

Université de Sherbrooke

**Compréhension de la pathophysiologie de l'accident vasculaire cérébral artériel ischémique  
néonatal**

Par  
Clémence Guiraut  
Département de Pédiatrie

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

Sherbrooke, Québec, Canada  
Mai 2015

Membres du jury d'évaluation  
Guillaume Sébire, Programme d'immunologie, UdeS  
Marek Rola-Pleszczynski, Programme d'immunologie, UdeS  
Pedro d'Orléans Juste, Programme de pharmacologie, UdeS



## **Compréhension de la pathophysiologie de l'accident vasculaire cérébral artériel ischémique néonatal**

Par Clémence Guiraut  
Département de pédiatrie

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

**Introduction :** Les artères cérébrales de gros calibre du système antérieur, regroupées sous le nom de bifurcation carotidienne intracrânienne, sont les plus affectées par les accidents vasculaires cérébraux artériels néonataux, ces AVC étant localisés dans ce territoire dans 85% des cas. L'hypothèse pathophysiologique classique, mais non prouvée, postule que l'occlusion artérielle est causée par un embolie d'origine placentaire. Cette croyance reste controversée par le débalancement de la distribution antérieure *versus* postérieure des infarctus cérébraux, et l'absence d'infarctus extra-cérébraux associés. Une nouvelle perspective pathophysiologique émerge de l'association épidémiologique entre l'inflammation gestationnelle et l'AVC néonatal. Nous postulons que l'inflammation materno-fœtale, induite par l'exposition gestationnelle aux pathogènes, mène à une vasculite affectant spécifiquement la bifurcation carotidienne puis provoque une thrombose focale.

**Méthodes :** Des rates Lewis gestantes sont injectées avec de la saline ou du lipopolysaccharide (LPS) d'*Escherichia coli* (200 µg/kg/12h) entre les jours de gestation (G) 21 et 22. Les cerveaux de la progéniture sont prélevés à G21, G22 et au jour postnatal (P)1. Le sang maternel, les placentas et le sang fœtal sont échantillonnés à G21 ou G22. A P1, un stress prothrombotique (photothrombose transcutanée) combiné à une hypoxie (3h30, 8% O<sub>2</sub>) est appliqué sur les artères cérébrales moyennes pour comparer leur susceptibilité à la thrombose chez les rats exposés au LPS et ceux non exposés. L'immunohistochimie, l'immunofluorescence et l'ELISA ont détecté les marqueurs inflammatoires maternels, placentaires et fœtaux.

**Résultats :** Les artères intra-crâniennes les plus susceptibles à l'AVC expriment constitutivement plus de marqueurs inflammatoires en comparaison aux artères intra- ou extra-crâniennes non susceptibles à l'AVC périnatal. L'exposition gestationnelle au LPS provoque une inflammation maternelle, placentaire et fœtale associées à une production d'IL-1 $\beta$ , de TNF- $\alpha$  et de MCP-1 ainsi qu'une inflammation artérielle affectant le segment proximal des artères intra-crâniennes fortement susceptible aux AVC néonataux. Les rats LPS + photothrombose + hypoxie présentent des AVC ischémiques ainsi que des déficits moteurs, qui n'étaient pas détectés lorsque la photothrombose + hypoxie était appliquée sans traitement préalable avec le LPS.

**Conclusion :** les résultats acquis par le biais de notre nouveau modèle animal préclinique supportent notre hypothèse d'une augmentation de la susceptibilité à l'inflammation des artères cérébrales antérieures, et ouvrent une nouvelle avenue physiopathologique vasculitique pour les AVC néonataux.

*Mots clés :* AVC, vasculite, LPS, bifurcation carotidienne, photothrombose



« La recherche est un processus sans fin dont on ne peut jamais dire comment il évoluera. L'imprévisible est dans la nature même de la science. »

*François Jacob*

**Table des matières :**

Résumé	III
Tables des matières	VI
Listes de figures	VIII
Liste des abréviations	X
<b>A. Introduction</b>	p.11
<b>1. L'AVC artériel ischémique néonatal</b>	p.11
1.1 Cause et conséquences de l'AVC artériel ischémique périnatal	p.11
1.2 Artères principalement touchées	p.12
1.3 Facteurs de risques (inflammation)	p.14
<b>2. Fenêtre périnatale de développement</b>	p.15
2.1 Remaniements de la circulation sanguine	p.15
2.2 Source d'oxygène chez le fœtus et le nouveau-né	p.17
2.3 Hypercoagulabilité	p.18
<b>3. Infection et inflammation maternelle</b>	p.18
3.1 Types d'infections et d'inflammations maternelles	p.18
3.2 Modèles animaux	p.19
3.2.1 Inflammation gestationnelle	p.19
3.2.2 AVC néonatal	p.20
<b>4. Infections et inflammation fœtale et néonatale</b>	p.22
4.1 Syndrome de réponse inflammatoire fœtale	p.22
<b>5. Effets de l'inflammation sur les artères cérébrales</b>	p.23
5.1 Constitution des artères cérébrales de gros et moyen calibre	p.24

5.2 Origine embryologique des artères cérébrales	p.24
5.3 Pathologies spécifiques des artères cérébrales	p.26
5.4 Barrière hémato-encéphalique	p.26
5.5 Inflammation par compartiments	p.27
5.5.1 Endothélium vasculaire	p.27
5.5.2 Media	p.28
5.5.3 Adventice	p.29
<b>B. Article</b>	p.30
Avant-propos	p.30
Résumé	p.30
Article	p.32
<b>C. Discussion et conclusion</b>	p.55
<b>D. Remerciements</b>	p.61
<b>E. Références</b>	p.62
<b>F. Annexes</b>	p.67
1. Matériel et méthodes supplémentaires	p.67
2. Résultats supplémentaires	p.67
3. Discussion des résultats supplémentaires	p.69

## Liste des figures

### A. Introduction

**Figure 1 :** Imagerie par résonance magnétique des lésions suite à un AVC périnatal.

**Figure 2 :** Artères cérébrales de la base du cerveau, vue axiale.

**Figure 3 :** Les trois principales artères cérébrales et les territoires parenchymateux cérébraux respectifs.

**Figure 4 :** Circulation sanguine du fœtus.

**Figure 5 :** Saturation en oxygène du sang du nouveau-né au fil du temps dans les 15 premières minutes de vie.

**Figure 6 :** Composition de la paroi d'une artère.

**Figure 7 :** Circulation artérielle cérébrale du fœtus à 10 semaines de vie.

**Figure 8 :** Composantes de la barrière hémato-encéphalique, vue de coupe d'un capillaire cérébral.

### B. Article

**Figure 1:** Increased constitutive number of Iba-1 positive cells in PAIS-susceptible neonatal vs non-susceptible arteries.

**Figure 2:** Increased constitutive expression of TNF- $\alpha$  in PAIS-susceptible vs non-susceptible arteries.

**Figure 3:** Increased constitutive expression of IL-1 $\beta$  in PAIS-susceptible vs non-susceptible arteries.

**Figure 4:** Unbalanced expression of SOD-1 between intima and media (arrowheads) of anterior and posterior intracranial but not extra-cranial arteries.

**Figure 5:** Increased TNF- $\alpha$  and MCP-1 blood titers of LPS exposed dams at 3 h after the first injection of LPS.

**Figure 6:** Decreased weight of the pups exposed to LPS+PT+H vs PT+H.

**Figure 7:** Increased number of Iba-1 positive cells in the arterial wall of P1 pups in utero exposed vs unexposed to LPS.

**Figure 8:** Increased expression of IL-1 $\beta$  in LPS-exposed vs unexposed PAIS-susceptible artery.

### **C. Discussion et conclusion**

**Figure 9 :** Hypothèse pathophysiologique de la survenue des AVCp

### **F. Annexe**

**Figure 1 :** Phénotype pro-inflammatoire des macrophages observés dans les espaces sous-arachnoïdiens.

**Figure 2 :** Inflammation du parenchyme cérébral au contact du liquide céphalo-rachidien.

**Liste des abréviations :**

<b>AB</b>	Artère basilaire ou tronc basilaire
<b>ACA</b>	Artère cérébrale antérieure
<b>ACI ec</b>	Artère carotide interne extra-crânienne
<b>ACI ic</b>	Artère carotide interne intra-crânienne
<b>ACM</b>	Artère cérébrale moyenne
<b>ACP</b>	Artère cérébrale postérieure
<b>AVC</b>	Accident vasculaire cérébral
<b>AVCp</b>	Accident vasculaire cérébral périnatal
<b>CD</b>	Cluster de différenciation
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>FIRS</b>	<i>Fetal inflammatory response syndrome</i>
<b>HIF-1</b>	<i>Hypoxia inducible factor 1</i>
<b>ICAM-1</b>	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interféron gamma
<b>IL</b>	Interleukine
<b>IRM</b>	Imagerie par résonance magnétique
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharide
<b>MCP-1</b>	<i>Monocyte chemoattractant protein 1</i>
<b>NAPDH oxidase</b>	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase</i>
<b>NO</b>	Oxide Nitrique
<b>ROS</b>	<i>Reactive oxygen species</i>
<b>SOD-1</b>	Super oxide dismutase-1
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
<b>VCAM-1</b>	<i>Vascular cell adhesion molecule 1</i>

## **A. Introduction :**

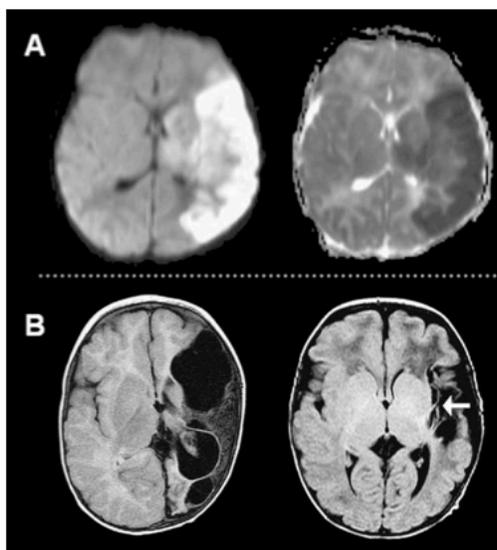
### **1. L'AVC artériel ischémique périnatal**

Il existe deux types principaux d'accidents vasculaires cérébraux (AVC) périnataux. Les AVC hémorragiques résultent d'une rupture du vaisseau sanguin et les AVC ischémiques résultent d'une sténose (obstruction partielle de la lumière de l'artère) ou d'une occlusion totale de l'artère du vaisseau sanguin.

#### **1.1 Cause et conséquences de l'AVC artériel ischémique périnatal**

L'AVC artériel ischémique néonatal est une maladie rare qui affecte environ 1 nouveau-né sur 2500 par an (incidence variant de 1/1600 à 1/5000). C'est un accident vasculaire cérébral qui survient entre la 28<sup>ème</sup> semaine de gestation et le 28<sup>ème</sup> jour de vie (par convention considéré comme étant le dernier jour de la période dite néonatale). En clinique, il est confirmé par neuro-imagerie (Laugesaar et al., 2007). Cet accident est causé par une diminution focale de la circulation sanguine (ischémie) dont les causes sont encore mal identifiées. Cette ischémie entraîne une privation en nutriments et en oxygène de la zone du cerveau irriguée par l'artère obstruée. La zone du cerveau privée de son apport sanguin (en fonction de la gravité de l'atteinte) devient dysfonctionnelle ou non-fonctionnelle provisoirement ou définitivement. Selon la sévérité de l'ischémie, qui n'est pas uniforme dans tout le territoire de l'artère on distingue 2 types de lésions principales. D'une part le cœur de la lésion (*core*) qui correspond à une perte définitive de matière cérébrale imputée à un phénomène de nécrose; d'autre part la pénombre entourant le cœur de la lésion, qui correspond à une ischémie partielle du tissu, entraînant un dysfonctionnement des cellules mais avec une possible récupération des cellules et de leur fonction. Les mécanismes de la mort cellulaire éventuelle de la pénombre sont plutôt de type apoptotique. Les séquelles découlant de cet infarctus peuvent se révéler à court ou long terme. À court terme, des convulsions peu de temps après la naissance sont la manifestation clinique qui oriente les cliniciens vers un diagnostic d'AVC périnatal qui est établi suite à une visualisation des dommages cérébraux par neuro-imagerie. Lorsque l'AVC est détecté aussi tôt, la région ischémisée apparaît en hypersignal en IRM de diffusion (c.f. Figure 1A) En l'absence de

convulsions néonatales (dans 40% des cas), la survenue d'un AVC périnatal est suspectée lorsque le nourrisson entre 6 - 18 mois présente un défaut de motricité (le plus souvent une paralysie cérébrale de type hémiplégique) en association avec des troubles de la cognition et de l'apprentissage. La visualisation des dommages en IRM se traduit par une large zone en hyposignal sur le territoire ischémié à la naissance, dénotant une perte massive et définitive de tissu cérébral (c.f. Figure 1B) (Kirton & deVeber, 2009).

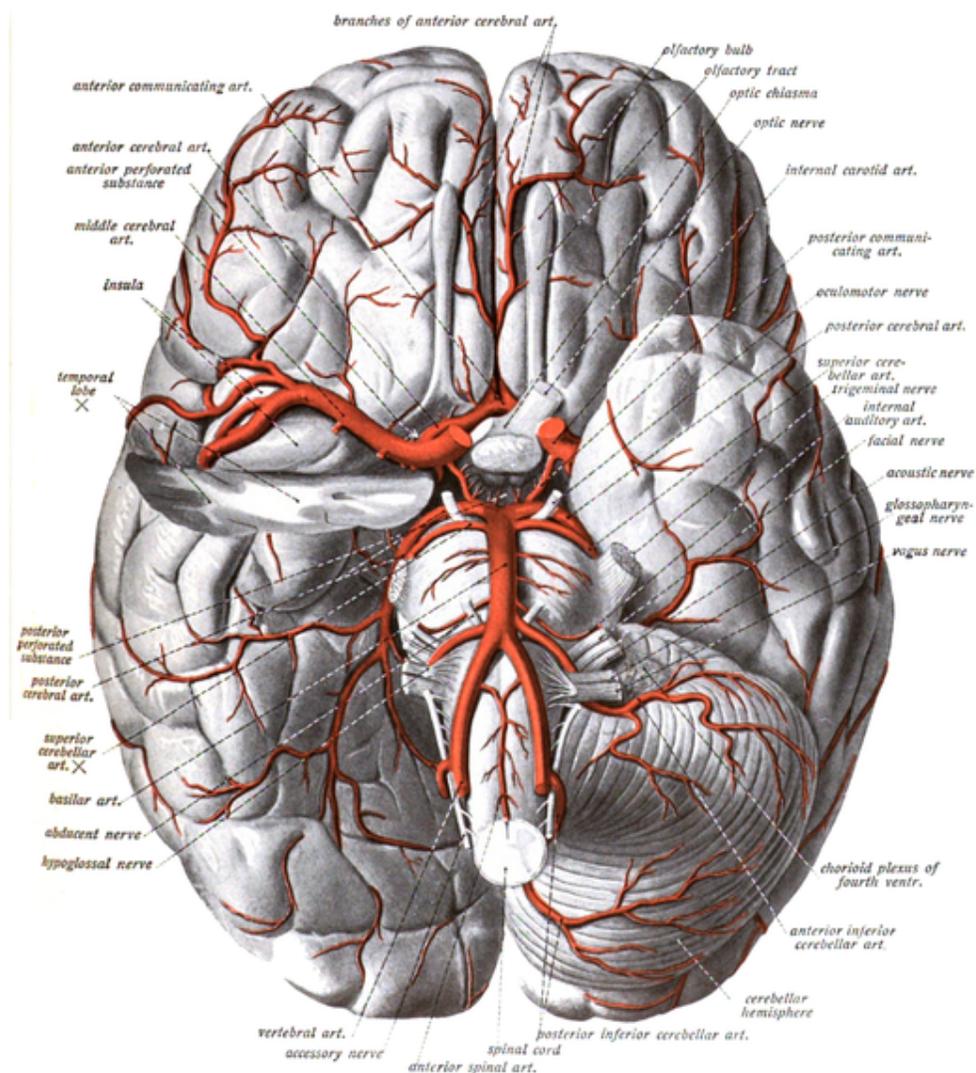


**Figure 1 : Imagerie par résonance magnétique des lésions suite à un AVC périnatal.** A. AVC détecté dans la période néonatale : lésion typiques (hypersignal en IRM), B. AVC suspecté après la période néonatale : lésion typique (hyposignal en IRM). Tiré de Kirton & deVeber, 2009.

Selon l'hypothèse médicale la plus en vogue, admise par plusieurs articles de revue, ce type d'AVC résulterait d'un embol placentaire (caillot provenant du placenta) voyageant dans la circulation sanguine et se bloquant aléatoirement dans une artère cérébrale (Chabrier, Husson, Dinomais, Landrieu, & Nguyen The Tich, 2011; Nelson & Lynch, 2004).

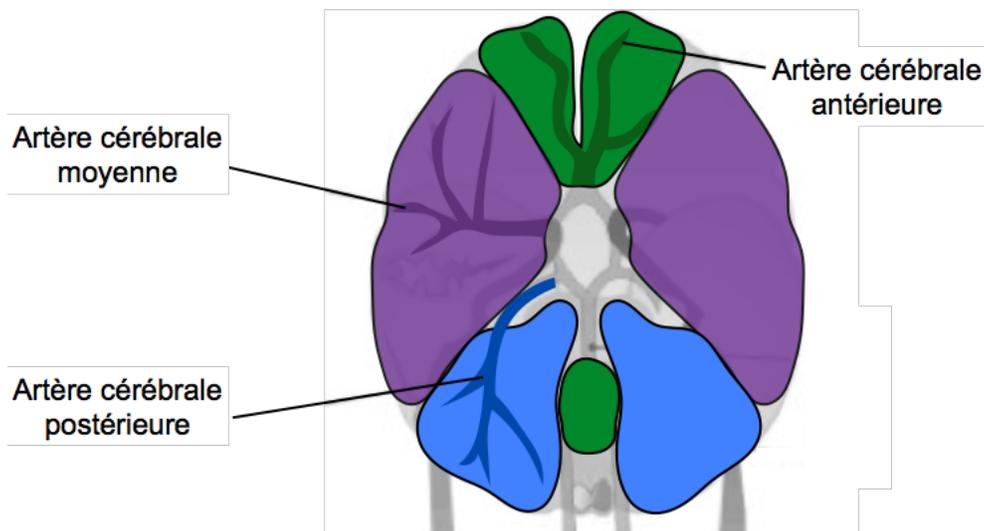
## 1.2 Artères principalement touchées

Le cerveau est irrigué par deux types d'artères naissant de l'aorte : les artères carotides communes droite et gauche (de chaque côté du cou) et les artères vertébrales droite et gauche (passant dans les vertèbres). Les artères carotides communes se divisent en carotides externes qui irriguent le crâne et en carotides internes qui irriguent l'avant du cerveau. Les artères carotides internes se ramifient ensuite en artères ophtalmiques et artères carotides internes intra-crâniennes qui se "greffent" sur le cercle de Willis pour irriguer le cerveau. Les artères vertébrales remontent jusque dans le cerveau pour fusionner au niveau du cercle de Willis et former le tronc basilaire (c.f. Figure 2).



**Figure 2 : Artères cérébrales de la base du cerveau, vue axiale.** La structure permettant la jonction des artères carotides et vertébrales est nommée le polygone de Willis (Sobotta, 1906).

Les AVC artériels ischémiques néonataux sont, dans tous les cas, localisés au niveau d'un des territoires artériels cérébraux suivant : dans 89% des cas, il s'agit du territoire de l'artère cérébrale moyenne, dans 7% des cas du territoire de l'artère cérébrale antérieure et dans 7 % du territoire de l'artère cérébrale postérieure (c.f. Figure 3). Il est possible que plus d'un territoire artériel soit touché par ce type d'AVC chez un même patient, unilatéralement ou bi-latéralement. Les artères les plus touchées sont donc l'artère cérébrale moyenne, l'artère cérébrale antérieure et l'artère cérébrale postérieure. Il est important de noter que les territoires des artères cérébrales vertébrales et basilaires sont épargnés par ce type d'AVC (Chabrier et al., 2010).



**Figure 3 : Les trois principales artères cérébrales et les territoires parenchymateux cérébraux respectifs.** Il est à noter que des anastomoses existent (anastomoses à la base du crane via le polygone de Willis et anastomoses cortico-corticales), elles peuvent compenser partiellement voire complètement l'effet de l'obstruction d'une artère donnée (Brozici, van der Zwan, & Hillen, 2003). Ceci explique pourquoi à occlusion semblable d'une artère cérébrale, l'étendue de l'infarctus d'aval varie d'un individu à l'autre.

### 1.3 Facteurs de risques (inflammation)

Une des problématiques de l'AVC artériel ischémique périnatal est qu'il n'existe pas de facteurs

prédictifs fiables de la survenue d'un tel AVC. Cependant, certaines conditions sont associées à l'AVC (facteurs de risque) tels que la chorioamnionite (infection ou inflammation du placenta), une rupture prolongée des membranes, une deuxième phase de travail prolongée, une fréquence cardiaque anormale, une anomalie du cordon ombilical (dans la majorité des cas un cordon ombilical de calibre rétréci) ou la nécessité d'une césarienne d'urgence (Darmency-Stamboul et al., 2012; Lee et al., 2005). Plus précisément, certains facteurs de type infectieux et inflammatoires chez le nouveau-né tels que des infections congénitales, des méningites bactériennes et des chorioamnionites (dont le diagnostic précis est encore problématique) sont des facteurs de risques importants de l'AVC artériel ischémique périnatal. Dans la majorité des cas, au moins un des facteurs de risque causant l'AVC peut être identifié, cependant établir un lien de causalité entre le facteur de risque et la survenue de l'AVC reste difficile considérant que seulement 50% des cas peuvent être expliqués par la présence d'un facteur de risque (Kirton & deVeber, 2009). Ce manque de compréhension concernant le ou les facteurs déclenchant de l'AVC artériel ischémique néonatal soulève la possibilité que les facteurs de risques connus de l'AVC néonatal puissent être additionnés à un autre facteur pour l'instant non-défini qui apporterait une susceptibilité (peut-être constitutive) de certaines artères cérébrales à l'occlusion.

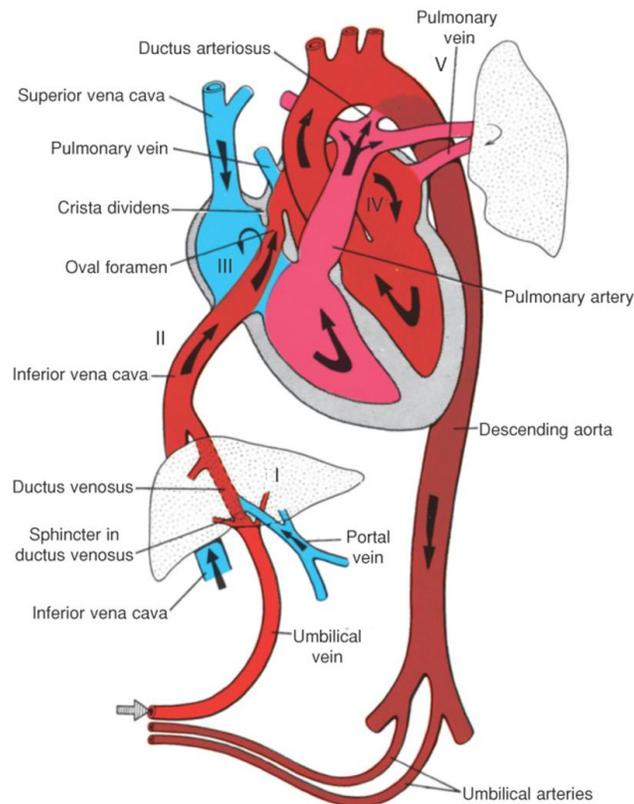
## **2. Fenêtre périnatale de développement**

La fenêtre de développement dans laquelle survient l'AVC possède un certain nombre de spécificités. La source d'oxygène du fœtus pendant la grossesse étant le placenta, lieu d'échange entre le fœtus et sa mère, la circulation sanguine doit être remaniée de façon à subvenir aux besoins en oxygène et en nutriments de tous les organes du fœtus.

### **2.1 Remaniement de la circulation sanguine**

Les poumons du fœtus sont non-fonctionnels pendant la grossesse. Chez le fœtus, le sang oxygéné provient des veines placentaires. Pour parvenir à oxygéner tous les organes du fœtus via le placenta, le sang oxygéné provenant de la veine cave inférieure arrive au cœur dans l'oreillette

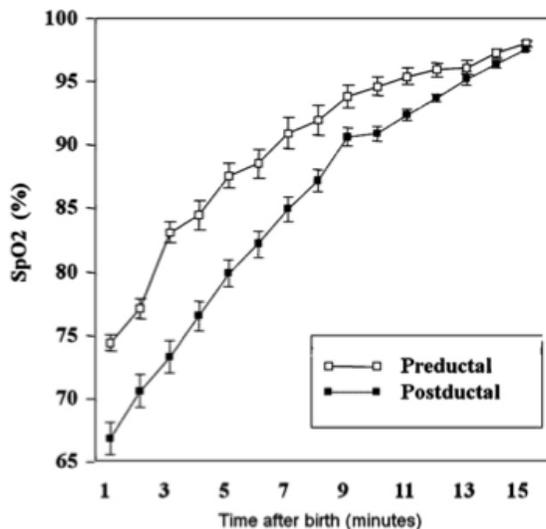
droite et est mélangé avec le sang non-oxygéné provenant de la veine cave supérieure. Le mélange de sang oxygéné et non-oxygéné passe ensuite dans le ventricule droit et rejoint l'artère pulmonaire (c.f. Figure 4). Les poumons étant non fonctionnels, l'artère pulmonaire court-circuite les poumons via le canal artériel, canal raccordant l'artère pulmonaire à l'aorte, qui propulse le sang oxygéné vers le cerveau et les organes de l'abdomen. De plus, un orifice dans la paroi du cœur qui sépare les oreillettes droite et gauche est présent uniquement chez le fœtus, c'est le foramen ovale. Cet orifice permet de faire passer le sang oxygéné mélangé au sang non-oxygéné de la veine cave supérieure directement de l'oreillette droite à l'oreillette gauche. L'oreillette gauche qui d'habitude propulse le sang oxygéné provenant de la veine pulmonaire va alors propulser le mélange de sang oxygéné provenant du foramen ovale dans l'aorte. Ce processus est appelé shunt droit/gauche (c.f. Figure 4). Ces deux structures anatomiques, le canal artériel et le foramen ovale, sont deux structures trouvées chez le fœtus qui se résorbent juste après la naissance.



**Figure 4 : Circulation sanguine du fœtus.** La particularité réside dans la présence d'un shunt droit/gauche et du foramen ovale.

## 2.2 Source d'oxygène chez le fœtus et le nouveau-né

Comme dit précédemment, le placenta est la source d'oxygène du fœtus pendant la grossesse. La saturation en oxygène du sang est en moyenne de 50-60% chez le fœtus (Saugstad, Sejersted, Solberg, Wollen, & Bjoras, 2012) tandis que chez le nouveau-né cette saturation avoisine les 95% (Castillo et al., 2008). Le développement de l'embryon et du fœtus se fait donc dans un environnement hypoxémique. À la naissance, la concentration en oxygène augmente donc drastiquement dans le sang du nouveau-né suite à la mise en fonction de ses poumons (c.f. Figure 5). Il est reconnu qu'un apport en oxygène trop important peut entraîner des dommages importants chez le nouveau-né, tout comme un apport en oxygène trop faible peut lui être tout autant dommageable (Castillo et al., 2008). Ce phénomène est connu sous le nom de paradoxe de l'oxygène (Uslu et al., 2012). Des concentrations supraphysiologiques en oxygène mènent à une génération excessive d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Ces ROS sont notamment produites par des systèmes tels que le système xanthine-xanthine, la NAPDH oxidase liée à la membrane et par des composants de la chaîne de transport d'électrons de la mitochondrie. Une brève hyperoxie peut notamment induire une augmentation de l'oxydation mitochondriale chez les cellules musculaires lisses des artères pulmonaires fœtales. De plus, il est connu que les ROS peuvent induire des dommages cellulaires (endommagement de macromolécules, induction de l'apoptose) dans le cerveau et les poumons (Saugstad et al., 2012).



**Figure 5 : Saturation en oxygène du sang du nouveau-né au fil du temps dans les 15 premières minutes de vie.** La saturation en oxygène double en 15 minutes. Tiré de Uslu et al., 2012.

### 2.3 Hypercoagulabilité

Durant la grossesse l'homéostasie générale du corps de la femme enceinte tend vers un état pro-coagulateur. Cet état pro-coagulateur est particulièrement présent pendant la période péripartum afin de prévenir le risque d'hémorragies durant l'accouchement. Cependant, cette hypercoagulabilité provisoire pourrait contribuer à augmenter le risque chez l'enfant à venir, de subir un AVC dans la période périnatale. Certaines études (Chabrier et al., 2011) proposent même que certains facteurs de risques de l'AVC; tels que des grossesses primipares ou donner naissance à de gros bébés; puissent découler directement de la proximité de cette période péripartum d'hypercoagulabilité en augmentant la possibilité de voir se créer des embolies placentaires-cérébrales.

## 3. Infection et inflammation maternelle

### 3.1 Types d'infections et d'inflammation maternelle

Des infections maternelles (par exemple des pyélonéphrites) peuvent survenir dans la période antepartum et intrapartum. Elles ont été associées avec la survenue de dommages cérébraux chez le fœtus, et chez la progéniture de paralysie cérébrale. Il est connu par exemple que des

infections du tractus urinaire augmentent le risque de paralysie cérébrale chez le nouveau-né et les effets néfastes de cette infection/inflammation sont plus marqués lors d'une exposition précoce du fœtus (Boles, Ross, Beloosesky, Desai, & Belkacemi, 2012).

Des études épidémiologiques (Brown & Susser, 2002) associent certaines infections maternelles comme les infections respiratoires (tuberculose, influenza, pneumonie, bronchite aigüe, et infections des voies respiratoires supérieures) ou d'autres infections comme les oreillons, la varicelle ou plus rarement la diphtérie avec une incidence augmentée des cas de schizophrénie chez la progéniture. De plus, une augmentation des cytokines pro-inflammatoires (IFN- $\gamma$  et IL-6, respectivement) a été dosée dans le sérum à la mi-grossesse de mères ayant donné naissance à des enfants autistes ou avec un retard développemental.

Le liquide amniotique des mères dont les enfants présentent des lésions de la substance blanche cérébrale présente une augmentation de TNF- $\alpha$ , d'IL-1 $\beta$ , et d'IL-6 (mais pas d'IL-1ra) par rapport aux mères des enfants ne présentant pas de lésions cérébrales. Les dommages cérébraux sont associés à des chorioamnionites histologiques (Burd, Balakrishnan, & Kannan, 2012; Yoon, Jun, et al., 1997).

La translocation des cytokines et cellules inflammatoires par le placenta via une inflammation de la couche maternelle du placenta, la décidua, transloquant vers le labyrinthe - la couche fœtale du placenta - pourrait éclaircir le lien entre les infections et/ou inflammation maternelles et des effets néfastes à court terme sur le fœtus (Girard et al., 2014).

## **3.2 Modèles animaux**

### **3.2.1 Inflammation gestationnelle**

Étant donné l'importance de l'infection et l'inflammation maternelle dans la survenue de pathologies chez la progéniture, beaucoup de modèles animaux ont été mis en place. Il n'existe pas de modèle parfait, chaque système ayant ses limitations vis-à-vis du paramètre étudié. Étudier l'impact de certains composés sur l'Homme peut s'avérer compliqué. L'inconfort pour le sujet humain de suivre des protocoles strictes à des fins de recherche, la difficulté d'accès aux tissus (dans le cas de pathologies du système nerveux par exemple), la disponibilité du sujet pour

la réalisation de prélèvements sériés ainsi que la nécessité de prendre en compte tous les effets à court et long terme dans le cas de traitements expérimentaux rendent la recherche sur l'homme difficile, nécessitant des études préliminaires dans des modèles animaux. Le recouplement de résultats obtenus avec plusieurs espèces animales (incluant l'homme) permet donc d'éclaircir le lien entre l'infection/inflammation maternelle et la survenue de dommages cérébraux à la progéniture.

L'inoculation intra-cervicale de lapines gestantes avec *E. coli* ( $10^3$  à  $10^4$  unités formatrices de colonies) démontre que le LPS provoque une surmortalité foetale. Les lapereaux des mères exposées au LPS présentent des lésions cérébrales (Yoon, Kim, et al., 1997). Des modèles de souris d'exposition gestationnelle au virus de l'influenza humain par inhalation en début (Shi, Fatemi, Sidwell, & Patterson, 2003) ou en fin de gestation (Fatemi et al., 2008; Girard, Kadhim, Beaudet, Sarret, & Sebire, 2009) montrent des effets différenciés dans la progéniture selon la fenêtre développementale d'exposition. Les souriceaux exposés à l'influenza en début de gestation développent des troubles comportementaux (comportement exploratoire et interactions sociales diminués) sans anomalie cérébrale (poids et imagerie par résonance magnétique cérébral) tandis que ceux exposés en fin de gestation présentent une atrophie du cerveau sans déficit comportemental. Un modèle d'exposition gestationnelle (fin de gestation) au LPS d'*E. coli* précédemment mis au point au laboratoire (Girard et al., 2009) a montré que cette exposition induit une infiltration massive de macrophages dans la paroi des artères placentaires fœtales. De plus, les placentas exposés au LPS gestationnel présentaient des signes de chorioamnionites histologiques comme une cavitation et une calcification du tissu placentaire ainsi qu'une diminution de la perfusion placentaire et une augmentation de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 $\beta$ , le TNF- $\alpha$ , l'IL-6 et en cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 (Girard, Sebire, & Kadhim, 2010). Cette inflammation placentaire est associée à des dommages cérébraux dans la progéniture occasionnant des troubles du comportement.

Ces modèles animaux apportent des éléments de compréhension quant à l'impact de l'inflammation maternelle sur le devenir neurocomportemental de la progéniture.

### **3.2.2 AVC néonatal**

Plusieurs procédés expérimentaux, appliqués à différentes espèces animales, ont tenté de

modéliser l'AVC artériel ischémique néonatal.

Le modèle d'AVC artériel ischémique néonatal le plus utilisé est un modèle de ligature permanente de l'artère carotide commune. Un modèle murin à P12 de ligatures permanentes unilatérales de l'artère carotide commune droite vise à étudier l'implication de Notch-2 dans la survie des neurones (Alberi et al., 2010). Le modèle dit de "Rice-Vannucci" est un des modèles classique d'ischémie néonatale, c'est en effet le premier modèle mis au point sur des petits animaux de laboratoire (rat) (Rice, Vannucci, & Brierley, 1981). C'est lui aussi un modèle de ligature permanente de l'artère carotide commune gauche chez le raton à P7 en combinaison avec une anoxie ou une hypoxie de 2-8% en O<sub>2</sub> afin de reproduire en plus de l'ischémie liée à la ligature le phénomène clinique subséquent de souffrance fœtale intrapartum ayant lieu chez certains nouveau-nés humains présentant des dommages cérébraux. De plus, la présence d'anastomoses (polygone de Willis et anastomoses cortico-corticales) permet un apport de sang continu au cerveau, altéré dans une mineure partie lors d'ischémies survenant dans les artères composant par exemple le polygone de Willis. Il a été démontré dans un modèle murin que les anastomoses cortico-corticales compensent très bien la survenue d'agressions hypoxiques ou ischémiques au cerveau et que seule leur combinaison induit des dommages cérébraux chez le rat (Levine, 1960).

D'autres modèles tentent de se rapprocher plus fidèlement de la réalité clinique en modélisant l'ischémie/reperfusion, comme c'est le cas lorsque le caillot qui bloque temporairement le flux sanguin artériel du nouveau-né est détruit (totalement ou partiellement par les mécanismes physiologiques de thromolyse) ou migre dans le système artériel, restaurant le flux sanguin puis l'interrompant éventuellement de manière définitive. (Mu et al., 2003) effectuent un épisode d'ischémie reperfusion chez des ratons à 10 jours de vie en ligaturant l'artère cérébrale moyenne pendant 1H30 puis en reperfusant le tissu pendant 0, 4, 8 ou 24H précédant une ligature permanente de l'artère cérébrale moyenne. Ce modèle vise à comprendre les différences d'expression de gènes tels que HIF-1 entre une ischémie totale et définitive du tissu cérébral et un épisode d'ischémie reperfusion. Un autre modèle d'AVC chez le raton, mais plus répandu chez le rat adulte, est la photothrombose. Ce procédé expérimental est une ischémie par occlusion des vaisseaux cérébraux de rongeurs en injectant du rose bengal, un produit qui réagit localement à la longueur d'onde de 450nm en créant de l'oxygène singulet qui endommage les

cellules endothéliales de la paroi de l'artère, enclenchant la cascade de coagulation (Grome, Gojowczyk, Hofmann, & Graham, 1988).

Parmi tous ces modèles, les uns prenant en compte l'inflammation maternelle avant la survenue des lésions cérébrales, les autres reproduisant l'ischémie menant à l'AVC, aucun ne s'adresse à la problématique de la localisation de l'occlusion ni des raisons du tropisme particulier de ces AVC (cf paragraphe tropisme des AVC). De plus, les facteurs de risques étudiés par ces auteurs (inflammation gestationnelle, occlusion artérielle) ne sont pas prédictifs de la survenue d'un AVC dans un territoire donné.

#### **4. Infections et inflammation fœtales et néonatales**

Des études réalisées *in vitro* et *in vivo* apportent des résultats contradictoires sur les propriétés du LPS des bactéries gram-négatives par exemple à traverser la barrière que représente le placenta. Cependant, il pourrait y avoir un transfert de cytokines du placenta vers le sang fœtal. L'hypothèse la plus répandue est celle d'un transfert d'inflammation du placenta vers la circulation fœtale via le syndrome de réponse inflammatoire fœtale (Boles et al., 2012).

##### **4.1. Le syndrome de réponse inflammatoire fœtale**

Le syndrome de réponse inflammatoire fœtale est caractérisé par une activation systémique du système immunitaire du fœtus. Ce syndrome a été décrit pour la première fois chez des fœtus ayant subi un travail pré-terme provoqué par une rupture précoce des membranes (Gomez et al., 1998). Il est principalement caractérisé par une augmentation de la concentration sérique fœtale d'IL-6 (>11 pg/mL). Les fœtus subissant un FIRS ont un plus grand taux de mortalité et sont plus sujets à des naissances pré-terme (dans les cas de rupture prolongée des membranes). Ces fœtus sont souvent suspectés ou confirmés comme ayant subi un sepsis néonatal, sont sujets aux pneumonies, aux dysplasies broncho-pulmonaires, aux hémorragies intra-ventriculaires, aux leucomalacies péri-ventriculaires (Gomez et al., 1998). La marque histologique distinctive d'un FIRS est une funisite (inflammation du cordon ombilical) et une vascularite chorionique (inflammation des vaisseaux placentaires) (Pacora et al., 2002). Le dosage de la protéine C

réactive dans le cordon ombilical est un autre moyen utilisé pour détecter le FIRS. Une élévation de la protéine C réactive est mesurée chez les patients présentant des infections du liquide amniotique, des funisites et des sepsis néonataux congénitaux (Gotsch et al., 2007).

Le rôle des antibiotiques est bien établi dans le traitement et l'amélioration du pronostic de nombreuses infections, y compris certaines du nouveau-né à terme (Baltimore, 2003). Cependant l'efficacité du traitement prophylactique de certaines infections congénitales reste discutée, notamment en ce qui concerne les infections responsables de l'accouchement prématuré (telle que la chorioamnionite pouvant être responsable du FIRS), en particulier en l'absence de rupture des membranes (Baltimore, 2003; Flenady, Hawley, Stock, Kenyon, & Badawi, 2013). En effet, dans cette situation, plusieurs essais randomisés contrôlés montrent l'absence de bénéfices neurologiques pour la progéniture suite à l'administration d'antibiotiques chez la mère menaçant d'accoucher prématurément (Flenady, Hawley, Stock, Kenyon, & Badawi, 2013). Il est possible que l'absence d'effet neuroprotecteur des antibiotiques dans ce contexte soit liée à leur défaut de contrôle de la réaction inflammatoire associée aux infections.

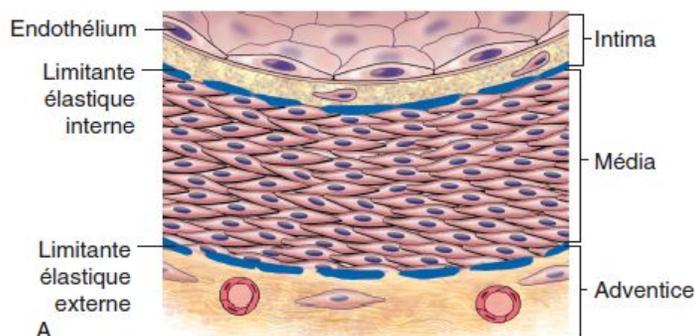
## **5. Effets de l'inflammation sur les artères cérébrales**

Je vais concentrer mon propos sur les artères de gros et moyen calibre car c'est le sujet de mon projet de recherche.

La composition des vaisseaux sanguins change en fonction du calibre du vaisseau, les vaisseaux de gros et moyen calibre ont une composition assez similaire tandis que les vaisseaux de petits calibres ont une composition différente afin d'ajuster les caractéristiques mécaniques de l'artère (résistance versus élasticité). La position de l'artère dans le flux sanguin, en lien direct avec la pression qui règne contre ses parois et le rôle qu'elle doit jouer (échanges avec le milieu vs redistribution du sang vers les organes vitaux), va déterminer en grande partie sa composition, les artérioles situées aux extrémités devant posséder une souplesse plus grande que les artères débouchant du cœur afin de permettre le passage des globules rouges même lorsque le diamètre de l'artère au repos est inférieur à la taille du globule rouge.

### 5.1. Constitution des artères cérébrales de gros et moyen calibre

Les artères sont constituées de trois types de couches de tissus distincts : l'intima, la media et l'adventice. L'intima est la couche de cellules en contact avec le flux sanguin. Elle est composée d'une seule couche de cellules endothéliales. La média, comme son nom l'indique est la couche de cellules se trouvant au milieu des trois couches composant l'artère. Elle est composée de cellules musculaires lisses permettant la vasoconstriction ou la vasodilatation de l'artère. La couche la plus externe de la paroi de l'artère est l'adventice, composée de tissu conjonctif (fibroblastes et collagène de type IV), de cellules inflammatoires et supportant les vasa vasora, des micro-vaisseaux apportant l'oxygène et les nutriments nécessaires au fonctionnement des artères de gros calibre. L'intima est séparée de la média par la limitante élastique interne et la media est séparée de l'adventice par la limitante élastique externe.



**Figure 6 : Composition de la paroi d'une artère de gros et moyen calibre, coupe transversale.** Chaque couche assure un rôle spécifique dans la physiologie de l'artère.

### 5.2. Origine embryologique des artères cérébrales :

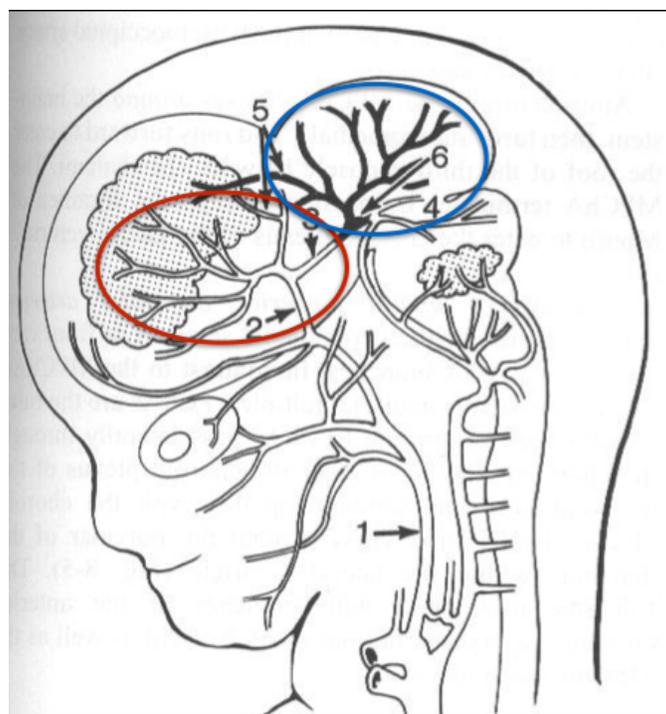
Relativement peu de choses sont connues quant à l'origine précise des artères cérébrales.

Les artères carotides internes primitives sont formées à partir de ramification céphalique des aortes dorsales, tandis que les artères carotides communes sont dérivées de l'aorte ventrale.

L'artère cérébrale moyenne, l'artère cérébrale antérieure tout comme l'artère cérébrale postérieure dérivent toutes de l'artère carotide interne qui résulte du troisième arc aortique (parmi les 6 arcs aortiques présents durant le développement embryologique).

Les artères vertébrales sont formées par la fusion des segments des artères cervicales inter-segmentaires. Le tronc basilaire résulte de la fusion longitudinale des artères neurales dorsales (Osborn, 1998).

Les artères de gros calibre ont embryologiquement une triple origine : mésoderme, crête neurale et tube neural (Ali, Farooqui, & Sohal, 2003). En revanche, les artères cérébrales de moyen calibre sont issues majoritairement du mésoderme et de la crête neurale, la crête neurale contribuant essentiellement à la formation des cellules musculaires lisses (Lopes et al., 2011). De plus, les artères de l'avant du cerveau ont une plus grande contribution des cellules d'origine ectodermique alors que les cellules des artères de l'arrière du cerveau sont en comparaison majoritairement d'origine mésodermique (Bergwerff, Verberne, DeRuitter, Poelmann, & Gittenberger-de Groot, 1998).



**Figure 7 : Circulation artérielle cérébrale du fœtus à 10 semaines de vie.** 1. Artère carotide interne primitive (ACI), 2. Division crânienne de la ACI, 3. Division caudale de la ACI (future artère cérébrale postérieure), 4. Artères d'origine crânienne et mésencéphaliques, 5. Artères choroïdes primitives, 6. Souche de l'artère cérébrale postérieure, 7. Artères dorsales neurales longitudinales. Encerclé rouge : contribution des cellules ectodermiques durant l'embryogénèse,

encerclé bleu : contribution des cellules mésodermiques durant l'embryogénèse. Adapté de *Diagnostic Cerebral Angiography*, Osborn A., 1998.

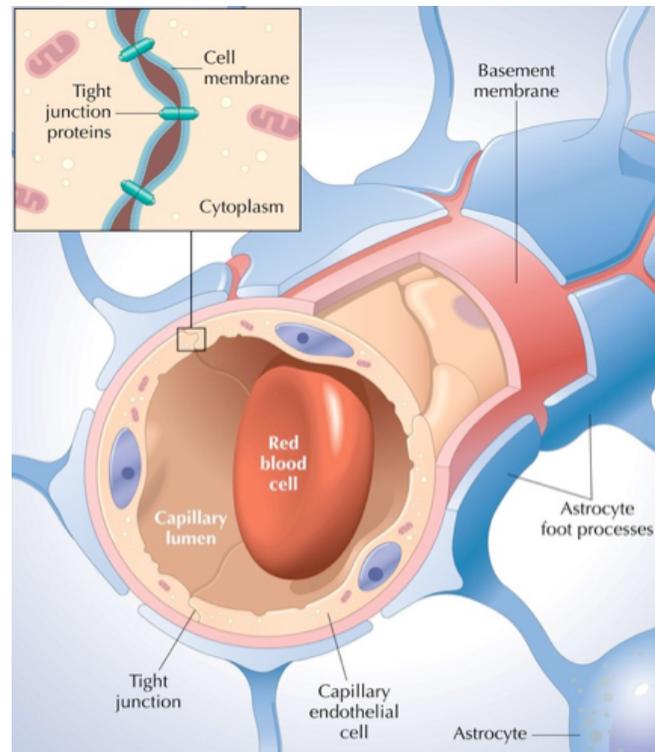
### **5.3. Pathologies spécifiques des artères cérébrales :**

Certaines pathologies sont spécifiques à certaines artères. Tandis que l'AVC artériel ischémique néonatal affecte préférentiellement les artères de la bifurcation carotidienne (Chabrier et al., 2010) certaines pathologies vasculaires comme les anévrismes distaux vont affecter préférentiellement l'artère cérébelleuse inférieure (Rodriguez-Hernandez, Zador, Rodriguez-Mena, & Lawton, 2013). La maladie de Moyamoya, qui peut résulter en une diminution globale de l'apport sanguin au cerveau via la diminution du diamètre de l'artère touchée, affecte uniquement les artères qui compose la bifurcation carotidienne et épargne le tronc basilaire, qui va donc permettre d'irriguer le cerveau via les anastomoses du cercle de Willis (Yamashiro, Takahashi, & Takahashi, 1984). D'autres pathologies des artères, comme l'athérosclérose, touchent principalement les artères de gros et moyen calibre.

### **5.4 Barrière hémato-encéphalique**

La barrière hémato-encéphalique est une barrière physique qui permet l'étanchéité sélective du cerveau aux molécules présentes dans le flux sanguin. Cette étanchéité résulte de la combinaison de plusieurs caractéristiques acquises grâce aux cellules composant les vaisseaux qui pénètrent dans le cerveau. Cette barrière est située au niveau de la paroi des petits capillaires irriguant le cerveau.

Premièrement, les cellules endothéliales qui composent le vaisseau possèdent des jonctions serrées qui scellent les parois des cellules entre elles et ne laissent passer que certaines molécules sélectivement (transport actif). Les cellules endothéliales sont entourées d'une gaine de soutien, la membrane basale. Cette membrane basale est elle-même recouverte par des pieds d'astrocytes, les cellules de soutien du tissu cérébral. Ces trois couches permettent l'imperméabilité du capillaire cérébral (c.f. Figure 8).



**Figure 8 : Composantes de la barrière hémato-encéphalique, vue de coupe d'un capillaire cérébral.** Les artères situées en contact direct avec le cerveau sont structurées de manière à assurer sa perméabilité sélective vis-à-vis du flux sanguin.

## 5.5. Inflammation par compartiments

### 5.5.1 Endothélium vasculaire

*Rôle constitutif :* L'endothélium vasculaire a un rôle prépondérant dans le contrôle précis des substances qui entrent et sortent du tissu cérébral. Les jonctions serrées et la faible activité pinocytotique des cellules endothéliales permettent d'inhiber le passage transcellulaire de molécules à travers la barrière hémato-encéphalique (Engelhardt, 2003). L'endothélium vasculaire exerce un contrôle sur l'entrée des cellules immunitaires dans le tissu cérébral en régulant finement l'expression de molécules d'adhésion (p-sélectines, ICAM, VCAM). De plus, l'adhésion des leucocytes à l'endothélium vasculaire permet leur expression de MMPs (matrix metalloproteases) qui entraîne la dégradation de la membrane basale puis la facilitation de

l'entrée des leucocytes dans le tissu cérébral (Correale & Villa, 2007).

*Réaction à l'inflammation* : les cellules endothéliales, lorsqu'elles sont exposées à l'inflammation (contenu bactérien, LPS, cytokines pro-inflammatoires) ont la capacité d'exprimer des molécules pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , MCP-1, IL-1 ou IL-6), des molécules d'adhésion (ICAM-1, VCAM-1) ou des molécules pro-coagulantes comme le facteur tissulaire, exprimé de novo lorsque les cellules endothéliales sont stimulées avec du TNF- $\alpha$  (An, Chen, & Quan, 2011; van der Poll, 2008). De plus, les cellules endothéliales relâchent du monoxyde d'azote (NO) (Sierra, Coca, & Schiffrin, 2011). Les ROS peuvent déréguler l'expression génique des cellules endothéliales via l'activation de facteurs de transcription et induire l'expression de molécules ayant un effet direct sur les cellules musculaires lisses, par exemple en dérégulant l'expression de l'endotheline-1, puissant vasoconstricteur et molécule ayant un effet pro-inflammatoire (Bohm & Pernow, 2007; Saugstad et al., 2012).

### 5.5.2 Media

*Rôle constitutif* : les cellules musculaires lisses de la média des artères permettent la vasoconstriction et la vasodilatation de l'artère. Elles ont aussi un rôle dans l'hémostase en exprimant constitutivement le facteur tissulaire qui, lorsque l'endothélium est endommagé, va être exposé dans la lumière du vaisseau pour enclencher la cascade de coagulation et limiter la perte d'intégrité du vaisseau lésé. (Steffel, Luscher, & Tanner, 2006)

*Réaction à l'inflammation* : Les cellules musculaires lisses surexpriment le facteur tissulaire en réaction à des médiateurs eux-mêmes surexprimés par les cellules endothéliales en condition inflammatoire tels que le TNF- $\alpha$ , CD40 ligand et des endotoxines (Steffel et al., 2006). De plus, la relâche de NO par les cellules endothéliales induit une relaxation des cellules musculaires lisses composant la media, ayant comme conséquence une vasodilatation de l'artère facilitant l'entrée des leucocytes dans la paroi de l'artère (Sierra et al., 2011). De plus, les cellules musculaires lisses peuvent produire une panoplie de molécules pro-inflammatoires telles que la

fractalkine, à la fois chimiokine et molécule d'adhésion permettant l'entrée de macrophages dans la paroi du vaisseau (Pirvulescu et al., 2014).

### **5.5.3. Adventice**

*Rôle constitutif* : l'adventice est le tissu de support de l'artère, il permet de maintenir l'intégrité de l'artère et la supplémente en sang via les vasa vasora. Elle a une fonction de niche biologique, hébergeant notamment des cellules progénitrices à proximité des vasa vasora.

*Réaction à l'inflammation* : l'inflammation peut induire l'augmentation de facteurs de prolifération et la prolifération accrue des cellules composant les vasa vasora mène à une hypoxie du vaisseau. Les vasa vasora pourrait être la voie d'entrée d'une variété de facteurs de croissance, cytokines et cellules sanguines dans la paroi de l'artère. La prolifération des vasa vasora jusque dans la média diffuse et accroît l'inflammation de l'artère (Hamaoka-Okamoto et al., 2014).

## B. Article

### *Focal intracranial arteritis induced by maternal immune activation in the pathophysiology of neonatal stroke.*

Clémence Guiraut, Nicole Cauchon, Martin Lepage, Guillaume Sébire.

\* Soumis à *Stroke*

#### Avant-propos

L'article intitulé « *Focal intracranial arteritis induced by maternal immune activation in the pathophysiology of neonatal stroke* » présentement soumis à *Stroke* traite uniquement de mon projet de recherche. Les travaux ont été supervisés par mon directeur de recherche, le Dr Guillaume Sébire.

J'ai effectué la majorité du travail de laboratoire contenu dans cet article dans le cadre de mon projet de maîtrise. Certains résultats ont été obtenus en collaboration avec Nicole Cauchon. Martin Lepage a contribué à l'avancement de cet article par l'apport d'idées novatrices lors de mes travaux de maîtrise. L'écriture du manuscrit et l'avancement des résultats se sont faits sous la direction du Dr Sébire.

#### Résumé de l'article

**Introduction.** Il est connu que les artères cérébrales de gros et moyen calibre du système antérieur intracranien ainsi que l'origine des artères cérébrales postérieures sont les plus affectées par l'AVC périnatal (AVCp). Ce type d'AVC affecte environ un enfant sur 2500 et touche les territoires artériels susmentionnés dans 85% des cas (Chabrier et al., 2010). L'hypothèse pathophysiologique classique postule que l'occlusion artérielle est causée par un embole d'origine placentaire. Pourtant, cette hypothèse embolique reste controversée par : (i) le débalancement majeur de la survenue des AVC dans les territoires artériels antérieurs vs postérieurs, et (ii) l'absence d'infarctus extra-cérébraux associés. Une nouvelle perspective pathophysiologique émerge de l'association épidémiologique entre l'inflammation gestationnelle et l'AVCp. La

pathophysiologie des AVCp nécessite d'être mieux comprise pour mettre en place des stratégies préventives et thérapeutiques présentement absentes. **Notre hypothèse** est que l'inflammation materno-foetale, induite par l'exposition gestationnelle aux pathogènes, mène à une vasculite site-spécifique affectant la bifurcation carotidienne puis provoquant une thrombose focale.

**Matériel et méthode.** Des rates Lewis gestantes aux jours de gestation (G) 21 et G22 sont injectées intra-péritonéalement avec de la saline ou du lipopolysaccharide (LPS) d'*Escherichia coli*. Le sang maternel et fœtal ainsi que le placenta et le cerveau de la progéniture sont prélevés aux jours gestationnels 21, 22 et au jour post-natal 1. Un stress pro-thrombotique est appliqué sur les artères cérébrales moyennes (ACM) exposées - ou non - au LPS. Des marquages immunologiques ainsi que des ELISA ont permis la détection de marqueurs inflammatoires.

**Nos résultats** montrent une réponse inflammatoire maternelle, placentaire et foetale associées à l'expression d'IL-1 $\beta$ , de TNF- $\alpha$  et de MCP-1 ainsi qu'une artérite macrophagique affectant sélectivement les segments de moyen calibre des artères intra-cérébrales susceptibles aux AVCp. Les rats exposés au LPS, à la photothrombose et à l'hypoxie présentent des AVCp et des déficits moteurs, qui ne sont pas détectés quand la photothrombose est appliquée sans exposition préalable au LPS.

**Conclusion.** Les résultats de notre modèle pré-clinique supportent notre hypothèse d'une susceptibilité augmentée des artères cérébrales antérieures à l'inflammation gestationnelle, et ouvrent une nouvelle voie pathophysiologique pour l'AVCp. Nous proposons un nouveau paradigme dans lequel les AVCp dérivent d'un modèle à triple risque : (i) une inflammation materno-foetale menant à une artérite focale antérieure intra-cranienne, (ii) une fenêtre développementale propice, et (iii) un état pro-coaguloire périnatal physiologique.

**Article****Focal intracranial arteritis induced by maternal immune activation in the pathophysiology of neonatal stroke**

Guiraut - Physiopathology of neonatal stroke

Clémence Guiraut\*, BSc, Nicole Cauchon<sup>+</sup>, PhD,  
Martin Lepage<sup>+</sup>, PhD, Guillaume Sébire\*<sup>#</sup>, MD, PhD.

\*Département de Pédiatrie, <sup>+</sup>Département de Médecine Nucléaire et Radiobiologie, Université de Sherbrooke; <sup>#</sup>McGill University, Quebec, Canada

Corresponding author: Guillaume Sébire, Laboratoire de neurologie pédiatrique, 3001 12ème avenue Nord, J1H5N4 Sherbrooke

Fax number: 1 819 564 5398, Phone number: 1 819 346 1110 (ext 75989), E-mail address: Guillaume.Sebire@usherbrooke.ca

Total word count: 4530

Subject codes: **[95] Endothelium/vascular type/nitric oxide, [130] Animal models of human disease, [82] Vasculitis Brain Arteries, [68] Stroke in Children and the Young, [63] Pathology of Stroke**

**Abstract**

**Rationale.** The medium-sized segments of intra-cranial arteries developing from the carotidian tree are selectively affected by perinatal arterial ischemic strokes (PAIS). The physiopathology of PAIS needs to be understood to put in place preventive and therapeutic strategies that are currently absent. **Objective.** We hypothesized that maternofetal inflammation, induced by gestational exposure to pathogens, leads to a site-specific vasculitis at the carotid bifurcation triggering a focal thrombosis and subsequent stroke.

**Methods and Results.** Dams were injected at the end of gestation with saline or lipopolysaccharide (LPS) from *Escherichia coli*. Maternal and fetal blood, placentas, and brains were harvested at gestational day (G)21, G22 and post-natal day 1 (P1). A prothrombotic stress was applied on LPS-exposed *vs* unexposed middle cerebral arteries (MCA). Immunostaining and ELISA detected the inflammatory markers of interest. Our results showed maternal, placental and fetal inflammatory responses associated with increased levels of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and MCP-1 as well as a macrophagic arteritis selectively affecting the medium sized segments of intra-cranial arteries susceptible to PAIS. *In utero* exposure to LPS followed by post-natal photothrombosis targeting the MCA led to PAIS in the MCA territory and to motor impairments, which were absent when photothrombosis was applied without prior treatment with LPS.

**Conclusions.** Results from our new pre-clinical model support our hypothesis of selective vulnerability of medium-sized segments of intracranial arteries developing from the internal carotid to gestational inflammation. These observations lead us to propose a new physiopathological paradigm whereby PAIS derives from a triple risk combination: (i) a maternofetal inflammation leading to focal intra-cranial anterior arteritis, (ii) a developmental window of susceptibility, and (iii) a physiological perinatal pro-coagulatory state.

**Keywords:** gestational inflammation, neonatal arterial ischemic stroke, photothrombosis, cytokines.

## Non-standard Abbreviations and Acronyms

ACA	anterior cerebral artery
AlPcS <sub>4</sub>	aluminium phthalocyanine tetrasulfonate
Arg-1	arginase-1
BA	basilar artery
CP	cerebral palsy
EBST	elevated body swing test
FIRS	fetal inflammatory response syndrome
G	gestational
H	hypoxia
Iba-1	ionized calcium binding adaptor molecule 1
ICAM-1	intercellular adhesion molecule 1
icICA	intra-cranial internal carotid artery
IF	immunofluorescence
IHC	immunohistochemistry
IL	interleukin
iNOS	inducible nitric oxide synthase
M1	pro-inflammatory macrophage
M2	anti-inflammatory macrophage
MCA	middle cerebral artery
MCP-1	macrophage chemoattractant protein 1
P	post-natal
PAIS	perinatal arterial ischemic stroke
PAVI	<i>plateforme d'analyse et de visualisation d'image</i>
PCA	posterior cerebral artery
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PMN	polymorphonuclear cell
PT	photothrombosis
S	saline
SOD-1	superoxide dismutase 1
ROS	reactive oxygen species
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule 1
vWF	von Willebrand factor

**Introduction:**

Perinatal arterial ischemic stroke (PAIS) is the most frequent form of paediatric stroke (Chabrier et al., 2010; Nelson & Lynch, 2004; van der Aa, Benders, Groenendaal, & de Vries, 2014). It affects about one in 2500 newborns (Chabrier et al., 2011). During our lifetime, the day of birth is the one we are most susceptible to stroke's occurrence. PAIS results in sequelae such as hemiplegic cerebral palsy (CP), cognitive and learning impairments, or both (Chabrier et al., 2010). A quarter of all CP occurrences derive from PAIS (Wu, Croen, Shah, Newman, & Najjar, 2006). The physiopathology of PAIS needs to be understood to implement preventive and therapeutic strategies that are currently inexistent (Kirton & deVeber, 2015). Surprisingly, almost all PAIS occurs in the territories of intracranial internal carotid arteries (icICA) and posterior cerebral arteries (PCA), while basilar (BA) and extracranial arteries are not affected (Chabrier et al., 2011; Kirton et al., 2011; Koelfen, Freund, & Varnholt, 1995; Nelson & Lynch, 2004; van der Aa et al., 2013). The distribution of infarcts on neuroimaging, and of arterial wall anomalies on pathological exams, suggests an interruption of blood flow in specific segments of medium-sized cerebral arteries, namely: the distal part of the icICA, the proximal part of its terminal bifurcation - *i.e.* A1 segment of the anterior cerebral artery (ACA) and M1 segment of middle cerebral artery (MCA) -, or the proximal (P1) segment of PCA (Barmada, Moossy, & Shuman, 1979; Chabrier et al., 2011). A classic pathophysiological hypothesis postulates that the arterial occlusion is due to emboli from placental or cord following the fetal circulation to reach the brain (Chabrier et al., 2011; Nelson & Lynch, 2004). This embolic hypothesis remains controversial due to: (i) the major imbalance of PAIS distribution between the anterior *vs* posterior intracranial arterial territories, and (ii) the absence of concomitant extra-cerebral infarcts. The epidemiological association between PAIS and gestational infection/inflammation, such as bacterial chorioamnionitis at the end of gestation, provides a new pathophysiological perspective (Chabrier et al., 2010; Lee et al., 2005; Nelson & Lynch, 2004; Wu, Lynch, & Nelson, 2005). Endogenous or exogenously-induced pro-thrombotic states, such as disseminated intravascular coagulation (DIC) are often caused by infectious/inflammatory conditions (Barmada et al., 1979; Gunther et al., 2000; Kirton & deVeber, 2009; Lynch, Han, Nee, & Nelson, 2005; Nelson & Lynch, 2004).

These are also associated with PAIS, although they may not be sufficient to cause PAIS alone (Lynch et al., 2005). Considering these data, we propose a new physiopathological paradigm whereby a focal medium-size vessel arteritis leading to PAIS results from the combination of a triple risk: *(i)* a materno-fetal infection/inflammation, *(ii)* a developmental window of susceptibility, and *(iii)* the physiological perinatal pro-coagulatory state, triggering an occlusive thrombus leading to ischemia. To test this hypothesis, we used an original preclinical rat model of lipopolysaccharide (LPS)-induced chorioamnionitis previously designed in our laboratory (Girard, Tremblay, Lepage, & Sebire, 2010).

## **Methods**

### ***Animals***

Animal experiments were conducted as previously described (Girard et al., 2008). Briefly, Lewis dams were injected intra-peritoneally (ip) between gestational day (G) 21 and G 22 with either lipopolysaccharide (LPS) (200 µg/kg/12 hours (h)) from *Escherichia coli* (LPS group), or with a pyrogen-free saline (control group) (see supplemental data). Our Animal Care and Use Committee approved this study.

### ***Immunohistochemistry (IHC) immunofluorescence (IF) and ELISA***

Rat pups were euthanized by decapitation at different times: from 3 h after the first LPS injection to post-natal day (P) 1. Caesarean sections were performed from 3 h to 24 h after the first LPS injection. Maternal, fetal blood samples, placentas and neonatal head were harvested and stored at -80°C or fixed and paraffin-embedded. IHC and IF were performed as previously described (Girard et al., 2008). Consecutive full skull sections were incubated with different sets of primary antibodies and the corresponding secondary antibodies (see supplemental data): ionized calcium binding adapter molecule-1 (Iba-1), interleukin-1 beta (IL-1β), interleukin-1 receptor antagonist (IL-1Ra), tumor necrosis factor alpha (TNF-α), inducible nitric oxide synthase (iNOS), and arginase-1 (Arg-1) - to determine the pro- (M1) versus anti-inflammatory (M2) phenotype of macrophages, and polymorphonuclear neutrophils\*<sup>cf page 54</sup> (PMN), cluster of differentiation 3 (CD3), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), cluster of differentiation 40 (CD40), cluster of differentiation 40 ligand (CD40L), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), proliferating cell nuclear antigen (PCNA), tissue factor, vonWillebrand factor (vWF), and superoxide dismutase-1 (SOD-1) to define other inflammatory and coagulatory features of cerebral arteries. Counting of labeled and unlabeled cells (data presented as ratio between labeled and total cells) was performed in four to six full sections per segment of interest from each artery (see supplemental material). We divided the arteries in two groups based on their susceptibility to PAIS, namely the highly susceptible group including ACA, MCA, icICA and PCA (all embryologically arising from the intra-cranial internal carotid artery) *vs* the non-susceptible group including ecICA and BA. Labeling was assessed by conventional and confocal microscopies. The SOD-1 and iNOS labeling were assessed

using a 0 to 3 score, in which 0 = no labeling, 1 = low-intensity, 2 = mid-intensity, and 3 = high-intensity labeling. Colorimetric measures of labeling were also performed as previously described (Girard, Sebire, et al., 2010). A nanozoomer device (Hamamatsu Corporation, NJ) and the *extract-brown plugin* generated by the image analysis platform of the *Université de Sherbrooke* (PAVI: *plateforme d'analyse et de visualisation d'images*) were also used, as previously described (Girard, Sebire, et al., 2010).

### ***ELISA***

Placental proteins were extracted and concentrations determined, as previously described (Girard et al., 2008). Plasma samples were obtained by centrifugation of whole blood (15 min, 13 000 RPM) in plasma separator tubes with lithium heparin (Becton Dickinson, ON, Canada). All the samples were kept at -80°C until their analysis. Cytokines (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) and chemokine (MCP-1) were quantified using ELISA kits according to manufacturer's instruction (R&D System, MN; except for MCP-1: BD Biosciences, NJ).

### ***Focal thrombosis induction***

Rat pups at P1 were submitted to a prothrombotic stress (transcutaneous photothrombosis) applied on the MCA (segment located between the ear and the eye (Wang-Fischer, 2009)). Aluminium phthalocyanine tetrasulfonate AlPcS<sub>4</sub> (650  $\mu$ g/kg) was used as a photosensitizer and was injected ip 30 min before illumination (Ali, Cauchon, & van Lier, 2009). The MCA was exposed transcutaneously to a laser light (intensity: 125 mW) for 2 min. In the presence of oxygen within the blood, AlPcS<sub>4</sub> produces free cytotoxic radicals when exposed to transcutaneous laser light. This creates a focal intra-luminal sub-thrombotic effect (Moore, West, & Whitehurst, 1997). Forty-five minutes (min) later, pups were submitted to hypoxia for 3 h 30 min (8% O<sub>2</sub>) as previously described (Levine, 1960) to minimize the capacity of neonatal rat arteries to compensate for the impact of reduced cerebral arterial blood flow through the circle of Willis anastomoses. This thrombosis

induction was performed alone or in combination with gestational exposure to LPS. Two experimental groups were studied: the saline (S) plus photothrombosis (PT) plus hypoxia (H) group (S+PT+H, n = 10) and the LPS plus PT plus H group (LPS+PT+H, n = 8). Rat pups were weighed from P1 to P16 and euthanized at P20. The brains were then collected and weighed after removal of olfactory bulbs and cerebellum.

### ***Behavioral tests***

Motor behavior was assessed at P13 and P16. Righting reflex was tested at P13. Rats were placed on their back, four paws in the air. The time to move from paws in the air to four paws on the ground was measured. In the Elevated Body Swing Test (EBST)) P16 rats were held by the base of the tail head downwards during 20 sec (Savard et al., 2013). The number of effective upswings (+90°) and the total number of upswing were compared between the S+PT+H and LPS+PT+H groups. A decrease in the number of effective upswings or in the total number of upswings during 20 sec was considered as a motor deficit.

### ***Statistical analyses***

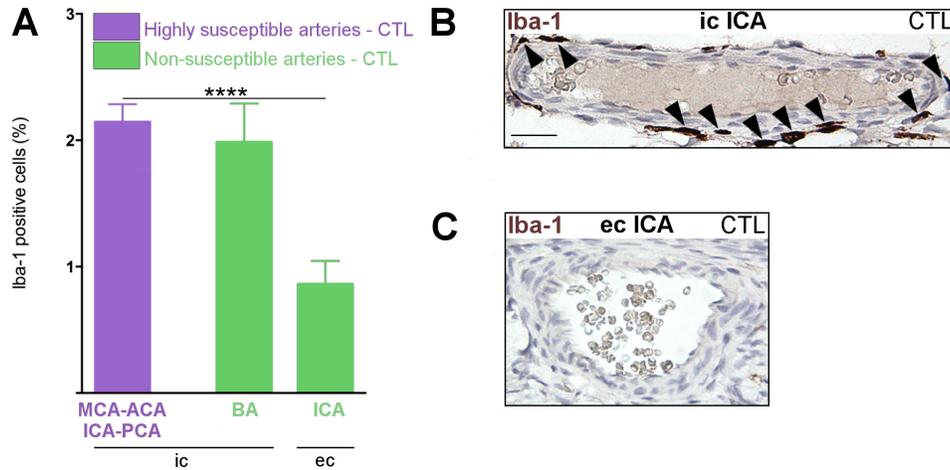
Data are presented as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Comparisons between groups were performed using one-way analysis of variance (ANOVA) with the Student-Newman-Keuls post-test, unpaired t-test with Welch correction or the chi-square test of independence. The significance level was set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

## **Results**

### **Comparison between constitutive expression of inflammatory cells and mediators within the medium-sized arterial wall of arteries susceptible vs non-susceptible to PAIS**

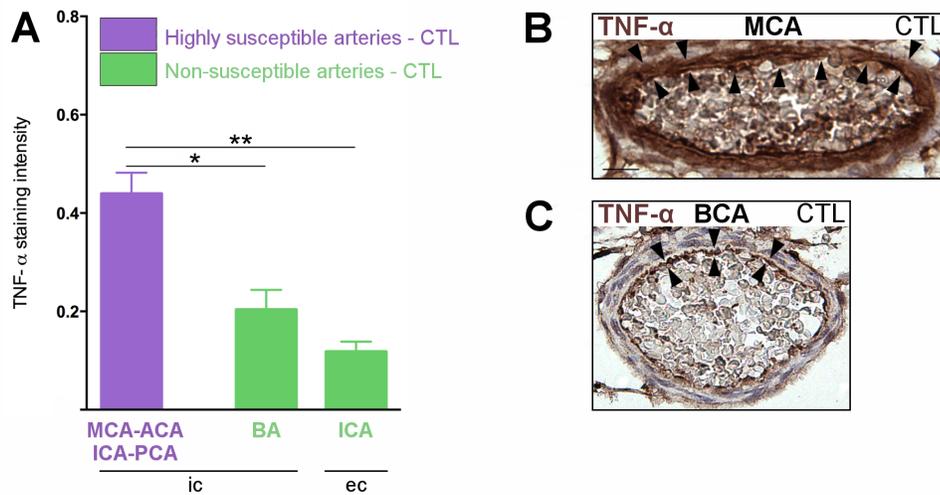
In control pups at P1, a two-fold increased density of Iba-1+ macrophages was found in the arterial wall of medium-sized segments of intra-cranial arteries, including all those

susceptible to PAIS, compared to ecICA (Fig. 1A-C). Most of these macrophages were detected within the adventitial layer of the arterial wall (Fig. 1B, C).

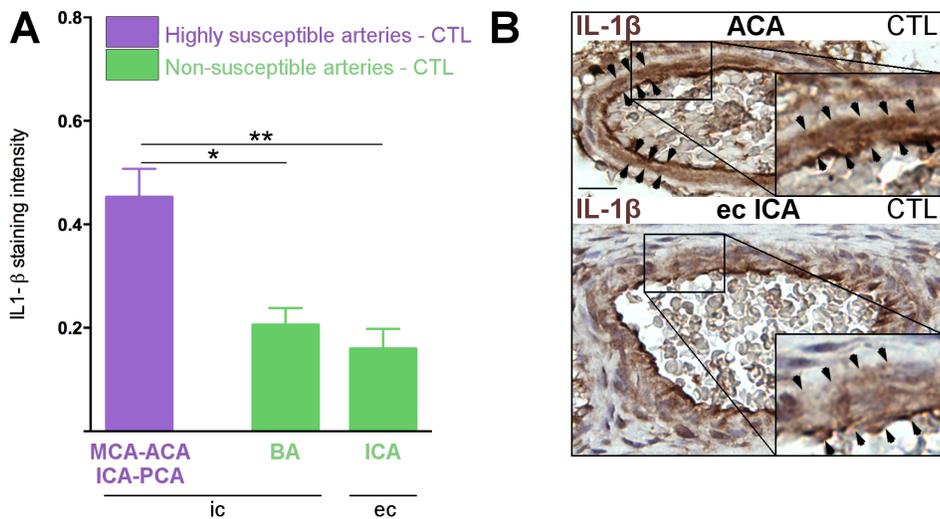


**Figure 1:** Increased constitutive density of Iba-1 positive cells in PAIS-susceptible vs non-susceptible arteries (**A**). Iba-1+ cells (*black arrowhead*) in a highly susceptible intracranial artery (icICA) (**B**) vs non-susceptible extracranial artery (ecICA) (**C**) to PAIS. \*\*\*\*  $p \leq 0.0001$ . Number ( $n$ ) = 3 to 4 animals per experimental condition. Scale bar = 15  $\mu$ m.

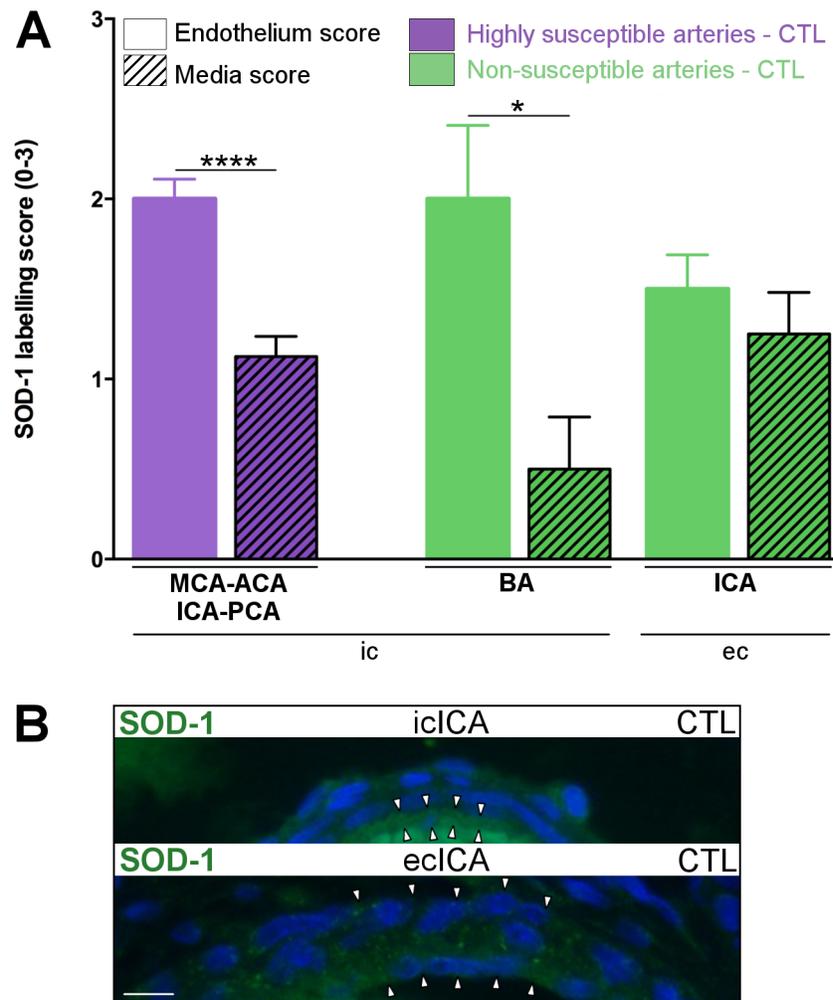
TNF- $\alpha$  (Fig. 2A-C) and IL-1 $\beta$  (Fig. 3 A, B) expressions were constitutively up-regulated in the arterial wall (predominantly in intimal and medial layers) from medium-sized segments of all susceptible - compared to non-susceptible - arteries to PAIS. The intimal vs medial level of ROS release (indirectly measured by SOD1 expression) was unbalanced (lower expression in intima than media) within intra-cranial - but not extra-cranial - arteries (Fig. 4 A, B).



**Figure 2:** Increased constitutive expression of TNF- $\alpha$  in PAIS-susceptible vs non-susceptible arteries (A). Increased TNF- $\alpha$  staining (black arrowheads) in PAIS-susceptible (MCA) (B) vs non-susceptible (BCA) (C) arteries. \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ .  $n = 3$  to 4 animals per experimental condition. Scale bar = 15  $\mu\text{m}$ .



**Figure 3:** Increased constitutive expression of IL-1 $\beta$  in PAIS-susceptible vs non-susceptible arteries (A). Increased IL-1 $\beta$  staining (black arrowheads) in PAIS-susceptible (ACA) (B) vs non-susceptible (ecICA) (C) arteries. \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ .  $n = 3$  to 4 animals per experimental condition. Scale bar = 15  $\mu\text{m}$ .

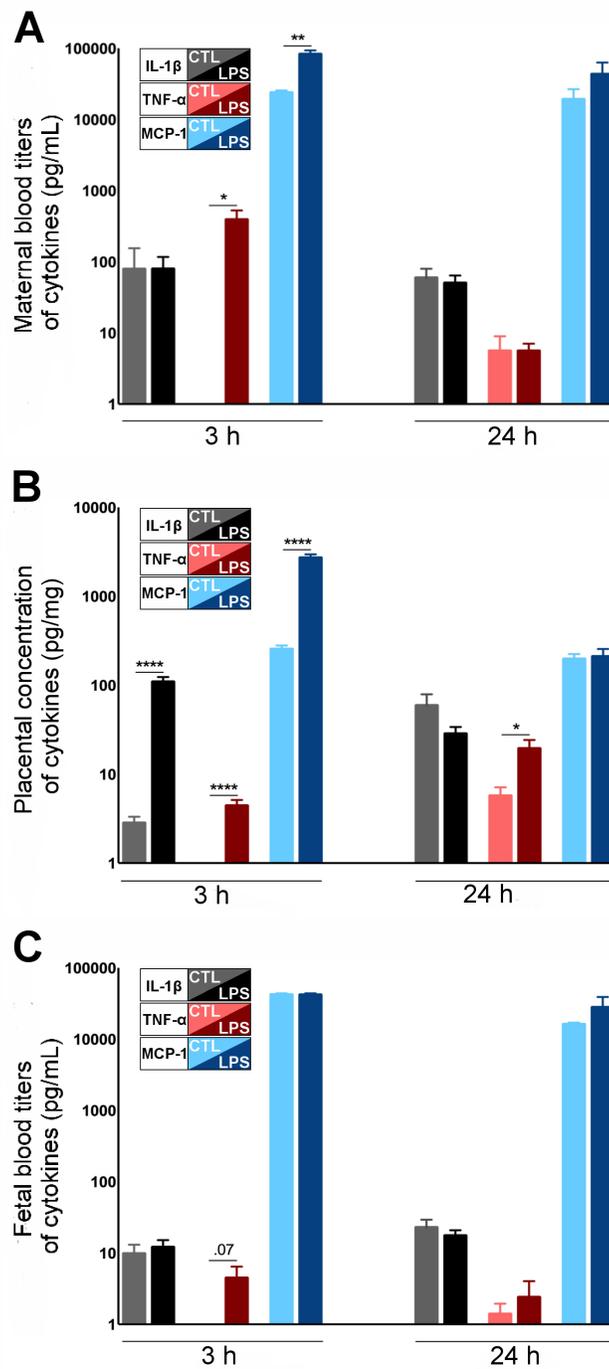


**Figure 4:** Unbalanced expression of SOD-1 between intima and media of anterior and posterior intracranial but not extra-cranial arteries (A). SOD-1 staining (*white arrowheads*) in PAIS-susceptible (icICA) vs non-susceptible (ecICA) arteries (B). \*  $p \leq 0.05$ , \*\*\*\*  $p \leq 0.0001$ .  $n = 3$  to 4 animals per experimental condition. Scale bar = 7  $\mu\text{m}$

### Inflammatory mediators involved in fetal inflammatory response syndrome

TNF- $\alpha$  and MCP-1 (but not IL-1 $\beta$ ) titers were increased in the maternal blood 3 h after the

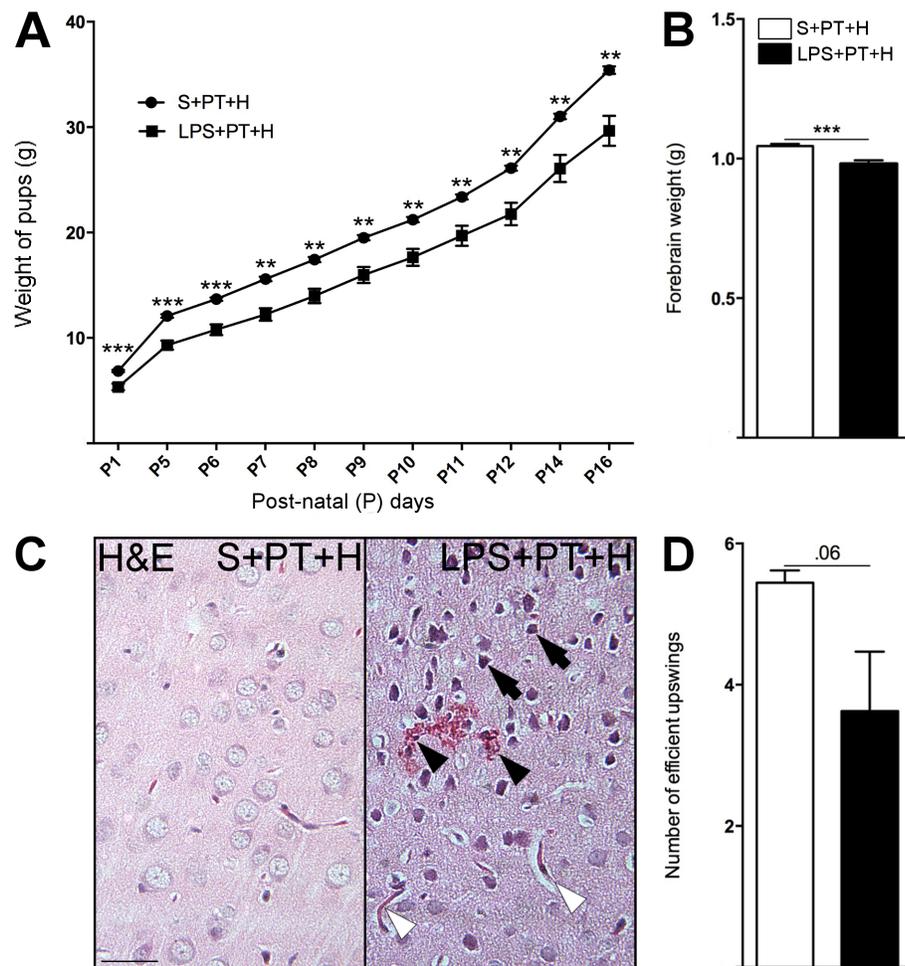
first LPS injection (Fig. 5 A). IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and MCP-1 were increased in the LPS-exposed placentas compared to the unexposed placentas at 3 h post-LPS injection (Fig. 5 B). At 24 h post-LPS injection, TNF- $\alpha$  remained increased in the LPS-exposed placentas whereas IL-1 $\beta$  and MCP-1 decreased back to the controls' levels (Fig. 5 B). In the blood of LPS-exposed fetuses, an increase of TNF- $\alpha$  (but not IL-1 $\beta$  and MCP-1) was detected at 3 h after the first LPS injection (Fig. 5 C).



**Figure 5:** Increased TNF- $\alpha$  and MCP-1 blood titers of LPS exposed dams at 3 h after the first injection of LPS (A);  $n = 3$  to 4 dams in each experimental group. ELISA showing increased IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , MCP-1 and TNF- $\alpha$  titers from LPS-exposed placentas at 3 h and 24 h after the first injection of LPS (B);  $n = 6$  to 8 placentas in each experimental group. Increased TNF- $\alpha$  fetal blood titers at 3 h after the first LPS injection (C);  $n = 6$  to 8 fetuses in each experimental group. \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*\*  $p \leq 0.0001$ .

### **Susceptibility to thrombosis in LPS-exposed - but not unexposed - MCA**

Pups from the LPS+PT+H group had a significantly lower body weight (as measured from P1 to P16) compared to those from the S+PT+H group (Fig. 6 A). A mean 6% decrease of forebrain weight was noted in P20 pups from LPS-exposed *vs* unexposed groups (Fig. 6 B). Rats from LPS+PT+H group presented PAIS characterized by pyknotic neurons, spongiosis, neovascularization, loss of normal tissue cytoarchitecture and hemorrhagic spots at P20 (Fig. 6 C). No forebrain PAIS was detected in the S+PT+H group whereas 62% of LPS+PT+H pups had at least one infarct ( $p < 0.01$ ). LPS+PT+H pups showed a significantly decreased number of efficient upswings compared to the S+PT+H pups (Fig. 6 D). LPS+PT+H pups also displayed a significantly prolonged time ( $> 1$  sec) to achieve a full righting reflex ( $p < 0.05$ ).

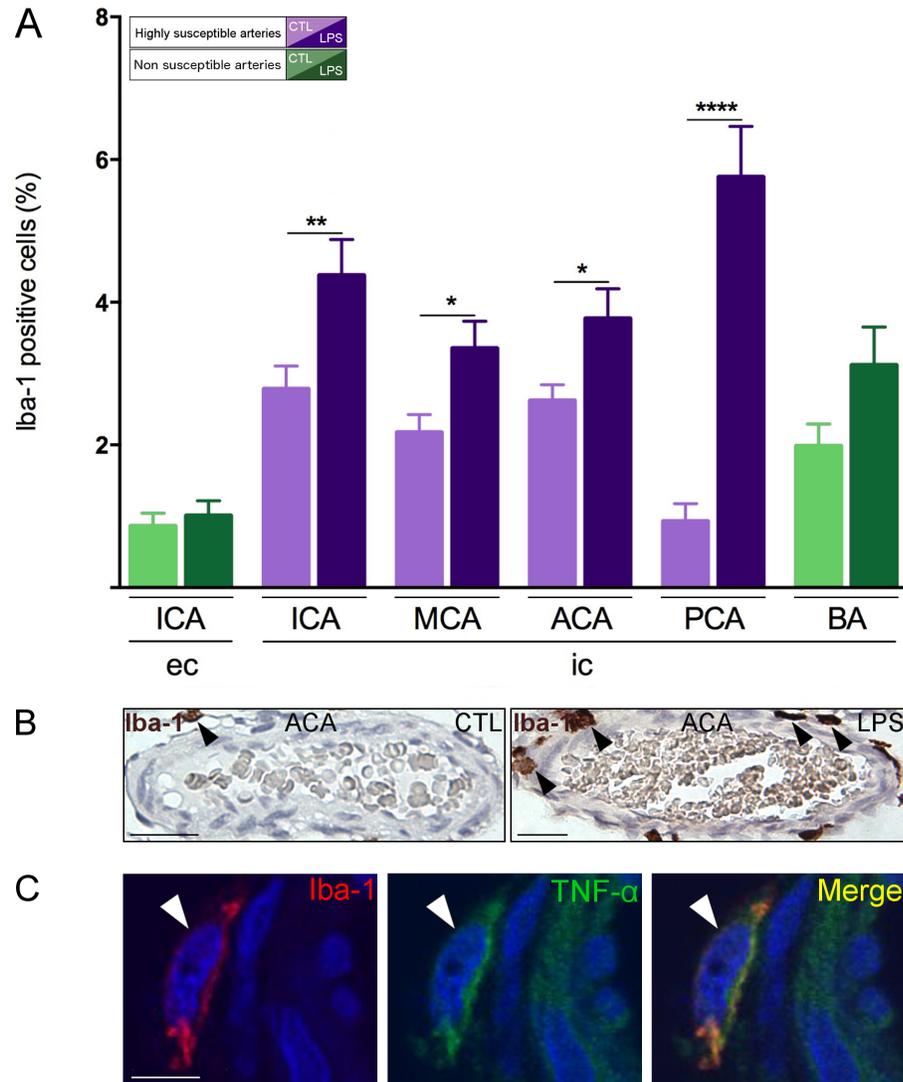


**Figure 6:** Decreased weight of the pups exposed to LPS+PT+H vs PT+H (A). Decreased weight of P20 forebrains from pups exposed to LPS+PT+H vs PT+H (B). Infarcts featured by: pyknotic neurons (*black arrows*), hemorrhagic spots (*black arrowheads*), and neovascularization (*white arrowheads*) in LPS+PT+H - but not in S+PT+H - condition (C). Decreased number of efficient upswings of the LPS +PT+H, compared to PT+H pups at P16 (D). \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ .  $n = 8$  to  $10$  pups per experimental group. Scale bar =  $30\mu\text{m}$ .

### Inflammatory cells and mediators responses within LPS-exposed cervicocephalic arterial walls:

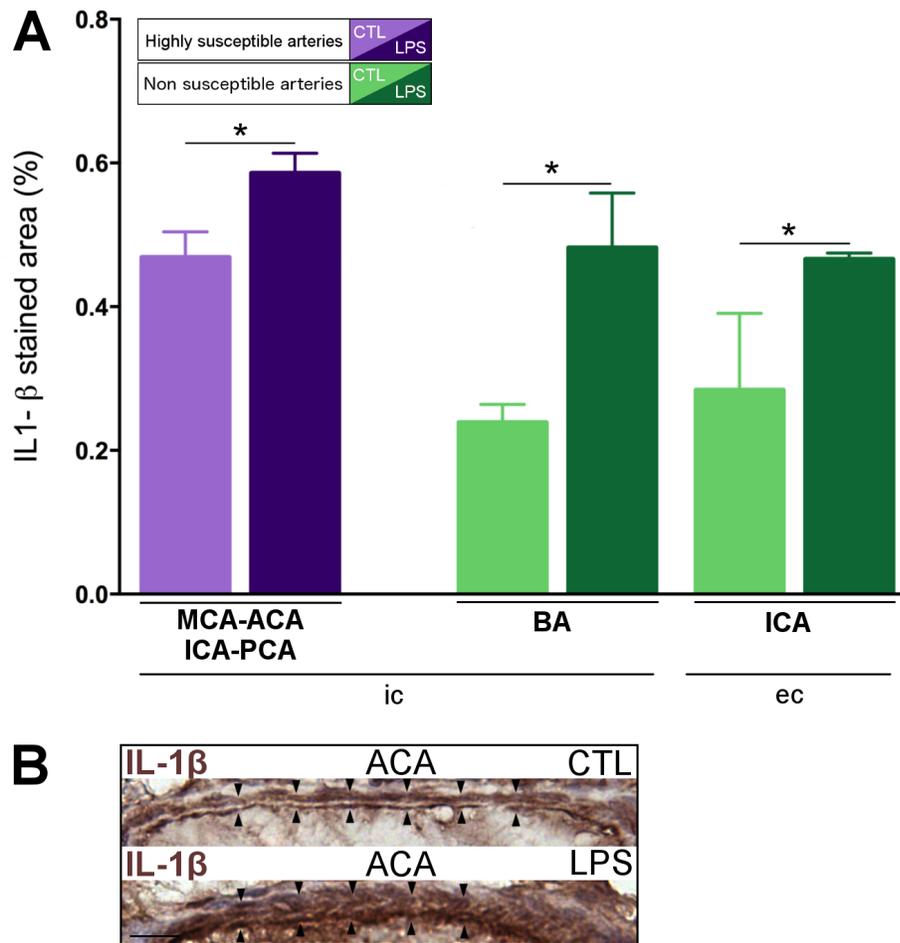
At P1, the number of macrophages detected within arterial walls from LPS-exposed pups was significantly increased in all PAIS- susceptible vs non-susceptible arteries (Fig. 7 A,

B). There were no CD3<sup>+</sup> or PMN<sup>+</sup> cells in the arterial walls in any experimental conditions. All infiltrating macrophages showed a pro-inflammatory (TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> and Arg-1<sup>-</sup>) M1 phenotype (Fig. 7 C).



**Figure 7:** Increased density of Iba-1<sup>+</sup> cells in the walls of all arteries susceptible to PAIS, but not in arterial wall of non-susceptible arteries, in P1 pups *in utero* exposed vs unexposed to LPS (A). Iba-1<sup>+</sup> cells (black arrowhead) in control (CTL) vs LPS-exposed PAIS-susceptible arteries (B). Scale bar = 15  $\mu$ m. M1 phenotype of macrophages in the arterial wall (MCA) of LPS-exposed rat pups: Iba-1 and TNF- $\alpha$  (M1, white arrowhead) double labeling (C). \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*\*  $P \leq 0.0001$ . n = 3 to 4 animals per experimental condition. Scale bar = 5  $\mu$ m.

IL-1 $\beta$  stained area was significantly increased in the arterial wall of susceptible as well as non-susceptible arteries exposed to LPS *vs* controls (Fig. 8 A, B). Adhesion molecules (ICAM-1, p-selectin, VCAM-1, CD40/CD40L), coagulation factors (tissue factor, vWF), and iNOS remained undetected by IHC and IF within the arterial wall or at the surface of endothelial cells regardless of the experimental group (data not shown). SOD-1 expression within the arterial walls was not modified by LPS exposure. Macrophages (Iba-1+) from the arterial wall of PAIS-susceptible and non-susceptible arteries were negative for PCNA (data not shown), suggesting that the increased density of macrophages within the arteries of LPS-exposed pups was more likely due to infiltration than to proliferation. Colorimetric measures of IL-1 $\beta$  and IL-1Ra staining did not show any difference in the ratio of IL-1Ra/IL-1 $\beta$  expression within the arterial wall of intra-cranial arteries between control *vs* LPS condition (data not shown).



**Figure 8:** Increased expression of IL-1 $\beta$  in LPS-exposed vs unexposed PAIS-susceptible artery (A). IL-1 $\beta$  staining (*black arrowhead*) in a PAIS-susceptible artery (ACA) exposed vs unexposed to LPS (B). \*  $p \leq 0.05$ .  $n=3$  to 4 animals per experimental condition. Scale bar = 15  $\mu\text{m}$ .

## Discussion

Physiologically, our results showed a constitutively higher density of macrophages located within the adventitia, a lower intimal expression of ROS indirectly measured by SOD-1 expression (Papa, Manfredi, & Germain, 2014), and a higher expression of TNF- $\alpha$ , and IL-1 $\beta$  within the internal layers of medium sized arteries of the intra- vs extra-cranial arteries.

This could be correlated to the vulnerability to immune-inflammatory processes affecting more intra- than extra-cranial arterial wall not only in human neonates but also later on in childhood in diseases such as moyamoya or transient cerebral arteriopathies (Amlie-Lefond, Sebire, & Fullerton, 2008; Braun et al., 2009; Chabrier et al., 2010; Yamashiro et al., 1984).

The data from our pre-clinical model of prenatal LPS and/or post-natal photothrombotic aggressions support our hypothesis that PAIS derives from the combination of multiple risks at the neonatal stage of development: (i) a fetal inflammatory response syndrome implicating circulating TNF- $\alpha$  and leading to a focal cerebral arteritis mediated by macrophages and IL-1 $\beta$ , (ii) a subthrombotic perinatal pro-coagulatory state - precipitated by the combination of LPS exposure and photothrombosis in our model - to trigger PAIS. In pups exposed to LPS *in utero*, PAIS was induced by a subthrombotic stress targeting the MCA. This effect was not seen in pups unexposed to LPS. LPS-induced maternal immune activation triggered a focal vasculitis characterized by conjoint macrophagic infiltration and IL-1 $\beta$  hyper-expression within the wall of medium-sized intracranial arteries (icICA, MCA, PCA) susceptible to PAIS in human newborns, but not in non-susceptible arteries (BA, ecICA). The distinctive phenotypes we uncovered between anterior (icICA, ACA, MCA, PCA) vs posterior (BA) intra-cranial arteries vs extra-cranial arteries (ecICA) might be related to embryological differences, namely differential neural crest cell contribution that is more important in anterior than in posterior cerebral arteries\*\*cf page54 (Bergwerff et al., 1998).

To interfere with the cerebral blood flow, the intra-cerebral anterior arteritis might either induce a focal arterial thrombosis adjacent to the inflamed arterial wall, or a vasospasm, or both. The physiological perinatal prothrombotic context, and the release of TNF- $\alpha$  we detected within the neonatal blood circulation, could contribute to such clot formation. Given that we did not detect any LPS-increased expression of tissue factor at the surface of the lumen of cerebral arteries susceptible to strokes, other thrombotic factor(s) seem(s) to be involved in triggering the thrombotic cascade. Our results showing that following maternal immune activation TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  are overexpressed in the neonatal blood circulation, or within the arterial walls susceptible to PAIS, suggest that platelets might

well be activated through the pro-coagulant effect of these pro-inflammatory cytokines (Renesto & Chignard, 1991). The higher expression of ROS in the endothelium of intracranial arteries susceptible to PAIS could also contribute to such platelet activation (Jang et al., 2014). In addition, a focal vasospasm as described in vasculitic processes might also occur in our model. Pro-inflammatory cytokines are known to increase the expression of various molecules resulting in smooth muscle cell contraction and vasospasm, such as endothelin-1 might be involved (Murray et al., 2014). Altogether, focal vasculitis, prothrombotic activation and vasospasm might act in concert in the arterial wall, and within the lumen, of cerebral arteries highly susceptible to PAIS.

This observational study has several limitations. The study of the arterial wall is based on semi-quantitative IHC due to the difficulty in extracting a sufficient amount of proteins from immature cerebral arteries of rodents to make possible the use of classic quantitative analyses. Selective dissections of such fragile arteries, which would have necessitated strenuous and lengthy dissections of the skull to access the small basal arteries; such dissection and arterial isolation without contamination by other tissues (*e.g.* meningeal tissue) and without alterations due to too long delay and trauma, remained an unresolved challenge in our hands. Further experiments on bigger animals might overcome this limitation. Due to the small amount of cerebrospinal fluid (CSF) and its difficult access in sufficient amounts of in small animals, it was not possible to monitor CSF inflammation. It is possible that the adventitial macrophagic infiltration we observed in segments of arteries located within or in the vicinity of subarachnoidal spaces would result from LPS-induced CSF inflammation. Additional pre-clinical, as well as clinical studies, for instance using non-invasive neonatal arterial wall imaging, are mandatory to further uncover the pathophysiological mechanisms underlying PAIS.

### **Acknowledgments**

We thank Johan Van Lier for providing us the photothrombotic compound. We are grateful to Brigitte Tardy, Stéphane Chabrier and Marek Rola-Pleszczynski (Université de Sherbrooke, Quebec, Canada) for helpful discussion, and to Marie-Elsa Brochu, Jean

Lainé, Khadija Taseen, and Luc Tremblay (Université de Sherbrooke) for technical assistance. We thank Myriam Srour (McGill University) for her help in the final revision of the manuscript.

### **Sources of Funding**

This work was supported by the Heart and Stroke Foundation, Canadian Institutes for Health Research (CIHR), *Fonds de la Recherche du Québec - Santé* (FRQ-S), Foundation of Stars, *Centre Mère-Enfant de l'Université de Sherbrooke*, Canada. GS and ML are members of the FRQ-S-funded *Centre de Recherche du Centre hospitalier universitaire de Sherbrooke* (CRCHUS). CG is supported by a scholarship (*bourse du Centre de recherche médicale de l'Université de Sherbrooke* (CRMUS)) from the *Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé* of the *Université de Sherbrooke*.

**Disclosures.** None

### **References**

1. Chabrier S, Saliba E, Nguyen The Tich S, Charollais A, Varlet MN, Tardy B, et al. Obstetrical and neonatal characteristics vary with birthweight in a cohort of 100 term newborns with symptomatic arterial ischemic stroke. *European journal of paediatric neurology : EJPN : official journal of the European Paediatric Neurology Society*. 2010;14(3):206-13. doi: 10.1016/j.ejpn.2009.05.004. PubMed PMID: 19541515.
2. van der Aa NE, Benders MJ, Groenendaal F, de Vries LS. Neonatal stroke: a review of the current evidence on epidemiology, pathogenesis, diagnostics and therapeutic options. *Acta paediatrica*. 2014;103(4):356-64. doi: 10.1111/apa.12555. PubMed PMID: 24428836.
3. Nelson KB, Lynch JK. Stroke in newborn infants. *The Lancet Neurology*. 2004;3(3):150-8. doi: 10.1016/S1474-4422(04)00679-9. PubMed PMID: 14980530.
4. Chabrier S, Husson B, Dinomais M, Landrieu P, Nguyen The Tich S. New insights (and new interrogations) in perinatal arterial ischemic stroke. *Thrombosis research*. 2011;127(1):13-22. doi: 10.1016/j.thromres.2010.10.003. PubMed PMID: 21055794.
5. Wu YW, Croen LA, Shah SJ, Newman TB, Najjar DV. Cerebral palsy in a term population: risk factors and neuroimaging findings. *Pediatrics*. 2006;118(2):690-7. doi: 10.1542/peds.2006-0278. PubMed PMID: 16882824.
6. Kirton A, deVeber G. Paediatric stroke: pressing issues and promising directions. *The Lancet Neurology*. 2015;14(1):92-102. doi: 10.1016/S1474-4422(14)70227-3. PubMed PMID: 25496900.

7. van der Aa NE, Dudink J, Benders MJ, Govaert P, van Straaten HL, Porro GL, et al. Neonatal posterior cerebral artery stroke: clinical presentation, MRI findings, and outcome. *Developmental medicine and child neurology*. 2013;55(3):283-90. doi: 10.1111/dmcn.12055. PubMed PMID: 23336217.
8. Kirton A, Armstrong-Wells J, Chang T, Deveber G, Rivkin MJ, Hernandez M, et al. Symptomatic neonatal arterial ischemic stroke: the International Pediatric Stroke Study. *Pediatrics*. 2011;128(6):e1402-10. doi: 10.1542/peds.2011-1148. PubMed PMID: 22123886.
9. Koelfen W, Freund M, Varnholt V. Neonatal stroke involving the middle cerebral artery in term infants: clinical presentation, EEG and imaging studies, and outcome. *Developmental medicine and child neurology*. 1995;37(3):204-12. PubMed PMID: 7890125.
10. Barmada MA, Moossy J, Shuman RM. Cerebral infarcts with arterial occlusion in neonates. *Annals of neurology*. 1979;6(6):495-502. doi: 10.1002/ana.410060606. PubMed PMID: 533248.
11. Wu YW, Lynch JK, Nelson KB. Perinatal arterial stroke: understanding mechanisms and outcomes. *Seminars in neurology*. 2005;25(4):424-34. doi: 10.1055/s-2005-923536. PubMed PMID: 16341998.
12. Lee J, Croen LA, Backstrand KH, Yoshida CK, Henning LH, Lindan C, et al. Maternal and infant characteristics associated with perinatal arterial stroke in the infant. *Jama*. 2005;293(6):723-9. doi: 10.1001/jama.293.6.723. PubMed PMID: 15701914.
13. Kirton A, deVeber G. Advances in perinatal ischemic stroke. *Pediatric neurology*. 2009;40(3):205-14. doi: 10.1016/j.pediatrneurol.2008.09.018. PubMed PMID: 19218034.
14. Lynch JK, Han CJ, Nee LE, Nelson KB. Prothrombotic factors in children with stroke or porencephaly. *Pediatrics*. 2005;116(2):447-53. doi: 10.1542/peds.2004-1905. PubMed PMID: 16061602.
15. Gunther G, Junker R, Strater R, Schobess R, Kurnik K, Heller C, et al. Symptomatic ischemic stroke in full-term neonates : role of acquired and genetic prothrombotic risk factors. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2000;31(10):2437-41. PubMed PMID: 11022077.
16. Girard S, Tremblay L, Lepage M, Sebire G. IL-1 receptor antagonist protects against placental and neurodevelopmental defects induced by maternal inflammation. *Journal of immunology*. 2010;184(7):3997-4005. doi: 10.4049/jimmunol.0903349. PubMed PMID: 20181892.
17. Girard S, Kadhim H, Larouche A, Roy M, Gobeil F, Sebire G. Pro-inflammatory disequilibrium of the IL-1 beta/IL-1ra ratio in an experimental model of perinatal brain damages induced by lipopolysaccharide and hypoxia-ischemia. *Cytokine*. 2008;43(1):54-62. doi: 10.1016/j.cyto.2008.04.007. PubMed PMID: 18511291.
18. Girard S, Sebire G, Kadhim H. Proinflammatory orientation of the interleukin 1 system and downstream induction of matrix metalloproteinase 9 in the pathophysiology of human perinatal white matter damage. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2010;69(11):1116-29. doi: 10.1097/NEN.0b013e3181f971e4. PubMed PMID: 20940629.
19. Wang-Fischer Y. *Manual of stroke models in rats*. CRC Press: Taylor & Francis Group; 2009. 332 p.
20. Ali H, Cauchon N, van Lier JE. Pd-catalyzed Heck reaction for the synthesis of isomeric metallo tetravinylsulfo phthalocyanines and their photosensitizing properties.

- Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology. 2009;8(6):868-74. doi: 10.1039/b902530h. PubMed PMID: 19492115.
21. Moore JV, West CM, Whitehurst C. The biology of photodynamic therapy. *Physics in medicine and biology*. 1997;42(5):913-35. PubMed PMID: 9172267.
  22. Levine S. Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. *The American Journal of Pathology* 1960;36:17.
  23. Savard A, Lavoie K, Brochu ME, Grbic D, Lepage M, Gris D, et al. Involvement of neuronal IL-1beta in acquired brain lesions in a rat model of neonatal encephalopathy. *Journal of neuroinflammation*. 2013;10:110. doi: 10.1186/1742-2094-10-110. PubMed PMID: 24007297; PubMed Central PMCID: PMC3844447.
  24. Papa L, Manfredi G, Germain D. SOD1, an unexpected novel target for cancer therapy. *Genes & cancer*. 2014;5(1-2):15-21. PubMed PMID: 24955214; PubMed Central PMCID: PMC4063254.
  25. Yamashiro Y, Takahashi H, Takahashi K. Cerebrovascular Moyamoya disease. *European journal of pediatrics*. 1984;142(1):44-50. PubMed PMID: 6370699.
  26. Braun KP, Bulder MM, Chabrier S, Kirkham FJ, Uiterwaal CS, Tardieu M, et al. The course and outcome of unilateral intracranial arteriopathy in 79 children with ischaemic stroke. *Brain : a journal of neurology*. 2009;132(Pt 2):544-57. doi: 10.1093/brain/awn313. PubMed PMID: 19039009; PubMed Central PMCID: PMC2640213.
  27. Amlie-Lefond C, Sebire G, Fullerton HJ. Recent developments in childhood arterial ischaemic stroke. *The Lancet Neurology*. 2008;7(5):425-35. doi: 10.1016/S1474-4422(08)70086-3. PubMed PMID: 18420156.
  28. Bergwerff M, Verberne ME, DeRuiter MC, Poelmann RE, Gittenberger-de Groot AC. Neural crest cell contribution to the developing circulatory system: implications for vascular morphology? *Circulation research*. 1998;82(2):221-31. PubMed PMID: 9468193.
  29. Renesto P, Chignard M. Tumor necrosis factor-alpha enhances platelet activation via cathepsin G released from neutrophils. *Journal of immunology*. 1991;146(7):2305-9. PubMed PMID: 2005399.
  30. Jang JY, Min JH, Chae YH, Baek JY, Wang SB, Park SJ, et al. Reactive oxygen species play a critical role in collagen-induced platelet activation via SHP-2 oxidation. *Antioxidants & redox signaling*. 2014;20(16):2528-40. doi: 10.1089/ars.2013.5337. PubMed PMID: 24093153; PubMed Central PMCID: PMC4025609.
  31. Murray KN, Girard S, Holmes WM, Parkes LM, Williams SR, Parry-Jones AR, et al. Systemic inflammation impairs tissue reperfusion through endothelin-dependent mechanisms in cerebral ischemia. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2014;45(11):3412-9. doi: 10.1161/STROKEAHA.114.006613. PubMed PMID: 25228257.

\* Note technique : cet anticorps anti-PMN est un anticorps polyclonal. Le ou les site(s) spécifiquement reconnu(s) par l'anticorps n'est(ne sont) précisé(s) ni par la compagnie, ni dans la littérature. Cependant, il est certifié par la compagnie, spécifique pour la détection des PMN.

\*\* Note : voir informations additionnelles concernant l'origine embryologique des artères et la contribution de la crête neurale dans l'introduction à la page 25.

### **C. Discussion et conclusion**

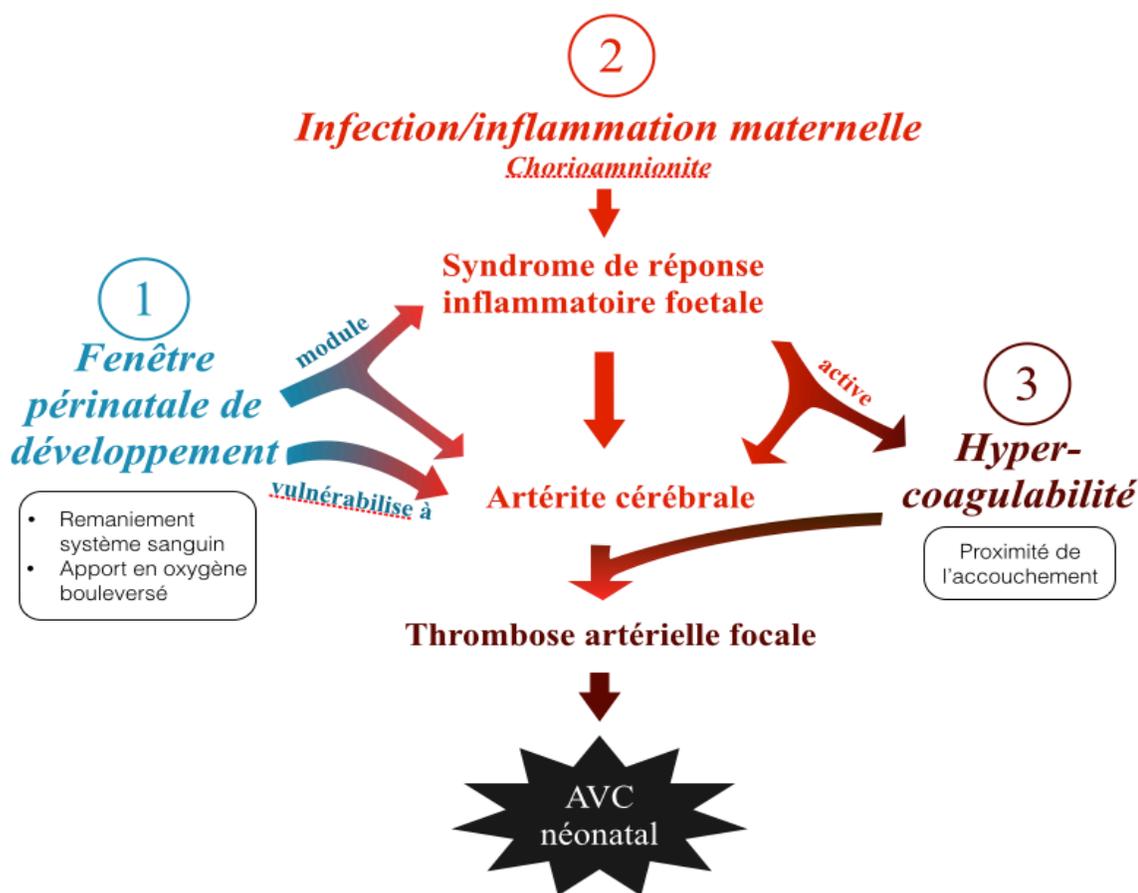
#### **Expression constitutive de marqueurs inflammatoires dans la paroi des artères les plus susceptibles à l'inflammation.**

Physiologiquement, nos résultats montrent une densité de macrophages constitutivement augmentée située dans les couches externes des artères les plus susceptibles à l'AVC (adventice ou au contact de l'adventice). De plus, ces artères présentent une expression intimale de ROS diminuée (mesurée indirectement via l'expression de SOD-1 (Papa et al., 2014) en comparaison d'artères non susceptibles à l'AVC comme l'artère carotide interne extra-crânienne (ACIec). Une expression augmentée de TNF- $\alpha$ , et d'IL-1 $\beta$  dans les couches internes des artères de moyen calibre des artères intra- vs extra-crânienne a aussi été observée. L'ensemble de ces observations - dénotant un environnement plutôt inflammatoire dans les artères intra-crâniennes - pourrait être corrélé à la vulnérabilité au processus immunologiques inflammatoires affectant plus les parois des artères intra qu'extra-crânienne. Ce tropisme des AVCp pour les artères intra-crânienne est connu non seulement chez les nouveaux-nés humains mais aussi plus tardivement dans l'enfance comme dans des maladies comme le Moyamoya ou les artériopathies cérébrales transitoires (Yamashiro et al., 1984).

#### **Exposition prénatale au LPS en combinaison avec un stress pro-thrombotique**

Chez les rats exposés *in utero* - mais pas chez ceux non-exposés - au LPS, l'AVCp est induit par un stress sub-thrombotique ciblant les ACMs. L'activation maternelle induite par le LPS provoque une vasculite focale caractérisée par une infiltration macrophagique associée à une hyper-expression d'IL-1 $\beta$  dans la paroi des artères intra-crâniennes de moyen calibre (ACIic, ACM, ACP) susceptibles aux AVCp chez les nouveaux-nés humains, mais pas dans la paroi des artères non-susceptibles à l'AVC (AB, ACIec).

Les données obtenues avec notre modèle préclinique d'exposition au LPS prénatal avec ou sans combinaison à une agression photothrombotique post-natale supportent donc notre hypothèse selon laquelle les AVCp dérivent de la combinaison de plusieurs risques lors des étapes du développement néonatal : (i) une réponse impliquant le TNF- $\alpha$  menant à une artérite cérébrale focale de la progéniture, (ii) un état sub-thrombotique périnatal - précipité dans notre modèle par la combinaison de l'exposition au LPS et à la photothrombose - pour provoquer l'AVCp (c.f. Figure 9).



**Figure 9 : hypothèse pathophysiologique de la survenue des AVCp.** La combinaison de trois facteurs ; la fenêtré périnatale de développement, l'infection ou inflammation maternelle et le phénomène d'hypercoagulabilité dû à la proximité de l'accouchement induit une artérite cérébrale provoquant l'AVC néonatal.

Les phénotypes distincts que nous avons découverts entre les artères antérieures (AClic, ACA, ACM, ACP) et postérieures (AB) intra-crâniennes vs extra-crâniennes (ACIec),

pourraient être reliés à des différences embryologiques, notamment *via* une contribution différentielle dans les artères antérieures, à contribution plutôt ectodermique, vs postérieures, à contribution plutôt mésodermique (Bergwerff et al., 1998). Pour interférer avec le flux sanguin cérébral, l'artérite antérieure intra-cérébrale pourrait soit induire une thrombose focale adjacente à la paroi artérielle inflammée, ou un vasospasme, ou la combinaison d'une thrombose et d'un vasospasme. Le contexte physiologique périnatal, ainsi que la relâche de TNF- $\alpha$  que nous avons détecté dans le flux sanguin, pourrait contribuer à la formation d'un tel caillot. Etant donné que nous n'avons pas détecté d'augmentation de facteur tissulaire à la surface de la lumière artérielle des artères susceptibles aux AVCp suite à l'exposition au LPS, d'autres facteurs thrombotiques semblent impliqués dans le déclenchement de la cascade thrombotique (par exemple, les plaquettes). Selon cette hypothèse, les plaquettes circulantes pourraient être activées par l'exposition à des médiateurs de l'inflammation produits de manière paracrine dans certains segments du flux sanguin artériel.

Nos résultats montrent que le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  sont sur-exprimés dans le flux sanguin néonatal ou dans la paroi des artères susceptibles aux AVCp suite à l'activation maternelle immune. Ces résultats suggèrent que les plaquettes pourraient être activées via des effets pro-coagulants locaux de ces cytokines pro-inflammatoires (Renesto & Chignard, 1991). L'IL-6, connue comme étant sur-exprimée dans le liquide amniotique des mères dont les enfants présentent des lésions de la substance blanche cérébrale (Burd et al., 2012; Yoon, Jun, et al., 1997), pourrait elle aussi jouer un rôle dans le déclenchement de la cascade de coagulation en provoquant une augmentation du nombre de plaquettes thrombogéniques dans la circulation sanguine (Burstein, 1997). De plus, l'expression plus importante de ROS dans l'intima comparativement à la média des artères susceptibles vs non-susceptibles aux AVCp pourrait aussi contribuer à cette activation plaquettaire. Il a été montré que les ROS produits au sein des plaquettes intervenait dans leur activation (Jang et al., 2014). Selon notre hypothèse, les ROS produites au sein de l'intima activée par l'inflammation pourraient agir localement via la lumière artérielle pour induire un phénotype prothrombotique des plaquettes.

Un vasospasme focal comme décrit dans des processus vasculitiques pourrait aussi survenir

dans notre modèle. Les cytokines pro-inflammatoires sont connues pour augmenter l'expression de plusieurs molécules provoquant la contraction des muscles lisses de l'artère et donc la survenue d'un vasospasme. Parmi ces molécules figure le NO (monoxyde d'azote, indirectement quantifié dans notre étude par l'expression de iNOS). Nous n'avons pas détecté de relâche de NO, qui aurait pu contribuer à un tel vasospasme. Cependant, d'autres médiateurs aboutissant à un vasospasme comme l'endothéline-1 pourraient être impliqués (Murray et al., 2014). Tous ces facteurs, une vasculite focale, une activation pro-thrombotique et un vasospasme pourraient agir en concert au sein de la paroi artérielle, et au contact de la lumière, des artères cérébrales susceptibles aux AVCs.

### **Limitations de notre modèle animal et perspectives**

L'étude de la paroi des artères cérébrales du raton nouveau-né à plusieurs limitations de taille. Elle est basée sur une analyse immunohistochimique semi-quantitative due à la difficulté d'extraire la quantité suffisante de protéine à partir des artères cérébrales de rongeurs pour rendre possible l'utilisation d'analyses quantitatives classiques (les segments d'intérêt ont chacun un volume inférieur à  $1\text{mm}^3$ ). De plus, la dissection sélective d'artères aussi fragile aurait nécessité des dissections fastidieuses du crâne des ratons pour avoir accès aux artères basales dont l'isolation sans la contamination par d'autres tissus (par exemple les méninges) et sans altérations dues à un trop long délai ou à un traumatisme, reste un défi irrésolu. D'autres expériences sur des animaux de plus grosse taille pourraient surmonter ces limitations.

Étant donné que la majorité des artères de la base du cerveau baignent dans le liquide céphalo-rachidien, il aurait été intéressant d'évaluer son état pro ou anti-inflammatoire. Cependant, nous n'avons pas encore été en mesure de réaliser cette étude à cause de la difficulté à accéder à une quantité suffisante de LCR chez les petits animaux. Il n'est pas exclu que l'infiltration macrophagique adventicielle que nous avons observé dans des segments d'artères localisées dans ou au voisinage des espaces sub-arachnoïdes soit due à une inflammation du LCR induite par le LPS. Il aurait été intéressant et pertinent de doser par des techniques quantitatives comme l'ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)

certaines cytokines comme le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  ou des chimiokines comme MCP-1, RANTES ou fractalkine, responsables du recrutement des macrophages à un site spécifique et de leur changement de phénotype pour un phénotype pro-inflammatoire tel qu'observé dans notre modèle au contact de l'adventice des artères exposées à l'inflammation gestationnelle. Les macrophages, au lieu d'être une conséquence de l'inflammation des artères pourraient alors être la cause de cette inflammation, notamment via leur phénotype pro-inflammatoire.

Pour confirmer notre hypothèse d'une susceptibilité à l'inflammation accrue des artères intra-crâniennes, il serait intéressant de tester l'effet neuro-protecteur de molécules bloquant sélectivement certaines voies de l'inflammation, par exemple en utilisant l'IL-1ra qui bloque l'inflammation médiée par l'IL-1  $\beta$  via un recrutement compétitif de son récepteur (Gibson, Rothwell, & Le Feuvre, 2004) ou encore en utilisant des anticorps monoclonaux bloquants le TNF- $\alpha$  (Sandborn, 2003).

Pour mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à l'AVC lorsque nous combinons l'exposition gestationnelle au LPS et le stress pro-thrombotique, la visualisation de l'arborisation cérébrale serait une alternative prometteuse. La reconstitution de la circulation artérielle permettrait de déterminer avec précision le territoire affecté par l'occlusion artérielle. De plus, cette technique permettrait de visualiser les artères inflammées puis les dommages cérébraux au cours du temps afin de comprendre comment la séquence d'évènements se met en place.

### **Conclusion :**

Les résultats obtenus avec notre modèle préclinique supportent donc notre hypothèse selon laquelle les AVCp dérivent de la combinaison de plusieurs risques lors des étapes du développement néonatal. D'une façon plus globale, ils permettent notamment de reconsidérer la réaction d'un tissu donné face à l'inflammation, ici les artères cérébrales intra-crâniennes, afin d'ajuster au mieux les traitements mis en place de façon préventive lorsqu'une infection maternelle est détectée pendant la grossesse ou suite à la détection d'une infection chez les nouveau-né. Malgré ces nouvelles données, l'éclaircissement des

mécanismes moléculaires sous-jacents des AVCp nécessitera d'autres études pré-cliniques et cliniques, par exemple en utilisant l'imagerie artérielle néonatale non-invasive.

## **D. Remerciements**

J'aimerais remercier mon directeur de recherche, le Dr Guillaume Sébire, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et permis de réaliser ma maîtrise au sein de son équipe de recherche. Il offre à ses étudiants un soutien et une écoute rares dans un milieu où les choses doivent aller vite.

Merci à Marie-Elsa pour avoir fait preuve d'une éthique de travail exemplaire sans toutefois mettre de côté l'aspect humain.

J'aimerais remercier le Dr Marek Rola-Pleszczynski pour avoir participé à mon comité de mentorat en apportant des idées, des suggestions et des encouragements au cours de mon cheminement de maîtrise.

Merci à mon comité d'évaluation d'avoir pris le temps d'apporter leurs critiques vis-à-vis de mon projet de maîtrise.

Merci à la Faculté de Médecine et des Science de la Santé pour l'octroi de la bourse de Centre de recherche médicale de l'Université de Sherbrooke (CRMUS) qui m'a supporté durant ma maîtrise.

Merci à mes collègues de travail Marie-Julie, Julie et Mathilde pour leur bonne humeur et la camaraderie qui règne au laboratoire, sans lesquelles aller au travail tous les jours ne serait pas aussi plaisant.

Pour finir, très sincèrement merci à ma famille, et à mes parents en particulier, pour la confiance dont ils ont fait preuve tout au long de mon cursus scolaire, les valeurs qu'ils m'ont inculqué et la force de caractère qu'ils m'ont transmis. Merci pour leur soutien inconditionnel dans les bons et les moins bons moments.

## E. Références

- Alberi, L., Chi, Z., Kadam, S. D., Mulholland, J. D., Dawson, V. L., Gaiano, N., & Comi, A. M. (2010). Neonatal stroke in mice causes long-term changes in neuronal Notch-2 expression that may contribute to prolonged injury. *Stroke*, *41*(10 Suppl), S64-71. doi: 10.1161/STROKEAHA.110.595298
- Ali, H., Cauchon, N., & van Lier, J. E. (2009). Pd-catalyzed Heck reaction for the synthesis of isomeric metallo tetravinylsulfo phthalocyanines and their photosensitizing properties. *Photochem Photobiol Sci*, *8*(6), 868-874. doi: 10.1039/b902530h
- Ali, M. M., Farooqui, F. A., & Sohal, G. S. (2003). Ventrally emigrating neural tube cells contribute to the normal development of heart and great vessels. *Vascul Pharmacol*, *40*(2), 133-140.
- Amlie-Lefond, C., Sebire, G., & Fullerton, H. J. (2008). Recent developments in childhood arterial ischaemic stroke. *Lancet Neurol*, *7*(5), 425-435. doi: 10.1016/S1474-4422(08)70086-3
- An, Y., Chen, Q., & Quan, N. (2011). Interleukin-1 exerts distinct actions on different cell types of the brain in vitro. *J Inflamm Res*, *2011*(4), 11-20. doi: 10.2147/JIR.S15357
- Baltimore, R. S. (2003). Neonatal sepsis: epidemiology and management. *Paediatr Drugs*, *5*(11), 723-740.
- Barmada, M. A., Moossy, J., & Shuman, R. M. (1979). Cerebral infarcts with arterial occlusion in neonates. *Ann Neurol*, *6*(6), 495-502. doi: 10.1002/ana.410060606
- Bergwerff, M., Verberne, M. E., DeRuiter, M. C., Poelmann, R. E., & Gittenberger-de Groot, A. C. (1998). Neural crest cell contribution to the developing circulatory system: implications for vascular morphology? *Circ Res*, *82*(2), 221-231.
- Bohm, F., & Pernow, J. (2007). The importance of endothelin-1 for vascular dysfunction in cardiovascular disease. *Cardiovasc Res*, *76*(1), 8-18. doi: 10.1016/j.cardiores.2007.06.004
- Boles, J. L., Ross, M. G., Beloosesky, R., Desai, M., & Belkacemi, L. (2012). Placental-mediated increased cytokine response to lipopolysaccharides: a potential mechanism for enhanced inflammation susceptibility of the preterm fetus. *J Inflamm Res*, *5*, 67-75. doi: 10.2147/JIR.S32108
- Braun, K. P., Bulder, M. M., Chabrier, S., Kirkham, F. J., Uiterwaal, C. S., Tardieu, M., & Sebire, G. (2009). The course and outcome of unilateral intracranial arteriopathy in 79 children with ischaemic stroke. *Brain*, *132*(Pt 2), 544-557. doi: 10.1093/brain/awn313
- Brown, A. S., & Susser, E. S. (2002). In utero infection and adult schizophrenia. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*, *8*(1), 51-57. doi: 10.1002/mrdd.10004
- Brozici, M., van der Zwan, A., & Hillen, B. (2003). Anatomy and functionality of leptomenigeal anastomoses: a review. *Stroke*, *34*(11), 2750-2762. doi: 10.1161/01.STR.0000095791.85737.65
- Burd, I., Balakrishnan, B., & Kannan, S. (2012). Models of fetal brain injury, intrauterine inflammation, and preterm birth. *Am J Reprod Immunol*, *67*(4), 287-294. doi: 10.1111/j.1600-0897.2012.01110.x
- Burstein, S. A. (1997). Cytokines, platelet production and hemostasis. *Platelets*, *8*(2-3), 93-104. doi: 10.1080/09537109709169324
- Castillo, A., Sola, A., Baquero, H., Neira, F., Alvis, R., Deulofeut, R., & Critz, A. (2008). Pulse oxygen saturation levels and arterial oxygen tension values in newborns

- receiving oxygen therapy in the neonatal intensive care unit: is 85% to 93% an acceptable range? *Pediatrics*, *121*(5), 882-889. doi: 10.1542/peds.2007-0117
- Chabrier, S., Husson, B., Dinomais, M., Landrieu, P., & Nguyen The Tich, S. (2011). New insights (and new interrogations) in perinatal arterial ischemic stroke. *Thromb Res*, *127*(1), 13-22. doi: 10.1016/j.thromres.2010.10.003
- Chabrier, S., Saliba, E., Nguyen The Tich, S., Charollais, A., Varlet, M. N., Tardy, B., . . . Landrieu, P. (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. doi: 10.1016/j.ejpn.2009.05.004
- Correale, J., & Villa, A. (2007). The blood-brain-barrier in multiple sclerosis: functional roles and therapeutic targeting. *Autoimmunity*, *40*(2), 148-160. doi: 10.1080/08916930601183522
- Darmency-Stamboul, V., Chantegret, C., Ferdynus, C., Mejean, N., Durand, C., Sagot, P., . . . Gouyon, J. B. (2012). Antenatal factors associated with perinatal arterial ischemic stroke. *Stroke*, *43*(9), 2307-2312. doi: 10.1161/STROKEAHA.111.642181
- Engelhardt, B. (2003). Development of the blood-brain barrier. *Cell Tissue Res*, *314*(1), 119-129. doi: 10.1007/s00441-003-0751-z
- Fatemi, S. H., Reutiman, T. J., Folsom, T. D., Huang, H., Oishi, K., Mori, S., . . . Juckel, G. (2008). Maternal infection leads to abnormal gene regulation and brain atrophy in mouse offspring: implications for genesis of neurodevelopmental disorders. *Schizophr Res*, *99*(1-3), 56-70. doi: 10.1016/j.schres.2007.11.018
- Flenady, V., Hawley, G., Stock, O. M., Kenyon, S., & Badawi, N. (2013). Prophylactic antibiotics for inhibiting preterm labour with intact membranes. *Cochrane Database Syst Rev*, *12*, CD000246. doi: 10.1002/14651858.CD000246.pub2
- Gibson, R. M., Rothwell, N. J., & Le Feuvre, R. A. (2004). CNS injury: the role of the cytokine IL-1. *Vet J*, *168*(3), 230-237. doi: 10.1016/j.tvjl.2003.10.016
- Girard, S., Heazell, A. E., Derricott, H., Allan, S. M., Sibley, C. P., Abrahams, V. M., & Jones, R. L. (2014). Circulating cytokines and alarmins associated with placental inflammation in high-risk pregnancies. *Am J Reprod Immunol*, *72*(4), 422-434. doi: 10.1111/aji.12274
- Girard, S., Kadhim, H., Beaudet, N., Sarret, P., & Sebire, G. (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. doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.10.032
- Girard, S., Kadhim, H., Larouche, A., Roy, M., Gobeil, F., & Sebire, G. (2008). Pro-inflammatory disequilibrium of the IL-1 beta/IL-1ra ratio in an experimental model of perinatal brain damages induced by lipopolysaccharide and hypoxia-ischemia. *Cytokine*, *43*(1), 54-62. doi: 10.1016/j.cyto.2008.04.007
- Girard, S., Sebire, G., & Kadhim, H. (2010). Proinflammatory orientation of the interleukin 1 system and downstream induction of matrix metalloproteinase 9 in the pathophysiology of human perinatal white matter damage. *J Neuropathol Exp Neurol*, *69*(11), 1116-1129. doi: 10.1097/NEN.0b013e3181f971e4
- Girard, S., Tremblay, L., Lepage, M., & Sebire, G. (2010). IL-1 receptor antagonist protects against placental and neurodevelopmental defects induced by maternal inflammation. *J Immunol*, *184*(7), 3997-4005. doi: 10.4049/jimmunol.0903349

- Gomez, R., Romero, R., Ghezzi, F., Yoon, B. H., Mazor, M., & Berry, S. M. (1998). The fetal inflammatory response syndrome. *Am J Obstet Gynecol*, *179*(1), 194-202.
- Gotsch, F., Romero, R., Kusanovic, J. P., Mazaki-Tovi, S., Pineles, B. L., Erez, O., . . . Hassan, S. S. (2007). The fetal inflammatory response syndrome. *Clin Obstet Gynecol*, *50*(3), 652-683. doi: 10.1097/GRF.0b013e31811ebef6
- Grome, J. J., Gojowczyk, G., Hofmann, W., & Graham, D. I. (1988). Quantitation of photochemically induced focal cerebral ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab*, *8*(1), 89-95. doi: 10.1038/jcbfm.1988.11
- Gunther, G., Junker, R., Strater, R., Schobess, R., Kurnik, K., Heller, C., . . . Childhood Stroke Study, G. (2000). Symptomatic ischemic stroke in full-term neonates : role of acquired and genetic prothrombotic risk factors. *Stroke*, *31*(10), 2437-2441.
- Hamaoka-Okamoto, A., Suzuki, C., Yahata, T., Ikeda, K., Nagi-Miura, N., Ohno, N., . . . Hamaoka, K. (2014). The involvement of the vasa vasorum in the development of vasculitis in animal model of Kawasaki disease. *Pediatr Rheumatol Online J*, *12*, 12. doi: 10.1186/1546-0096-12-12
- Jang, J. Y., Min, J. H., Chae, Y. H., Baek, J. Y., Wang, S. B., Park, S. J., . . . Chang, T. S. (2014). Reactive oxygen species play a critical role in collagen-induced platelet activation via SHP-2 oxidation. *Antioxid Redox Signal*, *20*(16), 2528-2540. doi: 10.1089/ars.2013.5337
- Kirton, A., Armstrong-Wells, J., Chang, T., Deveber, G., Rivkin, M. J., Hernandez, M., . . . International Pediatric Stroke Study, I. (2011). Symptomatic neonatal arterial ischemic stroke: the International Pediatric Stroke Study. *Pediatrics*, *128*(6), e1402-1410. doi: 10.1542/peds.2011-1148
- Kirton, A., & deVeber, G. (2009). Advances in perinatal ischemic stroke. *Pediatr Neurol*, *40*(3), 205-214. doi: 10.1016/j.pediatrneurol.2008.09.018
- Kirton, A., & deVeber, G. (2015). Paediatric stroke: pressing issues and promising directions. *Lancet Neurol*, *14*(1), 92-102. doi: 10.1016/S1474-4422(14)70227-3
- Koelfen, W., Freund, M., & Varnholt, V. (1995). Neonatal stroke involving the middle cerebral artery in term infants: clinical presentation, EEG and imaging studies, and outcome. *Dev Med Child Neurol*, *37*(3), 204-212.
- Laugesaar, R., Kolk, A., Tomberg, T., Metsvaht, T., Lintrop, M., Varendi, H., & Talvik, T. (2007). Acutely and retrospectively diagnosed perinatal stroke: a population-based study. *Stroke*, *38*(8), 2234-2240. doi: 10.1161/STROKEAHA.107.483743
- Lee, J., Croen, L. A., Backstrand, K. H., Yoshida, C. K., Henning, L. H., Lindan, C., . . . Wu, Y. W. (2005). Maternal and infant characteristics associated with perinatal arterial stroke in the infant. *JAMA*, *293*(6), 723-729. doi: 10.1001/jama.293.6.723
- Levine, S. (1960). Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. *The American Journal of Pathology*, *36*, 17.
- Lopes, M., Goupille, O., Saint Cloment, C., Lallemand, Y., Cumano, A., & Robert, B. (2011). Msx genes define a population of mural cell precursors required for head blood vessel maturation. *Development*, *138*(14), 3055-3066. doi: 10.1242/dev.063214
- Lynch, J. K., Han, C. J., Nee, L. E., & Nelson, K. B. (2005). Prothrombotic factors in children with stroke or porencephaly. *Pediatrics*, *116*(2), 447-453. doi: 10.1542/peds.2004-1905
- Mi, H., Haeberle, H., & Barres, B. A. (2001). Induction of astrocyte differentiation by endothelial cells. *J Neurosci*, *21*(5), 1538-1547.

- Moore, J. V., West, C. M., & Whitehurst, C. (1997). The biology of photodynamic therapy. *Phys Med Biol*, *42*(5), 913-935.
- Mu, D., Jiang, X., Sheldon, R. A., Fox, C. K., Hamrick, S. E., Vexler, Z. S., & Ferriero, D. M. (2003). Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha and induction of vascular endothelial growth factor in a rat neonatal stroke model. *Neurobiol Dis*, *14*(3), 524-534.
- Murray, K. N., Girard, S., Holmes, W. M., Parkes, L. M., Williams, S. R., Parry-Jones, A. R., & Allan, S. M. (2014). Systemic inflammation impairs tissue reperfusion through endothelin-dependent mechanisms in cerebral ischemia. *Stroke*, *45*(11), 3412-3419. doi: 10.1161/STROKEAHA.114.006613
- Nelson, K. B., & Lynch, J. K. (2004). Stroke in newborn infants. *Lancet Neurol*, *3*(3), 150-158. doi: 10.1016/S1474-4422(04)00679-9
- Osborn, A. G. (1998). *Diagnostic Cerebral Angiography* (Second ed.): Lippincott Williams & Wilkins.
- Pacora, P., Chaiworapongsa, T., Maymon, E., Kim, Y. M., Gomez, R., Yoon, B. H., . . . Romero, R. (2002). Funisitis and chorionic vasculitis: the histological counterpart of the fetal inflammatory response syndrome. *J Matern Fetal Neonatal Med*, *11*(1), 18-25. doi: 10.1080/jmf.11.1.18.25
- Papa, L., Manfredi, G., & Germain, D. (2014). SOD1, an unexpected novel target for cancer therapy. *Genes Cancer*, *5*(1-2), 15-21.
- Pirvulescu, M. M., Gan, A. M., Stan, D., Simion, V., Calin, M., Butoi, E., & Manduteanu, I. (2014). Subendothelial resistin enhances monocyte transmigration in a co-culture of human endothelial and smooth muscle cells by mechanisms involving fractalkine, MCP-1 and activation of TLR4 and Gi/o proteins signaling. *Int J Biochem Cell Biol*, *50*, 29-37. doi: 10.1016/j.biocel.2014.01.022
- Renesto, P., & Chignard, M. (1991). Tumor necrosis factor-alpha enhances platelet activation via cathepsin G released from neutrophils. *J Immunol*, *146*(7), 2305-2309.
- Rice, J. E., 3rd, Vannucci, R. C., & Brierley, J. B. (1981). The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol*, *9*(2), 131-141. doi: 10.1002/ana.410090206
- Rodriguez-Hernandez, A., Zador, Z., Rodriguez-Mena, R., & Lawton, M. T. (2013). Distal aneurysms of intracranial arteries: application of numerical nomenclature, predilection for cerebellar arteries, and results of surgical management. *World Neurosurg*, *80*(1-2), 103-112. doi: 10.1016/j.wneu.2012.09.010
- Sandborn, W. J. (2003). Strategies for targeting tumour necrosis factor in IBD. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, *17*(1), 105-117.
- Saugstad, O. D., Sejersted, Y., Solberg, R., Wollen, E. J., & Bjoras, M. (2012). Oxygenation of the newborn: a molecular approach. *Neonatology*, *101*(4), 315-325. doi: 10.1159/000337345
- Savard, A., Lavoie, K., Brochu, M. E., Grbic, D., Lepage, M., Gris, D., & Sebire, G. (2013). Involvement of neuronal IL-1beta in acquired brain lesions in a rat model of neonatal encephalopathy. *J Neuroinflammation*, *10*, 110. doi: 10.1186/1742-2094-10-110
- Shi, L., Fatemi, S. H., Sidwell, R. W., & Patterson, P. H. (2003). Maternal influenza infection causes marked behavioral and pharmacological changes in the offspring. *J Neurosci*, *23*(1), 297-302.

- Sierra, C., Coca, A., & Schiffrin, E. L. (2011). Vascular mechanisms in the pathogenesis of stroke. *Curr Hypertens Rep*, 13(3), 200-207. doi: 10.1007/s11906-011-0195-x
- Steffel, J., Luscher, T. F., & Tanner, F. C. (2006). Tissue factor in cardiovascular diseases: molecular mechanisms and clinical implications. *Circulation*, 113(5), 722-731. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.567297
- Uslu, S., Bulbul, A., Can, E., Zubarioglu, U., Salihoglu, O., & Nuhoglu, A. (2012). Relationship between oxygen saturation and umbilical cord pH immediately after birth. *Pediatr Neonatol*, 53(6), 340-345. doi: 10.1016/j.pedneo.2012.08.005
- van der Aa, N. E., Benders, M. J., Groenendaal, F., & de Vries, L. S. (2014). Neonatal stroke: a review of the current evidence on epidemiology, pathogenesis, diagnostics and therapeutic options. *Acta Paediatr*, 103(4), 356-364. doi: 10.1111/apa.12555
- van der Aa, N. E., Dudink, J., Benders, M. J., Govaert, P., van Straaten, H. L., Porro, G. L., . . . de Vries, L. S. (2013). Neonatal posterior cerebral artery stroke: clinical presentation, MRI findings, and outcome. *Dev Med Child Neurol*, 55(3), 283-290. doi: 10.1111/dmcn.12055
- van der Poll, T. (2008). Tissue factor as an initiator of coagulation and inflammation in the lung. *Crit Care*, 12 Suppl 6, S3. doi: 10.1186/cc7026
- Wang-Fischer, Y. (2009). *Manual of stroke models in rats* (Y. Wang-Fischer Ed.). CRC Press: Taylor & Francis Group.
- Wu, Y. W., Croen, L. A., Shah, S. J., Newman, T. B., & Najjar, D. V. (2006). Cerebral palsy in a term population: risk factors and neuroimaging findings. *Pediatrics*, 118(2), 690-697. doi: 10.1542/peds.2006-0278
- Wu, Y. W., Lynch, J. K., & Nelson, K. B. (2005). Perinatal arterial stroke: understanding mechanisms and outcomes. *Semin Neurol*, 25(4), 424-434. doi: 10.1055/s-2005-923536
- Yamashiro, Y., Takahashi, H., & Takahashi, K. (1984). Cerebrovascular Moyamoya disease. *Eur J Pediatr*, 142(1), 44-50.
- Yoon, B. H., Jun, J. K., Romero, R., Park, K. H., Gomez, R., Choi, J. H., & Kim, I. O. (1997). Amniotic fluid inflammatory cytokines (interleukin-6, interleukin-1beta, and tumor necrosis factor-alpha), neonatal brain white matter lesions, and cerebral palsy. *Am J Obstet Gynecol*, 177(1), 19-26.
- Yoon, B. H., Kim, C. J., Romero, R., Jun, J. K., Park, K. H., Choi, S. T., & Chi, J. G. (1997). Experimentally induced intrauterine infection causes fetal brain white matter lesions in rabbits. *Am J Obstet Gynecol*, 177(4), 797-802.

## **F. Annexes**

Nous avons observé une augmentation du nombre de macrophages (Iba-1<sup>+</sup>) montrant un phénotype pro-inflammatoire dans les artères cérébrales intra-crâniennes de la progéniture suite à leur exposition au LPS gestationnel. Ces résultats nous ont poussé à questionner l'origine de ses macrophages. Nous avons donc voulu déterminer s'ils provenaient de la prolifération ou d'un recrutement d'une population de macrophages à partir des tissus environnants. Comme mentionné dans l'article, un double marquage Iba-1 + PCNA (proliferating cell nuclear antigen) nous a permis de déterminer que les macrophages ne provenaient pas d'une prolifération à partir des tissus environnants mais qu'ils étaient probablement attirés dans les artères par d'autres facteurs. Nous avons donc voulu savoir si les macrophages que nous détectons dans les espaces sub-arachnoïdiens montraient un phénotype particulier. De plus, nous avons voulu évaluer indirectement le statut inflammatoire du liquide céphalo-rachidien en observant la réaction des composantes de la barrière hémato-encéphalique à son contact.

### **1. Matériel et méthodes supplémentaires**

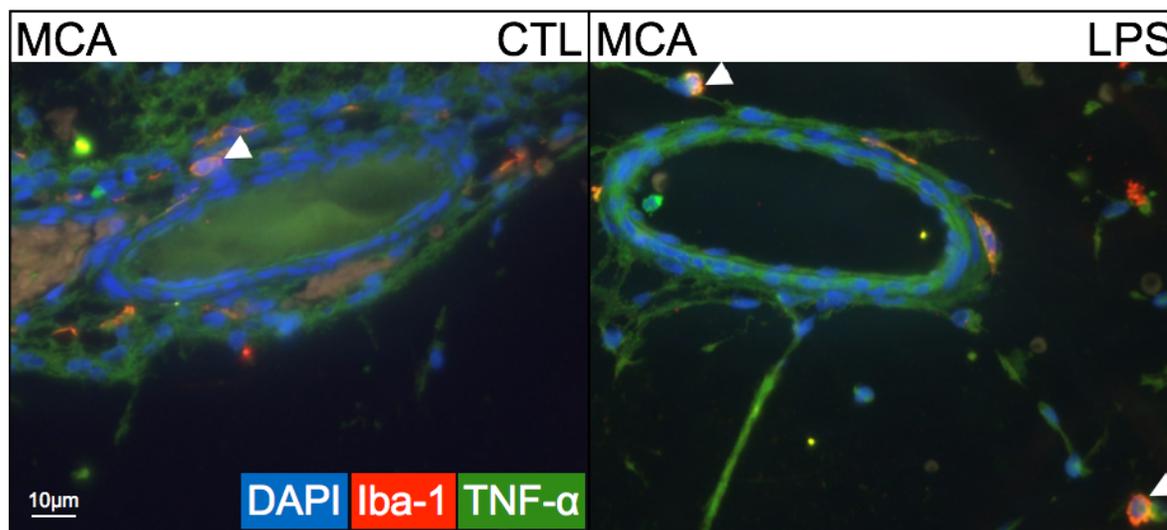
Les rats sont euthanasiés par décapitation au jour postnatal 1. La tête entière est fixée dans du paraformaldéhyde 4% puis incluse en paraffine. Les immunofluorescences sont réalisées comme décrite précédemment (Girard et al., 2008). Des sections entières de la tête sont incubées avec les anticorps suivants et leurs anticorps secondaires correspondant : ionized calcium binding adapter molecule-1 (Iba-1, 1:250, Wako, 019-19741, VA, USA), tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ , 1:50, Millipore, AB1837P, MA, USA), von Willebrand Factor (VWF, 1:40, LS Bio, LS-B4034 / 48362, WA, USA), glial fibrillary acid protein (GFAP, 1: 100, BD Pharmingen, 556330, Ont., Canada).

### **2. Résultats supplémentaires**

#### **Phénotypes des macrophages observés dans les espaces sub-arachnoïdiens**

L'étude du phénotype pro- ou anti-inflammatoire des macrophages a été réalisée par

l'analyse du marquage par immunofluorescence. Les cellules Iba-1<sup>+</sup> présentes dans les espaces sub-arachnoïdiens exhibent un phénotype pro-inflammatoire (TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>) et ce dans les cerveaux de la progéniture exposées ou non à l'inflammation (c.f. Figure 1).

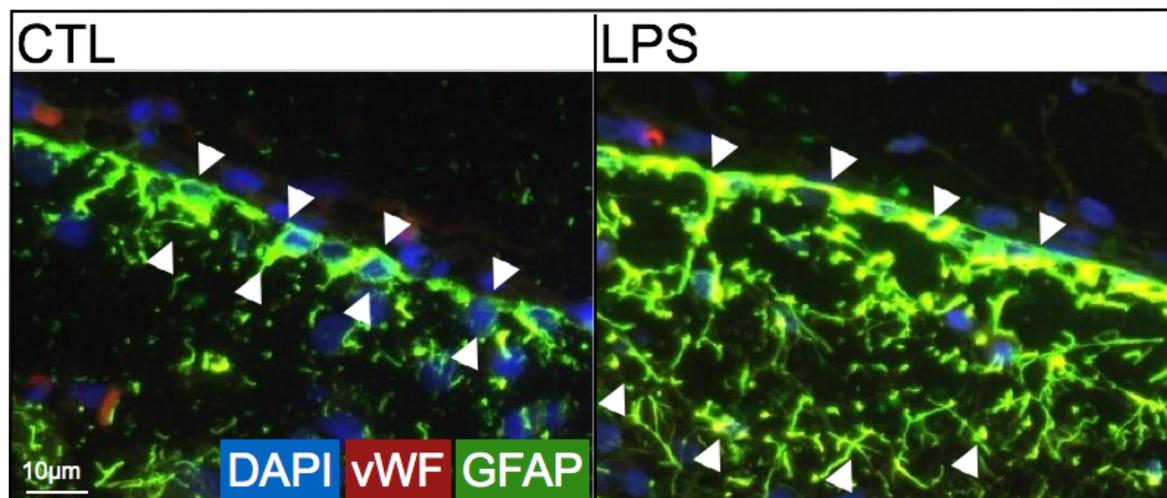


**Figure 1 : Phénotype pro-inflammatoire des macrophages observés dans les espaces sous-arachnoïdiens.** Les macrophages des espaces sous-arachnoïdiens sont TNF- $\alpha$  + à la fois chez la progéniture de mère non-exposées au LPS gestationnel (gauche) et chez la progéniture de mères exposées au LPS prénatal (droite), n = 2 animaux par condition

### Réaction du parenchyme cérébral au contenu du liquide céphalo-rachidien

Le marquage vWF permet la détection des cellules endothéliales composant la barrière hémato-encéphalique tandis que le marquage GFAP met en évidence la présence des pieds d'astrocytes permettant l'étanchéité de ces artères (Mi, Haeberle, & Barres, 2001). Le double marquage vWF + GFAP indique la présence d'une structure de barrière hémato-encéphalique en bordure du parenchyme cérébral des rats issus de mère non-exposées à l'inflammation gestationnelle (c.f. Figure 2, gauche). Une augmentation importante de l'expression de ces marqueurs est observée dans le cerveau de la progéniture des mères exposées à l'inflammation gestationnelle médiée par le LPS (c.f. Figure 2, droite). De plus, la surface marquée en bordure du parenchyme cérébral est proportionnellement plus grande

chez les rats exposés à l'inflammation gestationnelle vs ceux non-exposés (c.f. Figure 2, droite).



**Figure 2 : Inflammation du parenchyme cérébral au contact du liquide céphalo-rachidien.** Augmentation de l'expression des marqueurs de la barrière hémato-encéphalique (VWF<sup>++</sup>, GFAP<sup>++</sup>) dans le parenchyme cérébral en contact avec le liquide céphalo-rachidien chez la progéniture exposée à l'inflammation gestationnelle (droite) en comparaison du parenchyme cérébral de la progéniture des mères non-exposées au LPS gestationnel (gauche), n = 2 animaux par condition.

### 3. Discussion des résultats supplémentaires

La présence de cellules Iba-1+ TNF- $\alpha$  + dans les espaces sous-arachnoïdiens suggère un rôle des macrophages dans l'inflammation des artères intra-crâniennes exposées à l'inflammation gestationnelle. Comme mentionné plus haut (c.f. Discussion et conclusions), ces macrophages pourraient permettre la transduction de l'inflammation aux artères intra-crâniennes via leur infiltration dans la paroi de ces artères et leur phénotype pro-inflammatoire. De plus, une augmentation du nombre total de ces macrophages pourrait accentuer ce phénomène. Il serait donc pertinent de réaliser le décompte de ces cellules afin de mieux apprécier leur rôle dans les phénomènes sous jacents à l'inflammation des artères. Cependant, étant donné que toutes les cellules contenues dans le liquide céphalo-rachidien

(LCR) ne restent pas en place suite à l'euthanasie (par décapitation) et à la fixation du crâne dans le paraformaldéhyde 4%, le décompte en histologie du nombre de macrophages présents dans les espaces sous-arachnoïdiens serait fortement biaisé. Il serait donc pertinent de réaliser des ponctions de LCR afin de pouvoir apprécier le nombre absolu de cellules en suspension à l'intérieur.

La réaction importante des composantes de la barrière hémato-encéphalique en contact avec le contenu du LCR des rats exposés à l'inflammation gestationnelle suggère un rôle prépondérant du LCR dans l'inflammation artérielle observée dans notre modèle. En effet, la présence de cytokines pro-inflammatoires dans le LCR pourrait expliquer la réaction du parenchyme cérébral à son contact, c'est à dire un renforcement de la barrière hémato-encéphalique via une sur-expression de ses principaux constituants dans le but d'empêcher l'entrée non-sélective dans le cerveau de molécules présentes dans le flux sanguin. La présence de cytokines et/ou chimiokines pro-inflammatoires dans le LCR (où baigne la majorité des artères qui font l'objet de notre étude) pourrait éclaircir la voie de propagation de l'inflammation induite par le LPS. En effet, les artères les plus susceptibles à l'AVC artériel ischémique néonatal sont aussi celles les plus exposées au LCR. Cependant, pour éclaircir le rôle du LCR dans l'inflammation des artères cérébrales des nouveau-nés exposés à l'inflammation gestationnelle, la mise en place d'autres modèles animaux est nécessaire. En effet les très petits volumes de LCR accessibles (5 - 10 microlitres) chez les rats de P1 à P3 ainsi que l'impossibilité de ponctionner plusieurs fois le même animal, rendent difficile voire impossible l'étude du contenu du LCR par des méthodes classiques de quantification (telles que l'ELISA). L'utilisation d'animaux plus gros tels que l'agneau permettrait de surpasser ces limitations.