. Comme la méthode au formaldéhyde fixe les protéines de manières irréversibles, les antigènes devraient être conservés intacts. Selon une étude de spectroscopie Raman, bien que le formaldéhyde puisse modifier chimiquement les peptides, les spectres obtenus suite à la fixation au formaldéhyde sont similaires à ceux obtenus avec la bactérie vivante autant au niveau de la forme du spectre, que de sa position et de son intensité relative. Dans le cas d'une inactivation à la chaleur, les spectres obtenus post-inactivation sont détériorés comparativement à ceux obtenus avec la bactérie vivante et certains signaux plus faibles des spectres Raman sont complètement perdus. Il y a aussi une nette augmentation du bruit de fond. Cette expérience montre donc que l'inactivation

au formaldéhyde conserverait mieux la structure cristalline des protéines de surface que l'inactivation à la chaleur vu la similarité des spectres (Kniggendorf *et al.*, 2011). Cette méthode est d'ailleurs utilisée fréquemment dans la préparation de pathogènes inactivés pour les vaccins (Nims et Plavsic, 2013) et en microbiologie pour l'étude de structure de la paroi bactérienne.

4.4. Différences de genre : hypothèses de causes potentielles?

Chez l'humain, le genre masculin a été associé à certaines morbidités neurologiques d'origine périnatale dont la cause est associée à des facteurs environnementaux, ou génétiques, ou surtout les deux combinés. Ce type de mécanisme complexe, à double détente, est par exemple souvent responsable de la paralysie cérébrale ou de l'accident vasculaire cérébral du nouveau-né, via la combinaison de facteurs infectieux-inflammatoires prénatals et l'hypoxie-ischémie post-natale (Chabrier *et al.*, 2010). Selon nos hypothèses, la susceptibilité particulière des mâles à être affligés de troubles neuro-développementaux pourrait résulter d'un part de la réaction inflammatoire maternelle mais aussi :

- (i) d'une vulnérabilité particulière des placentas des fœtus mâles à l'inflammation maternelle, ce qui influencerait les échanges placentaires et la synthèse de facteurs trophiques agissant par exemple sur la différenciation des oligodendrocytes (tel que IGF-1);
- (ii) à une dichotomie de la réponse inflammatoire placentaire/fœtale entre les mâles et les femelles, possiblement influencée par un environnement hormonal distinct, qui se développe précocement, dès la période pré-natale, afin d'assurer la différenciation des organes génitaux. Ainsi, les mâles ont possiblement une réponse inflammatoire plus neurotoxiques que les femelles tel que suggéré par la forte présence d'IL-1 β trouvée dans le sang de cordons ombilicaux mâles par rapport à ceux femelles lors d'une stimulation ex-vivo de placentas humains intacts par le LPS (Kim-Fine *et al.*, 2012);

- (iii) à une vulnérabilité cérébrale fœtale plus grande chez les mâles que les femelles suite à une combinaison d'agressions comme la réponse pro-inflammatoire et/ou un manque de nutriments placentaires.

4.5. Traits autistiques et modélisation animale

Dans notre modèle, les mâles exposés au SGB présentent plusieurs traits associés à l'autisme, c'est-à-dire des traits caractéristiques de l'autisme chez l'humain mais aussi dans les modèles animaux d'autisme reconnus (Schneider et Przewlocki, 2005; Perry *et al.*, 2007). En plus de leur déficit d'interactions sociales, les mâles exposés au SGB présentent des défauts d'intégration sensorielle se traduisant par un déficit de reconnaissance de l'odeur maternelle en bas âge, et une réduction d'inhibition du réflexe de sursaut au test du PPI, réalisés pendant la période juvénile. Enfin, les animaux exposés au SGB présentent un appauvrissement du comportement exploratoire. Ces déficits récapitulent ceux retrouvés dans des modèles animaux classiques d'autisme, soit par exposition au valproate à la migration (Schneider et Przewlocki, 2005) ou encore des modèles porteurs de défauts génétiques inducteurs de TSA chez l'homme (Umeda *et al.*, 2010). Bien entendu, décrire des traits autistiques chez le rongeur représente tout un défi. D'une part, les comportements étudiés en soi peuvent relever d'autres pathologies, ou être fortement associés à d'autres pathologies, par exemple la schizophrénie. Ils peuvent aussi relever de symptômes associés aux TSA, mais non spécifiques, comme les troubles cognitifs affectant l'apprentissage, ou l'anxiété. D'ailleurs, le résultat du test d'interactions sociales chez les femelles SGB a montré une augmentation significative du temps total d'interactions sociales par rapport aux femelles contrôles. Bien qu'inattendu, nous croyons que ce résultat reflète peut-être un trouble neuro-développemental différent de celui des mâles, par exemple le syndrome frontal qui se caractérise par une hyperactivité, des comportements très familiers et une perte d'inhibition. Cette hypothèse serait plausible puisque les dommages cérébraux des femelles ne sont pas exactement les mêmes que ceux retrouvés chez les mâles. Il serait intéressant d'approfondir la caractérisation comportementale de notre modèle en utilisant un test d'anxiété, par exemple l'« *elevated-plus maze* » afin de comparer le niveau basal d'anxiété des animaux exposés au SGB par rapport aux animaux contrôles. L'anxiété peut

être un trait présent chez les patients atteints de TSA. De plus, l'enregistrement des vocalisations ultrasoniques pourrait nous fournir plusieurs informations sur la capacité des animaux exposés au SGB à communiquer. Ce test pourrait être fait en très bas âge (P7) dans un contexte de séparation maternelle afin de documenter la relation d'attachement maternel, altérée chez les autistes, ou encore à un âge plus tardif lors d'un épisode d'interactions sociales. Quant à la différenciation entre les comportements associés à la schizophrénie et ceux relevant de TSA, l'administration aux animaux d'anti-psychotiques permettrait d'écarter la possibilité de troubles associés à la schizophrénie. Cependant, un point fort de nos résultats obtenus jusqu'à présent qui est en faveur des TSA est que les déficits sont observés dans la période juvénile des animaux ou avant, alors que la schizophrénie se déclenche habituellement vers le début de l'âge adulte.

4.6. Modèle animal d'exposition au SGB et pratiques médicales

Ce nouveau lien établi entre l'inflammation gestationnelle induite par le SGB et l'autisme soulève d'importants questionnements sur le potentiel dommageable de la réaction inflammatoire durant la grossesse chez l'homme. Premièrement, il est possible que les agressions inflammatoires périnatales puissent être une des raisons expliquant le débalancement du sexe ratio dans plusieurs pathologies, par exemple le *sex ratio* garçons : filles de 4 :1 dans les TSA (Devlin et Scherer, 2012). Cependant, les mécanismes inflammatoires sous-jacents à l'exposition maternelle au SGB ne sont pas définis, tout comme les mécanismes sous-jacents aux différences de genre. Ceci fera l'objet de mon projet de recherche doctoral qui s'amorcera par l'étude de l'expression comparative des ARNm entre placenta et cerveaux exposés ou non au SGB (collaboration avec Génôme Québec); afin de fournir les résultats préliminaires soutenant la formulation de mes hypothèses mécanistiques. Deuxièmement, ces résultats amènent à se questionner sur les traitements présentement utilisés en clinique chez les femmes enceintes colonisées par le SGB. Au cours de la dernière décennie, le dépistage de la colonisation par le SGB en fin de gestation a été effectué de routine dans la plupart des pays développés. Ce dépistage est suivi par l'administration d'antibiotiques chez la mère pendant le travail, qui s'est avérée

efficace afin de prévenir l'infection du nouveau-né. Par contre, l'utilisation d'antibiotiques, parfois suivant une colonisation au SGB de longue date et discrète, peut entraîner la relâche massive de composants bactériens qui induiront une réaction inflammatoire systémique susceptible d'être délétère pour l'environnement fœtal. Des stimulations indirectes du système inflammatoire comme celle-ci ont déjà été rapportée dans d'autres situations, par exemple dans la méningite bactérienne (Waldorf *et al.*, 2011; Kak *et al.*, 2012). D'autres résultats qui soutiennent cette hypothèse sont ceux du groupe de recherche de Kenyon dans l'étude ORACLE II. Les auteurs ont comparé l'utilisation d'antibiotiques versus placebo chez les femmes enceintes, présentant un travail pré-terme spontané. Cette étude a montré que l'exposition prénatale aux antibiotiques accroît les déficits neurologiques de la progéniture, mesuré par un score composite intégrant déficits moteur, sensoriel, et comportementaux chez les enfants à l'âge de 7 ans (Kenyon *et al.*, 2008). L'administration concomitante d'antibiotique et de thérapie anti-inflammatoire ciblée, au lieu d'antibiotique seul, pourrait potentiellement être efficace afin de réduire les dommages collatéraux dus à l'infection prénatale elle-même et/ou à son traitement antibiotique.

4.7. Limitations du modèle animal

Ce modèle, comme tout autre modèle animal comporte certaines limitations. Premièrement, de choisir un agoniste TLR2 plutôt qu'un agoniste TLR3 ou TLR4 n'est pas classique dans un modèle d'inflammation gestationnelle et encore moins l'utilisation d'un pathogène entier inactivé. Selon notre méthode de préparation du SGB inactivé, nous nous basons sur un décompte de colonies par étalement, donc un décompte des bactéries capable de se diviser, afin de fixer la quantité de bactéries utilisées. Cependant, le nombre de colonies poussant sur la gélose ne reflète pas assurément la quantité de bactéries présentes dans la solution et ainsi, la quantité de matériel susceptible de générer une réaction inflammatoire peut être sous-estimée. Aussi, une seule dose de SGB a été testée. On pourrait alors penser que les dommages induits au placenta, au cerveau de la progéniture ainsi que les déficits comportementaux diffèrent des dommages induits par des agonistes TLR3 ou TLR4 à cause de l'intensité de la réaction inflammatoire induite. Cependant, cette hypothèse est peu

plausible puisque la nature elle-même des dommages est complètement différente, par exemple au niveau des dommages placentaires entre une stimulation TLR2 vs TLR4. Cela nous laisse présumer que des voies inflammatoires différentes seraient impliquées dans notre modèle actuel.

Une autre limitation de notre étude est le volet de caractérisation inflammatoire. Les dommages placentaires, cérébraux et comportementaux sont des aspects supportant la théorie qu'une exposition à l'inflammation gestationnelle peut entraîner des dommages neuro-développementaux, par contre, cette réaction inflammatoire n'a pas été étudiée à ce stade du projet. Des expériences sont actuellement en cours afin de caractériser la réaction inflammatoire présente dans les placentas et les cerveaux fœtaux exposés au SGB à court terme suivant l'exposition. Nous prévoyons faire la caractérisation de la cinétique inflammatoire pour les rates gestantes exposés au SGB (sang et placentas) ainsi que pour les fœtus (sang et cerveau). Ainsi, nous devrions être en mesure d'apporter des précisions mécanistique sur l'unicité de la réponse inflammatoire induite par le SGB comparativement par exemple à celle induite par le LPS dans des conditions similaires. Cela permettrait d'expliquer la nature différente des dommages ainsi que des troubles neuro-développementaux observés. Finalement, l'étude de cette cinétique inflammatoire apportera peut-être des éclaircissements sur la raison du nombre de rats par portée diminué chez les rates exposées au SGB comparativement aux rates contrôles. Certes, il y a décès de certains rats, cependant, selon nos observations à ce jour, nous ne pouvons conclure à savoir si cette mort a lieu *in-utero* ou en périnatal.

Chapitre 5. Conclusion

Lorsque l'on considère l'ensemble des données, autant les nôtres que celles d'autres groupes de recherche, il semble que les désordres neuropsychiatriques distincts, induits suite à l'inflammation maternelle, prennent leurs racines dans la réponse immunitaire materno-fœtale spécifique aux différents TLRs. Plus souvent qu'autrement, la distinction entre les différents types de pathogènes impliqués dans les infections, notamment les chorioamnionites, est négligée ou limitée par les techniques microbiologiques de diagnostic accessibles et fonctionnelles dans un contexte hospitalier. Les études épidémiologiques ainsi que pathophysiologiques devraient accorder plus d'importance à cette différence de pathogène (Leviton *et al.*, 2010). Les différences en terme de désordres neurologiques spécifiques à des types de pathogènes devraient être considérés comme un argument de plus pour inciter les futures recherches cliniques à prendre en compte cette différence, spécialement dans les chorioamnionites où aucun diagnostic sur le type de pathogène n'est posé en clinique, ou seulement dans de très rares cas. Une approche différenciée des agents infectieux opérant durant la gestation, prenant en compte le type de bactéries impliquées, permettrait possiblement de réconcilier les données, parfois très différentes, d'une étude épidémiologique à l'autre lorsque l'on s'intéresse au lien entre l'inflammation gestationnelle et à ses conséquences neurologiques sur la progéniture. Une telle approche permettrait peut-être de mieux comprendre les déterminants inflammatoires ainsi que les mécanismes inflammatoires menant à ce lourd fardeau de morbidités neurologiques résultant d'agressions périnatales.

Chapitre 6. Remerciements

Durant ces années de maîtrise, plusieurs personnes ont croisé mon chemin et l'ont marqué chacune à leur manière.

D'abord, j'aimerais remercier Dr Guillaume Sébire, mon directeur de recherche. Merci de m'avoir fait confiance dès le départ et de m'avoir laissé entre les mains un fabuleux projet de maîtrise, plein de surprises et de questionnements! J'en ai fait mon petit bébé que je chéris. Merci de m'avoir permis de m'épanouir en recherche, de m'impliquer dans mon projet et de prendre des décisions...qui m'intimidaient au départ! J'ai énormément appris au cours de ces trois années et je compte en apprendre encore beaucoup au cours de mon doctorat! Merci pour votre compréhension et votre humanisme, je ne pouvais demander mieux. Merci!

Merci à toute l'équipe du laboratoire, Marie-Elsa plus particulièrement, avec qui j'ai eu l'occasion de travailler, mais aussi de discuter de tout et de rien. Merci pour tes encouragements dans les moments plus difficiles et de ta bonne humeur! Bonne chance dans tous tes projets futurs personnels et professionnels!

Merci au Pr Louis-Charles Fortier pour l'autorisation d'effectuer toutes les manipulations liées au streptocoque de groupe B dans son laboratoire. Merci aussi pour tes judicieux conseils et ton enthousiasme!

Merci aux membres de mon jury d'évaluation de mémoire, Dr Guillaume Sébire, Pr Louis Gendron et Dr Marek Rola-Pleszczynski.

Merci à tous les organismes subventionnaires, notamment le FRQS, IRSC et la Fondation des Étoiles, qui ont permis la réalisation de ces travaux.

Il y a des gens sans qui je ne serais où je suis maintenant que je voudrais remercier. Pierre Chailier, le magicien de mon baccalauréat. Un merci tout spécial pour ton écoute attentive, tes bons conseils et ton support pendant toutes mes études universitaires. Il y a un coin de mon diplôme qui t'appartient! Éric Massé, merci pour la merveilleuse expérience de stage que j'ai eu l'occasion de vivre dans ton labo. Je crois que ça été le déclic pour moi. Le déclic que j'aimais la recherche, et que peu importe les prouesses académiques que je devrai faire pour continuer aux cycles supérieurs : j'y arriverai! Et en voilà la preuve. Merci pour ton approche qui m'a permis de me questionner et de toujours vouloir en apprendre plus, merci pour ton écoute et ton appui. C'est toujours un plaisir de discuter avec toi! Merci à Martin Bisailon, pour les discussions de coin de table sur mes angoisses et ma

peur de ne pas réussir aux études supérieures. Tu as su me rassurer et faire la différence dans mon cheminement! Un merci particulier à Louis Gendron. Merci pour m'avoir donné ma première chance. Peu de mots, mais d'excellents conseils qui m'accompagneront pour longtemps. Un merci du fond du cœur!

Merci à mes amis, plus particulièrement à Stéphanie et Hubert. Stéphanie, on vivait la même chose en même temps (sur pas mal tous les plans de notre vie finalement!), merci pour ton support et tes encouragements! Hubert, ti-gars, je me souviendrai de toi longtemps! Tu as marqué mon passage dans le labo Massé et je suis contente de t'avoir croisé sur mon chemin. Tes imitations me manquent déjà, comme mes desserts te manquent sûrement!

Un dernier merci va à ma famille, spécialement à mon chum Mathieu. Chéri, je t'aime et merci d'avoir enduré mon rythme de vie à la maîtrise et mon caractère pas toujours facile. Merci de m'épauler dans les moments les plus difficiles et merci surtout de partager ma vie et d'être le papa exceptionnel que tu es. Merci Xavier, mon petit homme, pour me donner un sourire par matin et d'enseigner mes journées avec tes éclats de rire. Je t'aime fort mon petit cou! Bébé bedon, qui arrivera en même temps que la fin de cette belle aventure, je ne te connais pas encore, mais je t'aime déjà tant.

Sincèrement, merci à tous! Xx

Chapitre 7. Références

Abdallah, M. W., D. M. Hougaard, B. Norgaard-Pedersen, J. Grove, E. C. Bonefeld-Jorgensen and E. L. Mortensen (2012). "[Infections During Pregnancy and After Birth, and the Risk of Autism Spectrum Disorders: A Register-based Study Utilizing a Danish Historic Birth Cohort]." *Turk Psikiyatri Derg* **23**(4): 229-236.

Aderem, A. and R. J. Ulevitch (2000). "Toll-like receptors in the induction of the innate immune response." *Nature* **406**(6797): 782-787.

Ashdown, H., Y. Dumont, M. Ng, S. Poole, P. Boksa and G. N. Luheshi (2006). "The role of cytokines in mediating effects of prenatal infection on the fetus: implications for schizophrenia." *Mol Psychiatry* **11**(1): 47-55.

Atladdottir, H. O., T. B. Henriksen, D. E. Schendel and E. T. Parner (2012). "Autism after infection, febrile episodes, and antibiotic use during pregnancy: an exploratory study." *Pediatrics* **130**(6): e1447-1454.

Atladdottir, H. O., P. Thorsen, L. Ostergaard, D. E. Schendel, S. Lemcke, M. Abdallah and E. T. Parner (2010). "Maternal infection requiring hospitalization during pregnancy and autism spectrum disorders." *J Autism Dev Disord* **40**(12): 1423-1430.

Baharnoori, M., S. K. Bhardwaj and L. K. Srivastava (2012). "Neonatal behavioral changes in rats with gestational exposure to lipopolysaccharide: a prenatal infection model for developmental neuropsychiatric disorders." *Schizophr Bull* **38**(3): 444-456.

Bell, M. J. and J. M. Hallenbeck (2002). "Effects of intrauterine inflammation on developing rat brain." *J Neurosci Res* **70**(4): 570-579.

Boksa, P. (2010). "Effects of prenatal infection on brain development and behavior: a review of findings from animal models." *Brain Behav Immun* **24**(6): 881-897.

Borrell, J., J. M. Vela, A. Arevalo-Martin, E. Molina-Holgado and C. Guaza (2002). "Prenatal immune challenge disrupts sensorimotor gating in adult rats. Implications for the etiopathogenesis of schizophrenia." *Neuropsychopharmacology* **26**(2): 204-215.

Cai, Z., Y. Pang, S. Lin and P. G. Rhodes (2003). "Differential roles of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta in lipopolysaccharide-induced brain injury in the neonatal rat." *Brain Res* **975**(1-2): 37-47.

Chabrier, S., E. Saliba, S. Nguyen The Tich, A. Charollais, M. N. Varlet, B. Tardy, E. Presles, C. Renaud, D. Allard, B. Husson and P. Landrieu (2010). "Obstetrical and neonatal characteristics vary with birthweight in a cohort of 100 term newborns with symptomatic arterial ischemic stroke." *Eur J Paediatr Neurol* **14**(3): 206-213.

Dahlgren, J., A. M. Samuelsson, T. Jansson and A. Holmang (2006). "Interleukin-6 in the maternal circulation reaches the rat fetus in mid-gestation." *Pediatr Res* **60**(2): 147-151.

- Dammann, O., K. C. Kuban and A. Leviton (2002). "Perinatal infection, fetal inflammatory response, white matter damage, and cognitive limitations in children born preterm." *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* **8**(1): 46-50.
- Deng, W., J. Pleasure and D. Pleasure (2008). "Progress in periventricular leukomalacia." *Arch Neurol* **65**(10): 1291-1295.
- Desa, D. J. and C. L. Trevenen (1984). "Intrauterine infections with group B beta-haemolytic streptococci." *Br J Obstet Gynaecol* **91**(3): 237-239.
- Devesa, J., N. Casteleiro, C. Rodicio, N. Lopez and P. Reimunde (2010). "Growth hormone deficiency and cerebral palsy." *Ther Clin Risk Manag* **6**: 413-418.
- Devlin, B. and S. W. Scherer (2012). "Genetic architecture in autism spectrum disorder." *Curr Opin Genet Dev* **22**(3): 229-237.
- Duncan, J. R., M. L. Cock, J. P. Scheerlinck, K. T. Westcott, C. McLean, R. Harding and S. M. Rees (2002). "White matter injury after repeated endotoxin exposure in the preterm ovine fetus." *Pediatr Res* **52**(6): 941-949.
- Edwards, A. D. and S. Tan (2006). "Perinatal infections, prematurity and brain injury." *Curr Opin Pediatr* **18**(2): 119-124.
- Folkerth, R. D. (2006). "Periventricular leukomalacia: overview and recent findings." *Pediatr Dev Pathol* **9**(1): 3-13.
- Fortier, M. E., G. N. Luheshi and P. Boksa (2007). "Effects of prenatal infection on prepulse inhibition in the rat depend on the nature of the infectious agent and the stage of pregnancy." *Behav Brain Res* **181**(2): 270-277.
- Friede, R. L. (1989). *Developmental Neuropathology*. Germany, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Garnier, Y., R. Berger, S. Alm, M. U. von Duering, A. B. Coumans, F. Michetti, M. Bruschetti, M. Lituania, T. H. Hasaart and D. Gazzolo (2006). "Systemic endotoxin administration results in increased S100B protein blood levels and periventricular brain white matter injury in the preterm fetal sheep." *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **124**(1): 15-22.
- Giakoumaki, S. G. (2012). "Cognitive and prepulse inhibition deficits in psychometrically high schizotypal subjects in the general population: relevance to schizophrenia research." *J Int Neuropsychol Soc* **18**(4): 643-656.
- Girard, S. (2010). *Rôle de l'interleukine-1 dans les dommages cérébraux périnataux: Perspectives de neuroprotection*. Doctorat Thèse par articles, Université de Sherbrooke.
- Girard, S., H. Kadhim, N. Beaudet, P. Sarret and G. Sebire (2009). "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* **158**(2): 673-682.
- Girard, S., H. Kadhim, M. Roy, K. Lavoie, M. E. Brochu, A. Larouche and G. Sebire (2009). "Role of perinatal inflammation in cerebral palsy." *Pediatr Neurol* **40**(3): 168-174.

Girard, S., L. Tremblay, M. Lepage and G. Sebire (2010). "IL-1 receptor antagonist protects against placental and neurodevelopmental defects induced by maternal inflammation." *J Immunol* **184**(7): 3997-4005.

Girard, S., L. Tremblay, M. Lepage and G. Sebire (2012). "Early detection of placental inflammation by MRI enabling protection by clinically relevant IL-1Ra administration." *Am J Obstet Gynecol* **206**(4): 358 e351-359.

Granholm, A. C., V. Zaman, J. Godbee, M. Smith, R. Ramadan, C. Umphlet, P. Randall, N. R. Bhat, B. Rohrer, L. D. Middaugh and H. A. Boger (2011). "Prenatal LPS increases inflammation in the substantia nigra of Gdnf heterozygous mice." *Brain Pathol* **21**(3): 330-348.

Guinchat, V., P. Thorsen, C. Laurent, C. Cans, N. Bodeau and D. Cohen (2012). "Pre-, peri- and neonatal risk factors for autism." *Acta Obstet Gynecol Scand* **91**(3): 287-300.

Hagberg, H., P. Gressens and C. Mallard (2012). "Inflammation during fetal and neonatal life: implications for neurologic and neuropsychiatric disease in children and adults." *Ann Neurol* **71**(4): 444-457.

Henneke, P., O. Takeuchi, R. Malley, E. Lien, R. R. Ingalls, M. W. Freeman, T. Mayadas, V. Nizet, S. Akira, D. L. Kasper and D. T. Golenbock (2002). "Cellular activation, phagocytosis, and bactericidal activity against group B streptococcus involve parallel myeloid differentiation factor 88-dependent and independent signaling pathways." *J Immunol* **169**(7): 3970-3977.

Henneke, P., O. Takeuchi, J. A. van Strijp, H. K. Guttormsen, J. A. Smith, A. B. Schromm, T. A. Espevik, S. Akira, V. Nizet, D. L. Kasper and D. T. Golenbock (2001). "Novel engagement of CD14 and multiple toll-like receptors by group B streptococci." *J Immunol* **167**(12): 7069-7076.

Kadhim, H., B. Tabarki, G. Verellen, C. De Prez, A. M. Rona and G. Sebire (2001). "Inflammatory cytokines in the pathogenesis of periventricular leukomalacia." *Neurology* **56**(10): 1278-1284.

Kak, V., V. Sundareshan, J. Modi and N. M. Khardori (2012). "Immunotherapies in infectious diseases." *Med Clin North Am* **96**(3): 455-474, ix.

Kannan, S., H. Dai, R. S. Navath, B. Balakrishnan, A. Jyoti, J. Janisse, R. Romero and R. M. Kannan (2012). "Dendrimer-based postnatal therapy for neuroinflammation and cerebral palsy in a rabbit model." *Sci Transl Med* **4**(130): 130ra146.

Kannan, S., F. Saadani-Makki, B. Balakrishnan, P. Chakraborty, J. Janisse, X. Lu, O. Muzik, R. Romero and D. C. Chugani (2011). "Magnitude of [(11)C]PK11195 binding is related to severity of motor deficits in a rabbit model of cerebral palsy induced by intrauterine endotoxin exposure." *Dev Neurosci* **33**(3-4): 231-240.

Kanner, L. (1968). "Autistic disturbances of affective contact." *Acta Paedopsychiatr* **35**(4): 100-136.

Katz, V. and W. A. Bowes, Jr. (1988). "Perinatal group B streptococcal infections across intact amniotic membranes." *J Reprod Med* **33**(5): 445-449.

- Kenyon, S., K. Pike, D. R. Jones, P. Brocklehurst, N. Marlow, A. Salt and D. J. Taylor (2008). "Childhood outcomes after prescription of antibiotics to pregnant women with spontaneous preterm labour: 7-year follow-up of the ORACLE II trial." *Lancet* **372**(9646): 1319-1327.
- Kim-Fine, S., T. R. Regnault, J. S. Lee, S. A. Gimbel, J. A. Greenspoon, J. Fairbairn, K. Summers and B. de Vrijer (2012). "Male gender promotes an increased inflammatory response to lipopolysaccharide in umbilical vein blood." *J Matern Fetal Neonatal Med* **25**(11): 2470-2474.
- Kniggendorf, A. K., T. W. Gaul and M. Meinhardt-Wollweber (2011). "Effects of ethanol, formaldehyde, and gentle heat fixation in confocal resonance Raman microscopy of purple nonsulfur bacteria." *Microsc Res Tech* **74**(2): 177-183.
- Kuban, K. C. and A. Leviton (1994). "Cerebral palsy." *N Engl J Med* **330**(3): 188-195.
- Kuban, K. C., T. M. O'Shea, E. N. Allred, H. Tager-Flusberg, D. J. Goldstein and A. Leviton (2009). "Positive screening on the Modified Checklist for Autism in Toddlers (M-CHAT) in extremely low gestational age newborns." *J Pediatr* **154**(4): 535-540 e531.
- Larroque, B., P. Y. Ancel, L. Marchand-Martin, G. Cambonie, J. Fresson, V. Pierrat, J. C. Roze, L. Marpeau, G. Thiriez, C. Alberge, G. Breart, M. Kaminski, S. Marret and g. Epipage Study (2011). "Special care and school difficulties in 8-year-old very preterm children: the Epipage cohort study." *PLoS One* **6**(7): e21361.
- Larroque, B., P. Y. Ancel, S. Marret, L. Marchand, M. Andre, C. Arnaud, V. Pierrat, J. C. Roze, J. Messer, G. Thiriez, A. Burguet, J. C. Picaud, G. Breart and M. Kaminski (2008). "Neurodevelopmental disabilities and special care of 5-year-old children born before 33 weeks of gestation (the EPIPAGE study): a longitudinal cohort study." *Lancet* **371**(9615): 813-820.
- Lehnardt, S., C. Lachance, S. Patrizi, S. Lefebvre, P. L. Follett, F. E. Jensen, P. A. Rosenberg, J. J. Volpe and T. Vartanian (2002). "The toll-like receptor TLR4 is necessary for lipopolysaccharide-induced oligodendrocyte injury in the CNS." *J Neurosci* **22**(7): 2478-2486.
- Leviton, A., E. N. Allred, K. C. Kuban, J. L. Hecht, A. B. Onderdonk, M. O'Shea T and N. Paneth (2010). "Microbiologic and histologic characteristics of the extremely preterm infant's placenta predict white matter damage and later cerebral palsy. the ELGAN study." *Pediatr Res* **67**(1): 95-101.
- Leviton, A., N. Paneth, M. L. Reuss, M. Susser, E. N. Allred, O. Dammann, K. Kuban, L. J. Van Marter, M. Pagano, T. Hegyi, M. Hiatt, U. Sanocka, F. Shahrivar, M. Abiri, D. Disalvo, P. Doubilet, R. Kairam, E. Kazam, M. Kirpekar, D. Rosenfeld, S. Schonfeld, J. Share, M. Collins, D. Genest, S. Shen-Schwarz and et al. (1999). "Maternal infection, fetal inflammatory response, and brain damage in very low birth weight infants. Developmental Epidemiology Network Investigators." *Pediatr Res* **46**(5): 566-575.
- Limperopoulos, C., H. Bassan, N. R. Sullivan, J. S. Soul, R. L. Robertson, Jr., M. Moore, S. A. Ringer, J. J. Volpe and A. J. du Plessis (2008). "Positive screening for autism in ex-preterm infants: prevalence and risk factors." *Pediatrics* **121**(4): 758-765.
- Makinodan, M., K. Tatsumi, T. Manabe, T. Yamauchi, E. Makinodan, H. Matsuyoshi, S. Shimoda, Y. Noriyama, T. Kishimoto and A. Wanaka (2008). "Maternal immune activation in mice delays

- myelination and axonal development in the hippocampus of the offspring." *J Neurosci Res* **86**(10): 2190-2200.
- Malkova, N. V., C. Z. Yu, E. Y. Hsiao, M. J. Moore and P. H. Patterson (2012). "Maternal immune activation yields offspring displaying mouse versions of the three core symptoms of autism." *Brain Behav Immun* **26**(4): 607-616.
- Mallard, C., A. K. Welin, D. Peebles, H. Hagberg and I. Kjellmer (2003). "White matter injury following systemic endotoxemia or asphyxia in the fetal sheep." *Neurochem Res* **28**(2): 215-223.
- Maski, K. P., S. S. Jeste and S. J. Spence (2011). "Common neurological co-morbidities in autism spectrum disorders." *Curr Opin Pediatr* **23**(6): 609-615.
- Matson, J. L. and M. S. Nebel-Schwalm (2007). "Comorbid psychopathology with autism spectrum disorder in children: an overview." *Res Dev Disabil* **28**(4): 341-352.
- Meyer, U. and J. Feldon (2012). "To poly(I:C) or not to poly(I:C): advancing preclinical schizophrenia research through the use of prenatal immune activation models." *Neuropharmacology* **62**(3): 1308-1321.
- Nelson, K. B. (2002). "The epidemiology of cerebral palsy in term infants." *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* **8**(3): 146-150.
- Nelson, K. B. (2003). "Can we prevent cerebral palsy?" *N Engl J Med* **349**(18): 1765-1769.
- Nelson, K. B. and R. E. Willoughby (2000). "Infection, inflammation and the risk of cerebral palsy." *Curr Opin Neurol* **13**(2): 133-139.
- Nims, R. W. and M. Plavsic (2013). "Polyomavirus inactivation - a review." *Biologicals* **41**(2): 63-70.
- Pang, Y., Z. Cai and P. G. Rhodes (2000). "Effects of lipopolysaccharide on oligodendrocyte progenitor cells are mediated by astrocytes and microglia." *J Neurosci Res* **62**(4): 510-520.
- Pang, Y., Z. Cai and P. G. Rhodes (2003). "Disturbance of oligodendrocyte development, hypomyelination and white matter injury in the neonatal rat brain after intracerebral injection of lipopolysaccharide." *Brain Res Dev Brain Res* **140**(2): 205-214.
- Perry, W., A. Minassian, B. Lopez, L. Maron and A. Lincoln (2007). "Sensorimotor gating deficits in adults with autism." *Biol Psychiatry* **61**(4): 482-486.
- Pinto-Martin, J. A., S. E. Levy, J. F. Feldman, J. M. Lorenz, N. Paneth and A. H. Whitaker (2011). "Prevalence of autism spectrum disorder in adolescents born weighing <2000 grams." *Pediatrics* **128**(5): 883-891.
- Romero, E., C. Ali, E. Molina-Holgado, B. Castellano, C. Guaza and J. Borrell (2007). "Neurobehavioral and immunological consequences of prenatal immune activation in rats. Influence of antipsychotics." *Neuropsychopharmacology* **32**(8): 1791-1804.
- Romero, E., C. Guaza, B. Castellano and J. Borrell (2010). "Ontogeny of sensorimotor gating and immune impairment induced by prenatal immune challenge in rats: implications for the etiopathology of schizophrenia." *Mol Psychiatry* **15**(4): 372-383.

- Rousset, C. I., S. Chalon, S. Cantagrel, S. Bodard, C. Andres, P. Gressens and E. Saliba (2006). "Maternal exposure to LPS induces hypomyelination in the internal capsule and programmed cell death in the deep gray matter in newborn rats." *Pediatr Res* **59**(3): 428-433.
- Saadani-Makki, F., S. Kannan, X. Lu, J. Janisse, E. Dawe, S. Edwin, R. Romero and D. Chugani (2008). "Intrauterine administration of endotoxin leads to motor deficits in a rabbit model: a link between prenatal infection and cerebral palsy." *Am J Obstet Gynecol* **199**(6): 651 e651-657.
- Schneider, T. and R. Przewlocki (2005). "Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism." *Neuropsychopharmacology* **30**(1): 80-89.
- Stephens, B. E., C. M. Bann, V. E. Watson, S. J. Sheinkopf, M. Peralta-Carcelen, A. Bodnar, K. Yolton, R. F. Goldstein, A. M. Dusick, D. E. Wilson-Costello, M. J. Acarregui, A. Pappas, I. Adams-Chapman, E. C. McGowan, R. J. Heyne, S. R. Hintz, R. A. Ehrenkranz, J. Fuller, A. Das, R. D. Higgins, B. R. Vohr, H. Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child and Human Development Neonatal Research (2012). "Screening for autism spectrum disorders in extremely preterm infants." *J Dev Behav Pediatr* **33**(7): 535-541.
- Takeuchi, O., K. Hoshino, T. Kawai, H. Sanjo, H. Takada, T. Ogawa, K. Takeda and S. Akira (1999). "Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components." *Immunity* **11**(4): 443-451.
- Umeda, T., N. Takashima, R. Nakagawa, M. Maekawa, S. Ikegami, T. Yoshikawa, K. Kobayashi, K. Okanoya, K. Inokuchi and N. Osumi (2010). "Evaluation of Pax6 mutant rat as a model for autism." *PLoS One* **5**(12): e15500.
- Urakubo, A., L. F. Jarskog, J. A. Lieberman and J. H. Gilmore (2001). "Prenatal exposure to maternal infection alters cytokine expression in the placenta, amniotic fluid, and fetal brain." *Schizophr Res* **47**(1): 27-36.
- Volpe, J. J. (2009). "Brain injury in premature infants: a complex amalgam of destructive and developmental disturbances." *Lancet Neurol* **8**(1): 110-124.
- Waldorf, K. M., M. G. Gravett, R. M. McAdams, L. J. Paoletta, G. M. Gough, D. J. Carl, A. Bansal, H. D. Liggitt, R. P. Kapur, F. B. Reitz and C. E. Rubens (2011). "Choriodecidual group B streptococcal inoculation induces fetal lung injury without intra-amniotic infection and preterm labor in *Macaca nemestrina*." *PLoS One* **6**(12): e28972.

Annexe

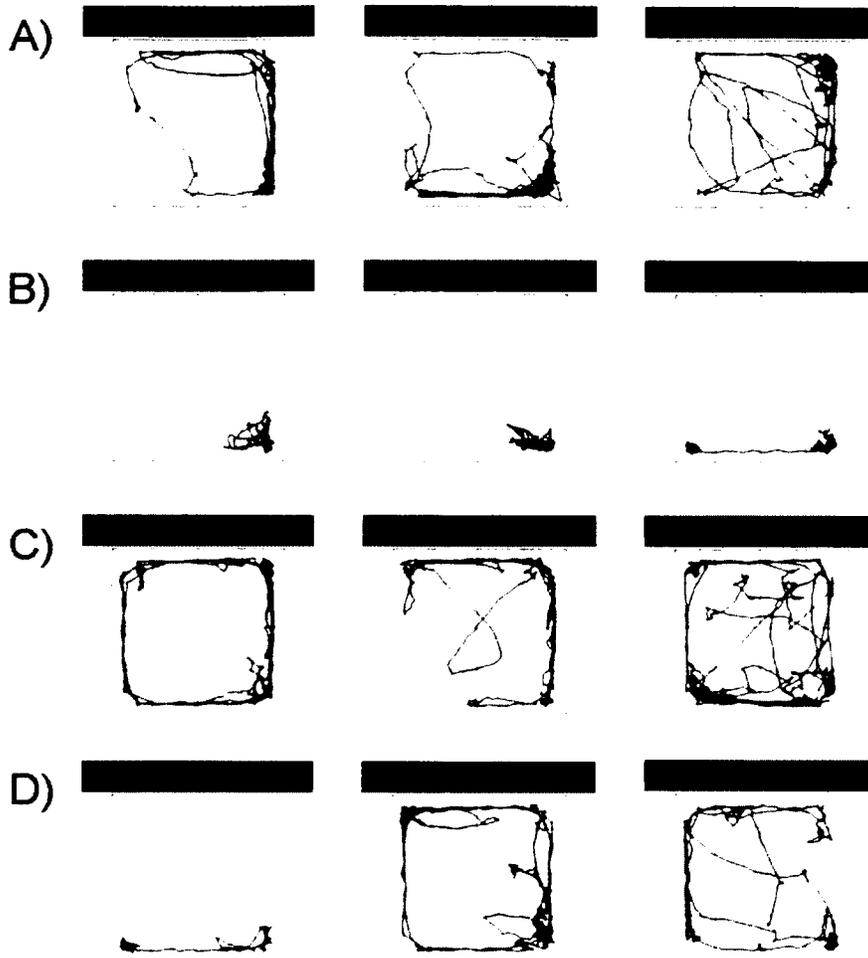


Figure supplémentaire. Exemples de tracés de déplacement lors du test de l'open field à P20 chez les A) mâles contrôles, B) mâles exposés au SGB, C) femelles contrôles et D) femelles exposées au SGB. 3 animaux par condition, provenant de 3 portées différentes.