



Université de Sherbrooke

**Effets neuroprotecteurs de l'hypothermie dans un modèle  
d'encéphalopathie néonatale combinant l'inflammation et  
l'hypoxie-ischémie**

Par  
Mathilde Chevin  
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  
Juillet, 2016

Membres du jury d'évaluation  
Guillaume Sébire, programme d'immunologie, UdeS  
Claire Dubois, programme d'immunologie, UdeS  
Pia Wintermark, département de pédiatrie, McGill University

© Mathilde Chevin, 2016

*« Trouver d'abord, chercher après. »*

*Jean Cocteau*

# Effets neuroprotecteurs de l'hypothermie dans un modèle d'encéphalopathie néonatale combinant l'inflammation et l'hypoxie-ischémie

Par Mathilde Chevin  
Département de pédiatrie

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

L'encéphalopathie néonatale (EN) affecte plus de 0.8% des nouveau-nés à terme et est la deuxième cause d'handicap neurologique durant l'enfance. Le traitement des enfants atteints d'EN consiste en une prise en charge symptomatique et en l'hypothermie (HT). Néanmoins, plus de 50% des patients traités par HT gardent des séquelles neurologiques majeures. Les données provenant du *Canadian Cerebral Palsy Registry* montrent que l'HT prévient seulement 4% des cas de paralysie cérébrale (PC). Le fait que l'HT ait des effets neuroprotecteurs chez certains nouveau-nés, mais pas chez tous les nouveau-nés atteints d'EN n'est pas encore totalement élucidé. Il a été rapporté que les nouveau-nés exposés à l'inflammation (sepsis néonatal, infections placentaires) et à l'hypoxie-ischémie (HI) semblent avoir moins d'effets bénéfiques de l'HT que ceux qui ont été seulement exposés à l'HI. Des études précliniques ont établi que l'HT avait des effets neuroprotecteurs dans les cas d'encéphalopathies hypoxique-ischémiques chez les nouveau-nés à terme ou peu prématurés (plus de 35 semaines d'âge gestationnel). Cependant, peu d'études ont investigué les effets de l'HT lorsque l'EN résulte de la combinaison d'HI et d'infection/inflammation, alors qu'il s'agit du scénario pathophysiologique le plus fréquemment rencontré chez les nouveau-nés humains atteints d'EN. Ceci nous a amené à tester les effets neuroprotecteurs de l'HT dans un modèle animal (rat) d'EN induite par l'inflammation et l'HI. Des rats Lewis au jour postnatal 12 sont injectés avec du lipopolysaccharide (LPS) d'*E.coli* afin de recréer l'inflammation, puis sont soumis à l'ischémie (ligature de la carotide commune droite) et à l'hypoxie (8% O<sub>2</sub>, 1h30). Les rats sont ensuite traités ou non par l'HT (32 ± 0.5°C, 4 h). L'étendue des lésions cérébrales ainsi que les cascades inflammatoires et oxydatives ont été étudiées. Nos résultats montrent que l'HT prévient l'étendue des lésions dans la composante de pénombre ischémique (néocortex et hippocampe). Cet effet neuroprotecteur est indépendant d'un effet anti-inflammatoire cérébral de l'HT portant sur le système de l'interleukine-1. Nos données indiquent que l'HT module l'expression des enzymes responsables de l'élimination des réactifs de l'oxygène (ROS). En conclusion, nos résultats montrent que l'HT a des effets neuroprotecteurs dans un modèle d'EN induite par l'exposition combinée au LPS et à l'HI. Ce projet devrait ouvrir des perspectives translationnelles pour prévenir la PC au-delà de l'hypothermie seule, comme par exemple celle visant à tester le bénéfice de la combinaison thérapeutique d'HT jointe au blocage de cytokines pro-inflammatoires.

Mots clés : Encéphalopathie néonatale, inflammation, hypothermie, neuroprotection, interleukin-1.

## TABLE DES MATIERES

<b>Résumé</b> .....	<b>iv</b>
<b>Table des matières</b> .....	<b>v-vi</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>vvi-viii</b>
<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>viii</b>
<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>ix-x</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>1-31</b>
<b>1.1 L'encéphalopathie du nouveau-né à terme : aspects cliniques</b> :.....	<b>1-7</b>
1.1.1 Généralités sur l'encéphalopathie néonatale (EN) :.....	1-3
1.1.2 Évolution clinique à long terme de l'EN : .....	3-4
1.1.3 Régions du cerveau principalement touchées par l'EN et la paralysie cérébrale (PC) :.....	4-5
1.1.4 Causes et facteurs de risques de l'EN :.....	5-7
1.1.4.1 Aggressions <i>antepartum</i> :.....	5-6
1.1.4.2 Aggressions <i>intrapartum</i> :.....	6
1.1.4.3 Implication de l'infection-inflammation : .....	6-7
<b>1.2 Les traitements dans l'EN d'origine hypoxique-ischémique (HI) : ...</b>	<b>8-15</b>
1.2.1 Données précliniques sur l'EHI :.....	8-9
1.2.2 Essais thérapeutiques de l'hypothermie (HT) dans l'EHI : .....	9-12
1.2.3 Les limitations de l'HT :.....	12-13
1.2.4 Autres approches thérapeutiques en développement :.....	13-15
<b>1.3 La genèse des lésions cérébrales dans l'EN</b> : .....	<b>15-23</b>
1.3.1 Les mécanismes contribuant aux dommages cérébraux :.....	15-17
1.3.2 La mort neuronale :.....	18-23
1.3.2.1 La nécrose :.....	18-19
1.3.2.2 L'apoptose : .....	19-21
1.3.2.3 La nécroptose :.....	21-23
<b>1.4 L'inflammation dans l'EN</b> :.....	<b>24-31</b>

1.4.1	Les cellules immunitaires dans l'inflammation induite par l'EN : .....	24-25
1.4.1.1	Les microglies : .....	24
1.4.1.2	Les astrocytes : .....	24-25
1.4.1.3	Les polymorphonucléaires neutrophiles (PMN) : .....	25
1.4.2	Les médiateurs de l'inflammation cérébrale : .....	25-27
1.4.2.1	Les cytokines : .....	25-26
1.4.2.2	Les chimiokines : .....	26
1.4.2.3	Les récepteurs reconnaissant les pathogènes : .....	26-27
1.4.3	Le stress oxydatif : .....	27-29
1.4.3.1	Les molécules pro-oxidantes : .....	27
1.4.3.2	Les molécules antioxydantes : .....	27-29
1.4.3.3	Le stress oxydatif dans l'EN : .....	29
1.4.4	Modèles animaux d'exposition au LPS+HI : .....	30-31
<b>1.5</b>	<b>Hypothèse de recherche : .....</b>	<b>32</b>
1.5.1	Objectifs : .....	32
<b>Article :</b>	.....	<b>33-52</b>
<b>Discussion :</b>	.....	<b>53-59</b>
1	Effet de l'HT sur l'étendue des lésions induites par l'exposition au LPS+HI : .....	53-54
2	L'HT ne module pas l'expression de marqueurs inflammatoires induits par l'exposition au LPS+HI : .....	54-56
3	L'HT augmente l'expression d'enzymes antioxydantes : .....	56-59
4	Limitations de l'étude : .....	59
5	Suite du projet et pertinence avec la clinique : .....	60-61
<b>Conclusion :</b>	.....	<b>62</b>
<b>Remerciements :</b>	.....	<b>63-64</b>
<b>Liste des références :</b>	.....	<b>65-77</b>

## LISTE DES FIGURES

### Introduction

Figure 1 : Histopathologie et aspect radiologique de cerveaux de nouveau-nés à terme atteints d'EHI. ....	5
Figure 2 : Combinaison inflammation/infection et HI dans les EN.....	7
Figure 3 : Asynchronie des principaux processus du développement cérébral (volume cérébral, prolifération et migration neuronale, synaptogénèse, mise en place des neurones de la sous-plaque, myélinisation) des principales espèces animales utilisées comme modèle d'encéphalopathie néonatale, comparativement à l'humain.....	9
Figure 4 : Mécanismes contribuant aux dommages cérébraux et aux handicaps à long-terme dans l'EHI. ....	17
Figure 5 : Schéma récapitulatif des deux voies de l'apoptose : extrinsèque et intrinsèque long-terme dans l'EN d'origine HI. ....	21
Figure 6 : Schéma des cascades apoptotique et nécroptotique ayant pour origine la liaison du TNF- $\alpha$ à son récepteur. ....	23
Figure 7 : Cascades de production et élimination des ROS. ....	29
Figure 8 : L'impact neurotoxique de l'HI est potentialisé par le lipopolysaccharide (LPS) d' <i>E. coli</i> dans un modèle préclinique.....	31

*\*Je dispose des autorisations requises pour la reproduction de ces figures publiées dans la littérature*

### Article

Figure 1: Experimental design. ....	38
Figure 2: Comparison of the extent of brain injuries between LPS+HI $\pm$ HT conditions. ....	42
Figure 3: Inflammatory mediators' expressions within the right cerebral hemisphere exposed to LPS+HI $\pm$ HT.....	44

Figure 4: SOD-1, CAT, and GPX-1 expressions within the LPS+HI±HT-exposed right forebrain.....	46
Figure 5: RIP-3 expression within the LPS+HI±HT-exposed right forebrain. ....	47

## Discussion

Figure 1 : Comparaison de l'étendue des lésions cérébrales entre les conditions LPS+HI±HT±IL-1Ra.....	56
Figure 2 : Modulation des voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose par l'HT. ....	58
Figure 2 : Le système Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap 1)-Nrf2. ....	59

## LISTE DES TABLEAUX

### Introduction

Tableau 1 : Critères d'éligibilité à l'hypothermie thérapeutique des enfants atteints d'EN. ....	2
Tableau 2 : Critères d'évaluation du score d'Apgar. ....	3
Tableau 3 : Classification des degrés de sévérité dans l'EN. ....	4
Tableau 4 : Évaluation pédiatrique d'enfants entre 6 et 7 ans ayant eu une EHI à la naissance, traités ou non par HT. ....	12
Tableau 5 : Essais thérapeutiques précliniques et cliniques combinant l'HT à d'autres interventions.....	14

### Article

Table: <i>List and features of antibodies</i> .....	40
---	----

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

<b>APAF-1</b>	<i>Apoptotic protease activating factor-1</i>
<b>ATP</b>	Adénosine triphosphate
<b>BHE</b>	Barrière hémato-encéphalique
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Calcium
<b>CAT</b>	Catalase
<b>CINC-1</b>	<i>Cytokine-induced neutrophil chemoattractant</i>
<b>Cyt-c</b>	Cytochrome-c
<b>DAMPs</b>	<i>Damage-associated molecular pattern molecules</i>
<b>Drp-1</b>	<i>Dynammin-related protein 1</i>
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>EHI</b>	Encéphalopathie hypoxique-ischémique
<b>EN</b>	Encéphalopathie néonatale
<b>EPO</b>	Érythropoïétine
<b>FADD</b>	<i>Fas-associated protein with death domain</i>
<b>FasR</b>	<i>Fas receptor</i>
<b>GPX-1/GSH-Px</b>	Glutathion peroxydase
<b>GSH</b>	Glutathion
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peroxyde d'hydrogène
<b>HI</b>	Hypoxie-ischémie
<b>HSP</b>	<i>Heat shock proteins</i>
<b>HT</b>	Hypothermie
<b>IFN-γ</b>	Interféron gamma
<b>IGF-1</b>	<i>Insulin-growth factor-1</i>
<b>IL</b>	Interleukine
<b>IL-1Ra</b>	Antagoniste au récepteur de l'IL-1
<b>iNOS</b>	<i>Inducible nitric oxide synthase</i>
<b>IRM</b>	Imagerie par résonance magnétique
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharide
<b>MCP-1</b>	<i>Monocyte chemoattractant protein 1</i>
<b>MLKL</b>	<i>Mixed lineage kinase domain-like protein</i>
<b>MMPs</b>	Métalloprotéinases
<b>NAC</b>	N-Acétylcystéine
<b>NADPH oxidase</b>	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase</i>
<b>NLRs</b>	<i>Nod-like receptors</i>
<b>NMDA</b>	N-méthyl-d-aspartate glutamate
<b>NO</b>	Oxide Nitrique
<b>NOS2</b>	<i>Nitric oxide synthase 2</i>
<b>Nrf2</b>	<i>nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>
<b>NSA</b>	Nécrosulfonamide
<b>PAMP</b>	Patrons moléculaires associées aux pathogènes
<b>PRR</b>	Récepteurs reconnaissant les pathogènes
<b>RIPs</b>	<i>Receptor interacting protein</i>

<b>RNS</b>	<i>Reactive nitrogen species</i>
<b>ROS</b>	<i>Reactive oxygen species</i>
<b>SGB</b>	Streptocoques de groupe B
<b>SNC</b>	Système nerveux central
<b>SOD-1</b>	Super oxide dismutase-1
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	<i>Transforming growth factor <math>\beta</math></i>
<b>TLRs</b>	<i>Toll-like receptors</i>
<b>TNFR</b>	<i>Tumor necrosis factor receptor</i>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
<b>TRADD</b>	<i>Tumor necrosis factor receptor type 1-associated death</i>
<i>domain protein</i>	

## INTRODUCTION

### 1.1 L'encéphalopathie du nouveau-né à terme : aspects cliniques :

#### 1.1.1 Généralités sur l'encéphalopathie néonatale (EN) :

L'encéphalopathie néonatale (EN) est un syndrome caractérisé par des anomalies cliniques du système nerveux central qui se manifestent chez le nouveau-né à terme (naissance après la 37<sup>e</sup> semaine de gestation), soit entre la naissance et le 28<sup>e</sup> jour de vie (Ferriero and Koch 1985).

Les patients atteints d'EN présentent une baisse du niveau de conscience allant jusqu'au coma, des crises d'épilepsies, des difficultés alimentaires et respiratoires, un faible tonus et des réflexes archaïques anormaux (Wu et al. 2004). Les causes de l'EN sont multiples. Elles peuvent se combiner et ne sont pas toujours clairement identifiées. La discrimination entre causes établies, facteurs de risques et éventuelles associations fortuites est encore débattue. En effet, les mécanismes et les causes précises de l'EN restent incertaines dans une fraction importante de patients, et ce malgré tous les efforts de recherche de la part des obstétriciens et des pédiatres (Committee on Obstetric Practice, American College of Obstetricians and Gynecologists 2005; Wu et al. 2004) . Néanmoins, les efforts de clarification des mécanismes physiopathologiques conduisant à l'EN ont permis d'établir des critères diagnostiques définissant une sous-catégorie qui est l'encéphalopathie hypoxique-ischémique (EHI). L'EHI représente 10% à 20% des EN. Les critères diagnostiques de l'EHI sont présentés au tableau 1. Comme décrit dans le tableau, un faible score d'APGAR à 10 minutes de vie (tableau 2), une acidose métabolique à la naissance, ainsi que le besoin d'être maintenu ventilé au-delà de 10 minutes de vie (tableau 1.A) sont des événements démontrant la présence d'un épisode d'HI sans pour autant éliminer d'autre(s) cause(s) associées, éventuellement précédant l'HI (voir paragraphe 1.1.4.3).

**Tableau 1 : Critères diagnostiques d'EHI.** Ces critères sont aussi ceux d'éligibilité à l'hypothermie (HT) thérapeutique des enfants atteints d'EN. Les critères A et B, ou A, B et C, selon les études doivent être rencontrés afin de porter un diagnostic d'EHI et d'induire par la suite l'HT (voir paragraphe 1.2.2).  
 Reproduced with permission from "Xenon as a neuroprotective treatment in neonatal encephalopathy" Elisa Smit and Marianne Thoresen, Infant (vol.10, issue 1), 2014.

<p><b>A criteria</b>            Infants <math>\geq 36</math> weeks gestation with at least one of the following:</p>	<p>Apgar score <math>\leq 5</math> at 10 minutes</p> <p>Continued need for resuscitation, including tracheal or mask ventilation, at 10 minutes</p> <p>Acidosis defined as either umbilical cord pH or any arterial, venous or capillary pH within 60 minutes of birth <math>&lt; 7.00</math></p> <p>Base deficit <math>\geq 16</math> mmol/L in umbilical or any blood sample within 60 minutes of birth</p>
<p><b>B criteria</b>            Moderate or severe encephalopathy as evidenced by any of the following:</p>	<p>Altered state of consciousness and at least one or more of the following:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ hypotonia</li> <li>■ abnormal reflexes</li> <li>■ absent or weak suck</li> <li>■ clinical seizures</li> </ul>
<p><b>C criteria</b>            At least 30 minutes duration of amplitude integrated EEG that shows:</p>	<p>Normal background with some electrical seizure activity (<math>&gt; 5</math> min)</p> <p>Moderately abnormal activity (upper margin of trace <math>&gt; 10 \mu V</math>, lower margin <math>&lt; 5 \mu V</math>)</p> <p>Suppressed activity (upper margin <math>&lt; 10 \mu V</math> and lower margin <math>&lt; 5 \mu V</math>)</p> <p>Definite seizure activity</p>

**Tableau 2 : Critères d'évaluation du score d'Apgar.** Le score Apgar consiste en une note globale attribuée à un nouveau-né suite à l'évaluation de cinq éléments

spécifiques qui sont le rythme cardiaque, la respiration, le tonus, la couleur de la peau et la réactivité. Chacun des éléments est noté à 0, 1 ou 2 points, selon les conditions observées. Le résultat total permet l'appréciation globale de l'état de santé du nouveau-né dans les 10 premières minutes de vie. Le résultat maximal est de 10, suggérant la meilleure condition de santé possible, alors qu'un score en dessous de 7 réfère à une souffrance périnatale. L'évaluation est effectuée 1 minute, 5 minutes et 10 minutes après la naissance, et est poursuivie aux 10 minutes suivant l'état du patient.

Reproduced with permission from <http://soft-informatique.com/MediTerms.Pro/mobile/recherche.php?id=2520&nom=Test%20APGAR>

Cotation (ou test) d'APGAR	0	1	2
Coloration de la peau (A)	Cyanose ou pâleur	Corps rose et extrémités cyanosées	Corps complètement rose
Fréquence cardiaque (P)	Inférieure à 80 par min	Entre 80 et 100 par min	Au-dessus de 100 par min
Réactivité (G)	Pas de réponse	Grimaces	Pleurs ou cris
Tonus musculaire (A)	Faible	Flexion d'un ou de deux membres	Membres bien fléchis
Mouvements respiratoires (R)	Absents	Cri faible et respiration irrégulière	Cri vigoureux respiration régulière

### 1.1.2 Évolution clinique à long terme de l'EN :

Certains des patients victimes d'EN récupèrent et ne conservent aucune séquelle. D'autres conservent des degrés variables de difficultés cognitives comportementales ou motrices (tableau 3). Les difficultés motrices sont regroupées sous le diagnostic de paralysie cérébrale (PC). La PC est un ensemble – hétérogènes sur le plan des causes - de désordres neurologiques non progressifs

résultant en un contrôle altéré du mouvement et/ou de la posture se manifestant tôt après la naissance (Nelson 2002).

**Tableau 3 : Classification des degrés de sévérité dans l'EN.**

L'EN est classé selon sa sévérité : légère, moyenne ou sévère en fonction du niveau de conscience de l'enfant, son tonus et ses réflexes, la présence de crises d'épilepsie et la durée des symptômes pendant 7 jours après la naissance. Reproduced with permission from (Pin et al. 2009) Copyright from [Creative Commons Attribution License \(CC BY\)](#).

	Stage 1 <sup>a</sup> (mild <sup>b</sup> )	Stage 2 <sup>a</sup> (moderate <sup>b</sup> )	Stage 3 <sup>a</sup> (severe <sup>b</sup> )
Duration	<24 h	2–14 days	Hours to weeks
Level of consciousness	Alert	Lethargy	Coma
Seizure activity	None	Frequent	Frequent
Electroencephalogram	Normal	Periodic or paroxymal	Periodic or isoelectric
Neuromuscular control			
Muscle tone	Normal or hypertonia	Hypotonia	Flaccidity
Stretch reflexes	Increase	Increase	Decrease or absent
Myoclonus	Present	Present	Absent
Complex reflexes			
Sucking	Weak	Weak or absent	Absent
Moro	Exaggerated	Incomplete	Absent
Oculovestibular	Normal	Overactive	Weak or absent
Autonomic function			
Pupils	Dilated, reactive	Constrictive, reactive	Variable
Heart rate	Increase	Decrease	Variable
Gastrointestinal motility	Normal or decrease	Increase	Variable

a Terminologies used by Samat.<sup>15</sup>

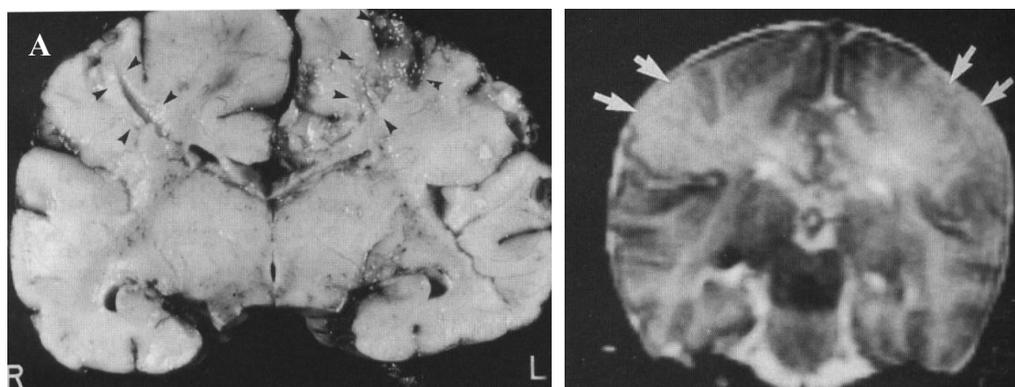
b Terminologies used by Fenichel.<sup>16</sup>

### 1.1.3 Régions du cerveau principalement touchées par l'EN et la PC :

Les nouveau-nés à terme atteints d'EN ont des dommages cérébraux très étendus. On observe trois patrons principaux de dommages pouvant se combiner : (1) une atteinte du néocortex et des régions sous-corticales adjacentes affectant principalement les régions paracentrales frontopariétales ; (2) une atteinte des noyaux gris de la base dont les noyaux lenticulaires et les thalami (noyaux ventrolatéraux particulièrement) ; (3) territoires dits de jonctions frontaux ou pariéto-occipitaux à la frontière des principaux territoires artériels cérébraux (figure 1) (Yager and Ashwal 2009).

**Figure 1 : Histopathologie et aspect radiologique de cerveaux de nouveau-nés à terme atteints d'EHI.** Nouveau-né à terme atteint d'EN combinant les trois principaux patrons de dommages soit des dommages étendus de la zone corticale, sous-corticale, de la substance blanche sous-jacente et des noyaux gris de la base (A, B, têtes de flèches noires et flèches blanches).

Reproduced with permission from (Yager and Ashwal 2009), Copyright from [Creative Commons Attribution License \(CC BY\)](#).



## 1.1.4 Causes et facteurs de risques de l'EN :

### 1.1.4.1 Agressions *antepartum* :

La majorité des cas d'EN sont associés à une agression *antepartum* (avant l'accouchement) (Badawi et al. 1998a). Des études épidémiologiques rétrospectives ont recensées les affections survenant pendant la grossesse comme facteur de risque d'EN. Parmi les principaux facteurs de risque recensées figurent les infections bactériennes périnatales (principalement dues au streptocoque de groupe B et *E. coli*), la fièvre maternelle, des antécédents maternels de : crises d'épilepsie sans fièvre ou autres désordres neurologiques, désordres de la thyroïde ou encore de traitements contre l'infertilité (Badawi et al. 1998a; Speer and Hankins 2003). D'autres part, figurent parmi les facteurs de risque d'EN la pré-éclampsie (*i.e.* hypertension artérielle et atteinte rénale de fin de gestation), la chorioamnionite (*i.e.* infection/inflammation du placenta, des membranes et du liquide amniotique), les thromboses et infarctus placentaires, les hémorragies maternelles suivant un décollement placentaire, la procidence du cordon, la rupture utérine, la rupture prolongée des membranes, ou la naissance post-terme (> 41 semaines de gestation) (McDonald 2004; Redline 2005; Redline et al. 2007). Le retard de croissance intra-utérin est considéré comme le facteur d'EN dont le risque est le plus élevé en terme de séquelles subséquentes comme la PC. Ces facteurs ont pour effet - ou sont associés à - une infection/inflammation périnatale et/ou à une diminution du débit sanguin ou de l'apport en oxygène au cerveau fœtal, ce qui résulte, dans la majorité des cas d'EN en une agression de type hypoxie-ischémie (HI) pure ou combinée à des facteurs infectieux et inflammatoires (Badawi et al. 1998a; Speer and Hankins 2003).

### 1.1.4.2 Agressions *intrapartum* :

Les agressions *intrapartum* (pendant l'accouchement) sont des facteurs avec le plus haut risque d'EN et de PC subséquente, mais sont recensés dans seulement 8 à 10% des cas d'EN. Il s'agit principalement de complications aiguës de

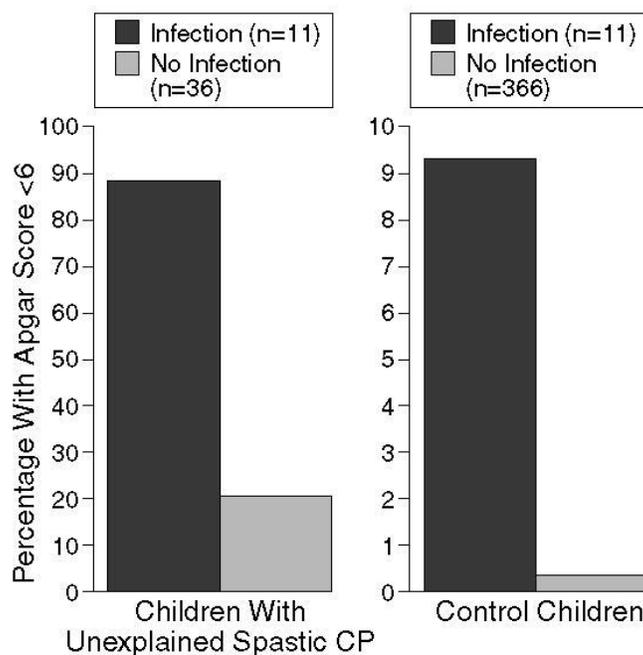
l'accouchement : rupture utérine, décollement placentaire, compression du cordon ou hémorragie maternelle (Badawi et al. 1998b; Martinez-Biarge et al. 2013).

#### 1.1.4.3 Implication de l'infection-inflammation :

Les pathologies infectieuses/inflammatoires exercent leurs effets néfastes le plus souvent avant la naissance (par exemple les chorioamnionites), et parfois après (les infections néonatales), et augmentent le risque d'asphyxie et de dépression cardiaque périnatale (hypoxie/ischémie) et d'EN (Lieberman et al. 2000) (Figure 2). Une interaction entre les événements inflammatoires, comme la chorioamnionite, et un épisode inflammatoire *antepartum* et une HI *intrapartum* a été reconnue comme une cause majeure des dommages cérébraux chez les nouveau-nés atteints d'EN (Wu et al. 2003; Aly et al. 2006). C'est cette séquence à la fois la plus fréquente, et la plus agressive pour le cerveau que nous avons appliqué à notre modèle expérimental d'EN.

#### **Figure 2 : Combinaison d'inflammation/infection et d'HI dans les EN.**

Un faible score d'Apgar a longtemps été considéré comme la conséquence d'une HI *perpartum*. En réalité d'autres facteurs déterminent un faible score d'Apgar dont, par exemple, les infections/inflammations périnatales aboutissant, ou non, à la PC (voir graphe ci-dessous provenant de l'étude rétrospective de 47 patients atteints d'EN et développant ou non une PC). Le score d'Apgar apparaît dans cette étude comme un test de faible valeur diagnostique d'HI et prédictive de PC. Néanmoins il est un bon marqueur de survenue d'un épisode HI post-partum, indépendamment de sa cause. Reproduced with permission from (Grether 1997). Abréviation : *Cerebral Palsy* : CP.



## 1.2 Les traitements dans l'EN d'origine hypoxique-ischémique (EHI) :

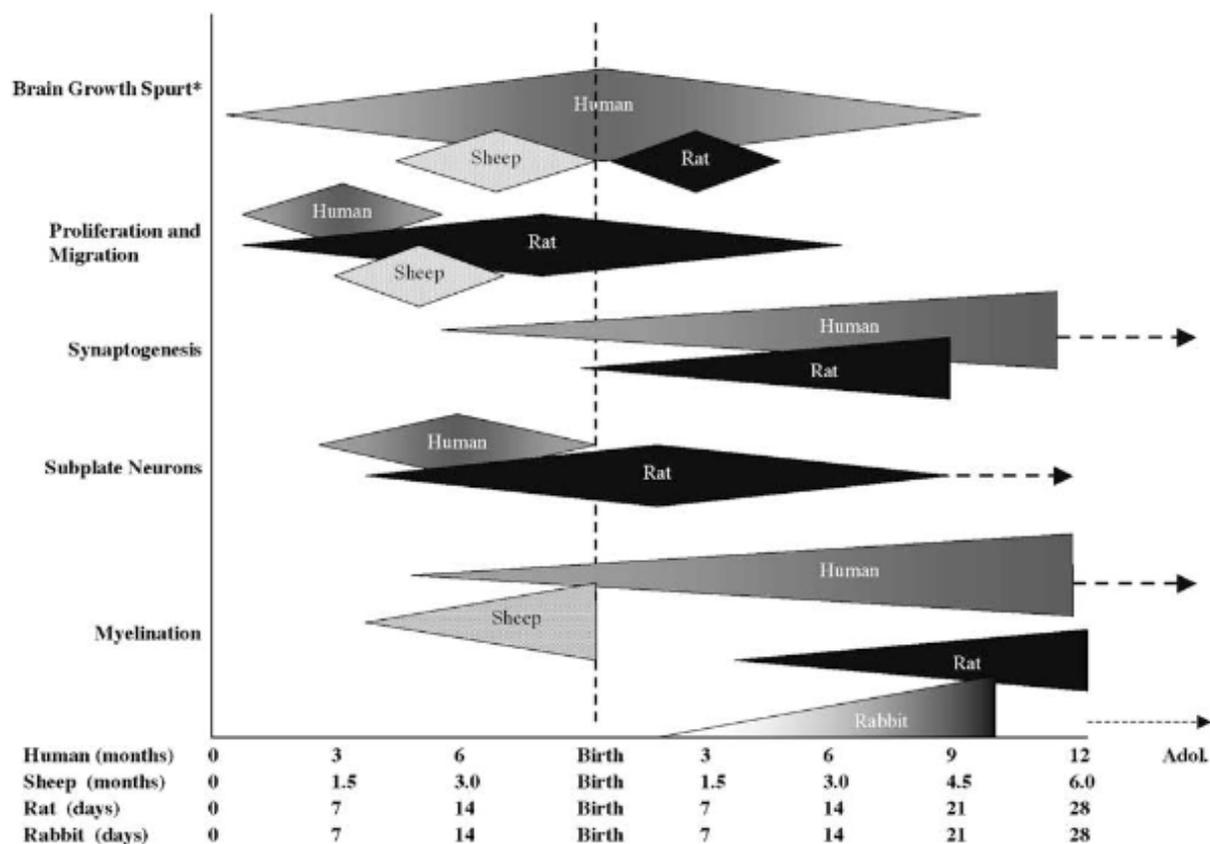
### 1.2.1 Données précliniques sur l'EHI :

Le premier modèle d'EN chez le rat a été mis au point par le groupe Rice-Vannucci en 1981 (Rice et al. 1981). Les auteurs ont utilisés des ratons au jour post-natal 7 (P7) sur lesquels ils ont effectués une ischémie (ligature permanente de la carotide commune gauche) et une hypoxie (3.5 h à 8% O<sub>2</sub>) (Rice et al. 1981). Néanmoins, le raton à P7 correspond en terme de développement neuronal, à un nouveau-né prématuré (32-36 semaines de gestation, figure 3) (Patel et al. 2014). Cela est donc en contradiction avec les données de développement neuronal du nouveau-né à terme (Yager and Ashwal 2009).

**Figure 3 : Asynchronie des principaux processus du développement cérébral (volume cérébral, prolifération et migration neuronale, synaptogenèse, mise en place des neurones de la sous-plaque, myélinisation) des principales espèces animales utilisées comme modèle d'EN, comparativement à l'humain. Cette asynchronie démontre une immaturité du raton à la naissance par rapport à**

l'humain. Le développement cérébrale d'un nouveau-né à terme est comparable à un raton au jour 10-12 de vie.

Reproduced with permission from (Yager and Ashwal 2009) , Copyright from Creative Commons Attribution License (CC BY).



Récemment, le groupe de Vannucci et d'autres ont utilisé des ratons à P10-11 car ceux-ci correspondent au neuro-développement d'un nouveau-né humain à terme ; ce qui est donc plus adéquat du point de vue translationnel pour l'étude du nouveau-né humain à terme (Brochu et al. 2011; Patel et al. 2014; Patel et al. 2015).

### 1.2.2 Essais thérapeutiques de l'hypothermie (HT) dans l'EHI :

La prise en charge des nouveau-nés atteint d'EN était, avant 2011, purement symptomatique. Elle consistait en des soins de support : maintenir la température corporelle du nouveau-né, maintenir l'hydratation et l'apport calorique optimal, assurer une bonne oxygénation et soutenir l'activité cardiaque si nécessaire. Le traitement des crises d'épilepsies, la prévention de l'hypoglycémie et de l'hyperbillirubinémie ainsi que le traitement des infections bactériennes sont également des soins prodigués à ces nouveau-nés.

L'HT est devenue depuis 2011 le traitement standard des nouveau-nés suspectés d'être atteint d'EN. Le traitement consiste en une prise en charge du nouveau-né dans les 6 h qui suivent sa naissance. L'ensemble du corps du nouveau-né est placé en HT afin d'abaisser la température corporelle jusqu'à atteindre 33-34°C. L'HT est maintenue pendant 72 h, puis on procède à un réchauffement progressif (0.5°C par heure) du nouveau-né. Les principaux mécanismes neuroprotecteurs connus de l'HT sont une baisse du métabolisme énergétique cérébral, une diminution de l'accumulation d'acides aminés neurotoxiques (glutamate), une diminution de la relâche des espèces réactive de l'azote (RNS) et de l'oxygène (ROS, voir paragraphe 1.4.3) (Alva et al. 2013), et une inhibition de l'activité des voies de l'apoptose et de la nécrose (Shankaran 2012; Gancia and Pomero 2010) (voir paragraphe 1.3.2).

Des études précliniques chez les rongeurs ont d'abord démontré des effets bénéfiques de l'HT après une ischémie et/ou hypoxie cérébrale : ces études ont noté des améliorations du métabolisme énergétique (amélioration des niveaux d'adénosine triphosphates (ATP) (Williams et al. 1997)), une diminution de l'acidose ainsi qu'une diminution des dommages cérébraux (Yager et al. 1993; Thoresen et al. 1996; Williams et al. 1997; Laptok et al. 1995).

Suite à ces travaux, six essais thérapeutiques randomisés contrôlés ont été effectués dans le but de vérifier et mieux caractériser les effets neuroprotecteurs de l'HT chez les nouveau-nés humains (Shankaran et al. 2005; Gluckman et al. 2005; Azzopardi et al. 2009; Simbruner et al. 2010; Zhou et al. 2010; Jacobs et al. 2013). Ces essais cliniques ont utilisé deux méthodes différentes de refroidissement : le

*selective head cooling* (seulement la tête est placée en HT) et le *whole-body HT* (le corps en entier est placé en HT). Aucune différence significative en terme de rapidité et stabilité de refroidissement n'a été observée entre ces deux méthodes (Gluckman et al. 2005; Zhou et al. 2010; Shankaran 2012). Les différentes équipes ont mesuré le taux de survie des nouveau-nés ainsi que les handicaps neurosensoriels découlant de l'EN (issue principale reposant sur un score composite intégrant ces deux variables). Les effets bénéfiques les plus convaincants ont été observés sur les nouveau-nés atteints d'encéphalopathies modérées (tableau 3) (Gluckman et al. 2005; Gunn et al. 2008).

Les effets bénéfiques à long-terme de l'HT ont été par la suite précisés par des études de suivi à plus long terme des cohortes de patients précédemment citées. Ces études ont démontrés que le risque de PC, chez les enfants ayant eu une EHI à la naissance, était diminué de 15% avec le traitement par HT (Azzopardi et al. 2014; Jary et al. 2015) (tableau 4). De plus, les auteurs ont remarqué que les enfants traités par HT étaient moins à risque de développer des handicaps moteurs sévères. Plus d'enfants dans le groupe traité par HT, versus non traité, survivaient sans problèmes neurologiques (tableau 4) (Azzopardi et al. 2014).

**Tableau 4 : Évaluation pédiatrique d'enfants entre 6 et 7 ans ayant eu une EHI à la naissance, traités ou non par HT.**

Le taux de mortalité est similaire dans le groupe HT et dans le groupe contrôle. Plus d'enfants survivent sans séquelles neurologiques dans le groupe HT (45%) en comparaison au groupe contrôle (28%). Parmi les survivants, les enfants dans le groupe hypothermie sont moins à risque de PC (21% vs 36%), ainsi que d'handicaps modérés à sévères (22% vs 37%), que ceux dans le groupe contrôle.

Reproduced with permission from (Azzopardi et al. 2014), Copyright Massachusetts Medical Society.

Variable	Hypothermia Group <i>no./total no. (%)</i>	Control Group <i>no./total no. (%)</i>	Relative Risk (95% CI)	P Value
<b>Grade of disability*</b>				
No disability	65/96 (68)	37/83 (45)	1.52 (1.15–2.00)	0.002
Mild disability	10/96 (10)	15/83 (18)		
Moderate disability	8/96 (8)	11/83 (13)		
Severe disability	13/96 (14)	20/83 (24)		
Moderate or severe disability	21/96 (22)	31/83 (37)	0.59 (0.37–0.94)	0.03
Cerebral palsy†	21/98 (21)	31/86 (36)	0.59 (0.37–0.95)	0.03
<b>Score on Gross Motor Function Classification System‡</b>				
No abnormality	76/98 (78)	49/83 (59)	1.31 (1.07–1.62)	0.01
Level 1–2	6/98 (6)	13/83 (16)		
Level 3–5	16/98 (16)	21/83 (25)	0.65 (0.36–1.15)	0.14
<b>Score on Manual Ability Classification System§</b>				
No abnormality	75/98 (77)	51/83 (61)	1.25 (1.02–1.53)	0.04
Level 1–2	4/98 (4)	8/83 (10)		
Level 3–5	19/98 (19)	24/83 (29)	0.67 (0.40–1.13)	0.16
Visual impairment not corrected by eyeglasses	7/98 (7)	10/82 (12)	0.59 (0.23–1.47)	0.31
Blindness	1/98 (1)	1/82 (1)	0.84 (0.05–13.17)	1.00
Hearing impairment	4/98 (4)	8/83 (10)	0.42 (0.13–1.36)	0.15

### 1.2.3 Les limitations de l'HT :

Plusieurs études cliniques indiquent que plus de 50% des nouveau-nés traités par HT gardent des séquelles neurologiques (Azzopardi et al. 2014; Davidson et al. 2015). Elles montrent également que l'efficacité de l'HT serait partielle dans les cas sévères d'EN (tableau 3) (Azzopardi et al. 2014; Edwards et al. 2010; Davidson et al. 2015). Ces constatations ont été également observées dans des études précliniques réalisées chez les ratons et les porcelets (Haaland et al. 1997; Yager et al. 1993; Sabir et al. 2012).

Par ailleurs, le timing d'induction de l'HT après la naissance ainsi que la température et la durée optimale de l'HT font encore l'objet de questionnements. Le timing

d'induction de l'HT a été fixé à 6 h maximum après la naissance, d'après les résultats d'études précliniques indiquant que l'HT n'était plus efficace après 6 h dans les cas modérés d'EHI ; et que l'HT est délétère lorsqu'elle était induite après 12 h de délai, dans les cas sévère d'EHI (Sabir et al. 2012). De récentes études ont voulu évaluer l'efficacité de l'HT lorsqu'elle était plus profonde (32°C au lieu de 33.5°C) et/ou durait plus longtemps (120 h au lieu de 72 h). Thomas Wood et al. ont démontré que des niveaux d'HT de 33.5°C, 32°C et 30°C étaient efficaces et sécuritaires chez les rats (Wood et al. 2016). Une étude clinique évaluant la même question n'a pas montré de différence en terme de sécurité (arrêt cardiaque, acidose persistante, thrombose ou saignement des vaisseaux sanguins et mortalité) de l'HT prolongée (120 h) en comparaison à l'HT classique (72 h) ; de même pour l'HT à 32°C versus 33.5°C (Shankaran et al. 2014). Par ailleurs, d'autres études cliniques et précliniques ont questionnés l'efficacité de l'HT lorsque l'EN résultait d'une combinaison infection-inflammation et HI (Wintermark et al. 2010; Osredkar et al. 2014; Mir et al. 2015). Les limitations d'efficacité neuroprotectrice de l'HT pour combattre l'HI pure, et les doutes sur son efficacité dans des mécanismes combinant plusieurs insultes comme l'inflammation et l'HI, imposent d'étudier de nouvelles thérapies associées à l'HT afin d'accroître son bénéfice thérapeutique, et de diminuer davantage les impacts de l'EN sur la survie des nouveau-nés et les handicaps neurologiques futurs.

#### 1.2.4 Autres approches thérapeutiques en développement :

Étant donné que l'HT est maintenant le traitement standard de l'EN, les autres traitements potentiels doivent être évalués en combinaison avec l'HT (Davidson et al. 2015). Aucune de ces thérapies, qui font pour certaine l'objet d'essais cliniques humains de phase I-II, n'a encore translaté dans les soins de routine chez les nouveau-nés atteints d'EN (tableau 5).

**Tableau 5 : Essais thérapeutiques précliniques et cliniques combinant l'HT à d'autres interventions :** Plusieurs approches thérapeutiques ont été étudiées

récemment en combinaison à l'HT dans des études précliniques, mais seulement l'EPO et le xénon ont fait l'objet d'essais cliniques chez l'homme. Tableau réalisé à partir de données provenant de (Robertson et al. 2012; Davidson et al. 2015).

Approche thérapeutique	Effets thérapeutiques	Données précliniques : effet neuroprotecteurs dans l'EHI en combinaison à l'HT	Essais cliniques chez l'homme, en combinaison avec l'HT
Insulin-like growth factor-1 (IGF-1)	anti-apoptotique et effets sur la neurogenèse	agneau : pas de valeur ajoutée à l'HT (réduction de dommages cérébraux et effet anti-apoptotique)	aucun
Cellules souches	effets présumés sur la neurogenèse et les mécanismes immunomodulateurs	aucune efficacité des cellules souches démontrée dans plusieurs modèles mais sans HT	aucun
Érythropoïétine (EPO/EPOrh)	hormone : facteur de croissance des globules rouges	rat : pas d'effet neuroprotecteurs en combinaison à l'HT primate : amélioration des fonction motrices et cognitives, diminution de la mort neuronale	2 essais de phase I/II : DANCE et NEATO (en cours)
Mélatonine	antioxydant et anti-apoptotique	agneau à terme : réduction de la peroxydation des lipides, de la mort neuronale et de l'activation des microglies et astrocytes (après occlusion du cordon)	aucun
N-Acétylcystéine (NAC)	précurseur de la glutathionne : antioxydant	rat : réduction des dommages cérébraux et amélioration des facultés motrices (réflexes)	aucun
Phénobarbital	anticonvulsivant	rat : réduction des dommages cérébraux et amélioration des facultés sensorimotrices	1 étude rétrospective : pas d'effet additif sur la mortalité (score composite)
Xénon	gaz noble : anesthésique et antagoniste du récepteur NMDA	rat : effets neuroprotecteurs additifs (réduction de l'apoptose, des dommages cérébraux et amélioration des fonctions motrices) porcelet : réduction des dommages cérébraux	2 essais de phase II : TOBYXe et CoolXenon2 TOBYXe : pas d'effets neuroprotecteurs additifs à l'HT

L'érythropoïétine (EPO) est une hormone qui agit comme facteur de croissance des globules rouges (Steensma 2007). L'EPO est maintenant utilisé de routine comme

traitement de l'anémie chez le nouveau-né prématuré. De plus, de récentes études cliniques et précliniques indiquent que l'EPO recombinant humain (EPOrh) a des effets neuroprotecteurs après une EHI. Dans le cerveau adulte ou celui du nouveau-né, l'EPO est capable de se fixer sur son récepteur (EPO récepteur : EPOR) sur les neurones et cellules gliales, et ainsi promouvoir l'expression de gènes anti-apoptotiques mais également d'atténuer les ROS et la réponse inflammatoire due à l'HI, et d'augmenter la neurogenèse (Robertson et al. 2012; Davidson et al. 2015). Deux essais cliniques de phase I et II étudiant l'effet combiné de l'EPOrh à l'HT chez les enfants atteints d'EHI sont en cours (NCT01471015/NCT01913340). Ces études examinent la sécurité, la pharmacocinétique et l'efficacité du traitement combinant HT et EPOrh.

Le xénon est un gaz noble qui agit comme antagoniste non-compétitif du récepteur N-méthyl-D-aspartate glutamate (NMDA) (Davidson et al. 2015). Les effets neuroprotecteurs du xénon passent par l'activation de facteurs anti-apoptotiques comme Bcl-2 et l'inhibition de la perméabilité de la membrane mitochondriale (Lobo et al. 2013) (voir paragraphe 1.3.2.2). Des études sur les rats et les porcelets ont montré que le xénon en combinaison à l'HT avait des effets additifs (Ma et al. 2005; Hobbs et al. 2008; Chakkarapani et al. 2010). La combinaison HT et xénon a été évaluée dans deux essais cliniques de phase II (TOBYXeNCT00934700 et CoolXenon2-NCT01545271). Le TOBYXe a montré que le xénon n'a pas d'effet additif sur la neuroprotection en comparaison à l'HT, après une asphyxie néonatale (Azzopardi et al. 2015).

### 1.3 La genèse des lésions cérébrales dans l'EN :

#### 1.3.1 Les mécanismes contribuant aux dommages cérébraux :

Les lésions cérébrales résultant de l'EN d'origine HI pure - ou HI combinée à l'infection-inflammation - sont provoquées par deux défaillances énergétiques consécutives. La première a lieu pendant l'asphyxie et est caractérisée par une

diminution du débit sanguin cérébral, diminuant l'apport d'oxygène et de nutriments au cerveau. Après une phase de latence correspondant à la ré-oxygénation cérébrale, le métabolisme énergétique va se stabiliser, avant de se détériorer de nouveau. La seconde défaillance énergétique se produit 6 à 72 h après la première, et est caractérisée par des dommages neuronaux engendrés par une dysfonction mitochondriale et l'initiation de la cascade apoptotique (Ma et al. 2012) (figure 4, voir paragraphe 1.3.2.2). Durant cette seconde phase, il y également relâche de médiateurs inflammatoires amplifiant les dommages cérébraux (Leviton et al. 2005; Khwaja and Volpe 2008) (voir paragraphe 1.4.2).

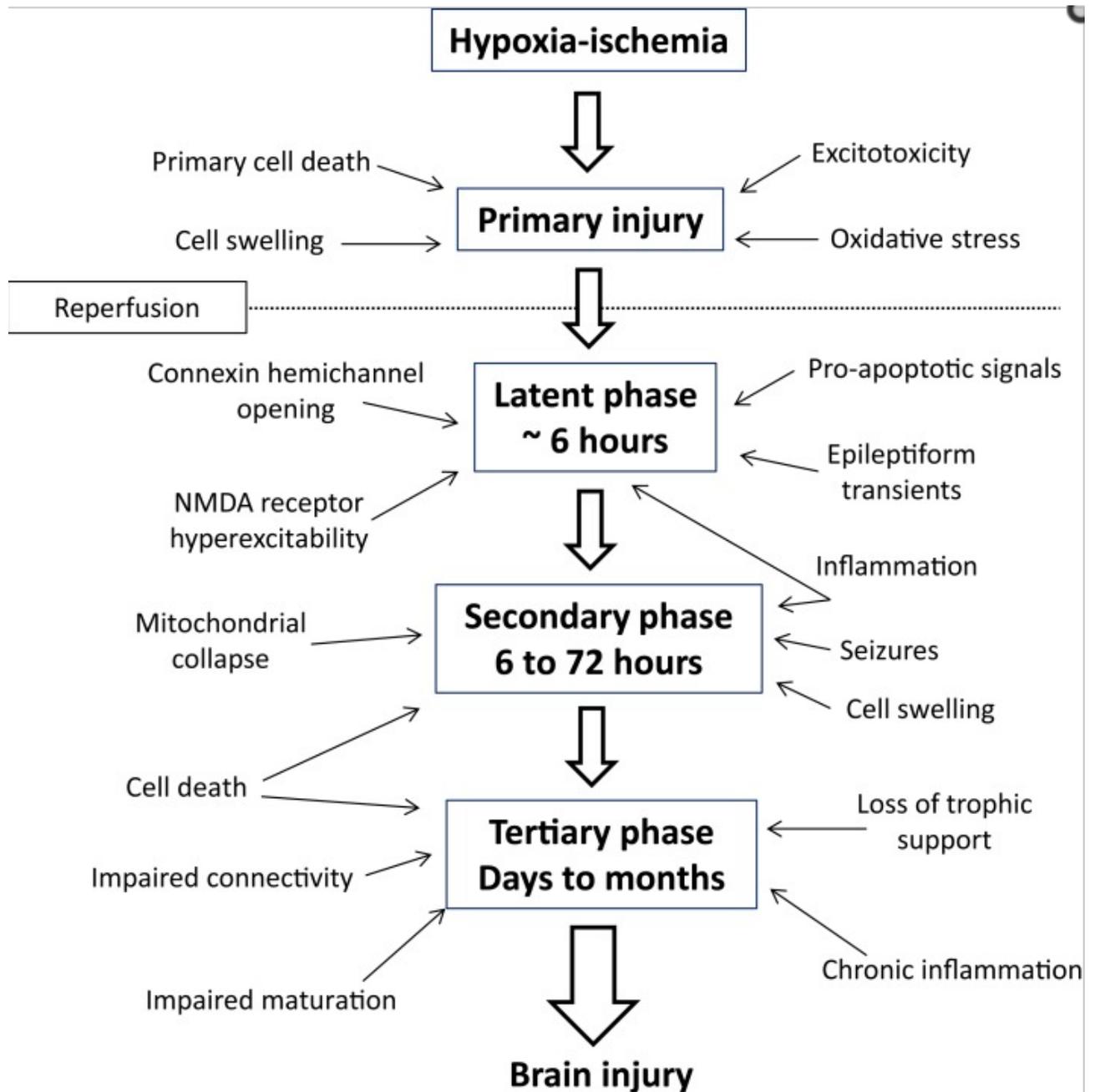
Suite à la destruction massive des neurones durant la seconde phase, il va y avoir une phase de réparation et de réorganisation. Pendant cette troisième phase, de nouvelles cellules se créent et les circuits neuronaux se régénèrent. Néanmoins, l'inflammation résultant de l'HI persiste encore et l'apoptose engendrée perturbe la production de nouvelles cellules et la survie neuronale pendant plusieurs mois (figure 4). Les mécanismes précis qui induisent le prolongement de l'agression ne sont pas tous connus à l'heure actuelle (Fleiss and Gressens 2012; Davidson et al. 2015).

**Figure 4 : Mécanismes contribuant aux dommages cérébraux et aux handicaps à long terme dans l'EHI.**

Schéma résumant les différentes phases de l'agression contribuant aux dommages cérébraux dans l'EN. Durant la phase 1, l'épuisement des métabolites énergétiques induit la dépolarisation progressive des cellules, un œdème cytotoxique sévère et l'augmentation du stress oxydatif. Après la mort de beaucoup de neurones suite à la période d'ischémie et/ou hypoxie, certains neurones vont récupérer partiellement de l'agression : c'est la phase de latence. Cette phase est suivie d'une deuxième détérioration métabolique, 6 h à 72 h après la naissance. Après la mort cellulaire massive durant la deuxième phase, s'en suit une troisième phase de réparation et de réorganisation.

Reproduced with permission from (Davidson et al. 2015), Copyright from [Creative Commons Attribution License \(CC BY\)](#).

Link: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fneur.2015.00198/full>.



### 1.3.2 La mort neuronale :

L'EN est une pathologie induisant de graves dommages cérébraux permanents qui résultent de différents types de mort neuronale.

#### 1.3.2.1 La nécrose :

La nécrose est la mort cellulaire la moins programmée. Lors de stress extrêmes, tel que l'HI, les canaux calciques de la cellule vont s'ouvrir, permettant au calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) d'entrer en grande quantité. Les organelles telles que le réticulum endoplasmique ainsi que les mitochondries vont relâcher également le  $\text{Ca}^{2+}$  qu'ils contenaient. Cette importante augmentation de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire va alors activer les calpaïnes qui vont cliver les protéines du cytosquelette, les récepteurs membranaires ainsi que les transporteurs. Au final, ce processus va induire le gonflement des organelles et du cytoplasme, ainsi que la rupture de la membrane plasmique de la cellule (Tovar-Y-Romo et al. 2016; Martin and Henry 2013). Les cellules nécrotiques vont relâcher leur contenu intracellulaire : organelles et noyau (ADN, ARN, nucléotides) ainsi que des *damage-associated molecular pattern molecules* (DAMPs) telles que l' $\text{IL-1}\alpha$ , le *high-mobility group box 1* (HMGB-1), l'ATP, l'acide urique, et les *heat shock proteins* (HSPs). Ce déversement de DAMPs va induire le recrutement et l'activation de neutrophiles, de cellules dendritiques ainsi que de macrophages ; et promouvoir une importante réponse inflammatoire. En effet l'activation d'inflammasomes et la transcription du facteur nucléaire (NF)- $\kappa\text{B}$ , via la liaison des DAMPs à leurs récepteurs *Toll-like* récepteurs (TLRs), *Nod-like* récepteurs (NLRs, voir paragraphe 1.4.2.3) va induire la synthèse et la relâche de cytokines pro-inflammatoires (Sangiuliano et al. 2014; Pisetsky 2011). Cette inflammation peut par la suite aboutir à l'apoptose ou la nécrose des cellules avoisinantes.

Lors de la détérioration du métabolisme énergétique suivant une HI, il va y avoir une augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  dans les neurones via l'activation de récepteurs au glutamate (NMDA). Cette augmentation de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire va induire des défauts de la chaîne respiratoire, l'augmentation de la production de ROS dans la mitochondrie et ultimement induire la perméabilisation de la membrane mitochondriale et la mort

cellulaire par nécrose ou apoptose (voir paragraphe 1.3.2.2) (Thornton and Hagberg 2015; Zhao et al. 2007).

### 1.3.2.2 L'apoptose

L'apoptose ou mort cellulaire programmée peut être provoquée par deux voies : extrinsèque ou intrinsèque, dépendamment des signaux reçus par la cellule. La voie extrinsèque est induite par l'activation de récepteurs de mort cellulaire à la surface de la cellule, comme le *tumor necrosis factor receptor* (TNFR) ou *Fas receptor* (FasR). Suite à cela, les caspases 8 et 10 vont être activées, et vont à leur tour activer caspase-3. L'internalisation de caspase-3 au noyau engendre la fragmentation de l'ADN menant à l'apoptose de la cellule (Tovar-Y-Romo et al. 2016; Elmore 2007). Caspase-8 activé peut également interagir et activer des protéines pro-apoptotiques telles que Bax et Bak (par l'intermédiaire de Bid et t-Bid, figure 5). Les protéines pro-apoptotiques ainsi en excédant par rapport aux protéines anti-apoptotiques (Bcl2, Bcl-xL) vont former des pores dans la paroi des mitochondries (Elmore 2007) (figure 5). La relâche de cytochrome-c (Cyt-c) provenant de la matrice mitochondriale et la formation de l'apoptosome avec la liaison de l'*apoptotic protease activating factor-1* (APAF-1) au Cyt-c et à la caspase-9 vont induire par la suite la mort de la cellule par apoptose (Walsh 2014) (figure 5). L'apoptose s'exécutera via la dégradation des protéines et la fragmentation de l'ADN ainsi que la formation de corps apoptotiques phagocytibles permettant une mort « propre », sans induction de la réponse inflammatoire (Martin and Henry 2013). La voie intrinsèque est induite par un stress (infection, entrée de  $Ca^{2+}$ , ultra-violets, DAMPs) et aboutit directement à des dommages aux mitochondries et la relâche de Cyt-c (Tovar-Y-Romo et al. 2016; Sangiuliano et al. 2014). Dans un contexte d'inflammation + HI, l'augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires tels que l'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$  (voire paragraphe 1.4.2.1) (Savard et al. 2013; Savard et al. 2015) va activer directement les récepteurs de mort cellulaire comme le TNFR. Des études indiquent que l'HT diminue l'apoptose dans des modèles d'EHI et d'ischémie cérébrale, en diminuant l'expression de protéines pro-apoptotiques comme Bax mais également caspase-3 et Cyt-c ; et en augmentant l'expression de

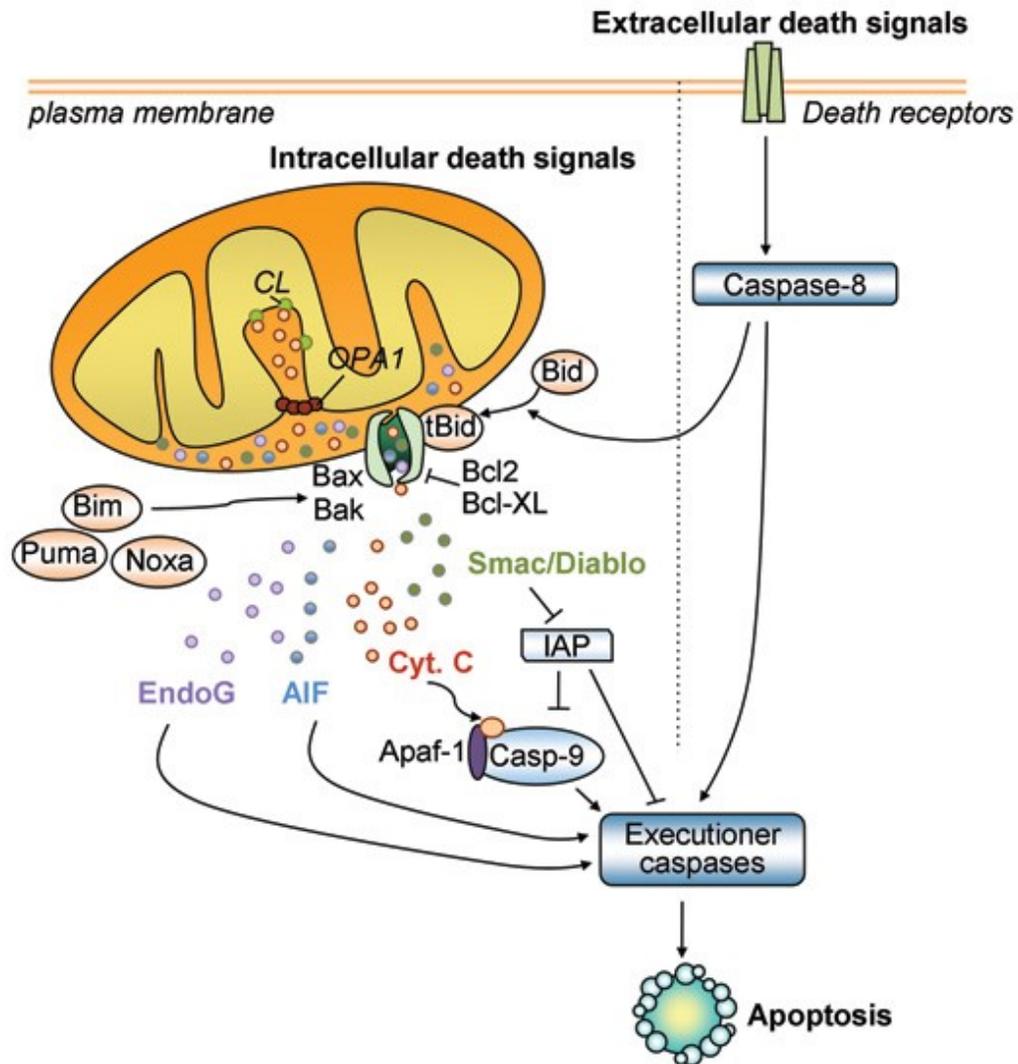
protéines anti-apoptotiques telle que Bcl2 (Ohmura et al. 2005; Yang et al. 2009; Matsui et al. 2014).

**Figure 5 : Schéma récapitulatif des deux voies de l'apoptose : extrinsèque et intrinsèque.**

La mitochondrie joue un rôle central dans la mort cellulaire programmée, car elle contient de nombreuses molécules qui vont être relâchées dans le cytosol après la rupture de la membrane mitochondriale. La perméabilité de la membrane mitochondriale est régulée par une série de protéines de la famille Bcl-2 qui préviennent (Bcl-2, Bcl-xL) ou induisent (Bax, Bak) la mort cellulaire par apoptose.

Reproduced with permission from (Perier and Vila 2012), Copyright from [Creative Commons Attribution License \(CC BY\)](#).

Link: <http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/content/2/2/a009332.full?sid=37addf02-50d3-4cc1-8528-c36f3af1a260>



### 1.3.2.3 La nécroptose :

La nécroptose ou nécrose programmée est une mort cellulaire alternative qui ne requiert pas l'activité des caspases. Même si, à l'heure actuelle, les mécanismes de la nécroptose ne sont pas encore tous résolus, on sait que ce processus passe par l'activation des récepteurs de mort comme TNFR via le TNF- $\alpha$ , qui est relâché au sein du cerveau exposé au lipopolysaccharide d'*E. coli* (LPS) et à l'HI (Savard et al. 2015; Tovar-Y-Romo et al. 2016; Liu et al. 2016). D'autres évidences montrent que d'autres ligands comme FasL, TRAIL, TWEAK ou encore le LPS peuvent activer les

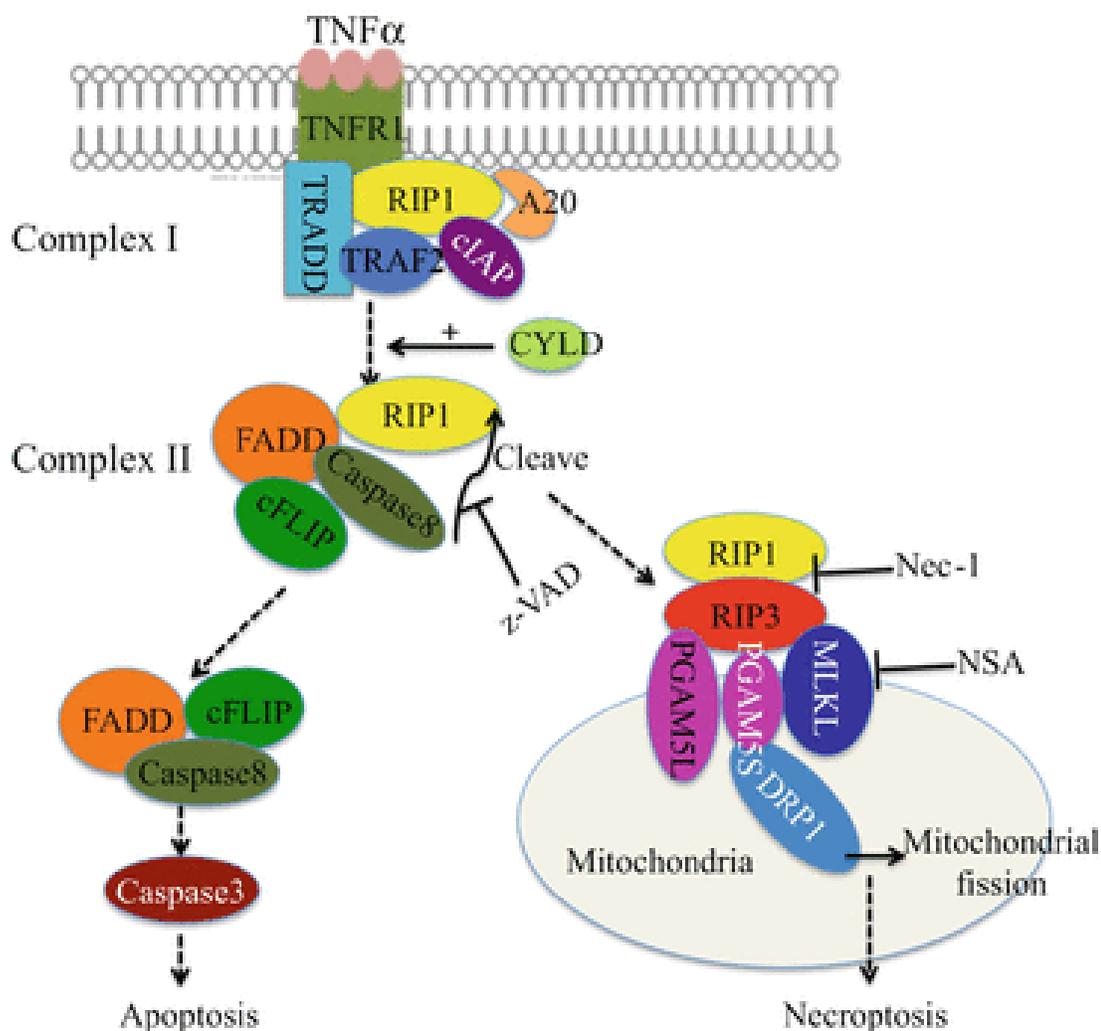
récepteurs : *tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein* (TRADD) et *fas-associated protein with death domain* (FADD) pouvant induire à la fois l'apoptose ou la nécroptose, dépendamment de la disponibilité des caspases (Tovar-Y-Romo et al. 2016). Le recrutement de protéines adaptatrices comme TRADD par les ligands mentionnés plus haut, ainsi que le *receptor interacting protein-1* (RIP-1) vont induire l'activation de caspase-8 et de t-Bid, et mener à la mort par apoptose. En revanche, si la caspase-8 est inhibée, TRADD va faciliter l'interaction et l'activation de RIP-1 et RIP-3 (activé au sein des neurones murins exposés au LPS+HI (Savard et al. 2015) ainsi que le recrutement de la *Mixed lineage kinase domain-like protein* (MLKL), formant ainsi le nécrosome (figure 6) (Tovar-Y-Romo et al. 2016; Walsh 2014). Le nécrosome va par la suite induire la nécroptose de la cellule en augmentant le niveau de ROS ou en induisant la fission mitochondriale via *dynamin-related protein 1* (Drp1). En temps normal, Drp-1 régule la dynamique mitochondriale (homéostasie entre la fusion et la fission mitochondriale) en facilitant la fission de la mitochondrie. Lors de stress cellulaire trop intense, il va y avoir une intensification de la translocation de Drp1 à la mitochondrie ce qui va induire une trop forte fragmentation de celle-ci et va mener à la mort de la cellule (figure 6) (Pradeep et al. 2014). L'induction de la nécroptose via des mécanismes non-mitochondriaux est encore à l'étude.

De récentes études indiquent que la nécroptose serait un processus de mort neuronale impliqué dans l'HI néonatale (Thornton and Hagberg 2015), notamment via l'utilisation de l'inhibiteur de RIP-1 : la nécrostatine-1. En effet il a été montré que l'utilisation de la nécrostatine-1 réduit la formation de complexe RIP-1/RIP-3 et atténue les lésions cérébrales induites par l'HI chez des souriceaux âgés de 7 jours (Northington et al. 2011). La nécroptose est aussi impliquée dans l'EN induite par l'inflammation et l'HI (Savard et al. 2015) décrite via l'augmentation de l'expression cérébrale de TNF- $\alpha$  ainsi que la présence de neurones surexprimant RIP-3. Aucune étude n'a encore démontré un effet de l'HT sur ce processus de mort neuronale dans l'EN.

**Figure 6 : Schéma des cascades apoptotiques et nécroptotiques ayant pour origine la liaison du TNF- $\alpha$  à son récepteur.**

Après leur activation par le TNF- $\alpha$  (ou FasL) et les récepteurs de mort cellulaire, RIP-1 et RIP-3 vont former un complexe jouant un rôle crucial dans la mort par nécroptose. RIP-3 phosphorylé va aller activer MLKL et PGAM5 qui vont induire la nécroptose via Drp-1 : une GTPase contrôlant la fission de la mitochondrie.

From (Chen et al. 2014) with permission of Springer



## 1.4 L'inflammation dans l'EN :

### 1.4.1 Les cellules immunitaires dans l'inflammation induite par l'EN :

#### 1.4.1.1 Les microglies :

Les microglies font partie des cellules gliales du système nerveux central (SNC). Elles ont un rôle immunitaire majeur dans le cerveau. Lorsqu'il y a une ischémie cérébrale, les microglies vont s'activer en quelques minutes, relâcher des cytokines pro et anti-inflammatoires, des chimiokines, et des métalloprotéinases (MMPs) qui vont participer à la perméabilisation de la barrière hémato-encéphalique (BHE). Des cellules périphériques (lymphocytes, macrophages) vont ainsi pouvoir infiltrer le cerveau, augmenter l'inflammation ce qui va engendrer davantage de dommages cérébraux. Durant la progression de l'agression puis dans sa phase de résolution, les microglies activées vont passer d'un phénotype pro-inflammatoire (M1 : augmentation de la mort neuronale) à un phénotype anti-inflammatoire (M2 : résolution de l'inflammation), dépendamment des signaux inflammatoires (Liu and McCullough 2013). Les travaux de notre laboratoire, et d'autres, ont montré que l'interleukine-1 (IL-1) bêta (IL-1 $\beta$ ) jouait un rôle central dans la genèse des lésions cérébrales dues à l'HI, sensibilisée ou non par une inflammation préalable (Girard et al. 2012; Savard et al. 2013; Savard et al. 2015).

#### 1.4.1.2 Les astrocytes :

L'activation des astrocytes a un rôle à la fois bénéfique et préjudiciable dans l'ischémie cérébrale. Le support des neurones par les astrocytes se fait via la relâche de glutathion et de superoxyde dismutase (SOD ; voir paragraphe 1.4.3.2), la recapture du glutamate ainsi que le maintien des gradients ioniques comme le potassium. Par ailleurs, les astrocytes activés produisent des cytokines : IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et interféron (IFN)- $\gamma$ . L'augmentation rapide des niveaux de ces cytokines ont pour effet d'exacerber l'agression ischémique en engendrant la mort neuronale par apoptose (voir paragraphe 1.3.2.2) en augmentant les niveaux d'oxyde nitrique (NO), et en inhibant la neurogenèse. De plus, les astrocytes activés

produisent également des chimiokines ce qui résulte en l'attraction de cellules immunitaires jusqu'au site ischémié et participe à l'aggravation des lésions cérébrales (Liu and McCullough 2013).

#### 1.4.1.3 Les polymorphonucléaires neutrophiles (PMN) :

Durant l'ischémie, les PMN infiltrent la barrière hémato-encéphalique via notamment la synthèse intracérébrale de chimiokines (voir paragraphe 1.4.2.2) comme l'IL-8 (équivalent de CINC-1 chez le rat). Les PMN exacerbent les lésions cérébrales du nouveau-né à terme via plusieurs mécanismes : la production de ROS, la diminution du débit sanguin dans les capillaires obstrués par les neutrophiles, la relâche de molécules inflammatoires cytotoxiques dans les vaisseaux sanguins et le parenchyme cérébrale, ainsi que par la production de MMP-9 (Liu and McCullough 2013) et l'anoïkose (apoptose résultant du défaut d'ancrage des cellules neurales dans la matrice extracellulaire altérée par MMP-9).

#### 1.4.2 Les médiateurs de l'inflammation cérébrale :

##### 1.4.2.1 Les cytokines :

Les cytokines sont d'importants médiateurs inflammatoires permettant le maintien de l'homéostasie tissulaire. En général, le rôle des cytokines est multiple. Dans les modèles d'EN, la balance entre les cytokines pro- et anti-inflammatoires demeure controversée. Les cytokines les plus étudiées dans l'inflammation induite par l'HI sont l'IL-1, l'IL-6, l'IL-10, le TNF- $\alpha$  et le *transforming growth factor*- $\beta$  (TGF- $\beta$ ). De toutes ces cytokines, l'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$  font l'objet de la grande majorité des travaux de recherche (Liu and McCullough 2013), effectués initialement dans des modèles immatures (rats à P7 pour la plupart) par rapport au niveau de développement neurologique et immunitaire du nouveau-né humain à terme (Brochu et al. 2011). Récemment, des études ont montré que l'axe inflammatoire IL-1 $\beta$ /TNF- $\alpha$ /MMP-9, impliquant la synthèse neuronale d'IL-1 et MMP-9, jouait un rôle majeur dans la genèse des lésions cérébrales dans l'EN à terme (travaux effectués sur les ratons à P12) due à la combinaison d'HI et infection/inflammation (Savard et al. 2013; Savard

et al. 2015). Ces travaux indiquent qu'un bloquant de l'IL-1 : l'antagoniste du récepteur de l'IL-1 (IL-1Ra) a des effets neuroprotecteurs dans les agressions cérébrales périnatales induites par l'inflammation et/ou l'HI (Quiniou et al. 2008; Girard et al. 2012; Leitner et al. 2014; Pang et al. 2015; Lan et al. 2015; Savard et al. 2015). Ceci démontre que l'IL-1 joue un rôle important dans les agressions périnatales induites par l'exposition à un pathogène suivie par une HI, et joue un rôle important dans la constitution de séquelles neurologiques à long terme.

#### 1.4.2.2 Les chimiokines :

Les neurones et cellules gliales (astrocytes et microglies, voir paragraphe 1.4.1) semblent être responsables de cette réponse inflammatoire en relâchant des chimiokines comme la *cytokine-induced neutrophil chemoattractant* (CINC-1) et la *monocyte chemoattractant protein 1* (MCP-1), suite à l'agression de type HI (Berger et al. 2012; Savard et al. 2013; Savard et al. 2015). Les chimiokines vont induire le recrutement de cellules immunitaires au cerveau comme des PMN, les macrophages et des cellules T (Leviton et al. 2005; Khwaja and Volpe 2008; Okazaki et al. 2006). De plus les cellules attirées par les chimiokines peuvent relâcher d'autres médiateurs neurotoxiques : ROS, RNS et MMPs.

#### 1.4.2.3 Les récepteurs reconnaissant les pathogènes :

Si elle est induite par une infection, la réponse inflammatoire dépend de récepteurs reconnaissant les pathogènes (PRR) comme les TLRs (Berger et al. 2012) ou les NLRs. Ces récepteurs sont impliqués dans la reconnaissance des pathogènes via les patrons moléculaires associés au pathogène (PAMP) (Yuan et al. 2010). Un de ces patrons le plus étudié est le LPS. Le LPS est reconnu par le TLR4 qui, par la suite, via *myeloid differentiation primary response gene* (MyD) 88 et le facteur NF- $\kappa$ B, active l'expression d'IL-1 $\beta$  (Bowie and O'Neill 2000). Une dérégulation de la fonction d'un de ces récepteurs peut s'avérer critique dans l'élaboration des dommages cérébraux suite à une agression de type HI et/ou inflammatoire (Yuan et al. 2010; Berger et al. 2012).

Les NLR sont des récepteurs intracellulaires qui reconnaissent des patrons moléculaires associés au danger (DAMP). Suite à l'activation de ces récepteurs, une multitude de cytokines sont produites dans le milieu extracellulaire. NLRP-1 et NLRP-3, en particulier, s'activent et s'associent avec la caspase-1 pour former l'inflammasome, contrôlant la maturation et l'expression de l'IL-1 $\beta$  et l'IL-18 (Schroder and Tschopp 2010).

### 1.4.3 Le stress oxydatif :

#### 1.4.3.1 Les molécules pro-oxydantes :

Les superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) sont produits de deux manières dans la matrice mitochondriale, dépendamment de la concentration d'électron donneur et la concentration locale en oxygène ( $O_2$ ). Brièvement, il y a production d' $O_2^{\cdot-}$  lorsque la mitochondrie ne produit pas d'ATP; ou lorsque le ratio NADH/NAD $^+$  est très élevé dans la matrice mitochondriale (Murphy 2009). En effet, la *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase* (NADPH oxydase) est une enzyme dont la fonction principale est de produire des ROS (figure 7) (Angeloni et al. 2015).

Les espèces réactives de l'azote (*reactive nitrogen species*, RNS) dérivent de l'oxyde nitrique ( $\cdot NO$ ) produit par l'enzyme *nitric oxide synthase 2* (NOS2); qui va réagir avec l'anion superoxyde.  $\cdot NO$  (nitric oxide) +  $O_2^{\cdot-}$  (superoxide)  $\rightarrow$  ONOO $^-$  (peroxynitrite) (Squadrito and Pryor 1998).

La surproduction des ROS et des RNS, ou l'élimination partielle de ces composants par les molécules antioxydantes, va mener à plusieurs dommages cellulaires, tels que l'oxydation des protéines, la peroxydation des lipides membranaires, les dommages à l'ADN et un stress cellulaire intense pouvant induire la mort cellulaire par apoptose ou nécroptose (voir paragraphe 1.3.5) (Dalle-Donne et al. 2006) .

#### 1.4.3.2 Les molécules antioxydantes :

Les enzymes antioxydantes sont la *superoxyde dismutase* (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GSH/GPX). Le rôle de la SOD est de transformer les

anions superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), qui est à son tour transformé en eau ( $H_2O$ ) et en oxygène ( $O_2$ ) par la GSH-Px et la CAT. Cette transformation permet ainsi d'éviter la formation de radicaux hydroxyle ( $OH^{\cdot}$ ) à partir du peroxyde d'hydrogène (Yao et al. 2001) (figure 7).

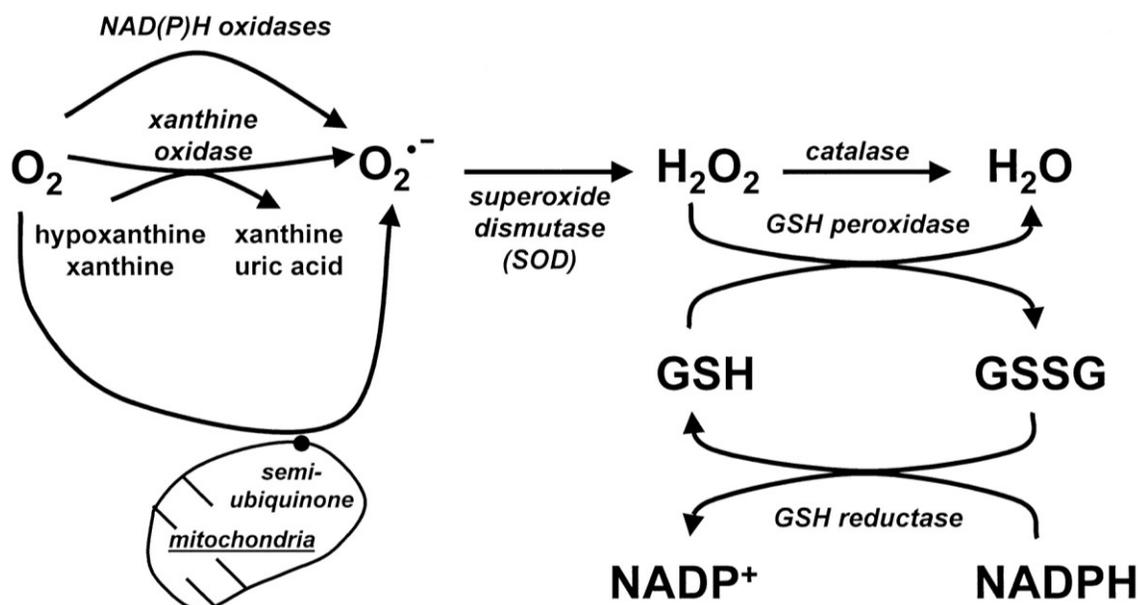
Des molécules endogènes comme le glutathion (GSH), l'albumine, la bilirubine, l'acide urique et l'acide ascorbique; ou exogènes telles que les vitamines A, E et l'ascorbate, constituent également des moyens de défense antioxydant non-enzymatique.

Ces molécules agissent principalement en « piégeant » les radicaux libres et en prévenant la conversion des ions ferriques en ion ferreux, qui facilitent la production de radicaux hydroxyle ( $OH^{\cdot}$ ) via la réaction de Fenton. La réaction de Fenton consiste en l'auto-oxydation du  $H_2O_2$  en  $OH^{\cdot}$  ( $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^{\cdot} + OH^-$ ) (Halliwell 1989).

#### **Figure 7 : Cascades de production et élimination des ROS :**

Les radicaux libres sont produits par les enzymes NADPH oxydase ainsi que xanthine oxydase. L'élimination des ROS dans la cellule se fait grâce à trois enzymes antioxydantes : la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GSH/GPX).

From (Dröge 2002), Copyright © 2002 The American Physiological Society



#### 1.4.3.3 Le stress oxydatif dans l'EN :

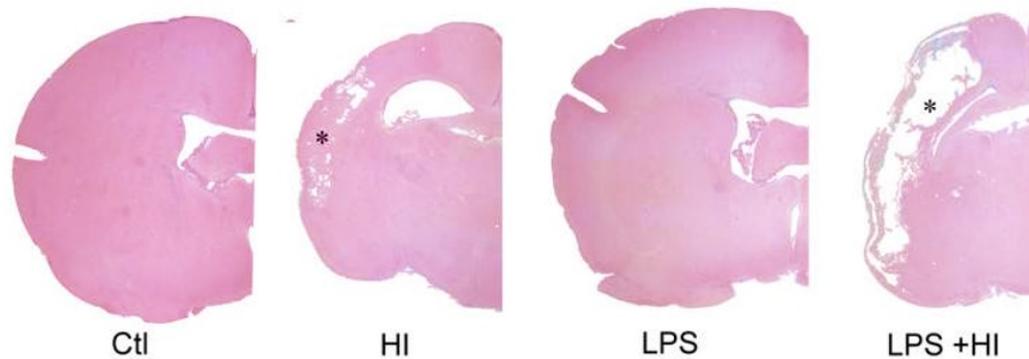
Le stress oxydatif joue un rôle majeur dans l'EN d'après les données précliniques démontrant que la surproduction de ROS après l'HI corrèle avec la mort des neurones par apoptose (Capani et al. 2003; Alonso-Alconada et al. 2012). En effet, la production de radicaux libres par la réaction de Fenton exerce d'important dommages neuronaux : dysfonctions mitochondriales, induction des cascades apoptotique et nécroptotique (voir paragraphe 1.3.2).

Récemment, plusieurs études cliniques montrent les effets bénéfiques du traitement par HT sur le stress oxydatif chez les nouveau-nés asphyxiés. D'après ces études, l'HT atténue l'index de stress oxydatif et améliore les issues neuro-développementales chez ces nouveau-nés, ce qui fournit un élément indirect en faveur d'une possible action neurotoxique des ROS dans ce contexte pathologique humain (Kakita et al. 2012; Joy et al. 2013; Gane et al. 2014). L'effet de l'HT sur les ROS n'a pas encore fait l'objet d'étude dans le cas où l'EN résulte d'une infection-inflammation en combinaison avec l'HI.

#### 1.4.4 Modèles animaux d'exposition au LPS+HI :

Après l'observation en clinique que l'inflammation maternelle menait souvent à un épisode d'HI (voir paragraphe 1.1.4.3), plusieurs groupes ont développé des modèles précliniques combinant stress inflammatoire et HI afin d'en décrire les effets sur le cerveau immature. Eklind et al. ont développé un modèle murin (rat) à P7 à double détente en utilisant une injection intrapéritonéale de LPS de *E. coli* suivi d'une HI (modèle Rice-Vannucci (Rice et al. 1981) ; voir paragraphe 1.2.1). Cette étude démontre la pertinence de combiner une l'inflammation avec l'HI car cette combinaison augmente de façon significative l'étendu des dommages (Eklind et al. 2001). D'autres études ont par la suite décrit les effets synergiques du LPS administré par voie systémique, associé à l'HI (figure 8) (Coumans et al. 2003; Brochu et al. 2011; Fleiss et al. 2015).

**Figure 8 : L'impact neurotoxique de l'HI est potentialisé par le lipopolysaccharide (LPS) d'*E. coli* dans un modèle préclinique.** L'HI seule (modèle Rice-Vannucci) engendre des lésions macroscopiques (les étoiles correspondent aux cavités) dans le cortex cérébral. L'exposition au LPS n'induit pas de lésions cérébrales macroscopiques. L'exposition au LPS+HI augmente les dommages cérébraux en comparaison à l'HI seule. L'inflammation causée par la présence du LPS potentialise la réaction inflammatoire et les dommages neurologiques causés par une agression de type HI. Reproduced with permission from (Brochu et al. 2011), Copyright from [Creative Commons Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).  
Link: <http://jneuroinflammation.biomedcentral.com/articles/10.1186/1742-2094-8-55c>



La combinaison HI et infection-inflammation est le scénario pathophysiologique le plus fréquent observé chez les nouveau-nés à terme souffrant d'EN (Fleiss et al. 2015; Girard, Kadhim, Roy, et al. 2009). Mon travail de maîtrise a donc ciblé les effets neuroprotecteurs de l'HT dans un modèle animal (rat) d'EN résultant de cette combinaison d'agression néonatale.

## **Hypothèse**

L'HT a des effets neuroprotecteurs dans un modèle d'EN résultant de l'inflammation plus hypoxie-ischémie. Ces effets sont indépendants du système de l'IL-1.

## **Objectifs**

### **Objectif #1 :**

Étudier l'impact de l'HT sur les dommages cérébraux résultants de l'exposition au LPS+HI.

### **Objectif #2 :**

Étudier la modulation par l'HT :

2.1 des marqueurs inflammatoires : cytokines (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-1Ra), métalloprotéinases (MMP-9), chimiokines (CINC-1, MCP-1)

2.2 des marqueurs de la mort neuronale (apoptose et nécroptose)

2.3 des marqueurs de stress oxydatif (enzymes antioxydantes)

### **Objectif #3 :**

Tester les effets combinés de l'IL-1Ra et de l'HT sur la prévention des dommages cérébraux.

**ARTICLE :**

Neuroprotective effects of hypothermia in  
inflammatory-sensitized hypoxic-ischemic  
encephalopathy.

Mathilde Chevin, Clémence Guiraut, Caroline Maurice-Gelinas, Jessica Deslauriers, Sylvain Grignon, Guillaume Sébire

**Statut de l'article** : soumis en tant qu'article original de recherche à *Neonatology*

**Avant-propos:**

L'article "*Neuroprotective effect of hypothermia in inflammatory-sensitized hypoxic-ischemic encephalopathy.*" a été soumis le 3 mai 2016 au journal *Neonatology*. Ce manuscrit est entièrement basé sur mon projet de recherche, conceptualisé par le directeur de recherche, Dr Guillaume Sébire, en collaboration avec l'étudiante.

Dans le cadre de mon projet de maîtrise, j'ai effectué l'intégralité des expérimentations menant aux résultats présentés dans le manuscrit. L'écriture du manuscrit, ainsi que l'avancement des résultats présentés, ont été réalisés sous la supervision du Dr Sébire. Les co-auteurs de l'article ont lus et révisés l'article avant la soumission.

## Résumé :

**Contexte :** Malgré la récente introduction de l'hypothermie (HT) dans le traitement de l'encéphalopathie des nouveau-nés à terme, l'incidence de l'encéphalopathie néonatale (EN) et ses conséquences neurologiques et comportementales désastreuses demeurent des problématiques majeures sur les plans individuel, familial et social. L'EN est engendré principalement par des effets combinés et des interactions entre l'hypoxie-ischémie (HI) et l'inflammation résultant d'infections néonatales ou du placenta. Nous ne savons pas avec certitude pourquoi l'HT est efficace pour alléger les dommages induits par l'EN chez certains nouveau-nés, mais pas chez tous les nouveau-nés atteints d'EN. Cependant, les nouveau-nés qui ont été exposés à l'HI sensibilisée par l'inflammation semblent avoir moins d'effets bénéfiques de l'HT, que ceux exposés à l'HI pure.

**Méthode :** En utilisant un modèle préclinique d'EN, chez le rat, induite par l'endotoxine plus l'HI, nous avons mesuré chez les rats soumis ou non à l'HT : l'étendue des dommages cérébraux et l'expression des cytokines pro-inflammatoires, d'une métalloprotéinase, des enzymes antioxydantes, ainsi que l'expression de RIP-3 (*receptor-interacting protein-3*) responsable de la mort cellulaire.

**Résultats :** L'HT a des effets neuroprotecteurs sur les lésions cérébrales dites de pénombre, mais pas sur le cœur des lésions, induites par l'HI sensibilisée par l'inflammation. Cet effet bénéfique de l'HT est associé avec la réduction des enzymes antioxydantes (la superoxyde dismutase-1, la glutathion peroxydase-1), mais n'est pas médié via la variation d'autres médiateurs inflammatoires, tels que : l'interleukine-1 $\beta$ , l'antagoniste récepteur à l'interleukine-1, le *tumor necrosis factor- $\alpha$*  et la métalloprotéinase-9.

**Conclusion :** L'HT a des effets neuroprotecteurs dans l'HI sensibilisée par l'inflammation.

## Abstract

**Background:** Despite the recent introduction of hypothermia (HT) as a mandatory standard of care, the incidence of neonatal encephalopathy (NE) and its devastating neuro-behavioral outcomes remain a major individual, familial and social issue. NE is mainly due to the compounding and interacting effects of hypoxia-ischemia (HI) and inflammation resulting from placental and neonatal infections. It is unclear why HT is effective in alleviating NE in some, but not all, newborns. However, newborns exposed to inflammatory-sensitized HI seem to have less therapeutic benefit from HT than those exposed to HI alone. To clarify this uncertainty, we tested the efficacy of HT in a double-hit rat model of NE induced by inflammatory-sensitized HI.

**Methods:** Using a rat preclinical model of endotoxin plus HI-induced NE, we assessed in pups exposed or not to HT: the extent of brain injuries and the expressions of pro-inflammatory cytokines, metalloproteinase, antioxidant enzymes, as well as receptor-interacting protein-3-induced cell death.

**Results:** HT was neuroprotective on inflammatory-sensitized HI-induced penumbra, but not core, brain injuries. This beneficial effect was associated to an HT-induced increase of antioxidant enzymes (superoxide dismutase-1, glutathione peroxidase-1), but was not mediated by any HT-induced variations of the other inflammatory mediators tested, namely: interleukin-1 $\beta$ , interleukin-1 receptor antagonist, tumor necrosis factor- $\alpha$  and matrix metalloproteinase-9.

**Conclusion:** HT is neuroprotective against inflammatory-sensitized HI.

## INTRODUCTION

Neonatal encephalopathy (NE) affects up to 0.8% of term newborns and is the second most common cause of childhood neurological disability [1]. Continued research into neuroprotective strategies against NE is important in light of the fact that recently tested neuroprotective therapies were either proven to be modestly effective, ineffective, or even potentially harmful [1,2]. Treatments available against NE consist of symptomatic care and hypothermia (HT), which leave 50% of the treated patients with major sequelae, such as cerebral palsy (CP) [1]. Data from the Canadian CP Registry showed that HT only prevents 4% of CP cases [2]. NE is mainly due to the compounding effects of hypoxia-ischemia (HI) and inflammation resulting from placental infections and neonatal sepsis [3,4]. It is unclear why HT is effective in alleviating NE in some, but not all, newborns. However, it has been reported that newborns exposed to inflammatory-sensitized HI might have less therapeutic benefit from HT than those exposed to HI alone [5,6]. Inflammatory and oxidative pathways implicating the interleukin-1 (IL-1) system – namely the IL-1 $\beta$ /IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) balance –, tumor necrosis factor alpha (TNF)- $\alpha$ , matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), and reactive oxygen species (ROS) play a critical role in brain injuries of term newborns resulting from HI or inflammatory-sensitized HI [3,7]. Preclinical studies established the neuroprotective effect of HT in the context of HI encephalopathy (HIE) alone in term or late preterm newborns [8,9]. However, few preclinical studies investigated the effect of HT when NE results from the combination of HI and infection/inflammation, a common pathophysiological scenario encountered in human newborns with NE and subsequent CP [4,5]. These findings led us to test, using a preclinical model, the neuroprotective efficacy of HT against NE due to inflammatory-sensitized HI.

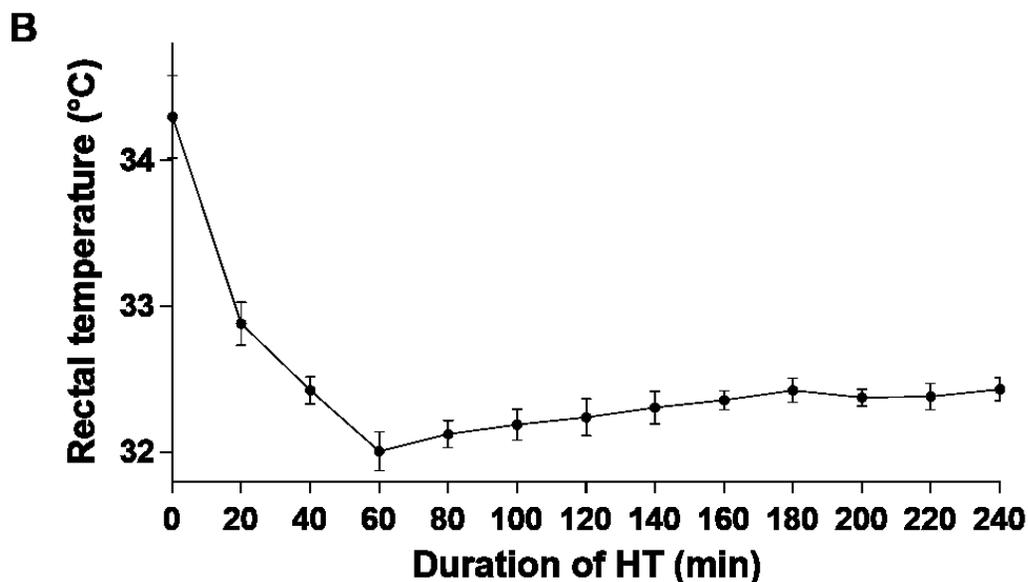
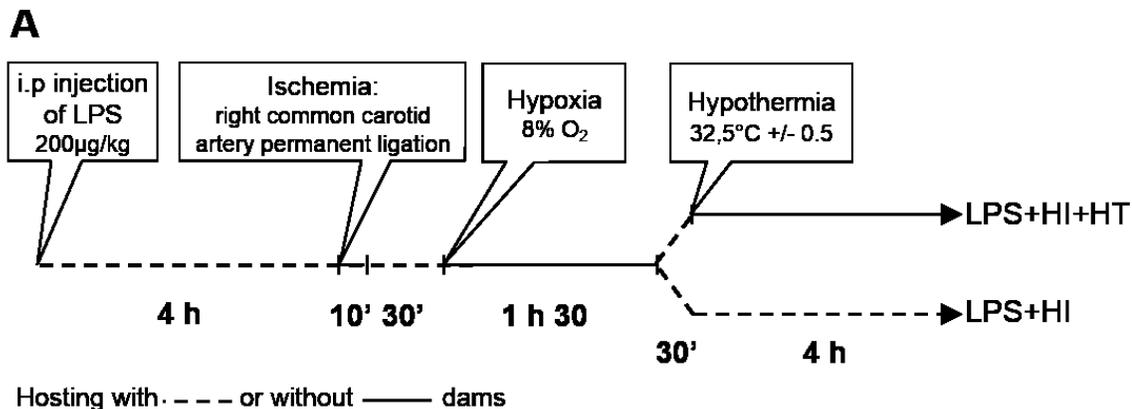
## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### *Rat model*

Our pre-clinical model was designed as described [10,11]. Briefly, Lewis dams (n=10) were obtained from Charles River Laboratories (Saint-Constant, QC) between gestational day 13 (G13) and 15 (G15). At postnatal day 12 (P12), pups received a single intraperitoneal (i.p.) injection of LPS (200 µg/kg diluted in 50 µL of pyrogen-free saline) from *E. coli* (Sigma-Aldrich, ON). HI was induced 4 hours (h) after LPS administration by permanent ligation of the right common carotid artery followed by 8% O<sub>2</sub> exposure at 37°C ± 1°C for 1.5 h. In the LPS+HI+HT group, HT was induced 30 minutes (min) after hypoxia. Pups on HT were kept on a hot plate in order to lower their temperature until 32.5°C ± 0.5°C (Fig. 1A). Pups reached the targeted temperature after 30 min ± 10 min. Rectal temperature was measured every 20 min by using a calibrated (0.1°C deviation) temperature probe (RET-3-ISO, Physitemp Instruments, Clifton, NJ). HT was maintained in a reproducible manner for 4 h (Fig. 1B). In the LPS+HI group, pups stayed with the dam during the time their peers underwent HT; they maintained their temperature at 36.2°C ± 0.4°C. Among pups exposed to LPS+HI (n=93), regardless of HT, the mortality rate was 8% during surgery, 45% during hypoxia, and 2% post-HI. Pups (n=41) were randomized in two experimental groups: LPS+HI (n=21) and LPS+HI+HT(n=20). Pups were euthanized at 4 h (P12), 24 h (P13), and 8 days (P20) post-HI. We built this preclinical model in the aim to reproduce the clinical scenario occurring in severe cases of NE of full-term newborns. In such scenarios, the mortality rate remains very high: 40-50%, despite the use of the best standard of cares [12]. For the sake of clinical pertinence of the model, we considered, as well as our animal ethic committee, that such level mortality was justified. The experimental protocol was approved by the Institutional Animal Care Committee of the *Université de*

Sherbrooke (protocol #147-11R) in accordance with the Canadian Council on Animal Care guidelines ([http://www.ccac.ca/en/\\_standards/guidelines](http://www.ccac.ca/en/_standards/guidelines)).

**Figure 1**



**Fig. 1: Experimental design.** Inflammation was induced in pups at postnatal day 12 (P12) with an i.p. injection of 200 µg/kg of LPS from *E.coli*; 4 h later, the right common carotid artery was ligated, and hypoxia was induced (8% O<sub>2</sub> for 1.5 h). Rat pups were subjected or not to HT (32.5°C ± 0.5°C for 4 h) (**A**). Rat pups reached the targeted temperature (32.5°C ± 0.5°C) 30 min ± 10 min after being isolated from the

mother. Rectal temperature was measured every 20 min by using a calibrated temperature probe. The end of hypoxia was referred to as 0 min. Number (n) of rats: LPS+HI+HT (n=12 from 6 litters) (**B**).

*Abbreviations:* h: hours; HI: hypoxia-ischemia; HT: hypothermia; i.p.: intraperitoneally; LPS: lipopolysaccharide from *E.coli*; min: minutes.

### *Histology*

The brains were removed and fixed (paraformaldehyde 4%, 0.1% glutaraldehyde) at room temperature, paraffin-embedded, and cut in 5  $\mu$ m slices using a microtome. Hematoxylin-eosin (H&E) staining was used to visualize brain injuries. Coronal sections were scanned with a NanoZoomer Digital Pathology Scanner (NanoZoomer 2.0-RS, Hamamatsu Photonics, Japan), and used according to the manufacturer instructions (NDP.view2 software, Hamamatsu Photonics, Japan) was used to measure the surface of the hemispheres on coronal sections located at the epicenter of the infarct (Bregma from -2.30 mm to -2.50 mm), as previously described [10,11]. The right hemisphere surface and the right hippocampal surface of LPS+HI $\pm$ HT-exposed rats were then compared with those of the left hemisphere (non-subjected to ischemia) from the same experimental condition [10,11]. Core vs penumbra areas of brain infarcts were defined as previously described [10,11]. Briefly, core injuries were associated with infarcted areas bearing cavitory lesions, whereas penumbra injuries were identified as regions surrounding the core where pycnotic neurons and/or loss of normal neuronal architecture were observed.

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

IHC and IF were performed as previously described [10,11,13]. Briefly, sections were incubated overnight at 4°C with the primary antibodies (Table). The appropriate horseradish peroxidase-conjugated or fluorescent-conjugated secondary antibodies (Table) were used for a 45 min incubation at room temperature. IHC labeling was revealed using diaminobenzidine (DAB) (Roche, Qc, Canada). Slides were

counterstained with hematoxylin. IF slides were mounted using a DAPI-containing medium (Invitrogen, Ontario, Canada). Labeled cells were counted as previously described [10,11]. The expression of the proteins of interest was analyzed using the Image J analysis software (NIH Image, <http://rsbweb.nih.gov/nih-image/>), as previously described [10,11].

### Table

#### List and features of antibodies.

Antibody	Company-reference number	Dilution
Anti-IL-1 $\beta$	Serotec-AAR15G	1:100
Anti-IL-1Ra	SCBT-sc25444	1:25
Anti-catalase	Abcam-ab125688	1:100
Anti-GPX-1	R&D systems-AF3798	1:50
Anti-RIP-3	Abcam-ab62344	1:30
Anti-SOD-1	Abcam-ab13498	1:100
Anti-goat-HRP	SCBT-sc2056	1:100
Anti-mouse-HRP	SCBT-sc2005	1:100
Anti-rabbit-HRP	SCBT-sc2030	1:100
Anti-rabbit-Alexa fluor conjugated	Invitrogen-A11012	1:500

### ELISA

Protein extracts were prepared from right hemisphere forebrains as previously described [10,11,14]. ELISAs were performed on these protein extracts using ELISA kits (R&D System, MN), as previously described [10,11,14].

### *Data analysis*

Statistical analyses were performed using IBM Statistics 23 (SPSS) and GraphPad software version 6.02. The data are presented as the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Results across experimental conditions were compared using the Mann-Whitney U test. The statistical significance level was set at  $p \leq 0.05$ . All data were analyzed using linear mixed models (MIXED) using SPSS, using sex and treatment (LPS+HI vs LPS+HI+HT) as fixed effects and litter as a random effect. Male and female data were combined, because no significant difference was observed between sex and treatment. Statistical analyses revealed no litter effect in any of the analyses.

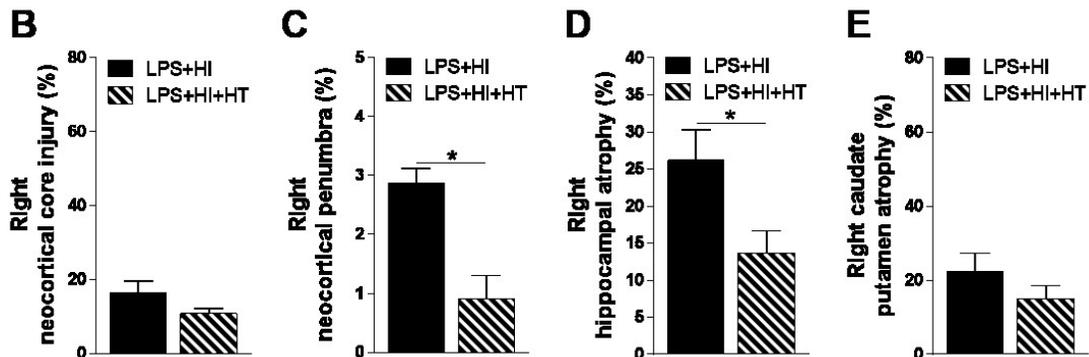
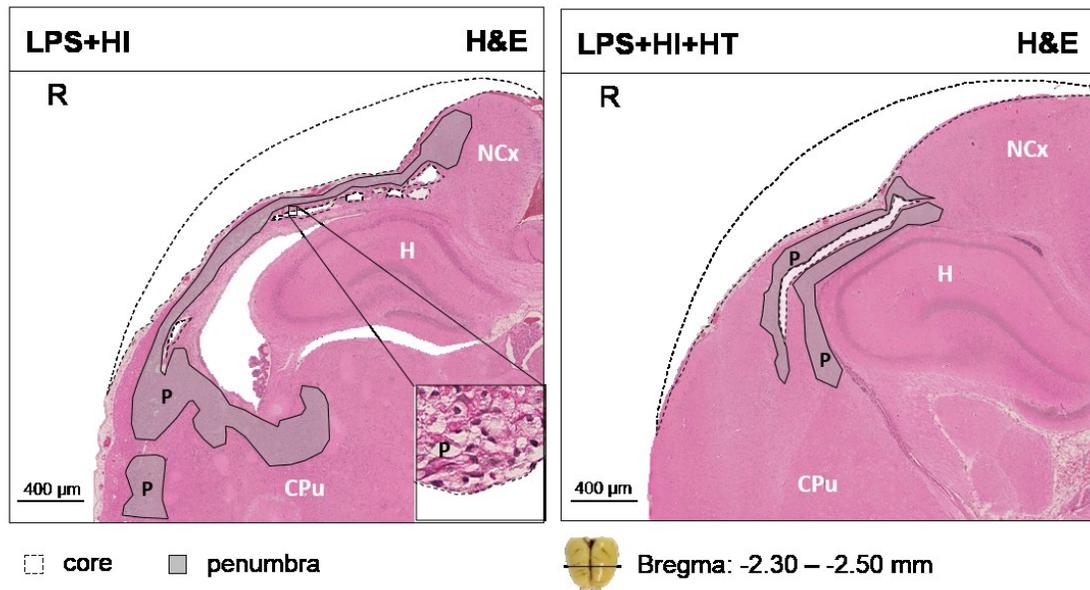
## **RÉSULTATS**

### *HT reduced penumbra but not core of LPS+HI-induced injuries*

HT exerted a neuroprotective effect on the extent of LPS+HI-induced neocortical injuries. In the neocortex HT induced a 68% reduction in the extent of LPS+HI-induced penumbra, but did not affect the core injuries (Fig. 2A-C). HT reduced the LPS+HI-induced hippocampal penumbra injuries by 48% (Fig. 2D), but had no effect on the LPS+HI-induced caudate-putamen penumbra injuries (Fig. 2E). There was no core injury observed in hippocampal and caudate-putamen areas.

Figure 2

A



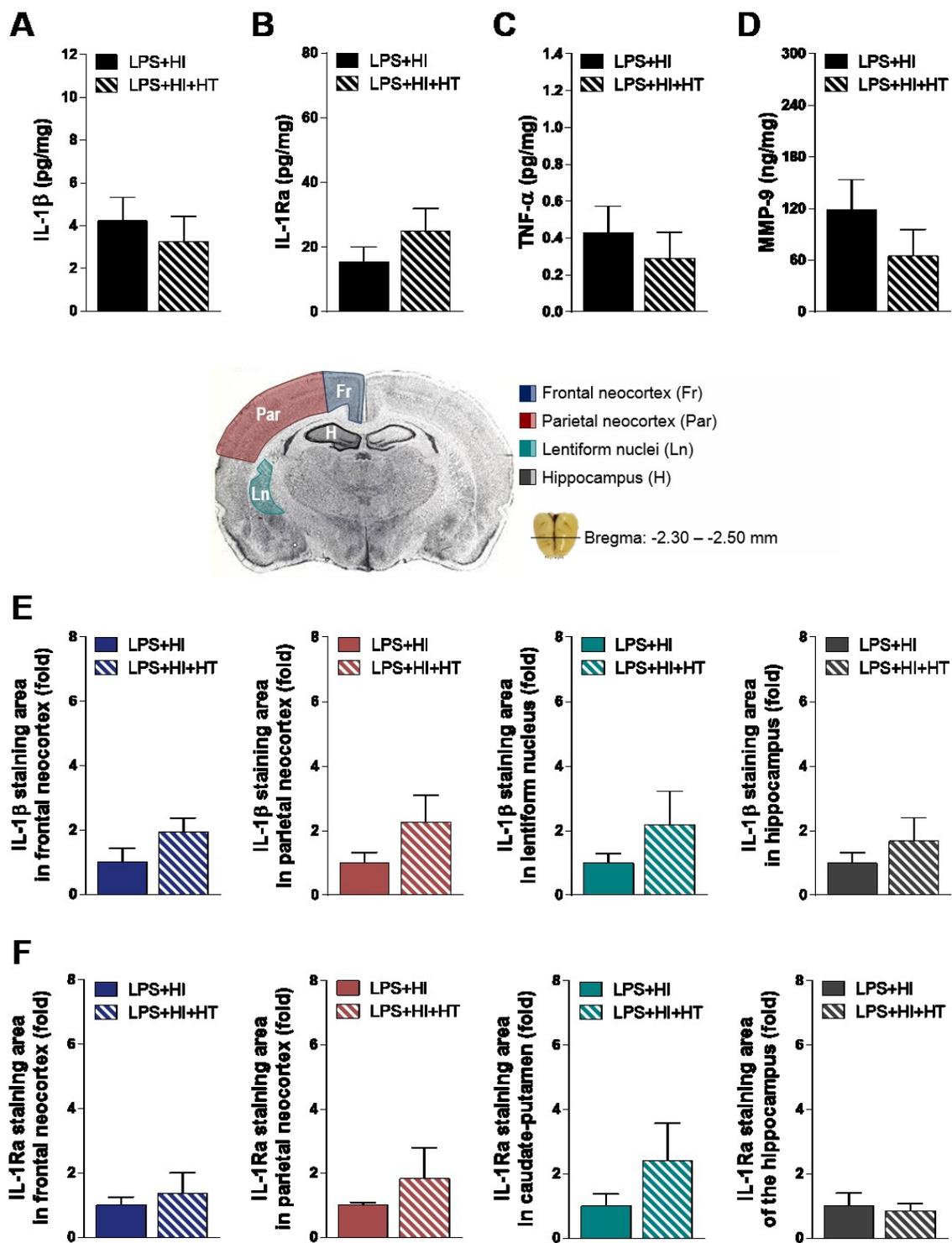
**Fig. 2: Comparison of the extent of brain injuries between LPS+HI±HT conditions.** Measure of the extent of core and penumbra injuries in pups exposed to LPS+HI±HT by H&E staining of the right forebrains at P20 (A). HT reduced the surface of penumbra, but not core, lesions (B, C). The surface of the hippocampus was decreased in LPS+HI compared to LPS+HI+HT conditions (D). The surface of the caudate putamen was identical in both conditions (E). Number (n) of rats: LPS+HI (n=7 from 4 litters), LPS+HI+HT (n=7 from 3 litters). The bars indicate the mean ± SEM. \*p < 0.05; Mann-Whitney U test. Scale bar = 400μm.

*Abbreviations:* CPu: caudate putamen; H: hippocampus; HI: hypoxia-ischemia; HT: hypothermia; H&E: hematoxylin and eosin; LPS: lipopolysaccharide from *E.coli*; NCx: neocortex; P: penumbra; R: right.

*Effect of HT on the expression of inflammatory mediators, antioxidant enzymes, and RIP-3-induced necroptosis.*

Using the same model of inflammatory-sensitized HI, we previously showed that the IL-1/TNF- $\alpha$ /MMP-9 inflammatory axis was upregulated from 4 h to 24 h post-HI, and played a key role in LPS+HI-induced brain injuries [10,11]. Thus, in the present study, we tested the influence of HT on the expression of these key neurotoxic molecules. IL-1 $\beta$ , IL-1Ra, TNF- $\alpha$  and MMP-9 expressions measured by ELISA (Fig. 3A-D) and IHC (Fig. 3E-F) within the LPS+HI-exposed right hemisphere at 4 h and 24 h post-HI were not affected by HT. The IL-1 $\beta$ /IL-1Ra ratios were identical within the right hemisphere of LPS+HI *versus* LPS+HI+HT-exposed pups (data not shown). Reactive oxygen species (ROS) are known to be downregulated by HT within the brains of infants exposed to HI alone [15,16]. This prompted us to test the impact of LPS+HI $\pm$ HT on key enzymes responsible for ROS clearance: superoxide dismutase-1 (SOD-1), catalase (CAT) and glutathione peroxidase-1 (GPX-1). In pups submitted to LPS+HI, HT increased SOD-1 expression in the neocortex and in the lentiform nucleus (Fig. 4A-B). GPX-1 levels in the lentiform nucleus, but not in the neocortex, were elevated following HT (Fig. 4C-D), while no changes in CAT levels were found (Fig. 4E-F). TNF- $\alpha$ -induced necroptosis has been shown to play a key role in HI-induced neural cell death [11] and RIP-3 is a critical molecule in the induction of this necroptotic process as observed in the neocortical core lesions from the present model of inflammatory-sensitized HI [11]. In keeping with this observation [11], HT did not affect the level of RIP-3 expression within LPS+HI-exposed forebrain (Fig. 5A-D) and did not prevent core lesions.

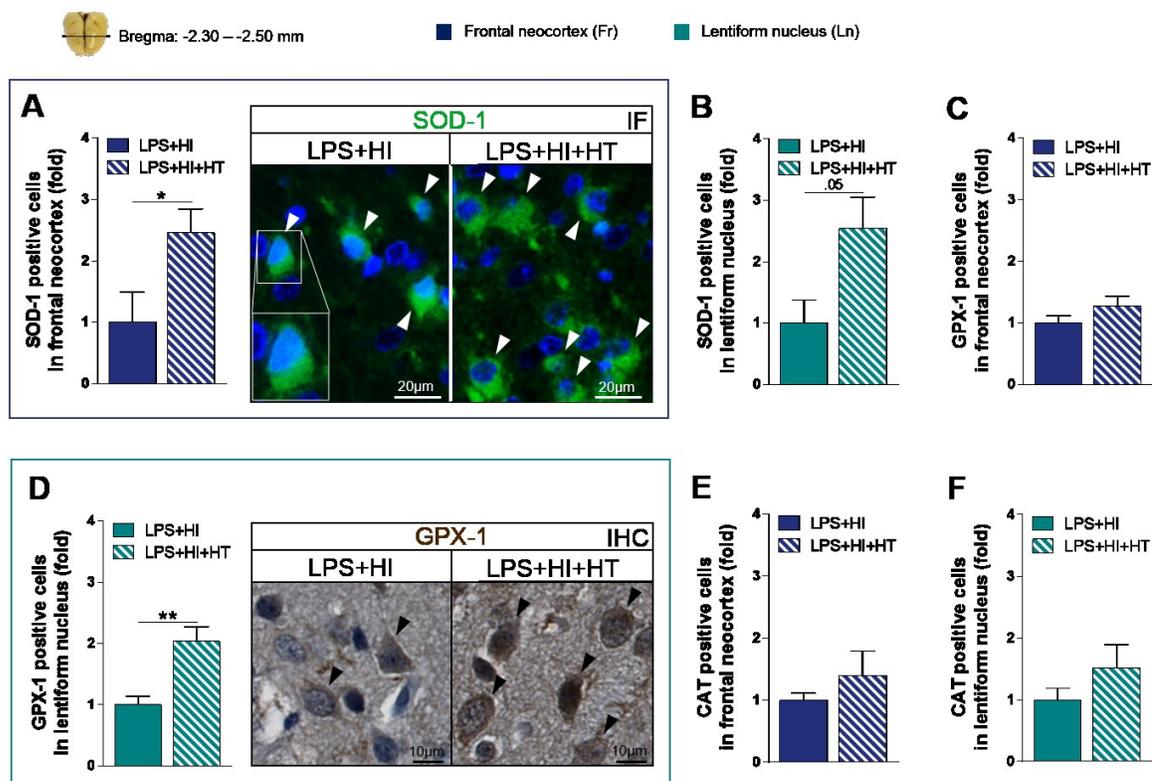
Figure 3



**Fig. 3: Inflammatory mediators' expressions within the right cerebral hemisphere exposed to LPS+HI±HT.** HT did not modulate IL-1 $\beta$  (A), IL-1Ra (B), TNF- $\alpha$  (C), and MMP-9 (D) expressions measured by ELISA at 24 h post-HI in the LPS+HI-exposed pups. Number (n) of rats: LPS+HI (n=7 from 5 litters), LPS+HI+HT (n=5 from 3 litters). HT did not affect IL-1 $\beta$  (E) and IL-1Ra (F) expressions (measured by colorimetric analyses of IHC staining) at 4 h post-HI within the LPS+HI-exposed frontal neocortex, parietal neocortex, lentiform nucleus, and hippocampus from the right hemisphere. Number (n) of rats: LPS+HI (n=5 from 3 litters), LPS+HI+HT (n=5 from 3 litters).

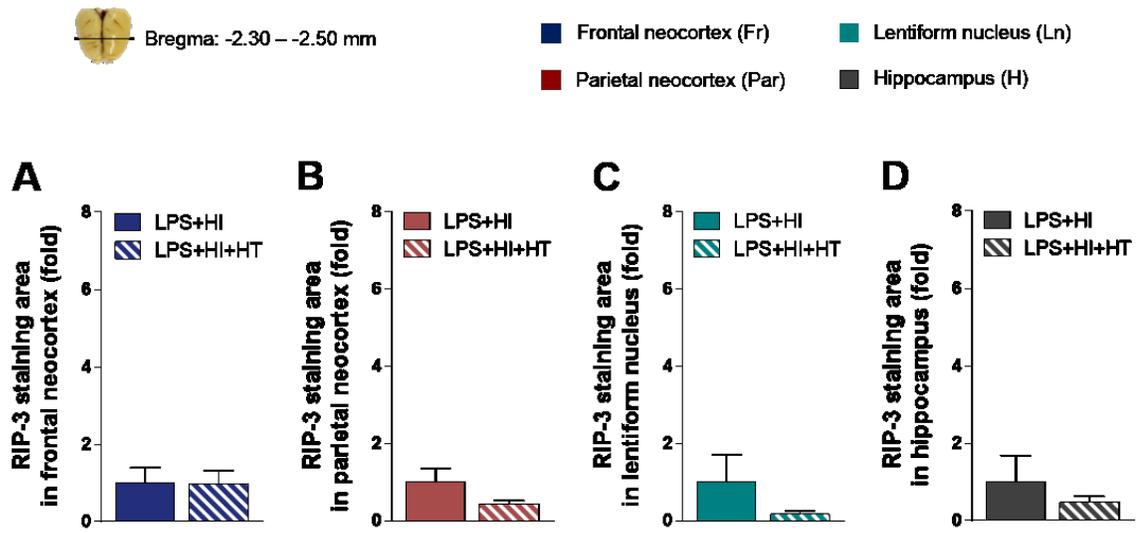
*Abbreviations:* HI: hypoxia-ischemia; HT: hypothermia; IL-1 $\beta$ : interleukin-1 $\beta$ ; IL-1Ra: interleukin-1 receptor antagonist; LPS: lipopolysaccharide from *E.coli*; MMP-9: matrix metalloproteinase-9; TNF- $\alpha$ : tumor necrosis factor- $\alpha$ .

Figure 4



**Fig. 4: SOD-1, CAT, and GPX-1 expressions within the LPS+HI±HT-exposed right forebrain.** The SOD-1 expression in the frontal neocortex was increased in LPS+HI+HT compared to LPS+HI condition (**A**). A trend ( $p=0.05$ ) toward an increase of SOD-1 expression in the lentiform nucleus was observed in LPS+HI+HT vs LPS+HI conditions (**B**). HT increased the GPX-1 expression within the lentiform nucleus exposed to LPS+HI (**D**). HT did not affect CAT expression within the frontal neocortex (**E**) and the lentiform nucleus (**F**) at 4 h post-HI in the LPS+HI exposed forebrain. Number (n) of rats: LPS+HI (n=5 from 3 litters), LPS+HI+HT (n=6 from 3 litters). The bars indicate the mean  $\pm$  SEM. \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ ; Mann-Whitney U test. *Abbreviations:* CAT: catalase; GPX-1: glutathione peroxidase-1; HI: hypoxia-ischemia; HT: hypothermia; LPS: lipopolysaccharide from *E.coli*; SOD-1: superoxide dismutase-1.

Figure 5



**Fig. 5: RIP-3 expression within the LPS+HI±HT-exposed right forebrain.** HT did not modulate RIP-3 expression at 4 h post-HI within the LPS+HI-exposed frontal neocortex (**A**), parietal neocortex (**B**), lentiform nucleus (**C**), and hippocampus (**D**) from the right hemisphere. Number (n) of rats: LPS+HI (n=7 from 4 litters), LPS+HI+HT (n=6 from 3 litters). Mann-Whitney U test.

*Abbreviations:* HI: hypoxia-ischemia; HT: hypothermia; LPS: lipopolysaccharide from *E.coli*; RIP-3: receptor-interacting protein-3.

## DISCUSSION

Our results demonstrated a neuroprotective effect of HT on penumbra, but not core, in inflammatory-sensitized HI of term newborn forebrains. This beneficial effect was associated with a HT-induced increase of antioxidant enzymes, but does not seem to be mediated by HT-induced variations of other key inflammatory molecules implicated in the physiopathology of NE, namely: IL-1 $\beta$ , IL-1Ra, TNF- $\alpha$  and MMP-9. The lack of neuroprotective effect of HT on core injuries is in line with the absence of downregulation of RIP-3 expression within the brain of term like newborns exposed to inflammatory-sensitized HI.

The neuroprotective effect of HT observed here against LPS+HI-induced brain injuries showed similarities but also certain discrepancies with the few studies addressing the same question [5,17]. Osredkar et al. used a relatively similar LPS+HI experimental design as ours, but at an earlier stage of development (P7) corresponding to a late preterm stage of brain development. In their macroscopic study, HT did not modify the extent of LPS+HI-induced core brain injuries [5], which is in line with our results and with previous studies using *in vivo* model of HI-induced brain injuries. In subsequent work using the same preclinical rat model at P7, Osredkar et al. showed that HT did not counteract the LPS+HI-induced decreased NeuN expression, an indirect marker of neuronal injury, within the cerebral hemisphere ipsilateral to ischemia [17]. This finding suggested that HT did not prevent LPS+HI-induced neuronal loss, in contrast with what we observed. This discrepancy might be due to the use of P7 (late preterm level of development) *versus* P12 pups (term level of development), the latter time point being to our knowledge more relevant to NE, since it occurs more frequently in full-term newborns. The important neurodevelopmental and associated metabolic and inflammatory variations described between preterm *versus* term newborns might account for the differential effects of HT observed between these models of inflammatory-sensitized HI [14].

We previously showed that IL-1 $\beta$  played a key role: (i) in the early (1-24 h) LPS+HI-induced neuroinflammatory response, and (ii) in generating both core and penumbra cerebral injuries of NE [10,11]. In the present study, HT acted only on penumbra but not on core of LPS+HI-induced brain lesions of term-like newborns. It has been reported that HT is neuroprotective against NE by reducing brain metabolism, and limiting apoptotic cascades [18,19]. The effect of HT on neuroinflammatory cytokines expression has been poorly studied up to now in preclinical model of NE. It has been shown that an anti-inflammatory cytokine (IL-10) was downregulated by HT in a model of HI-induced NE, which suggested more a pro- than anti-inflammatory effect of HT in HI-induced NE [20]. Here, HT did not have any effect on the key molecules of the IL-1 signaling system that we tested, suggesting that IL-1 blockade combined with HT might have additive or synergistic protective effects on both core and penumbra injuries of NE. This is supported by recent studies from our lab and others demonstrating that the upregulation of IL-1 is involved in the neuroinflammatory processes at play in perinatal brain injury, and that IL-1Ra has a neuroprotective effect against LPS and/or HI-induced brain lesions and subsequent neuro-disabilities [11,21–23].

Although there was no correlation in the effects of HT on the pro-inflammatory cytokine IL-1 $\beta$  and the extent of LPS+HI-induced brain injuries, we showed that HT increased antioxidant enzymes SOD-1 and GPX-1 levels in the neocortex and the lentiform nucleus, supporting the key implication of oxidative mechanisms in the effects of HT. Indeed, it has been suggested that oxidative stress might modulate the beneficial effects of HT [24] and HT has been shown to preserve antioxidant defenses following traumatic brain injury in children [25].

Our work presents some limitations. Beyond the anti-oxidant effect of HT, we did not further elucidate by which mechanism HT protects against inflammatory-sensitized HI insults. We showed that HT does not down-regulate RIP-3 induced necroptosis, but HT might reduce apoptosis as documented in preclinical studies dealing with HI-induced NE [8]. HT could also prevent necrosis in LPS+HI-induced brain injuries through the HT-induced down-regulation of brain metabolism [8]. We did not focus our study on possible sex-dichotomic effects that are possibly involved in HI

vulnerability and related inflammatory responses. However, we did not observe any sex-dependent effect in the outcomes measured in the different studies we performed using the same model [10,11,14].

Given that severe NE corresponds to the level of severity in which the worst neurological sequelae are observed and in which the current therapeutic interventions including HT are the less effective, the severity of the brain injuries and the significant mortality we observed in our LPS+HI model support the idea that our experimental conditions mimic severe NE. The neuroprotective effect of HT against inflammatory-sensitized HI does not seem to be mediated by a HT-induced modulation of the IL-1 system, meaning that the IL-1 blockade – which has been already shown as effective to curb LPS+HI-induced core and penumbra injuries [11] - might potentiate the effect of HT against NE and subsequent CP.

### **Conflict of interest**

The authors declare that they have no conflict of interest.

### **Acknowledgements**

This work was supported by grants from the Canadian Institute of Health Research, Foundation of Stars, Montreal Children Hospital Foundation, and Heart and Stroke Foundation of Canada. The authors are grateful to the *Faculté de Médecine des Sciences de la Santé de l'Université de Sherbrooke*, Canada, for the “Tranzyme-Pharma” MSc scholarship, to the Integrated Program in Neuroscience for the Entrance Award, and to Hoppenheim/Montreal Children Hospital Foundation for the research bursary.

## References

1. Azzopardi D, Strohm B, Marlow N, Brocklehurst P, Deierl A, Eddama O, et al.: Effects of hypothermia for perinatal asphyxia on childhood outcomes. *N Engl J Med* 2014 Jul 10;371:140–149.
2. Garfinkle J, Wintermark P, Shevell MI, Platt RW, Oskoui M, Canadian Cerebral Palsy Registry: Cerebral Palsy after Neonatal Encephalopathy: How Much Is Preventable? *J Pediatr* 2015 Jul;167:58–63.e1.
3. Fleiss B, Tann CJ, Degos V, Sigaut S, Van Steenwinckel J, Schang AL, et al.: Inflammation-induced sensitization of the brain in term infants. *Dev Med Child Neurol* 2015 Apr;57 Suppl 3:17–28.
4. Girard S, Kadhim H, Roy M, Lavoie K, Brochu ME, Larouche A, et al.: Role of perinatal inflammation in cerebral palsy. *Pediatr Neurol* 2009 Mar;40:168–174.
5. Osredkar D, Thoresen M, Maes E, Flatebø T, Elstad M, Sabir H: Hypothermia is not neuroprotective after infection-sensitized neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Resuscitation* 2014 Apr;85:567–572.
6. Wintermark P, Boyd T, Gregas MC, Labrecque M, Hansen A: Placental pathology in asphyxiated newborns meeting the criteria for therapeutic hypothermia. *Am J Obstet Gynecol* 2010 Dec;203:579.e1–579.e9.
7. Eliwan HO, Watson RW, Aslam S, Regan I, Philbin B, O'Hare FM, et al.: Neonatal brain injury and systemic inflammation: modulation by activated protein C ex vivo. *Clin Exp Immunol* 2015 Mar;179:477–484.
8. Ohmura A, Nakajima W, Ishida A, Yasuoka N, Kawamura M, Miura S, et al.: Prolonged hypothermia protects neonatal rat brain against hypoxic-ischemia by reducing both apoptosis and necrosis. *Brain Dev* 2005 Oct;27:517–526.
9. Patel SD, Pierce L, Ciardiello A, Hutton A, Paskewitz S, Aronowitz E, et al.: Therapeutic hypothermia and hypoxia-ischemia in the term-equivalent neonatal rat: characterization of a translational preclinical model. *Pediatr Res* 2015 Sep;78:264–271.
10. Savard A, Lavoie K, Brochu ME, Grbic D, Lepage M, Gris D, et al.: Involvement of neuronal IL-1 $\beta$  in acquired brain lesions in a rat model of neonatal encephalopathy. *J Neuroinflammation* 2013 Sep 5;10:110.
11. Savard A, Brochu ME, Chevin M, Guiraut C, Grbic D, Sébire G: Neuronal self-injury mediated by IL-1 $\beta$  and MMP-9 in a cerebral palsy model of severe neonatal encephalopathy induced by immune activation plus hypoxia-ischemia. *J Neuroinflammation* 2015 May 30;12:111.
12. Guillet R, Edwards AD, Thoresen M, Ferriero DM, Gluckman PD, Whitelaw A, et al.: Seven- to eight-year follow-up of the CoolCap trial of head cooling for neonatal encephalopathy. *Pediatr Res* 2012 Feb;71:205–209.
13. Girard S, Kadhim H, Beaudet N, Sarret P, Sébire G: Developmental motor deficits induced by combined fetal exposure to lipopolysaccharide and early neonatal hypoxia/ischemia: a novel animal model for cerebral palsy in very premature infants. *Neuroscience* 2009 Jan 23;158:673–682.
14. Brochu ME, Girard S, Lavoie K, Sébire G: Developmental regulation of the neuroinflammatory responses to LPS and/or hypoxia-ischemia between

- preterm and term neonates: An experimental study. *J Neuroinflammation* 2011 May 20;8:55.
15. Kakita H, Hussein MH, Kato S, Yamada Y, Nagaya Y, Asai H, et al.: Hypothermia attenuates the severity of oxidative stress development in asphyxiated newborns. *J Crit Care* 2012 Oct;27:469–473.
  16. Joy R, Pournami F, Bethou A, Bhat VB, Bobby Z: Effect of therapeutic hypothermia on oxidative stress and outcome in term neonates with perinatal asphyxia: a randomized controlled trial. *J Trop Pediatr* 2013 Feb;59:17–22.
  17. Osredkar D, Sabir H, Falck M, Wood T, Maes E, Flatebø T, et al.: Hypothermia Does Not Reverse Cellular Responses Caused by Lipopolysaccharide in Neonatal Hypoxic-Ischaemic Brain Injury. *Dev Neurosci* 2015 Jun 12;37:390–397.
  18. Gancia P, Pomero G: Brain cooling therapy. *Minerva Pediatr* 2010 Jun;62:173–175.
  19. Shankaran S: Therapeutic hypothermia for neonatal encephalopathy. *Curr Treat Options Neurol* 2012 Dec;14:608–619.
  20. Matsui T, Kakeda T: IL-10 production is reduced by hypothermia but augmented by hyperthermia in rat microglia. *J Neurotrauma* 2008 Jun;25:709–715.
  21. Quiniou C, Kooli E, Joyal JS, Sapieha P, Sennlaub F, Lahaie I, et al.: Interleukin-1 and ischemic brain injury in the newborn: development of a small molecule inhibitor of IL-1 receptor. *Semin Perinatol* 2008 Oct;32:325–333.
  22. Girard S, Sébire H, Brochu ME, Briota S, Sarret P, Sébire G: Postnatal administration of IL-1Ra exerts neuroprotective effects following perinatal inflammation and/or hypoxic-ischemic injuries. *Brain Behav Immun* 2012 Nov;26:1331–1339.
  23. Lan KM, Tien LT, Pang Y, Bhatt AJ, Fan LW: IL-1 receptor antagonist attenuates neonatal lipopolysaccharide-induced long-lasting learning impairment and hippocampal injury in adult rats. *Toxicol Lett* 2015 Apr 2;234:30–39.
  24. Alva N, Palomeque J, Carbonell T: Oxidative stress and antioxidant activity in hypothermia and rewarming: can RONS modulate the beneficial effects of therapeutic hypothermia? *Oxid Med Cell Longev* 2013 Dec 2;2013:957054.
  25. Bayir H, Adelson PD, Wisniewski SR, Shore P, Lai Y, Brown D, et al.: Therapeutic hypothermia preserves antioxidant defenses after severe traumatic brain injury in infants and children. *Crit Care Med* 2009 Feb;37:689–695.

## DISCUSSION

Nos résultats ont démontré que l'HT a des effets neuroprotecteurs dans un modèle d'EN résultant de l'inflammation plus HI. Ces résultats montrent des similarités ainsi que certaines différences avec les deux études précliniques adressant la même question (Osredkar et al. 2014; Osredkar et al. 2015).

### 1. Effet de l'HT sur l'étendue des lésions induites par l'exposition au LPS+HI :

Les études précliniques étudiant l'efficacité de l'HT dans les modèles d'EHI ont montrés que l'HT réduisait l'étendue des lésions notamment en diminuant la mort neuronale (l'apoptose et la nécrose) (Ohmura et al. 2005). Dans une étude précédente du laboratoire à laquelle j'ai collaboré, portant sur le même modèle que celui que j'ai utilisé, nous avons montré que l'exposition au LPS+HI entraînait 30 à 40% de perte de tissu cérébral dans le cœur (désigne la perte totale de tissu cérébral) ainsi que dans la pénombre (zone de lésion ou dysfonction cellulaire cérébrale entourant le cœur). De plus nous avons noté que l'exposition au LPS+HI augmentait l'expression de RIP-3 (molécule clef dans la cascade de la nécroptose, voir paragraphe 1.3.2.3) dans le néocortex et le striatum ; et augmentait l'expression de caspase-3 (molécule présente dans la cascade apoptotique, voir paragraphe 1.3.2.2) dans le striatum également, par rapport à la condition contrôle (sham).

Dans la présente étude, nous avons démontré que l'HT a des effets bénéfiques sur les lésions cérébrales induites par le LPS+HI et ce seulement dans les zones de pénombre du néocortex ainsi que de l'hippocampe, mais pas dans le cœur des lésions. Ce dernier point peut être mis en lien avec l'absence d'effet de l'HT sur l'expression de RIP-3 dans les différents compartiments cérébraux. Ceci indique donc que l'HT n'influence pas la mort par nécroptose dans les cerveaux exposés au LPS+HI : ce qui avec la première phase de nécrose rapide, va probablement constituer l'essentiel du cœur des lésions. Cependant, il est connu dans la littérature que l'HT diminue l'apoptose, via la diminution de capase-3 et cytochrome-c (Zhu et al. 2004; Ohmura et al. 2005; Ichinose et al. 2014). Il sera donc important de vérifier

dans notre modèle si l'HT diminue l'expression de médiateurs clefs dans l'apoptose, et ainsi faire le lien avec la réduction des lésions observée dans la pénombre, qui est classiquement attribuée principalement à des mécanismes apoptotiques (Wang et al. 2014; Zheng et al. 2016).

Osredkar et al. ont utilisé un modèle animal d'exposition au LPS+HI assez similaire au notre, excepté pour l'âge (P7) des rats, correspondant au développement cérébral d'un nouveau-né prématuré (32-36 semaines d'âge gestationnel). Dans leur étude fondée sur des critères macroscopique définissant les lésions cérébrales, ils ont montré que l'HT ne modifiait pas l'étendue des lésions dans le cœur; ce qui va dans le même sens que ce que nous avons observé dans notre modèle à P12 (niveau de développement cérébral d'un nouveau-né à terme) (Osredkar et al. 2014). Dans leur deuxième article, Osredkar et al ont montré que l'HT ne contrait pas la diminution de l'expression de NeuN (marqueur indirect de la mort neuronale) suite à l'exposition au LPS+HI (Osredkar et al. 2015). Ce résultat suggère que l'HT ne prévient pas la mort neuronale induite par l'exposition au LPS+HI, ce qui est en contradiction avec ce que nous avons observé. Cette contradiction est probablement dû à l'utilisation de rats P7 *versus* P12 ; et aux variations neuro-développementales, métaboliques et inflammatoires décrites entre les nouveau-nés prématurés et les nouveau-nés à terme (Brochu et al. 2011). Il est possible aussi que l'expression de NeuN, un neurofilament participant à la structure neuronale, ne soit pas encore modifié à une phase précoce malgré l'engagement de processus de morts neuronales.

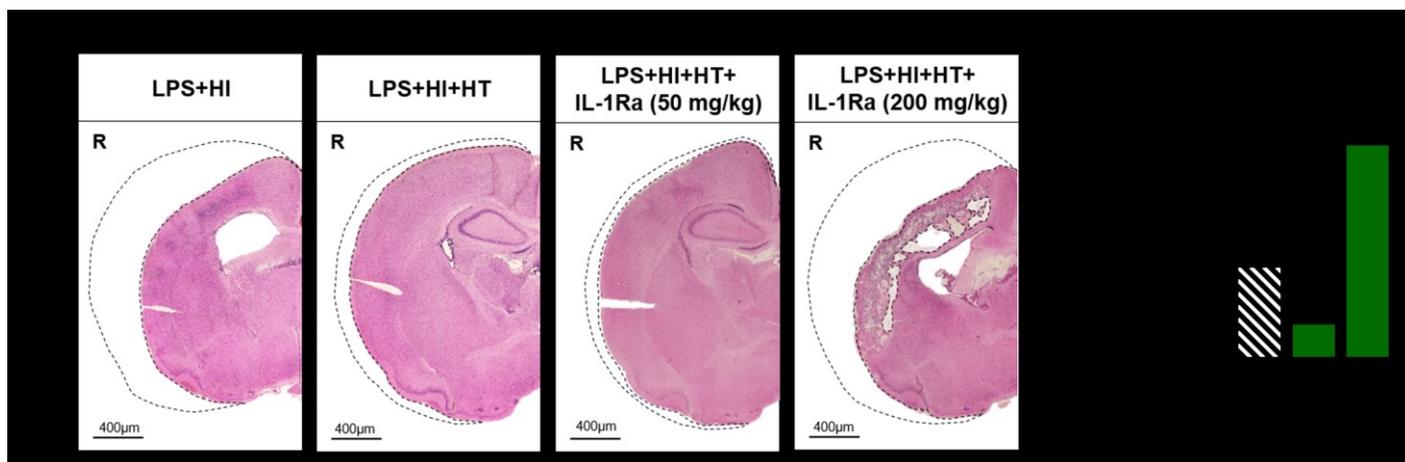
## **2. L'HT ne module pas l'expression de marqueurs inflammatoires induit par l'exposition au LPS+HI :**

Nos résultats ont démontré que l'effet neuroprotecteur de l'HT ne semblait pas être médié par un effet de l'HT sur les molécules inflammatoires clefs impliquées dans la physiopathologie de l'EN : à savoir l'IL-1 $\beta$ , l'IL-1Ra, le TNF- $\alpha$  et MMP-9.

L'effet de l'HT sur les cytokines pro-inflammatoires a, jusqu'à maintenant, été peu étudié dans les modèles précliniques d'EN. Il a été montré que l'IL-10 (cytokine anti-

inflammatoire) était diminué par l'HT dans un modèle d'EHI (Matsui and Kakeda 2008). Cela suggère davantage un effet pro-inflammatoire de l'HT dans ce cas. Par contre, l'IL-1 est fortement impliquée dans les processus neuroinflammatoires qui jouent un rôle majeur dans les lésions cérébrales induites par l'exposition au pathogène et/ou à l'HI (voir paragraphe 1.4.2.1). Précédemment au laboratoire, nous avons montré que l'IL-1 $\beta$  jouait un rôle clef dans la réponse neuroinflammatoire précoce induite par l'exposition au LPS+HI, ainsi que dans la genèse des lésions cérébrales, à la fois au niveau du cœur et de la pénombre des lésions via l'inhibition de cascades apoptotiques (caspase-3 dépendantes) et nécroptotiques (RIP-3 dépendantes) (Savard et al. 2013; Savard et al. 2015).

Dans la présente étude, l'HT n'a pas modulé l'expression des molécules du système de l'IL-1, et de sa cascade inflammatoire, ce qui suggère que l'effet de l'HT est indépendant de cette molécule, et que l'ajout d'un bloqueur de l'IL-1 à l'HT pourrait avoir des effets neuroprotecteurs additifs ou synergiques, et ainsi prévenir les lésions cérébrales à la fois dans le cœur et la pénombre. En effet, ceci est supporté par de récentes études réalisées par notre laboratoire et d'autres groupes de recherche, qui ont démontré que l'IL-1Ra a des effets neuroprotecteur dans les cas de lésions cérébrales induites par l'exposition au LPS+HI, au LPS seul ou à l'HI seule (Quiniou et al. 2008; Girard et al. 2012; Lan et al. 2015; Pang et al. 2015; Savard et al. 2015). De plus selon nos résultats préliminaires (figure 1 de la discussion), la combinaison HT plus IL-1Ra (50 mg/kg/12 h de P12 à P14) a des effets neuroprotecteurs additifs en comparaison à l'HT seule, dans le cœur des lésions.



**Fig.1 : Comparaison de l'étendue des lésions cérébrales entre les conditions LPS+HI±HT±IL-1Ra.** Mesure de l'étendue des lésions (cœur des lésions) par coloration H&E, dans l'hémisphère droit des rats exposés au LPS+HI±HT±IL-1Ra. Nous avons observé une tendance à la diminution ( $p=0.06$ ) de la surface du cœur des lésions dans la condition LPS+HI+HT en comparaison à la condition LPS+HI. L'HT combinée à l'IL-1Ra (200 mg/kg) ne réduit pas la surface du cœur des lésions. L'HT combinée à l'IL-1Ra (50 mg/kg) réduit davantage le cœur des lésions que l'HT seule. Nombre d'animaux : LPS+HI (n=9 de 5 portées), LPS+HI+HT (n=9 de 5 portées), LPS+HI+HT+IL-1Ra 200 mg/kg (n=7 de 4 portées), LPS+HI+HT+IL-1Ra 50 mg/kg (n=4 de 2 portées). \* $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ; Mann-Whitney U test. *Abréviations* : HI : hypoxie-ischémie ; HT : hypothermie ; H&E : coloration hématoxyline et éosine ; LPS : lipopolysaccharide d'*E. coli* ; R : droit.

### 3. L'HT augmente l'expression d'enzymes antioxydantes :

Nous avons montré dans notre modèle d'EN induite par le LPS+HI que l'effet bénéfique de l'HT passe par l'augmentation d'enzymes antioxydantes (SOD-1 et GPX-1), ce qui supporte l'implication des mécanismes oxydatifs dans l'EN due à l'inflammation et à l'HI combinées.

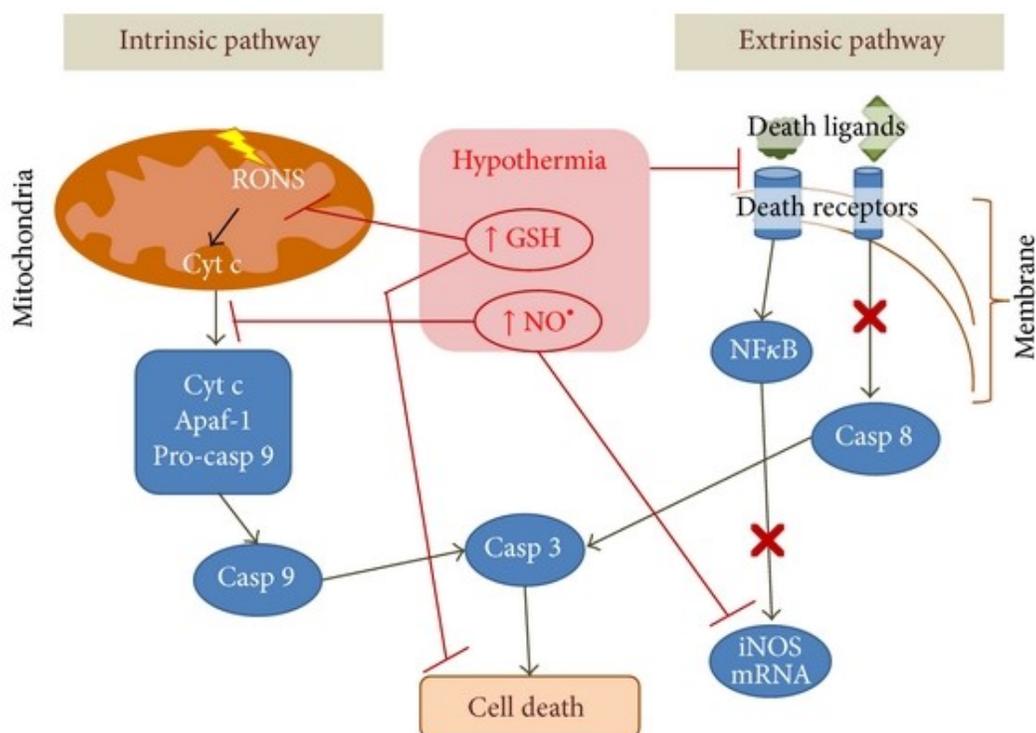
Dans la littérature, il a été démontré que l'HT atténuait le stress oxydatif chez les nouveau-nés ayant eu une agression cérébrale de type EN, asphyxie périnatale, voire traumatisme cranio-cérébral (Capani et al. 2003; Bayir et al. 2009; Kakita et al.

2012). En effet, l'HT semble limiter les dommages causés par les ROS (voir paragraphe 1.4.3.3) en préservant les défenses antioxydantes (Alva et al. 2013). Les effets neuroprotecteurs de l'HT sur les mécanismes oxydatifs ne sont pas totalement élucidés. Dans un premier temps, l'interprétation des données de la littérature suggéraient que les mécanismes neuroprotecteurs de l'HT étaient la conséquence principale de la réduction des besoins énergétiques du cerveau « refroidi » face à une situation de défaut de synthèse d'adénosine triphosphates (ATP) due à l'HI (Erecinska et al. 2003). Plus récemment, le rôle de l'HT pour combattre les conséquences de l'HI semble être aussi attribué à la régulation des niveaux de ROS et RNS, ce qui a effet indirect sur l'induction ou non de l'apoptose (voie extrinsèque et intrinsèque, voir paragraphe 1.3.2.2) (Alva et al. 2013). En effet, l'HT ne bloque pas simplement les cascades de signalisation menant à l'apoptose, mais peut également inhiber les molécules pro-apoptotiques (Eberspächer et al. 2003), et induire l'expression de gènes codant pour les molécules anti-apoptotiques dans les tissus ischémiés (Zhao et al. 2007). Pour la voie intrinsèque de l'apoptose, il a été montré que l'HT aide au maintien de l'intégrité membranaire en économisant les niveaux d'ATP et en ralentissant les flux ioniques des cellules. De plus, l'HT diminue la production de ROS (Capani et al. 2003). Ces événements limiteraient la rupture de la membrane mitochondriale et la relâche de molécules pro-apoptotiques comme le cytochrome-c, dans le cytosol (figure 2). Comme la CAT est absente dans la mitochondrie, le maintien des niveaux de GPX-1 est important afin d'éviter l'accumulation d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans les cellules neurales (Alva et al. 2013). Notre étude ainsi que d'autres travaux ont montré que l'HT induit la surexpression de GPX-1. Pour la voie extrinsèque, il a été reporté que l'HT diminue l'affinité entre les récepteurs de mort cellulaire et leurs ligands comme Fas et la caspase-8 (Yang et al. 2009), ce qui, inhiberait l'activation de caspase-8 (figure 2 de la discussion) (Alva et al. 2013).

**Figure 2 : Modulation des voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose par l'HT.** Les différents effets inhibiteurs de l'HT sur les voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose.

Reproduced with permission from (Alva et al. 2013), Copyright from [Creative Commons Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Link: <http://www.hindawi.com/journals/omcl/2013/957054/>



Une autre explication possible de l'effet antioxydant de l'HT serait l'effet de l'HT sur le facteur de transcription *nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (Nrf2). En effet, Nrf2 est connu pour jouer un rôle critique dans la régulation de l'expression des enzymes antioxydantes lorsqu'il se lie à une séquence unique sur l'ADN connu sous le nom d'*antioxidant response element* (ARE), et ainsi contribue à l'élimination du stress oxydatif de l'environnement (figure 3 de la discussion) (Zhai et al. 2016). Dans une autre étude, Gong *et al.* ont démontré que l'HT avait des effets sur le stress oxydatif cérébral, induit par un arrêt cardiaque. Cet effet passerait par l'augmentation de la *manganese superoxide dismutase* (MnSOD) via l'activation de Nrf2, induites par l'HT (Gong et al. 2012).

Néanmoins, cette étude ne s'est pas penchée sur la régulation par Nrf2 d'autres enzymes antioxydantes clefs telles que la CAT et la GPX-1, ni sur l'effet de l'HT sur ces enzymes.

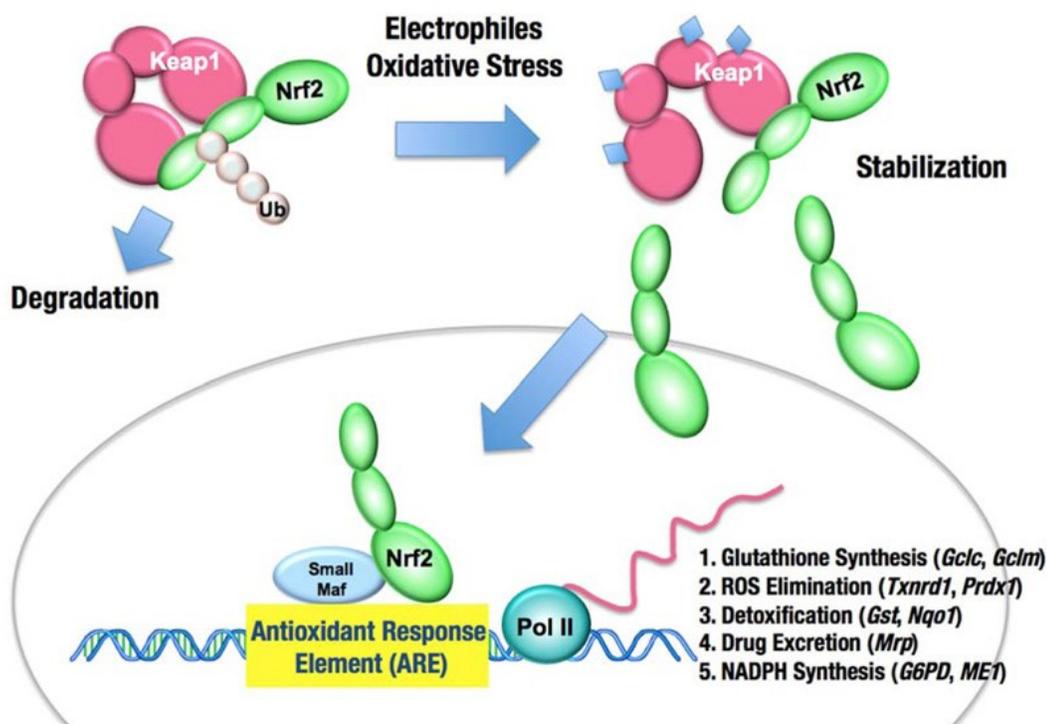
### Figure 3 : Le système Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap 1)-Nrf2.

Dans des conditions normales, Nrf2 est constamment ubiquitiné par Keap 1 et dégradé par le protéasome. Après l'exposition à des électrophiles (H<sup>+</sup> par exemple) ou au stress oxydatif, Keap 1 est inactivé et Nrf2 va alors s'accumuler dans le noyau et activer de nombreux gènes cytoprotecteurs notamment les gènes codant pour la synthèse des enzymes antioxydantes (SOD, CAT, GPX) et l'élimination des ROS.

Ub : ubiquitine.

Reproduced with permission from (Mitsuishi et al. 2012), Copyright from [Creative Commons Attribution License \(CC BY\)](#).

Link: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2012.00200/full>



#### 4. Limitations de l'étude :

Au-delà de l'effet antioxydant de l'HT, nous n'avons pas élucidé d'autres mécanismes par lesquels l'HT pourrait avoir des effets neuroprotecteurs dans notre modèle d'EN induite par l'inflammation et l'HI. Nous avons démontré que l'HT ne diminuait pas l'expressions de RIP-3 qui induit la nécroptose, mais l'HT peut également réduire l'apoptose comme l'ont documenté plusieurs études précliniques d'EN induite par l'HI. Il est connu également que l'HT peut prévenir la nécrose via la réduction du métabolisme cérébral. Néanmoins, nous ne nous sommes pas penchés sur ce point.

Par ailleurs, nous n'avons pas poussé l'étude des éventuels effets différentiels de l'HT selon le sexe qui sont possiblement impliqués dans les réponses inflammatoires et la vulnérabilité à l'HI. Toutefois, nous n'avons pas observé d'effets de l'HT selon le sexe dans les différents marqueurs que nous avons étudié dans cette étude ainsi que dans les différentes études que nous avons réalisées sur ce même modèle, mais ce sur de petits échantillons d'animaux (Brochu et al. 2011; Savard et al. 2013; Savard et al. 2015).

#### 5. Suite du projet et pertinence avec la clinique

Les EN sévères frappent les patients chez qui l'on observe les pires séquelles neurologiques, et chez qui les traitements, incluant l'HT, sont les moins efficaces. La sévérité des lésions cérébrales ainsi que le taux élevé de mortalité que nous observons (~40%) montrent que notre modèle expérimental mime les conditions sévères d'EN. Nous avons montré que l'effet neuroprotecteur de l'HT ne semble pas être médié via la modulation du système de l'IL-1, ce qui renforce le fait que l'utilisation d'un bloquant de l'IL-1 pourrait potentialiser les effets bénéfiques de l'HT dans l'EN et la PC subséquente. Au cours de mes études doctorales, je vais poursuivre ce projet et m'intéresser davantage aux effets combinés de l'HT et l'IL-1Ra (Kineret®). Ce médicament est déjà utilisé en clinique dans le traitement des maladies auto-immunes comme la polyarthrite rhumatoïde et la goutte, y compris durant la gestation, et aussi chez les nouveau-nés et enfants dans les cas de syndromes inflammatoires (syndrome auto-inflammatoire familial au froid, ou

*Neonatal-Onset Multisystem Inflammatory Disease* : NOMID). L'utilisation du Kineret® dans l'EN serait donc une nouvelle indication chez le nouveau-né. Néanmoins, avant que cela soit possible, d'autres tests montrant l'efficacité et la sécurité de la combinaison HT+IL-1Ra dans le traitement de l'EN doivent être effectués sur des modèles animaux, au-delà des résultats préliminaires que j'ai déjà obtenus (discussion, figure 1).

Par ailleurs, nous avons montré dans notre étude que l'HT n'avait pas d'effet sur la nécroptose médiée par RIP-3. Il serait donc pertinent d'envisager d'utiliser un inhibiteur spécifique de la nécroptose, comme la nécrosulfonamide (NSA), en combinaison avec l'HT. Néanmoins cet inhibiteur n'est pas utilisé en clinique, à ce jour.

## CONCLUSION

Cette étude préclinique concernant les effets neuroprotecteurs de l'HT dans les cas d'EN induite par l'infection/inflammation et l'HI apporte des résultats originaux et importants. Nous avons démontré que l'HT est protectrice lorsque l'EN résulte de la combinaison inflammation plus HI. En effet, l'HT réduit les lésions cérébrales dans la pénombre, mais pas dans le cœur des lésions. De plus l'HT augmente l'expression d'enzymes antioxydantes (SOD-1 et GPX-1) dans le cerveau, ce qui va permettre l'élimination des ROS et peut par la suite avoir un effet indirect sur l'inhibition de l'apoptose. Nous avons observé que l'HT ne modulait pas l'expression de RIP-3 et par conséquent n'a pas d'effet sur la nécroptose. En ce qui concerne les autres mécanismes de mort cellulaire impliqués dans l'EHI, il a déjà été démontré que l'HT diminue l'apoptose. Les effets bénéfiques de l'HT ne semblent pas résulter d'une diminution de l'inflammation médiée par l'IL-1, ce qui suggère que l'utilisation d'un bloquant de l'IL-1 pourrait avoir des effets additifs à l'HT. Ces résultats fournissent de nouvelles évidences quant à l'efficacité mais également aux limites d'efficacité de l'HT dans les cas où l'EN résulte d'une inflammation combinée à l'HI. Ce projet devrait ouvrir de nouvelles avenues thérapeutiques pour prévenir l'EN et la PC.

## REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche Dr Guillaume Sébire. Je tiens à vous remercier de m'avoir accueilli dans votre laboratoire lors de mon stage de fin d'IUT ainsi que lors des crédits de recherche effectués durant mon baccalauréat. Ces différentes expériences ont pu confirmer ma passion pour la recherche. Merci de m'avoir laissé de l'autonomie dans mon projet de recherche, ce qui a permis de m'épanouir tout au long de ma maîtrise. Merci de croire en moi et en mes capacités artistiques que j'ai pu employer dans la réalisation de mes figures d'article. Finalement, merci pour votre compréhension, votre soutien et votre écoute tant apprécié.

Je remercie toute l'équipe du laboratoire que j'ai pu côtoyer ces deux dernières années : Marie-Julie Allard, Julie Bergeron, Marie-Elsa Brochu (merci pour ton aide pour la mise en place de l'hypothermie dans le modèle), Clémence Guiraut et Alexandre Savard. Merci pour votre écoute, vos conseils et encouragements ainsi que votre bonne humeur essentielle à la vie du laboratoire. Merci pour vos : « Tu sais, on est tous passé par là ! », qui m'énerveront toujours autant.

J'aimerais également remercier mon mentor de maîtrise, Pr. Claire Dubois pour votre écoute et vos conseils astucieux durant ma maîtrise et qui me serviront tout au long de ma future vie professionnelle.

Merci aux membres de mon jury d'évaluation : Dr Guillaume Sébire, Pr. Claire Dubois et Dr Pia Wintermark, de prendre le temps de réviser mon mémoire et de m'apporter leurs commentaires sur mon projet de maîtrise.

Merci à l'équipe du laboratoire de Dr Sylvain Grignon (Jessica Deslauriers, Caroline Maurice-Gélinas et Cécile Monpays) pour leurs contributions et conseils précieux sur le stress oxydatif.

Merci à tous les organismes subventionnaires qui ont permis la réalisation de ce projet, notamment les IRSC, *Heart & Stroke Foundation of Canada*, la Fondation des Étoiles, ainsi que la Fondation de l'Hôpital de Montréal pour enfants. Merci également à la Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé pour ma bourse de maîtrise « Tranzyme-Pharma », à *Hoppenheim/Fondation de l'Hôpital de Montréal pour enfants* pour la bourse de recherche ainsi qu'à *Integrated Program in Neuroscience* pour le prix d'entrée au doctorat.

Pour finir, j'aimerais remercier ma famille et mes amis. Merci à mes parents pour leur écoute et leur soutien durant les moments difficiles. Merci pour les skypes du dimanche et les messages dans la semaine qui me font profiter de chaque petit moment, même à 5 000 km. Merci à mon frère pour les visites régulières au Québec et pour la participation aux collations des grades. Enfin merci à mes amis de Sherbrooke de m'avoir si bien accueilli il y a 3 ans et qui font de chaque moment passé avec eux des moments inoubliables. Un énorme merci à Annie pour son

soutien moral et son amitié indispensable. Merci également à mes amis d'enfance qui seront toujours là pour moi.

## LISTE DES RÉFÉRENCES

- Alonso-Alconada, D., Hilario, E., Álvarez, F.J. and Álvarez, A. 2012. Apoptotic cell death correlates with ROS overproduction and early cytokine expression after hypoxia-ischemia in fetal lambs. *Reproductive Sciences* 19(7), pp. 754–763.
- Alva, N., Palomeque, J. and Carbonell, T. 2013. Oxidative stress and antioxidant activity in hypothermia and rewarming: can RONS modulate the beneficial effects of therapeutic hypothermia? *Oxidative medicine and cellular longevity* 2013, p. 957054.
- Aly, H., Khashaba, M.T., El-Ayouty, M., El-Sayed, O. and Hasanein, B.M. 2006. IL-1beta, IL-6 and TNF-alpha and outcomes of neonatal hypoxic ischemic encephalopathy. *Brain & Development* 28(3), pp. 178–182.
- Angeloni, C., Prata, C., Dalla Sega, F.V., Piperno, R. and Hrelia, S. 2015. Traumatic brain injury and NADPH oxidase: a deep relationship. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2015, p. 370312.
- Azzopardi, D., Robertson, N.J., Bainbridge, A., Cady, E., Charles-Edwards, G., Deierl, A., Fagiolo, G., Franks, N.P., Griffiths, J., Hajnal, J., Juszczak, E., Kapetanakis, B., Linsell, L., Maze, M., Omar, O., Strohm, B., Tusor, N. and Edwards, A.D. 2015. Moderate hypothermia within 6 h of birth plus inhaled xenon versus moderate hypothermia alone after birth asphyxia (TOBY-Xe): a proof-of-concept, open-label, randomised controlled trial. *Lancet Neurology*.
- Azzopardi, D., Strohm, B., Edwards, A.D., Halliday, H., Juszczak, E., Levene, M., Thoresen, M., Whitelaw, A., Brocklehurst, P. and Steering Group and TOBY Cooling Register participants 2009. Treatment of asphyxiated newborns with moderate hypothermia in routine clinical practice: how cooling is managed in the UK outside a clinical trial. *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition* 94(4), pp. F260–F264.
- Azzopardi, D., Strohm, B., Marlow, N., Brocklehurst, P., Deierl, A., Eddama, O., Goodwin, J., Halliday, H.L., Juszczak, E., Kapellou, O., Levene, M., Linsell, L., Omar, O., Thoresen, M., Tusor, N., Whitelaw, A., Edwards, A.D. and TOBY Study Group

2014. *Effects of hypothermia for perinatal asphyxia on childhood outcomes. The New England Journal of Medicine* 371(2), pp. 140–149.
- Bayir, H., Adelson, P.D., Wisniewski, S.R., Shore, P., Lai, Y., Brown, D., Janesko-Feldman, K.L., Kagan, V.E. and Kochanek, P.M. 2009. *Therapeutic hypothermia preserves antioxidant defenses after severe traumatic brain injury in infants and children. Critical Care Medicine* 37(2), pp. 689–695.
- Berger, I., Peleg, O. and Ofek-Shlomai, N. 2012. *Inflammation and early brain injury in term and preterm infants. The Israel Medical Association Journal* 14(5), pp. 318–323.
- Bowie, A. and O'Neill, L.A. 2000. *The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. Journal of Leukocyte Biology* 67(4), pp. 508–514.
- Brochu, M.E., Girard, S., Lavoie, K. and Sébire, G. 2011. *Developmental regulation of the neuroinflammatory responses to LPS and/or hypoxia-ischemia between preterm and term neonates: An experimental study. Journal of Neuroinflammation* 8, p. 55.
- Capani, F., Loidl, C.F., Piehl, L.L., Facorro, G., De Paoli, T. and Hager, A. 2003. *Long term production of reactive oxygen species during perinatal asphyxia in the rat central nervous system: effects of hypothermia. The International journal of neuroscience* 113(5), pp. 641–654.
- Chakkarapani, E., Dingley, J., Liu, X., Hoque, N., Aquilina, K., Porter, H. and Thoresen, M. 2010. *Xenon enhances hypothermic neuroprotection in asphyxiated newborn pigs. Annals of Neurology* 68(3), pp. 330–341.
- Chen, J., Kostrzewa, R.M. and Xu, X. 2014. *Necroptosis, a Potential Therapeutic Target for Neurological Disorders. In: Kostrzewa, R. M. ed. Handbook of Neurotoxicity. New York, NY: Springer New York, pp. 69–93.*
- Committee on Obstetric Practice, American College of Obstetricians and Gynecologists 2005. *ACOG Committee Opinion. Number 326, December 2005. Inappropriate use of the terms fetal distress and birth asphyxia. Obstetrics and Gynecology* 106(6), pp. 1469–1470.

- Coumans, A.B., Middelanis, J.S., Garnier, Y., Vaihinger, H.M., Leib, S.L., Von Duering, M.U., Hasaart, T.H., Jensen, A. and Berger, R. 2003. Intracisternal application of endotoxin enhances the susceptibility to subsequent hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats. *Pediatric Research* 53(5), pp. 770–775.
- Dalle-Donne, I., Aldini, G., Carini, M., Colombo, R., Rossi, R. and Milzani, A. 2006. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 10(2), pp. 389–406.
- Davidson, J.O., Wassink, G., van den Heuij, L.G., Bennet, L. and Gunn, A.J. 2015. Therapeutic Hypothermia for Neonatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy - Where to from Here? *Frontiers in neurology* 6, p. 198.
- Dröge, W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews* 82(1), pp. 47–95.
- Eberspächer, E., Werner, C., Engelhard, K., Pape, M., Gelb, A., Hutzler, P., Henke, J. and Kochs, E. 2003. The effect of hypothermia on the expression of the apoptosis-regulating protein Bax after incomplete cerebral ischemia and reperfusion in rats. *Journal of Neurosurgical Anesthesiology* 15(3), pp. 200–208.
- Edwards, A.D., Brocklehurst, P., Gunn, A.J., Halliday, H., Juszczak, E., Levene, M., Strohm, B., Thoresen, M., Whitelaw, A. and Azzopardi, D. 2010. Neurological outcomes at 18 months of age after moderate hypothermia for perinatal hypoxic ischaemic encephalopathy: synthesis and meta-analysis of trial data. *BMJ (Clinical Research Ed.)* 340, p. c363.
- Eklind, S., Mallard, C., Leverin, A.L., Gilland, E., Blomgren, K., Mattsby-Baltzer, I. and Hagberg, H. 2001. Bacterial endotoxin sensitizes the immature brain to hypoxic-ischaemic injury. *The European Journal of Neuroscience* 13(6), pp. 1101–1106.
- Eliwan, H.O., Watson, R.W., Aslam, S., Regan, I., Philbin, B., O'Hare, F.M., O'Neill, A., Preston, R., Blanco, A., Grant, T., Nolan, B., Smith, O. and Molloy, E.J. 2015. Neonatal brain injury and systemic inflammation: modulation by activated protein C ex vivo. *Clinical and Experimental Immunology* 179(3), pp. 477–484.
- Elmore, S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology* 35(4), pp. 495–516.

- Erecinska, M., Thoresen, M. and Silver, I.A. 2003. Effects of hypothermia on energy metabolism in Mammalian central nervous system. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 23(5), pp. 513–530.
- Ferriero, D. and Koch, T.K. 1985. Computed tomography in white matter diseases. *Annals of Neurology* 17(3), pp. 314–315.
- Fleiss, B. and Gressens, P. 2012. Tertiary mechanisms of brain damage: a new hope for treatment of cerebral palsy? *Lancet Neurology* 11(6), pp. 556–566.
- Fleiss, B., Tann, C.J., Degos, V., Sigaut, S., Van Steenwinckel, J., Schang, A.L., Kichev, A., Robertson, N.J., Mallard, C., Hagberg, H. and Gressens, P. 2015. Inflammation-induced sensitization of the brain in term infants. *Developmental Medicine and Child Neurology* 57 Suppl 3, pp. 17–28.
- Gancia, P. and Pomeroy, G. 2010. Brain cooling therapy. *Minerva Pediatrica* 62(3 Suppl 1), pp. 173–175.
- Gane, B.D., Bhat, V., Rao, R., Nandhakumar, S., Harichandrakumar, K.T. and Adhisivam, B. 2014. Effect of therapeutic hypothermia on DNA damage and neurodevelopmental outcome among term neonates with perinatal asphyxia: a randomized controlled trial. *Journal of Tropical Pediatrics* 60(2), pp. 134–140.
- Garfinkle, J., Wintermark, P., Shevell, M.I., Platt, R.W., Oskoui, M. and Canadian Cerebral Palsy Registry 2015. Cerebral Palsy after Neonatal Encephalopathy: How Much Is Preventable? *The Journal of Pediatrics* 167(1), pp. 58–63.e1.
- Girard, S., Kadhim, H., Beaudet, N., Sarret, P. and Sébire, 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), pp. 673–682.
- Girard, S., Kadhim, H., Roy, M., Lavoie, K., Brochu, M.E., Larouche, A. and Sébire, G. 2009. Role of perinatal inflammation in cerebral palsy. *Pediatric Neurology* 40(3), pp. 168–174.
- Girard, S., Sébire, H., Brochu, M.E., Briota, S., Sarret, P. and Sébire, G. 2012. Postnatal administration of IL-1Ra exerts neuroprotective effects following perinatal inflammation and/or hypoxic-ischemic injuries. *Brain, Behavior, and Immunity* 26(8), pp. 1331–1339.

- Gluckman, P.D., Wyatt, J.S., Azzopardi, D., Ballard, R., Edwards, A.D., Ferriero, D.M., Polin, R.A., Robertson, C.M., Thoresen, M., Whitelaw, A. and Gunn, A.J. 2005. Selective head cooling with mild systemic hypothermia after neonatal encephalopathy: multicentre randomised trial. *The Lancet* 365(9460), pp. 663–670.
- Grether, J.K. 1997. Maternal Infection and Cerebral Palsy in Infants of Normal Birth Weight. *The Journal of the American Medical Association* 278(3), p. 207.
- Guillet, R., Edwards, A.D., Thoresen, M., Ferriero, D.M., Gluckman, P.D., Whitelaw, A., Gunn, A.J. and CoolCap Trial Group 2012. Seven- to eight-year follow-up of the CoolCap trial of head cooling for neonatal encephalopathy. *Pediatric Research* 71(2), pp. 205–209.
- Gunn, A.J., Wyatt, J.S., Whitelaw, A., Barks, J., Azzopardi, D., Ballard, R., Edwards, A.D., Ferriero, D.M., Gluckman, P.D., Polin, R.A., Robertson, C.M., Thoresen, M. and CoolCap Study Group 2008. Therapeutic hypothermia changes the prognostic value of clinical evaluation of neonatal encephalopathy. *The Journal of Pediatrics* 152(1), pp. 55–8, 58.e1.
- Haaland, K., Løberg, E.M., Steen, P.A. and Thoresen, M. 1997. Posthypoxic hypothermia in newborn piglets. *Pediatric Research* 41(4 Pt 1), pp. 505–512.
- Halliwel, B. 1989. Oxidants and the central nervous system: some fundamental questions. Is oxidant damage relevant to Parkinson's disease, Alzheimer's disease, traumatic injury or stroke? *Acta neurologica Scandinavica. Supplementum* 126, pp. 23–33.
- Hobbs, C., Thoresen, M., Tucker, A., Aquilina, K., Chakkarapani, E. and Dingley, J. 2008. Xenon and hypothermia combine additively, offering long-term functional and histopathologic neuroprotection after neonatal hypoxia/ischemia. *Stroke* 39(4), pp. 1307–1313.
- Ichinose, M., Kamei, Y., Iriyama, T., Imada, S., Seyama, T., Toshimitsu, M., Asou, H., Yamamoto, M. and Fujii, T. 2014. Hypothermia attenuates apoptosis and protects contact between myelin basic protein-expressing oligodendroglial-lineage cells and neurons against hypoxia-ischemia. *Journal of Neuroscience Research* 92(10), pp. 1270–1285.

Jacobs, S.E., Berg, M., Hunt, R., Tarnow-Mordi, W.O., Inder, T.E. and Davis, P.G. 2013. Cooling for newborns with hypoxic ischaemic encephalopathy. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 1, p. CD003311.

Jary, S., Smit, E., Liu, X., Cowan, F.M. and Thoresen, M. 2015. Less severe cerebral palsy outcomes in infants treated with therapeutic hypothermia. *Acta Paediatrica* 104(12), pp. 1241–1247.

Joy, R., Pournami, F., Bethou, A., Bhat, V.B. and Bobby, Z. 2013. Effect of therapeutic hypothermia on oxidative stress and outcome in term neonates with perinatal asphyxia: a randomized controlled trial. *Journal of Tropical Pediatrics* 59(1), pp. 17–22.

Kakita, H., Hussein, M.H., Kato, S., Yamada, Y., Nagaya, Y., Asai, H., Goto, T., Ito, K., Sugiura, T., Daoud, G.A., Ito, T., Kato, I. and Togari, H. 2012. Hypothermia attenuates the severity of oxidative stress development in asphyxiated newborns. *Journal of Critical Care* 27(5), pp. 469–473.

Khwaja, O. and Volpe, J.J. 2008. Pathogenesis of cerebral white matter injury of prematurity. *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition* 93(2), pp. F153–F161.

Lan, K.M., Tien, L.T., Pang, Y., Bhatt, A.J. and Fan, L.W. 2015. IL-1 receptor antagonist attenuates neonatal lipopolysaccharide-induced long-lasting learning impairment and hippocampal injury in adult rats. *Toxicology Letters* 234(1), pp. 30–39.

Laptook, A.R., Corbett, R.J., Burns, D. and Sterett, R. 1995. Neonatal ischemic neuroprotection by modest hypothermia is associated with attenuated brain acidosis. *Stroke* 26(7), pp. 1240–1246.

Leitner, K., Al Shammery, M., McLane, M., Johnston, M.V., Elovitz, M.A. and Burd, I. 2014. IL-1 receptor blockade prevents fetal cortical brain injury but not preterm birth in a mouse model of inflammation-induced preterm birth and perinatal brain injury. *American Journal of Reproductive Immunology* 71(5), pp. 418–426.

Leviton, A., Dammann, O. and Durum, S.K. 2005. The adaptive immune response in neonatal cerebral white matter damage. *Annals of Neurology* 58(6), pp. 821–828.

- Lieberman, E., Lang, J., Richardson, D.K., Frigoletto, F.D., Heffner, L.J. and Cohen, A. 2000. Intrapartum maternal fever and neonatal outcome. *Pediatrics* 105(1 Pt 1), pp. 8–13.
- Liu, F. and McCullough, L.D. 2013. Inflammatory responses in hypoxic ischemic encephalopathy. *Acta Pharmacologica Sinica* 34(9), pp. 1121–1130.
- Liu, T., Zhao, D.X., Cui, H., Chen, L., Bao, Y.H., Wang, Y. and Jiang, J.Y. 2016. Therapeutic hypothermia attenuates tissue damage and cytokine expression after traumatic brain injury by inhibiting necroptosis in the rat. *Scientific reports* 6, p. 24547.
- Lobo, N., Yang, B., Rizvi, M. and Ma, D. 2013. Hypothermia and xenon: novel noble guardians in hypoxic-ischemic encephalopathy? *Journal of Neuroscience Research* 91(4), pp. 473–478.
- Ma, D., Hossain, M., Chow, A., Arshad, M., Battson, R.M., Sanders, R.D., Mehmet, H., Edwards, A.D., Franks, N.P. and Maze, M. 2005. Xenon and hypothermia combine to provide neuroprotection from neonatal asphyxia. *Annals of Neurology* 58(2), pp. 182–193.
- Ma, H., Sinha, B., Pandya, R.S., Lin, N., Popp, A.J., Li, J., Yao, J. and Wang, X. 2012. Therapeutic hypothermia as a neuroprotective strategy in neonatal hypoxic-ischemic brain injury and traumatic brain injury. *Current Molecular Medicine* 12(10), pp. 1282–1296.
- Martin, S.J. and Henry, C.M. 2013. Distinguishing between apoptosis, necrosis, necroptosis and other cell death modalities. *Methods* 61(2), pp. 87–89.
- Matsui, T. and Kakeda, T. 2008. IL-10 production is reduced by hypothermia but augmented by hyperthermia in rat microglia. *Journal of Neurotrauma* 25(6), pp. 709–715.
- Matsui, T., Yoshida, Y., Yanagihara, M. and Suenaga, H. 2014. Hypothermia at 35 °C reduces the time-dependent microglial production of pro-inflammatory and anti-inflammatory factors that mediate neuronal cell death. *Neurocritical Care* 20(2), pp. 301–310.
- Mir, I.N., Johnson-Welch, S.F., Nelson, D.B., Brown, L.S., Rosenfeld, C.R. and Chalak, L.F. 2015. Placental pathology is associated with severity of neonatal

encephalopathy and adverse developmental outcomes following hypothermia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 213(6), pp. 849.e1–849.e7.

Murphy, M.P. 2009. How mitochondria produce reactive oxygen species. *The Biochemical Journal* 417(1), pp. 1–13.

Nelson, K.B. 2002. The epidemiology of cerebral palsy in term infants. *Mental retardation and developmental disabilities research reviews* 8(3), pp. 146–150.

Northington, F.J., Chavez-Valdez, R., Graham, E.M., Razdan, S., Gauda, E.B. and Martin, L.J. 2011. Necrostatin decreases oxidative damage, inflammation, and injury after neonatal HI. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 31(1), pp. 178–189.

Ohmura, A., Nakajima, W., Ishida, A., Yasuoka, N., Kawamura, M., Miura, S. and Takada, G. 2005. Prolonged hypothermia protects neonatal rat brain against hypoxic-ischemia by reducing both apoptosis and necrosis. *Brain & Development* 27(7), pp. 517–526.

Okazaki, K., Nishida, A., Kato, M., Kozawa, K., Uga, N. and Kimura, H. 2006. Elevation of cytokine concentrations in asphyxiated neonates. *Biology of the neonate* 89(3), pp. 183–189.

Osredkar, D., Sabir, H., Falck, M., Wood, T., Maes, E., Flatebø, T., Puchades, M. and Thoresen, M. 2015. Hypothermia Does Not Reverse Cellular Responses Caused by Lipopolysaccharide in Neonatal Hypoxic-Ischaemic Brain Injury. *Developmental Neuroscience* 37(4-5), pp. 390–397.

Osredkar, D., Thoresen, M., Maes, E., Flatebø, T., Elstad, M. and Sabir, H. 2014. Hypothermia is not neuroprotective after infection-sensitized neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Resuscitation* 85(4), pp. 567–572.

Pang, Y., Tien, L.T., Zhu, H., Shen, J., Wright, C.F., Jones, T.K., Mamoon, S.A., Bhatt, A.J., Cai, Z. and Fan, L.W. 2015. Interleukin-1 receptor antagonist reduces neonatal lipopolysaccharide-induced long-lasting neurobehavioral deficits and dopaminergic neuronal injury in adult rats. *International Journal of Molecular Sciences* 16(4), pp. 8635–8654.

Patel, S.D., Pierce, L., Ciardiello, A., Hutton, A., Paskewitz, S., Aronowitz, E., Voss, H.U., Moore, H. and Vannucci, S.J. 2015. Therapeutic hypothermia and hypoxia-

*ischemia in the term-equivalent neonatal rat: characterization of a translational preclinical model. Pediatric Research 78(3), pp. 264–271.*

*Perier, C. and Vila, M. 2012. Mitochondrial biology and Parkinson's disease. Cold Spring Harbor perspectives in medicine 2(2), p. a009332.*

*Pin, T.W., Eldridge, B. and Galea, M.P. 2009. A review of developmental outcomes of term infants with post-asphyxia neonatal encephalopathy. European Journal of Paediatric Neurology 13(3), pp. 224–234.*

*Pisetsky, D. 2011. Cell death in the pathogenesis of immune-mediated diseases: the role of HMGB1 and DAMP-PAMP complexes. Swiss Medical Weekly 141, p. w13256.*

*Pradeep, H., Sharma, B. and Rajanikant, G.K. 2014. Drp1 in ischemic neuronal death: an unusual suspect. Current Medicinal Chemistry 21(19), pp. 2183–2189.*

*Quiniou, C., Kooli, E., Joyal, J.S., Sapieha, P., Sennlaub, F., Lahaie, I., Shao, Z., Hou, X., Hardy, P., Lubell, W. and Chemtob, S. 2008. Interleukin-1 and ischemic brain injury in the newborn: development of a small molecule inhibitor of IL-1 receptor. Seminars in Perinatology 32(5), pp. 325–333.*

*Rice, J.E., Vannucci, R.C. and Brierley, J.B. 1981. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. Annals of Neurology 9(2), pp. 131–141.*

*Robertson, N.J., Tan, S., Groenendaal, F., van Bel, F., Juul, S.E., Bennet, L., Derrick, M., Back, S.A., Valdez, R.C., Northington, F., Gunn, A.J. and Mallard, C. 2012. Which neuroprotective agents are ready for bench to bedside translation in the newborn infant? The Journal of Pediatrics 160(4), pp. 544–552.e4.*

*Sabir, H., Scull-Brown, E., Liu, X. and Thoresen, M. 2012. Immediate hypothermia is not neuroprotective after severe hypoxia-ischemia and is deleterious when delayed by 12 hours in neonatal rats. Stroke 43(12), pp. 3364–3370.*

*Sangiuliano, B., Pérez, N.M., Moreira, D.F. and Belizário, J.E. 2014. Cell death-associated molecular-pattern molecules: inflammatory signaling and control. Mediators of Inflammation 2014, p. 821043.*

*Savard, A., Brochu, M.E., Chevin, M., Guiraut, C., Grbic, D. and Sébire, G. 2015. Neuronal self-injury mediated by IL-1 $\beta$  and MMP-9 in a cerebral palsy model of*

severe neonatal encephalopathy induced by immune activation plus hypoxia-ischemia. *Journal of Neuroinflammation* 12, p. 111.

Savard, A., Lavoie, K., Brochu, M.E., Grbic, D., Lepage, M., Gris, D. and Sebire, G. 2013. Involvement of neuronal IL-1 $\beta$  in acquired brain lesions in a rat model of neonatal encephalopathy. *Journal of Neuroinflammation* 10, p. 110.

Schroder, K. and Tschopp, J. 2010. The inflammasomes. *Cell* 140(6), pp. 821–832.

Shankaran, S. 2012. Therapeutic hypothermia for neonatal encephalopathy. *Current Treatment Options in Neurology* 14(6), pp. 608–619.

Shankaran, S., Laptook, A.R., Ehrenkranz, R.A., Tyson, J.E., McDonald, S.A., Donovan, E.F., Fanaroff, A.A., Poole, W.K., Wright, L.L., Higgins, R.D., Finer, N.N., Carlo, W.A., Duara, S., Oh, W., Cotten, C.M., Stevenson, D.K., Stoll, B.J., Lemons, J.A., Guillet, R., Jobe, A.H. and National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network 2005. Whole-body hypothermia for neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy. *The New England Journal of Medicine* 353(15), pp. 1574–1584.

Shankaran, S., Laptook, A.R., Pappas, A., McDonald, S.A., Das, A., Tyson, J.E., Poindexter, B.B., Schibler, K., Bell, E.F., Heyne, R.J., Pedroza, C., Bara, R., Van Meurs, K.P., Grisby, C., Huitema, C.M., Garg, M., Ehrenkranz, R.A., Shepherd, E.G., Chalak, L.F., Hamrick, S.E., Khan, A.M., Reynolds, A.M., Laughon, M.M., Truog, W.E., Dysart, K.C., Carlo, W.A., Walsh, M.C., Watterberg, K.L., Higgins, R.D. and Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network 2014. Effect of depth and duration of cooling on deaths in the NICU among neonates with hypoxic ischemic encephalopathy: a randomized clinical trial. *The Journal of the American Medical Association* 312(24), pp. 2629–2639.

Simbruner, G., Mittal, R.A., Rohlmann, F., Muche, R. and neo.nEURO.network Trial Participants 2010. Systemic hypothermia after neonatal encephalopathy: outcomes of neo.nEURO.network RCT. *Pediatrics* 126(4), pp. e771–e778.

Squadrito, G.L. and Pryor, W.A. 1998. Oxidative chemistry of nitric oxide: the roles of superoxide, peroxynitrite, and carbon dioxide. *Free Radical Biology & Medicine* 25(4-5), pp. 392–403.

- Thoresen, M., Bågenholm, R., Løberg, E.M., Apricena, F. and Kjellmer, I. 1996. Posthypoxic cooling of neonatal rats provides protection against brain injury. *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition* 74(1), pp. F3–F9.
- Thornton, C. and Hagberg, H. 2015. Role of mitochondria in apoptotic and necroptotic cell death in the developing brain. *Clinica Chimica Acta* 451(Pt A), pp. 35–38.
- Tovar-Y-Romo, L.B., Penagos-Puig, A. and Ramírez-Jarquín, J.O. 2016. Endogenous recovery after brain damage: molecular mechanisms that balance neuronal life/death fate. *Journal of Neurochemistry* 136(1), pp. 13–27.
- Walsh, C.M. 2014. Grand challenges in cell death and survival: apoptosis vs. necroptosis. *Frontiers in cell and developmental biology* 2, p. 3.
- Wang, K., Liu, B. and Ma, J. 2014. Research progress in traumatic brain penumbra. *Chinese Medical Journal* 127(10), pp. 1964–1968.
- Williams, G.D., Dardzinski, B.J., Buckalew, A.R. and Smith, M.B. 1997. Modest hypothermia preserves cerebral energy metabolism during hypoxia-ischemia and correlates with brain damage: a <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance study in unanesthetized neonatal rats. *Pediatric Research* 42(5), pp. 700–708.
- Wintermark, P., Boyd, T., Gregas, M.C., Labrecque, M. and Hansen, A. 2010. Placental pathology in asphyxiated newborns meeting the criteria for therapeutic hypothermia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 203(6), pp. 579.e1–579.e9.
- Wood, T., Osredkar, D., Puchades, M., Maes, E., Falck, M., Flatebø, T., Walløe, L., Sabir, H. and Thoresen, M. 2016. Treatment temperature and insult severity influence the neuroprotective effects of therapeutic hypothermia. *Scientific reports* 6, p. 23430.
- Wu, Y.W., Backstrand, K.H., Zhao, S., Fullerton, H.J. and Johnston, S.C. 2004. Declining diagnosis of birth asphyxia in California: 1991-2000. *Pediatrics* 114(6), pp. 1584–1590.
- Wu, Y.W., Escobar, G.J., Grether, J.K., Croen, L.A., Greene, J.D. and Newman, T.B. 2003. Chorioamnionitis and cerebral palsy in term and near-term infants. *The Journal of the American Medical Association* 290(20), pp. 2677–2684.

Yager, J., Towfighi, J. and Vannucci, R.C. 1993. Influence of mild hypothermia on hypoxic-ischemic brain damage in the immature rat. *Pediatric Research* 34(4), pp. 525–529.

Yager, J.Y. and Ashwal, S. 2009. Animal models of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *Pediatric Neurology* 40(3), pp. 156–167.

Yang, D., Guo, S., Zhang, T. and Li, H. 2009. Hypothermia attenuates ischemia/reperfusion-induced endothelial cell apoptosis via alterations in apoptotic pathways and JNK signaling. *FEBS Letters* 583(15), pp. 2500–2506.

Yao, J.K., Reddy, R.D. and van Kammen, D.P. 2001. Oxidative damage and schizophrenia: an overview of the evidence and its therapeutic implications. *CNS Drugs* 15(4), pp. 287–310.

Yuan, T.M., Sun, Y., Zhan, C.Y. and Yu, H.M. 2010. Intrauterine infection/inflammation and perinatal brain damage: role of glial cells and Toll-like receptor signaling. *Journal of Neuroimmunology* 229(1-2), pp. 16–25.

Zhao, H., Steinberg, G.K. and Sapolsky, R.M. 2007. General versus specific actions of mild-moderate hypothermia in attenuating cerebral ischemic damage. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 27(12), pp. 1879–1894.

Zheng, L., Ding, J., Wang, J., Zhou, C. and Zhang, W. 2016. Effects and Mechanism of Action of Inducible Nitric Oxide Synthase on Apoptosis in a Rat Model of Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury. *Anatomical Record* 299(2), pp. 246–255.

Zhou, W.H., Cheng, G.Q., Shao, X.M., Liu, X.Z., Shan, R.B., Zhuang, D.Y., Zhou, C.L., Du, L.Z., Cao, Y., Yang, Q., Wang, L.S. and China Study Group 2010. Selective head cooling with mild systemic hypothermia after neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy: a multicenter randomized controlled trial in China. *The Journal of Pediatrics* 157(3), pp. 367–72, 372.e1.

Zhu, C., Wang, X., Cheng, X., Qiu, L., Xu, F., Simbruner, G. and Blomgren, K. 2004. Post-ischemic hypothermia-induced tissue protection and diminished apoptosis after neonatal cerebral hypoxia-ischemia. *Brain Research* 996(1), pp. 67–75.

Preuve de soumission de l'article « Neuroprotective effects of hypothermia in inflammatory-sensitized hypoxic-ischemic encephalopathy », le 3 mai 2016 à Neonatology.

---

De : neo@karger.com [neo@karger.com]

Envoyé : 3 mai 2016 15:34

À : Guillaume Sébire, Dr

Objet : Neonatology Submission Received

Dear Dr. Guillaume Sébire:

Thank you for submitting your manuscript entitled "Neuroprotective effects of hypothermia in inflammatory-sensitized hypoxic-ischemic encephalopathy." to "Neonatology"; the submission number is: 7004. Your submission will now be checked by the editorial office. Once this has been done, you will receive a confirmation mail from the editorial office.

If you have any queries please send an email to: neo@karger.com.

With kind regards,

Editorial Office