La protection du cerveau en développement et des handicaps de l'enfant prématuré : impact du sulfate de magnésium et du rémifentanil

Clément Chollat

▶ **To cite this version:**

Clément Chollat. La protection du cerveau en développement et des handicaps de l'enfant prématuré : impact du sulfate de magnésium et du rémifentanil. Pharmacologie. Normandie Université, 2017. Français. NNT : 2017NORMR149 . tel-02048311v1

HAL Id: tel-02048311

https://theses.hal.science/tel-02048311v1

Submitted on 25 Feb 2019 (v1), last revised 25 Feb 2019 (v2)

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité ASPECTS MOLECULAIRES ET CELLULAIRES DE LA BIOLOGIE

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

La protection du cerveau en développement et des handicaps de l'enfant prématuré : impact du sulfate de magnésium et du rémifentanil

Présentée et soutenue par

Clément CHOLLAT

Thèse soutenue publiquement le 17 novembre 2017 devant le jury composé de		
Mme Nathalie BEDNAREK	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, M.D., Ph.D., Médecine Néonatale et Réanimation Pédiatrique, CHU, Reims / CResTIC EA 3804, UFR sciences exactes et naturelles, Reims / Université de Reims	Rapporteur
M. Ricardo CARBAJAL	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, M.D., Ph.D., Urgences pédiatriques-Réanimation Néonatale et Pédiatriques, Hôpital Armand Trousseau, Paris / INSERM U1153 « Equipe de recherche en Epidémiologie Obstétricale et Pédiatrique », Paris / Université Pierre et Marie Curie, Paris-VI	Rapporteur
Mme Carine ALI	Professeur des Universités, Ph.D., INSERM UMR-1237 « Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders » - PhIND, Caen / Université de Caen Normandie	Examinateur
M. Pierre GRESSENS	Directeur de recherche INSERM, M.D., Ph.D., INSERM UMR-S 1141, « Neuroprotection du Cerveau en Développement », Hôpital Robert Debré, Paris / Université Paris Descartes, Paris-V	Examinateur
Mme Sylvie JEGOU	Chargée de recherche INSERM, Ph.D., INSERM U1245, « Genetics and Pathophysiology of Neurodevelopmental Disorders », Rouen / Université de Rouen Normandie	Codirectrice de thèse
M. Stéphane MARRET	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, M.D., Ph.D., Pédiatrie Néonatale et Réanimation-Neuropédiatrie, CHU, Rouen / INSERM U1245, « Genetics and Pathophysiology of Neurodevelopmental Disorders », Rouen / Université de Rouen Normandie	Codirecteur de thèse

Thèse dirigée par Sylvie Jégou et par Stéphane Marret, INSERM U1245

UNIVERSITÉ DE ROUEN NORMANDIE

EdNBISE
Ecole doctorale Normande
Biologie Intégrative,
Santé, Environnement

Inserm U1245
Institut national
de la santé et de la recherche médicale

REMERCIEMENTS

A Madame le Docteur Sylvie Jégou, ma directrice de thèse qui m'accompagne depuis mon master 2. Merci de m'avoir initié à la recherche fondamentale au laboratoire U1245. Je suis depuis le début impressionné par ta rigueur scientifique, ta ténacité et ton amour du travail bien fait. Merci pour ta disponibilité et ta patience. Et la patience il t'en a fallu, en encadrant deux thèses de médecins en même temps, avec nos emplois du temps surchargés et les kilomètres qui me séparent maintenant de Rouen. Merci pour ta relecture très scrupuleuse de ce manuscrit. Je suis très fier d'être ton dernier thésard !

A Monsieur le Professeur Stéphane Marret, mon directeur de thèse. Merci de m'avoir guidé depuis le début de mon internat et de m'avoir poussé à franchir les portes du laboratoire et ainsi découvrir les joies de la recherche fondamentale. C'est à vous que je dois mon inscription en thèse, travail que je pensais insurmontable à l'époque. Merci de m'avoir accueilli dans votre service en tant qu'interne puis en tant qu'assistant. J'ai beaucoup appris à vos côtés, notamment sur le plan du raisonnement clinique. Enfin, merci pour votre soutien sans faille depuis mon exode vers la capitale. J'espère avoir encore beaucoup de projets en commun à l'avenir avec vous ! Merci pour le temps passé à relire ce manuscrit et pour vos remarques pertinentes.

A Madame le Professeur Nathalie Bednarek, pour m'avoir fait l'honneur de juger ce travail et d'en être rapporteur.

A Monsieur le Professeur Ricardo Carbajal, pour m'avoir fait l'honneur de juger ce travail et d'en être rapporteur.

A Madame le Docteur Carine Ali, pour m'avoir fait l'honneur de juger ce travail.

A Monsieur le Docteur Pierre Gressens, pour m'avoir fait l'honneur de juger ce travail.

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Docteur Bruno Gonzalez, directeur du laboratoire Neovasc. Merci de m'avoir accueilli dans l'équipe depuis mon master 2. Merci pour tes conseils toujours avisés et bienveillants sur nos travaux.

A Monsieur le Docteur Fabien Tourrel, dit « Fafa de la pomponnette, de Bihorel, de Saint-Hilaire, de l'Europe et du Zénith ». Mon ami, mon co-thésard, mon témoin. C'est toi qui m'a embarqué dans la « team rémifentanil ». Je suis fier et heureux d'avoir partagé tout ça à tes côtés.

A Madame le Docteur Maryline Lecointre, pour ton aide si précieuse dans le projet rémifentanil. Sans toi, nous ne serions pas arrivés à venir à bout de toutes les manips. Merci pour ta patience, ta gentillesse et ton optimisme !

Au reste de la team rémifentanil : Pamela Kwetieu de Lendeu, Lenaïg Abily-Donval, Matthieu Leuiller et Yasmina Ramdani pour votre participation au projet.

A l'ensemble du laboratoire Neovasc-U1245, en particulier (dans le désordre) au Docteur Philippe Leroux, au Professeur Isabelle Leroux-Nicollet, au Docteur Carine Cleren, au Docteur Carole Brasse-Lagnel, et au Docteur Nathalie Dourmap. Aux étudiants de master, aux doctorants et post-doc que j'ai pu croisé depuis 6 ans : Caroline Aligny et Christian Roux qui m'ont initié à la pipette et au vibratome, Mathieu Lecuyer pour son aide précieuse notamment pour la calcimetrie et pour notre intérêt commun pour le sulfate de magnésium, Vincent Henry, Virginie Girault, Nicolas Dupré, Baptiste Porte, Ismaël Daher, Arnaud Desfeux. A Céline Lesueur et Michèle Hauchecorne pour votre aide à la paillasse. A Catherine Cannessant, à François Janin.

Au service de néonatologie et réanimation du CHU de Rouen. A Anne-Marie Devaux et Véronique Brossard, vous êtes toutes les deux très haut dans mon estime. A Thierry et son compagnonnage en réanimation, à Caroline et Didier pour m'avoir enseigné la néonatologie. Je garderai toujours en mémoire ma première visite en néonat « verte » avec Caro ! A mes amis et (anciens) collègues : Alex, Aurélie, Amélie, Dorothée, Gaëlle D Gaëlle « Pinto », Sophie, Stéphane, Stéphanie. Vous me manquez, et je pense souvent à vous ! J'ai passé de belles années à vos côtés, riches en émotions et pleines de bonne humeur. Merci d'avoir

accepté que je passe un peu de temps au labo au détriment du service. Aux secrétaires Patricia, Sylvie, Véro et Sabine.

A toutes les personnes ayant participé au suivi à long terme de Premag. A Nathalie Mestre qui m'a tant aidé à retrouver les familles de Premag, dès 7h30 deux fois par semaine pendant de longs mois. Merci pour ton professionnalisme et ton soutien ! A Joannie Fresser, Amandine Comare et Catherine Lévêque. A Estelle Houivet pour sa patience et son courage pour toutes ces stats. Je tiens particulièrement à remercier les familles ayant participé à l'étude PREMAG. Il a fallu parfois être persuasif, envoyer des courriers, appeler, rappeler, renvoyer des courriers…Mais les familles ont été pour la plupart, très accueillantes et les témoignages empreints d'une certaine émotion. La période néonatale pour la famille d'un grand prématuré reste une cicatrice sensible durant de longues années. Vraiment merci.

Au service de néonatologie et réanimation de Port Royal. Au Professeur Pierre-Henri Jarreau pour m'avoir accordé du temps pour finaliser ce travail. Merci de la confiance que vous m'accordez en m'accueillant dans votre équipe. A Juliana, Mayass, Elodie, Marie-Stéphanie, Madame Boccara, Cécile, Philippe, Odile, Sophie, Valérie, Pascale, Claire B, Doriane, Clémence, Marianne, Amélie, Aurélie, Laureline, Camille D, Camille J, Emilie R, Emilie B, Antonin, Pauline et bien sûr Lise-marie. Merci de tous ces moments à vos côtés. Merci de m'avoir soutenu pendant l'écriture de ce manuscrit et d'avoir accepté que je sois un peu plus dans mon bureau que vous ces derniers temps ! Aux secrétaires Pascale, Catherine (& Liliane), Nancy et Sylvia.

Aux auxiliaires de puériculture, aux infirmières, aux puéricultrices avec qui je travaille au quotidien depuis plusieurs années. Merci pour les bons moments passés ensemble. Et aux moins bons. J'apprends beaucoup à vos côtés.

Aux médecins que j'ai rencontré depuis le début de mon internat (et que je n'ai pas encore cités) et qui me servent d'exemple : le Professeur Eric Mallet, le Professeur Christophe Marguet, le Professeur Laurent Storme, le Professeur Patrick Truffert.

A Sylvie Karila-Bourdet pour ta relecture à distance lors de la dernière ligne droite.

REMERCIEMENTS

A mes amis qui n'ont pas encore été cités (encore dans le désordre) : Claire (la femme de Fafa) tu veux pas venir bosser à la maison de Solenn ?, Mélanie toujours si positive, Nimrod mon pote de barbe et de cravate (c'était quand même bien quand on était voisin !), Vincent tu resteras à jamais mon Co (-loc,-interne,-chef, pain), Diane la Gouffa, Antoine p'tite chatte, Fred le génie (si, si), Charles le Roux, Mathieu mon petit, Alaric mon si cher papi. La distance et nos emplois du temps trop chargés font que nous ne nous voyons pas assez. Je pense très souvent fort à vous.

A ma famille :

A mes parents, Christiane et Philippe. Merci pour votre soutien depuis le début. Votre dévouement à notre famille est exemplaire. Merci pour vos attentions toujours justes à mon égard et pour ma petite famille. Merci pour la relecture de ce long manuscrit !

A mes frères et sœurs (dans l'ordre chronologique) : Emilie, Colombe, Jehanne, Ladislas, Akim. Encore une fois la distance fait que nous ne voyons pas assez, mais vous retrouver est toujours un bonheur. C'est incroyable d'avoir une telle famille !

A mes grands-parents, qui m'ont chéri et aidé tout au long de mes études. Je sais qu'ils auraient été fiers d'être là. Vous me manquez !

A mes beaux-parents Michelle et Laurent.

A « Papi Gérald » et les déjeuners en famille du dimanche.

A mes belles belles-sœurs : Sarah et Noé (j'ai de la chance !).

A mes beaux-frères : Pierre, Benoit, Raph et Arthur (Vous avez été sacrément bien choisis. Triés sur le volet).

A tous mes nièces et neveux (dans l'ordre) : Marguerite, Emma, Martin, Timothée, Paul-Emile, Madeleine, Léa, Violette, Louis, Nina, Solal, Zachary et James. Vous voir grandir est exquis.

REMERCIEMENTS

A Hanna, ma petite fille chérie. Tu nous combles de bonheur, ta maman et moi, depuis déjà trois ans. Tu nous impressionnes tous les jours un peu plus. Nous sommes très fiers de toi.

A Maya.

Ma femme chérie.

Mon amour.

Depuis notre rencontre, la vie a un tout autre sens.

Merci pour ton soutien sans faille.

Pour tout ce que nous avons construit. Pour tout ce que nous construirons ensemble.

Présentations affichées aux congrès

- Lecuyer M, Rubio M, **Chollat C**, Lecointre M, Jégou S, Leroux P, Cleren C, Leroux-Nicollet I, Marpeau L, Vivien D, Marret S, Gonzalez B. Pre-clinical and clinical evidence of differential effects of magnesium sulfate on neuroprotection and angiogenesis during brain development. Journée normande de recherche biomédicale. Rouen, 2016.

- Lecuyer M, Rubio M, **Chollat C**, Lecointre M, Jégou S, Leroux-Nicollet I., Ali C, Vivien D, Marret S, Gonzalez B. Effect of low and high dose of prenatal magnesium sulfate exposure on cerebral vascular network: a pre-clinical and clinical study. Journée de l'Institut de Recherche et d'Innovation Biomédicale (IRIB). Rouen, 2015.

- Lecuyer M, Rubio M, **Chollat C**, Lecointre M, Jégou S, Leroux-Nicollet I, Ali C, Marret S, Vivien D, Gonzalez B. Effect of antenatal administration of magnesium sulfate on cerebral vascular network: a pre-clinical and clinical study. Colloque de la Société des Neurosciences. Montpellier, 2015**.**

- Lecuyer M, Rubio M, Lecointre M, Jégou S, Leroux-Nicollet I, Ali C, **Chollat C**, Marret S, Vivien D, Gonzalez B. Effect of low and high doses of magnesium sulfate on the cerebro-vascular network. Journée de l'Ecole Doctorale Normande (Ed NBISE). Rouen, 2015.

- Tourrel F, **Chollat C**, Ramdani Y, Compagnon P, Marret S, Dureuil B, Gonzalez B, Jégou S. Effet neuroprotecteur du rémifentanil dans un modèle lésionnel in vivo du cerveau immature murin. Congrès de la Société Française d'Anesthésie et de Réanimation (SFAR). Paris, 2014.

- Lecuyer M, Rubio M, Lecointre M, Jégou S, Leroux-Nicollet I, Ali C, **Chollat C**, Marret S, Vivien D, Gonzalez B. Effects of in utero exposure to low and high doses of magnesium sulfate on the cortical angiogenesis. *Society For Neurosciences*, Washington DC, 2014.

- **Chollat C**, Tourrel F, Donval L, Marret S, Dufrasne F, Dureuil B, Gonzalez BJ, Jégou S. Remifentanil exerts an anti-apoptotic effect on immature mice brain: action mechanisms. *54th Annual Meeting European Society for Pediatric Research*. Porto, 2013.

- Lecuyer M, Lecointre M, Aligny C, Jégou S, Leroux-Nicollet I, **Chollat C**, Marret S, Gonzales B. Effects of low and high doses of magnesium sulfate on the cortical neuronal death and

angiogenesis. Journée de l'Institut de Recherche et d'Innovation Biomédicale (IRIB). Rouen, 2013.

- Lecuyer M. Aligny C, Roux C, **Chollat C**, Marret S, Gonzales B. Impact of prenatal magnesium sulfate exposure on the development of the cortical neurovascular network in mice. Colloque Grand Réseaux de Recherche (GRR) haut-normands. Rouen, 2013.

- **Chollat C**, Tourrel F, Donval L, Kwetieu de Lendeu P, Marret S, Dufrasne F, Dureuil B, Laudenbach V, Gonzalez B, Jegou S. Anti-apoptotic effect of remifentanil in mice immature brain: action mechanisms. *LARC Neurosciences*. Portsmouth, 2012

- **Chollat C**, Labarre A, Mestre N, Leveque C, Provost D, Marpeau L, Benichou J, Marret S. Suivi à long terme de la cohorte PREMAG. Congrès des sociétés médico-chirurgicales de pédiatrie. Bordeaux, 2012.

Présentations orales aux congrès (le nom de l'orateur est souligné)

- **Chollat C**, Tourrel F, Lecointre M, Ramdani Y, Marret S, Gonzalez B, Jegou S. Neuroprotective effect of remifentanil on excitotoxic-induced brain damaged in neonatal mice. *joint European Neonatal Societies* (jENS). Budapest, 2015.

- **Chollat C**, Ramdani Y, Compagnon P, Marret S, Dureuil B, Gonzalez B, Jegou S, Tourrel F. Effets *in vivo* du rémifentanil sur le cerveau immature du cerveau dans un modèle d'excitotoxicité cérébrale. Journées Francophones de Recherche en Néonatologie. Paris, 2014.

- Lecuyer M, Rubio M, Lecointre M, Jégou S, Leroux-Nicollet I, Ali C, **Chollat C**, Vivien D, Marret S, Gonzalez B. Effet d'une administration anténatale de différentes doses de sulfate de magnésium sur le réseau cérébral vasculaire. Journées Francophones de Recherche en Néonatologie. Paris, 2014.

- De la Villéon G, Dabbagh D, Auber M, Marret S, **Chollat C**. Réanimation du nouveau-né en salle de naissance en présence et en l'absence des parents. Etude qualitative du vécu des parents (REPARE). Journées Francophones de Recherche en Néonatologie. Paris, 2014.

- Lecuyer M, Rubio M, Lecointre M, Jégou S, Leroux-Nicollet I, Ali C, **Chollat C**, Vivien D, Marret S, Gonzalez B. Une exposition in utero au sulfate de magnésium altère l'angiogenèse

corticale et le flux sanguin cérébral. Journée de l'Institut de Recherche et d'Innovation Biomédicale (IRIB). Evreux, 2014.

- Marret S, Jadas V, Kieffer A, **Chollat C,** Rondeau S. Place de l'anoxie dans l'encéphalopathie précoce du nouveau-né à terme. Journées Nationales de Néonatologie. Paris, 2014.

- Joly A, **Chollat C**, Houivet E, Marret S. Evaluation à l'âge scolaire des dessins de bonhomme d'enfant grands prématurés. Essai contrôlé randomisé Premag. Journées Francophones de Recherche en Néonatologie. Paris, 2013.

- **Chollat C**, Marret S. Magnesium Sulfate Given before Very−Preterm Birth To Protect Infant Brain: The First Long−Term Follow−Up (PREMAG Randomized Trial). *Pediatric Academic Societies (PAS)*. Washington DC, 2013.

- **Chollat C**, Enser M, Provost D, Bénichou J, Marpeau L, Marret S. Magnesium sulfate antenatal exposure to protect brain of very preterm infants: the first school-age follow-up (PREMAG randomized controlled trial). *European Society for Paediatric Research (ESPR)*. Porto, 2013.

- **Chollat C**, Marret S. Indication néonatale du sulfate de magnésium point de vue du pédiatre : intérêts et limites. Club d'anesthésie-réanimation en obstétrique (CARO). Grenoble, 2013.

Publications (revues avec comités de lecture)

- **Chollat C**, Lecointre M, Leuillier M, Remy-Jouet I, Do Rego J, Abily-Donval L, Ramdani Y, Compagnon P, Dureuil B, Marret S, Gonzalez B, Jégou S, Tourrel F. Neuroprotective Effects of Remifentanil against Excitotoxic Brain Damage in Newborn Mice. Soumis en 2017 à *Anesthesiology*.

- **Chollat C**, Tourrel F, Marret S. Does remifentanil have a place for sedation in case of endotracheal intubation or minimally invasive surfactant therapy in neonates? *Neonatology*, 2017.

- **Chollat C**, Le Doussal L, de la Villéon G, Provost D, Marret S. Antenatal Magnesium Sulphate Administration For Fetal Neuroprotection: A French National Survey. *BMC Pregnancy & Childbirth*, 2017.

PRODUCTION SCIENTIFIQUE

- Lecuyer M, Rubio M, **Chollat C**, Lecointre M, Jégou S , Leroux P, Cleren C, Leroux-Nicollet I, Marpeau L, Vivien D, Marret S, Gonzalez B. Experimental and clinical evidence of differential effects of magnesium sulfate on neuroprotection and angiogenesis in the fetal brain. *Pharmacology Research and Perspectives*, 2017.

- Marret S, **Chollat C**, de Quelen R, Pinto-Cardoso G, Abily-Donval L, Chadie A, Torre S, Vanhulle C, Mellier D, Charollais A, Ancel PY, Réseau de Périnatalité en Haute-Normandie. Course and neurological/behavioral development of preterm children. Archives de Pédiatrie, 2015.

- Marret S, Jadas V, Kieffer A, **Chollat C**, Rondeau S, Chadie A. Hypoxic-ischemia and encephalopathy in at-term newborn. Archives de Pédiatrie, 2014.

- **Chollat C**, Enser M, Houivet E, Provost D, Bénichou J, Marpeau L, Marret S. School-Age Outcomes Following Randomized Controlled Trial of Magnesium Sulfate for Neuroprotection of Preterm Infants. *The Journal of Pediatrics*, 2014.

- Tourrel F, Kwetieu de Lendeu P, Abily-Donval L, **Chollat C**, Marret S, Dufrasne F, Compagnon P, Ramdani Y, Dureuil B, Laudenbach V, Gonzalez B, Jegou S. Remifentanil anti-apoptotic Effect on the Immature Mouse Brain: an ex vivo study. *Anesthesia and Analgesia*, 2014.

- Jadas V, Brasseur-Daudruy M, **Chollat C**, Pellerin L, Devaux A-M, Marret S. L'apport de l'examen Clinique, de l'électroencéphalogramme et de l'IRM cérébrale dans l'évaluation du pronostic de l'encéphalopathie néonatale précoce du nouveau-né à terme. A propos d'une série de 30 nouveau-nés, avant la mise en place du traitement par hypothermie. Archives de pédiatrie, 2013.

- Marret S, **Chollat C**, Leveque C, Marpeau L. Prévention de la paralysie cérébrale du grand prématuré par le sulfate de magnésium. Archives de pédiatrie, 2011.

<u>Publications (autres)</u>

- Réanimation et Soins Intensifs en Néonatologie, Masson, 2016.

  - Chapitre 28 Maladie des membranes hyalines (**Chollat C**, Jarreau PH).

- Chapitre 88 Les hémorragies intracrâniennes de l'enfant prématuré (Marret S, Parain D, Pinto-Cardoso G, **Chollat C**).

- Prémices N°10, Enquête « Peut-on protéger le cerveau du prématuré ?». **Chollat C**.

RESUME

Les progrès médicaux de la prise en charge des nouveau-nés prématurés ont permis la diminution de la mortalité néonatale, mais la prévalence des handicaps neurologiques d'origine périnatale reste stable. Ainsi, la mise en place de stratégies de neuroprotection est un enjeu primordial de la médecine périnatale actuelle. Une partie de ces stratégies a lieu avant la naissance, comme par exemple l'injection anténatale de corticoïdes qui diminue la survenue d'une hémorragie intracérébrale ou le transfert *in utero* vers une maternité de niveau III. Il a également été démontré que l'administration de sulfate de magnésium en cas de menace d'accouchement prématuré améliorait le devenir neurologique des enfants à l'âge de deux ans. La neuroprotection concerne aussi l'ensemble des interventions qui ont lieu après la naissance, pendant la période néonatale. Depuis les années 2000, les agents anesthésiques sont mis en cause dans la survenue d'anomalies du développement lorsqu'ils sont administrés chez le nouveau-né. La balance bénéfice/risque doit donc être évaluée pour chaque anesthésique prescrit en période néonatale afin de limiter une potentielle neurotoxicité.

Ce travail de thèse s'inscrit dans l'élaboration et l'évaluation de stratégies de neuroprotection du prématuré. La première partie a pour objectif le suivi à l'âge scolaire d'une cohorte d'enfants prématurés exposés en anténatal au sulfate de magnésium. La deuxième partie est consacrée à l'évaluation *in vivo* de l'impact du rémifentanil, morphinique de synthèse utilisé comme agent anesthésique, sur le cerveau immature du souriceau en condition excitotoxique.

1 - Etude de l'influence de l'administration anténatale du sulfate de magnésium sur le développement psychomoteur à l'âge scolaire de prématurés de moins de 33 semaines d'aménorrhée.

Compte tenu de ses propriétés pharmacologiques, le sulfate de magnésium est un bon candidat pour la neuroprotection. Des études chez l'Animal ont permis de mettre en évidence des effets bénéfiques du sulfate de magnésium sur la vitalité cellulaire cérébrale, notamment en contexte lésionnel. Chez l'Homme, de nombreuses études observationnelles ainsi que cinq essais randomisés contrôlés internationaux ont démontré une réduction de la paralysie cérébrale et de la survenue de troubles moteurs à l'âge de deux ans, en cas d'administration anténatale de sulfate de magnésium lors d'une menace d'accouchement prématuré.

Parmi ces essais, l'étude PREMAG, débutée en France en 1997 avait permis l'inclusion de 688 nouveau-nés prématurés, dont 606 ont été suivis à l'âge de deux ans. Un suivi à plus long terme était nécessaire pour affirmer l'innocuité de la molécule sur le devenir neurocognitif à l'âge scolaire. En effet, tout médicament utilisé chez le nouveau-né dans un but de neuroprotection peut avoir des effets bénéfiques sur la survenue des lésions cérébrales et des séquelles associées mais peut aussi intervenir de façon positive ou négative sur les processus physiologiques du développement. L'objectif de la recherche de cette première partie de thèse était donc de poursuivre l'analyse de cette cohorte en obtenant des renseignements sur le devenir neurologique de ces enfants âgés de 8 à 11 ans. Entre décembre 2009 et avril 2012, les familles qui avaient participé à l'essai Premag ont été recontactées. Quatre-cent-trente-et-un enfants (moyenne d'âge 11 ans) parmi les 606 survivants ont été évalués à l'âge scolaire par un questionnaire parental. Le critère d'évaluation principal était un critère combiné déficit moteur et/ou décès. Il n'a pas été mis en évidence d'effet délétère de l'exposition anténatale au sulfate de magnésium. Par ailleurs, une diminution non significative des troubles du comportement, une meilleure scolarisation et une réduction du recours aux services d'éducation à domicile ont été observées en cas d'exposition au sulfate de magnésium.

Cet essai est le premier à avoir évalué à l'âge scolaire une cohorte d'enfants prématurés exposés en anténatal au sulfate de magnésium. Les résultats du suivi à long terme sont rassurants et confortent les praticiens dans l'intérêt de l'utilisation anténatale du sulfate de magnésium en cas de menace d'accouchement prématuré avant 33 semaines d'aménorrhée.

2 - Effet neuroprotecteur du rémifentanil dans un modèle murin de lésion excitotoxique néonatale.

Les nouveau-nés prématurés sont exposés à différents agents anesthésiques au moment de la naissance lors d'une césarienne sous anesthésie générale, ou bien au cours de leur prise en charge en réanimation néonatale, pour la sédation/analgésie. L'impact de ces agents anesthésiques sur le cerveau en développement n'est pas encore clairement établi. Depuis les années 2000, de nombreuses études chez l'Animal ont mis en évidence un potentiel impact neurotoxique des anesthésiques sur le cerveau immature. Des études

observationnelles chez l'Homme ont mis en avant un lien entre l'exposition à une anesthésie générale au cours des premiers mois de vie avec un devenir neurologique altéré. Parmi ces agents anesthésiques, le rémifentanil, morphinique de synthèse, est utilisé en période périnatale, chez la mère en cas d'anesthésie générale ou chez le nouveau-né en cas de nécessité d'anesthésie/analgésie. Compte tenu de ses propriétés pharmacocinétiques (demi-vie courte, métabolisme par des estérases aspécifiques, indépendant des métabolismes rénal et hépatique), le rémifentanil semble particulièrement adapté au nouveau-né prématuré. Une interaction entre les morphiniques et le récepteur NMDA a été démontrée au travers du modèle d'hyperalgésie induite par les morphiniques : la stimulation du récepteur μ par les morphiniques pourrait entraîner l'activation du récepteur NMDA *via* une réaction de phosphorylation. L'existence d'un lien entre le rémifentanil et le récepteur NMDA a donc motivé au laboratoire l'étude des effets du rémifentanil sur les phénomènes de mort cellulaire dans le cerveau immature, en utilisant tout d'abord un modèle murin *ex vivo* de tranches cérébrales organotypiques. Nous avions mis en évidence que le rémifentanil ne modifiait pas la nécrose, mais exerçait un effet anti-apoptotique impliquant la voie intrinsèque de l'apoptose. Ce potentiel effet neuroprotecteur du rémifentanil nous a incité secondairement à évaluer *in vivo* l'impact du morphinique en contexte lésionnel. Les lésions cérébrales ont été obtenues par administration intracorticale d'iboténate, agoniste glutamatergique, au deuxième jour de vie (P2) chez le souriceau. Après exposition au rémifentanil, la taille de la lésion induite par l'iboténate était significativement réduite à P7. Cet effet protecteur était accompagné par une diminution de la production des dérivés réactifs de l'oxygène et de l'astrogliose réactionnelle, suggérant un effet modulateur de la neuroinflammation par le rémifentanil. L'activité caspase était également réduite dans le groupe rémifentanil, confortant les résultats obtenus *ex vivo*. Enfin, l'étude du comportement des souriceaux a permis de mettre en évidence un impact fonctionnel de l'administration de rémifentanil en contexte lésionnel. Les performances sensori-motrices (géotaxie négative entre P6 et P8 et réflexe d'agrippement entre P10 et P12) étaient améliorées chez les animaux lésés exposés au morphinique. A P18, l'analyse du comportement des souris dans l'*open field* semblait suggérer que l'exposition au rémifentanil à P2 entraînait un effet anxiolytique, particulièrement chez les femelles.

RESUME

L'effet anti-apoptotique du rémifentanil observé *ex vivo* se traduit *in vivo* par un effet protecteur en réduisant significativement la taille de la lésion induite par l'iboténate. Cet effet semble impliquer une modulation de l'inflammation et de l'apoptose. L'exposition au morphinique en période néonatale améliore les performances sensori-motrices de la souris lésée et semble diminuer l'anxiété de l'animal.

SUMMARY

Better protecting the developing brain of very preterm infants remains a daily challenge for all specialists in perinatal care. Despite improvement of neonatal mortality and morbidity, very preterm infants remain vulnerable and at risk of developing neurological impairments. To limit the occurrence of such events, implementing of neuroprotection during brain development is essential. Neuroprotection in the context of preterm birth is the subject of extensive research, but few strategies have currently been demonstrated to be effective. One part of these strategies takes place before birth, as antenatal corticosteroids administration that is known to reduce intraventricular hemorrhage, or *in utero* transfer to tertiary maternity hospitals. There is now strong evidence to support antenatal magnesium sulfate infusion in order to prevent cerebral palsy in context of prematurity. Neuroprotection may also occur after birth and evaluate the benefit/risk balance for each potentially deleterious drug administered during this period, such as anesthetics, is one of those strategies. Fetuses and preterm newborns are exposed to general anesthesia during cesarean delivery or in neonatal intensive care when sedation and analgesia is recommended. The role of these agents remains extremely controversial and could appear to be neurotoxic.

This thesis work is part of the development and evaluation of neuroprotection strategies for preterm neonates. The first part aims at the follow up of the French PREMAG cohort to evaluate the children for any long-term deleterious effects of magnesium sulfate, and to assess developmental and psychomotor outcomes at school-age. The second part is devoted to the evaluation of the *in vivo* impact of remifentanil, synthetic opiate, on the immature brain of mouse pups in an excitotoxic condition.

1 - School-age outcomes following a randomized controlled trial of magnesium sulfate for neuroprotection of preterm infants

Given its pharmacological properties, magnesium sulfate has always been a good candidate for neuroprotection. Animal studies have demonstrated beneficial effects of magnesium sulfate on brain cell vitality, particularly in the context of brain injury. In humans, many observational studies as well as five international randomized controlled trials demonstrated a reduction in cerebral palsy and motor impairment at the age of two years after antenatal administration of magnesium sulfate.

Among these randomized controlled trials, the Premag study, started in France in 1997, included 688 preterm infants, of which 606 were followed at the age of two. A longer follow-up was necessary to confirm the safety of magnesium sulfate on neurocognitive outcome at school-age. Indeed, a same molecule used in neonate for neuroprotection may have some beneficial effects on brain injury but it can also impact negatively on brain development few years later. The objective of this study was the analysis of neurological outcome of the children included in the Premag trial and aged between 8 and 11 years. Between December 2009 and April 2012, families were contacted by a postal questionnaire. Information were obtained for 431 of the 606 survivors. The primary outcome was a composite of death and motor outcome. No deleterious effect of prenatal exposure to magnesium sulfate has been demonstrated. Although the differences between magnesium sulfate and placebo groups were not statistically significant, the average reduction in neurologic outcomes (in particular of behavioral disorders) are of potential clinical significance. The observations are strengthened by the reduced grade repetition, less need for specific assistance at school, and better parental perception of health.

This study is the first to have evaluated a cohort of preterm infants exposed to prenatal magnesium sulfate, at school age. These results allow us to assume that the promising short-term results observed at age 2 years are very likely sustained at school-age, and strongly suggest that the beneficial effects of magnesium sulfate observed at 2 years are not counterbalanced by later deleterious effects.

2- Neuroprotective effects of remifentanil against excitotoxic brain damage in newborn mice

Fetuses and preterm newborns are exposed to general anesthesia during cesarean delivery or in neonatal intensive care when sedation and analgesia is recommended. The impact of these anesthetic agents on the immature brain is controversial. On the one hand, management of pain is essential for the premature newborn, as the lack of pain care could lead to neurological complications such as behavioral or cognitive disorders. On the other hand, anesthetics, including opioids, have been implicated as being potentially deleterious. In animal studies, opioid exposure is associated with alterations of neuronal proliferation and degeneration, as well as behavioral changes. In some human studies, morphine

exposure is associated with early alterations in cerebral structure and with short-term neurobehavioral problems. Because of its pharmacokinetic properties (short half-life, non-specific esterase metabolism), remifentanil appears to be particularly suitable for preterm infants. Remifentanil has been shown to activate the glutamatergic N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor through a μ-opioid receptor-initiated cascade. However, in the developing brain, activation of the NMDA receptor can lead to excitotoxic or antiapoptotic effects, depending on the cortical layers. Using an *ex vivo* model of brain slices from postnatal day 2 mice (P2), we previously showed that remifentanil exerts an anti-apoptotic activity without necrotic effect, involving both opioids and NMDA receptors and the intrinsic mitochondrial-dependent apoptotic pathway. To clarify the effects of remifentanil on the immature injured brain, a well-defined rodent model of neonatal brain lesion by intracortical injection of the NMDA receptor agonist ibotenate was used to evaluate the impact of remifentanil *in vivo* in P2 mice. After remifentanil exposure, the size of the ibotenate-induced lesion was significantly reduced at P7. Remifentanil significantly decreased ROS production, cortical caspase activity, DNA fragmentation and cortical GFAP levels. Performance of negative geotaxis (P6-P8) and grasping reflex (P10-12) were improved in the remifentanil group. At P18, remifentanil-treated females spent more time in the open field center than control, suggesting less anxiety.

The anti-apoptotic effect of remifentanil observed *ex vivo* is translated *in vivo* by a protective effect leading to a significant reduction of ibotenate-induced lesion. This effect seems involve modulation of inflammation and apoptosis. Moreover, neonatal exposure to remifentanil improves the sensorimotor performance of the mouse and appears to decrease anxiety.

ABREVIATIONS

ABD : *Agonist Binding Domain*

AC : adénylate cyclase

ACOG : *American College of Obstetricians and Gynecologists*

ACTOMgSO4 : *Australian Collaborative Trial of Magnesium Sulphate*

AG : anesthésie générale

ADN : acide désoxyribonucléique

AMPA : alpha-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoazole-propionate

AMPc : adénosine monophosphate cyclique

ARN : acide ribonucléique

ATC : acide tricarboxylique

ATP : adénosine triphosphate

BEAM : *Beneficial Effect of Antenatal Magnesium trial*

BDNF : *Brain-Derived Neurotrophic Factor*

Ca^{2+} : ion calcium

CAM : *cell-adhesion molecule*

CAMKII : *calcium/calmodulin-dependent protein kinase II*

CASK : *calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase*

CBCL : *Achenbach Child Behavior Checklist Parental Assessment*

CELF : *Clinical Evaluation of Language Fundamentals*

CITO : *Class Integration and Test Order*

CNIH : protéine cornichon

CPAP : *Continuous Positive Airway Pressure*

CPM : *Raven's Colored Progressive Matrices*

DAG : diacylglycérol

D-AP5 : *D-2-Amino-5-phosphonopentanoic acid*

EAAT : *Excitatory Amino Acid Transporter*

EDI : *Early Development Instrument*

EGL : éminence ganglionnaire latérale

EGM : éminence ganglionnaire médiane

EPIPAGE : étude épidémiologique sur les petits âges gestationnels

EPIPPAIN : *Epidemiology of Procedural Pain In Neonates*

ERGIC : compartiment intermédiaire du RE-Golgi

ETF : échographie transfontanellaire

FDA : *Food and Drug Administration*

FiO_2 : fraction inspiratoire en oxygène

GABA : acide gamma-aminobutyrique

GAD : glutamate decarboxylase

ABREVIATIONS

GBP : *Guanylate-Binding Protein*

GFAP : *Glial Fibrillary Acidic Protein*

Gi/Go : protéine G de type Gi/Go

GLU : glutamate

GluA1-4 : sous-unités du R-AMPA

GluK1-5 : sous-unités du récepteur kaïnate

GluN1-3 : sous-unités du récempteur NMDA

GLUT1 : *glucose transporter* 1

GRIN : *Glutamate Receptor Ionotropic N-methyl-D-aspartate*

GRIP : *Glutamate Receptor-Interacting Protein*

GS : glutamine synthase

HELLP syndrome : *Hemolysis Elevated Liver enzymes Low Platelet count syndrome*

HIM : hyperalgésie induite par les morphiniques

HMGB1 : *High mobility group box 1*

I^2 : index d'hétérogénéité

IC : intervalle de confiance

ICD : *International Statistical Classification of Disease*

iGluR : récepteur ionotropique du glutamate

ILCOR : *International Liaison Committee on Resuscitation*

IMC : infirmité motrice cérébrale

IMOC : infirmité motrice d'origine cérébrale

IP3 : inositol triphosphate

INSURE : *intubation, surfactant, extubation*

IRM : imagerie par résonnance magnétique

K-ABC : *Kaufman Assessment Battery for Children*

KG : alpha cétoglutarate

KIF 17 : *kinesine superfamily 17*

LBD : *Ligand Binding Domain*

LDH : lactate deshydrogénase

LISA : *low invasive surfactant administration*

LIVBP : *Leucine/Isoleucine/Valine-Binding Protein*

LTD : dépression à long terme

LTP : potentialisation à long terme

MaGnet : *Magnesium and Neurologic Endpoint Trial*

Magpie : *Magnesium sulphate for prevention of eclampsia*

ABREVIATIONS

MAGUK : *Membrane Associated Guanylate Kinase*

Mg2+ : ion magnésium

mGluR : récepteur métabotropique

MgSO4 : sulfate de magnésium

MOR : *μ-Opioid Receptor*

mPins : homologue mammifère de *Drosopholia melanogaster partner of inscuteable*

Na^+ : ion sodium

NTD : *N-Terminal Domain*

NEPSY II : *Developmental Neuropsychological Assessment, 2nd Edition*

NETO 1 et 2 : *Neuropilin Tolloide-like* 1 et 2

NGF : *Nerve Growth Factor*

NIDCAP : *Newborn Individualized DevelopmentalCcare and Assessment Program*

NMDA : N-méthyl-D-aspartate

NO : monoxyde d'azote

NTPDase *: Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase*

OAA : oxaloacétate

OL : oligodendrocyte

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OPC : *Oligodendrocytes Precursor Cell*

OPRM : *opioid receptor μ*

OR *: odd ratio*

P10 *: postnatal day 10*

PC : paralysie cérébrale

PCa : pyruvate carboxylase

PCo : plaque corticale

PDH : pyruvate deshydrogénase

PDZ : *Post synaptic density protein, Drosophila disc large tumor suppressor, and Zonula occludens-1 protein*

PICK1 : *Protein Interacting with C Kinase 1*

PKC : Protéine Kinase C

PLC : phospholipase C

PN : plaque nenurale

PSD 95 : *PostSynaptic Density 95*

PYR : pyruvate

Pré-OL : pré-oligodendrocyte

QI : quotient intellectuel

RAKIT : *Revision Amsterdam Child Intelligence Test*

RE : réticulum endoplasmique

RR : risque relatif

SA : semaine d'aménorrhée

SAP 97/102 : *synapse associated protein 97/102*

ABREVIATIONS

Sec8 : *secretory protein* 8

SNC : système nerveux central

SynCAM : *synaptic cell adhesion molecule*

TARP : *Transmembrane AMPA Receptor Regulatory Proteins*

TDAH : trouble déficit de l'attention/hyperactivité

TMD : *TransMembranaire Domain*

TORCH : *Toxoplasmis Others Rubella Cytomegalovus Herpes infections*

TUNEL : *TdT-mediated-dUTP nick-end labelling*

UMR : unité mixte de recherche

VGLUT : *vesicular glutamate transporter*

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

VL : ventricule latéral

WAIS : *Wechsler Adult Intelligence Scales*

WASI : *Wechsler Abbreviated Scales of Intellegience*

WISC III ou IV : *Wechsler Intelligence Scale for Children 3rd or 4th Edition*

WPPSI : *Wechsler Preschool and Primary Scales of Intelligence*

ZI : zone intermédiaire

ZM : zone marginale

ZSV : zone sous-ventriculaire

ZV : zone ventriculaire

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : ESTIMATION DES TAUX DE PREMATURITE A L'ECHELLE MONDIALE EN 2010. 5
FIGURE 2 : MISE EN PLACE DES VESICULES CEPHALIQUES A PARTIR DU TUBE NEURAL. 17
FIGURE 3 : DEVELOPPEMENT CORTICAL PRECOCE ET NEUROGENESE. 20
FIGURE 4 : MIGRATION NEURONALE. 21
FIGURE 5 : DIFFERENTS MODES DE MIGRATION NEURONALE. 22
FIGURE 6 : FORMATION DES COUCHES DE NEURONES DU NEOCORTEX : MODELE « *INSIDE –OUT* ». 24
FIGURE 7 : INTERACTION ENTRE LES DIFFERENTS TYPES DE CELLULES CEREBRALES. 26
FIGURE 8 : LE DEVELOPPEMENT OLIGODENDROCYTAIRE SOUS CONTROLE DE FACTEURS INTRINSEQUES ET NEURONAUX. 28
FIGURE 9 : LES CINQ ETAPES DE LA SYNAPTOGENESE. 31
FIGURE 10 : LIBERATION ET ABSORPTION SYNAPTIQUE DES NEUROTRANSMETTEURS. 34
FIGURE 11 : LA SYNAPSE GLUTAMATERGIQUE. 35
FIGURE 12 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UN RECEPTEUR METABOTROPIQUE AU GLUTAMATE. 36
FIGURE 13 : CLASSIFICATION DES RECEPTEURS METABOTROPIQUES AU GLUTAMATE 37
FIGURE 14 : LES RECEPTEURS METABOTROPIQUES AU GLUTAMATE AU SEIN DE LA SYNAPSE. 38
FIGURE 15 : DISTRIBUTION SPATIALE DES MGLUR CHEZ LE RAT ADULTE. 39
FIGURE 16 : ORGANISATION MODULAIRE ET MECANISME D'ACTIVATION DES SOUS-UNITES DES RECEPTEURS IONOTROPIQUES AU GLUTAMATE. 40
FIGURE 17 : CLASSIFICATION DES RECEPTEURS IONOTROPIQUES AU GLUTAMATE 41
FIGURE 18 : EXPRESSION DU RECEPTEUR AMPA SANS SOUS-UNITE GLUA2 CHEZ L'HOMME ET LE RAT. 43
FIGURE 19 : EVOLUTION AU COURS DU TEMPS DE L'EXPRESSION DES SOUS-UNITES DU RECEPTEUR AMPA CHEZ LE RONGEUR. 44
FIGURE 20 : TRAFIC DU RECEPTEUR AMPA. 45
FIGURE 21 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU RECEPTEUR KAÏNATE. 46
FIGURE 22 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU RECEPTEUR NMDA. 50
FIGURE 23 : DISTRIBUTION SPATIO-TEMPORELLE DES SOUS-UNITES DU RECEPTEUR NMDA 53
FIGURE 24 : EXPRESSION DE SURFACE DES RECEPTEURS NMDA 57
FIGURE 25 : PROFIL DE DEVELOPPEMENT DES SOUS-UNITES GLUN2 ET GLUN3 DU RECEPTEUR NMDA. 60
FIGURE 26 : MECANISMES STRUCTURELS D'ACTIVATION DU RECEPTEUR NMDA. 60
FIGURE 27 : PROPRIETES BIOPHYSIQUES DES SOUS-UNITES DU RECEPTEUR NMDA. 62
FIGURE 28 : SITES DE LIAISON POUR DES LIGANDS EXTRACELLULAIRES DU RECEPTEUR NMDA. 63
FIGURE 29 : MECANISMES MOLECULAIRES MIS EN JEU LORS DE LA CASCADE EXCITOTOXIQUE 69
FIGURE 30 : FREQUENCE ET MODE D'ADMINISTRATION DES AGENTS ANESTHESIQUES EN NEONATOLOGIE EN CAS DE VENTILATION TRACHEALE. 92
FIGURE 31 : PERCEPTION DOULOUREUSE PAR LE FAISCEAU SPINO-THALAMIQUE. 94
FIGURE 32 : POURCENTAGE CUMULE DES TROUBLES DES APPRENTISSAGES APRES EXPOSITION A UNE OU PLUSIEURS ANESTHESIES AVANT 4 ANS. 102
FIGURE 33 : INTERACTIONS ENTRE LE RECEPTEUR NMDA ET LES MORPHINIQUES. 120
FIGURE 34 : IMPACT DE L'ACTIVITE DU RECEPTEUR NMDA SUR LA SURVIE CELLULAIRE 218

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : DEVELOPPEMENT FONCTIONNEL ET ANATOMIQUE DE LA PERCEPTION DOULOUREUSE. 95
TABLEAU 2 : ESSAIS CLINIQUES EVALUANT L'EFFET D'UNE EXPOSITION AUX ANESTHESIQUES CHEZ L'ENFANT SUR LE DEVENIR NEUROLOGIQUE. 107
TABLEAU 3 : ESSAIS RANDOMISES CONTROLES EVALUANT UNE SEDATION/ANALGESIE PAR REMIFENTANIL EN VUE D'UNE INTUBATION ENDOTRACHEALE CHEZ LE PREMATURE. 116
TABLEAU 4 : COMPARAISON DES DEVENIRS NEUROLOGIQUES ET SCOLAIRES DES COHORTES EPIPAGE 1 ET PREMAG 204
TABLEAU 5 : PROTOCOLES D'ADMINISTRATION DU SULFATE DE MAGNESIUM A VISEE NEUROPROTECTRICE SELON LES RECOMMANDATIONS NATIONALES 209

SOMMAIRE

INTRODUCTION **1**

I LA PREMATURITE 4

I.1 Définitions 4

I.2 Etat des connaissances 4

I.2.1 Epidémiologie 4

I.2.2 Causes 5

I.2.3 Conséquences 7

II LE DEVELOPPEMENT CEREBRAL NORMAL 16

II.1 Développement précoce du système nerveux central 16

II.2 Développement du télencéphale 18

II.3 Développement du cortex cérébral 18

II.3.1 Le développement précoce est marqué par une prolifération précoce 18

II.3.2 Début de la neurogenèse (5ème semaine de gestation) 19

II.3.3 Migration cellulaire 21

II.3.4 Différenciation cellulaire 25

II.3.5 Synaptogenèse 29

II.3.6 Myélinisation 31

II.3.7 Mort cellulaire physiologique des neurones en développement 32

III GLUTAMATE ET NEURODEVELOPPEMENT 33

III.1 Les récepteurs métabotropiques 36

III.2 Les récepteurs ionotropiques 39

III.2.1 Les récepteurs AMPA 41

III.2.2 Les récepteurs kaïnate 45

III.2.3 Les récepteurs NMDA 48

IV IMPACT DE LA NAISSANCE PREMATUREE SUR LE CERVEAU EN DEVELOPPEMENT 70

IV.1 Anomalies de la substance grise 70

IV.2 Anomalies de la substance blanche 71

IV.3 Hémorragies intracrâniennes 73

V STRATEGIES DE NEUROPROTECTION CHEZ LE PREMATURE 74

V.1 Période anténatale 74

V.2 Période périnatale 75

V.3 Période postnatale 75

VI LE SULFATE DE MAGNESIUM 77

VI.1 Propriétés du magnésium 77

VI.2 Actions cellulaires du magnésium 78

VI.2.1 Au niveau cardiovasculaire 78

VI.2.2 Au niveau neuromusculaire 78

VI.2.3 Au niveau du système nerveux central 78

VI.2.4 Autres actions 78

VI.3 Hypermagnésémie 79

VI.4 Indications thérapeutiques actuelles du magnésium 79
VI.5 Effets potentiels du magnésium sur le cerveau immature 80
VI.6 Le magnésium et la neuroprotection 81
VI.6.1 Chez l'Animal 81
VI.6.2 Chez l'Homme 83
VII LES AGENTS ANESTHESIQUES EN PERIODE PERINATALE : LE REMIFENTANIL 90
VII.1 Contexte d'utilisation des agents anesthésiques 90
VII.2 La douleur du nouveau-né 93
VII.2.1 Le nouveau-né ressent-il la douleur ? 93
VII.2.2 Aspects développementaux des circuits de la douleur : spécificités néonatales 93
VII.2.3 Effets à long terme de la douleur néonatale chez l'Homme 96
VII.3 Effets potentiels des agents anesthésiques sur le cerveau en développement 97
VII.3.1 Effets des agents anesthésiques agissant sur les récepteurs NMDA et GABA 98
VII.3.2 Effets des morphiniques 107
VII.4 Le rémifentanil 111
VII.4.1 Propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques, spécificités du nouveau-né 111
VII.4.2 Exposition du fœtus au rémifentanil 112
VII.4.3 Utilisation chez le nouveau-né 113
VII.4.4 Interactions avec le récepteur NMDA (modèle d'hyperalgésie induite par les morphiniques) 119
VII.4.5 Impact du rémifentanil sur la mortalité cellulaire au sein du cerveau immature murin (première partie des travaux réalisés au laboratoire Inserm U1245) 121

OBJECTIFS DE LA THESE 125

I LE SULFATE DE MAGNESIUM ADMINISTRE AVANT LA NAISSANCE A-T-IL UN EFFET A L'AGE SCOLAIRE ? 127
II QUELS SONT LES EFFETS DU REMIFENTANIL SUR LE CERVEAU DU SOURICEAU ? 128

RESULTATS 131

I SCHOOL-AGE OUTCOMES FOLLOWING A RANDOMIZED CONTROLLED TRIAL OF MAGNESIUM SULFATE FOR NEUROPROTECTION OF PRETERM INFANTS 133
II NEUROPROTECTIVE EFFECTS OF REMIFENTANIL AGAINST EXCITOTOXIC BRAIN DAMAGE IN NEWBORN MICE 143

DISCUSSION & PERSPECTIVES 195

I DEVENIR A L'AGE SCOLAIRE D'ENFANTS NES PREMATURES EXPOSES AU SULFATE DE MAGNESIUM EN ANTENATAL A VISEE NEUROPROTECTRICE (ESSAI RANDOMISE CONTROLE PREMAG) 199
I.1 Limites de l'étude 200
I.1.1 Limites liées à l'étude initiale 200
I.1.2 Limites liées au questionnaire 202
I.1.3 Limites liées aux perdus de vue 203
I.1.4 Limites liées à la représentativité du groupe contrôle 203
I.2 Intérêts de l'étude 205
I.3 Comparaison avec le suivi à l'âge scolaire de l'essai ACTOMgSO$_4$ 207
I.4 Utilisation du sulfate de magnésium en France et à l'étranger 208

I.5 Effet-dose du sulfate de magnésium sur le cerveau immature 209
I.6 Perspectives 210
II EFFET NEUROPROTECTEUR DU REMIFENTANIL DANS UN MODELE MURIN DE LESION EXCITOTOXIQUE NEONATALE 212
II.1 Quelle est la posologie de rémifentanil à administrer chez le souriceau ? 213
II.2 Impact du rémifentanil sur la survie du souriceau 214
II.3 Effets du rémifentanil sur les paramètres cardio-respiratoires du souriceau : impacts potentiels sur le cerveau immature. 215
II.4 Impact du rémifentanil sur la mort cellulaire neuronale en cas de lésion induite par l'iboténate : effet neuroprotecteur ? 216
II.5 Rôle du récepteur NMDA dans l'effet potentiellement neuroprotecteur du rémifentanil.. 217
II.6 Inflammation, rémifentanil et neuroprotection 219
II.7 L'analgésie induite par le rémifentanil participe-t-elle à la protection du cerveau immature ?. 220
II.8 L'exposition néonatale au rémifentanil a-t-elle un impact sur le comportement du souriceau à court et à long terme ? 221
II.9 Utilisation périnatale du rémifentanil : exemple de la césarienne sous anesthésie générale et de l'intubation endotrachéale du nouveau-né 224
II.9.1 Utilisation du rémifentanil en cas de césarienne en urgence : étude REAGI 224
II.9.2 Mise au point d'un protocole de sédation du nouveau-né par du rémifentanil en cas d'intubation endotrachéale 225

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 229

ANNEXES 305

I ANNEXE 1 : ANTENATAL MAGNESIUM SULPHATE ADMINISTRATION FOR FETAL NEUROPROTECTION: A FRENCH NATIONAL SURVEY 307
II ANNEXE 2 : EXPERIMENTAL AND CLINICAL EVIDENCE OF DIFFERENTIAL EFFECTS OF MAGNESIUM SULFATE ON NEUROPROTECTION AND ANGIOGENESIS 315
III ANNEXE 3 : DOES REMIFENTANIL HAVE A PLACE FOR SEDATION IN CASE OF ENDOTRACHEAL INTUBATION OR MINIMALLY INVASIVE SURFACTANT THERAPY IN NEONATES? 337

INTRODUCTION

INTRODUCTION

La santé périnatale est un enjeu majeur de santé publique en 2017. Des progrès considérables ont été réalisés dans la surveillance des grossesses, l'organisation des soins, la prise en charge obstétricale, la prise en charge des nouveau-nés et leur réanimation. Ainsi, les seuils de réanimation des nouveau-nés prématurés ont été grandement abaissés : en France il est possible de prendre en charge un patient à partir de 23-24 semaines d'aménorrhée (SA) et de 500 grammes de poids de naissance. Il faut toutefois souligner que la prématurité reste la première cause de mortalité infantile dans le monde (Liu et al., 2016) et que les morbidités associées sont à l'origine d'hospitalisations longues, de complications neurodéveloppementales parfois lourdes à l'origine de handicaps moteurs, sensoriels, cognitifs et/ou comportementaux. La meilleure compréhension du cerveau en développement et la mise en place de stratégies de neuroprotection sont des axes prioritaires de recherche pour tous les acteurs de la médecine périnatale actuelle afin d'améliorer le devenir neurologique des enfants nés prématurés.

I La prématurité

Définitions

Une naissance prématurée est une naissance avant le terme normal d'une grossesse (40 à 41 SA). Le terme de grossesse est estimé par la date du premier jour des dernières règles et/ou à l'aide d'une échographie dite de « datation », réalisée précocement au cours du premier trimestre de la grossesse. L'âge gestationnel est donc le critère permettant de définir une naissance prématurée. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), une naissance avant 37 SA (259 jours) est considérée comme prématurée (World Health Organization, 2016). On distingue :

- la prématurité tardive, entre 34 et 36 SA ;
- la prématurité modérée, entre 32 et 33 SA ;
- la grande prématurité, entre 27 et 31 SA ;
- l'extrême prématurité, inférieure à 27 SA.

I.2 *Etat des connaissances*

I.2.1 Epidémiologie

Les dernières estimations effectuées en collaboration avec l'OMS font état d'environ 15 millions de prématurés en 2010 soit 11,1% du nombre total de naissances vivantes. Ces naissances prématurées sont distribuées différemment selon les pays (Figure 1) : elles concernent en effet 5% des naissances totales pour certains pays d'Europe du Nord et jusqu'à 18% pour des pays africains comme le Malawi (Blencowe et al., 2012). En France, 7,4% des enfants étaient nés avant 37 SA en 2010, soit environ 60000 nouveau-nés, dont 12000 avant 32 SA (Blondel et al., 2012 ; Torchin et Ancel, 2016). Le taux de prématurité est en constante augmentation, en moyenne de 0,8% par an, soit environ 14,7% entre 1990 et 2010 dans le monde (Blencowe et al., 2012). En Europe, si la tendance est similaire, elle est plus hétérogène. Sur 19 pays européens, la prématurité a augmenté significativement entre 1996 et 2008 pour 13 pays, mais elle a stagné ou diminué pour 6 autres. En France, le taux de prématurité a lui augmenté, passant de 5,9% en 1995, à 7,2% en 2003 et 7,4% en 2010 (Zeitlin et al., 2013). Cette tendance peut s'expliquer notamment par l'augmentation des taux de grossesses multiples et de prématurité induite, de l'âge moyen des femmes lors des

grossesses, le développement des techniques d'aide médicale à la procréation et l'amélioration des soins intensifs néonataux permettant une prise en charge des nouveau-nés plus immatures.

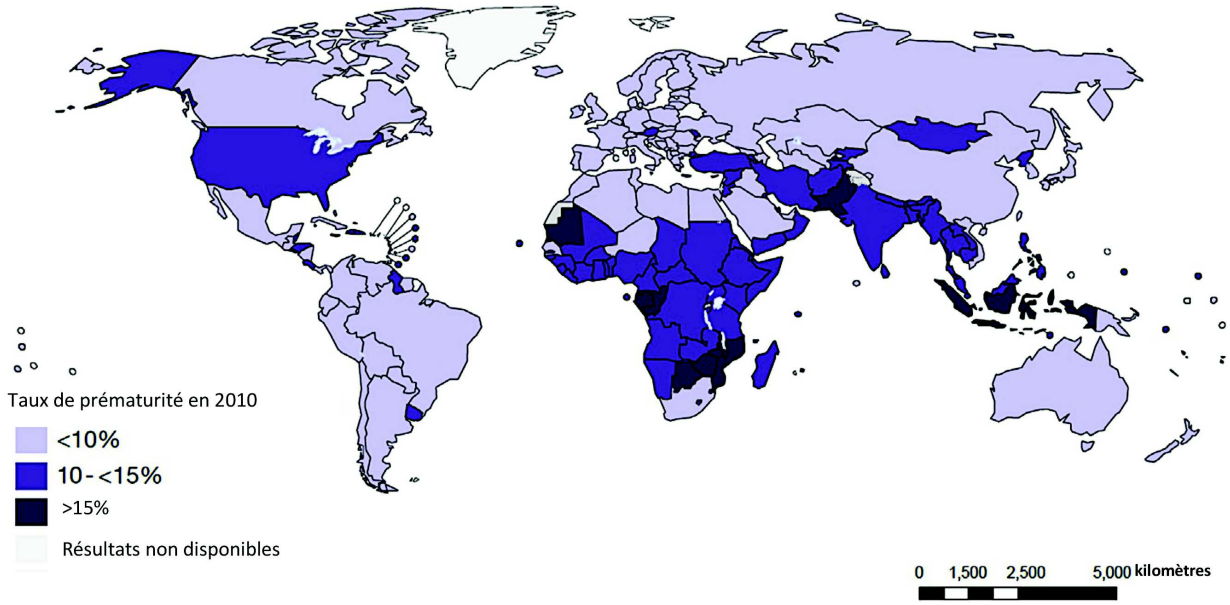


Figure 1 : Estimation des taux de prématurité à l'échelle mondiale en 2010.
La prématurité concerne tous les pays, mais son incidence est hétérogène. Les pays en voie de développement semblent particulièrement touchés avec pour certains plus de 15% de prématurité. D'après Blencowe et al., 2012.

I.2.2 Causes

Il est habituel de distinguer les prématurités spontanées des prématurités induites par l'obstétricien pour une indication maternelle ou fœtale.

a Prématurité spontanée

Elle est définie par une mise en travail spontanée avant 37 SA. Le travail peut aussi être précédé par une rupture prématurée des membranes. La naissance prématurée spontanée est souvent un processus multifactoriel, résultant de l'interaction de différents facteurs entraînant la modification de l'utérus qui passe d'un état quiescent à un état contractile à l'origine de la naissance prématurée. Plusieurs facteurs de risque sont identifiés (Goldenberg et al., 2012 ; Blencowe et al., 2013) :

- l'âge maternel lors de la grossesse (adolescence et âge maternel avancé) (Ferré et al., 2016) et l'intervalle court entre deux grossesses (Goldenberg et al., 2008 ; Muglia et Katz, 2010) ;
- le caractère multiple de la grossesse, à l'origine d'une sur-distension utérine. L'incidence des grossesses multiples augmente avec l'âge maternel et avec le développement de l'assistance médicale à la procréation (Blondel et al., 2006) ;
- les infections (infections urinaires, VIH, syphilis, chorioamniotite, paludisme, vaginoses bactériennes) (Gravett et al., 2010) ;
- les pathologies chroniques maternelles (diabète, hypertension artérielle, anémie, asthme, dysthyroïdie, obésité, insuffisance rénale) (Kersten et al., 2014) ;
- l'état nutritionnel (malnutrition, carence en micronutriments, anémie) (Black et al., 2008 ; Dean et al., 2014) ;
- le mode de vie (tabagisme, consommation d'alcool ou de drogues) (Gravett et al., 2010) et le type de travail exercé pendant la grossesse (activité physique excessive) (Muglia et Katz, 2010) ;
- la santé psychologique et psychiatrique maternelle (syndrome dépressif, violences faites aux femmes) (Männistö et al., 2016) ;
- les prédispositions génétiques (antécédents de prématurité spontanée, incompétence cervicale) (Mercer et al., 1999 ; Plunkett et Muglia, 2008).
- les conditions socio-économiques défavorables (Germany et al., 2015 ; Kramer, 2015).

L'origine de la mise en travail prématurée varie en fonction de l'âge gestationnel et des facteurs sociaux et environnementaux. Elle reste indéterminée pour plus de la moitié des cas (Menon, 2008). Les facteurs de risque peuvent aussi être associés, augmentant ainsi le risque de naissance prématurée.

b Prématurité induite

Elle est définie par le déclenchement médicamenteux du travail sur la décision de l'obstétricien ou par la nécessité d'une césarienne, programmée ou pendant le travail (spontané ou déclenché), pour une cause maternelle et/ou fœtale. Le taux de prématurité induite varie selon le niveau de vie du pays. Pour les pays en voie de développement, il est

bas, compte tenu du faible niveau de surveillance de la grossesse et du travail, de la médicalisation moins importante de l'accouchement et du faible taux de naissance par césarienne (moins de 5% par exemple pour les pays africains *versus* 20% en France quel que soit le terme (Le Ray et al., 2015) et jusqu'à 60% en France en dessous de 35 SA (Ancel et al., 2015)).

La prématurité induite concerne 20% des naissances prématurées dans les pays en voie de développement comme le Pakistan, l'Ouganda ou le Niger et jusqu'à 40% dans les pays plus riches comme le Japon, le Qatar ou l'Argentine (Morisaki et al., 2014).

Les indications médicales de prématurité induite sont de causes :

- maternelles, liées à la grossesse : prééclampsie sévère, éclampsie, HELLP syndrome (*Hemolysis Elevated Liver enzymes Low Platelet count syndrome*), cholestase gravidique, décollement placentaire, hématome retro-placentaire, placenta prævia, rupture utérine, chorioamniotite ;
- maternelles, liées à une pathologie chronique : cancer, obésité, diabète, hypertension ;
- fœtales : retard de croissance intra-utérin avec retentissement sur le bien-être fœtal, anomalies du rythme cardiaque fœtal ou certaines anomalies congénitales.

Par ailleurs, certains facteurs de risque associés à la prématurité induite ont été mis en évidence comme l'âge, l'ethnie, l'indice de masse corporelle de la mère ou le recours à l'assistance médicale à la procréation (Blencowe et al., 2013 ; de Jongh et al., 2014 ; Vogel et al., 2014).

I.2.3 Conséquences

Le risque de complications liées à la naissance prématurée diminue progressivement avec l'augmentation de l'âge gestationnel. La survenue des complications est certes directement en lien avec la prématurité, mais peut aussi être favorisée par des facteurs de risque individuels. Les facteurs de risque peuvent être associés, augmentant d'autant le risque de complications.

a Mortalité

La naissance prématurée est la principale cause de mortalité néonatale, représentant environ 3,1 millions de nouveau-nés dans le monde. Il existe une véritable disparité concernant le taux de survie des prématurés en fonction du pays de naissance. En effet, 50% des nouveau-nés prématurés à 24 SA survivent au-delà de 28 jours dans les pays développés, et 90% à 28 SA (Patel, 2016). A l'inverse, dans les pays en développement, seulement 10% des nouveau-nés à 28 SA vont survivre au-delà de 28 jours (Althabe et al., 2012). Dans l'étude EPIPAGE 2, la survie à 2 ans d'âge corrigé était de 52% pour les 22-26 SA, 93% pour les 27-31 SA et 98% pour les 32-34 SA (Pierrat et al., 2017).

b Morbidité

La morbidité en rapport avec une naissance prématurée peut survenir à court et à long terme. Les études épidémiologiques de suivis longitudinaux des prématurés comme par exemple EPIPAGE 1 et 2 en France (Larroque et al., 2008 ; Ancel et al., 2014) ou EPICure 1 et 2 au Royaume-Uni (Johnson et al., 2009 ; Costeloe et al., 2012) permettent une meilleure appréciation des risques.

A court terme, les nouveau-nés prématurés présentent un risque de syndrome de détresse respiratoire, pouvant nécessiter l'instillation intra-trachéale de surfactant exogène. Certains nouveau-nés nécessitent une ventilation mécanique (invasive ou non) durant leur séjour en néonatologie. L'immaturité du parenchyme pulmonaire, associée au syndrome de détresse respiratoire du prématuré et aux techniques de ventilation nécessaires à leur survie peut entraîner des lésions pulmonaires dont la forme la plus sévère concerne 35-40 % des grands prématurés : la dysplasie broncho-pulmonaire (définie par la nécessité d'une assistance ventilatoire à 36 SA d'âge corrigé) (Platt, 2014). Enfin, une oxygénothérapie à domicile sera nécessaire pour 7% des survivants (Datta-Nemdharry et al., 2012).

Les troubles digestifs du prématuré sont des complications fréquentes. L'entéropathie du prématuré est une intolérance alimentaire caractérisée par l'incapacité de digérer plus de la moitié de la ration alimentaire, la présence de résidus gastriques ou de vomissements et d'une distension abdominale (Moore et Wilson, 2011). Le stade ultime de gravité de l'entéropathie est l'entérocolite ulcéro-nécrosante, marquée par un état inflammatoire et/ou infectieux, dont l'incidence est estimée entre 4 et 7%. Un traitement

chirurgical est nécessaire pour environ un tiers des entérocolites et le taux de mortalité varie entre 12 et 30% selon le degré de la prématurité (Lin et Stoll, 2006). La croissance post-natale est aussi altérée pour une majorité des prématurés présentant des complications digestives (McCormick et al., 2011).

Le risque d'infection materno-fœtale et d'infections secondaires est augmenté en cas de prématurité. La survenue d'infection materno-fœtale est dix fois plus importante en cas de naissance prématurée, par rapport à une naissance à terme. Les infections secondaires sont favorisées par les techniques invasives utilisées en néonatologie nécessaires à la survie du nouveau-né (par exemple la ventilation trachéale ou le cathétérisme), l'immunodéficience liée à la prématurité et les risques inhérents à l'hospitalisation à l'origine d'infections nosocomiales (McCormick et al., 2011).

Au niveau neurologique, il peut survenir des hémorragies intracérébrales (ventriculaires et/ou parenchymateuses), des lésions diffuses de la substance blanche et des leucomalacies périventriculaires pour environ 25% des grands prématurés (Beaino et al., 2010). Dans l'étude EPIPAGE 2, le taux de leucomalacie périventriculaire kystique était faible avant 30 SA (2%), en revanche, les taux d'hémorragies intracrâniennes les plus graves (grades 3 et 4 selon la classification de Papile) concernaient 14% des enfants nés avant 28 SA (Ancel et al., 2014). Selon la nature, l'étendue et la localisation de ces lésions cérébrales, elles peuvent être ultérieurement associées à des troubles du neuro-développement parfois graves (Marret et al., 2013a ; Bolisetty et al., 2014). Au niveau sensoriel, la rétinopathie du prématuré concerne environ 3% des naissances avant 28 SA (Darlow, 2015).

A plus long terme, le taux de ré-hospitalisation pour une détresse respiratoire, notamment pour une bronchiolite, est augmenté en cas de prématurité (Mourani et al., 2014). C'est également un facteur de risque de survenue d'asthme à l'âge scolaire, notamment pour les enfants ayant comme antécédent une dysplasie broncho-pulmonaire. (He et al., 2015).

La prématurité est un facteur de risque de trouble du développement moteur. Parmi ces troubles, la paralysie cérébrale représente une complication grave, décrite dans le paragraphe suivant. Les troubles neuromoteurs mineurs sont beaucoup plus fréquents que la paralysie cérébrale, concernant près de la moitié des enfants inclus dans EPIPAGE 1 à l'âge

de 5 ans (Arnaud et al., 2007). Ces troubles comprennent les troubles du tonus, l'instabilité posturale, les troubles de la coordination (dyspraxies) et de la motricité fine. Les troubles cognitifs sont favorisés par la prématurité. En effet, le retard mental est quatre fois plus présent dans la population prématurée d'EPIPAGE 1 par rapport aux nouveau-nés à terme. On observe aussi des retards de l'acquisition du langage, pouvant concerner à 2 ans 40% des enfants nés avant 33 SA, des troubles neuro-visuels probablement sous-évalués par les cliniciens et des troubles de l'attention/hyperactivité (Marret et al., 2015). Toutes ces difficultés cognitives potentielles peuvent avoir un impact négatif sur les performances scolaires de l'enfant prématuré. Soixante-dix-sept pour cent des grands prématurés de l'étude EPIPAGE 1 avaient un niveau scolaire adéquat à 8 ans, alors que 94% des nouveau-nés à terme ne présentaient pas de retard scolaire (Larroque et al., 2008). Enfin les troubles sensoriels (déficience visuelle sévère secondaire à une rétinopathie ou déficience auditive sévère) sont rares, et concernent moins de 1% de la population des grands prématurés (Pierrat et al., 2017).

c La paralysie cérébrale

i Historique et définitions

Historiquement, c'est William John Little, chirurgien orthopédiste britannique, qui, le premier, décrit en 1861 la paralysie cérébrale sous la forme de diplégie spastique (syndrome de Little). Il évoque aussi un lien entre la survenue du trouble et « un manque d'oxygène » pendant l'accouchement. La paralysie cérébrale, depuis, a fait l'objet de nombreux écrits, intéressant d'imminents cliniciens. Sigmund Freud en 1897 et Sir William Osler en 1899 ont notamment contribué à sa description et participé à l'effort de recherche sur le sujet. Dans les années 1940, les pères fondateurs de l'Académie américaine pour la paralysie cérébrale et la médecine développementale (Carlson, Crothers, Deaver, Fay, Perlstein, et Phelps) aux États-Unis, et Mac Keith, Polani, Bax et Ingram, du « Little Club » au Royaume-Uni, ont permis l'évolution des concepts et une meilleure description de la paralysie cérébrale.

Définir la paralysie cérébrale a toujours été un défi pour les néonatologues, comme en témoigne le grand nombre de publications dans la littérature scientifique. En 1964, Bax propose de définir la paralysie cérébrale comme étant « un trouble du mouvement et de la posture dû à une anomalie ou une lésion du cerveau immature » (Bax, 1964). Il exclut les

troubles de la posture et du mouvement qui sont de courte durée, en rapport avec une maladie progressive, ou uniquement dus à une déficience mentale. Cette définition s'attache seulement aux aspects moteurs bien que les déficits sensoriels, cognitifs, ou comportementaux soient très répandus chez les patients concernés.

En France, Guy Tardieu introduit en 1969 le concept d'infirmité motrice cérébrale qui regroupe des troubles moteurs prédominants et non évolutifs dus à une lésion cérébrale « conséquence d'une lésion pré, péri ou post-natale précoce », pouvant « s'accompagner d'atteintes sensorielles et d'atteintes partielles des fonctions supérieures à l'exception d'une déficience intellectuelle ».

L'hétérogénéité des troubles désignés par le terme de paralysie cérébrale ainsi que les progrès dans la compréhension du développement des lésions cérébrales précoces, conduisent Mutch à modifier la définition en 1992 comme suit : « La paralysie cérébrale est un terme générique regroupant les déficits moteurs non progressifs, mais dont l'expression clinique peut être changeante, secondaires à des lésions ou des anomalies cérébrales survenant dans les tous premiers stades du développement » (Mutch et al., 1992). La variabilité du déficit moteur, déjà soulignée par Mac Keith et Polani, est reconnue et les maladies progressives, comme pour Bax, sont exclues de la définition.

En 2005, une définition internationale est proposée après le congrès de Bethesda. « La Paralysie Cérébrale désigne un ensemble de troubles permanents du développement, du mouvement et de la posture, responsables de limitations d'activité, imputables à des atteintes non progressives survenues sur le cerveau en développement du fœtus ou du nourrisson. Les troubles moteurs de la paralysie cérébrale sont souvent accompagnés de troubles sensoriels, perceptifs, cognitifs, de la communication et du comportement, par une épilepsie et/ou par des problèmes musculo-squelettiques secondaires » (Bax et al., 2005 ; Rosenbaum et al., 2007).

Cette définition anglo-saxonne regroupe les notions francophones, historiques, d'infirmité motrice cérébrale (IMC), définie par la présence de handicaps moteurs fixés et isolés, et d'infirmité motrice d'origine cérébrale (IMOC) définie par des handicaps moteurs fixés associés à un déficit cognitif, sensitif et/ou sensoriel (Amiel-Tison, 1997).

Enfin pour Mac Keith et Polani (Keith et al., 2008), la paralysie cérébrale est « un trouble persistant mais non immuable du mouvement et de la posture, qui apparaît dans les premières années de la vie et qui est la conséquence d'une lésion cérébrale non progressive, en rapport avec la survenue d'interférences lors du développement cérébral ».

La déficience motrice est de forme variable : hémi-, di-, tri- ou tétraplégie voire même une atteinte globale (hypotonie du tronc sans tenue de la tête associée à une tétraplégie) selon la maturation cérébrale et la topographie de la lésion cérébrale. Il existe par ailleurs trois grandes formes de paralysie : spastique (la plus fréquente), athétosique et ataxique.

Les complications associées peuvent être une maladie épileptique, des troubles oculaires, des troubles auditifs, une dyspraxie bucco-faciale, des troubles du langage ainsi que d'autres troubles cognitifs (dyscalculie, dyspraxie d'habillage, dyspraxie constructive,…) voire un retard mental.

ii Epidémiologie

La réduction du taux de paralysie cérébrale est un des objectifs principaux des obstétriciens et des pédiatres en néonatologie. Actuellement, en Europe, la paralysie cérébrale touche environ 1,8 enfants pour 1000 naissances (Sellier et al., 2016). La naissance prématurée est le principal facteur de risque de paralysie cérébrale (O'Callaghan et al., 2011). Le taux de paralysie cérébrale augmente de façon inversement proportionnelle à l'âge gestationnel. Ainsi, au sein de la cohorte EPIPAGE 1, il a été retrouvé 4,4% de paralysie cérébrale chez les anciens prématurés nés à 32 semaines d'aménorrhée et 19,4 % chez les enfants nés à 24-25 semaines d'aménorrhée (Ancel et al., 2006). Le taux de paralysie cérébrale pour EPIPAGE 2 à deux ans d'âge corrigé était de 7% pour les 24-26 SA, 4% pour les 27-31 SA et 1% pour les 32-34 SA. Il existe donc une diminution du taux de paralysie cérébrale chez les prématurés en France entre 1997 (EPIPAGE 1) et 2011 (EPIPAGE 2).

Près de la moitié des paralysies cérébrales est diagnostiquée chez des enfants nés prématurés (Institut national de la santé et de la recherche médicale (France), 2004). Le taux de paralysie cérébrale a augmenté jusqu'à la fin des années 1980 de la même manière que le taux de survie des grands prématurés a augmenté. Puis la prévalence a semblé se stabiliser voire diminuer à partir de la fin des années 1990 (Himmelmann et Uvebrant, 2014 ; Reid et

al., 2016). En Europe, le taux de paralysie cérébrale a diminué de 1,9 à 1,77 pour 1000 naissances entre 1980 et 2003 (Sellier et al., 2016).

iii Facteurs de risque

De nombreuses études épidémiologiques ont mis en évidence des facteurs de risque associés à la survenue de la paralysie cérébrale. Ces facteurs de risque semblent agir de manière synergique, et non isolée, dans la pathogenèse de la maladie. Parfois, aucun agent étiologique n'est identifié et le mécanisme causal reste inconnu. On distingue (Himmelmann, 2013 ; Marret et al., 2013b) :

➢ *Les facteurs de prédisposition anténatale*

- les infections congénitales « TORCH » (Toxoplasmose, Syphilis, Varicelle Zona Virus, Parvovirus B19, Rubéole, Cytomégalovirus, Herpès Simplex Virus) ;
- l'exposition à des toxiques comme l'alcool (Guerri, 1998, 2002), les drogues ou certains médicaments comme l'acide valproïque (Bolaños et Medina, 1997) ;
- la grossesse multiple (Scher et al., 2002 ; Topp et al., 2004) ;
- les pathologies vasculaires de la grossesse comme la prééclampsie, le retard de croissance intra-utérin (Badawi et al., 1998 ; Jarvis et al., 2005) ;
- la naissance prématurée ;
- la naissance post-terme ;
- les pathologies maternelles comme les dysthyroïdies, le diabète,…(Nelson, 2008) ;
- le sexe : la paralysie cérébrale est plus fréquente chez les garçons. Les nouveau-nés prématurés garçons ont une substance blanche significativement diminuée par rapport aux nouveau-nés à terme, ce qui n'est pas observé chez les nouveau-nés filles (Jarvis et al., 2005 ; Johnston et Hagberg, 2007) ;
- les autres malformations congénitales (fente labio-palatine, hypospade, atrésie de l'œsophage,…) sont retrouvées de façon plus fréquente chez les enfants présentant une paralysie cérébrale (Pharoah, 2007 ; Rankin et al., 2010) ;
- des facteurs génétiques pourraient influencer la cascade d'événements conduisant à la survenue de la paralysie cérébrale (MacLennan et al., 2015 ; Lim, 2016 ; Fahey et al., 2017). Il a été observé des familles présentant un risque de paralysie cérébrale accru dans le registre national suédois (Hemminki et al., 2007). Le polymorphisme

des gènes codant pour les protéines de l'inflammation, de la coagulation ou de l'endothélium vasculaire est associé à la paralysie cérébrale chez certains enfants (Nelson, 2008).

- *Les facteurs de risque périnataux*

L'asphyxie néonatale est impliquée dans la survenue de la paralysie cérébrale, mais elle concerne seulement 10% des cas (Graham et al., 2008 ; Coq et al., 2016). Cet épisode hypoxique (défini par la présence d'un événement obstétrical à risque, d'une acidose métabolique avec un pH < 7,0 ou d'un déficit de base > 12mmol/L, et d'un score d'APGAR<4 à 5 minutes) est lié à une situation à risque comme l'hématome rétroplacentaire, la rupture utérine, les dystocies sévères, les dysfonctions placentaires (postmaturité, prééclampsie), ou les hémorragies fœtales (hémorragie de Benckiser, transfusion fœto-maternelle). L'asphyxie néonatale peut être associée à un événement prénatal, comme un phénomène inflammatoire induit, par exemple, par une chorioamniotite ou une infection urinaire (Wu et al., 2003 ; Bax et al., 2006). Le phénomène d'infection/inflammation semble potentialiser les lésions d'hypoxie-ischémie cérébrale.

- *Les facteurs de risque postnataux*

De nombreux facteurs peuvent altérer le développement cérébral après la naissance. Le stress et la séparation mère/nouveau-né, le retard de croissance extra-utérin, les infections materno-fœtales ou les infections secondaires (Glass et al., 2008), les entérocolites ulcéro-nécrosantes (Shah et al., 2008) et l'utilisation de certains médicaments comme les glucocorticoïdes (Doyle et al., 2014b) ont été identifiés comme étant délétères sur le développement du cerveau immature et pouvant augmenter le risque de paralysie cérébrale.

- *Les conditions socio-économiques*

Alors que la relation entre la survenue de la prématurité et le niveau socio-économique familial est maintenant bien établi (Germany et al., 2015 ; Kramer, 2015), il semble également exister un impact des conditions socio-économiques familiales sur la survenue et la sévérité de la paralysie cérébrale, indépendamment de la prématurité et du

poids de naissance (Hjern et Thorngren-Jerneck, 2008 ; Solaski et al., 2014 ; Durkin et al., 2015 ; Oskoui et al., 2016).

II Le développement cérébral normal

Chez l'Homme, la troisième semaine embryonnaire marque le début du développement cérébral. A ce stade, l'embryon est soumis au processus de gastrulation qui correspond au passage d'une structure à deux feuillets à une structure à trois feuillets (Gilbert et Singer, 2004 ; Murry et Keller, 2008) :

- l'endoderme, feuillet dorsal épiblastique, le plus interne, qui donnera naissance notamment aux poumons, aux viscères, au pancréas et au foie ;
- le mésoderme, feuillet intermédiaire qui formera le cœur, les vaisseaux, le sang, les muscles et le squelette ;
- l'ectoderme, feuillet ventral, le plus externe, qui sera subdivisé en épiderme à l'origine de la peau, du cristallin et de la cornée et en neuroectoderme à l'origine du système nerveux central et périphérique.

II.1 *Développement précoce du système nerveux central*

La genèse du système nerveux débute lors de la phase de neurulation qui succède immédiatement à la gastrulation. La neurogenèse va alors débuter dans la région dorsale de l'embryon par un épaississement médio-sagittal de l'ectoderme qui traduit la prolifération de précurseurs neuraux et qui formera la plaque neurale (PN) au 19ème jour de la vie embryonnaire (E19) chez l'Homme. Le développement de la PN est plus rapide à l'extrémité crâniale, qui s'élargit en forme de raquette, à l'origine du futur cerveau. L'extrémité caudale reste étroite et deviendra la moelle épinière. Vers E20, la plaque neurale va s'invaginer selon un axe rostro-caudal pour former la gouttière neurale. Sous l'induction du mésoderme et de la chorde, les bords de la gouttière vont fusionner à E25 pour former le tube neural. La lumière du tube neural est le précurseur du système ventriculaire adulte. Dans le même temps, des amas cellulaires issus de la zone de jonction de la gouttière neurale et de l'ectoderme se détachent pour former les crêtes neurales. Les cellules des crêtes neurales forment un véritable quatrième feuillet dont seront issus les neurones et les cellules gliales des systèmes nerveux sympathique, parasympathique et sensoriel (Bystron et al., 2008 ; Volpe, 2008 ; Stiles et Jernigan, 2010). A partir de E32, le neuroépithélium de la partie rostrale du tube neural sera l'objet d'épaississements différentiels qui formeront trois vésicules : le prosencéphale (P) en position rostrale, le mésencéphale (M), en position

intermédiaire et le rhombencéphale (R) en position caudale. Ces trois vésicules sont positionnées selon une courbure à concavité ventrale, liée à l'apparition de deux sillons qui conditionnent la courbure mésencéphalique et la courbure céphalique (entre la moelle et le rhombencéphale). Par la suite, le prosencéphale se divisera en télencéphale et diencéphale, le rhombencéphale se divisera en métencéphale et télencéphale alors que le mésencéphale ne se divisera pas. Ainsi, vers E42, cinq structures vésiculeuses sont individualisées à l'origine des structures nerveuses de l'encéphale. Ces cinq structures sont alignées selon l'axe rostro-caudale de l'embryon, formant ainsi l'organisation primaire du système nerveux central (SNC) (Figure 2). Au cours de la cinquième semaine, les courbures mésencéphalique et cervicale s'accentuent. La courbure pontique, à concavité dorsale commence à se dessiner entre le myélencéphale et le métencéphale.

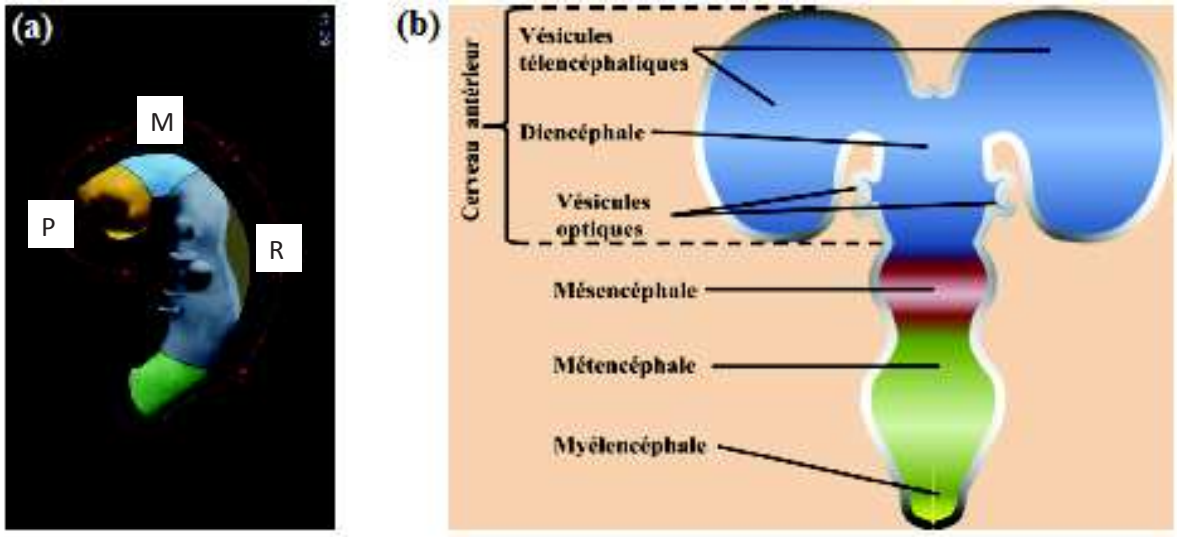


Figure 2 : Mise en place des vésicules céphaliques à partir du tube neural.
(a) Représentation schématique du stade « 3 vésicules » (P : prosencéphale, M : mésencéphale, R : rhombencéphale). (b) Le prosencéphale donnera le télencéphale et le diencéphale, le rhombencéphale donnera le métencéphale et le myélencéphale. Les hémisphères cérébraux proviennent du télencéphale et les vésicules optiques du diencéphale. D'après http://www.embryology.ch.

II.2 *Développement du télencéphale*

Le télencéphale va donner naissance à deux vésicules latérales, les futurs hémisphères cérébraux. Les cavités des vésicules télencéphaliques forment les ventricules latéraux qui communiquent avec la cavité diencéphalique par les foramens interventriculaires (trous de Monro). Le cortex cérébral (pallium) se développe à partir de la partie dorsale des vésicules télencéphaliques, alors que la région latéro-ventrale des vésicules (plancher ou subpallium) est à l'origine des éminences ganglionnaires médianes et latérales qui formeront les noyaux gris centraux (noyau caudé, noyau lenticulaire divisé en putamen et pallidum). Les vésicules télencéphaliques vont s'étendre tout d'abord vers le haut, puis vers l'arrière, vers le bas et vers l'avant. Cette croissance du télencéphale va ainsi dessiner une courbure à concavité antéro-interne à l'intérieur de laquelle se trouve l'insula qui sera enfouie en profondeur. Progressivement le télencéphale enveloppera le diencéphale, la partie dorsale du mésencéphale ainsi qu'une partie du métencéphale.

II.3 *Développement du cortex cérébral*

La formation du cortex est un processus complexe comportant plusieurs étapes chronologiques : la prolifération, la migration, la différenciation cellulaire et la synaptogenèse (Ortinau et Neil, 2015). En parallèle de ces phases clés de développement, un processus de mort cellulaire programmée, l'apoptose, joue un rôle essentiel dans le modelage des structures cérébrales par élimination des cellules excédentaires et régulation du nombre de cellules neurales.

II.3.1 Le développement précoce est marqué par une prolifération précoce

La prolifération cellulaire débute précocement vers E25, et devient maximale vers 3-4 mois de gestation (Zecevic, 2004 ; Volpe, 2008 ; Stiles et Jernigan, 2010). L'ectoderme à l'origine de l'ensemble du système nerveux n'est composé initialement que d'une monocouche de cellules prolifératives épithéliales. L'induction de la chorde et du mésoderme para-axial va permettre la création du neuroépithélium de la plaque neurale. Les cellules neuroépithéliales vont entrer en phase intense de mitose et ainsi constituer un neuroépithélium pseudo-stratifié épais composé de cellules épithéliales bipolaires jointives. Il est constitué d'une zone ventriculaire (ZV) germinative au contact de la lumière du tube

neural, et d'une zone marginale contenant uniquement les prolongements cellulaires (Bystron et al., 2008). Lors de la division cellulaire, la position du noyau va évoluer au sein du neuroépithélium au cours du cycle cellulaire. Le noyau, initialement dans la zone ventriculaire, va migrer vers la zone marginale (phase G1) au travers d'un prolongement cytoplasmique émis par la cellule. Une fois arrivé jusqu'à une zone intermédiaire (ZI), proche de la zone marginale, l'ADN est synthétisé (phase S). Le noyau contenant ainsi deux copies de son matériel génétique, retourne vers la zone ventriculaire (phase G2) où il se divise (phase M) en même temps que la cellule rétracte ses projections périphériques et s'arrondit. Après division, les cellules filles s'allongent à nouveau (phase G1) (Caviness et Rakic, 1978). Cette division symétrique s'opère selon un plan de clivage vertical. Les cellules neuroépithéliales poursuivent ainsi leurs divisions et augmentent l'épaisseur de la ZV. Il existe une première phase de prolifération cellulaire symétrique, permettant de créer deux cellules qui continuent elles-mêmes à proliférer, à l'origine d'une augmentation exponentielle du nombre de cellules progénitrices (Rakic, 1995). Ces cellules filles générées précocement constitueront la glie radiaire (Figure 3).

Les semaines 4 et 5 de gestation sont aussi marquées par l'apparition de la première couche de cellules méningées (O'Rahilly et Müller, 1986). Les méninges jouent un rôle primordial dans le développement cérébral (Budday et al., 2015). Alors que le rôle mécanique des méninges reste mal compris, la dure-mère, l'arachnoïde et la pie-mère jouent un rôle plus important que de simples couches protectrices du cerveau. En libérant des facteurs diffusibles, les méninges forment un important centre de signalisation entre le cortex et le crâne pour contrôler la prolifération et la migration des progéniteurs neuronaux et des neurones (Siegenthaler et Pleasure, 2011). Il n'est pas surprenant que la perturbation de la fonction méningée puisse entraîner des pathologies cérébrales complexes de type lissencéphalie ou polymicrogyrie (Sun et Hevner, 2014).

II.3.2 Début de la neurogenèse (5ème semaine de gestation)

Vers E33, les progéniteurs de la ZV, les cellules de la glie radiaire, commencent à passer de la division cellulaire symétrique à la division asymétrique (Iacopetti et al., 1999). Le plan de clivage de la cellule devient alors horizontal. Lors de la division asymétrique, une cellule fille reste dans la ZV pour former une cellule gliale alors que l'autre cellule fille

devient un neurone post-mitotique ou un progéniteur intermédiaire (Pontious et al., 2008 ; Ortinau et Neil, 2015). Les cellules post-mitotiques résultant d'une division asymétrique ne sont plus soumises au processus de migration nucléaire (Kosodo, 2012). Le passage de la division symétrique à la division asymétrique marque le début de la neurogenèse. L'accumulation de progéniteurs permet la création à partir de E40 d'une deuxième zone germinative proche de la ZV : la zone sous-ventriculaire (ZSV) entre les zones ventriculaire et marginale (Lui et al., 2011). Les neurones commenceront leur migration à partir de cette ZSV. La ZV et la ZSV forment la matrice germinative, une zone de prolifération active, dont les progéniteurs sont à l'origine des neurones pyramidaux (Figure 3). Chez l'Homme, la majorité des neurones du néocortex est générée entre la 6ème et la 27ème semaine de gestation (Volpe, 2009 ; Figure 3).

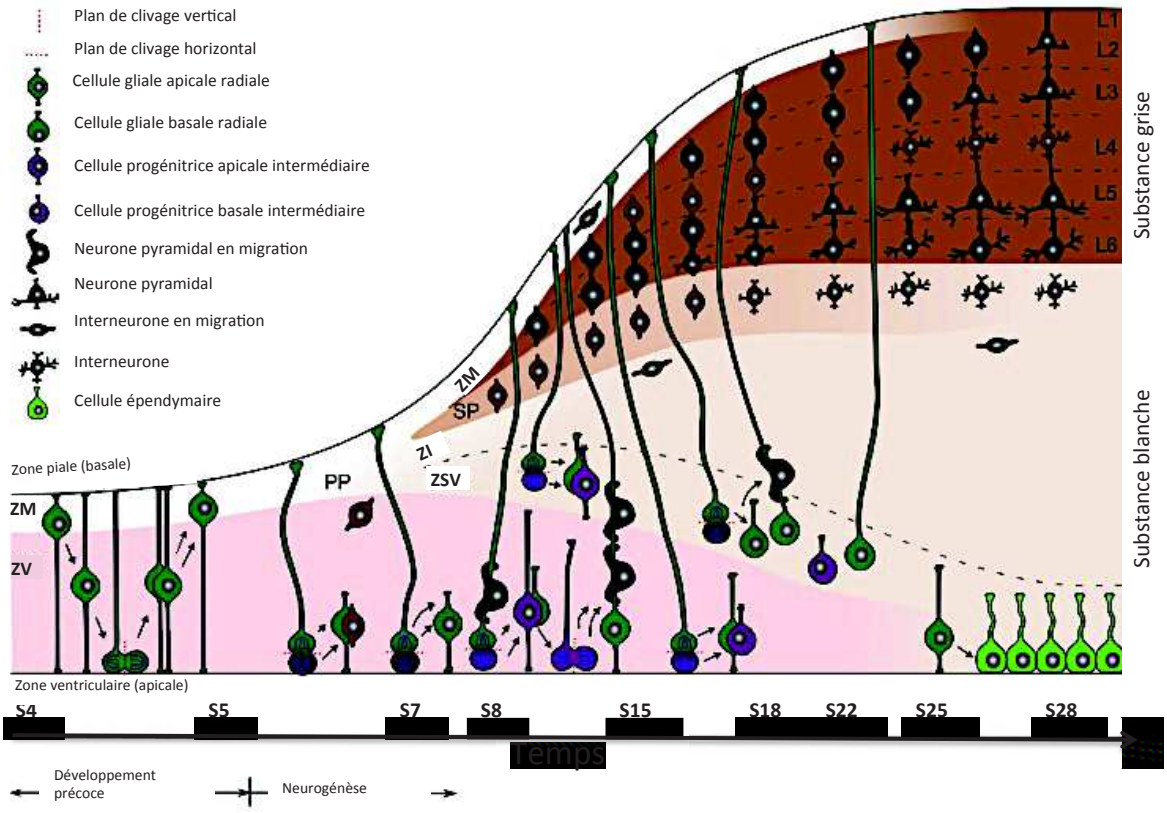


Figure 3 : Développement cortical précoce et neurogenèse.
Le développement précoce est marqué par une migration nucléaire pendant laquelle les cellules neuroépithéliales se divisent symétriquement selon un plan de clivage vertical. Le passage à une division cellulaire asymétrique signe le début de la neurogenèse. Les cellules progénitrices apicales et basales s'accumulent pour devenir la majeure source de neurones pyramidaux. PP : pré-plaque, SP : sous-plaque, ZI : zone intermédiaire, ZM : zone marginale, ZSV : zone sous-ventriculaire, ZV zone ventriculaire. D'après Budday et al., 2015.

II.3.3 Migration cellulaire

La séquence de migration cellulaire s'étend de la 7ème à la 28ème semaine de gestation, et concerne principalement le mouvement des cellules de la ZV et de la ZSV jusqu'à leur emplacement final (Volpe, 2008). Ce phénomène de migration joue un rôle prépondérant dans le développement neurologique car il conditionne l'organisation structurale du SNC (Hatten, 1993). Les neurones peuvent adopter différents types de trajectoire : la migration radiaire qui concerne essentiellement les neurones excitateurs, et la migration tangentielle pour les interneurones (Figure 4).

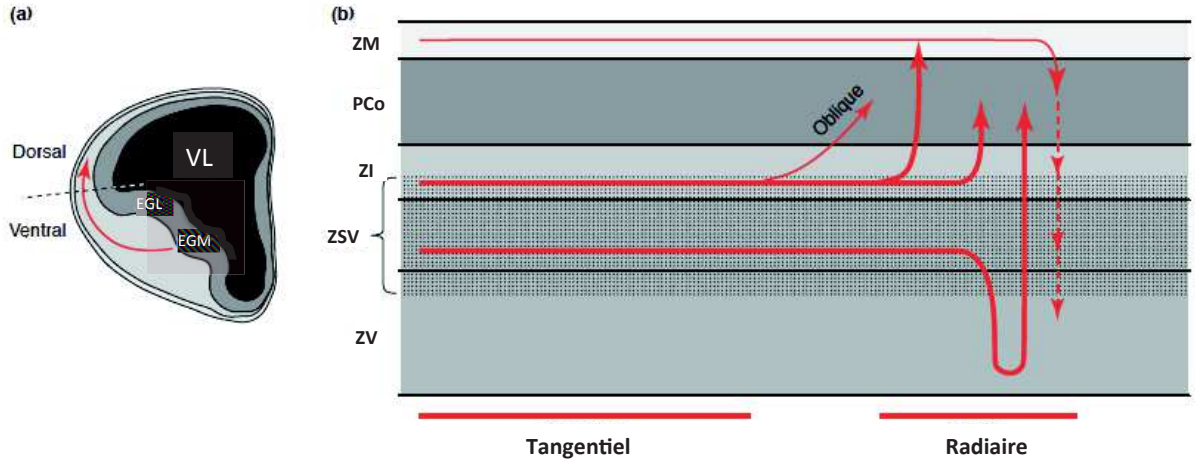


Figure 4 : Migration neuronale.
(a) Les interneurones proviennent majoritairement du télencéphale ventral. La plupart des interneurones sont produits au sein de l'éminence ganglionnaire médiane. (EGM) du télencéphale ventral et migrent afin d'atteindre le télencéphale dorsal. (b) Phases de migration des neurones au sein du télencéphale dorsal. Migration tangentielle puis radiaire ou oblique à l'entrée de la plaque corticale (PCo). EGL : éminence ganglionnaire latérale, EGM : éminence ganglionnaire médiane, VL : ventricule latéral, ZI : zone intermédiaire, ZM zone marginale, ZSV : zone sous-ventriculaire, ZV : zone ventriculaire. D'après Kriegstein et Noctor, 2004.

a Formation de la plaque corticale (A partir de la 7ème semaine de gestation)

A partir de la 7ème semaine, les neurones migrant de façon radiale à partir de la ZV et de la ZSV sont à l'origine de la formation de la plaque corticale. La migration radiaire des neurones peut prendre deux formes distinctes : la translocation somatique et la locomotion (Nadarajah et al., 2001 ; Tan et Shi, 2013 ; Figure 5).

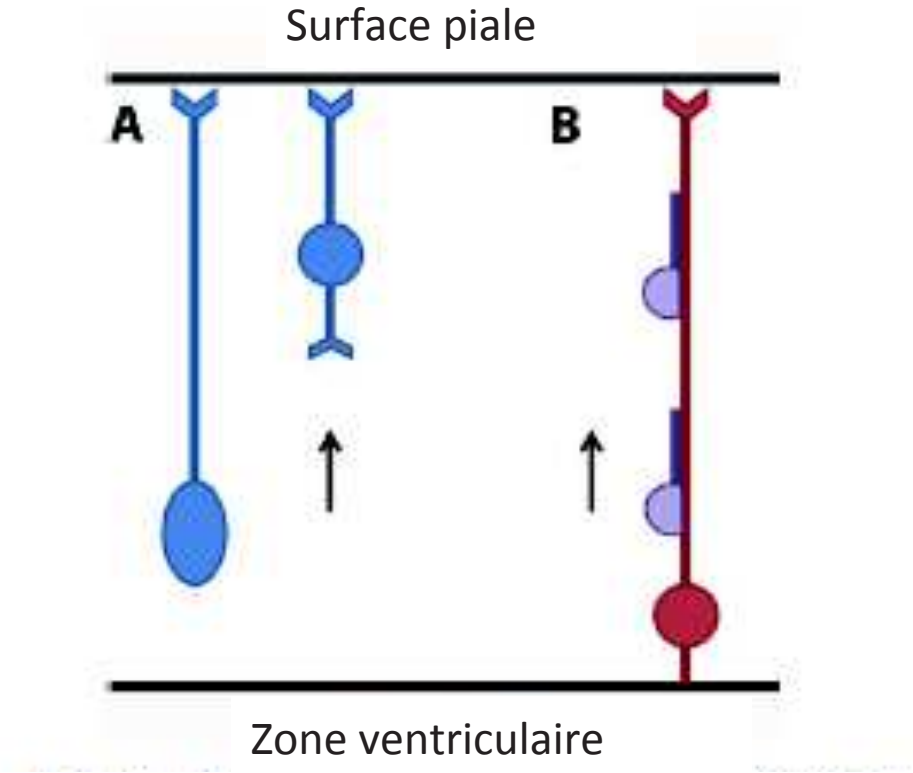


Figure 5 : Différents modes de migration neuronale.
A. Migration neuronale par translocation somatique. La cellule déploie un processus cytoplasmique qui s'attache au niveau de la surface piale. Le noyau se déplace ensuite vers la surface piale. **B**. Migration neuronale radiaire. Le neurone migre le long de la glie radiaire. D'après Stiles et Jernigan, 2010.

Au début de la phase de migration, le principal mode de migration semble être la translocation somatique. Elle concerne les jeunes neurones qui ont hérité du prolongement de la glie radiaire qui leur a donné naissance (Miyata et al., 2001). Ces cellules présentent une forme radiale, avec un noyau situé dans la zone germinative, une extrémité liée à la surface ventriculaire, et une autre extrémité atteignant la surface piale ou la zone marginale (ZM) (Gressens, 2000). Le corps cellulaire du neurone se hisse alors par un mouvement de translocation continu jusqu'à une nouvelle couche appelée « pré-plaque ». Cette couche cellulaire se positionne entre la ZI et la ZM dès E51. La pré-plaque se subdivisera en sous-plaque et en plaque corticale. Cette dernière sera à l'origine des couches VI à II du cortex mature, et la ZM deviendra la couche I (Bystron et al., 2008). La sous-plaque corticale est une structure transitoire, décrite comme étant une zone d'attente pour la mise en place des connections synaptiques, et disparaîtra dans les premiers mois après la naissance.

Dans les phases ultérieures du développement néocortical, les jeunes neurones adoptent majoritairement un second mode migratoire au cours duquel ils utilisent les processus radiaux des cellules gliales radiaires comme « échafaudage » pour atteindre leur position finale : la locomotion ou migration radiale guidée par la glie. Des études par images « *time-lapse* » de cultures de tranches de cerveau ont révélé de nombreux détails de ce type de migration. Noctor, Kriegstein et collaborateurs (Noctor et al., 2004) ont mis en évidence quatre phases de migration : 1) de la ZV à la ZSV, 2) arrêt de la migration pendant 24 heures ou plus, 3) phase rétrograde de migration, avec un retour vers la ZV puis 4) après contact avec le ventricule, le neurone migre vers la plaque corticale. Une fois que la cellule atteint la ZM, elle peut se détacher de la glie radiaire et migrer selon un mode de translocation terminale. Contrairement aux cellules qui migrent par translocation et qui se déplacent à une vitesse continue, les cellules migrant par locomotion se déplacent à des vitesses variables et subissent ensuite une translocation rapide pendant les étapes finales de la migration lorsqu'elles se rapprochent de leur destination finale (O'Rourke et al., 1992 ; Nadarajah et al., 2001).

b Formation des 6 couches du cortex (jusqu'à 18 semaines de gestation)

Entre les semaines 9 et 12, la sous-plaque s'épaissit fortement et sa densité cellulaire diminue. Entre les semaines 13 et 15, la ZV devient progressivement moins épaisse car de nombreuses cellules ont migré vers l'extérieur (Sidman et Rakic, 1973). A partir de 18 semaines, l'organisation du néocortex à 6 couches est identifiable. Des études de datation des neurones ont montré que les couches II à VI du néocortex sont formées selon un mode « *inside-out* ». Ainsi, Les premiers neuroblastes qui atteignent la plaque corticale constitueront la couche la plus profonde du cortex (couche VI). Puis, les neuroblastes destinés à la formation de la couche V migreront à leur tour, traverseront la pré-plaque et la couche VI. Ce processus se répétera jusqu'à la couche II (Angevine et Sidman, 1961 ; Berry et Rogers, 1965). La ZM donnera naissance à la couche I, la plus superficielle (Raybaud et al., 2013). La formation des couches corticales par migration radiaire s'étend entre le deuxième et le septième mois de développement chez l'Homme et entre E11 et E18 chez la Souris (Gupta et al., 2002). Au final, le neuroépithélium d'origine est considérablement transformé : la ZV n'est constituée que d'une seule couche de cellules épendymaires

délimitant les ventricules, la ZI correspond à la substance blanche sous-corticale et la plaque corticale est subdivisée en six couches corticales constituant le cortex cérébral (Figure 6).

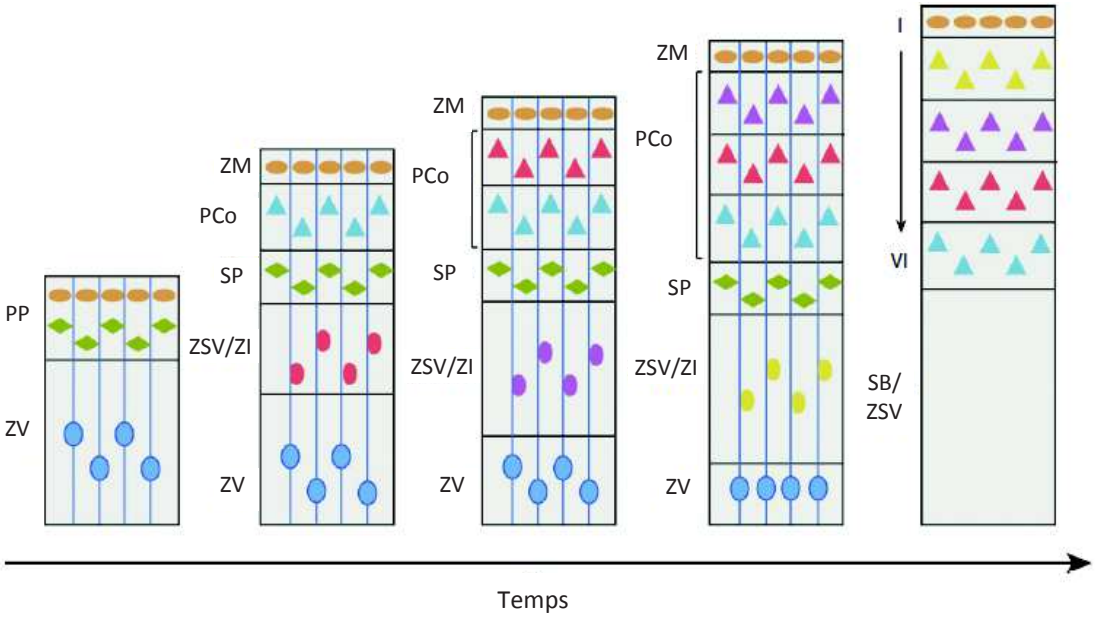


Figure 6 : Formation des couches de neurones du néocortex : modèle « *inside –out* ».
La pré-plaque est formée à partir d'une première vague de neurones post-mitotiques qui migrent de la zone ventriculaire jusqu'à la surface piale. Ensuite, une deuxième vague de néo-neurones (triangles bleus) migrent à travers les ZSV et ZI et divisent la pré-plaque en ZM, plus superficielle (les neurones de la ZM sont représentés par des ovales orange) et la sous-plaque, plus profonde (losanges verts), créant ainsi la PCo, futur néocortex. Les neurones générés par la suite, (représentés par des triangles roses, violets et jaunes, par ordre de naissance) étendent la PCo selon un modèle « *inside-out* ». Ainsi les neurones générés en derniers traversent les couches de neurones préexistant pour aller occuper les couches les plus superficielles. La ZV diminue progressivement puis disparaît. A l'âge adulte, la sous-plaque dégénère et laisse derrière elle un néocortex à six couches. PCo : plaque corticale, PP : préplaque, SB : substance blanche, ZI : zone intermédiaire, ZM : zone marginale, ZSV : zone sous-ventriculaire, ZV : zone ventriculaire. D'après Tan et Shi, 2012.

c Migration tangentielle

Alors que les neurones excitateurs sont produits directement dans la zone prolifération du néocortex, la plupart des interneurones proviennent du télencéphale ventral, majoritairement de l'éminence ganglionnaire médiane, des éminences ganglionnaires caudales et de l'aire pré-optique (Lavdas et al., 1999 ; Wichterle et al., 1999). A l'inverse des neurones excitateurs, les interneurones produits au niveau du télencéphale ventral empruntent une voie de migration tangentielle, longitudinale, pour atteindre le néocortex dorsal. Ce mode de migration ne nécessite pas d'interaction avec la glie radiaire. Les neuroblastes se déplacent le long des fibres axonales disposées tangentiellement à la surface corticale (McManus et al., 2004). Ils peuvent être amenés à migrer radialement pour

parvenir à leur position finale (Tan et Shi, 2013). La migration des interneurones se poursuit jusqu'au troisième trimestre, alors que la migration des neurones excitateurs s'est terminée, ce qui les rend plus vulnérables aux modifications liées à la prématurité, notamment les hémorragies de la matrice germinale (Del Bigio, 2011).

II.3.4 Différenciation cellulaire

a Neuroblastes

Lorsque le neuroblaste atteint sa position finale, il doit intégrer un réseau complexe de connexions avec son environnement (neurones, cellules gliales, matrice extracellulaire) (Figure 7). Pour y parvenir il subit un processus de maturation ou différentiation cellulaire. Ce phénomène commence une fois que le neuroblaste atteint la plaque corticale. Les neurones des couches V et VI se différencient donc avant que les cellules de la couche II n'aient atteint la plaque corticale. Cette différenciation suit un gradient ventro-dorsal (Angevine et Sidman, 1961). Elle débute par la formation de neurites au niveau du corps cellulaire qui seront à l'origine d'axones ou de dendrites. La croissance axonale et son guidage sont étroitement liés avec une structure transitoire formée de l'extrémité d'une neurite en croissance : le cône de croissance. Cette structure est dépendante des signaux environnementaux attractifs ou répulsifs permettant ainsi de façonner son trajet. Il existe un guidage par signalisation moléculaire non diffusible (la membrane axonale détecte des molécules d'adhérence sur les autres cellules ou dans la matrice extracellulaire) et par chimiotactisme (gradient de concentration de molécules attractives ou répulsives diffusibles émises par la cellule cible) (Luo, 2002 ; Gomez et Letourneau, 2014).

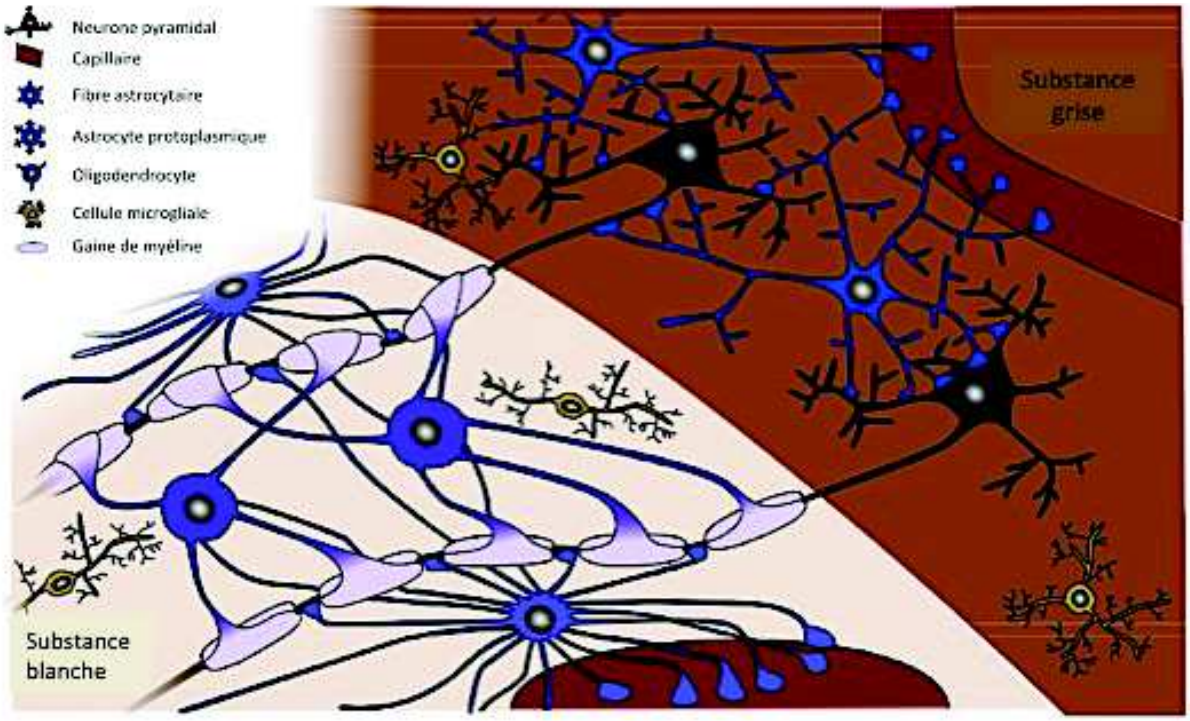


Figure 7 : Interaction entre les différents types de cellules cérébrales.
Dans la substance blanche, les axones myélinisés permettent une conduction rapide du message ; les oligodendrocytes intermédiaires se connectent entre eux et forment la gaine de myéline. Les astrocytes assurent l'approvisionnement en nutriments et le traitement synaptique. Dans la substance grise, les neurones forment des synapses entre eux et avec des astrocytes protoplasmiques. Les cellules microgliales contribuent à la clairance des débris et au remodelage synaptique. D'après Budday et al., 2015.

b Cellules gliales

Les cellules gliales représentent environ 90% des cellules cérébrales chez l'Homme. Il en existe trois types cellulaires dans le SNC : les astrocytes, les oligodendrocytes et la microglie.

i Les astrocytes

Les astrocytes apparaissent au cours de la deuxième moitié de la gestation (entre la semaine 24 et 32), après la phase de prolifération neuronale massive (Morrow et al., 2001 ; Freeman, 2010). La phase de prolifération astrocytaire se prolonge après la naissance. Les astrocytes continuent à élaborer et affiner leurs extensions en période néonatale pendant la phase active de synaptogenèse (Lund et Lund, 1972). Au final, les astrocytes deviendront le type cellulaire le plus abondant du cerveau humain (40% des cellules du SNC) (Freeman, 2010), présents dans la substance blanche et la substance grise.

Les astrocytes adoptent une forme étoilée. Ils jouent un rôle clé dans la transmission synaptique et le traitement de l'information. Ils participent au guidage des neurones pendant leur migration (Powell et Geller, 1999), interviennent dans la recapture de certains neurotransmetteurs dont le glutamate (Ortinau et Neil, 2015), véhiculent les substrats énergétiques aux neurones (Brown et Ransom, 2007 ; Falkowska et al., 2015) et participent à l'excitabilité neuronale (Haydon et Carmignoto, 2006 ; Fellin et al., 2007). L'astrocyte est un médiateur clé de l'homéostasie, de la plasticité et du développement cérébral.

ii Les oligodendrocytes

Les oligodendrocytes représentent environ 20% des cellules cérébrales. Ils constituent un support structurel au réseau neuronal et forment une gaine de myéline autour de l'axone pour permettre une propagation rapide du signal nerveux (Budday et al., 2015). Les premiers progéniteurs des oligodendrocytes (*oligodendrocytes precursor cells*, OPC) proviennent de la ZV et de la ZSV. Ils apparaissent vers la 10ème semaine de gestation et leur production atteint un pic autour de la 15ème semaine (Jakovcevski et al., 2009). Ce sont de petites cellules qui émettent des prolongements cytoplasmiques qui entoureront les axones, formant ainsi la gaine de myéline et les nœuds de Ranvier. Les OPC vont tout d'abord se différencier en pré-oligodendrocytes puis en oligodendrocytes matures. Les pré-oligodendrocytes se développent essentiellement au sein de la sous-plaque, de la zone intermédiaire et du cortex à la fin du second trimestre. Après la 30ème semaine, les oligodendrocytes apparaissent progressivement dans la zone intermédiaire avant de se propager massivement après la 40ème semaine. Les oligodendrocytes vont parcourir une longue distance avant d'atteindre leur destination finale (Bradl et Lassmann, 2010).

Plusieurs facteurs intrinsèques contrôlant une partie ou plusieurs étapes du développement oligodendrocytaire ont été identifiés. Parmi eux, des facteurs de transcription, des protéines de remodelage de la chromatine ou encore des ARN non codant (Tomassy et al., 2016). Les neurones contrôlent aussi le développement des oligodendrocytes en régulant leur prolifération, leur différenciation et leur survie (Figure 8) (Simons et Trajkovic, 2006).

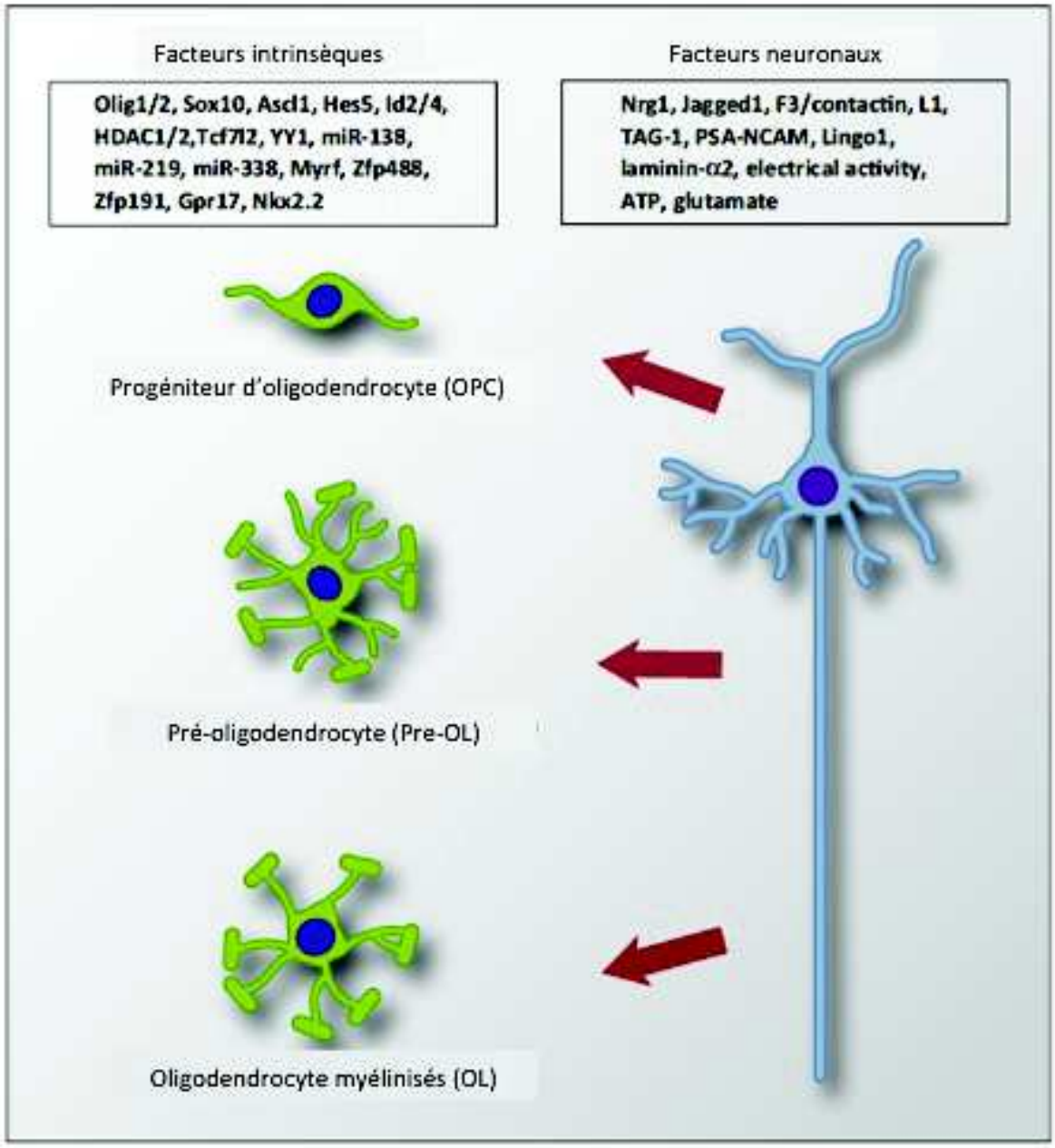


Figure 8 : Le développement oligodendrocytaire sous contrôle de facteurs intrinsèques et neuronaux.

Les oligodendrocytes proviennent d'un pool de progéniteurs (OPC). Après différenciation, les OPC se propagent au travers du SNC et se différencient en pré-oligodendrocytes (Pré-OL). Les Pré-OL produisent alors de grandes quantités de membranes cellulaires qui enveloppent les axones afin de former la gaine de myéline (oligodendrocytes myélinisés, OL). De nombreux facteurs autonomes intrinsèques contrôlant une ou plusiers étapes de ce processus ont été identifiés : facteurs de transcription, protéines remodelant la chromatine, ARN non codant par exemple. Des facteurs neuronaux jouent également un rôle dans le développement oligodendrocytaire et la myélinisation. D'après Tomassy et al., 2016.

iii La microglie

Les cellules microgliales proviennent de progéniteurs myéloïdes issus du mésoderme. Ces cellules de petite taille pénètrent dans le SNC dès la 3ème semaine de gestation à partir des vaisseaux sanguins (Harry, 2013). Elles migrent ensuite le long des cellules de la glie radiaire et le long des vaisseaux pour atteindre la ZV (6ème semaine), la ZM (8ème semaine) puis enfin la sous-plaque (16ème semaine) (Raybaud et al., 2013). La microglie contribue à la prolifération et la différenciation neuronale, au nettoyage des débris cellulaires et au remodelage synaptique (Harry, 2013). Ces cellules permettent de détecter des évènements pathologiques dans le SNC et se comportent comme des cellules cérébrales « immunitaires ». En effet, elles partagent des caractéristiques phénotypiques et des fonctions immunologiques avec les macrophages et les monocytes. La morphologie des cellules microgliales se modifie en fonction du stade de développement. Pendant la période de prolifération cellulaire massive, la microglie joue son rôle de phagocyte pour éliminer les neurones en excès. La cellule prend alors une forme ronde et amiboïde, marquée par un cytoplasme hypertrophié. A un stade de développement ultérieur, lorsque le nettoyage des cellules excédentaires diminue, les cellules microgliales deviennent fortement ramifiées, avec un petit corps cellulaire et des processus longs et fins (Monier et al., 2006). A 35 semaines de gestation, la microglie se présente sous la forme de cellules ramifiées (Esiri et al., 1991). Au final, les cellules microgliales représentent 15 à 20% des cellules cérébrales (Carson et al., 2006).

II.3.5 Synaptogenèse

La formation d'un réseau fonctionnel entre les neurones dépend de la constitution de connexions synaptiques appropriées : la synaptogenèse. Ce processus requiert une progression dirigée de l'axone vers sa cible, la reconnaissance de celle-ci puis la formation et le maintien d'une synapse entre les deux éléments (Figure 9).

Les synapses ont été identifiées au sein de la sous-plaque dès 9-10 semaines de gestation (Bayatti et al., 2008 ; Stiles et Jernigan, 2010), cependant la majorité de la synaptogenèse a lieu au cours du troisième trimestre de gestation et pendant les premières années de vie. Dans un premier temps, une extension neuronale (axone ou dendrite) reconnaît une cible potentielle. Des molécules d'adhérence de la famille des cadhérines

permettent de stabiliser ce contact. Dans un second temps, une étape d'induction puis de différenciation pré et post-synaptique s'opèrent par l'intermédiaire de complexes pré/post synaptiques (Neurexine/neuroligine, éphrine/récepteur de l'éphrine, SynCAM) (Mondin et al., 2013). Les zones pré et post-synaptiques se développent avec :

- formation et accumulation de vésicules synaptiques et de transport ;
- augmentation du nombre des canaux calcium transmembranaires nécessaires à l'exocytose ;
- formation de densités post-synaptiques (PSD pour *PostSynaptic Density*), regroupant des récepteurs de neurotransmetteurs, des canaux, des protéines de transduction du signal et des protéines d'échafaudage comme celles de la famille des MAGUK (*Membrane Associated Guanylate Kinase*).

Après la différenciation des zones pré et post-synaptiques, surviennent des phases de maturation (passage d'un état quiescent à un état actif) et de stabilisation de la synapse. Le nombre de vésicules synaptiques augmente et les PSD s'intensifient (Ethell et Pasquale, 2005).

Les astrocytes et la microglie semblent aussi influencer la synaptogenèse (Reemst et al., 2016). En effet, lors de la première vague de formation synaptique, seules les cellules de la microglie sont présentes. Il semble qu'elles puissent favoriser la synaptogenèse par la sécrétion de facteurs de croissance (Kettenmann et al., 2013) ou par la modulation d'influx calciques et par l'accumulation d'actine au niveau du site de contact (Miyamoto et al., 2016). La microglie joue aussi un rôle majeur dans le phénomène d'élagage synaptique (Bialas et Stevens, 2012). Les astrocytes contrôlent le nombre de synapses et jouent un rôle essentiel pour la fonction et l'efficacité de la synapse (Allen, 2013).

La phase finale de la synaptogenèse est une phase d'élagage synaptique, processus d'élimination des synapses qui débute vers la naissance. Ce phénomène est influencé par des facteurs environnementaux et semble être le reflet de l'apprentissage et de l'adaptation de l'individu (Craik et Bialystok, 2006).

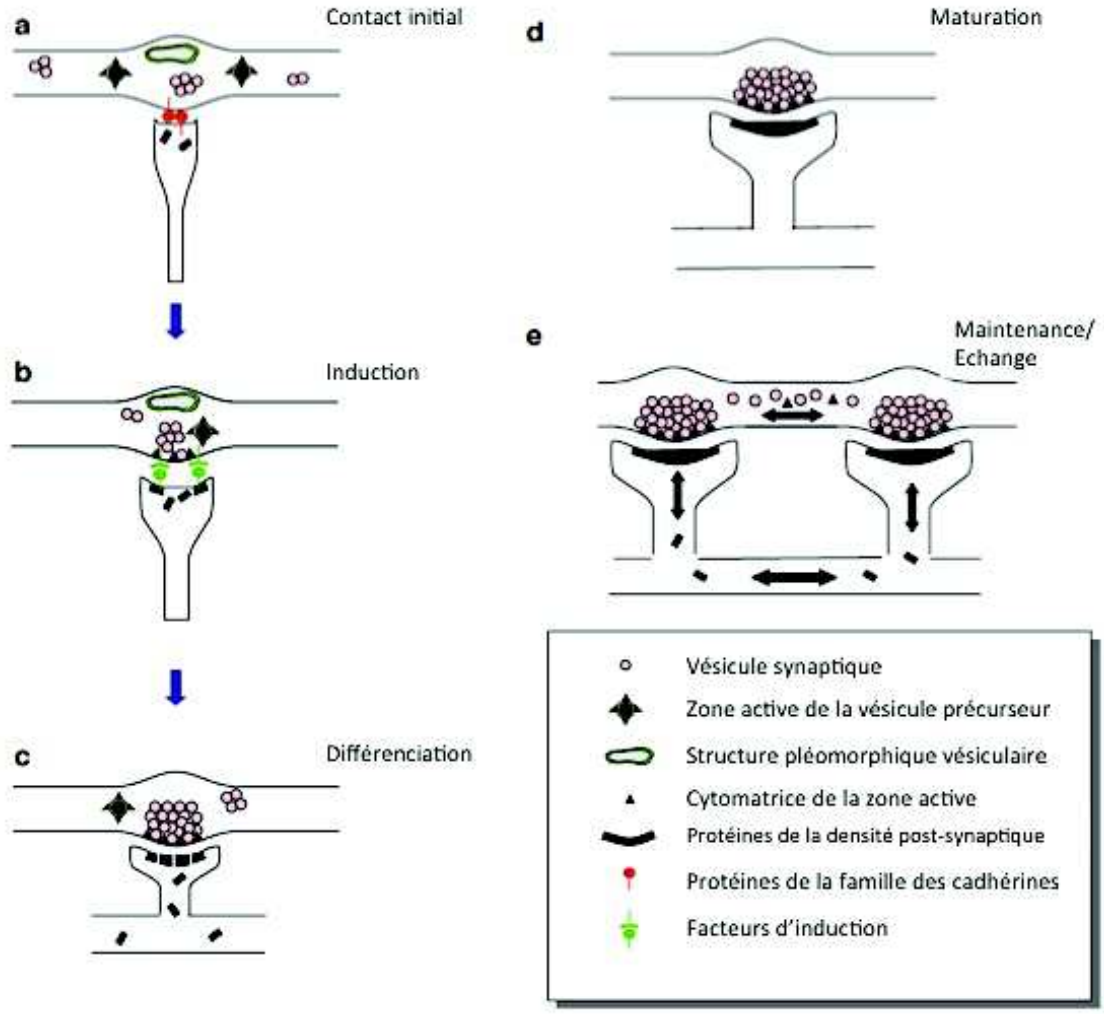


Figure 9 : Les cinq étapes de la synaptogenèse.
La formation synaptique est un procédé complexe impliquant de multiples cascades de signalisation et de molécules. Le contact initial entre les axones et les dendrites semble dépendant de molécules d'adhésion cellulaire (CAM), notamment celles de la famille des cadhérines (a). La présence de facteurs d'induction (SynCAM, Neurexine/neuroligine, éphrine/récepteur de l'éphrine) au niveau des sites de contact entraîne la formation de zones actives pré-synaptiques et de densités post-synaptiques (b). Pendant ce temps, les cadhérines et autres CAM stabilisent avec les facteurs d'induction la jonction synaptique. Après la phase de différenciation, la synapse est fonctionnelle mais elle ne contient pas encore tous les composants, comme les canaux calcium-voltage dépendant ou certaines sous-unités de récepteurs, et les épines dendritiques ne sont pas complètement formées (c). Après la maturation synaptique, la composition finale en composés protéiques de la synapse, sa stabilité optimale et la forme finale de l'arbre dendritique sont atteintes (d). Enfin, le remplacement et l'échange de protéines pré et post-synaptiques permettent une stabilité dans le temps (e). D'après Garner et al., 2006.

II.3.6 Myélinisation

Les cellules gliales responsables de la myélinisation du SNC sont les oligodendrocytes. La myélinisation débute précocement, au cours d'une fenêtre étroite estimée à 12-18 heures une fois l'oligodendrocyte différencié (Barres, 2008). Une partie de la myélinisation chez

l'Homme n'aura lieu qu'après la naissance à partir d'une dernière vague d'OPC issus du cortex « postnatal » (Kessaris et al., 2006). Chaque oligodendrocyte va émettre plusieurs prolongements qui vont s'enrouler autour des axones adjacents, constituant ainsi des couches superposées de membrane cytoplasmique. Ce mécanisme permet de créer une véritable spirale membranaire autour d'un segment d'axone, constituant la gaine de myéline. Les nœuds de Ranvier sont des espaces non myélinisés entre deux segments axonaux adjacents myélinisés, zones d'insertion des prolongements astrocytaires. Les oligodendrocytes peuvent recouvrir des axones dont le diamètre est supérieur à 0,2 µm. Chaque oligodendrocyte va produire entre 5 et 50000 μm^2 de myéline par jour (Pfeiffer et al., 1993). La myélinisation dépend de facteurs neuronaux et oligodendrocytaires (Figure 8), mais aussi de l'activité électrique neuronale : l'augmentation du flux électrique augmente la myélinisation (Simons et Trajkovic, 2006).

II.3.7 Mort cellulaire physiologique des neurones en développement

Une quantité importante de neurones est produite durant le développement cérébral, et beaucoup d'entre eux seront supprimés. Ce processus de mort cellulaire physiologique, qui ne perturbe pas le développement des cellules neuronales restantes, est appelé la mort cellulaire programmée. Des travaux pionniers (Hamburger et Levi-Montalcini, 1949 ; Glucksmann, 1951) ont permis de mettre en évidence que les précurseurs neuronaux étaient produits en excès et qu'ils étaient soumis à une sélection ultérieure dépendant de facteurs intra et extra cellulaires. Dans certaines régions cérébrales, plus de la moitié des neurones va disparaître au cours du développement normal. Il existe une vague précoce de mort cellulaire programmée correspondant au pic de neurogenèse, et une vague tardive concernant les neurones en migration ou en cours de connexion pendant la période post-natale précoce. Cette deuxième vague est considérée comme la plus classique (Lockshin et Zakeri, 2001). Ces deux vagues de mort cellulaire programmée permettent de réguler le pool de précurseurs neuronaux et d'assurer le bon « câblage » des circuits de neurones en développement (Blomgren et al., 2007).

III Glutamate et neurodéveloppement

Le glutamate est le principal neurotransmetteur excitateur du système nerveux central chez les mammifères (Meldrum, 2000). Des études de spectrométrie de résonnance magnétique nucléaire ont mis en évidence des concentrations élevées de glutamate dans le cerveau humain (10 à 12 mM) (Schubert et al., 2004), allant de 1 µM dans le liquide céphalo-rachidien jusqu'à 100mM dans les vésicules synaptiques (Nedergaard et al., 2002).

Le glutamate et son précurseur la glutamine sont les métabolites principaux du cycle glutamine-glutamate/GABA (acide gamma-aminobutyrique). La glutamine est transférée des astrocytes aux neurones puis convertie en glutamate via la glutaminase, enzyme mitochondriale. Dans les neurones glutamatergiques, le glutamate néoformé est libéré dans la fente synaptique. Une partie du glutamate est réabsorbée par les astrocytes et recyclée en glutamine par la glutamine synthétase. Dans les neurones GABAerqiques, le glutamate est transformé en GABA par la glutamate décarboxylase avant d'être libéré dans la fente synaptique. (Walls et al., 2015). Le glutamate peut également être transformé par la glutamate déshydrogénase en alpha-cétoglutarate qui participe au cycle de Krebs (Figure 10) (Nedergaard et al., 2002).

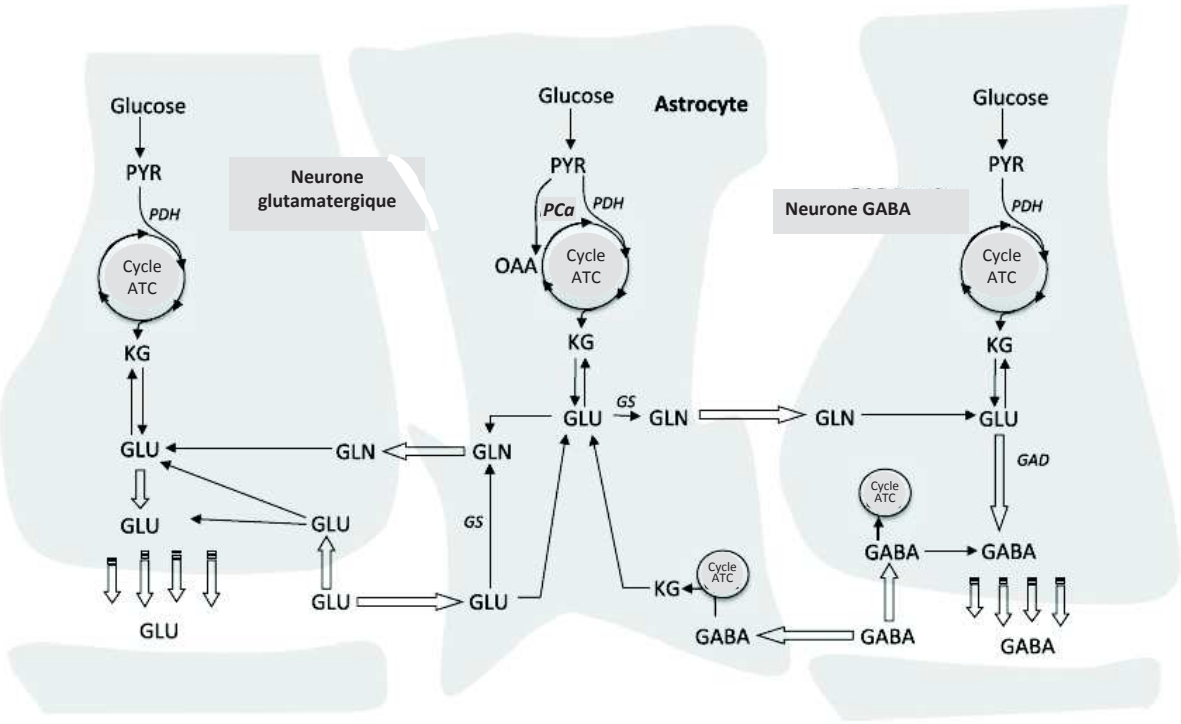


Figure 10 : Libération et absorption synaptique des neurotransmetteurs.
Le cycle glutamate/glutamine entre les neurones glutamatergiques permet la production de glutamate (GLU) qui sera libéré dans la synapse. La carboxylation du pyruvate (PYR) en oxaloacétate (OAA) par la pyruvate carboxylase (PCa) dans le compartiment astrocytaire permet également la production de glutamate au niveau astrocytaire. Le GLU peut être transformé en GLN par la glutamine synthétase (GS). GAD : glutamate décarboxylase, KG : alpha cétoglutarate, PDH : pyruvate déshydrogénase. D'après Walls et al., 2015.

La transmission glutamatergique implique donc trois compartiments : la cellule gliale, le neurone et la fente synaptique (Figure 11). Une fois libéré dans la fente synaptique, le glutamate agit sur des récepteurs spécifiques en position pré ou post-synaptique : les récepteurs métabotropiques (mGluR) et les récepteurs ionotropiques ou récepteurs-canaux (iGluR). (Gielen, 2010).

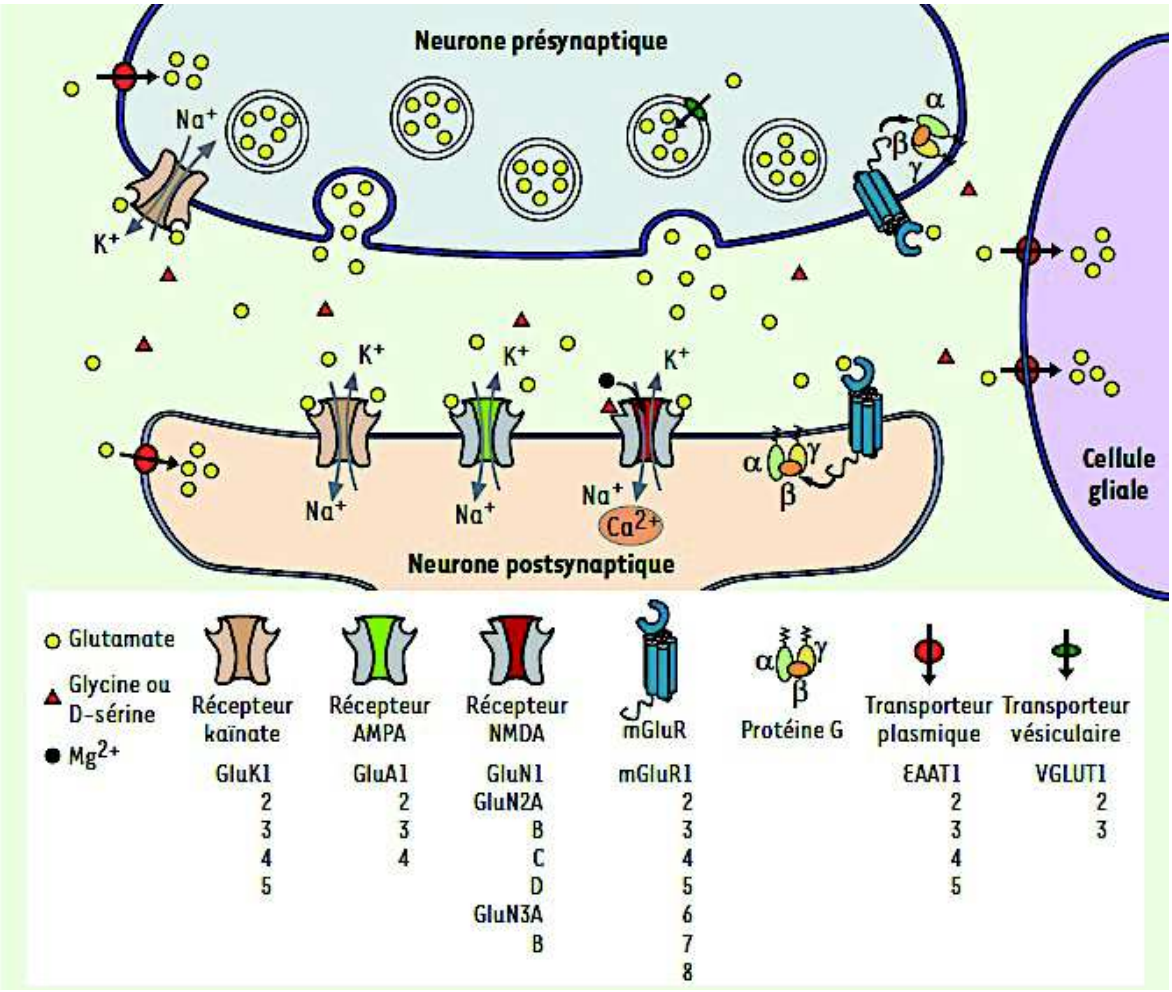


Figure 11 : La synapse glutamatergique.
Trois classes d'iGluR ont été définies en fonction de leurs propriétés pharmacologiques : les récepteurs AMPA, kaïnate et NMDA. Les récepteurs AMPA et NMDA semblent être les principaux récepteurs post-synaptiques. Les récepteurs kaïnate seraient plus souvent localisés en position pré ou extra-synaptique, et joueraient un rôle de modulateurs de la transmission synaptique assez similaire à celui des mGluR. Enfin, le glutamate extracellulaire est maintenu à des concentrations nanomolaires par des transporteurs plasmiques (les transporteurs d'acides aminés excitateurs, EAAT (*Excitatory Amino Acid Transporter)*, distincts des transporteurs accumulant le glutamate dans les vésicules d'exocytose, les transporteurs VGLUT (*Vesicular Glutamate Transporter*)). D'après Gielen 2010.

Outre son action de neurotransmission excitatrice, le glutamate intervient au cours des étapes clés de la neurogenèse (prolifération, migration, différenciation et synaptogenèse) par l'intermédiaire de ses récepteurs dont l'expression, la fonction et la répartition varient au cours du développement (Luján et al., 2005 ; Jansson et Åkerman, 2014).

III.1 *Les récepteurs métabotropiques*

Les récepteurs métabotropiques contiennent une partie N-terminale extracellulaire, sept domaines transmembranaires et une partie C-terminale intracellulaire couplée à une protéine G (Figure12).

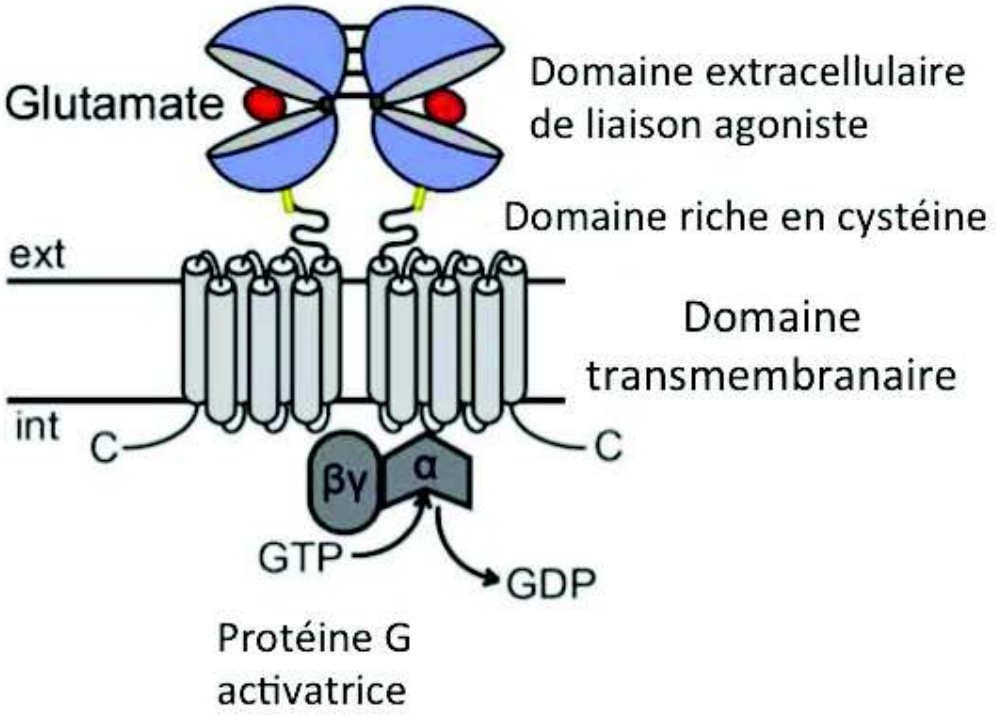


Figure 12 : Représentation schématique d'un récepteur métabotropique au glutamate.
Chaque monomère possède un large domaine extracellulaire de type LIVBP (*leucine/isoleucine/valine-binding protein*), qui lie le glutamate, un domaine contenant 17 cystéines conservées, un domaine comprenant les sept segments transmembranaires et une queue C-terminale variable. D'après Grégory et al., 2013.

Les mGluR répondent à une exposition prolongée au glutamate (Attwell et Gibb, 2005). Une fois activés, ils sont responsables de modulations lentes des réponses synaptiques, d'une régulation des canaux calciques et potassiques et des régulations des réponses induites par l'activation des iGluR (Conn et Pin, 1997).

La famille des récepteurs métabotropiques comprend huit sous-types, classés en trois groupes selon leurs homologies de séquence, leurs propriétés pharmacologiques et leurs couplages à des seconds messagers (Figure 13).

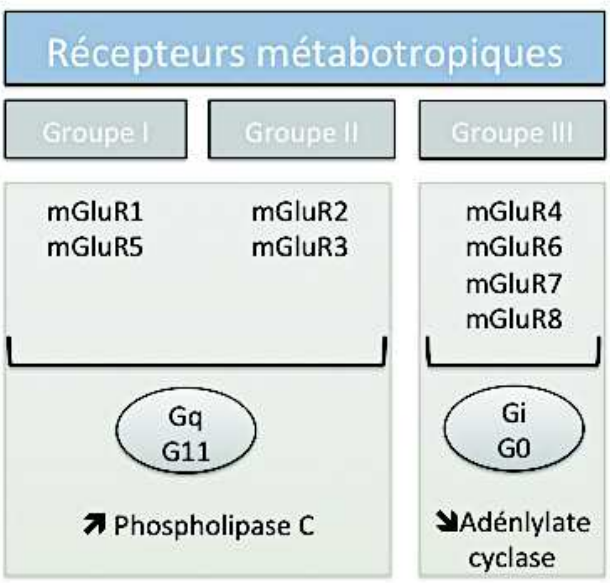


Figure 13 : Classification des récepteurs métabotropiques au glutamate.
Trois groupes de récepteurs métabotropiques ont été identifiés. Les groupes I et II activent la phospholipase C *via* l'action de protéines G_q et G_{11}. Le groupe III diminue l'activité de l'adénylate cyclase via les protéines G_i et G_0. D'après Chandrasekar, 2013.

Les récepteurs du groupe I (mGluR1 et mGluR5) sont couplés préférentiellement à la famille $G_{q/11}$ des protéines G, et activent la phospholipase C_β. Cette enzyme permet l'hydrolyse du phosphatidylinositol en diacylglycérol (DAG) et inositol 1-4-5-triphosphate (IP3). Le DAG néoformé pourra activer des protéines kinases C (PKC) et permettre la mobilisation du calcium intracellulaire. Les récepteurs du groupe I sont retrouvés principalement en position post-synaptique. Leur activation entraîne une dépolarisation cellulaire et augmente l'excitabilité neuronale en modulant des canaux ioniques membranaires (Gregory et al., 2013).

Les récepteurs du groupe II (mGluR2 et mGluR3) et du groupe III (mGluR4, mGluR6, mGluR7 et mGluR8) sont couplés majoritairement aux protéines $G_{i/o}$ et entraînent l'inhibition de l'adénylcyclase (AC) et la diminution de la production d'adénosine monophosphate

cyclique (AMPc) (Niswender et Conn, 2010). Ils sont principalement localisés au niveau des terminaisons pré-synaptiques (mais ils sont parfois positionnés en post-synaptique) et leur activation inhibe la libération de neurotransmetteurs (glutamate ou GABA selon le type de neurone) (Figure 14) (Gu et al., 2012 ; Gregory et al., 2013).

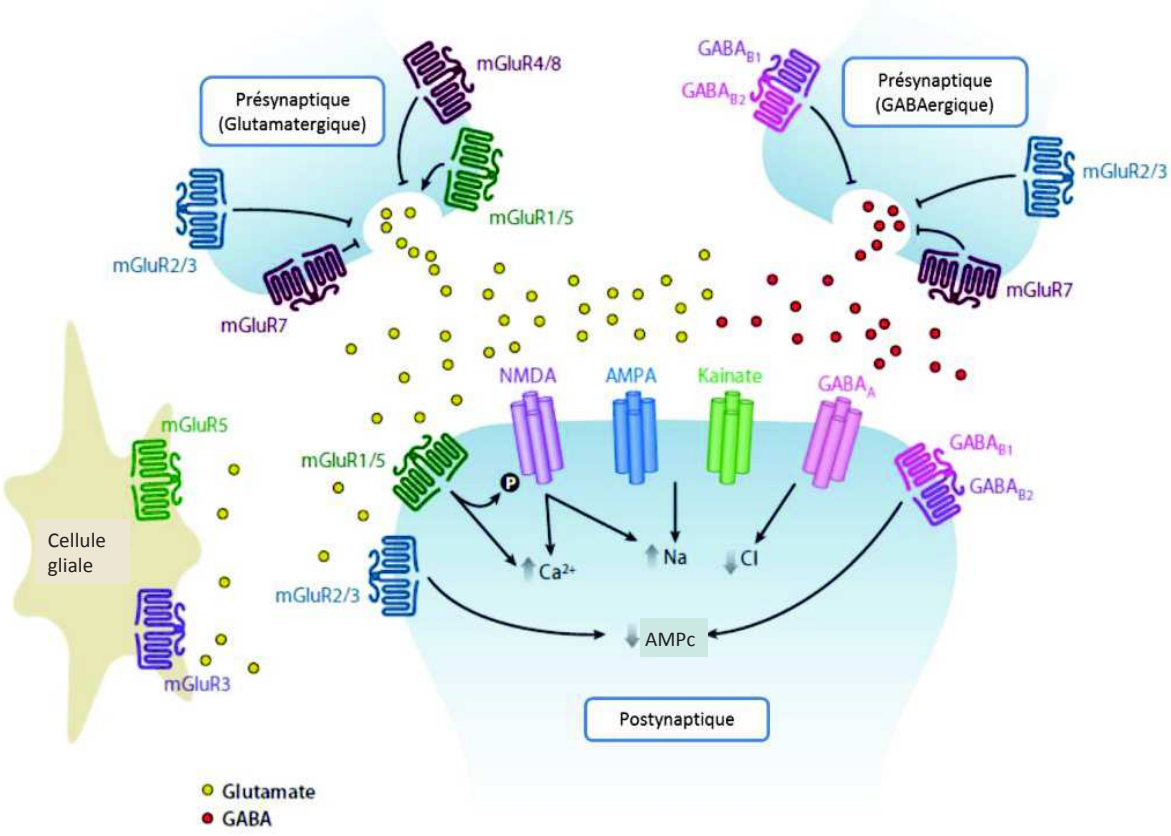


Figure 14 : Les récepteurs métabotropiques au glutamate au sein de la synapse.
Les mGluR du groupe I (vert), sont généralement localisés au niveau post-synaptique, et ceux du groupe II (bleu) et III (rouge) au niveau pré-synaptique, bien qu'il existe quelques exceptions. Au niveau pré-synaptique, les mGluR2, 3, 4 et 8 se trouvent généralement en position extrasynaptique et le mGluR7 est situé dans la zone active. Les mGluR des groupes II et III inhibent la libération de glutamate (cercles jaunes) ou de GABA (cercles rouges), tandis que ceux du groupe I favorisent sa libération. La cellule gliale au sein de laquelle sont exprimés les mGluR3 et 5 est un site clé pour la régulation de l'activité synaptique, bien que les voies de signalisation et les conséquences de l'activation de ces récepteurs sur ces cellules ne soient pas actuellement bien connues. D'après Niswender et Conn, 2010.

A l'exception de mGluR6 qui est localisé dans la rétine, les récepteurs métabotropiques sont exprimés de façon ubiquitaire dans l'ensemble du système nerveux central, à la fois au sein des neurones et des cellules gliales. Les sous-types des récepteurs métabotropiques ont néanmoins une localisation régionale spécifique (Ferraguti et Shigemoto, 2006 ; Figure 15).

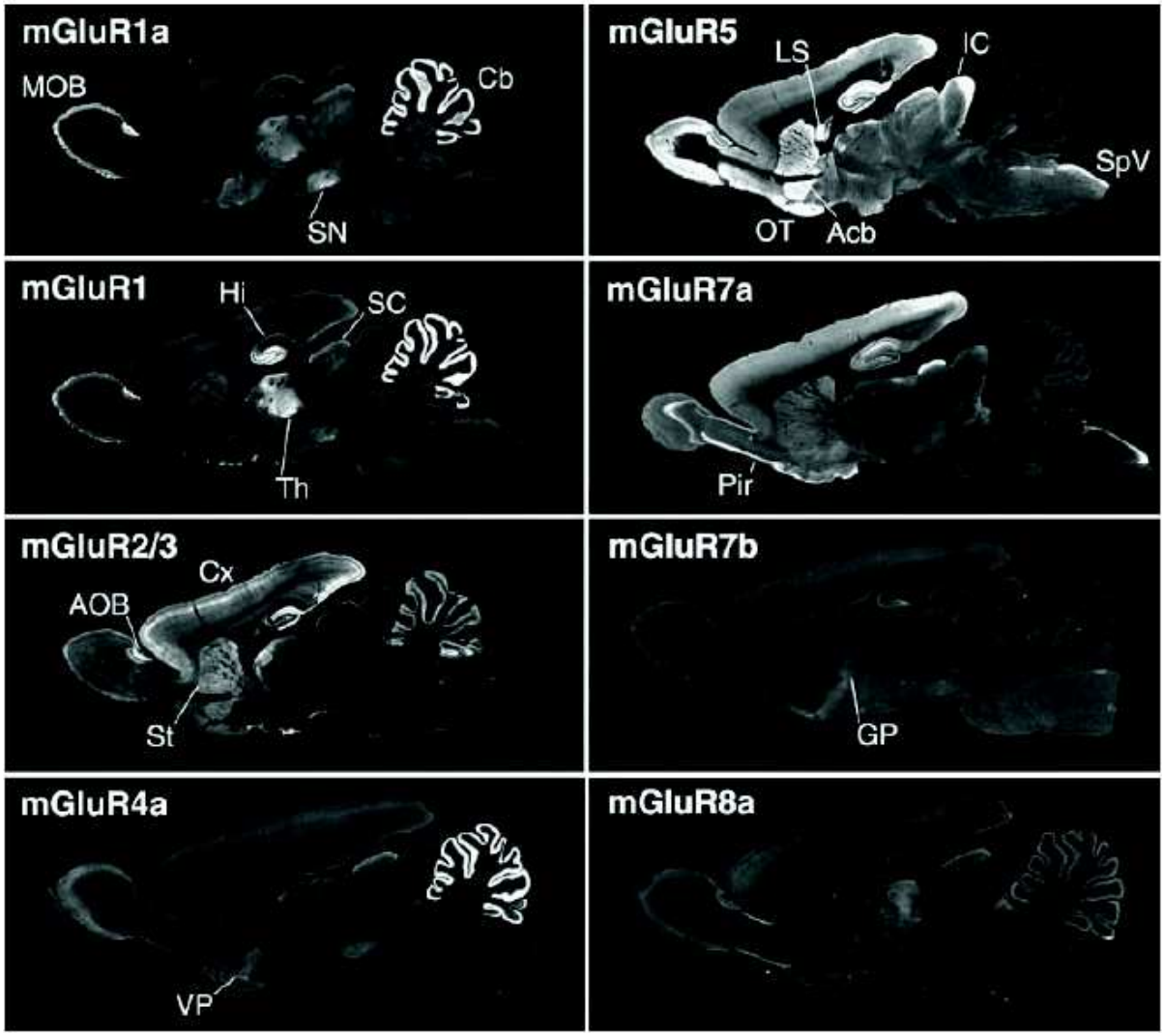


Figure 15 : Distribution spatiale des mGluR chez le Rat adulte.
Expression par hybridation *in situ* des ARNm des différents mGluR au sein du cerveau de rat adulte. Acb : *accumbens nucleus* ; AOB : *accessory olfactory bulb* ; Cb : *cerebellum* ; Cx : *neocortex* ; GP : *globus pallidus* ; Hi : *hippocampus* ; IC : *inferior colliculus* ; LS : *lateral septum* ; MOB : *main olfactory bulb* ; Pir : *piriform cortex* ; OT : *olfactory tubercule* ; SC : *superior colliculus* ; SN : *substantia nigra* ; St : *neostriatum* ; SpV : *spinal vestibular nucleus* ; Th : *thalamus* ; VP : *ventral pallidum*. D'après Ferraguti et Shigemoto, 2006.

III.2 *Les récepteurs ionotropiques*

Chaque iGluR est un tétramère composé de quatre sous-unités arrangées autour d'un unique pore central : le canal ionique. L'activation des iGluR est à l'origine d'un flux ionique à travers la membrane plasmique du neurone, provoquant sa dépolarisation et permettant d'initier un potentiel d'action. Les iGluR adoptent une même architecture : une extrémité carboxy terminale (CTD) intracellulaire impliquée dans le trafic et l'ancrage des récepteurs à la synapse (Sheng et Kim, 2002) ; une partie transmembranaire (TMD) qui forme le canal

ionique et qui présente une homologie de séquence avec certains canaux potassiques (Mayer, 2006) ; une région extracellulaire, formée par un tandem de deux larges domaines bilobés, composée d'un domaine de liaison des agonistes (*Agonist Binding Domain*, ABD), connecté à la partie transmembranaire, puis un domaine amino-terminal (*N-terminal domain*, NTD). Les iGluR se comportent en dimères de dimères (Armstrong et Gouaux, 2000). Les domaines ABD de deux sous-unités adjacentes se dimérisent via une apposition « dos-à-dos » de leur lobe supérieur. La liaison de l'agoniste à chaque domaine ABD va provoquer l'écartement des deux domaines ABD adjacents, entraînant l'ouverture du canal ionique (Figure 16).

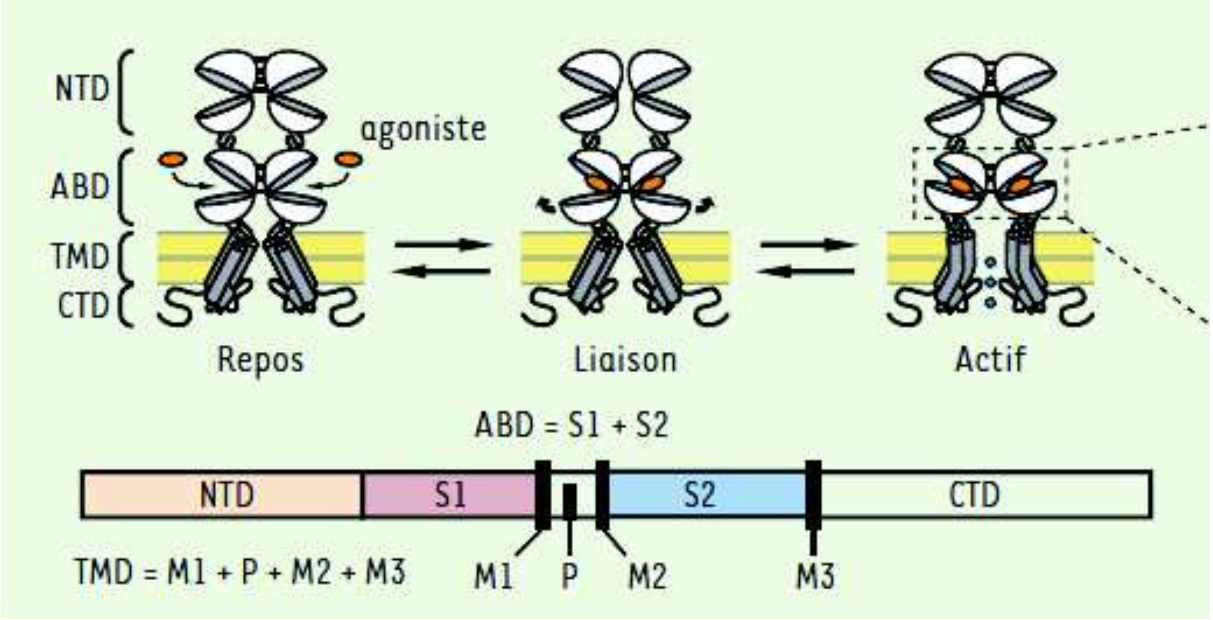


Figure 16 : Organisation modulaire et mécanisme d'activation des sous-unités des récepteurs ionotropiques au glutamate.
La partie transmembranaire sépare la séquence de l'ABD en deux segments (S1 et S2). La liaison de l'agoniste provoque l'écartement de chaque domaine ABD, permettant l'ouverture du pore ionique et l'activation du récepteur. NTD : domaine amino-terminal, ABD : domaine de liaison de l'agoniste, TMD : domaine transmembranaire, CTD : domaine carboxy-terminal. D'après Gielen, 2010.

Les iGluR sont responsables de la transmission synaptique excitatrice rapide. Leur cinétique d'activation est assez élevée afin de permettre une réponse à une libération brève de glutamate à la synapse, comme lors d'une fusion vésiculaire. Trois classes d'iGluR ont été identifiées en fonction de leur affinité sélective pour un ligand : les récepteurs sensibles à l'alpha-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoazole-propionate (R-AMPA), les récepteurs sensibles au kaïnate et les récepteurs sensibles au N-méthyl-D-aspartate (R-NMDA) (Figure 17). Les

récepteurs AMPA et NMDA sont les principaux récepteurs post-synaptiques, alors que les récepteurs kaïnate sont localisés sur les neurones pré et post-synaptiques et leur rôle de modulateur de la transmission serait assez proche de celui des mGluR (Huettner, 2003 ; Lerma, 2003 ; Pinheiro et Mulle, 2006).

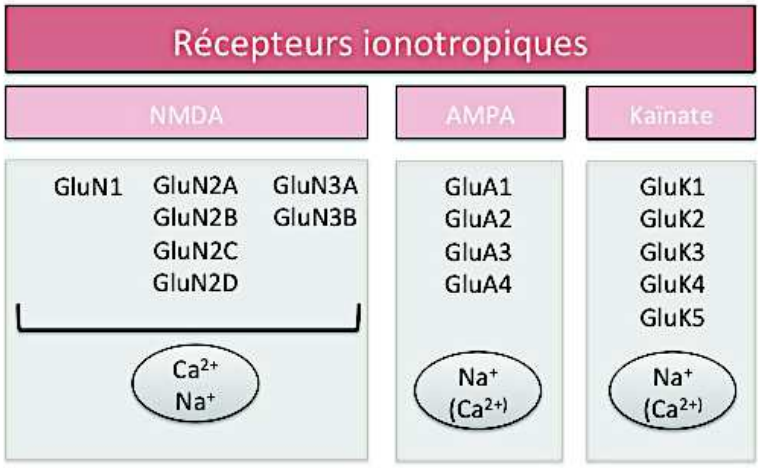


Figure 17 : Classification des récepteurs ionotropiques au glutamate.
On distingue les récepteurs NMDA, AMPA et kaïnate. Leur activation modifie les flux ioniques membranaires, notamment pour le calcium et le sodium. D'après Chandrasekar, 2013.

III.2.1 Les récepteurs AMPA

Les récepteurs AMPA, exprimés sur l'ensemble du cerveau, sont principalement responsables de la transmission synaptique rapide (Attwell et Gibb, 2005 ; Traynelis et al., 2010), mais aussi de la plasticité synaptique du système nerveux central (Hadzic et al., 2017). Après liaison au glutamate, l'ouverture du pore permet un afflux d'ions sodium, associé à un efflux d'ion potassium. En fonction de sa composition en sous-unités, il peut aussi jouer sur les échanges calciques. Les récepteurs AMPA sont des homo- ou des hétéromères, composés de quatre sous-unités parmi les sous unités GluA1, GluA2, GluA3 ou GluA4 (anciennement dénommées GluR1, GluR2, GluR3 ou GluR4), codées respectivement par les gènes Gria 1, Gria 2, Gria 3 et Gria 4. Chaque gène des sous-unités du R-AMPA donne naissance à plusieurs isoformes par épissage alternatif et, pour GluA2, par édition de l'ARN. Ces modifications post-transcriptionnelles augmentent considérablement la diversité fonctionnelle des R-AMPA. Par exemple, un épissage alternatif en C-terminal modifie la taille de cette région. Il a en effet été mis en évidence une longue queue C-terminale pour les sous-unités GluA1, un

variant d'épissage $GluA2_{long}$, et GluA4 ainsi qu'une queue C-terminale courte pour GluA2 et GluA3 (Gallo et al., 1992 ; Köhler et al., 1994). Cette variabilité de la taille des régions C-terminales a un impact sur la fonction du récepteur : les sous-unités possédant les queues C-terminales les plus longues présentent à leur extrémité des séquences de liaison à certaines protéines PDZ (*Post synaptic density protein, Drosophila disc large tumor suppressor, and Zonula occludens-1 protein*) et jouent donc un rôle majeur dans l'ancrage des récepteurs à la densité post-synaptique. L'épissage est donc un élément clé du trafic synaptique des R-AMPA (Bredt et Nicoll, 2003). Un autre exemple est celui de l'édition d'une glutamine (charge neutre) de l'ARN de la sous-unité GluA2 en arginine (charge positive). Cette modification de la sous-unité est stratégique car l'arginine chargée positivement constitue une véritable barrière électrostatique aux ions calcium et rend les récepteurs comprenant GluA2 imperméables au calcium (Hume et al., 1991 ; Burnashev et al., 1992). Par ces mécanismes, les R-AMPA contenant GluA2 limitent les influx calciques et peuvent jouer un rôle protecteur vis à vis de l'excitotoxicité (Talos et al., 2006 ; Isaac et al., 2007 ; Liu et Zukin, 2007). Ainsi, lors de la fenêtre de vulnérabilité aux lésions de la substance blanche qu'est la prématurité (24-36 SA), les R-AMPA ne contenant pas GluA2 sont fortement exprimés dans la glie radiaire, les oligodendrocytes et les neurones de la sous-plaque. A l'inverse, pendant les périodes proches du terme (38-42 SA) marquées par la susceptibilité aux lésions corticales et aux crises convulsives, les R-AMPA ne contenant pas GluA2 sont exprimés préférentiellement dans les neurones corticaux pyramidaux ou non pyramidaux (Talos et al., 2006 ; Figure 18).

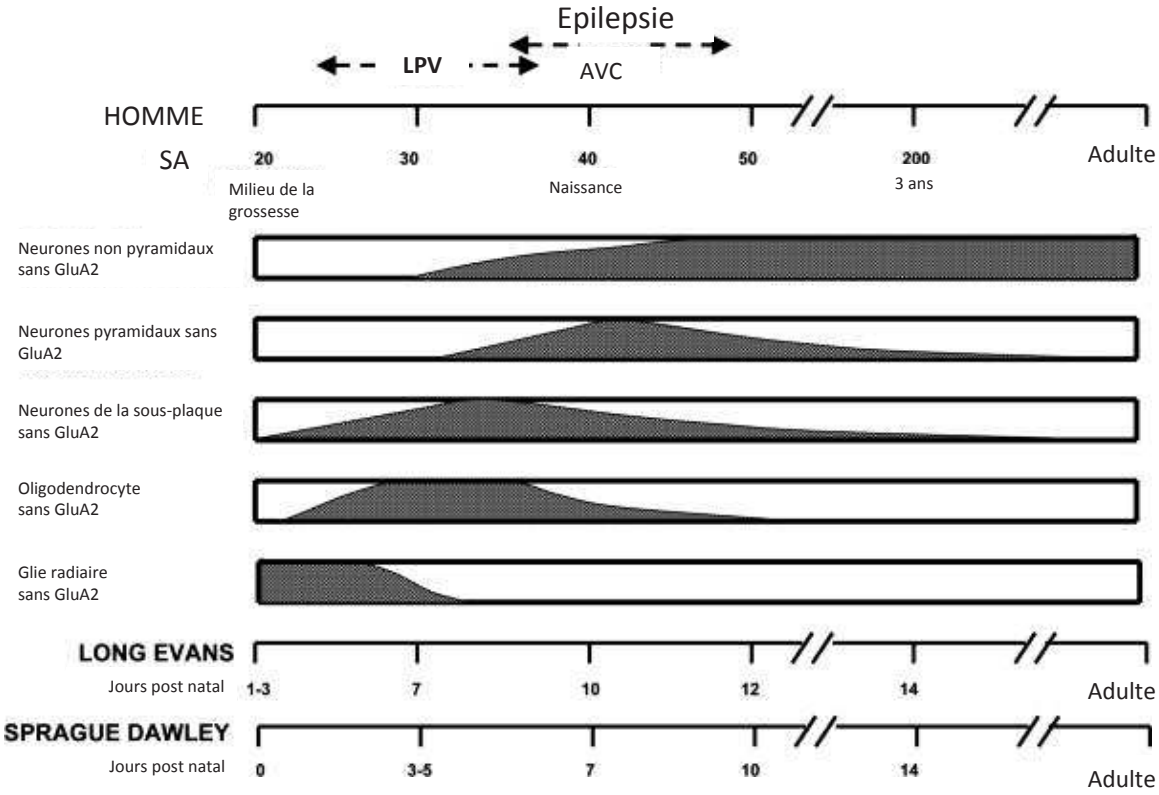


Figure 18 : Expression du récepteur AMPA sans sous-unité GluA2 chez l'Homme et le Rat.
Chez l'Homme, vers 20-24 SA, la glie radiaire exprime fortement des récepteurs AMPA sans sous-unité GluA2, alors qu'entre 25 et 37 SA, ces récepteurs sont exprimés transitoirement au niveau des oligodendrocytes prémyélinisés et des neurones de la sous-plaque. A partir de 38 SA, les récepteurs AMPA sans GluA2 sont exprimés spécifiquement au niveau des neurones corticaux, et durant l'enfance ces récepteurs ne sont retrouvés que sur les neurones non-pyramidaux. Il existe une similarité d'expression des récepteurs AMPA sans GluA2 chez le Rat. Les périodes de susceptibilité accrue aux épisodes d'hypoxie et d'ischémie semblent corrélées avec un déficit en sous-unité GluA2. AVC : accident vasculaire cérébral. LPV : leucomalacie périventriculaire. D'après Talos, 2006.

Il existe également des modifications post-traductionnelles (phosphorylation, glycosylation, palmitoylation, ubiquitination…) qui sont indispensables à la régulation de l'activité du récepteur, son transport à la membrane, sa stabilisation et son activation (Anggono et Huganir, 2012).

Les sous-unités sont exprimées et régulées différemment selon le stade de développement (Figure 19). L'expression des sous-unités GluA1, GluA2 et GluA3 augmente au cours du développement et persiste à l'âge adulte, alors que la sous-unité GluA4 est fortement exprimée pendant le développement précoce, puis son expression diminue et devient quasi-inexistante à l'âge adulte (Zhu et al., 2000 ; Lohmann et Kessels, 2014). Au stade mature, il existe majoritairement au sein des synapses excitatrices de l'hippocampe et

du cortex des hétéromères GluA1/GluA2, GluA2/GluA3 et, en quantité moindre, des homomères GluA1 (Henley et Wilkinson, 2016).

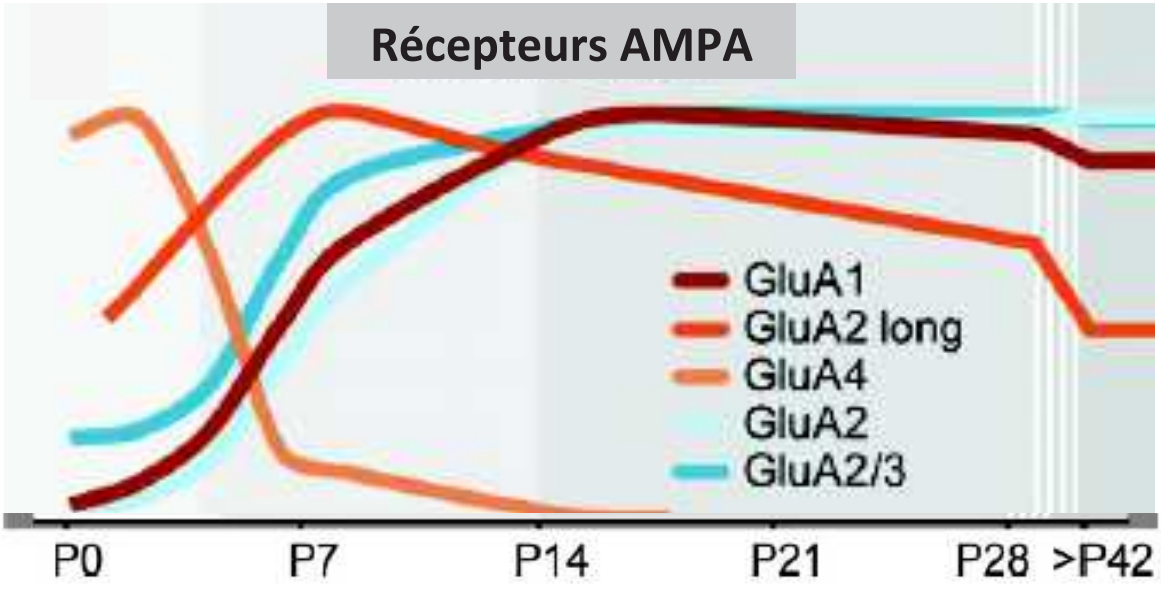


Figure 19 : Evolution au cours du temps de l'expression des sous-unités du récepteur AMPA chez le rongeur.
La sous-unité GluA4 est majoritairement exprimée à la naissance, puis son expression diminue progressivement pour devenir quasi-nulle à partir de P7. La sous-unité $GluA2_{long}$ est moyennement exprimée à la naissance. Son expression augmente progressivement jusqu'à un pic à P7. Une diminution est ensuite observée afin d'atteindre progressivement le taux de naissance à P42. Enfin, les sous-unités GluA3, GluA2/3 et GluA1 sont faiblement exprimées à P0. Leur taux d'expression augmente jusqu'à atteindre un plateau vers P14. D'après Lohman et Kessels, 2014.

Les R-AMPA peuvent être extra-synaptiques ou pré-synaptiques mais ils sont majoritairement en position post-synaptique. Une de leurs caractéristiques est leur mobilité tout au long de la surface membranaire entre les zones synaptiques et extra-synaptiques. Ils sont aussi mobiles au sein même de la cellule pour accéder à la surface ou pour s'en éloigner (Chater et Goda, 2014). L'adressage du R-AMPA du réticulum endoplasmique à la synapse est sous le contrôle de protéines auxiliaires comme celles de la famille TARP (*Transmembrane AMPA receptor Regulatory Proteins*), à laquelle appartient la stargazine, et la stabilisation des récepteurs à la membrane dépend de PSD95 (*Postsynaptic density* 95) (Straub et Tomita, 2012 ; Figure 20).

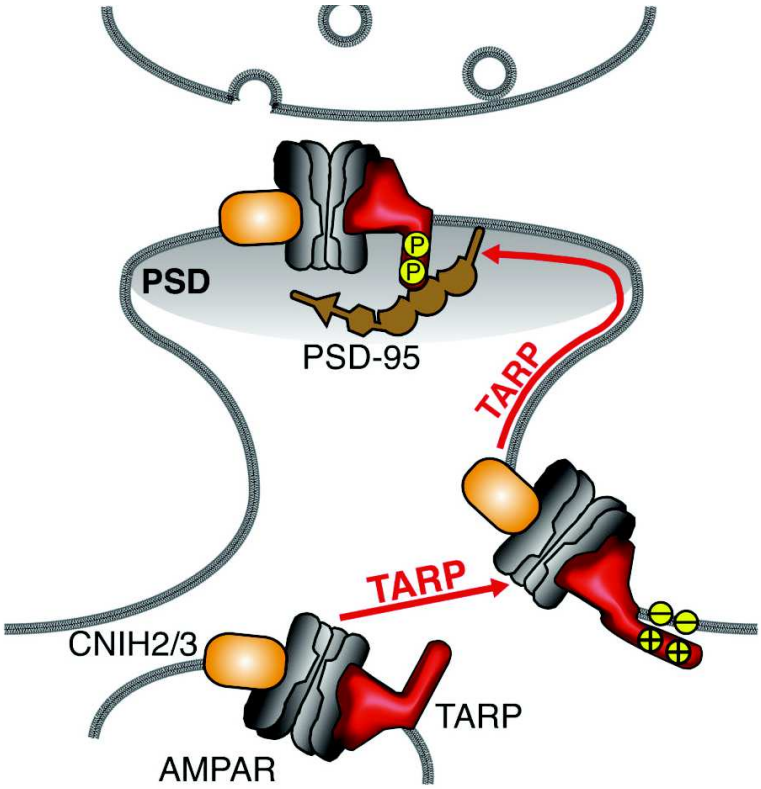


Figure 20 : Trafic du récepteur AMPA.
Le récepteur AMPA s'associe à des protéines auxiliaires comme CNIH (protéine « cornichon ») et TARP dans l'hippocampe. TARP module à la fois l'expression des récepteurs AMPA à la surface ainsi que la localisation synaptique. Le complexe récepteur AMPA/protéines auxiliaires est stabilisé par des densités post-synaptiques. D'après Straub et Comita, 2012.

III.2.2 Les récepteurs kaïnate

Le kaïnate est issu de l'algue marine *Digenia simplex*, dénommée en japonais « kaininsoo ». Les récepteurs kaïnate sont ubiquitaires dans le système nerveux central (Bahn et al., 1994) et participent à de nombreuses actions, notamment le contrôle de l'activité des circuits neuronaux et le développement synaptique (Lerma, 2006 ; Lerma et Marques, 2013). Contrairement aux autres iGluR, ils sont peu impliqués dans la neurotransmission excitatrice (Copits et Swanson, 2012 ; Sihra et al., 2014).

Les récepteurs kaïnate sont des tétramères formés d'une combinaison des sous-unités GluK1, Gluk2, GluK3, GluK4 et GluK5 (anciennement dénommées GluR5, GluR6, GluR7, KA1, et KA2). Les trois premières sous-unités présentent une « faible affinité » à l'acide kaïnique, en comparaison aux sous-unités GluK4 et 5 qui sont, elles, hautement affines pour le ligand (Swanson et Sakai, 2009). Les sous-unités à faible affinité peuvent

s'assembler entre elles en homo- ou hétéromères pour donner naissance à des récepteurs fonctionnels (Cui et Mayer, 1999 ; Paternain et al., 2000). En revanche GluK4 et GluK5 doivent s'assembler obligatoirement en hétéromères avec GluK1, GluK2 ou GluK3.

Le récepteur kaïnate présente une structure distincte des autres iGluR : un domaine N-terminal extracellulaire étendu, suivi d'un simple domaine transmembranaire (M1), une boucle membranaire réentrante P (M2), un autre domaine transmembranaire (M3), une boucle extracellulaire et un dernier domaine transmembranaire (M4) précédent le domaine carboxy terminal (Contractor et al., 2011). Le domaine de liaison au ligand (LBD pour *Ligand Binding Domain*) est formé par le pré-domaine M1 (appelé S1) et la boucle entre M3 et M4 (appelée S2) (Figure 21) (Stern-Bach et al., 1994).

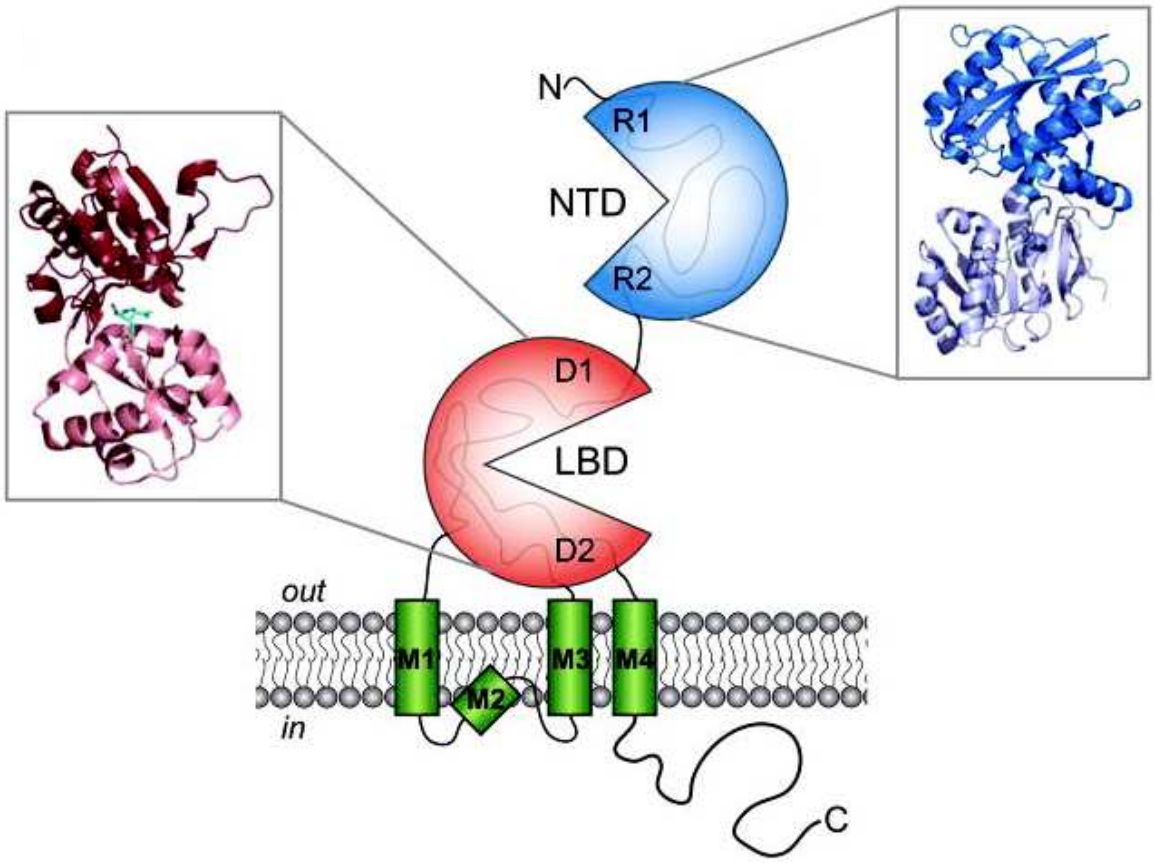


Figure 21 : Représentation schématique du récepteur kaïnate.
Visualisation des trois domaines transmembranaires (M1, M3 et M4) et de la boucle ré-entrante M2, de l'extrémité N terminale et de la boucle C-terminale intracellulaire. D1 et D2 sont les lobes contenant le domaine de liaison du ligand (LBD). R1 et R2 sont les lobes du domaine N-terminal (NTD). Les domaines NTD et LBD sont illustrés en cristallographie. D'après Contractor et al., 2011.

Les sous-unités GluK1 sont principalement présentes dans l'hippocampe, au sein des interneurones corticaux, des cellules de Purkinje et des neurones sensitifs. Son expression augmente au cours du développement, avec un pic au cours de la première semaine de vie chez le rongeur (Lerma et Marques, 2013). L'expression de GluK2 est prédominante dans les cellules pyramidales de l'hippocampe, les cellules granulaires cérébelleuses et hippocampiques et les cellules pyramidales corticales (Paternain et al., 2003). GluK3 est peu exprimé, essentiellement au niveau de la couche IV du néocortex et du gyrus denté (Wisden et Seeburg, 1993). GluK4 est présent dans les neurones pyramidaux de l'aire CA3 de l'hippocampe, au sein du gyrus denté et des cellules de Purkinje. Enfin GluK5 est abondamment exprimé sur l'ensemble du cerveau (Bahn et al., 1994 ; Lerma et Marques, 2013).

Comme pour les R-AMPA, les propriétés des récepteurs kaïnate sont déterminées par l'épissage alternatif et l'édition de leur ARN. L'extrémité C-terminale des sous-unités GluK1, GluK2 et GluK3 subit un épissage alternatif similaire à celui des sous-unités du R-AMPA (Bettler et Mulle, 1995 ; Schiffer et al., 1997). L'extrémité C-terminale ainsi modifiée, en interaction avec des protéines intracellulaires, permettrait l'adressage des récepteurs à partir du réticulum endoplasmique et son ancrage à la membrane (Hadzic et al., 2017). Par ailleurs, une édition de l'ARN des GluK1 et GluK2 a été identifiée au niveau du site Q/R (segment M2 du canal), permettant un contrôle du degré de perméabilité au calcium (Burnashev et al., 1995). Les récepteurs peuvent également subir des modifications post-traductionnelles comme une phosphorylation par la protéine kinase A qui va potentialiser leur activité, ou une déphosphorylation par la calcineurine qui va l'inhiber (Traynelis et Wahl, 1997).

La localisation des récepteurs au sein de la synapse et leur fonction dépend de leur composition en sous-unités et des modifications post-transcriptionnelles et post-traductionnelles. En position pré-synaptique, les récepteurs kaïnate ont un rôle modulateur de l'activité synaptique, en régulant la libération des neurotransmetteurs (GABA et glutamate). Leur activation induit une entrée de calcium par l'intermédiaire de canaux calciques activés par le potentiel d'action, et ainsi favorise la libération de glutamate (Frerking et al., 2001 ; Huettner, 2003). A l'inverse, il peut inhiber la libération vésiculaire en

position présynaptique lorsque le récepteur se comporte comme un récepteur métabotropique en activant une protéine G (Rozas et al., 2003). La contribution du récepteur kaïnate au courant post-synaptique excitateur est bien plus faible que celle des R-AMPA. En position post-synaptique le récepteur kaïnate a plutôt un rôle de médiateur de la transmission du signal. Par exemple, en cas de présence de la sous-unité GluK2, il peut augmenter l'excitabilité de la membrane post-synaptique (Ruiz et al., 2005 ; Rodríguez-Moreno et Sihra, 2007). Ces fonctions semblent participer au processus de plasticité cérébrale à court et à long terme (Lerma, 2006 ; Rodríguez-Moreno et Sihra, 2007 ; Sihra et Rodríguez-Moreno, 2011 ; Sihra et al., 2014).

Comme les autres iGluR, les récepteurs kaïnate interagissent avec des protéines auxiliaires qui jouent un rôle essentiel dans l'adressage du récepteur à la membrane et à sa stabilisation au sein de la synapse. Ces protéines interfèrent avec le récepteur kaïnate majoritairement par l'extrémité C-terminale des sous-unités. Des protéines d'échafaudage comme PSD95 ou d'autres protéines de la famille des MAGUK (*membrane-associated guanylate kinase*), les protéines GRIP (*glutamate receptor-interacting protein*) ou PICK1 (*protein interacting with C kinase*) jouent une action directe ou indirecte sur le récepteur afin de réguler le signal (Copits et Swanson, 2012). Deux protéines auxiliaires aux récepteurs kaïnate ont été récemment identifiées : Neto 1 et Neto 2 (*NEuropilin TOlloide-like* 1 et 2) (Zhang et al., 2009 ; Straub et al., 2011). Si leurs fonctions ne sont pas encore complètement établies, il semble que ces protéines agissent comme de véritables modulateurs allostériques de la fonction des récepteurs kaïnate (Copits et Swanson, 2012 ; Fisher et Mott, 2013 ; Griffith et Swanson, 2015 ; Palacios-Filardo et al., 2016).

III.2.3 Les récepteurs NMDA

Depuis qu'il a été découvert dans les années 1970, le récepteur NMDA (R-NMDA) fait l'objet d'intenses travaux de recherche, compte tenu de son rôle central dans le fonctionnement du SNC. Les R-NMDA sont présents sur les neurones et leurs précurseurs (Traynelis et al., 2010), mais aussi sur les cellules gliales, en particulier sur les astrocytes et les oligodendrocytes (Parpura et Verkhratsky, 2013). Ce récepteur présente une structure et une composition spécifiques qui lui confèrent des propriétés biophysiques et pharmacologiques uniques. Il est impliqué dans de nombreux processus physiologiques et

physiopathologiques au cours du développement et à l'âge adulte. Il est à la base des phénomènes de plasticité synaptique les plus répandus : la potentialisation à long terme (LTP) et la dépression à long terme (LTD) qui représentent les mécanismes cellulaires de la mémoire et de l'apprentissage. Le récepteur NMDA intervient aussi dans le phénomène d'excitotoxicité, responsable de la mort neuronale. La famille des récepteurs NMDA comprend trois différentes sous-unités dénommées GluN1, GluN2 et GluN3 (anciennement NR1, NR2 et NR3). Les modifications post-transcriptionnelles de l'ARN de GluN1 peuvent donner naissance à 8 variants d'épissage différents (Moriyoshi et al., 1991 ; Sugihara et al., 1992 ; Zukin et Bennett, 1995). Quatre gènes ont été identifiés pour coder GluN2 (GluN2A, GluN2B, GluN2C et GluN2D), et deux pour GluN3 (GluN3A et GluN3B). Au total, l'ensemble des R-NMDA est codé par sept gènes (Sugihara et al., 1992 ; Matsuda et al., 2002). Le récepteur est un tétramère formé obligatoirement de deux sous-unités GluN1, associées à deux sous-unités GluN2 ou à une sous-unité GluN2 et une sous-unité GluN3 (Cull-Candy et Leszkiewicz, 2004 ; Paoletti et Neyton, 2007 ; Paoletti, 2011 ; Paoletti et al., 2013). Les diverses combinaisons de sous-unités possibles sont à l'origine de multiples populations de R-NMDA de compositions et de fonctions distinctes.

a Architecture moléculaire des récepteurs NMDA

Les sous-unités partagent une topologie membranaire commune, caractérisée par un large domaine extracellulaire N-terminal, un domaine membranaire comprenant trois segments transmembranaires (TM1, TM3 et TM4) et une boucle réentrante (M2), une boucle extracellulaire entre TM3 et TM4 et une partie cytoplasmique C-terminale dont la taille est variable selon le type de sous-unité et qui fournit de multiples sites d'interactions potentiels avec les protéines intracellulaires (Dingledine et al., 1999 ; Mayer, 2006 ; Paoletti et Neyton, 2007 ; Figure 22).

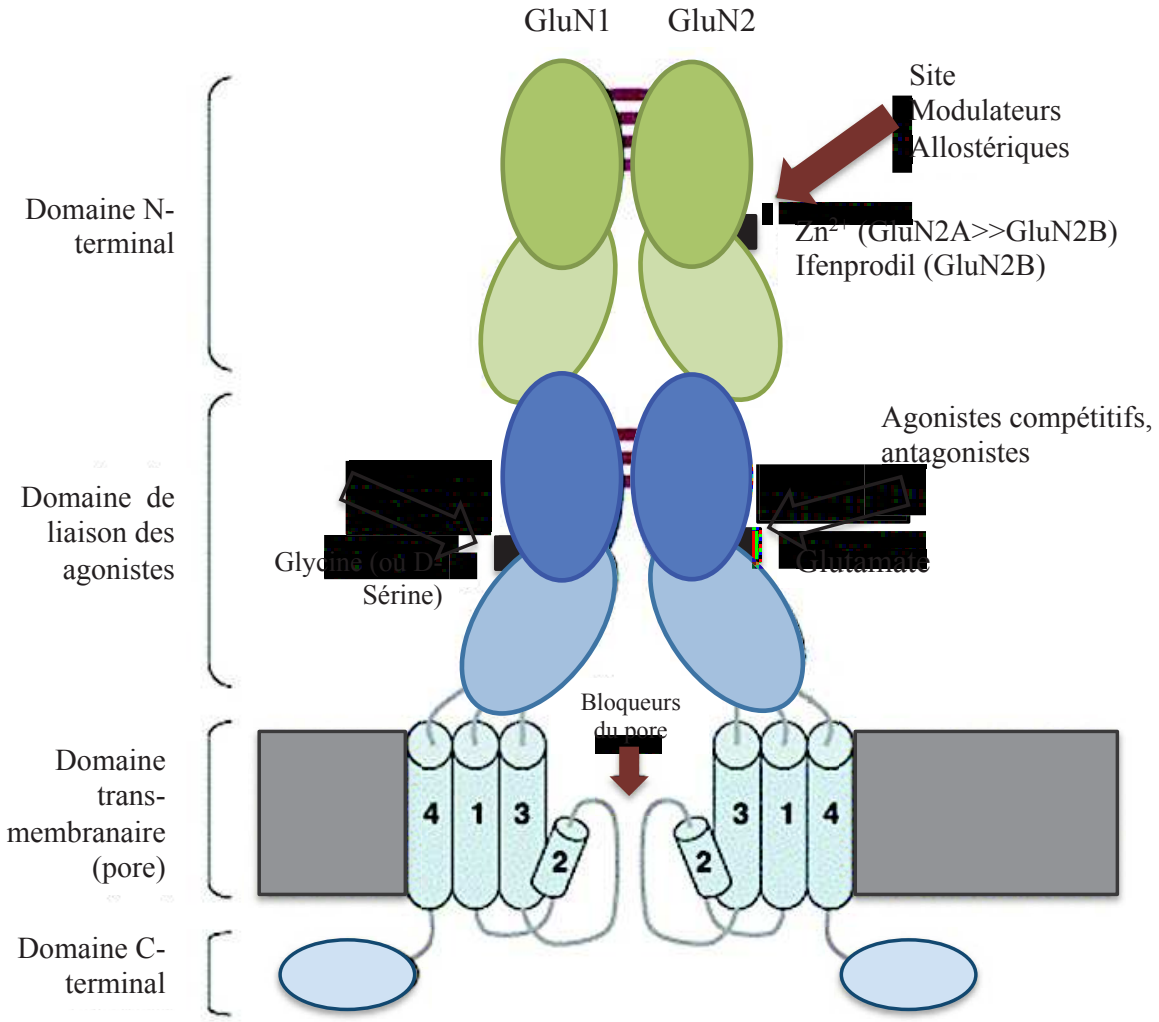


Figure 22 : Représentation schématique du récepteur NMDA.
Assemblage hétérotetramérique de deux sous-unités GluN1 et deux sous-unités GluN2. Un seul des deux hétérodimères GluN1/GluN2 est représenté par souci de clarté. La région extracellulaire est composée d'un domaine N-Terminal et d'un domaine de liaison des agonistes. Le domaine de liaison des agonistes de GluN2 reçoit le glutamate alors que celui de GluN1 reçoit son co-agoniste : la glycine ou la D-Sérine. Le domaine transmembranaire qui forme le canal ionique est un site de liaison pour des bloqueurs de pore comme le magnésium, mais aussi le MK-801, la mémantine ou la kétamine. Il existe aussi des sites modulateurs allostériques sur le domaine N-Terminal de GluN2 qui lient l'ifenprodil ou le zinc. D'après Paoletti et Neyton, 2007.

La partie extracellulaire des sous-unités du R-NMDA est organisée comme pour les sous-unités des autres iGluR par une association de deux domaines distincts : les domaines NTD (*N-terminal domain*) et ABD (*agonist binding domain*). Le domaine N-terminal qui comprend les 350 premiers acides aminés présente une homologie de séquence avec la protéine bactérienne périplasmique LIVBP (*leucine/isoleucine/valine-binding protein*) (Masuko et al., 1999 ; Paoletti et al., 2000). Le domaine N-terminal joue un rôle majeur dans

l'assemblage des sous-unités (Meddows et al., 2001). Pour les sous-unités GluN2A et GluN2B, il contient également les sites de liaison pour des inhibiteurs allostériques comme l'ifenprodil ou l'ion zinc (Zn^{2+}) et exerce ainsi une modulation inhibitrice ou potentialisatrice sur le R-NMDA (Gielen, 2010). Le domaine ABD est quant à lui constitué de la région « pré-TM1 » et de la boucle TM3-TM4, représentant environ 150 acides aminés pour chacune. Il présente une homologie de séquence avec la protéine GBP (*guanylate-binding protein*) (Paoletti et Neyton, 2007). Le domaine ABD est divisé par le canal ionique en deux segments discontinus S1 et S2. L'activation du R-NMDA nécessite la liaison simultanée de deux co-agonistes : le glutamate et la glycine (ou la D-sérine). La glycine se fixe sur la partie ABD de GluN1 et GluN3, alors que le glutamate se fixe sur GluN2 (Furukawa et al., 2005 ; Yao et Mayer, 2006).

Le domaine transmembranaire comprend quatre segments M1, M2, M3 et M4. Les segments M1, M3 et M4 sont des domaines transmembranaires traversant la membrane de part et d'autre depuis la face cytoplasmique vers la face extracellulaire ou inversement. Le segment M2 ou « boucle P » est en forme de U inversé : il s'engage dans la membrane depuis la face cytoplasmique et en ressort par cette même face sans atteindre la face extracellulaire. Les quatre segments du domaine transmembranaire forment le canal ionique du R-NMDA, avec la face interne du canal constituée par le segment M2. Ce segment M2 joue le rôle de filtre de sélectivité ionique et influe sur les propriétés de conductance et sur la sensibilité au voltage du récepteur (Mori et Mishina, 1995 ; Dingledine et al., 1999).

Le domaine CTD (*C-terminal domain*) présente des formes très variables en fonction de la sous-unité dont il fait partie. Il contient de nombreux domaines PDZ qui sont des possibilités d'interaction avec des protéines d'échafaudage post-synaptiques, d'adhésion et d'ancrage à la membrane ou des complexes de signalisation (Traynelis et al., 2010 ; Punnakkal et al., 2012). Le domaine CTD présente également de nombreux sites de phosphorylation qui peuvent influer sur le trafic cellulaire du récepteur (Salter et Kalia, 2004). La diversité potentielle du domaine C-terminal confère des propriétés uniques aux sous-unités, influençant la localisation cellulaire du récepteur, ses propriétés d'internalisation et de recyclage à la membrane ainsi que les voies de signalisation intracellulaires.

b Les sous-unités des récepteurs NMDA

La sous-unité GluN1 est une glycoprotéine (environ 920 acides aminés) qui présente une forte identité de séquence avec les autres sous-unités des récepteurs au glutamate. Elle est codée par un seul gène (*glutamate receptor ionotropic N-methyl-D-aspartate 1*, GRIN1) comprenant 22 exons et 21 introns (Moriyoshi et al., 1991). Il existe huit variants d'épissage (GluN1-1a à 4a, et GluN1-1b à 4b) qui concernent trois exons : l'exon 5 codant pour un segment de 21 acides aminés localisés dans le NTD, dénommé cassette N1, et les exons 21 et 22, codant pour des segments de 37 et 38 acides aminés, dénommés cassettes C1 et C2, situés dans le CTD (Dingledine et al., 1999). La cassette N1 influence l'affinité du récepteur pour ses agonistes, ainsi que leur sensibilité au zinc et au proton (Paoletti et Neyton, 2007). La sous-unité GluN1, indispensable à la formation de récepteurs fonctionnels, est exprimée de façon ubiquitaire dans l'ensemble du SNC pendant le développement ainsi qu'à l'âge adulte. Il existe des localisations différentes en fonction du variant d'épissage et du stade de développement, les isoformes « a » étant dominants, excepté dans le cervelet (Figure 23).

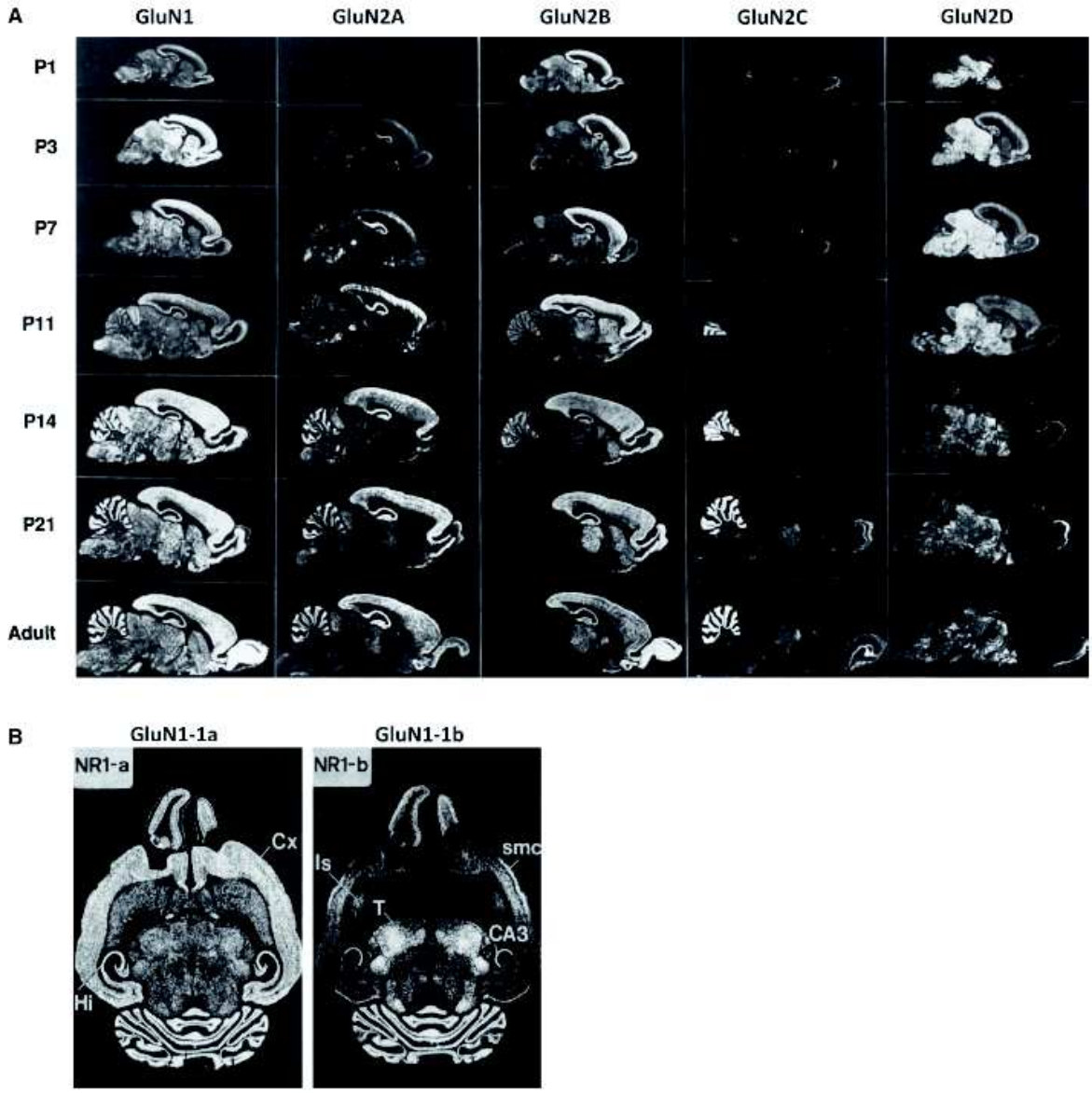


Figure 23 : Distribution spatio-temporelle des sous-unités du récepteur NMDA
(A) Distribution des ARNm des sous-unités GluN1, GluN2A, GluN2B, GluN2C et GluN2D dans le cerveau en développement chez le Rat. (B) Expression de deux variants d'épissage de la sous-unité GluN1 dans le cerveau à P12 chez le Rat. D'après Paoletti 2011 et Laurie et Seeburg 1994.

La famille des sous-unités GluN2 (entre 1200 et 1400 acides aminés, (Traynelis et al., 2010)) est composée de quatre membres (GluN2A, GluN2B, GluN2C et GluN2D) encodés par quatre gènes distincts (GRIN2A, GRIN2B, GRIN2C et GRIN2D). Les sous-unités GluN2 se distinguent des sous-unités GluN1 par la longueur de leur extrémité C-terminal qui interagit avec des protéines intracellulaires responsables du transport et de l'adressage du récepteur (Bard et Groc, 2011 ; Paoletti, 2011). Associées avec la sous-unité GluN1, elles forment un R-

NMDA fonctionnel. La sous-unité GluN2 possède le site de liaison au glutamate (Laube et al., 1997 ; Anson et al., 1998). L'affinité pour les agonistes, les antagonistes et les autres modulateurs allostériques ainsi que les propriétés de perméabilité et de conductance du récepteur sont dépendantes de la composition du récepteur en sous-unité GluN2.

Les sous-unités GluN3 sont réparties en sous-unités GluN3A (1115 acides aminés), encodées par le gène GRIN3A, et en sous-unités GluN3B (901 acides aminés) encodées par le gène GRIN3B (Ciabarra et al., 1995 ; Sucher et al., 1995 ; Eriksson et al., 2002). GluN3 partage la même architecture que les autres sous-unités des récepteurs ionotropiques, mais se rapproche davantage de GluN1 en raison de sa liaison avec la glycine ou la D-sérine, au lieu du glutamate pour GluN2, ainsi que de son domaine C-terminal plus court que celui de GluN2 (Pérez-Otaño et al., 2016). GRIN3A code pour deux isoformes GluN3A-L (long) et GluN3A-S (court). Seul GluN3A-S est présent chez l'Homme. GRIN3B connaît un épissage alternatif plus étendu qui permet la formation de l'isoforme canonique GluN3B et quatre isoformes fonctionnels, avec des délétions dans le domaine C-terminal (Domingues et al., 2011). La co-expression des différents isoformes de GluN3B avec les sous-unités GluN1 et GluN2 offre un panel de récepteurs NMDA différents avec des propriétés biophysiques multiples.

Les sous-unités du récepteur NMDA présentent des homologies de séquence entre elles : environ 29% entre GluN1 et GluN2, 30% entre GluN1 et GluN3, 28% entre GluN2 et GluN3. Les sous-unités GluN2A-D partagent entre 38 et 52% de leur séquence. Enfin, GluN3 A et GluN3B présentent également une forte homologie de séquence (57%) (Ciabarra et al., 1995 ; Stephenson et al., 2008).

c Assemblage quaternaire des sous-unités en R-NMDA fonctionnel et adressage membranaire

Les R-NMDA fonctionnels sont obligatoirement des hétérotétramères contenant deux sous-unités GluN1 associées à deux autres sous-unités (Traynelis et al., 2010). La majorité des récepteurs contient deux sous-unités GluN1 et deux sous-unités GluN2 de même type. Il existe aussi des trihétérotétramères comprenant également deux sous-unités GluN1 associées à deux sous-unités GluN2 ou GluN3 différentes. Les sous-types majeurs des R-NMDA sont les dihétéromères suivants : GluN1/GluN2A, GluN1/GluN2B, GluN1/GluN2C et

GluN1/GluN2D. Les propriétés pharmacologiques, biophysiques et fonctionnelles du R-NMDA dépendent donc essentiellement de sa composition en sous-unité GluN2 (Cull-Candy et al., 2001). Il existe aussi des combinaisons trihétéromériques mises en évidence : GluN1/GluN2A/GluN2B (Chazot et Stephenson, 1997), GluN1/GluN2A/GluN2D, GluN1/GluN2B/GluN2D (Piña-Crespo et Gibb, 2002), GluN1/GluN2A/GluN2C (Cull-Candy et Leszkiewicz, 2004), GluN1/GluN2A/GluN3A (Perez-Otano et al., 2001), GluN1/GluN2A/GluN3B (Matsuda et al., 2003) et GluN1/GluN2B/GluN3A (Pilli et Kumar, 2012).

Les sous-unités du R-NMDA sont synthétisées puis assemblées en tétramères dans le réticulum endoplasmique (RE). La sous-unité GluN1 est produite en grand excès relativement aux sous-unités GluN2 et GluN3 (Chazot et Stephenson, 1997), permettant ainsi une quantité suffisante disponible pour former des R-NMDA. Trois modèles ont été proposés pour l'assemblage des sous-unités entre elles (Stephenson et al., 2008 ; Horak et al., 2014) :

- formation initiale d'homodimères GluN1/GluN1 et GluN2/GluN2, puis assemblage de ces paires pour former un hétérotétramère ;
- formation initiale d'un homodimère GluN1/GluN1 puis association successive de deux sous-unité GluN2 l'une après l'autre ;
- formation initiale d'un hétérodimère GluN1/GluN2 suivie d'un assemblage de deux hétérodimères GluN1/GluN2.

L'assemblage des sous-unités entre elles permet d'activer la sortie du récepteur du RE en masquant des motifs de rétention du RE ou en entraînant des modifications structurelles (Horak et al., 2014).

Une fois libérés du RE, les R-NMDA subissent diverses modifications post-traductionnelles au sein de l'appareil de Golgi du corps cellulaire, puis sont distribués au réseau trans-golgien (TGN, *trans Golgi network*) et aux endosomes pour atteindre la membrane plasmique.

Après leur passage dans l'appareil de Golgi, les R-NMDA sont associés à des vésicules qui vont les transporter jusqu'à la membrane, sous le contrôle de larges complexes

protéiques qui interagissent avec le récepteur (Figure 24). Par exemple, la protéine SAP102 (*synapse associated protein* 102) de la famille des MAGUK va s'associer à la sous-unité GluN2B du R-NMDA une fois libérée du RE. Le complexe GluN2B/SAP102 va alors interférer avec un composant de l'exocyste, la protéine Sec8 (*secretory protein* 8). En cas de perturbation de la liaison de Sec8 avec le complexe GluN2B/SAP102, l'expression des récepteurs à la membrane est diminuée (Horak et al., 2014). La protéine mPins (homologue mammifère de *Drosopholia melanogaster partner of inscuteable*) interagit également avec SAP102 et favoriserait l'adressage membranaire des récepteurs GluN1/GluN2B (Sans et al., 2005). Un autre exemple est celui de la protéine SAP97, une autre protéine de la famille des MAGUK qui peut se lier à la sous-unité GluN2A par son domaine PDZ, sous le contrôle de CAMKII (*calcium/calmodulin-dependent protein kinase II*) (Gardoni et al., 2003 ; Mauceri et al., 2007). Ce complexe semble être impliqué dans l'adressage d'une partie des récepteurs n'empruntant pas la voie classique de sécrétion. En effet, alors que la plupart des R-NMDA sont produits puis modifiés dans le corps cellulaire puis transportés à la synapse, certains R-NMDA empruntent une voie de sécrétion atypique en court-circuitant le compartiment intermédiaire du RE-Golgi (ERGIC) du corps cellulaire (Wenthold et al., 2003 ; Jeyifous et al., 2009). Ces récepteurs sont associés à SAP97 et CASK (*calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase)* et possiblement à KIF17 (*kinesine superfamily 17*). Les complexes R-NMDA/SAP97 sont dirigés à partir du RE du corps cellulaire à un sous-compartiment du RE dendritique qui les adresse à des appareils de Golgi délocalisés (« *outposts* ») dans la dendrite (Horak et al., 2014). SAP97 semble aussi pouvoir se lier à des récepteurs contenant GluN2B, mettant ainsi en évidence des rôles différents de SAP97 en fonction de ses isoformes (Lin et al., 2013). Le transport des vésicules contenant les R-NMDA nécessite un guidage le long de microtubules grâce à des moteurs kinésines comme KIF17. KIF17 interagit avec le domaine PDZ de mLin10 qui va se lier à la sous-unité GluN2B (Setou et al., 2000) sous la régulation de CaMKII. Enfin, KIF17 ne semble pas acheminer le R-NMDA jusqu'aux régions synaptiques. Le transport de courte distance au sein de l'épine dendritique jusqu'à la densité post-synaptique semble dépendre de protéines motrices comme l'actine et la myosine. Lorsque les R-NMDA ont atteint la membrane plasmique, ils vont diffuser latéralement vers les compartiments synaptiques et extra-synaptiques (Choquet et Triller, 2013).

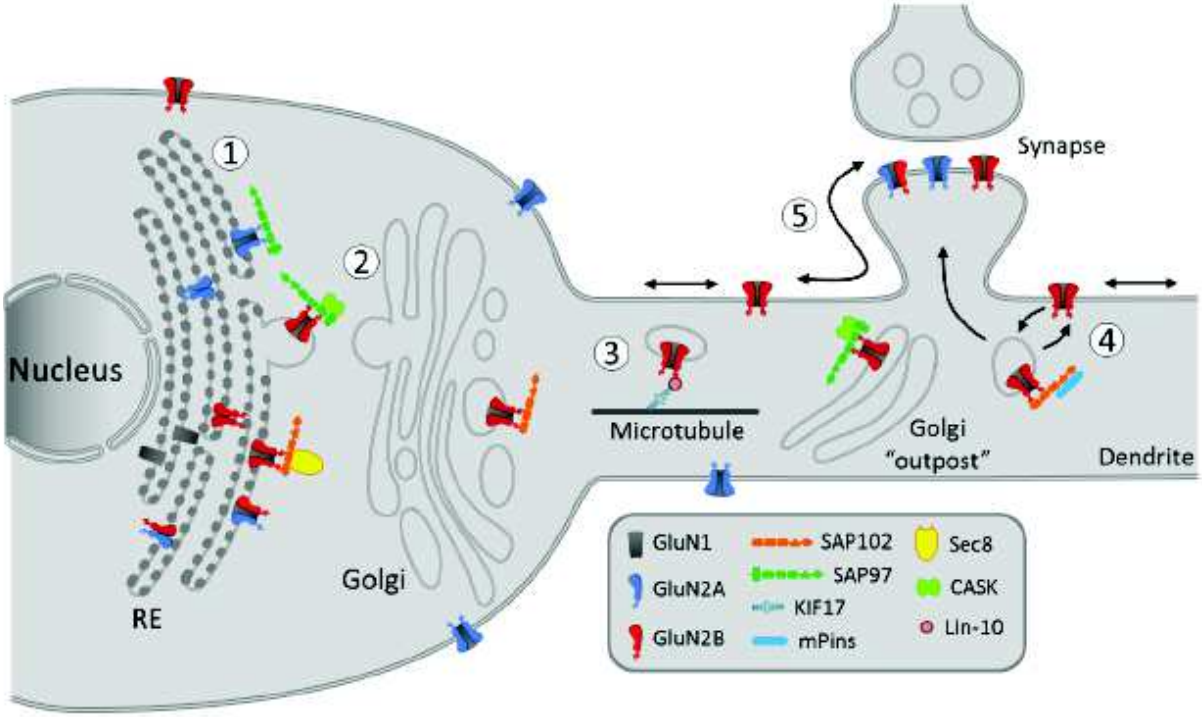


Figure 24 : Expression de surface des récepteurs NMDA
(1) L'assemblage des sous-unités en récepteur NMDA fonctionnel se produit dans le RE. (2) L'association à des complexes protéiques tels que SAP102/Sec8 et SAP97/CASK favorise le trafic intracellulaire via le réseau golgien somatique et dendritique ("outpost"). (3) Les vésicules de transport des récepteurs NMDA voyagent le long des microtubules par l'association à des moteurs de type kinésine (par ex. KIF-17). L'expression à la membrane plasmique se fait finalement par exocytose (4) avant de rejoindre la synapse par diffusion latérale (5). D'après Bard et Groc, 2011.

d Localisation cellulaire du récepteur NMDA

Une fois arrivé au niveau de la membrane plasmique, le R-NMDA peut se situer en position pré-synaptique, synaptique ou extra-synaptique.

Les récepteurs pré-synaptiques sont activés par des neurotransmetteurs libérés par leur propre cellule (autorécepteurs) ou par une cellule adjacente neuronale ou gliale (hétérorécepteurs) (Engelman et MacDermott, 2004 ; Rodríguez-Moreno et al., 2010). Les R-NMDA sont largement répandus dans l'ensemble du SNC, aussi bien au sein des synapses excitatrices ou inhibitrices (Duguid et Smart, 2009 ; Rodríguez-Moreno et al., 2010 ; Bouvier et al., 2015). A l'inverse des R-NMDA post-synaptiques, les R-NMDA pré-synaptiques ne sont pas ubiquitaires mais concentrés dans le cortex cérébral, l'hippocampe, les amygdales cérébrales, le striatum, le *nucleus accumbens* et le cervelet (Bouvier et al., 2015). Le rôle principal des R-NMDA pré-synaptiques est la régulation de la libération des

neurotransmetteurs. Cette action de modulation du flux de neurotransmetteurs confère un rôle dans la plasticité synaptique aux R-NMDA pré-synaptiques (Engelman et MacDermott, 2004 ; Corlew et al., 2008).

La synapse est le compartiment membranaire où la densité des R-NMDA est la plus importante (Antal et al., 2008). Les R-NMDA synaptiques sont situés sur la membrane plasmique à 200-300 nm des densités post-synaptiques. Ils participent à la transmission du signal glutamatergique. La répartition des récepteurs en fonction de leur sous-unité est hétérogène. En effet, la sous-unité GluN2B est concentrée en périphérie de la synapse, alors que GluN2A semble être réparti de façon homogène (Shinohara et al., 2008). Par ailleurs, la composition en sous-unités GluN2 diffère d'une synapse à l'autre, notamment selon le type d'afférence qui se projette sur le neurone (Kawakami et al., 2003). Les R-NMDA participent également à la maturation synaptique au cours du développement et à la plasticité synaptique.

Les R-NMDA extra-synaptiques sont, quant à eux, impliqués dans la synaptogenèse, la neuritogenèse, la migration et la différenciation cellulaire (Zhou et al., 2015). Ces récepteurs sont exposés au glutamate environnant d'origine gliale et ne sont activés que lors d'une libération massive de glutamate (Le Meur et al., 2007). Les récepteurs extra-synaptiques jouent aussi un rôle modulateur de l'excitabilité neuronale et participent ainsi à la plasticité synaptique. Ils sont aussi fortement impliqués dans les processus d'excitotoxicité et de mort neuronale (Papouin et al., 2012).

e Expression spatiale et temporelle des récepteurs NMDA

Le récepteur NMDA est exprimé dans l'ensemble du SNC (et également au niveau des tissus périphériques comme le rein, les poumons, le foie et l'estomac (Du et al., 2016)), mais il existe une distribution variable dans le temps et dans l'espace en fonction de la composition en sous-unités. La sous-unité GluN1 est ubiquitaire depuis E14 jusqu'à l'âge adulte, avec une différence d'expression en fonction de l'isoforme (Paoletti, 2011). GluN1-2 est exprimée de façon diffuse, alors que GluN1-1 et GluN1-4 sont exprimées préférentiellement dans les régions rostrales (incluant le cortex et l'hippocampe). La localisation des isoformes a et b des sous-unités GluN1 se superpose pour la plupart, mais il peut exister des variations d'expression dans certaines régions comme dans l'hippocampe

où GluN1-1a est présente dans toutes les cellules, alors que GluN1-1b n'est retrouvée que dans l'aire CA3 (Paoletti et al., 2013). Les quatre sous-unités GluN2 ont des profils d'expression spatio-temporelle complètement différents (Akazawa et al., 1994 ; Laurie et Seeburg, 1994 ; Monyer et al., 1994 ; Sheng et al., 1994) (Figure 25). GluN2B et GluN2D sont les seules sous-unités GluN2 exprimées pendant la période embryonnaire. GluN2B est exprimée de façon diffuse, alors que GluN2D est limitée au diencéphale et au tronc cérébral. Au cours des deux premières semaines de vie du rongeur, le profil d'expression des sous-unités GluN2 va évoluer. L'expression de GluN2A va débuter juste après la naissance et va rapidement s'étendre de façon diffuse dans l'ensemble du SNC adulte. Dans le même temps, l'expression de GluN2D va chuter pour finalement être exprimée à des niveaux faibles essentiellement dans le diencéphale et le mésencéphale. Contrairement à GluN2D, l'expression de la sous-unité GluN2B va se maintenir à des taux élevés après la naissance, avec un pic autour de la première semaine de vie, puis son expression va diminuer et se concentrer dans le prosencéphale. Autour du 5ème jour postnatal (P5) chez la Souris, GluN2A devient prédominante par rapport à GluN2B (Liu et al., 2004 ; Jantzie et al., 2015). Chez l'Homme, le switch Glun2B/GluN2A semble débuter autour des semaines 22-24 de gestation (Bagasrawala et al., 2016). La sous-unité GluN2C apparaît tardivement, après P10, et son expression est concentrée au niveau du cervelet et du bulbe olfactif. Comme pour les sous-unités GluN2, les profils d'expression des différentes sous-unités GluN3 diffèrent pendant le développement (Henson et al., 2010 ; Pachernegg et al., 2012). En effet, il existe un pic d'expression de GluN3A au cours des premiers jours de vie (P8), puis son expression diminue progressivement, alors que l'expression de GluN3B augmente au cours du développement pour être fortement présente au sein des neurones moteurs à l'âge adulte. L'expression précoce dans le développement de GluN2B, GluN2D et GluN3 suggère que ces sous-unités participent au processus de synaptogenèse et de maturation synaptique. De même, la présence prédominante de GluN2A et GluN2B dans le cortex ou l'hippocampe souligne leurs rôles clé pour le fonctionnement de la synapse et la plasticité cérébrale.

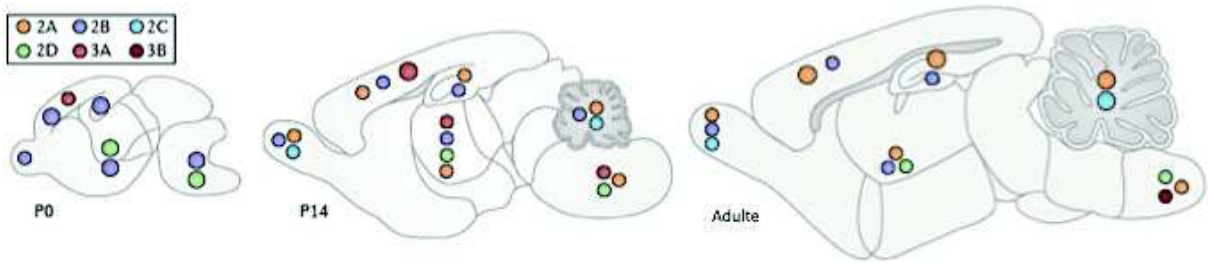


Figure 25 : Profil de développement des sous-unités GluN2 et GluN3 du récepteur NMDA.
D'après Paoletti 2013.

f Activation des récepteurs NMDA et propriétés biophysiques

Les mécanismes d'activation du R-NMDA n'impliquent que les domaines ABD et transmembranaires du récepteur (Qiu et al., 2009 ; Paoletti, 2011). Le glutamate et son co-agoniste la glycine (ou la D-sérine) se lient au domaine ABD au niveau de leur site de reconnaissance (sur la sous-unité GluN2 pour le glutamate et sur GluN1 ou GluN3 pour la glycine). Cette liaison induit un écartement de la partie inférieure des domaines ABD de chaque dimère. Ainsi, une traction est exercée sur la région intermédiaire qui relie les domaines ABD aux segments transmembranaires qui provoque l'ouverture du canal (Figure 26). Enfin, l'activation du R-NMDA se termine par une phase de désactivation permettant au récepteur d'adopter à nouveau une configuration fermée en présence de ses agonistes.

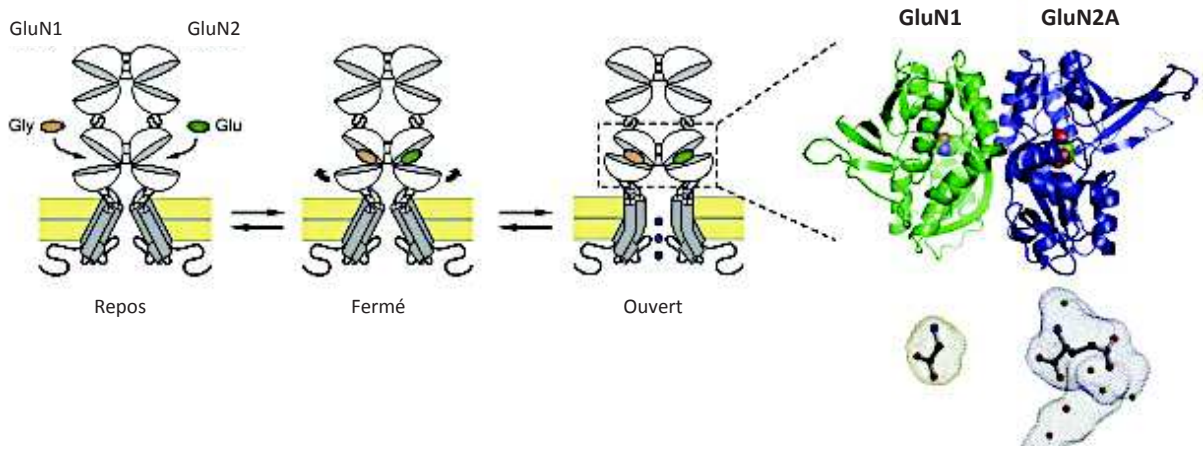


Figure 26 : Mécanismes structurels d'activation du récepteur NMDA.
Glycine et glutamate sont tous les deux requis pour entraîner l'ouverture du R-NMDA. Ici, seul un dimère est représenté. Un récepteur NMDA fonctionnel est un tétramère. A droite, est représentée la structure cristallographique de l'hétérodimère GluN1/GluN2A avec la glycine liée à la sous-unité GluN1 et le glutamate lié à la sous-unité GluN2A. D'après Paoletti, 2011.

L'activité du récepteur est aussi dépendante du potentiel de membrane. En effet, il existe un blocage du récepteur par les ions Mg^{2+} extracellulaires au voisinage du potentiel de repos. Les concentrations physiologiques de Mg^{2+} dans le milieu extracellulaire (1-2 mM) inhibent fortement les réponses des R-NMDA au potentiel de membrane de repos. Ainsi, à -60mV, la quasi-totalité des R-NMDA est bloquée par les ions Mg^{2+}. La dépolarisation membranaire induite par l'activation des récepteurs AMPA environnants permet, dès -40mV, de libérer le Mg^{2+} du canal. Après liaison des agonistes, le R-NMDA devient alors perméable aux cations. Plusieurs résidus de segments transmembranaires (en particulier au niveau de la boucle réentrante P) des sous-unités GluN1 et GluN2 semblent jouer un rôle primordial dans la liaison avec les ions Mg^{2+}, notamment un résidu asparagine de la sous-unité GluN2 (Wollmuth et al., 1998). La sensibilité du récepteur au blocage magnésium lui confère un rôle de détecteur de coïncidences entre les éléments pré- et post-synaptiques. Ainsi, il faut que les éléments pré-synaptiques soient dépolarisés pour qu'ils libèrent le glutamate dans la fente synaptique, élément indispensable à l'activation du R-NMDA. Pour rendre perméable le canal aux flux ioniques, le blocage par les ions Mg^{2+} doit également être levé par dépolarisation des éléments post-synaptiques (Dingledine et al., 1999). Une fois le Mg^{2+} libéré du canal, les R-NMDA sont perméables aux cations monovalents (essentiellement Na^{+} et K^{+}), mais aussi au calcium (contrairement à la majorité des iGluR). En effet, le R-NMDA est le récepteur-canal qui présente la perméabilité au calcium la plus importante. La fraction de courant ionique attribuée au calcium au travers des R-NMDA est de l'ordre de 10 à 20%, alors qu'elle est inférieure à 1% pour les récepteurs canaux non-NMDA (Rogers et Dani, 1995). L'affinité pour les agonistes, la sensibilité au blocage magnésium, la perméabilité et la conductance est différente d'un récepteur à l'autre et dépend de sa composition en sous-unités (Cull-Candy et al., 2001 ; Paoletti, 2011 ; Paoletti et al., 2013 ; Figure 27).

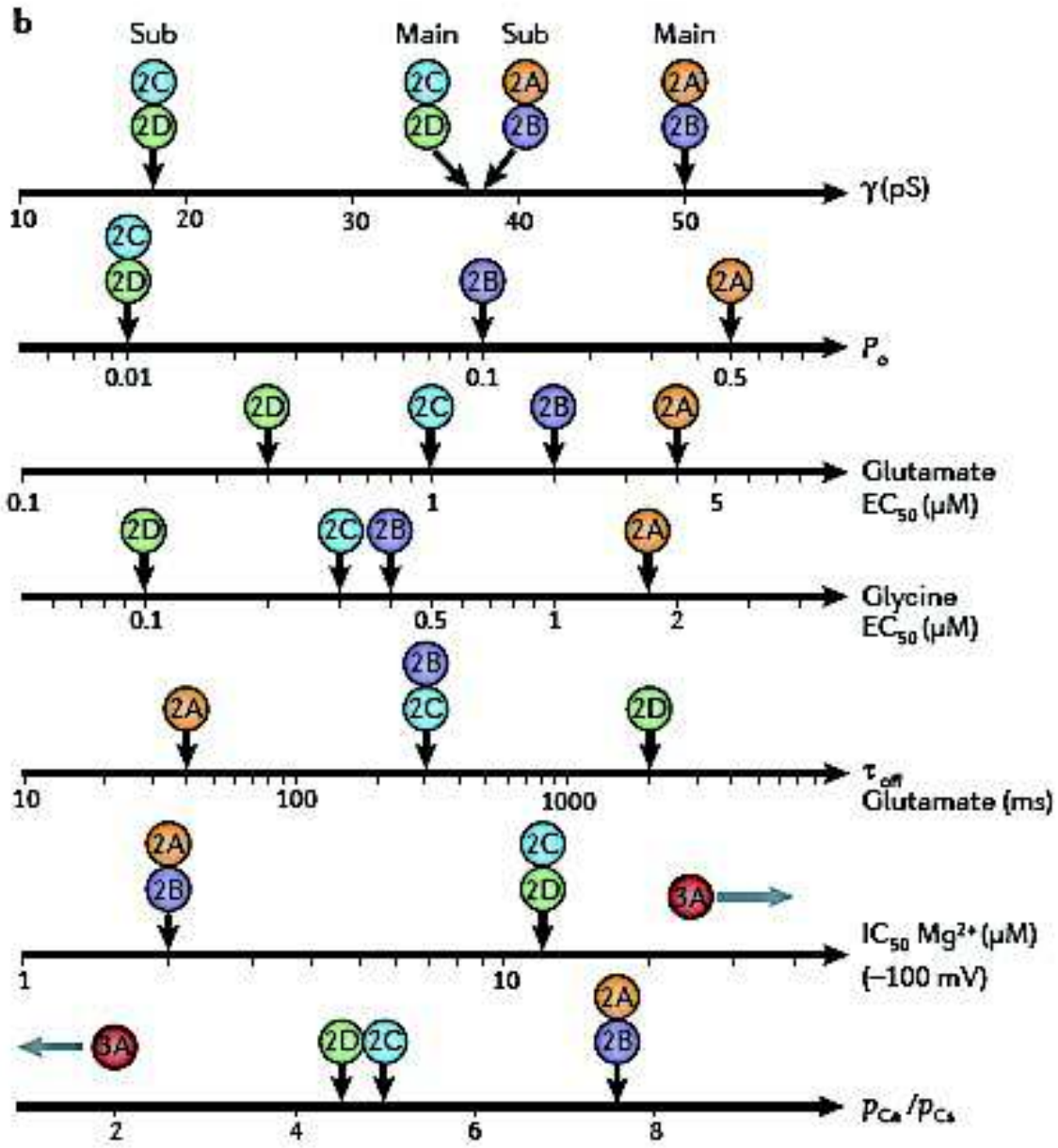


Figure 27 : Propriétés biophysiques des sous-unités du récepteur NMDA.
Les différents sous-types de récepteurs NMDA se caractérisent par des propriétés biophysiques distinctes. La conductance unitaire (γ), la probabilité maximale d'ouverture (Po), l'affinité pour les agonistes glycine et glutamate (EC50), la constante de temps de désactivation (τoff), la sensibilité au bloc Mg2+ (IC50 à -100 mV) et la perméabilité calcique (pCa/pCs) sont représentées. D'après Paoletti et al., 2013.

L'activité des récepteurs NMDA est également modulée positivement ou négativement par des molécules et des ions dont le site de liaison est différent des domaines ABD destinés aux agonistes, et en dehors du canal (Figure 28). Ces modulateurs allostériques peuvent être endogènes comme pour le zinc ou les protons, mais aussi exogènes comme

pour l'ifenprodil, molécule de synthèse. Ils n'interfèrent pas directement avec le processus d'activation du récepteur et peuvent cibler seulement certains sous-types de récepteurs (Mony et al., 2011). Les domaines NTD sont les sites préférentiels de la régulation allostérique des R-NMDA et jouent un rôle majeur dans la diversité fonctionnelle des récepteurs (Zhu et Paoletti, 2015).

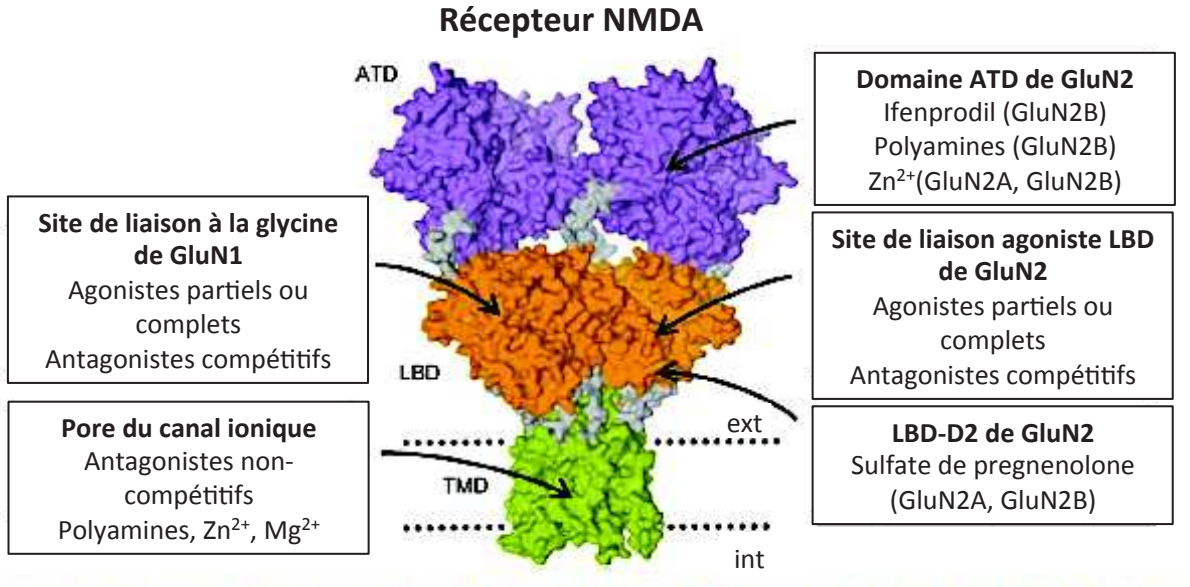


Figure 28 : Sites de liaison pour des ligands extracellulaires du récepteur NMDA.
Le récepteur NMDA possède de nombreux sites de liaison pour des ligands extracellulaires, notamment des sites dits allostériques qui lient des petites molécules ou ions capables de réguler l'activité du récepteur. Ces sites allostériques peuvent se situer au niveau des domaines NTD, dans la poche interlobes de GluN2 pour la liaison du zinc ou à l'interface entre les domaines NTD de GluN1 et GluN2B pour la liaison de l'ifenprodil et de la spermine. D'après de Traynelis et al., 2010.

Le zinc, les polyamines et l'ifenprodil et ses dérivés peuvent interagir avec les domaines NTD des sous-unités GluN2B. Le zinc et l'ifenprodil agissent comme des agents allostériques inhibiteurs. Le zinc est un cation essentiel au développement, à la maturation et aux fonctions du neurone (Sandstead, 2013). Le site de liaison du zinc à la sous-unité GluN2B se situe au bord de la fente inter-lobe du domaine NTD. En 1993, l'agent antihypertenseur ifenprodil fut le premier inhibiteur allostérique spécifique d'une sous-unité (GluN2B) à avoir été découvert (Williams, 1993). Avec ses dérivés, ils forment une grande famille de composés synthétiques qui agissent comme des antagonistes hautement spécifiques de GluN2B. Le site de liaison de l'ifenprodil (ou de son dérivé Ro25-6981) réside à

l'interface des domaines NTD des sous-unités GluN1 et GluN2B voisines (Zhu et Paoletti, 2015). Les domaines NTD des sous-unités GluN2B contiennent aussi un site de modulation allostérique positive en liant les polyamines comme la spermine ou la spermidine mais aussi, étonnamment, le magnésium (Williams et al., 1994 ; Zhang et al., 1994 ; Paoletti et al., 1995 ; Hackos et Hanson, 2017). Cette modulation est elle aussi hautement spécifique de la sous-unité GluN2B. Tout comme l'ifenprodil, la spermine se lie à l'interface des domaines NTD de GluN1 et GluN2B (Mony et al., 2011). A partir de ces trois exemples de modulations allostériques, négatives ou positives, un modèle général a été proposé : tout ligand qui stabilise les domaines NTD dans une configuration « ouverte » se comporte comme un modulateur allostérique positif, tandis qu'un ligand favorisant la fermeture du domaine NTD agit comme un inhibiteur allostérique (Zhu et Paoletti, 2015). Ces principes généraux peuvent s'appliquer également pour la sous-unité GluN2A : le zinc a longtemps été identifié comme le seul ligand allostérique de GluN2A (puissant inhibiteur), mais des travaux récents ont mis en évidence des modulateurs allostériques positifs de la sous-unité (GNE-0723 et GNE-5729) (Volgraf et al., 2016 ; Villemure et al., 2017).

g Le glutamate et le récepteur NMDA, acteurs du développement cérébral

Le glutamate et le récepteur NMDA ne participent pas qu'à la transmission du signal, ils jouent également un rôle majeur dans le développement cérébral. Tout d'abord, le glutamate est un acteur de la modulation de la neurogenèse. En effet les R-NMDA sont exprimés au niveau des précurseurs neuronaux avant la phase de synaptogenèse (Komuro et Rakic, 1993 ; Luján et al., 2005 ; Bagasrawala et al., 2016), et le glutamate participe par son interaction avec les R-NMDA, à la régulation de la survie, de la prolifération, de la migration et de la différentiation cellulaire des neurones (Jansson et Åkerman, 2014).

Le glutamate est présent à forte concentration dans les zones neurogènes pendant le développement (Behar et al., 1999 ; Haydar et al., 2000). Les progéniteurs neuronaux hautement exposés sont beaucoup moins sensibles aux concentrations élevées de glutamate que les cellules matures. De ce fait, des concentrations supra-physiologiques de glutamate (supérieures à 1mM) ne sont pas toxiques pour les précurseurs qui expriment des récepteurs ionotropiques et métabotropiques (Meldrum, 2000 ; Brazel et al., 2005 ; Suzuki et al., 2006).

Le glutamate influence le développement neuronal précoce, notamment en favorisant la prolifération des précurseurs (Balazs, 2006). Cette action semble différente en fonction du stade de développement et donc de l'expression des récepteurs au glutamate.

Le blocage *in vivo* du R-NMDA dans le cerveau immature de rongeurs réduit la prolifération cellulaire, augmente la proportion de cellules pycnotiques et entraîne une altération sévère de la morphologie du gyrus denté (Gould et al., 1994 ; Luk et al., 2003).

L'activation du récepteur NMDA influence positivement la migration neuronale et l'extension ou la rétractation des neurites (Komuro et Rakic, 1993 ; Behar et al., 1999). La morphologie même des épines dendritiques néoformées semble être modulée par l'action du glutamate et du R-NMDA (Mattison et al., 2014). En condition de blocage des récepteurs NMDA, une partie de la migration cellulaire est inhibée (Behar et al., 1999). Enfin, la synaptogenèse semble dépendre partiellement du glutamate et du R-NMDA dans le cerveau immature et adulte (Pérez-Otaño et Ehlers, 2004 ; Fedder et Sabo, 2015).

D'autre part, le blocage du récepteur majore la perte neuronale en cas de lésion cérébrale (Ikonomidou et al., 2000) et altère la survie des neurones néoformés du gyrus denté (Tashiro et al., 2006) notamment par un arrêt de la maturation mettant en péril la vitalité cellulaire (Monti et Contestabile, 2000 ; Fiske et Brunjes, 2001 ; Adams et al., 2004). Par ailleurs, l'activation du R-NMDA permet l'initiation de cascades de phosphorylation comme PI3K-Akt, ou provoque la suppression de l'expression de gènes pro-apoptotiques, processus participant l'un et l'autre à la survie neuronale (Hardingham, 2009). L'augmentation de l'expression du gène anti-apoptotique Bcl-2 et la diminution de l'expression du gène pro-apoptotique Bax a été mise en évidence *in vitro* en cas d'activation des R-NMDA (Zhu et al., 2005). Il a également été démontré qu'un blocage du R-NMDA pouvait activer l'apoptose (Yoon et al., 2003) et rendre le neurone plus vulnérable au stress oxydatif (Papadia et al., 2008). Enfin, des travaux du laboratoire UMR (unité mixte de recherche) 1245 ont permis de souligner l'effet dual du glutamate en fonction de la couche corticale : pro-nécrotique dans les couches profondes matures et anti-apoptotique dans les couches superficielles immatures (Desfeux et al., 2010).

Présent au niveau des pré-oligodendrocytes (Káradóttir et al., 2005 ; Salter et Fern, 2005 ; Micu et al., 2006), le R-NMDA participe à la régulation de leur différenciation et de

leur migration ainsi qu'à la régulation de la myélinisation (Li et al., 2013 ; Xiao et al., 2013). Il a aussi récemment été mis en évidence que la stimulation du récepteur mobilise le transporteur de glucose GLUT1 et entraîne son incorporation au sein de la myéline. Il participe ainsi au métabolisme énergétique oligodendrocytaire (Saab et al., 2016), ce qui suggère un rôle prépondérant dans la pathogenèse des lésions liées à un déficit énergétique.

La place centrale qu'occupent le glutamate et son récepteur NMDA dans le cerveau immature suggère qu'une inhibition du R-NMDA au cours du développement pourrait altérer les fonctions supérieures à l'âge adulte (Deutsch et al., 1998 ; Anand et Scalzo, 2000). L'altération quantitative ou qualitative du R-NMDA serait impliquée dans la survenue de pathologies comme la schizophrénie (Gargiulo et Landa De Gargiulo, 2014 ; Vukadinovic, 2014 ; Cohen et al., 2015 ; Catts et al., 2016) ou le syndrome d'alcoolisation fœtal (Olney et al., 2001, 2002 ; Möykkynen et Korpi, 2012).

h Récepteur NMDA et cascade d'excitotoxicité

Alors que le récepteur NMDA et son agoniste le glutamate participent à la neurogenèse, ils sont aussi au centre de la cascade d'excitotoxicité, à l'origine des lésions cérébrales (Volpe, 2009). Les effets toxiques du glutamate ont été décrits pour la première fois en 1957 sur la rétine de souriceau après une injection sous-cutanée de glutamate (Lucas et Newhouse, 1957). Olney met en évidence en 1969 un effet toxique sur la rétine de souriceau lié à l'action prolongée ou excessive du glutamate (Olney, 1969), ainsi que des lésions cérébrales chez le singe après injection de glutamate (Olney et Sharpe, 1969). Par la suite, les acides aminés neurotoxiques font l'objet de nombreuses études *in vivo* dans les années 1980 (Coyle et al., 1981 ; McGeer et McGeer, 1982). En 1986, Olney introduit la notion d'excitotoxicité, définie par une mort neuronale induite par une stimulation excessive des récepteurs aux acides aminés excitateurs (Olney, 1986). Plus tard, les travaux de Choi permettent de mettre en relation les flux calciques liés au récepteur NMDA et la survenue des effets toxiques du glutamate, mettant ainsi en exergue les acteurs clés du phénomène d'excitotoxicité (Choi, 1987, 1992).

Le *primum movens* du phénomène d'excitotoxicité est le déficit énergétique lié à une situation d'hypoxo-ischémie ou d'inflammation, traduisant une inadéquation entre les apports et les besoins énergétiques des cellules nerveuses (Figure 29). L'excitotoxicité

conduit à la mort cellulaire par plusieurs mécanismes : la nécrose, l'apoptose et l'autophagie (Wang et Qin, 2010). Le déficit en oxygène et en nutriments entraîne une altération du métabolisme oxydatif mitochondrial qui aboutit à un effondrement des réserves énergétiques (ATP, Adénosine Tri Phosphate). La défaillance énergétique provoque une inhibition des pompes Na^+/K^+ ATP dépendantes, ce qui empêche le maintien des gradients ioniques de part et d'autre de la membrane et aboutit à une dépolarisation neuronale. En se dépolarisant, les neurones glutamatergiques vont libérer massivement du glutamate dans la fente synaptique. Les systèmes de recapture du glutamate ATP-dépendants (EAAT, *excitatory amino acid transporter*), présents notamment aux niveaux astrocytaire, neuronal et vasculaire, sont rapidement saturés (Perego et al., 2000). Ces évènements vont s'accompagner d'importantes modifications des flux ioniques à l'origine des mécanismes entraînant la mort cellulaire.

La libération massive du glutamate entraîne une stimulation importante des récepteurs AMPA/kaïnate qui provoque une entrée de sodium dans le milieu intracellulaire. Cet influx ionique provoque un œdème cellulaire et une mort précoce de la cellule par nécrose (Bonde et al., 2005).

De plus, l'activation des récepteurs NMDA et des canaux calciques voltage-dépendants va entraîner un influx massif de calcium au sein de la cellule. L'augmentation des concentrations intracellulaires de Ca^{2+} est accentuée par la mobilisation du *pool* réticulaire calcique suite à l'activation de la voie de l'inositol triphosphate (IP3) *via* l'activation des récepteurs glutamatergiques métabotropiques. Cette concentration intracellulaire excessive de Ca^{2+} va conduire à l'activation de protéases (dégradant le cytosquelette) et de lipases (comme la phospholipase A2 dégradant les lipides membranaires et générant des radicaux libres), l'activation de la calmoduline, la production de monoxyde d'azote (NO) par activation de la NO synthase (Lau et Tymianski, 2010) et l'induction de gènes impliqués dans l'expression ou la régulation du processus apoptotique (Gavaldà et al., 2008). Le fonctionnement des mitochondries peut lui aussi être altéré par l'influx calcique massif, entraînant la production de radicaux libres (Reynolds et Hastings, 1995). Le récepteur NMDA occupe une place décisive au sein de la cascade excitotoxique. Son importance est notamment illustrée par la protection neuronale, obtenue de manière

expérimentale, en condition de blocage du récepteur par un antagoniste, le MK-801 (Foster et al., 1988).

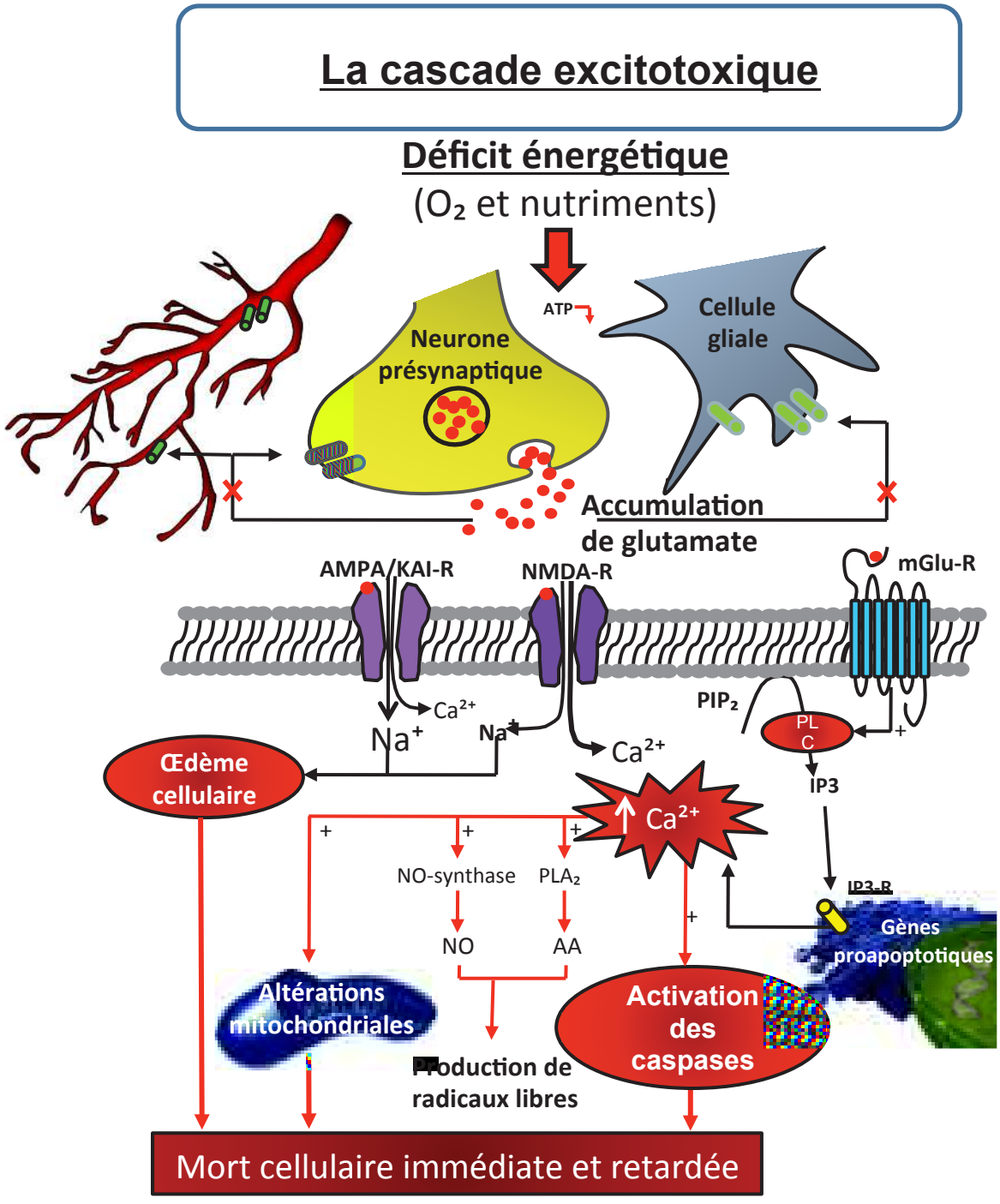


Figure 29 : Mécanismes moléculaires mis en jeu lors de la cascade excitotoxique.
La libération massive et incontrôlée du glutamate et le blocage de ses systèmes de recapture provoquent une accumulation du neurotransmetteur. La suractivation des récepteurs ionotropiques et métabotropiques modifie l'homéostasie ionique pouvant conduire à un œdème cellulaire, une augmentation excessive des concentrations de calcium intracellulaire, un stress oxydatif et l'activation des caspases. Selon l'intensité de ces différents processus, la cellule pourra dégénérer selon un mécanisme nécrotique (mort immédiate) ou apoptotique (mort retardée). AMPA/KAI-R : récepteur α-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole-propionate/kaïnate du glutamate, ATP : adénosine triphosphate, Ca2+ : calcium, Na+ : sodium, NMDA-R : récepteur N-méthyl-D-aspartate du glutamate.

IV Impact de la naissance prématurée sur le cerveau en développement

La naissance prématurée est à haut risque de lésions cérébrales. Un retard de la maturation cérébrale normale lié à la prématurité, associé à la survenue d'agressions aiguës ou chroniques, peut être responsable de ces lésions cérébrales (Volpe, 2009 ; Penn et al., 2016). Aux lésions cérébrales du prématuré, il peut s'ajouter une exposition non physiologique à certains facteurs neurotoxiques (par exemple des drogues, des facteurs de l'inflammation, des stimuli douloureux…) entraînant des trajectoires développementales anormales à l'origine de handicaps. Les étiologies et les mécanismes à l'origine de ces lésions sont complexes et multifactoriels, dépendant entre autres de la qualité des soins hospitaliers apportés aux nouveau-nés, de la survenue d'épisodes d'hypoxie tissulaire, d'infections materno-fœtales ou tardives, d'inflammation systémique, de l'exposition à des drogues ou des toxiques, de la prise en charge de la douleur aiguë et/ou chronique, du stress et/ou de la malnutrition (Back et Miller, 2014). Au-delà de ces facteurs de risque généraux, des facteurs individuels influencent la genèse des lésions cérébrales, comme le genre, la génétique, l'épigénétique, le statut socio-économique, ou encore l'intégrité de la cellule familiale. La compréhension de la pathogenèse des lésions cérébrales du prématuré reste un défi en raison des multiples étiologies possibles, et s'appuie sur les études cliniques de suivi des prématurés, la neuro-imagerie, l'accès (restreint) aux examens anatomopathologiques cérébraux d'enfants prématurés et les études précliniques chez l'Animal. Bien qu'indispensables car elles permettent notamment une approche mécanistique, les études chez l'Animal sont ciblées sur un ou éventuellement plusieurs types lésionnels (infection, inflammation, hypoxie-ischémie, excitotoxicité…), et ne reproduisent pas le panel physiopathologique des situations cliniques potentielles. Par conséquent, les informations apportées par les divers modèles animaux doivent être intégrées avec les résultats des études observationnelles chez le prématuré humain.

IV.1 *Anomalies de la substance grise*

Les enfants prématurés disposent d'un volume cortical réduit et d'une perte de la substance grise sous-corticale, notamment au niveau du thalamus et des noyaux gris centraux. Le degré de prématurité, l'étendue du volume cortical et le devenir

neurodéveloppemental sont directement corrélés (Counsell et Boardman, 2005 ; Ment et Vohr, 2008 ; Ball et al., 2012). Parallèlement à la perte de volume cortical, il existe une altération de la microstructure du cortex cérébral mise en évidence notamment par des études de tractographie par imagerie par résonnance magnétique (IRM) en tenseur de diffusion, suggérant un retard de développement de la croissance des processus neuronaux dans le cortex cérébral (Ball et al., 2012, 2013 ; Vinall et al., 2013a). Le défaut de croissance corticale est aussi associé à des anomalies de l'arborisation dendritique et de la formation synaptique (Dean et al., 2013). La neurogenèse semble également atténuée en cas de naissance prématurée au niveau des zones germinatives corticales (ZV et ZSV) (Malik et al., 2013). Par ailleurs, le volume des noyaux amygdaliens est réduit, ce qui pourrait altérer les capacités de traitement de la peur chez les enfants prématurés (Cismaru et al., 2016). L'ensemble de ces anomalies morphologiques et structurelles du cortex pourraient contribuer aux difficultés cognitives et aux troubles des apprentissages décelés chez les enfants en cas de prématurité (Penn et al., 2016).

IV.2 *Anomalies de la substance blanche*

Les anomalies de la substance blanche comprennent trois entités identifiables : les lésions nécrotiques de leucomalacie kystique, les microlésions focales nécrotiques et les lésions diffuses non nécrotiques de la substance blanche (Back, 2014). Alors que la leucomalacie kystique périventriculaire était fréquente au cours des dernières décennies, l'amélioration de la prise en charge globale des prématurés a permis une évolution des atteintes de la substance blanche vers des lésions non nécrotiques diffuses (Back et Miller, 2014). Ces lésions sont à l'origine d'une diminution du volume de la substance blanche et de troubles de la myélinisation (Ment et al., 2009). Chez l'Homme, le développement de la substance blanche débute au cours de la deuxième moitié de la gestation et se poursuit après la naissance jusqu'à l'adolescence. La naissance prématurée (entre 23 et 32 SA) intervient par conséquent pendant une fenêtre critique de vulnérabilité pour les cellules gliales en cours de développement.

Les lésions diffuses de la substance blanche sont associées à un programme de développement retardé ou perturbé des cellules de la lignée oligodendrocytaire, en particulier des cellules précurseurs des oligodendrocytes (Back et Miller, 2014).

L'interruption de la différenciation des pré-oligodendrocytes se traduit par l'accumulation des précurseurs et des pré-oligodendrocytes (Buser et al., 2012). En cas de lésion aiguë, le nombre de pré-oligodendrocytes, particulièrement vulnérables au stress oxydatif, diminue fortement. Afin de lutter contre cette dégénérescence, les précurseurs oligodendrocytaires prolifèrent rapidement pour régénérer le pool de pré-oligodendrocytes. Cette nouvelle génération de pré-oligodendrocytes ne parviendra pas à réussir sa maturation pour devenir des oligodendrocytes matures en raison d'un environnement lésionnel riche en gliose (astrocytes et microglie) (Back, 2014). Plusieurs mécanismes pourraient être impliqués dans l'accumulation et l'absence de maturation des pré-oligodendrocytes, notamment l'accumulation d'un inhibiteur de maturation, l'acide hyaluronique, issu des astrocytes environnants (Marret et al., 1997 ; Back et al., 2005), l'activation de la microglie entraînant l'inhibition de la maturation des oligodendrocytes, ou encore des dysrégulations de protéines, comme p27Kip1, intervenant dans la maturation de la lignée oligodendrocytaire (Jablonska et al., 2012).

Les axones semblent épargnés en cas de lésions diffuses de la substance blanche, alors qu'ils sont détruits en cas de lésions focales nécrotiques (Riddle et al., 2012). Des études de tractographie des zones lésées suggèrent des anomalies de développement des fibres axonales (Hüppi et al., 2001 ; Miller et al., 2002). Ces données sont cohérentes avec la notion que la croissance axonale est très importante au cours du dernier trimestre de gestation chez l'Homme, et que la prématurité peut ralentir ou perturber ce processus.

Enfin, l'atteinte potentielle des neurones de la sous-plaque dans la pathogenèse des lésions de la substance blanche du prématuré reste une question ouverte. En effet, d'une part cette zone joue un rôle fondamental dans l'organisation du cortex et dans les connexions thalamo-corticales (Hoerder-Suabedissen et Molnár, 2015), et d'autre part l'épaisseur de la sous-plaque est maximale entre 22 et 37 SA (Kostovic et Rakic, 1990). En cas de leucomalacie périventriculaire, il existe un déficit quantitatif des neurones de la substance blanche, notamment au niveau de la sous-plaque (Kinney et al., 2012), perturbant ainsi les connexions thalamo-corticales (McQuillen et al., 2003). Les lésions diffuses de la substance blanche sont associées à des phénomènes de gliose au niveau de la sous-plaque, confirmant la vulnérabilité cellulaire complexe de cette zone (Pogledic et al., 2014).

IV.3 *Hémorragies intracrâniennes*

Les hémorragies intraventriculaires sont des complications fréquentes liées à la naissance prématurée. Ces hémorragies proviennent typiquement de la matrice germinale périventriculaire, zone riche en précurseurs neuronaux et gliaux, hautement vascularisée et particulièrement vulnérable aux hémorragies. L'épaisseur de la matrice germinale diminue à partir de 24 SA et cette dernière disparaît vers 36-37 SA. Lorsque l'hémorragie de la matrice germinale est importante, elle entraîne une rupture de l'épendyme sous-jacent et progresse dans le ventricule latéral. Ces hémorragies sont classées en quatre grades selon la classification de Papile : grade I, hémorragie sous-épendymaire isolée ; grade II, hémorragie intra-ventriculaire sans dilatation ventriculaire ; grade III, hémorragie intra-ventriculaire avec dilatation ventriculaire ; grade IV hémorragie intra-ventriculaire associée à une hémorragie parenchymateuse (Papile et al., 1978). La pathogenèse des hémorragies intraventriculaires est complexe. Tout d'abord, la vascularisation de la matrice germinale est fragile en raison, notamment, d'une densité en péricytes réduite comparée à la substance blanche et au cortex (Braun et al., 2007), d'un déficit en fibronectine au niveau de la lame basale (Xu et al., 2008), et d'une réduction de l'expression de GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) dans les extrémités des astrocytes (Liedtke et al., 1996 ; El-Khoury et al., 2006). Ensuite, le débit sanguin cérébral est perturbé en cas de prématurité. En effet, les nouveau-nés prématurés présentant une détresse respiratoire peuvent avoir un débit sanguin cérébral fluctuant, ce qui est fortement associé à la survenue des hémorragies intraventriculaires (Perlman et al., 1983, 1985). Par ailleurs, il existe une altération de l'autorégulation du débit sanguin cérébral du prématuré, variable dans le temps et corrélée avec le poids de naissance et l'âge gestationnel (Soul et al., 2007), mais dont le rôle dans la survenue des hémorragies intraventriculaires reste à préciser (Ballabh, 2014). Enfin, l'hémostase du nouveau-né prématuré est parfois perturbée (thrombopathie, thrombopénie, anomalies des facteurs de coagulation), ce qui peut aggraver le processus hémorragique.

V Stratégies de neuroprotection chez le prématuré

Afin de limiter les effets délétères potentiels de la naissance prématurée sur le cerveau en développement, l'élaboration de stratégies de neuroprotection est indispensable. Alors que certaines interventions ont déjà démontré leur efficacité sur le devenir neurocognitif de l'enfant né prématuré, d'autres font encore l'objet d'évaluation (Berger et Söder, 2015 ; Chang, 2015 ; Jelin et al., 2016).

V.1 *Période anténatale*

Les risques d'anomalies du développement neurologique étant étroitement liés au degré de la prématurité (Moore et al., 2012), la prévention de l'accouchement prématuré est probablement la stratégie la plus efficace de neuroprotection néonatale. Le collège américain des obstétriciens gynécologues (ACOG) propose en cas d'antécédent de naissance prématurée ou de diminution de la longueur du col de l'utérus trois options à considérer : la progestérone, le cerclage du col ou l'utilisation d'un pessaire (Committee on Practice Bulletins—Obstetrics, The American College of Obstetricians and Gynecologists, 2012). Une fois la mise en travail diagnostiquée, les obstétriciens ont le choix parmi une variété de tocolytiques afin de tenter de retarder au maximum la naissance prématurée (Navathe et Berghella, 2016). Le transfert *in utero* vers une maternité de niveau III en cas de grossesse à haut risque permet l'optimisation de la prise en charge obstétricale et néonatale et l'amélioration globale du devenir du prématuré (Chien et al., 2001). En cas de menace d'accouchement prématuré, l'administration anténatale de corticoïdes, initialement prévue pour diminuer le taux de syndrome de détresse respiratoire néonatale du prématuré (Liggins et Howie, 1972), est associée à une diminution de l'ensemble des comorbidités liées à la prématurité, notamment une réduction des hémorragies intraventriculaires (Roberts et Dalziel, 2006 ; Roberts et al., 2017). La posologie à administrer (12 ou 24 mg de bétamethasone par cure), le nombre de cures possibles et le terme maximal d'utilisation font l'objet actuellement de discussions compte tenu du potentiel effet délétère des corticoïdes sur les nouveau-nés naissant finalement à terme et ne bénéficiant alors pas des effets bénéfiques escomptés (Harding et Dalziel, 2016 ; Vidaeff et al., 2016b, 2016a). Un essai randomisé français en cours, Betadose (identifiant ClinicalTrials.gov : NCT02897076), a pour but d'évaluer l'effet de 12 mg de bétamethasone *versus* 24 mg. Enfin, l'administration

intraveineuse de sulfate de magnésium avant l'accouchement, améliore le pronostic neurologique du prématuré (voir chapitre VII : Le sulfate de magnésium).

V.2 *Période périnatale*

La standardisation et l'amélioration de la prise en charge des nouveau-nés en salle de naissance grâce notamment aux nouvelles recommandations internationales (*International Liaison Committee on Resuscitation*, ILCOR) (Perlman et al., 2015) et à l'avènement de la simulation (Rubio-Gurung et al., 2014) permettent une amélioration des conditions de naissance. Si l'impact immédiat de ces mesures a un effet sur la morbi-mortalité immédiate (DeMauro et al., 2013 ; Legendre et al., 2015 ; Mduma et al., 2015), l'effet sur le devenir neurologique à long terme reste à prouver.

Bien que la durée optimale avant clampage du cordon ne soit pas encore déterminée chez les prématurés, de nombreuses études suggèrent qu'un clampage retardé du cordon de plus de 30 secondes réduirait l'incidence des hémorragies ventriculaires (Backes et al., 2014 ; Chiruvolu et al., 2015 ; Ruangkit et al., 2015 ; Mercer et al., 2016). L'ACOG et l'ILCOR recommandent un clampage retardé du cordon en cas de naissance prématurée (Committee on Obstetric Practice, American College of Obstetricians and Gynecologists, 2012 ; Perlman et al., 2015). Une alternative au clampage retardé est la traite du cordon ou *milking* (Jaiswal et al., 2015 ; Rabe et al., 2016), mais sa non-infériorité reste à confirmer.

V.3 *Période postnatale*

Après la stabilisation du nouveau-né en salle de naissance, le séjour en réanimation/soins intensifs fait l'objet de nombreuses interventions médicales qui peuvent avoir un impact bénéfique potentiel indirect sur le développement neurologique de l'enfant. Il a été démontré que la dysplasie bronchopulmonaire sévère, les infections néonatales, l'entérocolite ulcéronécrosante, ou le retard de croissance extra-utérin pouvaient altérer le devenir neurologique des prématurés (Short et al., 2007 ; Neubauer et al., 2008 ; Mitha et al., 2013 ; Keunen et al., 2015). Ainsi, des stratégies spécifiques de prévention de ces complications de la prématurité s'inscrivent indirectement dans le cadre des stratégies de neuroprotection du prématuré.

Administrée en prévention des apnées des prématurés, la caféine semble améliorer la survie sans déficit neurodéveloppemental à 18-21 mois (Schmidt et al., 2007), mais cet effet n'est pas confirmé à 5 ans (Schmidt et al., 2012).

Les soins de développement de type NIDCAP (*Newborn Individualized Developmental Care and Assessment Program*) améliorent également le devenir à court et long terme des prématurés, ainsi que leur confort pendant la période d'hospitalisation et la relation avec les parents (Peters et al., 2009 ; McAnulty et al., 2012). Par ailleurs, la reconnaissance de la réalité de la douleur du nouveau-né et de ses conséquences à long terme, la réflexion sur la diminution du nombre d'actes douloureux au cours de l'hospitalisation et la prévention de la douleur en cas d'acte douloureux indispensable, participent aussi à la neuroprotection du prématuré (voir chapitre VIII.2 : La douleur du nouveau-né).

Enfin, le choix de l'anesthésique et/ou analgésique efficace sur le nouveau-né et potentiellement le moins délétère sur le cerveau immature doit être pris en compte par le clinicien en cas de nécessité de sédation (voir chapitre VIII : Les agents anesthésiques en période périnatale : le rémifentanil).

Des stratégies pharmaceutiques émergentes sont en cours d'évaluation. La mélatonine (Colella et al., 2016), l'érythropoïétine ou la darbepoïétine (Messier et Ohls, 2014), les cellules souches (Paton et al., 2017), l'œstradiol ou la progestérone (Berger et Söder, 2015) sont des candidats potentiels à l'amélioration du devenir neurologique des prématurés.

VILe sulfate de magnésium

Le magnésium, du fait de ses multiples propriétés biologiques, a fait l'objet de nombreuses études expérimentales et cliniques évaluant son action neuroprotectrice.

VI.1 *Propriétés du magnésium*

Le magnésium est le second cation intracellulaire après le potassium. Comme ce dernier, c'est un ion essentiellement intracellulaire dont la concentration varie entre 0,1 et 3 mmol/L. L'organisme contient environ 16 mmol/kg de magnésium, soit environ 24 grammes (1 mole) chez l'adulte. Le tissu osseux renferme plus de 60 % du magnésium total de l'organisme. Seule une fraction du magnésium osseux intervient dans les échanges avec le magnésium plasmatique, il s'agit du magnésium présent à la surface des cristaux d'hydroxyapatite, libéré lors de la résorption osseuse. Le muscle contient lui 30 à 40% du magnésium total. Le magnésium extracellulaire ne représente que 1% du magnésium total. La concentration plasmatique est de l'ordre de 0,9 ± 0,1 mmol/L, dont 60% se trouve sous la forme ionisée, active dans de nombreuses réactions physiologiques, et 40% est lié à l'albumine ou complexé à des anions. L'équilibre entre les apports et les pertes de magnésium est assuré principalement par les variations de la réabsorption tubulaire rénale (de Rouffignac et Quamme, 1994).

Le magnésium est un cation ubiquitaire dans le corps humain. Cofacteur de nombreux systèmes enzymatiques, il est impliqué dans plus de 300 réactions enzymatiques différentes. Le magnésium intervient dans le contrôle de la respiration mitochondriale. Il est indispensable aux réactions dépendantes de l'ATP car il active les enzymes impliquées dans le transfert du groupe phosphate en s'intercalant par des liaisons électrostatiques entre deux atomes d'oxygène chargés négativement. La forme intracellulaire active de l'ATP correspond en fait à un complexe Mg^{2+}/ATP (Panov et Scarpa, 1996). Le magnésium intervient donc dans l'activité de nombreuses ATPases, en particulier la Na^{+}/K^{+}ATPase et les Ca^{2+}/ATPases membranaires. De même, l'activité adénylcyclase de la cellule, catalysant la synthèse d'AMPc à partir de l'ATP, est dépendante du magnésium. Le magnésium intervient également lors de la synthèse des acides nucléiques, la glycolyse, la béta-oxydation, la phosphorylation oxydative, la synthèse protéique et le cycle de Krebs.

VI.2 *Actions cellulaires du magnésium*

VI.2.1 Au niveau cardiovasculaire

Le magnésium agit comme antagoniste compétitif du calcium au niveau des canaux calciques voltage-dépendants de type L et du canal calcique du réticulum sarcoplasmique (canal-récepteur à la ryanodine). Il limite ainsi la concentration cytosolique de calcium. Le magnésium agit aussi sur les canaux potassiques en inhibant les courants de rectification (Williams et Beatch, 1997). En intervenant sur les différents systèmes contrôlant les mouvements calciques intracellulaires, le magnésium agit comme régulateur des flux calciques. La résultante hémodynamique de l'action anticalcique du magnésium est un effet inotrope négatif, une vasodilatation périphérique et une tendance à la tachycardie. Par ailleurs, l'exposition anténatale au magnésium semble stabiliser la tension artérielle des nouveau-nés prématurés (Rantone et al., 2002).

VI.2.2 Au niveau neuromusculaire

A forte concentration, le magnésium peut bloquer la transmission neuromusculaire, à la fois par blocage des canaux calciques qui stimulent la libération d'acétylcholine, et par diminution de la sensibilité à l'acétylcholine des récepteurs post-synaptiques. Une hypomagnésémie entraîne une hyperexcitabilité musculaire alors qu'une hypermagnésémie est responsable d'une paralysie progressive (Ayuk et Gittoes, 2014).

VI.2.3 Au niveau du système nerveux central

Le magnésium est un antagoniste du récepteur NMDA. Au potentiel de repos, le glutamate est incapable d'activer le récepteur NMDA, car le canal est bloqué par des ions magnésium. Une légère dépolarisation permet l'expulsion des ions magnésium et ainsi le récepteur peut être activé. Le magnésium inhibe aussi la libération de glutamate, ce qui participe à la diminution de la mort cellulaire en condition d'hypoxo-ischémie (Kang et al., 2011). Par ailleurs, le magnésium semble diminuer le vasospasme et donc améliorer le débit sanguin cérébral (Odom et al., 2013).

VI.2.4 Autres actions

Le magnésium est aussi antiagrégant plaquettaire (diminution du thromboxane-A2, augmentation de l'AMPc) et anti-inflammatoire (diminution de cytokines pro-inflammatoires

notamment l'interleukine 6, diminution de la production de radicaux libres) (Lamarca et al., 2011 ; Sugimoto et al., 2012 ; Van Laecke et al., 2012). Il agit aussi au niveau de la réponse immunitaire (Wu et Veillette, 2011). Le magnésium semble potentialiser l'effet de certains médicaments (effets cardiovasculaires et neuromusculaires des bêtamimétiques, des bloqueurs calciques, des curares, de la gentamicine) (L'Hommedieu et al., 1983).

VI.3 *Hypermagnésémie*

Sur le plan clinique, l'hypermagnésémie (>5mmol.L^{-1}) provoque un blocage progressif de la transmission neuromusculaire avec une diminution des réflexes ostéotendineux et peut entraîner jusqu'à une paralysie des muscles respiratoires. L'effet des curares en anesthésie est potentialisé par l'hypermagnésémie. L'hypermagnésémie peut également provoquer des troubles de la conscience qui peuvent aller jusqu'au coma profond. Sur le plan cardiaque, les manifestations précoces de l'hypermagnésémie sont marquées par une bradycardie et une hypotension. L'effet calcium-bloqueur du magnésium retentit sur la conduction avec un risque de bloc auriculo-ventriculaire complet, voire d'arrêt cardiaque. Des nausées, des vomissements, des maux de tête, des flushs et des palpitations peuvent être fréquemment observés (Ayuk et Gittoes, 2014).

VI.4 *Indications thérapeutiques actuelles du magnésium*

En pratique clinique, le magnésium est utilisé sous forme de sulfate de magnésium. Le choix entre le sulfate ou le chlorure de magnésium semble être motivé par des habitudes cliniques plutôt que par des données pharmacologiques ou toxicologiques (Durlach et al., 2005). Le magnésium fait l'objet de diverses indications thérapeutiques. En cardiologie, il est utilisé dans le traitement des torsades de pointe, des tachycardies ventriculaires résistantes et des arythmies ventriculaires dues à une intoxication digitalique (Tzivoni et Keren, 1990). En anesthésie-réanimation, le magnésium est utilisé pour contrôler l'hypertension artérielle, en cas de crise paroxystique adrénergique du phéochromocytome (James et Cronjé, 2004). Il est utilisé en seconde intention pour le traitement des crises d'asthme aigu grave, du fait de son action anticalcique et donc bronchodilatatrice sur le muscle lisse bronchique (Silverman et al., 2002 ; Herroeder et al., 2011), mais cette indication reste encore controversée (L'her, 2002 ; Goodacre et al., 2014 ; Kew et al., 2014). Il n'y a pas de preuve scientifique suffisante pour l'utilisation en pratique clinique du magnésium dans la prise en charge de l'infarctus du

myocarde, de l'accident vasculaire cérébral et de l'arrêt cardiaque (Herroeder et al., 2011). En obstétrique, une méta-analyse (*Cochrane Database*) recommande l'utilisation du sulfate de magnésium en cas de prééclampsie sévère avec présence de signes neurologiques (Duley et al., 2010). En effet, il limite à la fois le risque d'évolution vers l'éclampsie et le taux de mortalité maternelle. Il est aussi le traitement de choix de l'éclampsie et diminue la récidive des crises convulsives (Euser et Cipolla, 2009 ; Vigil-De Gracia et Ludmir, 2015). En revanche, le sulfate de magnésium n'est plus recommandé en tant qu'agent tocolytique car son efficacité n'est pas démontrée (Grimes et Nanda, 2006 ; Han et al., 2013 ; McNamara et al., 2015), et les hautes doses utilisées (à partir de 50 grammes) peuvent entraîner une surmortalité pédiatrique (Pryde et Mittendorf, 2009).

VI.5 *Effets potentiels du magnésium sur le cerveau immature*

Au vu des différentes propriétés biologiques du magnésium, il semble se dégager des effets bénéfiques potentiels dans le cadre de la neuroprotection :

- modification du dysfonctionnement cellulaire
- anti-inflammatoire
- blocage non compétitif, voltage-dépendant, du récepteur NMDA
- inhibition de la libération de glutamate
- hémodynamique (stabilisation de la pression artérielle, augmentation du débit sanguin cérébral)

Mais certaines actions du magnésium peuvent potentiellement être délétères sur le cerveau immature, notamment ses effets :

- antiagrégant-plaquettaire ;
- anticalcique (vasodilatation, hypotension artérielle, bradycardie, apnée) ;
- neuromusculaire ;
- potentialisateurs de certains médicaments (effets cardiovasculaires et neuromusculaires des bêtamimétiques, des bloqueurs calciques, des curares et de la gentamicine notamment).

VI.6 *Le magnésium et la neuroprotection*

VI.6.1 Chez l'Animal

Du fait de ses effets bénéfiques probables, le magnésium a depuis longtemps été considéré comme un bon candidat pour la neuroprotection. Depuis le milieu des années 1980, de nombreuses expérimentations animales ont cherché à mettre en évidence le rôle protecteur du magnésium sur le cerveau. Les expérimentations ont tout d'abord concerné des animaux adultes dans le cadre de modèles d'hypoxie, d'accident vasculaire ou de traumatismes crâniens. Ainsi en 1984, Vacanti et Ames mettent en évidence un effet neuroprotecteur du magnésium, dans un modèle d'ischémie de la moelle épinière de lapins adultes (Vacanti et Ames, 1984). En 1987, l'ajout de magnésium sur des tranches d'hippocampe de rats permet de diminuer l'effet de l'hypoxie (Clark et Rothman, 1987). McIntosh et collaborateurs démontrent en 1989 que l'injection post-traumatique de sulfate de magnésium diminue, de façon dose-dépendante, l'incidence des troubles neurologiques (McIntosh et al., 1989). En 1996, Marinov et collaborateurs constatent que chez le Rat, l'administration de sulfate de magnésium avant un épisode d'ischémie focale joue un rôle neuroprotecteur par blocage des récepteurs NMDA (Marinov et al., 1996).

Compte tenu des résultats prometteurs sur le cerveau adulte, des études ont été menées sur des modèles animaux de lésions cérébrales périnatales. L'effet neuroprotecteur du magnésium a été évalué au travers de plusieurs modèles lésionnels.

a Injection intracérébrale d'agonistes glutamatergiques

McDonald en 1990 démontre que les lésions cérébrales induites par une injection intra-striatale de NMDA sont moins importantes après injection intra-péritonéale de sulfate de magnésium chez le rat âgé de 7 jours (McDonald et al., 1990). Marret en 1995 utilise un modèle d'injection intracérébrale d'iboténate chez le souriceau (Marret et al., 1995a). Les lésions cérébrales induites par l'iboténate chez le souriceau peuvent être assimilées par certains aspects à celles observées chez le prématuré humain. Les effets du magnésium sont différents en fonction de la maturité développementale des souriceaux. Ainsi, à 5 jours de vie, l'injection intra-péritonéale de sulfate de magnésium diminue la taille des lésions cérébrales induites par l'iboténate. En revanche, le magnésium ne modifie pas l'étendue de la lésion cérébrale si l'injection a lieu le jour de la naissance ou à 10 jours de vie. Ces

résultats mettent en évidence à la fois un effet bénéfique du magnésium sur le cerveau immature lésé et aussi la notion de fenêtre thérapeutique en dehors de laquelle le magnésium est inefficace. La maturité développementale des cerveaux de souris à P2 équivaut schématiquement à celle des cerveaux humains à 24 semaines d'aménorrhée, et la maturité des cerveaux à P10 équivaut à celle des cerveaux de nouveau-nés à terme (Marret, 2003). Ainsi, l'injection du sulfate de magnésium à visée neuroprotectrice chez l'homme semblerait être optimale entre 26 et 41 semaines d'aménorrhée.

b Hypoxie-ischémie cérébrale focale (de type Rice-Vannuci)

Le modèle lésionnel consiste à ligaturer une des artères carotidiennes puis à soumettre les animaux à une atmosphère hypoxique pendant une à deux heures (8% d'oxygène, 92% d'azote) (Rice et al., 1981). Les lésions cérébrales observées du côté de la ligature sont comparables à celles retrouvées chez l'Homme en cas d'ischémie cérébrale.

L'injection de magnésium après l'épisode d'hypoxie-ischémie ne modifie pas la mortalité neuronale à P7 chez le Rat (Galvin et Oorschot, 1998) ou à P1 chez le porcelet (Penrice et al., 1997 ; Greenwood et al., 2000). En revanche, à P7 chez le Rat, une réduction de la taille de la lésion cérébrale est observée en cas d'administration de magnésium en bolus avant un épisode d'hypoxo-ischémie (Sameshima et al., 1999), ainsi qu'une diminution de l'apoptose hippocampique, évaluée par la méthode TUNEL (*TdT-mediated-dUTP nick-end labelling*) (Türkyilmaz et al., 2002). Enfin, les rats ayant été exposés au magnésium à P7 avant la procédure Rice-Vannuci présentent de meilleures performances sensori-motrices à l'âge adulte (Pazaiti et al., 2009). L'effet neuroprotecteur du sulfate de magnésium et le concept de fenêtre d'utilisation sont à nouveau mis en évidence par ces études animales.

c Hypoxie seule

Chez le porcelet nouveau-né, âgé de deux jours, intubé et ventilé en condition d'hypoxie (fraction inspiratoire en oxygène (FiO_2) de 0,05 à 0,07), l'administration de sulfate de magnésium prévient les modifications de la membrane nucléaire des neurones et réduit ainsi la transcription de facteurs pro-apoptotiques calcium-dépendants (Mami et al., 2006a). Avec le même protocole expérimental, il a été mis en évidence que le magnésium prévenait l'augmentation de l'activité de certaines protéines kinases ainsi que la production excessive de radicaux libres (Mami et al., 2006b). Le magnésium permet aussi le maintien du niveau

d'activité des pompes Na^+/Ca^{2+} ATPases, du nombre de récepteurs NMDA et diminue les altérations membranaires (Hoffman et al., 1994). Dans un modèle *in vitro* d'hypoxie, des cultures de pré-oligodendrocytes de rats ont montré davantage de résistance en cas de traitement par du sulfate de magnésium (Itoh et al., 2016)

Par ailleurs, il a été démontré que le sulfate de magnésium, injecté en sous-cutané chez des rates gestantes, traverse la barrière placentaire et la barrière hémato-encéphalique pour atteindre la circulation cérébrale fœtale en 1 heure (Hallak et Cotton, 1993). L'injection de magnésium à des cobayes gestantes avant un épisode hypoxique permet la prévention de l'augmentation intracérébrale de radicaux libres (Maulik et al., 1999). L'injection une heure après l'hypoxie, permet de limiter les altérations membranaires et de l'ADN par maintien des concentrations extracellulaires de magnésium (Maulik et al., 2001).

Au total, l'impact du sulfate de magnésium sur le cerveau immature animal semble bénéfique, mais la période, la durée et la dose de l'injection ne sont pas consensuelles.

VI.6.2 Chez l'Homme

Le sulfate de magnésium est utilisé depuis longtemps en obstétrique chez la mère : en cas de prééclampsie pour limiter le risque d'évolution vers l'éclampsie (Duley et al., 2010) et comme agent tocolytique, bien que son utilisation dans cette indication ne soit plus recommandée (Pryde et Mittendorf, 2009). Dans ces situations, le fœtus est exposé passivement au sulfate de magnésium. En effet, comme chez l'Animal, la concentration en magnésium augmente chez le fœtus après une administration maternelle (Hallak et al., 1993), de façon corrélée à la concentration observée chez la mère (Borja-Del-Rosario et al., 2014 ; Sherwin et al., 2014). Ce passage actif et rapide transplacentaire du magnésium a motivé l'élaboration d'essais évaluant le devenir des nouveau-nés exposés *in utero* au magnésium pour cause maternelle.

a Etudes observationnelles

De nombreuses études d'observation ont évalué le développement neurologique des nouveau-nés ayant reçu du sulfate de magnésium en période anténatale pour cause obstétricale. Une étude cas-témoins d'enfants de faible poids de naissance (inférieur à 1500 grammes) a mis en évidence une réduction importante du risque de paralysie cérébrale à trois ans dans le groupe exposé au sulfate de magnésium pendant le travail (*odd ratio* (OR)

0,14 ; intervalle de confiance (IC) 95% : 0,05-0,51) (Nelson et Grether, 1995). Schendel et collaborateurs ont également mis en évidence une association entre l'exposition anténatale au sulfate de magnésium et la diminution du risque de survenue de paralysie cérébrale ou de retard mental au sein d'une cohorte d'enfants de faible poids de naissance suivie jusqu'à 3-5 ans (OR : 0,11 ; IC 95% : 0,02-0,81) (Schendel et al., 1996). Cependant, l'association devenait non significative après ajustement des facteurs confondants. D'autres études observationnelles ne mettent pas en évidence de bénéfice de l'exposition anténatale au sulfate de magnésium sur le risque de survenue de déficits neurologiques (Leviton et al., 1997 ; Paneth et al., 1997 ; O'Shea et al., 1998 ; Canterino et al., 1999 ; Boyle et al., 2000 ; Grether et al., 2000 ; Weintraub et al., 2001). Une méta-analyse de l'ensemble de ces études observationnelles a montré que l'exposition anténatale au sulfate de magnésium était associée à un risque réduit de mortalité (risque relatif (RR) 0,73 ; IC 95% 0,61-0,89) et de paralysie cérébrale (OR 0,64 ; IC 95% 0,47-0,89) (Wolf et al., 2012).

b Essais randomisés contrôlés

Compte tenu des propriétés biologiques potentiellement bénéfiques du sulfate de magnésium, ainsi que de son effet neuroprotecteur démontré par les études sur les animaux et suggéré par les études observationnelles chez l'Homme, des protocoles de recherche clinique chez l'Homme ont été mis en place. Il existe quatre essais randomisés contrôlés multicentriques à visée de neuroprotection cérébrale chez le grand prématuré (dans l'ordre chronologique, MagNet pour *Magnesium and Neurologic endpoint trial*, ACTOMgSO_4 pour *Australian Collaborative Trial of Magnesium Sulphate*, Premag et Beam pour *Beneficial effect of antenatal magnesium trial*) et un essai à visée de prévention de l'éclampsie chez les femmes en prééclampsie (Magpie pour *Magnesium sulphate for prevention of eclampsia*).

i L'essai MagNet (Mittendorf et al., 2002)

Cent quarante-neuf femmes en menace d'accouchement prématuré entre 25 et 33 semaines d'aménorrhée ont été incluses dans un seul centre aux Etats-Unis entre octobre 1995 et janvier 1997 (165 fœtus). Les grossesses triples, la présence de signes cliniques d'infection ou de prééclampsie étaient des critères d'exclusion. Une stratification a été faite sur l'origine ethnique, l'âge gestationnel (25-28 semaines et 28-33 semaines) et le nombre

de fœtus (grossesse monofœtale ou gémellaire). Il y avait deux stratégies de traitement selon la dilatation cervicale à l'admission. Les femmes présentant une dilatation cervicale ≤ 4 cm étaient considérées candidates pour une tocolyse avec du sulfate de magnésium (bras « tocolyse »). Après randomisation, un groupe recevait un bolus de sulfate de magnésium de 4 grammes, suivi d'une dose d'entretien de 2-3 grammes par heure, l'autre groupe recevait un autre agent tocolytique choisi par l'obstétricien. Les femmes présentant une dilatation cervicale > 4 cm à l'admission étaient incluses dans le bras « prévention ». Les femmes recevaient soit un bolus de sulfate de magnésium (4 grammes), soit un bolus de sérum physiologique. En janvier 1997, l'étude a été suspendue en raison d'une mortalité périnatale plus importante dans le groupe magnésium du bras tocolytique, lors de l'étude intermédiaire (Mittendorf et al., 1997). L'interruption prématurée de l'essai a considérablement été commentée (Bénichou et al., 1998 ; Crowther et al., 1998 ; Grether et al., 1998 ; Leveno, 1998). La différence de mortalité pouvait être expliquée par l'utilisation d'une dose importante de magnésium, mais aussi par une méthodologie critiquable. En effet, le taux de décès dans le groupe magnésium était semblable à celui de la population des enfants nés prématurément (11%), alors que le taux de mortalité du groupe placebo était anormalement bas (1,4%). De plus les causes de décès observées dans le groupe traitement étaient des causes fréquentes pour d'anciens prématurés (mort subite du nourrisson, syndrome transfuseur-transfusé, anomalies congénitales), difficilement imputables au magnésium. Enfin, l'effet confondant des grossesses multiples n'avait pas été pris en compte, alors qu'il y avait plus de jumeaux dans le groupe magnésium.

ii L'essai ACTOMgSO$_4$ (Crowther et al., 2003)

Mille soixante-deux femmes en menace d'accouchement prématuré à moins de 30 semaines d'aménorrhée, et dont l'accouchement survenait dans les 24 heures, recrutées dans 16 centres d'Australie et de Nouvelle-Zélande entre février 1996 et janvier 2000 ont été incluses (soit 1255 fœtus randomisés). Les critères d'exclusion étaient les accouchements imminents, une contre-indication au magnésium, ou une exposition préalable au magnésium pendant la grossesse. Une stratification sur le centre et le nombre de fœtus (grossesse monofœtale ou gémellaire) était réalisée. Les critères de jugement principaux étaient la mortalité infantile à 2 ans, la paralysie cérébrale à 2 ans, et un critère combiné

décès/paralysie cérébrale. Le groupe magnésium recevait un bolus de 4 grammes de sulfate de magnésium puis une dose d'entretien de 1 gramme par heure pendant au maximum 24 heures. La mortalité pédiatrique, la paralysie cérébrale et le critère combiné décès ou paralysie cérébrale étaient moins fréquents dans le groupe magnésium, mais les différences n'étaient pas statistiquement significatives. Les troubles moteurs et le critère combiné décès ou troubles moteurs étaient significativement réduits dans le groupe magnésium.

iii L'essai Premag (Marret et al., 2007, 2008)

L'étude Premag était un essai thérapeutique prospectif, randomisé, contrôlé, en simple aveugle, avec bénéfice individuel direct. L'essai était multicentrique et regroupait 18 maternités françaises de niveau 3. L'objectif principal était d'évaluer si l'exposition anténatale au magnésium diminuait l'incidence ou la gravité des leucomalacies périventriculaires chez le grand prématuré. Les critères de jugement principaux étaient la mortalité néonatale et la présence de lésions sévères de la substance blanche diagnostiquées par l'échographie transfontanellaire (ETF). Les objectifs secondaires étaient d'une part l'évaluation chez les enfants de l'impact de l'exposition anténatale sur l'incidence des lésions de la substance blanche diagnostiquées par ETF, des effets indésirables liés à l'administration du magnésium et des complications néonatales potentielles, et d'autre part l'analyse chez les mères des effets indésirables cardiovasculaires et respiratoires, du taux d'hémorragie du post-partum et de la mortalité périnatale. Cinq-cent-soixante-treize patientes en menace d'accouchement prématuré à moins de 33 semaines d'aménorrhée (soit 688 fœtus) ont été incluses entre juillet 1997 et juillet 2003 et randomisées en simple aveugle en deux groupes : magnésium et placebo. Les pathologies vasculaires liées à la grossesse étaient un critère de non-inclusion. Les patientes recevaient une dose unique de sulfate de magnésium (4 grammes) ou du sérum physiologique, par injection intraveineuse, sans dose d'entretien. Une surveillance biologique et clinique de la patiente et du nouveau-né était programmée ainsi que quatre ETF, de la naissance jusqu'au terme théorique. Un suivi neurologique à 18 mois était organisé. La mortalité, les lésions sévères de la substance blanche et les critères combinés étaient moins fréquents dans le groupe magnésium, mais la différence n'était pas statistiquement significative. A 2 ans, les critères combinés décès ou

troubles moteurs, décès et troubles moteurs ou cognitifs, décès et paralysie cérébrale ou troubles cognitifs étaient significativement diminués dans le groupe magnésium.

iv L'essai Beam (Rouse et al., 2008)

Deux mille deux-cent-quarante-et-une femmes à risque de naissance prématurée en raison d'une rupture prématurée des membranes entre 22 et 31 semaines d'aménorrhée, d'une dilatation cervicale entre 4 et 8 cm à membranes intactes ou d'une naissance anticipée dans les 24 heures suivantes pour retard de croissance intra-utérin étaient incluses. Les femmes présentant une rupture des membranes avant 22 semaines d'aménorrhée, un fœtus avec des malformations majeures, une hypertension ou une prééclampsie, des contre-indications au magnésium ou qui avaient reçu du magnésium dans les douze heures précédentes avaient été exclues. Deux-mille quatre-cent-trente-et-un fœtus ont été randomisés. Le critère de jugement principal était un critère composite associant la mortalité pédiatrique avant 1 an ou la présence de paralysie cérébrale modérée ou sévère à 2 ans. Le critère combiné décès ou paralysie cérébrale à 2 ans était équivalent dans les deux groupes. En revanche, le taux de paralysie cérébrale était diminué de manière significative dans le groupe magnésium.

v L'essai Magpie (Altman et al., 2002)

Cet essai n'avait pas pour critère de jugement principal la neuroprotection, mais la prévention de l'éclampsie. Ainsi, 10141 femmes présentant une prééclampsie ont été incluses entre juillet 1998 et novembre 2001 (dont 1544 femmes (soit 1593 fœtus) de moins de 37 semaines d'aménorrhée). Les femmes étaient exclues si elles avaient une contre-indication au magnésium, un coma hépatique ou une myasthénie gravidique. Les patientes ont été recrutées dans de nombreux pays, essentiellement des pays développés. La posologie du sulfate de magnésium était de 4 grammes en bolus intraveineux suivi d'une dose d'entretien intraveineuse de 1 gramme par heure pendant 24 heures ou de 5 grammes en intramusculaire toutes les 4 heures pendant 24 heures. Dans certains centres, un suivi du développement neurologique avait été recueilli à 18 mois par questionnaires. Il n'y avait pas de différence significative en termes de mortalité pédiatrique ou de déficit neurosensoriel entre les deux groupes (Magpie Trial Follow-Up Study Collaborative Group, 2007).

vi Méta-analyses des essais randomisés

Afin d'apprécier l'impact de l'exposition anténatale au magnésium sur le devenir neurologique des enfants prématurés, une première méta-analyse (*Cochrane database*) des essais a été publiée en 2009. Doyle et collaborateurs ont analysé les quatre essais de neuroprotection et les 1593 enfants de l'essai Magpie évalués à 18 mois et dont les mères avaient reçu avant le terme de 37 semaines d'aménorrhée un traitement par sulfate de magnésium (Doyle et al., 2009a, 2009b). Une diminution de 32 % du risque relatif de paralysie cérébrale a été mise en évidence (RR 0,68 ; IC 95 % 0,54-0,87 ; 5 essais ; 6145 enfants). Le bénéfice restait significatif dans le sous-groupe neuroprotection (RR 0,71 ; IC 95 % 0,55-0,91 ; 4 essais ; 4446 enfants), mais pas dans l'autre sous-groupe (essai Magpie). Le nombre de mères à traiter pour prévenir une paralysie cérébrale était de 63 (IC 95 % 39-172), de 42 dans le sous-groupe neuroprotection (IC 95 % 22-357) et de 29 femmes dans le groupe des enfants nés avant 28 semaines d'aménorrhée. La mortalité pédiatrique n'était pas modifiée par l'administration anténatale de magnésium (RR 0,95, IC 95% 0,80-1,12 ; 5 essais ; 6145 enfants). Les analyses statistiques étaient les mêmes dans les sous-groupes en intention de traiter. Par ailleurs il existait une forte hétérogénéité entre les études (I^2 45%) largement liée aux résultats de l'étude MagNet (RR 15,8, IC 95% 0,93-267 ; 106 enfants). De même, le sulfate de magnésium n'avait pas d'effet significatif sur le critère combiné mortalité/paralysie cérébrale, mais il existait une hétérogénéité importante (RR 0,94 ; IC 95% 0,78-1,12 ; I^2 51,3% - 5 essais, 6145 enfants). En revanche dans le sous-groupe neuroprotection, le magnésium induisait une réduction significative du critère composite (RR 0,85 ; IC 95% 0,74-0,98 ; I^2 5,3% – 4 essais ; 4446 enfants). Le retard de développement moteur était moins fréquent dans le groupe magnésium (RR 0,61 ; IC 95% 0,44-0,85 – 4 essais ; 5980 enfants). Enfin, il n'y avait pas d'impact du sulfate de magnésium sur le score d'APGAR, le besoin de ventilation assistée à la naissance, les anomalies cérébrales décelées à l'ETF et les devenirs sensoriels (surdité, cécité) ou cognitifs. Cette méta-analyse présente évidemment des limites du fait notamment des différences de protocoles des essais analysés. En effet, les modalités d'administration du sulfate de magnésium, les limites maximales de terme et les critères d'inclusion étaient variables d'un essai à l'autre. De plus, les outils d'évaluation des nouveau-nés et des enfants n'étaient pas semblables. Par ailleurs,

les populations impliquées dans les différents essais n'étaient pas strictement identiques, notamment pour les causes de la prématurité.

Quatre méta-analyses ont été depuis publiées avec des résultats et des conclusions semblables (Conde-Agudelo et Romero, 2009 ; Costantine et al., 2009 ; Oddie et al., 2015 ; Zeng et al., 2016).

L'ensemble des essais randomisés et des méta-analyses met en évidence un lien fort et constant entre le traitement par magnésium et la réduction de la paralysie cérébrale. Un groupe d'étude collaborative internationale (*Antenatal Magnesium IPD International Collaboration : assessing the benefits for babies using the best level of evidence : AMICABLE*) rassemblant les différents investigateurs des essais publiés, s'est constitué pour compléter les données des méta-analyses par une analyse des données individuelles (*individual patient data meta-analysis* (IPD)), utilisant la méthodologie *Cochrane* (AMICABLE Group, 2012). Les résultats de cette méta-analyse IPD sont en cours de publication.

L'évaluation du devenir à long terme des enfants exposés *in utero* au sulfate de magnésium est indispensable pour analyser leur développement psychomoteur et s'assurer de l'absence d'effet délétère de la molécule. Le suivi à l'âge scolaire de la cohorte française Premag fait l'objet de la première partie du travail de cette thèse (Chollat et al., 2014). Le suivi à long terme de la cohorte australienne a été publié dans un second temps (Doyle et al., 2014a).

VII Les agents anesthésiques en période périnatale : le rémifentanil

Des millions d'enfants dans le monde sont anesthésiés chaque année pour des interventions chirurgicales, des procédures douloureuses, ou pour certains examens radiologiques. Aux débuts de l'anesthésie pédiatrique, il était habituel de penser qu'une fois l'effet de l'agent anesthésiant dissipé, le cerveau revenait à son état basal. Depuis quelques années, de nombreuses équipes de recherche suggèrent que la sédation/analgésie pourrait avoir des effets durables sur le cerveau. De multiples travaux mettent en évidence chez l'Animal des effets néfastes d'une anesthésie sur la vitalité cellulaire cérébrale. Certaines études chez l'Homme mettent également en avant un impact sur le devenir neurocognitif des enfants exposés. Compte tenu de la nécessité d'une sédation/analgésie en situation de procédure douloureuse chez le nouveau-né et l'enfant, les travaux de recherche sur l'impact des anesthésiques sur le cerveau en développement sont indispensables afin d'administrer l'agent anesthésique le moins délétère.

VII.1 *Contexte d'utilisation des agents anesthésiques*

Les nouveau-nés prématurés ou à terme peuvent être exposés à des agents anesthésiques pendant la grossesse, lors de l'accouchement et/ou au cours des premières semaines et des premiers mois de vie.

In utero, le fœtus peut être exposé à des agents anesthésiques en cas d'intervention chirurgicale non obstétricale nécessitant une anesthésie générale maternelle (Heesen et Klimek, 2016). Aux Etats-Unis, 2% des femmes enceintes nécessitent une chirurgie pendant la grossesse. Les indications les plus fréquentes sont les appendicectomies, les cholécystectomies, les cures de hernie discale, les traumatismes ou encore les chirurgies oncologiques (Gilo et al., 2009). Le collège américain des gynécologues-obstétriciens a publié des recommandations en 2003 (mises à jour en 2017) pour encadrer ces procédures (ACOG Committee on Obstetric Practice, 2011 ; Anon, 2017).

Une anesthésie générale maternelle peut également être nécessaire en cas de césarienne en urgence ou lorsque l'anesthésie locorégionale est contre-indiquée ou inefficace. Aux Etats-Unis entre 2010 et 2015, 5,8% des césariennes ont nécessité une anesthésie générale. En situation d'urgence, le taux d'anesthésie générale s'élève à 14,6%

des césariennes (Juang et al., 2017). En cas de naissance prématurée, le recours à la césarienne est plus fréquent qu'en cas de naissance à terme (37% des naissances entre 22 et 26 SA, 70% des naissances entre 27 et 31 SA et 55% entre 32 et 34 SA pour la cohorte française EPIPAGE 2 (Ancel et al., 2015)), et le taux d'anesthésie générale est également majoré (environ 53% des césariennes pour la cohorte EPIPAGE 1 (Laudenbach et al., 2009), et 18,5% pour la cohorte EPIPAGE 2, données non publiées). Pour l'induction, le propofol semble le plus adapté et remplace peu à peu le thiopental. Un curare est associé avant l'intubation (rocuronium ou succinylcholine). Historiquement, les morphiniques ne sont administrés qu'après clampage du cordon pour éviter un effet dépresseur respiratoire chez le nouveau-né. Mais l'utilisation du rémifentanil dès l'induction est croissante en raison de son délai d'action rapide et de sa demi-vie courte, limitant les effets respiratoires délétères chez le nouveau-né. Les gaz halogénés (sévoflurane) sont quant à eux utilisés pour l'entretien de l'anesthésie (Murdoch et al., 2013 ; Devroe et al., 2015).

En dehors de l'anesthésie générale, l'utilisation du rémifentanil pour l'analgésie pendant le travail, en remplacement de l'anesthésie locorégionale, est en pleine expansion (Devabhakthuni, 2013 ; Ohashi et al., 2016). Son utilisation paraît aussi efficace et sûre que les autres modes d'analgésie du travail (Leong et al., 2011 ; Schnabel et al., 2012).

En cas d'hospitalisation en réanimation néonatale, le nouveau-né prématuré ou à terme peut être exposé d'une part à des procédures douloureuses ou stressantes comme par exemple la ventilation invasive, la pose de cathéter central ou encore la pose de drain thoracique, et d'autre part à des complications médico-chirurgicales douloureuses (entérocolite ulcéro-nécrosante, chirurgie digestive, chirurgie de fermeture du canal artériel…). L'étude française EPIPPAIN (*Epidemiology of Procedural Pain in Neonates)* a recensé les actes douloureux des nouveau-nés hospitalisés en réanimation néonatale en région parisienne. Durant les 14 premiers jours d'hospitalisation, chaque nouveau-né était confronté en moyenne à 10 procédures douloureuses par jour (Carbajal et al., 2008). Ces épisodes douloureux nécessitent l'évaluation de la douleur du nouveau-né et l'administration d'une sédation et d'une analgésie adaptée, parfois au long cours. L'étude multicentrique Europain a permis l'évaluation des pratiques concernant les moyens d'analgésie et de sédation pour 243 unités de néonatologie dans 18 pays européens

(Carbajal et al., 2015). Au cours de cette étude, 6680 nouveau-nés de 24 à 42 SA ont été inclus entre 2012 et 2013. Trente-quatre pour cent des patients ont reçu au moins une fois une sédation ou une analgésie, essentiellement en cas de ventilation mécanique (82%). Les morphiniques les plus utilisés en cas de ventilation trachéale sont la morphine (43%), le fentanyl (29%) et le sufentanil (10%). Le midazolam est l'agent sédatif hypnotique le plus répandu (25%), devant l'hydrate de chloral (4%) et le phénobarbital (3%). Enfin la kétamine (6%) et le propofol (3%) sont également régulièrement administrés (Figure 30).

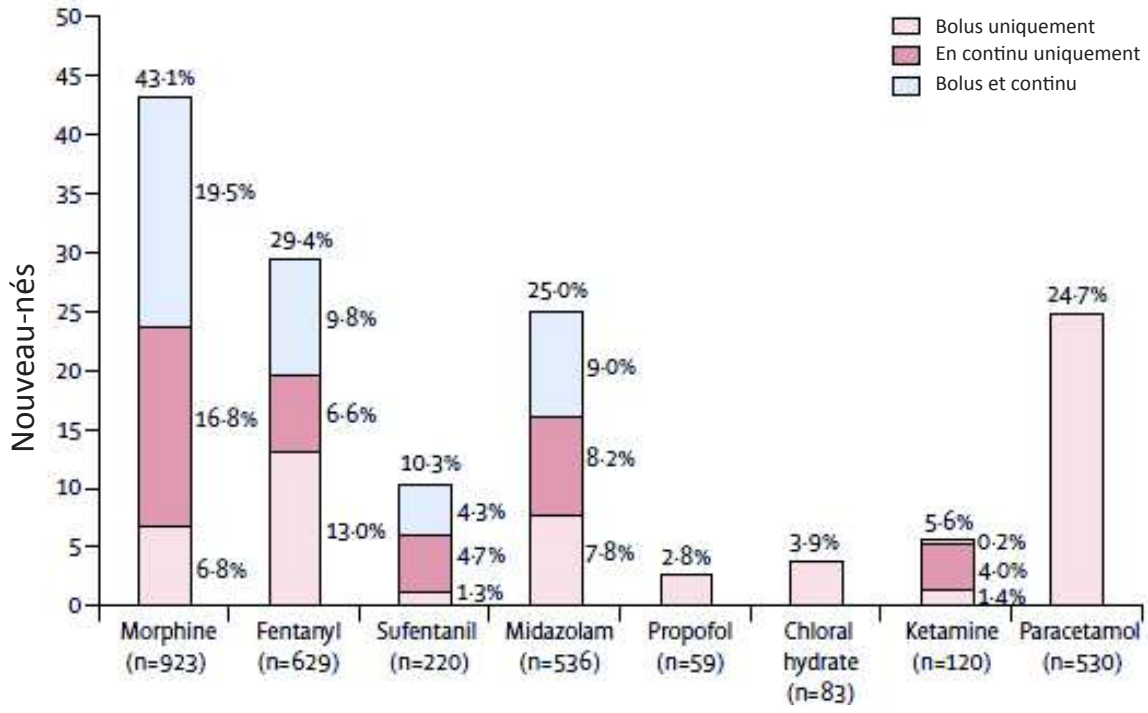


Figure 30 : Fréquence et mode d'administration des agents anesthésiques en néonatologie en cas de ventilation trachéale.
L'étude observationnelle Europain a rapporté une utilisation importante de la morphine, du fentanyl, du midazolam, du paracétamol et du sufentanil. D'après Carbajal et al., 2015.

Le nouveau-né et le nourrisson peuvent être soumis à des agents anesthésiques durant les premiers mois de vie en cas d'intervention chirurgicale ou de recours à une imagerie qui nécessite que l'enfant soit immobile (par exemple pour une IRM cérébrale). En 2010, 933736 procédures d'anesthésie pédiatrique sont recensées en France, dont 4,7% concernent les enfants de moins de 1 an et 22,5% les enfants de 1 à 3 ans (Dadure et al., 2015). Une enquête de pratique en anesthésie réalisée en France rapporte que la prémédication la plus utilisée est le midazolam pour les enfants entre 1 et 10 ans et

l'hydroxyzine pour les enfants âgés de 10 à 15 ans (Constant et al., 2012). L'induction par inhalation de gaz halogénés (sévoflurane) est majoritaire pour les enfants entre 1 et 3 ans. En cas d'intubation trachéale, le propofol est souvent associé au sévoflurane pour les enfants de plus de trois ans. Un morphinique est utilisé avant le geste chez 83% des enfants entre 1 et 3 ans. L'entretien de l'anesthésie est réalisé par du propofol ou du sévoflurane. Concernant les morphiniques, 72% des anesthésistes utilisent du sufentanil, 18% de l'alfentanil et 10% du rémifentanil pour l'entretien de l'analgésie.

VII.2 *La douleur du nouveau-né*

VII.2.1 Le nouveau-né ressent-il la douleur ?

La reconnaissance de la douleur du nouveau-né date des années 1980 grâce aux travaux fondateurs d'Anand (Anand et Hickey, 1987). Il était auparavant habituel de penser que le nouveau-né ne ressentait pas de douleur compte-tenu de l'immaturité de son système nerveux. Cette méconnaissance de la douleur du nouveau-né a induit des pratiques inacceptables aujourd'hui comme la réalisation d'interventions chirurgicales sans anesthésie (Anand et al., 1987a). L'histoire médiatisée d'un nouveau-né prématuré de 500 grammes, Jeffrey Lawson, opéré pour une fermeture chirurgicale de canal artériel sans anesthésie (un curare seul avait été administré durant l'intervention) avait sensibilisé l'opinion publique (Rodkey et Pillai Riddell, 2013). Par la suite, un essai randomisé conduit par Anand a permis la mise en évidence d'une augmentation majeure des hormones de stress en cas de chirurgie de nouveau-nés prématurés sans morphinique (Anand et al., 1987b). Ces avancées ont permis une prise de conscience de la communauté scientifique et de la société et ont entraîné des modifications considérables de la prise en charge de la douleur du nouveau-né (McGrath et Unruh, 2002).

VII.2.2 Aspects développementaux des circuits de la douleur : spécificités néonatales

Le message nociceptif initié au niveau des tissus périphériques est véhiculé par les neurones afférents primaires : les fibres Aδ myélinisées et C non myélinisées. Ces fibres sont présentes dès la 7ème SA au niveau de région péribuccale, vers 11SA au niveau de la face, des paumes des mains et de la plante des pieds, vers la 15ème SA au niveau du tronc et de la racine des membres et sur tous les téguments vers 20 SA (Anand et Hickey, 1987 ; Fitzgerald,

1991). Le potentiel d'action généré entraîne la libération de neurotransmetteurs excitateurs au niveau de la première synapse de la corne postérieure, permettant l'activation des voies spino-thalamo-corticales controlatérales (Figure 31).

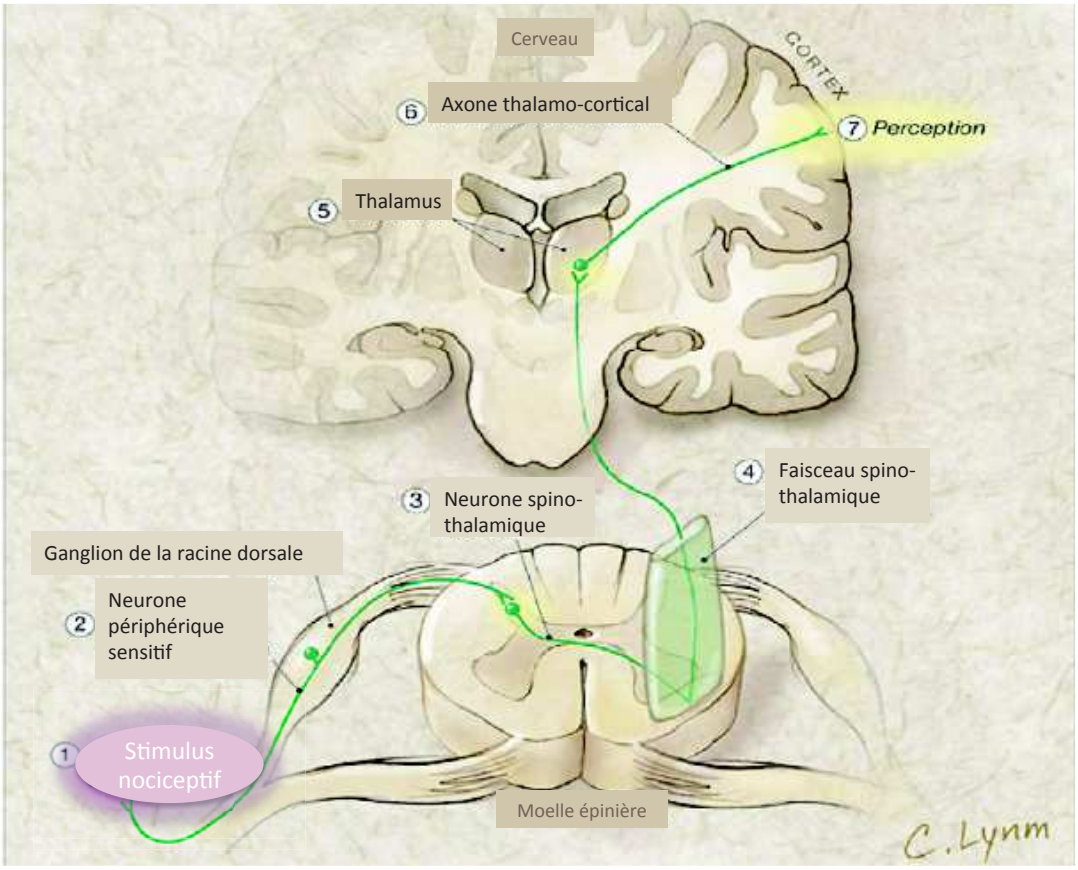


Figure 31 : Perception douloureuse par le faisceau spino-thalamique.
Les stimuli douloureux (1) activent les neurones sensoriels périphériques (2) qui se connectent aux neurones du faisceau spino-thalamique (3) dont les axones s'étendent tout au long de la moelle épinière (4) pour se connecter au thalamus (5). Puis, les axones thalamo-corticaux se connectent aux neurones corticaux et de la sous-plaque, engendrant ainsi la perception douloureuse. D'après Lowery et al., 2007.

La maturation de ces voies débute à partir de 6 SA. Les connections spino-thalamiques se développent entre 14 et 20 SA et les connections thalamo-corticales, présentes dès 13 SA, sont matures entre 26 et 30 SA (Lowery et al., 2007). On estime que les voies spino-thalamo-corticales sont matures entre 26 et 30 SA (Mrzljak et al., 1988 ; Tableau 1).

Caractéristiques anatomiques et fonctionnelles	Description	Age gestationnel (SA)	Source
Récepteurs sensoriels cutanés périphériques	Récepteurs sensoriels cutanés de la région péribuccale	7,5	Humphrey, 1964
	Récepteurs sensoriels cutanés palmaires	10-10,5	
	Récepteurs sensoriels cutanés abdominaux	15	
Moelle épinière	Arc reflexe spinal en réponse à un stimulus non douloureux	8	Lee et al., 2005
	Neurones nociceptifs dans le ganglion de la racine dorsale	19	Konstantinidou et al., 1995
Afférences thalamiques	Afférences thalamiques atteignant la sous-plaque	20-22	Kostovic et Rakic, 1990 ; Hevner, 2000
	Afférences thalamiques atteignant la plaque corticale	23-24	Kostovic et Goldman-Rakic, 1983 ; Kostovic et Rakic, 1984
Fonction corticale	Potentiels évoqués somatosensoriels, avec composants continus	29	Hrbek et al., 1973 ; Klimach et Cooke, 1988
	1ers éléments électroencéphalographiques avec un éveil et un sommeil actif	30	Anderson et al., 1985 ; Torres et Anderson, 1985

Tableau 1 : Développement fonctionnel et anatomique de la perception douloureuse.
D'après Lee et al., 2005.

Les messages nociceptifs sont modulés et contrôlés tout au long du système nerveux central. Des endomorphines (les endorphines, les enképhalines et les dynorphines) sont sécrétées au niveau périphérique, médullaire et supra-médullaire. Ces inhibiteurs sont produits essentiellement au cours des six premiers mois de vie. Au niveau médullaire, Melzack a développé la théorie du *Gate Control* selon laquelle les fibres Aα et Aβ, non nociceptives, inhiberaient les neurones nociceptifs (Melzack et Wall, 1965). Ces fibres sont présentes en période néonatale mais leur réponse à un stimulus semble faible (Fitzgerald et al., 1988). Au niveau du tronc cérébral, le système inhibiteur descendant peut inhiber l'activation des neurones spinothalamiques par libération de la sérotonine et de la noradrénaline. Ainsi, la stimulation de la substance grise périaqueducale du mésencéphale et du noyau raphé magnus dans le bulbe rachidien bloquerait jusqu'à 80 à 100% des réponses nociceptives chez l'adulte (Lowery et al., 2007). Chez le nouveau-né à terme, ces mécanismes paraissent matures seulement vers la 3ème semaine de vie (van Praag et Frenk, 1991 ; Hathway et al., 2009).

Les prématurés possèdent donc des circuits nociceptifs immatures, ce qui les rend plus sensibles aux stimulations nociceptives que les nouveau-nés à terme, notamment en

raison d'un déséquilibre des systèmes excitateurs et inhibiteurs qui a pour conséquence l'augmentation de la signalisation nociceptive dans le système nerveux central (Fitzgerald et Beggs, 2001 ; Fitzgerald, 2005).

VII.2.3 Effets à long terme de la douleur néonatale chez l'Homme

Le ressenti néonatal de la douleur semble avoir un impact négatif sur la trajectoire neurodéveloppementale (Walker, 2013 ; Ranger et Grunau, 2014 ; Walker, 2014). Il est parfois difficile de discerner le rôle des épisodes douloureux sur la présence éventuelle de lésions cérébrales ou encore du recours à des agents analgésiques et/ou anesthésiques sur le devenir neurologique de l'enfant. Les analyses statistiques des études de cohorte doivent s'astreindre d'ajuster les résultats bruts sur les nombreux facteurs de confusion comme l'âge gestationnel, le poids de naissance, les retards de croissance intra et extra utérins, les troubles hémodynamiques, les atteintes respiratoires, les évènements infectieux ou encore les conditions socio-économiques qui pourraient modifier le devenir neurologique des enfants (Walker, 2013). Des études de suivi de prématurés ont mis en évidence que l'exposition néonatale du prématuré à des épisodes douloureux était associée à une réduction du volume de la substance blanche et de la substance grise sous-corticale (Brummelte et al., 2012), à une altération du développement microstructural du faisceau cortico-spinal (Zwicker et al., 2013), à une diminution de la croissance du périmètre crânien à 32 SA d'âge corrigé (Vinall et al., 2012), et à une diminution de la taille du cortex à l'âge scolaire dans certaines régions cérébrales (Ranger et al., 2013). A 8, 12 et 18 mois, les fonctions cognitives et motrices paraissent plus pauvres en cas d'exposition à des épisodes de douleur néonatale (Grunau et al., 2009 ; Morag et al., 2017) et les comportements anxieux voire dépressifs plus fréquents à 18 mois (Vinall et al., 2013b). Chez les prématurés, la douleur pendant l'hospitalisation semble modifier l'expression du cortisol à distance de l'hospitalisation (Grunau et al., 2004). A l'âge scolaire, des anomalies de la microstructure de la substance blanche, une diminution du quotient intellectuel et une réduction du volume de certaines régions cérébelleuses sont également associées à la douleur néonatale (Vinall et al., 2014 ; Ranger et al., 2015).

La douleur néonatale semble également modifier les réponses ultérieures à la douleur. En cas de ponction au talon dans les premières 36 heures de vie, il semble exister

un conditionnement entraînant des douleurs plus intenses pour les ponctions veineuses ultérieures (Taddio et al., 2002). De la même façon, les réponses comportementales lors de vaccinations entre 4 et 6 mois sont majorées chez les garçons circoncis en période néonatale sans analgésie (Taddio et al., 1997).

Face à ces éléments d'inquiétude des effets délétères de la douleur sur le cerveau en développement, la diminution des actes douloureux chez les nouveau-nés hospitalisés doit être une préoccupation majeure des néonatologistes. En cas d'acte indispensable potentiellement douloureux, une prise en charge de la douleur par des stratégies médicamenteuses associées à des traitements non pharmacologiques est nécessaire. Le médicament analgésique et / ou anesthésique le plus efficace et le moins délétère sur le cerveau en développement devra être choisi par le prescripteur, en accord avec la littérature scientifique.

VII.3 *Effets potentiels des agents anesthésiques sur le cerveau en développement*

La réflexion sur le potentiel effet neurotoxique des agents anesthésiques sur le cerveau en développement date du début des années 2000 (Jevtovic-Todorovic et al., 2003). Depuis, de nombreuses études expérimentales sur des espèces animales diverses (souris, rats, cochons, singes) ont mis en en avant l'impact neurotoxique potentiel des anesthésiques (Rizzi et al., 2008 ; Paule et al., 2011 ; Zou et al., 2011 ; Shen et al., 2013a, 2013b). Une analyse récente de la littérature dénombre plus de 440 études précliniques chez l'Animal et 32 études chez l'Homme qui évaluent l'impact des anesthésiques sur le cerveau en développement (Lin et al., 2017). Les effets observés semblent dépendre de l'étape du développement lors de l'exposition, de la posologie utilisée et de la durée d'administration de l'anesthésique (Ikonomidou et al., 1999 ; Stratmann et al., 2009 ; Gutierrez et al., 2010 ; Zhu et al., 2010). Si les mécanismes d'une potentielle neurotoxicité ne sont pas encore clairement établis, le mode d'action des anesthésiques conduit à différencier les agents inhibiteurs du récepteur NMDA (la kétamine, le protoxyde d'azote…) et potentialisateurs du récepteur GABA (les benzodiazépines, les barbituriques, les gaz halogénés…), des morphiniques activant les récepteurs métabotropiques aux opiacés mu (μ), kappa (κ), et delta (δ) couplés aux protéines G.

VII.3.1 Effets des agents anesthésiques agissant sur les récepteurs NMDA et GABA

a Etudes expérimentales chez l'Animal

L'administration d'un anesthésique pendant la période périnatale pourrait avoir des répercussions à long terme chez l'Animal, comme la survenue de déficits cognitifs, des perturbations de l'activité locomotrice ou des modifications du comportement émotionnel à l'âge adulte (Fredriksson et al., 2004 ; Viberg et al., 2008 ; Paule et al., 2011 ; Lecointre et al., 2015 ; Milanovic et al., 2017). Ces effets à long terme suggèrent que les agents anesthésiques peuvent affecter le développement cérébral. La vulnérabilité du cerveau immature aux agents anesthésiques pourrait dépendre des étapes clés du développement concernées lors de l'exposition (Rice et Barone, 2000).

i L'apoptose

L'apoptose est indispensable au développement cérébral normal puisqu'elle permet d'éliminer environ 50% du stock initial de neurones (Stiles et Jernigan, 2010). Il est reconnu que lors d'une exposition à un agent toxique comme l'alcool ou le plomb qui affecte ce processus physiologique, le développement cérébral peut être altéré (Oberto et al., 1996 ; Liesi, 1997). Les premières préoccupations de l'effet des anesthésiques sur l'apoptose datent des travaux d'Ikonomidou en 1999 qui avait mis en évidence une augmentation de l'apoptose chez le raton en bloquant le récepteur NMDA par du MK801 à P0, P3 et P7 (Ikonomidou et al., 1999). Il a été démontré par la suite que la kétamine, antagoniste du récepteur NMDA, était un agent pro-apoptotique lorsque son administration avait lieu pendant les périodes de vulnérabilité développementale (Hayashi et al., 2002 ; Scallet et al., 2004 ; Rudin et al., 2005 ; Slikker et al., 2007 ; Aligny et al., 2014). Cette majoration de l'apoptose physiologique peut en partie s'expliquer par un phénomène de « *up regulation* » des récepteurs NMDA, modifiant ainsi l'homéostasie calcique intracellulaire (Shi et al., 2010 ; Liu et al., 2013). L'activation des récepteurs GABA par des agents halogénés (isoflurane) peut, comme lors du blocage du récepteur NMDA par le MK801 ou la kétamine, induire de l'apoptose, associée à des flux calciques pathologiques (Zhao et al., 2011).

ii La neurogenèse

L'exposition à des toxiques comme l'alcool pendant les phases de prolifération neuronale peut affecter le développement normal du cerveau avec potentiellement un impact sur les fonctions cognitives à l'âge adulte (Coleman et al., 2012). Ainsi, l'exposition à l'isoflurane ou au propofol en période néonatale diminue la neurogenèse hippocampique (Stratmann et al., 2009 ; Zhu et al., 2010 ; Erasso et al., 2013 ; Huang et al., 2016). L'association d'isoflurane, de monoxyde d'azote et de midazolam diminue l'expression de BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*) au sein du thalamus, ce qui pourrait avoir un effet indirect négatif sur la régulation de la neurogenèse (Lu et al., 2006).

iii Migration et différenciation

L'exposition de ratons à de l'isoflurane ou du desflurane à P2 perturbe la migration et/ou la prolifération neuronale à P7 au sein du gyrus denté (Drobish et al., 2016). L'administration de kétamine à des souris gestantes induit également une altération de la différenciation des interneurones GABAergiques chez le souriceau (Aligny et al., 2014). Comme pour l'apoptose, les modifications des flux calciques peuvent altérer la migration et la différentiation neuronale. En effet, le calcium est un acteur de la différentiation neuronale et de la formation du cône de croissance. Les perturbations de l'homéostasie calcique liées à l'activation des récepteurs GABA par de l'isoflurane ont été mises en cause dans la détérioration de la guidance axonale des neurones en développement (Mintz et al., 2013).

iv Synaptogenèse

Chez les rongeurs, la synaptogenèse a lieu essentiellement au cours de la deuxième semaine de vie (Jevtovic-Todorovic, 2012). L'administration de midazolam ou de kétamine entre P8 et P12 chez la Souris diminue la formation de dendrites à P13 (Tan et al., 2009). A l'inverse, certaines études chez le rongeur observent une majoration des épines dendritiques après exposition au midazolam, au propofol ou à l'isoflurane entre P15 et P20 (De Roo et al., 2009 ; Briner et al., 2010). L'augmentation de la formation de dendrites semble être une réponse au blocage de la transmission synaptique (Kirov et al., 2004). Ainsi, le propofol semble bloquer la formation synaptique de neurones en culture, modifier les protéines de structure de la synapse et entraîner une rétractation des neurites, altérant ainsi l'intégrité de la fonction synaptique (Woodall et al., 2003 ; Turina et al., 2008 ; Milanovic et

al., 2017). Par ailleurs, une seule injection de kétamine en période périnatale modifie le profil d'expression corticale des sous-unités du récepteur NMDA, suggérant un retard dans la maturation synaptique (Lecointre et al., 2015).

v Gliogenèse

Les cellules gliales constituent la moitié des cellules cérébrales, et leur rôle dans le développement cérébral normal commence à être reconnu (Barres, 2008 ; Zuchero et Barres, 2015). Des astrocytes immatures en culture exposés à de l'isoflurane pendant 24 heures subissent des modifications morphologiques (Lunardi et al., 2011) ainsi qu'un retard de maturation et une diminution de leur prolifération (Wang et al., 2016). L'administration d'isoflurane chez des fœtus de singes (Creeley et al., 2014), et des singes adultes (Brambrink et al., 2012), ainsi que l'administration de propofol chez des fœtus et des singes nouveau-nés (Creeley et al., 2013) entraînent une apoptose massive des oligodendrocytes. Les effets des agents anesthésiques sur la microglie ne sont pas encore établis, et la littérature scientifique est pauvre à de ce sujet. L'étude des médiateurs de l'inflammation cérébrale peut être une approche indirecte de l'étude de la microglie, étant donné qu'elle est la source principale des cytokines pro-inflammatoires cérébrales. L'exposition au sévoflurane augmente l'expression cérébrale d'IL-6 et du TNFα (Lu et al., 2010 ; Shen et al., 2013a). Des études ciblées sur la microglie après administration d'anesthésiques sont donc nécessaires afin de mieux comprendre leurs potentiels effets neurotoxiques.

b Etudes cliniques chez l'Homme

Backman et Kopf ont été les premiers à suggérer un lien entre une anesthésie pendant l'enfance et la survenue d'un retard cognitif à long terme (Backman et Kopf, 1986). Dans cet essai, les enfants étaient anesthésiés avec de la kétamine et de l'halothane pour une cure chirurgicale de nævus congénital. Une augmentation des troubles cognitifs était observée jusqu'à 18 mois après l'intervention. La neurotoxicité potentielle des agents anesthésiques sur le cerveau en développement suggérée par les essais chez l'Animal a motivé l'évaluation du devenir neurologique des enfants exposés à des anesthésiants. Afin d'analyser cette problématique chez l'Homme, une trentaine d'essais rétrospectifs ou de cohortes prospectives ont vu le jour depuis les années 2000, mais seulement un essai randomisé contrôlé a été jusqu'alors mis au point (Davidson et al., 2016 ; Lin et al., 2017 ;

Tableau 2). Bien que certaines études épidémiologiques aient mis en évidence une altération du devenir à long terme en cas d'exposition à des agents anesthésiques avant trois ans, de nombreuses études n'ont pas détecté d'effet significatif.

La survenue de difficultés scolaires (Bartels et al., 2009 ; Flick et al., 2011a ; Block et al., 2012 ; Clausen et al., 2016), de troubles des apprentissages (Wilder et al., 2009 ; Bong et al., 2013), de déficits cognitifs (Ing et al., 2012 ; Andropoulos et al., 2014), de troubles du comportement (DiMaggio et al., 2009 ; Kalkman et al., 2009 ; DiMaggio et al., 2011), ainsi que de retard mental (DiMaggio et al., 2009 ; Garcia Guerra et al., 2014 ; Backeljauw et al., 2015) semblent être associés, dans certaines études rétrospectives ou de cohorte, à une ou plusieurs anesthésies générales dans la petite enfance. Plusieurs études suggèrent également que le développement du langage pourrait être particulièrement vulnérable à une exposition aux anesthésiques avant trois ans (Graham et al., 2008 ; DiMaggio et al., 2009 ; Ing et al., 2012 ; Backeljauw et al., 2015). Une méta-analyse bayésienne incluant sept études rétrospectives, soit 40685 enfants concluait que l'exposition à une anesthésie et une chirurgie dans la petite enfance était associée à un risque modéré de développer des troubles du comportement ou du développement (DiMaggio et al., 2012).

Parmi ces études, une analyse rétrospective sur 5357 enfants a mis en évidence une association entre le recours à au moins deux anesthésies générales avant quatre ans et le risque de troubles des apprentissages à l'adolescence (Wilder et al., 2009 ; Figure 32). Le risque augmentait avec l'allongement de la durée de l'anesthésie (supérieure à deux heures).

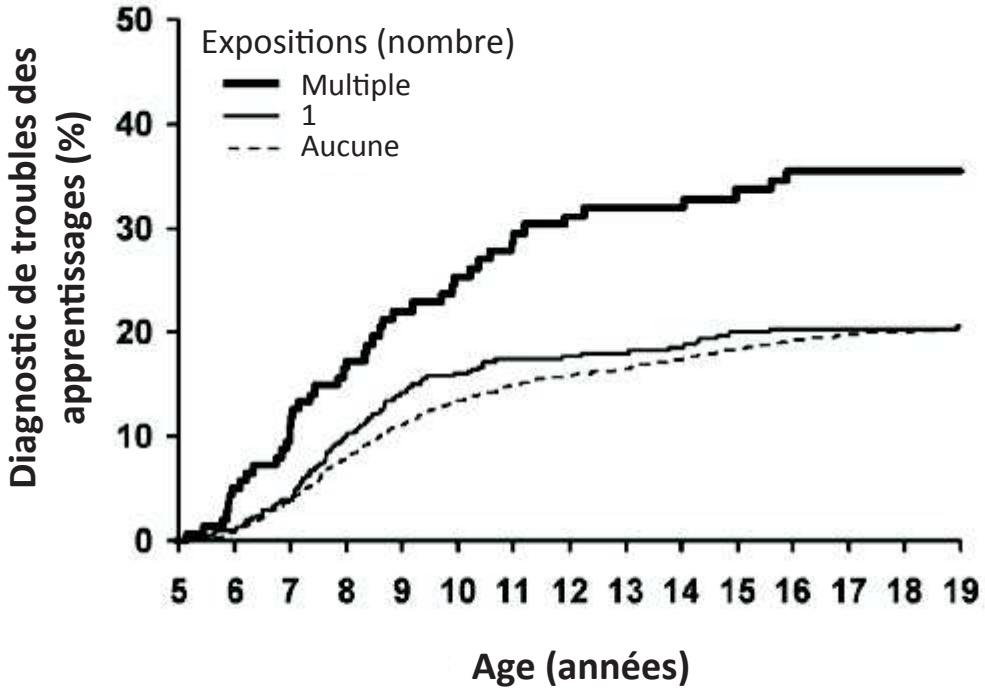


Figure 32 : Pourcentage cumulé des troubles des apprentissages après exposition à une ou plusieurs anesthésies avant 4 ans.
D'après Wilder et al., 2009.

La durée d'exposition semble en effet jouer un rôle prépondérant dans la survenue de déficits neurologiques. Dans une autre étude rétrospective, environ 14% des enfants exposés à une anesthésie générale obtenaient des résultats scolaires en dessous du 5ème percentile de la population générale (Block et al., 2012). Alors qu'en cas d'anesthésie générale inférieure à deux heures il n'a pas été observé de trouble du comportement, de trouble cognitif ou de difficulté scolaire dans certains essais (Sprung et al., 2009 ; Wilder et al., 2009 ; Fan et al., 2013 ; Davidson et al., 2016 ; Sun et al., 2016), de tels déficits ont été observés si l'anesthésie durait plus de deux heures (Wilder et al., 2009 ; Andropoulos et al., 2014). Sprung et collaborateurs ont mis également en évidence un risque plus élevé de déficit de l'attention/hyperactivité en cas d'exposition à au moins deux anesthésies générales avant l'âge de deux ans (Sprung et al., 2012).

La plupart des études cliniques évaluent une ou plusieurs expositions avant 2-3 ans, afin de cibler une fenêtre de vulnérabilité pour le cerveau en développement décrite dans les études précliniques chez l'Animal. Ing et collaborateurs ont évalué des enfants anesthésiés entre 3 et 10 ans et ont mis en évidence une augmentation du risque de

développer un déficit moteur modéré à 10 ans, sans impact sur les troubles cognitifs et le langage (Ing et al., 2014b). Le devenir neurologique des enfants entre 3 et 10 ans exposés à une anesthésie générale doit encore faire l'objet d'études dédiées.

Chez les prématurés, les nouveau-nés ayant necessité une intervention chirurgicale pour une fermeture de leur canal artériel (Chorne et al., 2007) ou pour une entérocolite ulcéro-nécrosante présentent des devenirs neurologiques plus altérés que ceux qui ont reçu un traitement médical seul (Hintz et al., 2005 ; Rees et al., 2007). Dans ces situations, la sévérité de la maladie sous-jacente nécessitant une intervention chirurgicale pourrait contribuer à elle seule à l'altération du développement neurologique. Une seule étude évalue l'exposition prolongée à une sédation/analgésie des prématurés pendant leur séjour en réanimation néonatale, sans retrouver d'effet sur le développement cognitif à cinq ans (Rozé et al., 2008).

Alors qu'une partie de la littérature scientifique suggère un impact inquiétant des agents anesthésiants sur la trajectoire neurodéveloppementale de l'enfant exposé, de nombreuses études cliniques ne retrouvent pas d'effet délétère (Rozé et al., 2008 ; Sprung et al., 2009 ; Flick et al., 2011b ; Guerra et al., 2011 ; Hansen et al., 2011 ; Fan et al., 2013 ; Hansen et al., 2013 ; Ko et al., 2014, 2015). Parmi celles-ci, un essai récent (PANDA) a comparé le quotient intellectuel (QI) d'enfants exposés à une anesthésie générale avant 3 ans à celui des enfants non exposés de la fratrie. Aucune différence n'a été mise en évidence en termes de QI entre 8 et 15 ans (Sun et al., 2016). Enfin, pour le seul essai randomisé contrôlé publié (l'étude GAS), les enfants de moins de 5 mois d'âge corrigé et né après 26 SA nécessitant une cure chirurgicale de hernie inguinale étaient randomisés pour recevoir une anesthésie locorégionale ou une anesthésie générale par sévoflurane sans autre agent anesthésique. Environ 360 enfants ont été inclus dans chaque groupe. Il n'a pas été démontré de différence sur le devenir neurocognitif à 2 ans (évalué par les score de Bayley III et de MacArtur-Bates) entre les deux groupes (Davidson et al., 2016). Une évaluation à l'âge de cinq ans de cette cohorte est prévue par les investigateurs.

Les résultats de ces études sont donc très hétérogènes. Pour les études rétrospectives, qui constituent la quasi-totalité de la littérature scientifique à ce sujet, il est fondamental d'interpréter leurs résultats avec les réserves *ad hoc*. Tout d'abord, les

protocoles d'anesthésie sont variés et les molécules utilisées, seules ou en association, diffèrent d'un patient à l'autre. Les facteurs confondants ne sont également pas maitrisés et peuvent parfois, à eux seuls, modifier la trajectoire développementale des enfants. La cause de la chirurgie et les comorbidités du patient peuvent pareillement interférer sur le devenir neurologique du patient. Les essais randomisés contrôlés doivent donc être privilégiés pour évaluer au mieux cette problématique. Enfin, les tests utilisés pour évaluer le devenir neurocognitif des enfants doivent être judicieusement choisis en fonction de l'âge d'évaluation et du critère évalué, au risque de sous-estimer certains déficits. Par exemple, une étude rétrospective ne retrouvait pas d'impact de l'anesthésie chez l'enfant sur les résultats scolaires, en revanche des déficits plus subtils ont été mis en évidence concernant les troubles du langage et les troubles cognitifs (Ing et al., 2014a). Le choix de l'outil d'évaluation et des critères mesurés est donc crucial pour détecter une éventuelle neurotoxicité induite par une anesthésie (Jevtovic-Todorovic, 2016).

Compte tenu de l'ensemble de ces éléments, un avertissement récent de la *Food and Drug Administration* (FDA) met en garde contre l'anesthésie générale et les agents sédatifs chez les enfants de moins de trois ans, et recommande de décaler si possible toute intervention chirurgicale après trois ans (Food and Drug Administration, 2017).

Population étudiée	Exposé (n)/contrôle (N)	Durée exposition	Age exposition	Age évaluation	Test	Devenir neurologique	Références
Cohorte prospective EPIPAGE 1(1997)	Sédation prolongée et/ou analgésie vs absence de sédation (115) /analgésie (1457)	Non indiquée	Prématurés < 33 SA	5 ans	K-ABC	Pas de différence après ajustement	Rozé et al., 2008
Cohorte rétrospective (1987-1995)	AG pour chirurgies urologiques avant 24 mois (178) vs après 24 mois (65)	Non indiquée	0-6 ans	> 4 ans	CBCL 4-18 (questionnaires parentaux)	↗ troubles du comportement si > 24 mois, NS	Kalkman et al., 2009
Cohorte de naissance (1976-1982)	AG avant 4 ans (593) vs absence d'exposition (4764)	125 min	0-4 ans	≤19 ans	Evaluation médicale/scolaire	Troubles des apprentissage x2 si 2 chirurgies >2 heures	Wilder et al., 2009
Cohorte de naissance (1976-1982)	AG (193) vs ALR (304) pour césarienne vs VB (4823)	14 min	A la naissance	≤ 19 ans	Evaluation médicale/scolaire	Pas de différence	Sprung et al., 2009
Cohorte de naissance (1999-2001)	Chirurgie pour hernie inguinale (383) vs absence (codage) (5050)	Non indiquée	0-3 ans	≤ 4 ans	Anomalies neurologiques (codage ICD-9)	↗ troubles du développement /comportement, retard mental, autisme, langage	DiMaggio et al., 2009
Registre des jumeaux néerlandais (1986-1995)	AG avant 3 ans (1143) vs absence (1143)	Non indiquée	0-3 ans	12 ans	Examen scolaire (CITO), échelle de Connor	Performances scolaires ↘ en cas d'anesthésie	Bartels et al., 2009
Etude Cas-témoin, appariement fratrie (1999-2005)	Intervention chirurgicale (codage) (304) vs absence (10146)	Non indiquée	0-3 ans	≤4 ans	Anomalies neurologiques (codage ICD-9)	↗ troubles développement /comportement suivant ≥2 anesthésie avant 3 ans	DiMaggio et al., 2011
Cohorte de naissance (1976-1982)	Voie basse avec (1495) ou sans ALR (3189)	Non indiquée	A la naissance	≤19 ans	Performances scolaires	Pas de différence	Flick et al., 2011b
Cohorte de naissance (1976-1982)	AG avant 2 ans (350) vs absence (700)	133 min	0-2 ans	≤19 ans	Performances scolaires	Difficultés scolaires si AG ≥2	Flick et al., 2011a
Cohorte prospective (2003-2006)	AG chirurgie cardiopathie congénitale (95)	Non indiquée	≤6 semaines	18-24 mois	Bayley II et III	Pas de différence	Guerra et al., 2011
Cohorte nationale de naissance (1986-1990)	Chirurgie hernie inguinale (2689) vs 5% de la population (14575)	Non indiquée	Enfance	15-16 ans	Performances scolaires	Pas de différence	Hansen et al., 2011
Cohorte de naissance (1989-1992)	Exposition anesthésique (321) vs absence (2868)	Non indiquée	0-3 ans	≤10 ans	CELF, CPM	↗troubles du langage /cognitifs après une seule exposition	Ing et al., 2012
Etude de Cohorte	Chirurgie digestive (287) vs normes population	1-12 h	Enfance	7-10 ans	Performances scolaires	Scores limites bas en cas d'exposition	Block et al., 2012
Cohorte observationnelle, longitudinale (2001-2004)	Chirurgie (hernie inguinale, canal artériel, laparotomie) (30) vs absence (178)	Non indiquée	Période néonatale (<33 SA)	2 ans	Bayley II	↘Scores moteurs, mais non significatif après ajustement	Filan et al., 2012
Etude rétrospective	AG hernie inguinale, circoncision ou cystoscopie (100) vs absence (106)	30-120 min	< 1 an	12 ans	Troubles des apprentissages (questionnaire téléphonique)	↗ troubles des apprentissages	Bong et al., 2013

Population étudiée	Exposé (n)/ contrôle (N)	Durée exposition	Age exposition	Age évaluation	Test	Devenir neurologique	Références
Cohorte de naissance nationale (1986-1990)	Pyloromyotomie (779) vs 5% de la population (14665)	Non indiquée	0-3 mois	15-16 ans	Performances scolaires et évaluations par professeurs	Pas de différence	Hansen et al., 2013
Cohorte prospective	Chirurgie pour strabisme. Etude avant/après (100)	67min	4-7 ans	1 jour avant, 1, 6 et 12 mois après	WPPSI III	Pas de différence	Fan et al., 2013
Cohorte rétrospective	Chirurgie cardiopathie congénitale (59) vs normes population	4,4 h	Enfance	12 mois	Bayley III	↘ Score cognitifs si halogénés	Andropoulos et al., 2014
Cohorte prospective (2003-2006)	Chirurgie cardiaque (91) vs normes population	Non indiquée	≤6 semaines	54 mois	WISC III	↘ QI et intégration motrice visuelle	Garcia Guerra et al., 2014
Cohorte de naissance (1989-1992)	• Anesthésie (112) vs absence (669) • Anesthésie (375) vs absence (1952)	Non indiquée	• 0-3 ans • 3-10 ans	≤ 10 ans	CELF, CPM, Performances scolaires, codage ICD-9	↘ scores neuropsychologiques.	Ing et al., 2014b, 2014a
Essai prospectif avant/après	Avant et après anesthésie par kétamine pour laser (49)	5 min, 1 à 3 expositions	10-12 mois	<2 ans	Bayley II	↘score après 3 expositions	Yan et al., 2014
Cohorte nationale rétrospective (2001-2005)	Anesthésie (3292) vs absence (13172)	Non indiquée	<3 ans	> 3 ans	TDAH (Codage ICD-9 CM 314.01)	Pas d'association	Ko et al., 2014
Etude de cohorte avec appariement	Anesthésie pour chirurgie urologique (28) vs absence (28)	Non indiquée	<1 an	6-11 ans	Test de mémoire, WASI, CBCL	Mémoire de récupération ↘ pour espace et couleur	Stratmann et al., 2014
Cohorte nationale rétrospective (2001-2007)	Anesthésie (5197) vs absence (20788)	Non indiquée	<2 ans	3-9 ans	Autisme	Pas d'association	Ko et al., 2015
Cohorte rétrospective	Anesthésie pour chirurgie urologique (15) vs absence (15)	> 1 heure	< 2 ans	10-17 ans	IRM fonctionnelle	Différences sur activation régions cérébrales	Taghon et al., 2015
Etude rétrospective cohorte nationale	Césarienne sous AG (12384) vs césarienne sous ALR (161992) vs AVB (362297)	Non indiquée	A la naissance	2-6 ans	Autisme (codage ICD-9 CM 299.0)	↗autisme en cas de césarienne sous AG	Chien et al., 2015
Etude de cohorte rétrospective	Anesthésie (53) vs absence (53)	37 min	<4 ans	5-18 ans	WISC/IRM	↘ QI et volume cortical	Backeljauw et al., 2015
Essai randomisé contrôlé	Chirurgie hernie inguinale sous AG (363) vs ALR (359)	54 min	< 1an	2 ans	Bayley III	Pas de différence	Davidson et al., 2016
Etude de cohorte avec appariement sur la fratrie	Chirurgie hernie inguinale (105) vs fratrie non exposée (105)	84 min	< 3 ans	8-15 ans	WASI, WISC, CBCL	Pas de différence	Sun et al., 2016
Cohorte nationale de naissance (1986-1990)	Chirurgie fente labio-palatine (509) vs 5% population (14677)	Non indiquée	3 mois	15-16 ans	Test scolaire	Scores ↘ en cas de fente labiale	Clausen et al., 2016
Etude de cohorte avec appariement	AG avant 4 ans (28366) vs absence (55910)	Non indiquée	0-6 ans	5-6 ans	EDI	↘score bien-être, relation, émotionnel si > 2 ans	O'Leary et al., 2016
Etude de cohorte avec appariement	AG avant 4 ans (4470) vs absence (13586)	Non indiquée	0-4 ans	5 ans	EDI	Déficit communication, connaissances, langage si > 2 ans	Graham et al., 2016

Tableau 2 : Essais cliniques évaluant l'effet d'une exposition aux anesthésiques chez l'enfant sur le devenir neurologique.
AG : anesthésie générale ; Bayley : échelle du développement de l'enfant de Bayley, 2ème ou 3ème édition ; CBCL : *Achenbach Child Behavior Checklist Parental Assessment* ; CELF : *Clinical Evaluation of Language Fundamentals* ; CITO : *Class Integration and Test Order* ; CPM : *Raven's Colored Progressive Matrices* ; EDI : *Early Development Instrument* ; ICD : *International Statistical Classification of Disease* ; K-ABC : *Kaufman Assessment Battery for Children* ; QI : quotient intellectuel ; TDAH : trouble déficit de l'attention/hyperactivité ; NEPSY II : *Developmental Neuropsychological Assessment, 2nd Edition* ; WAIS : *Wechsler Adult Intelligence Scales* ; WASI : *Wechsler Abbreviated Scales of Intellegience* ; WISC III ou IV : *Wechsler Intelligence Scale for Children 3rd or 4th Edition* ; WPPSI : *Wechsler Preschool and Primary Scales of Intelligence*. D'après Lin et al., 2017.

VII.3.2 Effets des morphiniques

Les opioïdes sont utilisés fréquemment chez le nouveau-né comme agents analgésiques puissants. Les morphiniques les plus utilisés en réanimation néonatale actuellement sont la morphine, le sufentanil, et le fentanyl (Carbajal et al., 2015). Le rémifentanil, utilisé depuis quelques années, semble de plus en plus avoir une place au sein de l'arsenal thérapeutique de l'analgésie du nouveau-né (Kamata et Tobias, 2016). La morphine est l'agent opiacé le plus évalué chez l'Animal et chez l'Homme. Comme pour les antagonistes du récepteur NMDA ou les agonistes du récepteur GABA, le mode d'action des morphiniques suggère qu'ils pourraient avoir un impact potentiel sur le développement cérébral. En effet, la liaison d'un morphinique avec un récepteur opioïde μ va entraîner l'activation d'un récepteur couplé à une protéine G, entraînant une diminution de l'AMP cyclique. L'activation du récepteur couplé aux protéines G modifie également les flux ioniques en diminuant l'influx calcique à l'origine d'une diminution du relargage pré-synaptique des neurotransmetteurs. Les opioïdes entraînent également une hyperpolarisation des neurones post-synaptiques par la majoration de l'efflux potassique, conduisant à une diminution de la transmission des neurotransmetteurs. Par ces mécanismes, le message nociceptif est inhibé et la perception douloureuse est modifiée (Rang et al., 2016). L'action des morphiniques sur le relargage des neurotransmetteurs pourrait avoir un impact sur le développement du cerveau immature car l'activité neuronale basale est impliquée dans la synaptogenèse et la différenciation neuronale (Schuurmans et al., 2015), mais cet impact n'a pas encore été clairement établi.

Chez l'Animal, certaines études ne montrent pas d'effet des opiacés. Par exemple, Massa et collaborateurs ne démontrent pas de modification de l'arborisation dendritique ou

de l'apoptose au niveau du cortex frontal chez le raton après exposition postnatale à la morphine entre P7 et P20 (Massa et al., 2012). En revanche, d'autres études précliniques mettent en avant des effets des opioïdes potentiellement délétères sur le cerveau immature :

- l'exposition prénatale à la morphine altère la migration neuronale et la survie des neurones embryonnaires (Harlan et Song, 1994) ;
- en cas d'exposition chronique à la morphine chez le raton entre P1 et P7, une induction de l'apoptose au niveau cortical et amygdalien (Bajic et al., 2013) ainsi que des effets neurotoxiques (Mao et al., 2002 ; Emeterio et al., 2006) ont été mis en évidence ;
- la composition protéique de l'hippocampe semble également modifiée après des injections quotidiennes de morphine entre P3 et P7 : les concentrations en GABA, taurine et myo-inositol sont diminuées et les concentrations en glutathion et en phospho-éthanolamine sont augmentées (Traudt et al., 2012) ;
- les concentrations cérébrales en neurotrophines (BDNF, et *Nerve growth factor*, NGF) et en enzymes anti-oxydantes sont également diminuées après administration de morphine chez le raton (Schrott et al., 2008 ; Rozisky et al., 2013; Nunes et al., 2016) ;
- l'activité de certaines nucléotidases (notamment la *Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase*, NTPDase) semble également altérée après exposition néonatale à la morphine (Rozisky et al., 2010, 2012) ;
- une altération du comportement nociceptif à l'âge adulte (hyperalgésie en cas d'exposition à la chaleur et/ou allodynie) est observée en cas d'exposition chronique à la morphine chez le raton entre P8 et P14 (Rozisky et al., 2011 ; Nunes et al., 2016).

Alors que les études précédemment citées n'évaluent que l'impact du morphinique seul sur le cerveau immature, certaines équipes de recherche se sont attachées à évaluer l'effet d'un morphinique en situation de procédure douloureuse ou stressante. En effet, en clinique, l'administration d'un opiacé n'est indiquée qu'en cas de perception douloureuse chez le patient. Lors de procédures douloureuses (injections répétées chez le raton), délétères pour le cerveau en développement, l'administration de morphine réduit le

processus apoptotique induit par la douleur (Dührsen et al., 2013). De façon similaire, en situation de stress induit chez la Souris, l'expression de certains gènes est augmentée au niveau de l'hippocampe (comme ceux liés à la réponse au stress ou à la synthèse des récepteurs NMDA). Mais cet effet semble en partie réversible en cas d'administration de morphine pendant la situation de stress (Juul et al., 2011). Les morphiniques semblent donc avoir un impact potentiellement délétère sur le cerveau immature de l'Animal, mais lorsque l'administration des opiacés a lieu en condition de douleur ou de stress cet effet pourrait être contrebalancé par le bénéfice lié à la diminution de la perception douloureuse et/ou stressante.

Chez l'Homme, l'effet de l'exposition néonatale aux morphiniques chez le prématuré a notamment été évalué lors de l'essai randomisé contrôlé NEOPAIN (Anand et al., 1999). L'administration continue de morphine n'a pas montré d'effet délétère sur le devenir neurologique à court terme (hormis pour le sous-groupe des prématurés nés entre 27 et 29 SA), alors que l'administration de bolus de morphine était associée à une recrudescence d'hémorragie intracérébrale, de leucomalacie périventriculaire ou de décès (Anand et al., 2004). L'hypotension associée à l'administration en bolus a été incriminée pour expliquer ces atteintes neurologiques, mais cette hypothèse reste controversée (Hall et al., 2005 ; Perlman, 2005 ; Anand et Hall, 2006). Simons et collaborateurs ont mis en évidence lors d'un autre essai randomisé contrôlé en double aveugle une diminution de l'incidence des hémorragies intracérébrales en cas d'exposition à la morphine chez le prématuré (Simons et al., 2003). Les effets à long terme de l'exposition aux morphiniques sur le développement neurologique sont peu étudiés jusqu'à présent. Il n'existe pas d'essai randomisé contrôlé élaboré pour analyser cette problématique. Cependant, des études rétrospectives, des études épidémiologiques prospectives ou des études ancillaires se sont intéressées à l'impact à long terme d'une exposition néonatale aux opiacés. Ainsi, dans le cadre d'un suivi de cohorte, l'exposition à la morphine est associée une majoration des troubles moteurs à huit mois d'âge corrigé. Cette association n'est pas retrouvée à 18 mois et n'intéresse pas les troubles cognitifs (Grunau et al., 2009). MacGregor et collaborateurs n'ont pas mis en évidence de différence significative en termes de QI, de troubles moteurs ou de troubles du comportement à l'âge de cinq ans, mais il existe une tendance vers un meilleur devenir neurodéveloppemental pour ces trois paramètres en cas de traitement néonatal par

morphine (MacGregor et al., 1998). *A contrario,* une étude de suivi a rapporté une diminution du QI à cinq ans si les enfants avaient été exposés à la morphine, mais cette différence disparaissait après ajustement avec un score de propension. L'effet délétère du morphinique persistait seulement pour l'analyse visuelle du test d'évaluation utilisé (*Revision Amsterdam Child Intelligence Test*, RAKIT) (de Graaf et al., 2011). Lors de l'évaluation de cette même cohorte à 8-9 ans, il n'a pas été démontré d'effet délétère de l'exposition néonatale à la morphine en termes d'intelligence, de troubles moteurs ou du comportement ; un impact bénéfique de la morphine sur les fonctions exécutives de la vie quotidienne a même été mis en évidence (de Graaf et al., 2013). Les résultats du suivi à cinq ans de la cohorte EPIPAGE 1 ne retrouvent pas d'association entre l'utilisation d'agents analgésiques/anesthésiques pendant la période néonatale et la survenue de troubles neurologiques (Rozé et al., 2008). Par ailleurs, une petite proportion des enfants de la cohorte NEOPAIN (*n*=14 en cas d'exposition à la morphine, *n*= 5 en cas d'exposition au placebo) a été évaluée entre cinq et sept ans (Ferguson et al., 2012). Il n'y avait pas de différence significative entre les deux groupes pour le QI et les troubles du comportement.

Au niveau de l'imagerie cérébrale, une diminution du volume du cortex orbito-frontal et subgénual à l'IRM a été observée au terme corrigé (41SA) chez des prématurés exposés à la morphine, associée à des troubles du comportement à l'âge de deux ans, mais ces anomalies ne persistaient pas à l'âge de sept ans (Steinhorn et al., 2015). Une diminution du volume cérébral global et de certaines régions spécifiques a été également décrite à l'âge de 10 ans chez des enfants ayant participé à l'étude de Simons et ayant été exposés à la morphine, sans atteinte neurocognitive associée (Simons et al., 2003 ; van den Bosch et al., 2015). Enfin, l'exposition au fentanyl chez des prématurés semble corrélée à la survenue d'hémorragie cérébelleuse ainsi qu'à une diminution du diamètre du cervelet à terme, sans effet sur le neurodéveloppement à l'âge de deux ans (McPherson et al., 2015). De la même manière, une diminution de la croissance du cervelet est retrouvée en cas d'exposition à la morphine chez des prématurés, associée à des troubles moteurs et cognitifs à 18 mois (Zwicker et al., 2016).

In fine, l'exposition néonatale aux morphiniques semble donc affecter le développement cérébral, mais la relevance clinique de cet effet reste controversée dans la littérature.

VII.4 *Le rémifentanil*

Le rémifentanil est le plus récent opioïde de synthèse, dérivé de la pipéridine, et utilisé en pratique clinique depuis les années 1990 aux Etats-Unis. La modification de sa structure par l'incorporation d'une liaison ester permet son hydrolyse par des estérases plasmatiques et tissulaires non spécifiques. Contrairement aux autres morphiniques, son élimination est donc indépendante de la fonction rénale et hépatique (Dershwitz et al., 1996 ; Hoke et al., 1997). Son principal métabolite, le GR90291, se lie également aux récepteurs opioïdes mais sa puissance est bien plus faible que celle du rémifentanil (1/4600ème, (Hoke et al., 1997)). La configuration moléculaire et le métabolisme rapide du rémifentanil se traduisent par un profil pharmacocinétique et pharmacodynamique unique, adapté à l'utilisation chez le nouveau-né.

VII.4.1 Propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques, spécificités du nouveau-né

Le métabolisme du rémifentanil est donc dépendant d'estérases aspécifiques tissulaires et plasmatiques, et non de la fonction hépatique et/ou rénale du patient (Dershwitz et al., 1996 ; Hoke et al., 1997). Les études de pharmacocinétique chez l'adulte mettent en évidence un faible volume de distribution, un délai d'action rapide de 1 à 2 minutes, une clairance rapide et une demi-vie d'élimination courte entre 3 et 10 minutes (Egan et al., 1993 ; Glass, 1995 ; Kapila et al., 1995 ; Davis et al., 1999 ; Glass et al., 1999 ; Ross et al., 2001 ; Egan et al., 2004). Chez l'enfant et le nouveau-né, le volume de distribution semble plus important et la clairance plus rapide que chez l'adulte, mais la demi-vie est similaire à celle de l'adulte (Davis et al., 1999 ; Ross et al., 2001 ; Rigby-Jones et al., 2007 ; Sam et al., 2009). Chez le prématuré, une seule étude de pharmacocinétique *in vitro* a été jusqu'alors entreprise (Welzing et al., 2011). Le rémifentanil était mélangé à du sérum de sang de cordon de 40 patients nés entre 24 et 41 SA, avec une concentration finale de 50 µg/L. La demi-vie médiane du rémifentanil était de 143 minutes ± 47 minutes (minimum 76 minutes, maximum 221 minutes) chez les prématurés et de 188 minutes ± 58 minutes (120 minutes, 208 minutes) chez les nouveau-nés à terme. Le rémifentanil étant dégradé par des estérases tissulaires et plasmatiques, la durée de la demi-vie du rémifentanil *in vitro* dans du sérum observée dans cette étude n'est pas comparable à celles observées *in vivo* sur des

échantillons de sang total. En revanche, cette étude met en évidence la présence d'une activité des estérases non spécifiques quel que soit le terme de naissance par la présence du GR90291, métabolite du rémifentanil, de manière croissante dans le temps. Afin d'affiner les propriétés pharmacocinétiques du rémifentanil chez le prématuré, d'autres études pharmacocinétiques et pharmacodynamiques sont nécessaires. Concernant les données pharmacodynamiques, le rémifentanil a une forte affinité pour les récepteurs aux opiacés μ, mais également une affinité plus faible pour les récepteurs κ et δ (Egan et al., 1993 ; Glass et al., 1999 ; Egan et al., 2004). La puissance du rémifentanil est approximativement égale à celle du fentanyl, 15 à 60 fois supérieure à celle de l'alfentanil et environ un dixième de la puissance du sufentanil (Egan et al., 1993 ; Patel et Spencer, 1996 ; Glass et al., 1999). Les effets secondaires habituellement décrits sont ceux des morphiniques, notamment les bradycardies, les hypotensions, les rigidités thoraciques, les nausées et les vomissements (Welzing et Roth, 2006).

VII.4.2 Exposition du fœtus au rémifentanil

L'utilisation du morphinique lors d'une césarienne sous anesthésie générale ne débute habituellement qu'après le clampage du cordon afin de ne pas exposer le fœtus au morphinique, et ainsi éviter au nouveau-né une imprégnation morphinique avec une potentielle dépression respiratoire à la naissance. En effet, les morphiniques traversent la barrière placentaire et l'administration de morphine chez la mère entraîne une exposition du fœtus puis du nouveau-né (Johnson et al., 1997). Compte tenu des caractéristiques pharmacocinétiques du rémifentanil, en particulier sa demi-vie courte, les pratiques ont évolué et l'analgésie maternelle avant le clampage du cordon a été proposée. En effet, si le rémifentanil, comme les autres morphiniques, passe la barrière placentaire, son métabolisme et son élimination semblent plus rapides chez le nouveau-né exposé (Kan et al., 1998 ; Ngan Kee et al., 2006 ; Coonen et al., 2010). Depuis quelques années, des essais ont évalué l'impact de l'administration de rémifentanil avant clampage du cordon au cours d'une anesthésie générale lors d'une césarienne sur l'état respiratoire du nouveau-né. Plusieurs études, dont une méta-analyse, ne retrouvaient pas d'effet significatif du rémifentanil sur le score d'APGAR ou le recours à une ventilation mécanique en salle de naissance (Behdad et al., 2013 ; Bakhouche et al., 2015 ; Li et al., 2015 ; Shaylor et al., 2016 ; Hu et al., 2017 ;

Zhang et al., 2017). En revanche, Noskova et collaborateurs avaient mis en évidence, en cas d'exposition anténatale au rémifentanil, un score d'APGAR plus bas à 1 minute, mais équivalent à 5 minutes, ainsi qu'un recours plus fréquent à la stimulation tactile pour diminuer les apnées, sans impact sur le recours à une ventilation mécanique (Noskova et al., 2015).

L'utilisation du rémifentanil s'est également étendue à l'analgésie pendant le travail, en remplacement de l'anesthésie locorégionale (Devabhakthuni, 2013 ; Ohashi et al., 2016). Son utilisation paraît aussi efficace et sûre que les autres modes d'analgésie du travail pour la mère et pour le nouveau-né. Le pH au cordon, le score d'APGAR et le recours à une ventilation mécanique en salle de naissance sont équivalents après une analgésie systémique par du rémifentanil ou après une anesthésie péridurale (Leong et al., 2011 ; Schnabel et al., 2012 ; Lin et al., 2014 ; Liu et al., 2014b ; Freeman et al., 2015 ; Jelting et al., 2017 ; Lee et al., 2017 ; Logtenberg et al., 2017 ; Weibel et al., 2017).

L'exposition fœtale au rémifentanil semble donc être sans retentissement sur l'adaptation à la vie extra-utérine et les effets sur le nouveau-né sont minimes ou inexistants dans la littérature. L'étude REAGI (numéro EudraCT 2013-001850-83), menée au CHU de Rouen entre 2014 et 2016, a permis l'inclusion de 52 patientes nécessitant une anesthésie générale pour une césarienne en urgence avant 37 SA. Elles ont été randomisées en double aveugle pour recevoir du rémifentanil ou un placebo dès l'induction. L'état du nouveau-né à la naissance et le devenir neurologique à 2 ans de l'enfant ont été comparés. Les résultats de cette étude, permettront d'évaluer les effets d'une imprégnation fœtale au rémifentanil à court terme et à l'âge de deux ans.

VII.4.3 Utilisation chez le nouveau-né

a Dans quels cas utiliser le rémifentanil ?

Chez le nouveau-né et l'enfant, le rémifentanil est principalement utilisé au cours d'interventions chirurgicales comme analgésique. Comparé à l'inhalation d'isoflurane ou d'halothane, l'administration de rémifentanil chez des nouveau-nés à terme pour une pylorotomie semble avoir un effet analgésique meilleur, sans effet délétère au niveau hémodynamique et respiratoire (Ben Khalifa et al., 2009). Le délai pour l'extubation et le

recours aux antalgiques en période post-opératoire étaient semblables en cas d'exposition au rémifentanil ou aux gaz halogénés (Davis et al., 2001 ; Galinkin et al., 2001). Une étude rétrospective concernant 65 enfants ayant nécessité une anesthésie générale par rémifentanil et sévoflurane pour une chirurgie digestive a mis en évidence la nécessité de doses plus importantes de rémifentanil pour les nourrissons (<2ans) que pour les nouveau-nés à terme ou pour les nouveau-nés prématurés (Michel et al., 2008). En effet, les posologies de rémifentanil avaient tendance à être dégressives au cours de l'intervention chez les nouveau-nés alors qu'elles étaient augmentées progressivement chez les nourrissons. L'extubation était effective environ 10 minutes après l'arrêt du rémifentanil. Un essai randomisé contrôlé en double aveugle a évalué l'effet du rémifentanil *versus* placebo lors de la tunnelisation d'une dérivation ventriculo-péritonéale chez des nourrissons anesthésiés au préalable avec de l'isoflurane et du protoxyde d'azote (Chambers et al., 2002). Le rémifentanil permettait une analgésie efficace, et la durée de ventilation trachéale ainsi que le délai de transfert en salle de réveil étaient comparables au groupe placebo. Concernant l'utilisation du rémifentanil lors d'une intervention chirurgicale chez les grands prématurés, une série de cas ne retrouvait pas de complication chez des patients de 26 et 27 SA pesant respectivement 400 et 580 grammes à 7 jours de vie, pour des laparotomies en cas d'entérocolite ulcéro-nécrosante (Sammartino et al., 2011). Il faut noter que l'utilisation d'un analgésique avec un métabolisme rapide comme celui du rémifentanil lors d'une intervention chirurgicale pourrait entraîner le recours à d'autres analgésiques en période post-opératoire immédiate (Kamata et Tobias, 2016). Dans les unités de réanimation néonatale, le rémifentanil peut également être utilisé pour l'analgésie et la sédation des nouveau-nés nécessitant une ventilation mécanique invasive (Stoppa et al., 2004 ; Pereira e Silva et al., 2005 ; e Silva et al., 2008 ; Giannantonio et al., 2009 ; Welzing et al., 2012).

En dehors de l'administration prolongée lors d'une anesthésie générale liée à un acte chirurgical ou d'une sédation pour ventilation mécanique, le rémifentanil peut être utilisé chez le nouveau-né lors de procédures invasives douloureuses de courte durée. En cas de traitement par laser pour une rétinopathie du prématuré, le rémifentanil, associé à du midazolam, est efficace et sans complication chez des patients intubés (Sammartino et al., 2003 ; Demirel et al., 2014). Un essai randomisé contrôlé en double aveugle a permis également d'évaluer l'efficacité et l'innocuité du rémifentanil (*versus* glucosé 5%) à faible

dose lors de la pose d'un cathéter central (cathéter épicutanéo-cave) chez des grands prématurés quel que soit le mode de ventilation (invasive ou non invasive) (Lago et al., 2008). Cinquante-quatre nouveau-nés ont été inclus, 27 dans chaque groupe (terme de naissance moyen 29 SA dans le groupe contrôle, 28 SA dans le groupe rémifentanil ; poids de naissance moyen 1144 g dans le groupe contrôle, 1108 g dans le groupe rémifentanil). Parmi eux, 36 patients étaient ventilés par CPAP nasale et 18 étaient intubés. Les scores de douleurs étaient significativement diminués dans le groupe rémifentanil et aucun effet délétère hémodynamique ou respiratoire n'a été relevé.

La sédation/analgésie en vue d'une intubation endotrachéale n'est pas consensuelle en néonatologie et de nombreux protocoles sont utilisés en fonction des habitudes locales. Une sédation/analgésie efficace durant la laryngoscopie permet un confort du patient, une meilleure stabilité cardio-respiratoire ainsi que des meilleures conditions d'intubation pour l'opérateur (Cook-Sather et al., 1998 ; Shah et Ohlsson, 2002). L'efficacité et la sécurité du rémifentanil utilisé lors d'une laryngoscopie ont été mises en évidence dans plusieurs essais randomisés contrôlés (Tableau 3).

Références	Nombre de patients	Terme de naissance	Groupe rémifentanil	Groupe contrôle	Résumé
Pereira e Silva et al., 2007	20	Entre 28 et 34 SA	Rémifentanil 1 µg/kg sur 1 minute et midazolam 20 µg/kg	Morphine 150 µg/kg et midazolam 20 µg/kg	Essai randomisé contrôlé. Meilleures conditions d'intubation dans le groupe rémifentanil. Pas d'effet secondaire.
Choong et al., 2010	30	Entre 25 et 30 SA	Rémifentanil 3 µg/kg sur 1 min et Atropine 20 µg/kg	Fentanyl 2 µg/kg, succinylcholine 2mg/kg et atropine 20 µg/kg	Essai randomisé contrôlé. Pas de différence pour le taux de réussite d'intubation. Meilleures conditions dans le groupe rémifentanil
Penido et al., 2011	20	Entre 28 et 34 SA	Rémifentanil 1 µg/kg sur 1 minute et midazolam 200 µg/kg	Rémifentanil 1 µg/kg sur une minute et propofol 2 mg/kg	Essai randomisé contrôlé. Pas de différence entre les deux groupes (l'objectif était de comparer propofol et midazolam)
Norman et al., 2011	28	Entre 25 et 28 SA	Rémifentanil 1 µg/kg, Glycopyrrolate 5 µg/kg, thiopental 2 à 3mg/kg et succinylcholine 2 mg/kg	Atropine 10 µg/kg et morphine 0,3 mg/kg	Essai randomisé contrôlé. Meilleures conditions d'intubation dans le groupe induction à séquence rapide. Troubles hémodynamiques plus importants dans le groupe morphine.
Norman et al., 2013	28	Entre 25 et 28 SA	Rémifentanil 1 µg/kg, Glycopyrrolate 5 µg/kg, thiopental 2 à 3mg/kg et succinylcholine 2 mg/kg	Atropine 10 µg/kg et morphine 0,3 mg/kg	Essai randomisé contrôlé. Altération prolongée de l'EEG dans le groupe morphine.
Avino et al., 2014	71	≥ 28 SA	Rémifentanil 1 µg/kg et atropine 20 µg/kg	Morphine 100 µg/kg, midazolam 50 µg/kg et atropine 20 µg/kg	Essai randomisé contrôlé. Non infériorité du rémifentanil *versus* morphine. Pas d'effet secondaire.

Tableau 3 : Essais randomisés contrôlés évaluant une sédation/analgésie par rémifentanil en vue d'une intubation endotrachéale chez le prématuré.
EEG : électro-encéphalogramme, SA : semaine d'aménorrhée. D'après Kamata et Tobias, 2016.

Enfin le développement des techniques d'administration mini-invasive de surfactant chez le prématuré dans les années 2010 (c'est à dire la méthode INSURE (pour *Intubation, Surfactant, Extubation)* qui nécessite une extubation précoce après l'administration du surfactant (Verder et al., 1994), et la méthode LISA (pour *Low Invasive Surfactant*

Administration) qui consiste à placer un cathéter en position trachéale puis à administrer le surfactant en ventilation spontanée avec un support ventilatoire non invasif (Kribs et al., 2007)) a suscité l'élaboration de nouveaux protocoles de sédation/analgésie nécessitant des molécules dont le délai d'action et l'élimination sont rapides. Compte-tenu de ses propriétés pharmacologiques, le rémifentanil s'avère un candidat potentiel pour ce type de procédure (de Kort et al., 2013). Welzing et collaborateurs ont, lors d'une étude pilote, évalué la prémédication par rémifentanil lors des procédures INSURE pour 21 prématurés entre 29 et 32 SA (Welzing et al., 2009). Une dose unique de 2 µg/kg de rémifentanil permettait d'obtenir une sédation suffisante pour 81% des patients, et 19% avaient nécessité l'administration d'une deuxième dose. L'intubation était réussie lors du premier essai pour 71% des patients et les conditions d'intubation étaient bonnes ou excellentes pour tous les nouveau-nés. Aucune rigidité thoracique n'était mentionnée. Un essai randomisé contrôlé a comparé l'effet du rémifentanil (2 µg/kg sur deux minutes) à un placebo (sérum physiologique) (Badiee et al., 2013). L'utilisation du morphinique apportait une analgésie de qualité sans effet délétère hémodynamique. Une rigidité thoracique pour 4 patients (20%), et des apnées d'une durée moyenne de 8,7 minutes $\pm$ 5,2 minutes pour 16 patients ont été observées dans le groupe rémifentanil. Une étude observationnelle récente sur 14 patients a mis en évidence un taux élevé de rigidité thoracique (43%), mais les doses administrées étaient élevées (jusqu'à 5 µg/kg), et l'administration était très rapide (30 secondes) (de Kort et al., 2017).

b A quelle posologie ?

Les posologies utilisées sont très variables en fonction de l'indication et du support ventilatoire du patient. En ventilation non invasive, des doses minimes sont nécessaires afin d'éviter les pauses respiratoires. Lago et collaborateurs proposent de débuter à 0,03 µg/kg/min pour la pose d'un cathéter central chez un prématuré en CPAP (*continuous positive airway pressure)*. En cas de ventilation mécanique, une analgésie de qualité peut être obtenue par le rémifentanil avec des posologies moyennes plutôt basses allant de 0,1 µg/kg/min (Giannantonio et al., 2009) à 0,25 µg/kg/min (Welzing et al., 2012), avec des posologies extrêmes entre 0,075 µg/kg/min et 0,5 µg/kg/min. En cas d'intubation, un bolus de 1 à 3 µg/kg sur une minute est proposé (Choong et al., 2010 ; Avino et al., 2014). Une

administration continue plus longue pourrait être proposée afin de réduire les risques de rigidité thoracique. Pour l'administration de surfactant par méthode mini-invasive, des bolus de 1 à 2 µg/kg ont été évalués (Welzing et al., 2009 ; Badiee et al., 2013 ; de Kort et al., 2017).

c Quels sont les potentiels effets délétères ?

Comme les autres morphiniques, le rémifentanil est dépresseur respiratoire ce qui nécessite des précautions d'utilisation en cas de ventilation non invasive (recherche de la dose minimale efficace notamment). Les effets hémodynamiques liés au rémifentanil sont également semblables à ceux des autres morphiniques. Les épisodes de bradycardie ou d'hypotension artérielle observés dans les études cliniques sont rarement cliniquement significatifs. Dans une étude, même avec un bolus relativement important (5µg/kg), la diminution de la fréquence cardiaque était seulement de 9 battements par minute et la diminution de la pression artérielle de 12% par rapport aux valeurs de base (Ross et al., 2001). La rigidité thoracique est connue comme étant un effet secondaire des morphiniques de synthèse, notamment en cas de forte dose et d'administration rapide, mais peut également survenir en cas de doses plus faibles (Dewhirst et al., 2012). Cet événement peut être compliqué d'hypoxémie avec bradycardie ainsi que de difficultés ventilatoires. Dans les études précédemment citées évaluant l'effet du rémifentanil pour une intubation, des bolus de 3, 2 et 1 µg/kg entraînaient une rigidité thoracique respectivement dans 13% (2/15), 10% (4/40) et 6 % (2/36) des cas (Choong et al., 2010 ; Badiee et al., 2013 ; Avino et al., 2014). Cependant, d'autres études ne retrouvent pas de rigidité thoracique avec des protocoles similaires (Welzing et al., 2009). Enfin, les phénomènes de tolérance et d'hyperalgésie induite par les morphiniques entraînent une augmentation des doses administrées pour atteindre le niveau d'analgésie souhaité (Vinik et Kissin, 1998 ; Guignard et al., 2000 ; Crawford et al., 2006 ; Anand et al., 2010). Débuter l'administration du rémifentanil à faible dose puis titrer selon le seuil d'analgésie désiré, administrer le morphinique en continu et éviter les bolus rapides permettrait de réduire la survenue de ces effets secondaires connus.

VII.4.4 Interactions avec le récepteur NMDA (modèle d'hyperalgésie induite par les morphiniques)

L'hyperalgésie induite par les morphiniques (HIM) est un phénomène connu depuis la fin du 19ème siècle, initialement décrit lors d'observations d'injections abusives de morphine dans une série de cas de 9 patients (Allbutt, 1880). L'HIM se traduit par une hypersensibilité à un stimulus douloureux observée lors d'une administration chronique d'opiacés. Le traitement supposé soulager la douleur du patient est alors à l'origine d'une sensation douloureuse exacerbée. Tous les morphiniques peuvent être impliqués dans la survenue d'une HIM, notamment le rémifentanil (Rivosecchi et al., 2014). Depuis les observations historiques, de nombreux de travaux de recherche ont permis d'élaborer des hypothèses sur les mécanismes cellulaires et moléculaires potentiellement impliqués (Yi et Pryzbylkowski, 2015 ; Roeckel et al., 2016). Ce processus multifactoriel semble impliquer une des isoformes du récepteur μ. Protéine possédant sept domaines transmembranaires (7TM) couplée à une protéine G, le récepteur μ est encodé par le gène OPRM1. Chez l'Homme, trois isoformes ont été décrites : 7TM (MOR1), 6TM (MOR1K) et 1TM (Pasternak et Pan, 2013). L'isoforme MOR1K est tronquée dans son extrémité N-terminale et ne possède pas de domaine extracellulaire ni de premier domaine transmembranaire. Les deux variants d'épissage MOR1 et MOR1K présentent une activité antagoniste : alors que l'activation du récepteur canonique MOR1 inhibe l'activité cellulaire via l'activation d'une protéine Gαi/o, l'activation du récepteur MOR1K induit une excitation cellulaire via l'activation d'une protéine Gαs (Gris et al., 2010). Ainsi, en condition de répression de l'expression de MOR1K chez la Souris, l'hyperalgésie attendue par l'administration chronique de morphine n'est pas observée (Oladosu et al., 2015). L'effet analgésique des morphiniques est donc dépendant du récepteur MOR 7TM, alors que l'isoforme MORK1 semble impliquée dans le phénomène d'hyperalgésie. Le récepteur NMDA semble également jouer un rôle dans la survenue de l'HIM (Mitra, 2008 ; Silverman, 2009 ; Yi et Pryzbylkowski, 2015 ; Roeckel et al., 2016). En pratique clinique, l'utilisation de kétamine, antagoniste du récepteur NMDA, participe à la prévention de l'HIM (Joly et al., 2005 ; Forero et al., 2012). Chez la Souris, l'injection d'un antagoniste ou d'un bloqueur du récepteur NMDA, respectivement le D-AP5 (*D-2-Amino-5-phosphonopentanoic acid*) ou le sulfate de magnésium, permet de diminuer l'hyperalgésie (Ahmadi et al., 2014). Par ailleurs, l'enregistrement électrophysiologique de l'activité des

récepteurs NMDA de neurones dorsaux de la moelle épinière de Rat en culture met en évidence une activation de ces récepteurs en cas de traitement par du rémifentanil, activation dépendante des récepteurs μ et δ (Zhao et Joo, 2008). Simonnet et Riva suggèrent que la stimulation du récepteur μ par un morphinique induit l'activation du récepteur NMDA par l'intermédiaire d'une cascade de phosphorylation par des protéines kinases (Simonnet et Rivat, 2003 ; Figure 33). Plus précisément, la phosphorylation des sous-unités GluN1 (Rodríguez-Muñoz et al., 2012 ; Anderson et al., 2015 ; Zhang et al., 2015) et GluN2B (Kato et al., 2007 ; Gu et al., 2009 ; Liu et al., 2014a ; Zhao et al., 2017) semble être impliquée dans le phénomène d'HIM. Enfin, la protéine kinase C participe à la phosphorylation du récepteur NMDA en cas d'exposition aux opiacés (Rodríguez-Muñoz et al., 2012 ; Zhao et al., 2012 ; Song et al., 2015).

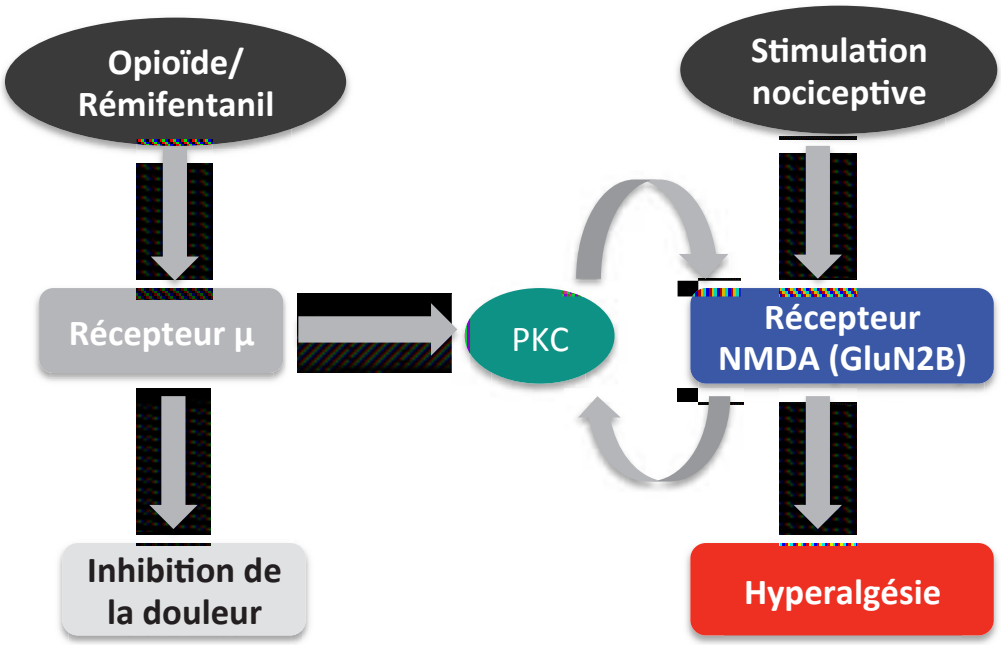


Figure 33 : Interactions entre le récepteur NMDA et les morphiniques.
Mécanismes décrits dans la survenue de l'hyperalgésie post opératoire. L'activation des récepteurs μ par l'administration de morphiniques entraîne la phosphorylation et l'activation du récepteur NMDA induisant l'hyperalgésie, *via* une cascade de phosphorylation. D'après Simonnet et Rivat, 2003 et Gu et al., 2009.

En ce qui concerne le rémifentanil, commercialisé et utilisé en pratique clinique sous le nom d'Ultiva® (*Glaxo SmithKline*) ou sous forme générique (rémifentanil, *Mylan*), il contient dans ses excipients de la glycine, agoniste du récepteur NMDA. Pour les deux

formes commercialisées, 50 µM de rémifentanil sont associés à environ 3,6 mM de glycine. Le rôle propre de la glycine est donc primordial à prendre en compte dans l'effet global du rémifentanil. Une étude électrophysiologique (patch-clamp) a exploré en 2005, les effets du chlorhydrate de rémifentanil avec et sans son excipient, la glycine, sur l'activation du récepteur NMDA (Guntz et al., 2005). Une activation du récepteur était induite en présence de glycine, et cet effet était significativement augmenté lorsque le rémifentanil était associé à la glycine.

VII.4.5 Impact du rémifentanil sur la mortalité cellulaire au sein du cerveau immature murin (première partie des travaux réalisés au laboratoire Inserm U1245)

L'existence d'un lien entre le rémifentanil et le récepteur NMDA a donc motivé l'étude des effets du rémifentanil sur les phénomènes de mort cellulaire dans le cerveau immature en utilisant un modèle murin *ex vivo* de tranches cérébrales organotypiques (Tourrel et al., 2014). Les expérimentations ont été réalisées avec la forme commerciale du rémifentanil, l'Ultiva® *(Glaxo SmithKline)* utilisée en pratique clinique et, chez le souriceau âgé de 2 jours car les lésions cérébrales induites à ce stade sont comparables à celles des cerveaux humains prématurés (24 semaines d'aménorrhée, (Marret et al., 1995b ; Gressens et al., 1996)). La mort cellulaire par nécrose ou apoptose a été respectivement quantifiée par l'analyse de l'activité lactate deshydrogénase (LDH) et de l'activité caspase-3. Le rémifentanil (50 µM) ne modifiait pas l'activité LDH par rapport à un groupe contrôle. En revanche, le rémifentanil inhibait significativement l'activité caspase-3. En immunohistochimie, il a été observé que le rémifentanil n'avait pas d'effet sur la nécrose, alors qu'une diminution du marquage caspase-3 clivée était detectée dans les couches superficielles du cortex. Par ailleurs, la proportion des noyaux pyknotiques dans les couches superficielles était diminuée en présence de rémifentanil, ce qui suggère l'implication de la voie intrinsèque (mitochondriale) de l'apoptose (diminution de l'activité caspase 9 et 3, absence d'effet sur l'activité caspase-8). Cet effet anti-apoptotique était conforté par la diminution de l'expression de la protéine pro-apoptotique Bax et un effet bénéfique du rémifentanil sur l'intégrité mitochondrale. Par ailleurs, le rémifentanil permettait la phosphorylation de la sous-unité GluN2B corticale et l'action anti-apoptotique du rémifentanil était abolie en

présence d'antagoniste de GluN2B et d'inhibiteurs de protéines kinases. L'effet anti-apoptotique du morphinique semblait donc impliquer la sous-unité GluN2B du récepteur NMDA.

OBJECTIFS DE LA THESE

Protéger le cerveau du nouveau-né prématuré est un défi auquel le néonatologiste est confronté au quotidien. L'amélioration globale des soins aux prématurés a permis l'amélioration de la morbi-mortalité des nouveau-nés et également la prise en charge réanimatoire aux limites de la viabilité (à partir de 23 SA). Cependant, la naissance prématurée peut avoir des retentissements sur la trajectoire neurodéveloppementale de l'enfant, à l'origine de troubles moteurs et/ou cognitifs parfois graves. Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à l'évaluation clinique et préclinique d'interventions médicamenteuses pouvant s'intégrer dans le cadre de stratégies de neuroprotection du prématuré.

I Le sulfate de magnésium administré avant la naissance a-t-il un effet à l'âge scolaire ?

La prévention des complications neurologiques du prématuré débute avant la naissance. En cas de menace d'accouchement prématuré, le transfert de la femme enceinte dans un centre de niveau III permet d'améliorer le devenir global de l'enfant. Assurer à la fois la sécurité de la parturiente et la bonne vitalité fœtale est alors la priorité des obstétriciens. La préparation de l'éventuelle naissance prématurée débute également avec la corticothérapie anténatale et l'administration intraveineuse de sulfate de magnésium. En effet, depuis les années 2000, cinq essais randomisés contrôlés internationaux ont permis de mettre en évidence un effet neuroprotecteur à l'âge de deux ans d'une administration anténatale de sulfate de magnésium en cas de menace d'accouchement prématuré. Parmi ces études, l'essai français Premag, piloté par Stéphane Marret, avait permis l'inclusion de 688 nouveau-nés, dont 606 avaient été évalués à l'âge de deux ans (Marret et al., 2007, 2008). L'objectif de cette première partie de thèse était d'évaluer à l'âge scolaire le devenir neurologique des enfants inclus dans cet essai. Nous avons émis l'hypothèse que l'exposition anténatale au sulfate de magnésium améliorait le devenir neurologique de l'enfant à l'âge scolaire et n'entraînait pas d'effet délétère à long terme. En effet, une même molécule pourrait potentiellement avoir un effet double sur le cerveau immature : à la fois bénéfique et néfaste. Par ailleurs, l'évaluation neurologique à l'âge scolaire apporte des informations complémentaires et plus détaillées que l'examen à deux ans. Pour cela, un questionnaire a été conçu à partir de grilles d'évaluation déjà existantes (questionnaire EPIPAGE 1, SDQ), et

envoyé aux parents. Le critère de jugement principal était un critère composite décès/trouble moteur. Les critères de jugement secondaires étaient la survenue de troubles des apprentissages, de troubles cognitifs, de troubles du comportement, de troubles psychiatriques et de déficits neurosensoriels.

II Quels sont les effets du rémifentanil sur le cerveau du souriceau ?

Pendant la grossesse et au cours des premiers mois de vie, le cerveau en développement est exposé à diverses substances médicamenteuses, notamment à des agents anesthésiants dont la potentielle neurotoxicité est souvent mise en cause (Jevtovic-Todorovic et al., 2003). Le rémifentanil est un morphinique de synthèse dont l'utilisation en période périnatale est en plein essor. En effet, compte tenu de ses propriétés pharmacologiques, le rémifentanil est un morphinique de choix pour une anesthésie générale lors d'une césarienne en urgence, pour l'analgésie du travail en cas de contre-indication à l'anesthésie péridurale ou également en cas de sédation/analgésie du nouveau-né. L'absence d'évaluation de ce morphinique sur le cerveau en développement a incité notre équipe à évaluer son action sur le cerveau du souriceau. Des premiers travaux du laboratoire ont permis de mettre en évidence *ex vivo* un effet anti-apoptotique du rémifentanil impliquant la voie mitochondriale de l'apoptose (Tourrel et al., 2014). L'objectif de cette deuxième partie de thèse était d'évaluer *in vivo* le retentissement d'une exposition au rémifentanil sur le cerveau lésé par une injection intracorticale d'iboténate chez le souriceau à P2. Nous avons émis l'hypothèse que l'effet anti-apoptotique observé *ex vivo* pouvait se traduire par un effet protecteur *in vivo* en contexte lésionnel. Après avoir mis au point le modèle (mode d'administration du rémifentanil, posologie adéquate, évaluation des effets cardio-respiratoires), la première partie du travail a consisté à analyser l'effet du morphinique sur la taille des lésions induites par l'iboténate. Des mécanismes potentiellement impliqués dans l'effet du rémifentanil ont été évalués, notamment l'étude de l'apoptose, de la production des dérivés réactifs de l'oxygène et de l'astrogliose après exposition au rémifentanil ou à un placebo. Enfin, les conséquences fonctionnelles de l'exposition au morphinique ont été appréciées par des tests comportementaux jusqu'à l'âge adulte.

RESULTATS

I School-Age Outcomes following a Randomized Controlled Trial of Magnesium Sulfate for Neuroprotection of Preterm Infants

Clément Chollat, Maya Enser, Estelle Houivet, Delphine Provost, Jacques Bénichou, Loïc Marpeau, Stéphane Marret.

Publié en 2014 dans *The Journal of Pediatrics.*

L'amélioration de la prise en charge des enfants prématurés a permis la diminution de la morbi-mortalité périnatale. Cependant, les complications neurologiques liées à une naissance prématurée sont encore fréquentes et à l'origine de déficits neuromoteurs et/ou cognitifs parfois sévères. La protection du cerveau immature est donc un enjeu majeur de la médecine néonatale actuelle. Une des stratégies neuroprotectrices possible est l'administration anténatale de sulfate de magnésium en cas de menace d'accouchement prématuré. Il a en effet été démontré au travers de cinq essais randomisés contrôlés et de six méta-analyses de ces essais que l'exposition au sulfate de magnésium avant la naissance prématurée était associée à une réduction du risque de paralysie cérébrale et de retard de développement à 2 ans. 688 fœtus avaient été inclus dans l'essai randomisé français Premag, dont 352 avaient été exposés au sulfate de magnésium. Le suivi à deux ans de la cohorte avait permis la mise en évidence d'un effet protecteur, mais non significatif, du magnésium sur les anomalies motrices et cognitives. (Marret et al., 2007, 2008).

L'objectif de cette étude était d'évaluer le devenir neurologique à l'âge scolaire de la cohorte française Premag par un questionnaire rempli par les parents.

Nous avons cherché à répondre aux questions suivantes :

1. L'impact bénéfique du sulfate de magnésium sur le devenir neuromoteur observé à 2 ans est-il également présent à l'âge scolaire ?

2. L'exposition anténatale au sulfate de magnésium a-t-elle un impact sur le devenir cognitif, les troubles du langage, les troubles des apprentissages, les troubles du comportement, les troubles psychiatriques et les déficits sensoriels à long terme ?

3. Existe-t-il des effets délétères de l'exposition anténatale au sulfate de magnésium à l'âge scolaire ?

Dans cet article, nous avons mis en évidence en cas d'exposition anténatale au sulfate de magnésium :

- une amélioration du devenir moteur ;
- l'absence d'effet sur les devenirs sensoriels et cognitifs, les troubles du langage, de l'alimentation et du sommeil ;
- une diminution des troubles du comportement, notamment l'hyperactivité ;
- une amélioration du devenir scolaire ;
- un meilleur ressenti parental de la santé des enfants ;
- l'absence d'effets délétères.

CLINICAL AND LABORATORY OBSERVATIONS

www.jpeds.com • THE JOURNAL OF PEDIATRICS

School-Age Outcomes following a Randomized Controlled Trial of Magnesium Sulfate for Neuroprotection of Preterm Infants

Clément Chollat, MD[1,2], Maya Enser, MD[3], Estelle Houivet, MSc[4], Delphine Provost, MD[3], Jacques Bénichou, MD, PhD[4], Loïc Marpeau, MD[2,5], and Stéphane Marret, MD, PhD[1,2]

In a French randomized trial, children at school-age demonstrated no evidence of harm from fetal exposure to $MgSO_4$ before very preterm birth. Motor dysfunction/death, qualitative behavioral disorders, cognitive difficulties, school grade repetition, and education services were decreased in the children exposed to $MgSO_4$, although the differences were not significant. *(J Pediatr 2014;165:398-400).*

The development of strategies for fetal neuroprotection is a key issue in modern perinatal medicine. To date, 5 randomized controlled trials, including the French PREMAG trial,[1,2] have demonstrated a neuroprotective effect of prenatal exposure to $MgSO_4$.[1-6] A meta-analysis of these 5 trials found that prenatal $MgSO_4$ treatment significantly reduced the risk of cerebral palsy (CP) at age 2 years.[7]

The mechanism of the protection conferred by $MgSO_4$ remains unclear. Theoretically, $MgSO_4$ has multiple beneficial effects related to its reduction in neural and endothelial cell dysfunction, but it has potentially deleterious effects as well.[8-11] Therefore, we followed up the French PREMAG cohort to evaluate the children for any long-term deleterious effects of $MgSO_4$, and to assess developmental and psychomotor outcomes at school-age.

Methods

Between December 2009 and April 2012, we contacted the families of all surviving children from the French PREMAG cohort. This protocol was approved by the Comité Consultatif sur le Traitement de l'Information en Matière de Recherche dans la Santé of the French Ministry of Health (17.12.2009) and the Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés (CNIL) (19.04.2010).

The overall objective was to assess the impact of prenatal exposure to $MgSO_4$ on the neurologic outcome of children at school-age. The primary outcome was a composite of death and motor outcome. The secondary outcomes were composites of learning/cognitive disabilities and special education services, behavioral and psychiatric disorders, and health and neurosensory deficits.

Parents completed a 48-item questionnaire of neuropsychomotor development items, including the long-term follow-up etude épidémiologique sur les petits âges gestationnels questionnaire,[12] and the Strengths and Difficulties Questionnaire (SDQ).[13] We developed outcome indicators from the questionnaire to assess motor deficits, cognitive deficits/learning disabilities, psychiatric disorders, and overall deficiencies (**Table I**; available at www.jpeds.com).

Statistical Analyses

All statistical analyses were by intention to treat. A general logistic model using generalized estimating equations to account for twins or triplets was used to compare the $MgSO_4$ and the placebo groups. Comparisons of outcomes were adjusted for stratification variables, gestational age, singleton/multiple pregnancy, socioeconomic variables, sex, and birth weight residual. The birth weight residual was estimated by linear regression of birth weight on gestational age, to eliminate the colinearity between the 2 variables. ORs and corresponding 95% CIs were estimated. Statistical significance was defined as $P < .05$. These analyses were performed with SAS version 9.2 (SAS Institute, Cary, North Carolina).

Results

At school-age, 185 children were lost to follow-up (26.9%), and 431 children were assessed, at a mean age of 11 years (range, 7-14 years). Long-term outcomes were available for 503 children, including those who had died (**Figure**; available at www.jpeds.com). Overall characteristics of children and mothers were broadly similar in the 2 groups; however, the $MgSO_4$ group included more boys and had a lower mean birth weight (**Table II**; available at www.jpeds.com). The main characteristics of participants and families lost to follow-up, except for prenatal corticosteroid exposure, were also similar in the two groups (**Table III**; available at www.jpeds.com).

No children died between age 2 years and school-age. The rates of at least one motor or cognitive impairment, behavioral

CP	Cerebral palsy
SDQ	Strengths and Difficulties Questionnaire

From the [1]Department of Neonatal Pediatrics and Intensive Care, Rouen University Hospital; [2]Region INSERM Team 28 "NeoVasc", Laboratory of Microvascular Endothelium and Neonate Brain Lesions, Institute for Biomedical Research, Rouen University; and Departments of [3]Anesthetics and Intensive Care, [4]Biostatistics, and [5]Obstetrics and Gynecology, Rouen University Hospital, Rouen, France

This follow-up study was funded by the European Regional Development Fund and the Upper-Normandy region. The authors declare no conflicts of interest.

Registered with ClinicalTrials.gov: NCT00120588.

0022-3476/$ - see front matter. Copyright © 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.jpeds.2014.04.007

Vol. 165, No. 2 • August 2014

Table IV. Primary and secondary outcomes of death, motor impairment, cognitive deficity, health, and other

Outcome	$MgSO_4$ group, n/N (%)	Placebo group, n/N (%)	Unadjusted OR (95% CI)	OR adjusted for patient characteristics (95% CI)*	*P* value
Mortality and neurologic outcome†,‡					
Death and/or motor deficit	138/252 (54.8)	147/249 (59.0)	0.81 (0.56-1.2)	0.79 (0.53-1.17)	.24
Death and/or cognitive deficits	173/252 (68.7)	175/249 (70.3)	0.93 (0.63-1.34)	0.89 (0.59-1.33)	.57
Death and/or psychiatric disorder	104/252 (41.3)	117/251 (46.6)	0.84 (0.58-1.22)	0.80 (0.54-1.20)	.29
Death and/or motor and/or cognitive deficits and/or psychiatric disorder	200/252 (79.4)	211/249 (84.7)	0.71 (0.44-1.15)	0.68 (0.41-1.11)	.16
Neuromotor deficits†					
Severe CP	7/218 (3.2)	9/211 (4.3)	0.85 (0.58-1.26)	0.92 (0.62-1.36)	.66
Mild to moderate CP	23/218 (10.5)	24/211 (11.4)			
No CP, other motor disorder	74/218 (33.9)	76/211 (36.0)			
None identified	114/218 (52.4)	102/211 (48.3)			
Cognitive deficits/learning disabilities†					
Severe	15/218 (6.9)	22/211 (10.4)	0.88 (0.60-1.29)	0.89 (0.60-1.33)	.58
Moderate	124/218 (56.9)	115/211 (54.5)			
None identified	79/218 (36.2)	74/211 (35.1)			
Associaton of motor and cognitive deficits†					
Motor only	18/218 (8.3)	29/211 (13.8)	0.88 (0.61-1.27)	0.94 (0.64-1.38)	.76
Cognitive only	53/218 (24.3)	57/211 (27.0)			
Motor and cognitive	86/218 (39.5)	80/211 (37.9)			
None	61/218 (27.9)	45/211 (21.3)			
Behavioral and psychiatric disorder†					
Moderate	70/218 (32.1)	79/213 (37.1)	0.87 (0.57-1.32)	0.84 (0.54-1.32)	.45
None identified	148/218 (67.9)	134/213 (62.9)			
Overall deficits†					
Severe	19/218 (8.7)	27/211 (12.7)	0.71 (0.47-1.08)	0.73 (0.47-1.11)	.14
Moderate	147/218 (67.4)	146/211 (68.5)			
None identified	52/218 (23.9)	40/211 (18.8)			
Learning and cognitive disabilities and special education services					
Language disorder§	19/67 (28.3)	19/60 (31.6)	0.85 (0.37-1.96)	0.80 (0.31-2.05)	.65
Schooling					
Regular school and classroom	200/212 (94.3)	198/210 (94.3)	0.9 (0.38-2.17)	1.18 (0.46-3.03)	.73
Specialized class room	7/212 (3.3)	8/210 (3.8)			
Specialized institution	4/212 (1.9)	4/210 (1.9)			
Repeated grades¶	9/212 (4.2)	17/210 (8.1)	0.5 (0.22-1.16)	0.44 (0.19-1.06)	.07
Specific education assistance‖	16/211 (7.6)	21/207 (10.1)	0.73 (0.36-1.45)	0.72 (0.34-1.54)	.40
Home education services	7/207 (3.4)	18/207 (8.7)	0.37 (0.15-0.9)	0.42 (0.16-1.06)	.07
Health					
Hospital admissions	102/216 (47.2)	116/204 (56.9)	0.69 (0.47-1.03)	0.66 (0.44-1.01)	.05
Asthma	42/214 (19.6)	57/210 (27.1)	0.67 (0.42-1.08)	0.7 (0.43-1.15)	.16
Health as assessed by parents					
Excellent or good	210/218 (96.3)	194/210 (92.3)	0.38 (0.15-0.95)	0.4 (0.15-1.09)	.07
Fair or poor	8/218 (3.7)	16/210 (7.6)			
Sleep disorder**	25/213 (11.7)	14/214 (6.5)	1.85 (0.91-3.7)	1.52 (0.7-3.33)	.29
Eating disorder**	17/212 (8.0)	22/210 (10.5)	0.67 (0.33-1.35)	0.66 (0.33-1.35)	.26
Neurosensory deficiencies††					
Hearing deficiency	9/218 (4.1)	14/211 (6.6)	0.60 (0.26-1.43)	0.61 (0.25-1.49)	.28
Visual deficiency	105/218 (48.2)	98/211 (46.5)	1.06 (0.72-1.56)	0.99 (0.66-1.49)	.97

Values are n/M (%).
Values are n (%) unless stated otherwise.
Percentages may not sum to 100 because of rounding.
*OR adjusted for gestational age, singleton/multiple pregnancy, socioeconomic variables, sex, and birth weight (using the residual of the linear regression of birth weight on gestational age).
†Deficits are defined as in Table I.
‡These data are for 503 children (431 followed at 11 years and 72 who died).
§Language disorder was defined as treatment by a speech-language pathologist.
¶Repeated grades was defined as a 2-year delay compared with a normal age for a given grade.
‖Specific assistance was defined as use of special education services and home care.
**Sleep and eating disorders were defined as moderate or severe difficulties as assessed by parents.
††Hearing deficiency was defined as poor hearing (as assessed by parents) or wearing a hearing aid; visual deficiency was defined by poor vision (as assessed by parents) and wearing glasses.

disorder, and death were lower in the $MgSO_4$ group; however, no differences were statistically significant (Table IV). Neuromotor deficits did not differ significantly between the $MgSO_4$ and placebo groups, but fewer children in the $MgSO_4$ group had no CP or any motor disorder. The rates of language disorders were distributed similarly between the two groups. The percentage of children who repeated at least two school grades was lower in the $MgSO_4$ group than in the placebo group (4.2% vs 8.1%), as was the prevalence of those requiring home education services (3.4% vs 8.7%), with differences that approached significance ($P = .07$). The overall SDQ score for behavioral and psychiatric disorders was better in the $MgSO_4$ group (abnormal or borderline behavior, 24.3% vs 32.9%; $P = .17$). The prevalence of

THE JOURNAL OF PEDIATRICS • www.jpeds.com Vol. 165, No. 2

hyperactivity was lower in the $MgSO_4$ group, but not significantly so (22.5% vs 26.3%; $P = .71$) (Table V; available at www.jpeds.com). Parents of the $MgSO_4$ group perceived their children's health to be better compared with parents of the placebo group, but again the difference was not significant.

Discussion

We assessed the long-term effect of prenatal exposure to $MgSO_4$ in the French PREMAG cohort of children born preterm before 33 weeks' gestation. Our long-term follow-up revealed no detrimental effects of prenatal $MgSO_4$ exposure. Although the differences between the $MgSO_4$ and placebo groups were not statistically significant, the average reductions in neurologic outcomes are of potential clinical significance. These observations are strengthened by the reduced grade repetition, less need for specific assistance at school, fewer specific educational and home care needs, and better parental perception of health.

These results should be qualified in the light of this study's limitations. The mean age of the children assessed was 11 years, but the range was 7-14 years, owing to a 6-year inclusion period and a data collection time of 2 years. The study's statistical power is low, owing to the relatively small number of children included in long-term follow-up and the high number lost to follow-up (26.9%); however, characteristics of respondents and nonrespondents were similar. Our study was based on mail surveys with questionnaires completed by parents. Such surveys are simple, inexpensive, and reliable tools for long-term cohort assessment,[14-17] but they likely underestimate the rate of cognitive/learning disabilities.

Although the rates of neuromotor disabilities were not significantly different between our two study groups, the results of our long-term study are consistent with those of a meta-analysis that found lower rates of CP at 18-24 months after such exposure.[7] Even if not statistically significant, there was an improvement in cognitive/learning/behavioral disabilities. In particular, there was a decrease in grade repetition, less need for specific assistance at school, fewer specific education needs, and higher SDQ score. These results allow us to assume that the promising short-term results observed at age 2 years are very likely sustained at school-age, and, equally important, strongly suggest that the beneficial effects of $MgSO_4$ observed at 2 years are not counterbalanced by later deleterious effects. ■

We are grateful to Nathalie Mestre for technical assistance, JoAnn Cahn for editorial assistance, Nikki Sabourin-Gibbs for linguistic support, Catherine Lévêque for administrative support, and members of the initial PREMAG Trial Group. We are indebted to the women and their children who participated in this study.

Submitted for publication Dec 11, 2013; last revision received Mar 14, 2014; accepted Apr 3, 2014.

Reprint requests: Clément Chollat, MD, Hôpital Charles Nicolle Service de Pédiatrie Néonatale et Réanimation, 1 rue de Germont, 76000 Rouen, France. E-mail: clement.chollat@chu-rouen.fr

References

1. Marret S, Marpeau L, Zupan-Simunek V, Eurin D, Lévêque C, Hellot MF, et al. Magnesium sulphate given before very-preterm birth to protect infant brain: the randomised controlled PREMAG trial. BJOG 2007;114:310-8.
2. Marret S, Marpeau L, Bénichou J. Benefit of magnesium sulfate given before very preterm birth to protect infant brain. Pediatrics 2008;121:225-6.
3. Mittendorf R, Dambrosia J, Pryde PG, Lee KS, Gianopoulos JG, Besinger RE, et al. Association between the use of antenatal magnesium sulfate in preterm labor and adverse health outcomes in infants. Am J Obstet Gynecol 2002;186:1111-8.
4. Altman D, Carroli G, Duley L, Farrell B, Moodley J, Neilson J, et al. Do women with pre-eclampsia, and their babies, benefit from magnesium sulphate? The Magpie Trial: a randomised placebo-controlled trial. Lancet 2002;359:1877-90.
5. Crowther CA, Hiller JE, Doyle LW, Haslam RR. Effect of magnesium sulfate given for neuroprotection before preterm birth: a randomized controlled trial. JAMA 2003;290:2669-76.
6. Rouse DJ, Hirtz DG, Thom E, Varner MW, Spong CY, Mercer BM, et al. A randomized, controlled trial of magnesium sulfate for the prevention of cerebral palsy. N Engl J Med 2008;359:895-905.
7. Doyle LW, Crowther CA, Middleton P, Marret S, Rouse D. Magnesium sulphate for women at risk of preterm birth for neuroprotection of the fetus. Cochrane Database Syst Rev 2009;CD004661.
8. Sugimoto J, Romani AM, Valentin-Torres AM, Luciano AA, Ramirez Kitchen CM, Funderburg N, et al. Magnesium decreases inflammatory cytokine production: a novel innate immunomodulatory mechanism. J Immunol 2012;188:6338-46.
9. Wu N, Veillette A. Immunology: magnesium in a signalling role. Nature 2011;475:462-3.
10. Paoletti P, Neyton J. NMDA receptor subunits: function and pharmacology. Curr Opin Pharmacol 2007;7:39-47.
11. Kang SW, Choi SK, Park E, Chae SJ, Choi S, Jin Joo H, et al. Neuroprotective effects of magnesium-sulfate on ischemic injury mediated by modulating the release of glutamate and reduced of hyperreperfusion. Brain Res 2011;1371:121-8.
12. Larroque B, Ancel PY, Marret S, Marchand L, André M, Arnaud C, et al. Neurodevelopmental disabilities and special care of 5-year-old children born before 33 weeks of gestation (the EPIPAGE study): a longitudinal cohort study. Lancet 2008;371:813-20.
13. Goodman R. The Strengths and Difficulties Questionnaire: a research note. J Child Psychol Psychiatry 1997;38:581-6.
14. Bortolus R, Parazzini F, Trevisanuto D, Cipriani S, Ferrarese P, Zanardo V. Developmental assessment of preterm and term children at 18 months: reproducibility and validity of a postal questionnaire to parents. Acta Paediatr 2002;91:1101-7.
15. Flamant C, Branger B, Nguyen The Tich S, de la Rochebrochard E, Savagner C, Berlie I, et al. Parent-completed developmental screening in premature children: a valid tool for follow-up programs. PLoS ONE 2011;6:e20004.
16. Wilson BN, Kaplan BJ, Crawford SG, Campbell A, Dewey D. Reliability and validity of a parent questionnaire on childhood motor skills. Am J Occup Ther 2000;54:484-93.
17. Riley AW. Evidence that school-age children can self-report on their health. Ambul Pediatr 2004;4(4 Suppl):371-6.

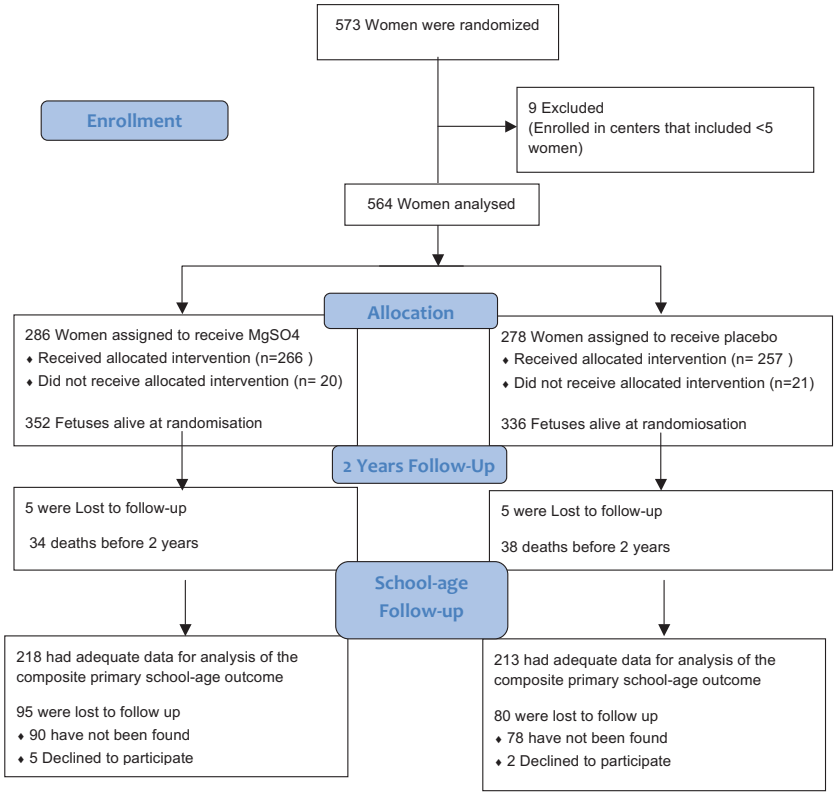


Figure. Prenatal $MgSO_4$ exposure for neuroprotection trial participant flow at the school-age follow-up.

THE JOURNAL OF PEDIATRICS • www.jpeds.com Vol. 165, No. 2

Table I. Classification of deficits

Classification	Description
Neuromotor deficits	
Severe CP*	CP, unable to walk or walks only with aid
Mild to moderate CP	CP, but walks without aid
No CP, other motor disorder†	No CP but dyspraxia or motor coordination disorder
None identified	Neither CP nor motor disorder identified
Cognitive deficits/learning disabilities	
Severe	Special school/class
Moderate	Has repeated a grade and/or receives/needs special support at school, has schooling difficulties, language disorder‡
None identified	Mainstream class appropriate for age without any special support
Association of motor and cognitive deficiencies	
Motor only	Severe or moderate CP or other disorder without cognitive deficit/learning disability
Cognitive only	Severe or moderate cognitive deficit/learning disability without motor deficit
Motor and cognitive	Motor deficit and cognitive deficit/learning disability
None	No motor or cognitive deficit identified
Psychiatric disorder	
Severe	Autism, pervasive development disorders, treated with risperidone
Moderate	Hyperactivity or attention deficit disorder or methylphenidate medication or overall SDQ >17 or SDQ hyperactivity subscale >7 or conduct disorder as reason for a visit to a psychiatrist or a psychologist at age 11 y
None identified	None of the above
Overall deficits	
Severe	At least 1 of severe CP, severe cognitive deficit/learning disabilities, severe psychiatric disorder
Moderate	At least 1 of moderate CP, other motor disorder, moderate cognitive deficit or moderate psychiatric disorder
None identified	None of the above

*CP defined as being unable to walk, or walking only with aid, or treated with botulinum toxin infusion or tenotomy.
†Other motor disorders were defined as coordination disorders, difficulties in cycling, drawing, cutting with scissors, playing with construction toys or puzzles, washing him/herself, dressing or tying shoes, receiving psychomotor or ergotherapy sessions.
‡Language disorders were defined by treatment by a speech-language pathologist at the time the questionnaire was received.

Table II. Characteristics of the children and their families

Characteristics	$MgSO_4$ group (n = 218)	Placebo group (n = 213)	*P* value
Children			
Gestational age, wk, mean (SD)	29.9 (2.0)	30.1 (1.9)	.31
<27	21 (9.6)	16 (7.5)	.43
27-29	70 (32.1)	68 (31.9)	.96
30-32	127 (58.3)	129 (60.6)	.63
Singleton birth, n (%)	139 (63.8)	143 (67.1)	.46
Birth weight, g, mean (SD)	1397 (24)	1476 (25)	.02
Male sex, n (%)	117 (53.7)	82 (38.5)	.02
Prenatal corticosteroid exposure, n (%)	208 (95.4)	204 (95.8)	.85
Reasons for preterm birth, n (%)			
Preterm labor	39 (17.9)	61 (28.6)	.06
Preterm premature rupture of membranes	82 (37.8)	67 (31.5)	
Chorioamnionitis	58 (26.6)	58 (27.2)	
Prepartum hemorrhage	28 (12.8)	22 (10.3)	
Other	11 (5.0)	5 (2.3)	
Age at long-term follow-up, mo, mean (SD)	134.0 (17.1)	134.4 (5.6)	.76
Families			
Maternal age at birth, y, mean (SD)	29.5 (5.3)	29.5 (4.9)	.94
Maternal educational level, n (%)			
Did not finish high school or equivalent	3 (1.4)	2 (1.0)	.08
Completed high school or equivalent	59 (27.7)	80 (38.5)	
Some college or university	48 (22.5)	51 (24.5)	
University graduate	103 (48.4)	75 (36.1)	
Unknown	5 (2.3)	5 (2.3)	
Family arrangement, n (%)			
Single parent	46 (21.1)	46 (21.6)	.22
Two-parent family	162 (74.3)	151 (70.9)	
Shared custody	9 (4.1)	9 (4.2)	
Foster care	1 (0.4)	5 (2.3)	
Other or unknown	0 (0)	3 (1.4)	

Data are for the 431 children with adequate information at the reception of the questionnaire. Percentages may not sum to 100 because of rounding.

Table III. Main characteristics of the participants and those lost to follow-up

Characteristics	Participants (n = 431)	Lost to follow-up (n = 185)	*P* value
Male sex, n (%)	248 (57.5)	104 (56.2)	.76
Gestational age, wk, mean (SD)	29.8 (2.2)	29.5 (2.2)	.85
<27 wk, n (%)	37 (8.6)	12 (6.5)	.38
27-29 wk, n (%)	138 (32.0)	69 (37.3)	.20
30-32 wk, n (%)	256 (59.3)	104 (56.2)	.46
Singleton birth, n (%)	282 (65.4)	120 (64.9)	.89
Prenatal corticosteroid exposure, n (%)	412 (95.6)	164 (88.6)	.001
Reason for preterm birth, n (%)			
Preterm labor	100 (23.2)	42 (22.7)	.76
Preterm premature rupture of membranes	149 (34.6)	71 (38.4)	
Chorioamnionitis	116 (26.9)	41 (22.2)	
Prepartum hemorrhage	50 (11.6)	24 (15.5)	
Other	16 (3.7)	7 (3.8)	
Prenatal $MgSO_4$ exposure, n (%)	218 (50.6)	100 (54.1)	.59
CP at 2 y, n (%)*	38 (8.8)	14 (7.6)	.61

Data are for the 616 children alive at 2 years (including 10 children lost to follow-up at 2 years) with adequate information. Percentages may not sum to 100 because of rounding.
*CP was assessed among 606 children. Ten children were lost to follow-up at 2 years, 5 in each group.

Table V. SDQ

Scale	$MgSO_4$ (n = 218), n (%)	Placebo (n = 213), n (%)	Unadjusted OR (95% CI)	OR adjusted for patient characteristics (95% CI)*	*P* value
Emotional Symptoms Scale					
Normal	133 (61.0)	126 (59.2)	1.14 (0.65-2)	1.51 (0.85-2.7)	.16
Borderline + abnormal	85 (39)	87 (40.9)			
Conduct Problem Scale					
Normal	162 (74.3)	161 (75.6)	1.14 (0.73-1.79)	1.43 (0.89-2.33)	.14
Borderline + abnormal	56 (25.7)	52 (24.4)			
Hyperactivity Scale					
Normal	169 (77.5)	157 (73.7)	0.83 (0.53-1.31)	0.9 (0.56-1.47)	.71
Borderline + abnormal	49 (22.5)	56 (26.3)			
Peer Problems Scale					
Normal	160 (73.4)	151 (70.9)	0.91 (0.59-1.41)	0.92 (0.57-1.45)	.71
Borderline + abnormal	58 (26.6)	62 (29.1)			
Prosocial Scale					
Normal	205 (94.0)	201 (94.4)	1 (0.99-1.01)	1.22 (0.49-3.03)	.66
Borderline + abnormal	13 (6)	12 (5.6)			
Total Difficulties Score					
Normal	165 (75.7)	143 (71.8)	0.70 (0.45-1.09)	0.72 (0.45-1.15)	.17
Borderline + abnormal	53 (24.3)	70 (32.9)			

*OR adjusted for gestational age, singleton/multiple pregnancy, socioeconomic variables, sex, and birth weight (using the residual of the linear regression of birth weight on gestational age).

II Neuroprotective Effects of Remifentanil against Excitotoxic Brain Damage in Newborn Mice

Clément Chollat, Maryline Lecointre, Matthieu Leuillier, Isabelle Remy-Jouet, Jean-Claude Do Rego, Lénaïg Abily-Donval, Yasmina Ramdani, Patricia Compagnon, Bertrand Dureuil, Stéphane Marret, Bruno José Gonzalez, Sylvie Jégou, Fabien Tourrel.

Soumis en août 2017 à *Anesthesiology*.

La mise en place de stratégies de neuroprotection du cerveau immature est essentielle pour diminuer chez l'enfant les complications neurodéveloppementales liées une naissance prématurée. L'efficacité de certaines interventions a déjà été démontrée, notamment pour l'administration anténatale de sulfate de magnésium ou la mise en place de soins de développement. Le choix des agents anesthésiques à administrer aux nouveau-nés fait partie intégrante de ces stratégies neuroprotectrices. En effet, certaines molécules comme la kétamine ou le propofol peuvent avoir des effets délétères sur le cerveau immature et la trajectoire développementale de l'enfant (Creeley et al., 2013 ; Lecointre et al., 2015). Nous avions démontré en 2014 que le rémifentanil, morphinique de synthèse, exerçait *ex vivo* un effet anti-apoptotique sur le cortex cérébral immature (Tourrel et al., 2014). Dans la suite de ces travaux, nous avons évalué *in vivo* l'impact du rémifentanil sur le cerveau immature, dans un contexte de lésion induite par l'iboténate, agoniste glutamatergique.

Le but de cette étude était d'évaluer dans un modèle néonatal murin les conséquences de l'effet anti-apoptotique du rémifentanil précédemment mis en évidence *ex vivo* sur le développement des lésions excitotoxiques induites et sur le développement fonctionnel du souriceau.

Nous avons cherché à répondre aux questions suivantes :

1. L'effet anti-apoptotique mis en évidence *ex-vivo* se traduit-il *in vivo* par un effet neuroprotecteur sur la taille des lésions induites par l'iboténate ?

2. Par quels mécanismes le rémifentanil protège-t-il des lésions cérébrales ?

3. Les effets observés *in vivo* du rémifentanil sur la vitalité cellulaire cérébrale ont-ils un impact sur le comportement de la Souris jusqu'à l'âge adulte ?

Dans cet article, nous avons mis en évidence que le rémifentanil administré chez le souriceau lésé était associé à :

- une franche réduction de la taille de la lésion cérébrale induite par l'iboténate ;
- une diminution de l'astrogliose réactionnelle, de la production de ROS et de l'activité caspase ;
- une amélioration de l'activité locomotrice entre P6 et P12 (géotaxie négative et agrippement) ;
- un effet anxiolytique à P18 chez les femelles.

Abstract

Background: Remifentanil, a synthetic opioid used for analgesia in cesarean section or in neonatal intensive care, exerts an anti-apoptotic activity on immature mice brain in *ex vivo* experiments. A model of neonatal brain injury by intracortical ibotenate injection was used to evaluate the impact of remifentanil *in vivo*.

Methods: Postnatal day-2 (P2) mice received three intraperitoneal injections of remifentanil (500 ng/g over a 10-min period) or saline followed by an intracortical injection of ibotenate (10 µg). Cerebral reactive oxygen species (ROS) production, cell death, *in situ* labeling of cortical caspase activity, astrogliosis, and the lesion size were determined at various time points after ibotenate injection. Finally, behavioral tests were performed until P18.

Results: In injured neonatal brain, remifentanil significantly decreased ROS production, cortical caspase activity, DNA fragmentation, and cortical GFAP levels. The size of the ibotenate-induced lesions was significantly reduced after remifentanil treatment. Performance of negative geotaxis (P6–8) and grasping reflex (P10–12) were improved in the remifentanil group. At P18, remifentanil-treated females spent more time in the open field center than control, suggesting less anxiety.

Conclusions: *In vivo,* exposure to remifentanil exerts a neuroprotective effect on the developing mouse brain that is associated with a reduction of brain lesion size and prevention of some behavioral deficits.

Introduction

Better protecting the developing brain of very preterm infants remains a daily challenge for all specialists in perinatal care. Despite improvement of neonatal mortality and morbidity,[1–3] very preterm infants remain vulnerable and at risk of developing neurological impairments.[4–7] Hypotheses about the genesis of these deficits include a combination of environmental and/or genetic factors inducing or modulating brain lesions in preterm newborns.[8,9] To limit the occurrence of such events, implementing strategies of neuroprotection during brain development is essential.[10–14] Evaluating the benefit/risk balance for each potentially deleterious drug administered to the brain, such as anesthetics, is one of those strategies.[15–17] Fetuses and preterm newborns are exposed to general anesthesia during cesarean delivery or in neonatal intensive care when sedation and analgesia is recommended.[18–21] The role of these agents remains extremely controversial. On the one hand, management of pain is essential for the premature newborn, as the lack of pain care could lead to neurological complications such as behavioral or cognitive disorders.[22–24] On the other hand, anesthetics, including opioids, have been implicated as being potentially deleterious.[25,26] In animal studies, opioid exposure is associated with alterations of neuronal proliferation and degeneration, as well as behavioral changes.[27–29] In some human studies, morphine exposure is associated with early alterations in cerebral structure and with short-term neurobehavioral problems.[30–32]

Among opioids used in neonatology, remifentanil has attractive pharmacokinetic properties: it is a synthetic ultrashort-acting opioid, potent μ-opioid receptor agonist, metabolized by nonspecific plasma and tissue esterases, and, consequently, unaffected by renal or liver function.[33] It is used for general anesthesia for cesarean delivery or analgesia for invasive procedures as tracheal intubation for the newborn.[34–36] Remifentanil has been shown to activate the glutamatergic N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor through a μ-opioid receptor-initiated cascade.[37–40] However, in the developing brain, activation of the NMDA

receptor can lead to excitotoxic or anti-apoptotic effects, depending on the cortical layers.[41] Using an *ex vivo* model of brain slices from postnatal day 2 mice (P2), we previously showed that remifentanil exerts an anti-apoptotic activity without necrotic effect, involving both opioids and NMDA receptors (NMDA-R), and the intrinsic mitochondrial-dependent apoptotic pathway.[42] To clarify the effects of remifentanil on the immature injured brain, a well-defined rodent model of neonatal brain lesion by intracortical injection of the NMDA-R agonist ibotenate was used to evaluate the impact of remifentanil *in vivo*.[43,44] This excitotoxic model can reproduce some aspects of perinatal brain lesions observed in human preterm neonates.[45–48] In this study, we investigated the effects of remifentanil exposure in P2 mice in the context of excitotoxicity on (1) brain reactive oxygen species (ROS) production, cell death, astrogliosis, and size of ibotenate-induced lesion and (2) sensorimotor development and motor performance from the neonatal period.

Materials and Methods

Animals

NMRI (Naval Medical Research Institute) mice (Janvier, Le Genest Saint Isle, France) were housed under controlled conditions with a 12-h light/dark cycle at 21 ± 1°C with free access to food and tap water. Animal manipulations were performed in accordance with the European Communities Council Directives (86/609/EEC), the French National legislation (ethical approvals no. 01316.02 and 01680.02), and were under the supervision of authorized investigators (SJ, ML authorizations no. A76-34 and A76-13 from the Ministère de l'Agriculture et de la Pêche). Females were individually housed and inspected daily for pregnancy and delivery. The day of birth was considered as postnatal day 0 (P0). In all litters included, P2 male and female pups (2.26–2.35 g) were randomly assigned to each experimental group.

Determination of the effective dose of remifentanil for inducing sedation in P2 pups

The clinically used remifentanil formulation, Ultiva® (containing 3.7 mM glycine per 50 µM remifentanil), was purchased from GlaxoSmithKline (Rueil-Malmaison, France) and diluted in NaCl 0.9%. P2 pups received three intraperitoneal (ip) injections of Ultiva (20 µl/g) over a 10-min period or the same volume of NaCl. Three doses of Ultiva were used to evaluate the effective dose for inducing sedation, with each Ultiva injection containing 50, 250, or 500 ng of remifentanil. The sedation time was measured, using the righting reflex test performed after the last injection of remifentanil. Control mice were injected with NaCl. When a neonate is placed in the supine position, it immediately turns over in a righting reflex to restore its normal prone position. The pups were placed supine on a plane surface and their mean time to return to a normal prone position during two consecutive trials was recorded (cut-off: 60 sec). The righting reflex was assessed until 30 min after the last injection. Between tests, pups

stayed with their dams. The behavioral test to measure sedation time was carried out during the first part of the light phase (between 09:00 and 11:00 h). Nineteen to 22 P2 pups from seven litters were included in each experimental group.

Determination of plasma remifentanil concentrations

Only P2 pups ip injected with 3 × 500 ng/g of remifentanil were used. At 5 min after the last injection, trunk blood from five pups was collected, pooled in a heparinized tube, and immediately maintained on ice until remifentanil measurement. The quantification of remifentanil from 14 plasma pools was investigated by combining reverse-phase high-performance liquid chromatography analysis with tandem mass spectrometry. See Supplemental Digital Content 1 for the methods used in this study.

Quantification of physiological parameters

Ventilation and heart rates

The remifentanil (remi) and NaCl groups were compared to a third group of untreated pups. Pups were maintained in a cotton nest and filmed for 5 min. Two investigators unaware of the experimental group (CC and FT) counted the number of breaths within 30 sec. Three counts were performed by pup and 7–9 pups were used for each experimental group.

Heart rate was monitored for 5 min immediately after the last injection of remifentanil or NaCl, and nine pups were used per experimental group. Electrocardiogram recordings were taken using subcutaneous surgical steel needle electrodes (29-gauge, 12-mm length) taped to the pup's foot pads. The signal was acquired at a 1000-µs rate by using PowerLab data acquisition system and biopotential amplifiers operated with LabChart 8.0 software (AD Instruments Ltd, Oxford, UK), and data were analyzed using the electrocardiogram module of LabChart Pro 8.0 software (AD Instruments Ltd).

Blood gas analysis

Pups were decapitated immediately after the last injection, and trunk blood (mix of venous and arterial blood) from seven pups was collected and pooled in heparinized capillary tubes. Blood gas (pCO_2, pO_2) and pH were measured immediately from eight blood pools using a clinical blood gas analyzer (ABL800 Flex, Radiometer, Brea, CA, USA).

Ibotenate administration: model of excitotoxic brain lesions

Intracortical (ic) injection of ibotenate was performed at P2 pups immediately after the last ip injection of remifentanil (500 ng/g; Ibo/remi group) or NaCl (Ibo/NaCl group). In some experiments, a third group of unlesioned and untreated pups was added (unlesioned group). As previously described,[43,49,50] injection was given under a warming lamp using a 26-gauge needle mounted on a Hamilton syringe microdispenser device. Details of the experiments are given in Supplemental Digital Content 1. Pilot injection tests were done with the CellTracker™ Red (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) to standardize the injection protocol.

Measurement of ROS production by electron paramagnetic resonance spectroscopy

The production of ROS was evaluated using electron paramagnetic resonance spectroscopy as described before.[51] See Supplemental Digital Content 1 for the methods used in this study.

***In situ* labeling and quantification of cortical caspase activity**

See Supplemental Digital Content 1 for the methods used in this study.

Cleaved caspase-3 immunohistochemistry

See Supplemental Digital Content 1 for the methods used in this study.

Fragmented DNA detection by enzyme-immunoassay

See Supplemental Digital Content 1 for the methods used in this study.

GFAP immunohistochemistry and western blot

See Supplemental Digital Content 1 for the methods used in this study.

Determination of lesion size

Two investigators blinded to the treatment groups (CC and FT), determined the lesion size in each brain. See Supplemental Digital Content 1 for the methods used in this study.

Behavioral assessments of neonate mice sensorimotor development

The measures of sensorimotor development were assessed by negative geotaxis and suspension tests according to methods described by Altman and Sudarshan.[52] See Supplemental Digital Content 1 for the methods used in this study.

Juvenile mouse behavior in the open field test

See Supplemental Digital Content 1 for the methods used in this study.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using PRISM (Graphpad, San Diego, CA, USA). The data were plotted as mean ±SEM. Differences between groups were assessed by Mann–Whitney *U*-test or Kruskal–Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test. Occurrence rates of cyst lesions and survival rates between experimental groups were performed using Fisher's exact test. For behavioral experiments, the statistical analysis was performed using two-way

ANOVA followed by Bonferroni's post-test. Tests used for each experiment, the number of independent experiments, and *p* values are summarized in Supplemental Digital Content 2. A target sample size of 56 pups, equally distributed (n=28 in each group), was calculated to detect a 30% reduction of the size of ibotenate-induced lesion, with a type I error (two-sided) of 5% and a power of at least 90 %. The other sample sizes were estimated based on previous experiments.[42,51,52] A p value < 0.05 was considered statistically significant.

Results

Remifentanil anesthesia, pharmacokinetics, and physiological responses

Neonatal exposure to remifentanil affected the righting reflex latency (Figure 1A). Following remifentanil administration at doses 250 and 500 ng/g, the pups spent significantly more time on their back as compared to the control pups ($p < 0.0001$) and the pups administered with the 50 ng/g dose of remifentanil ($p < 0.0001$). As compared to the control group, the pups injected with the lower dose of remifentanil (50 ng/g) exhibited only low sleepiness, with no significant increase of latency time to restore a normal prone position. From 10-min post-injection, pups injected with 500 ng/g spent significantly more time to turn over as compared to pups injected with 250 ng/g remifentanil ($p < 0.01$ and $p < 0.05$ at 10 and 15 min, respectively), indicating a dose-dependent effect of remifentanil on sedation. At 30 min after remifentanil injection (250 or 500 ng/g), pups showed righting reflex latency time equivalent to NaCl-treated mice, indicating that animals recovered rapidly from anesthesia (Figure 1A). There was no mortality during and after anesthesia. Considering these results, the highest tested dose of remifentanil (500 ng/g) was used in the following steps of the study. At 5 min after the last injection (500 ng/g), the plasmatic concentration of remifentanil measured by combining high-performance liquid chromatography analysis with tandem mass spectrometry was 10.03 ± 0.35 nmol/L ($n = 14$).

Remifentanil exposure led to a significant decrease of respiratory frequency as compared to untreated and NaCl-treated pups (Figure 1B, $p < 0.01$ and $p < 0.05$ respectively). Blood gases measured following remifentanil administration revealed respiratory acidosis (Figures 1C, D, $p < 0.01$). Conversely, pO2 values were not significantly different between remifentanil and NaCl-treated pups (Figure 1E). Without anesthesia, heart rate values were in an acceptable range (485.9 ± 36.1 bpm).[53] Remifentanil significantly reduced heart rate compared to NaCl ($p < 0.05$; Figure 1F).

Remifentanil protects the neonatal brain against ibotenate-induced damage

Cleaved caspase-3 immunohistochemistry and CellTracker probe were used to visualize the injection site of ibotenate (Figures 2A–C). At 10 min after lesion induction (M10), an excessive production of ROS was detected in brains from the Ibo/NaCl group as compared to the unlesioned group ($p < 0.01$). The production of ROS was more pronounced 5 h after lesion (H5; $p < 0.01$). Conversely, in the Ibo/remi group, a weak increase of ROS was measured at M10 ($p < 0.05$) and at H5 post-lesion, and ROS production was not significantly different from that of the unlesioned group ($p = 0.0513$; Figure 2D).

At H5, ic ibotenate injection induced a large increase of caspase activity around the lesion site (Figures 2E, G). Remifentanil administration significantly reduced cortical caspase activity induced by ibotenate ($p < 0.05$; Figures 2F, G).

Cleaved caspase-3 immunohistochemistry performed at P3 showed that ic ibotenate injection induced a widespread apoptotic signal in the ipsilateral hemisphere (Figures 2H1, 2). The immunolabeling was particularly dense in the cortex around the injection site and in the striatum. Conversely, the apoptotic immunolabeling observed in the ibotenate-treated hemisphere of the remifentanil group appeared weaker (Figures 2I1, 2).

Nucleosomal DNA fragmentation and histone release is a characteristic of the apoptotic process. Quantitative analysis on P3 of DNA fragmentation showed that ic ibotenate injection potently increased cell death in the ipsilateral hemisphere as compared to the unlesioned group ($p < 0.0001$; Figure 2J). Remifentanil administration significantly decreased ibotenate-induced DNA fragmentation in the injected hemisphere ($p < 0.05$; Figure 2J).

One day after ic ibotenate injection, a decrease of cortical thickness was observed and a destructive cyst of white matter was already present (Figure 3A1). GFAP immunodetection was used to examine the astroglial reactivity. In the ipsilateral hemisphere to the lesion of an

Ibo/NaCl pup, GFAP positive astrocytes were found in the cortex, striatum, and thalamus, with the higher signal being observed in the interior zone bordering the lateral ventricle (Figures 3A1, 2). In the ipsilateral hemisphere of Ibo/remi pups, the immunolabeling appeared much weaker than in Ibo/NaCl pups (Figures 3B1, 2). Evaluation of the immunolabeled area in the interior zone bordering the lateral ventricle revealed a drastic decrease of astroglial reactivity in the Ibo/remi group (Figure 3C, $p < 0.05$). Western blot analysis showed a significant decrease in GFAP cortical levels after remifentanil treatment (Figure 3D, $p < 0.05$).

Mouse pups injected at P2 with ic ibotenate and ip NaCl developed cortical lesion shrinkage of the white matter together with the formation of cysts at P7 (Figure 3E). Remifentanil exposure produced a reduction of the ibotenate-induced cortical lesion size (up to 67%, $p < 0.001$; Figure 3F), in both males and females ($p < 0.01$ and $p < 0.05$, respectively). Similarly, in the Ibo/remi group, the occurrence of cystic lesions in white matter was lower than in the Ibo/NaCl group (51% vs. 62%; data not shown), although this decrease was not statistically significant, based on Fisher's exact test ($p = 0.4553$).

Survival rate at 5 h post-injection with ibotenate was higher in the Ibo/remi group as compared to the Ibo/NaCl group (Table 1, $p < 0.01$). The survival rate in males at 5 h post-injection was significantly higher in the Ibo/remi group as compared to the Ibo/NaCl group ($p < 0.01$), whereas no difference was observed in females. At 5 days post-lesion, although the survival rate was higher in the Ibo/remi group than in the Ibo/NaCl group, especially in males, no significant difference was observed in a test of contingency (Fisher's exact test).

Effect of remifentanil treatment on sensorimotor development of P2 lesioned and unlesioned pups

From P2 to P12, body weight showed a significant increase in the male Ibo/remi pups as compared to the Ibo/NaCl pups ($p = 0.0001$). The body weight gain of female pups until P12 was not significantly different between these groups ($p = 0.1414$; Supplemental Digital Content 3, Supplementary Figures 1A, B). To determine if the neuroprotective effects of remifentanil positively affect sensorimotor development, negative geotaxis (P6–8) and grasping reflex (P10–12) tests were used. Two-way ANOVA revealed that male and female pups lesioned and exposed to remifentanil more rapidly rotated at 180° than NaCl-treated pups ($p < 0.001$) and showed performance close to that of the unlesioned pups (Figures 4A, B). The analysis for the grasping reflex/grip strength showed a higher latency before falling for male remifentanil-treated pups (Figure 4C, $p < 0.001$), which exhibited a similar performance to that of unlesioned pups. Until P11, the unlesioned females showed poor performances in grasping reflex (Figure 4D). At P12, the latency times before falling of unlesioned females were close to those of unlesioned males (Figures 4C, D). At this age, females lesioned and treated with remifentanil exhibited higher latency times than NaCl-treated females, although the remifentanil effect did not reach statistical significance (Figure 4D).

The impact of remifentanil treatment was also investigated in unlesioned male and female pups. A two-way ANOVA did not reveal a significant difference in body weights between the experimental groups from P2 and P12 (Supplemental Digital Content 3, Supplementary Figures 1C, D). The measurements of performances in negative geotaxis (P6–8; Figures 5A, B) and suspension (P10–12; Figure 5C, D) tests did not show any difference between the remifentanil and NaCl groups.

Impact of neonatal remifentanil exposure on the locomotor activity in young mice

To determine whether neonatal remifentanil exposure in a lesional context leads to a lasting effect, an open field test was conducted to assess locomotor activity before weaning (P18). At P18, body weight of mice did not differ between the Ibo/remi and Ibo/NaCl groups, in both males and in females. In males, no significant difference was found between the Ibo/remi and Ibo/NaCl groups concerning the distance covered during 30 min in the entire compartment (Figure 6A) or the time spent in the center during the first 5 min after the habituation period (Figure 6B). Although lesioned females injected with remifentanil at P2 covered a distance similar to that of NaCl-injected females in the entire compartment (Figure 6C), they spent significantly more time in the open field center than controls ($p < 0.001$; Figure 6D). These data suggest that lesioned females exposed to remifentanil in the neonatal period were less anxious than NaCl-treated mice. In unlesioned mice, the distance covered in the entire open field during 30 min (Figures 7A, C) and the time spent in the center zone (Figures 7B, D) did not differ between remifentanil- and NaCl-treated animals, regardless of sex.

Discussion

The present study provides the first experimental support for a neuroprotective effect of remifentanil against excitotoxic perinatal brain lesions. In our mouse model, remifentanil treatment decreased ROS production, cell death, and astrogliosis induced by ic ibotenate injection at P2, leading to a reduction of brain lesion sizes in male and female pups. In addition, remifentanil positively affected sensorimotor development of the lesioned pups. In the longer term, juvenile lesioned females exposed to remifentanil are less anxious.

From a clinical point of view, the dose of 500 ng/g remifentanil administered to mouse neonates seems high for neonates (in humans, it ranges from 1 to 5 µg/kg for bolus intravenous administration).[34,54–57]. This dose appears to give the most relevant clinical effect, evaluated by the loss of righting reflex. Drug metabolism and pharmacokinetics are different between humans and mice, and discrepancies between effective doses are commonly observed. For example, ketamine and midazolam doses required to induce anesthesia in mice neonates are 10 to 30 times the anesthesia-inducing doses for human infants.[58,59] Moreover, the pups' plasmatic level of remifentanil was 10 nmol/L, similar from human remifentanil concentrations (from 10 to 100 nmol/L).[60,61]

Bradypnea, apnoea, bradycardia, and hypotension are common clinical side effects observed with remifentanil.[62] One consequence of bradypnea is respiratory acidosis with hypoxemia and hypercapnia. In our study, there was no significant hypoxemia, but a trend was observed. Hypoxemia is associated with poorer neurological outcome and death in very preterm infants.[63–65] The significant hypercapnia observed in the remifentanil group could have a proper effect on brain lesions. In preterm neonates, the absence of capnia control is controversial[63,66] and is implicated in the occurrence of neurological disorders.[67–69] In immature rodent brain, hypercapnia causes cell damage and microvascular degeneration by inducing nitrative stress.[70,71] Mild hypercapnia (55 mmHg) and normocapnia (38 mmHg)

were associated with less brain damage than hypocapnia (26 mmHg) in immature rats.[72] Although the pCO2 value in remifentanil-treated group is statistically higher than in the NaCl-treated group (45 mmHg vs. 35 mmHg, respectively), it ranges between normal and mild hypercapnia. So, the impact of mild hypercapnia in remifentanil group appears negligible on our model. It was not possible to evaluate blood pressure on pups. Hemodynamic effect of remifentanil was only evaluated by the heart rate. In human, bradycardia is associated with hypotension.[62] As remifentanil-treated pups have a decreased heart rate, it is reasonable to assume that it was associated with hypotension. In very preterm infants, mild isolated hypotension does not seem to affect neurological development.[73–77] Remifentanil respiratory and hemodynamics side effects should have at worst a deleterious impact on brain injury induced by ic ibotenate.

In immature mice, the ibotenate-induced cerebral lesions mimic some aspects of the developmental lesions observed in human preterm neonates.[43,44] Following ibotenate injection, the brain of the newborn undergoes a series of cellular and molecular impairments, ranging from inflammatory changes such as microglial activation, reactive gliosis, and ROS and cytokine production within a few hours of the insult to neuronal loss within a few days.[78–80] Ibotenate administered at P2 in mice induced cortical neuronal death and produced periventricular white matter cystic lesions.[43,44] Excitotoxic neuronal cell death in the neonate rodent was previously described to involve apoptotic and necrotic mechanisms.[81] In this context, our data showed that, within the first hours post-lesion, remifentanil treatment decreased the ROS production and caspase-3 activity in the lesioned hemisphere. At 1 day post-lesion, a decrease of caspase-3 immunoreactive signal and apoptotic cell death was observed in brain from a remifentanil-treated pup, leading to a significant reduction of the lesion size observed at P7. Altogether, our data support a protective effect of remifentanil against neonatal excitotoxic brain injury, probably involving an anti-apoptotic action.[42] Our

data are consistent with recent studies showing a neuroprotective effect of remifentanil against transient focal brain ischemia in adult rodents.[82,83]

The mechanisms underlying the neuroprotective action of remifentanil have been poorly investigated. Inflammation is increasingly recognized as being a critical contributor to injury outcome in the immature brain.[84] During an excitotoxic challenge, leucocyte infiltration, microglial activation, and reactive astrogliosis participate in brain inflammation, triggering release of many neurotoxic compounds such as free radicals and cytokines.[43,80,85] We found that remifentanil alleviates brain ROS production and astrogliosis induced by ibotenate injection, suggesting that the opioid could modulate the neuroinflammation. In adult rat, remifentanil preconditioning has been shown to alleviate brain damage of cerebral ischemia reperfusion and to reduce expression of TNF-α and ROS production as well release of cytochrome C and caspases-3 and -9 activities.[86,87] Furthermore, *in vitro* data have demonstrated that remifentanil inhibits neutrophils migration[88] and cytokine production by human activated neutrophils.[89] All these data support an anti-inflammatory effect of remifentanil in neonatal brain lesions.

We also investigated whether a functional neuroprotective effect of remifentanil could be found in developing mice. In lesional conditions, remifentanil injection at P2 counterbalanced the behavioral deficits observed in the negative geotaxis test in males and females and in the grip test, especially in males. The tests used evaluate the motor activity and sensory development.[52] In rodents, delayed sensorimotor reflexes during development may result from hypomyelination of the subcortical white matter.[90] In addition, 5 days after the injection of ibotenate, the size of the lesion was significantly decreased in the remifentanil-treated mice. Taken together, these data suggest that remifentanil, by protecting the cortical structure and the white matter, preserved motor and proprioceptive integrative centers. Similarly, results obtained with the geotaxis tests support that the functional link between the sensorimotor

cortex and the thalamic nuclei that integrate the vestibular system information is preserved, thus allowing the perception of rotation and vertical orientation. In the grip test, the effect of the lesion is only detectable at P12 in females, but does not reach significance. This result can be explained by muscle development of the upper limbs in females being less important than in males. Gripping performance in females is therefore poorer than in males, and this is particularly noticeable at P10 and P11. Consequently, a protective effect of remifentanil could be more difficult to reveal in the female group, whereas it was significant in males. The open field test performed at P18 did not reveal motor deficit in the injured mice of both sexes, whether treated or not with remifentanil. These results are consistent with the very strong cerebral plasticity described in rodents, particularly during the synaptogenesis period occurring within the first three postnatal weeks.[91] Such plasticity was shown to result in a marked compensation of motor impairments induced by the lesion.[92] However, because in the open field mice are placed in a new environment, this test is also indicative of anxiety that can be evaluated by the time spent in the center of the device in the first minutes. Our results showed that females injured and treated with remifentanil spent more time in the central area than injured animals that received NaCl, suggesting a less anxious state of remifentanil-treated animals. Interestingly, this effect was also observed in males but only during the first 2 min. The involvement of opiate receptors in the regulation of emotional states, including anxiety, has been previously shown.[93]

The present study provides the first evidence that the anti-apoptotic effects of remifentanil on the developing mouse brain which were previously shown *ex vivo* are also found *in vivo* in a neonatal model of excitotoxic lesions. This neuroprotective effect of remifentanil is associated with a reduction of brain lesion size and prevention of several behavioral deficits occurring during the first 18 days of life. Further experiments are being planned to better understand the mechanisms involved in this neuroprotective effect.

References

1. Sellier E, Platt MJ, Andersen GL, Krägeloh-Mann I, De La Cruz J, Cans C: Surveillance of Cerebral Palsy Network: decreasing prevalence in cerebral palsy: a multi-site European population-based study, 1980 to 2003. *Dev Med Child Neurol* 2016; 58:85–92
2. Ancel P-Y, Goffinet F, EPIPAGE-2 Writing Group, Kuhn P, Langer B, Matis J, Hernandorena X, Chabanier P, Joly-Pedespan L, Lecomte B, Vendittelli F, Dreyfus M, Guillois B, Burguet A, Sagot P, Sizun J, Beuchée A, Rouget F, Favreau A, Saliba E, Bednarek N, Morville P, Thiriez G, Marpeau L, Marret S, Kayem G, Durrmeyer X, Granier M, Baud O, Jarreau P-H, et al.: Survival and morbidity of preterm children born at 22 through 34 weeks' gestation in France in 2011: results of the EPIPAGE-2 cohort study. *JAMA Pediatr* 2015; 169:230–8
3. Himmelmann K, Uvebrant P: The panorama of cerebral palsy in Sweden. XI. Changing patterns in the birth-year period 2003-2006. *Acta Paediatr* 2014; 103:618–24
4. Volpe JJ: Brain injury in premature infants: a complex amalgam of destructive and developmental disturbances. *Lancet Neurol* 2009; 8:110–24
5. Surman G, Hemming K, Platt MJ, Parkes J, Green A, Hutton J, Kurinczuk JJ: Children with cerebral palsy: severity and trends over time. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2009; 23:513–21
6. Ball G, Srinivasan L, Aljabar P, Counsell SJ, Durighel G, Hajnal JV, Rutherford MA, Edwards AD: Development of cortical microstructure in the preterm human brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110:9541–6
7. Taylor HG, Klein N, Anselmo MG, Minich N, Espy KA, Hack M: Learning problems in kindergarten students with extremely preterm birth. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2011; 165:819–25
8. Van Steenwinckel J, Schang A-L, Sigaut S, Chhor V, Degos V, Hagberg H, Baud O, Fleiss B, Gressens P: Brain damage of the preterm infant: new insights into the role of inflammation. *Biochem Soc Trans* 2014; 42:557–63
9. Penn AA, Gressens P, Fleiss B, Back SA, Gallo V: Controversies in preterm brain injury. *Neurobiol Dis* 2016; 92:90–101
10. Marret S, Foix-L'hélias L, Ancel P-Y, Kaminski M, Larroque B, Marcou-Labarre A, Laudenbach V: [Is it possible to protect the preterm infant brain and to decrease later neurodevelopmental disabilities?]. *Arch Pediatr* 2008; 15 Suppl 1:S31-41
11. Degos V, Loron G, Mantz J, Gressens P: Neuroprotective strategies for the neonatal brain. *Anesth Analg* 2008; 106:1670–80
12. Chang E: Preterm birth and the role of neuroprotection. BMJ 2015; 350:g6661
13. Davis AS, Berger VK, Chock VY: Perinatal neuroprotection for extremely preterm infants. *Am J Perinatol* 2016; 33:290–6
14. Berger R, Söder S: Neuroprotection in preterm infants. *Biomed Res Int* 2015; 2015:257139
15. Anand KJS, Hall RW, Desai N, Shephard B, Bergqvist LL, Young TE, Boyle EM, Carbajal R, Bhutani VK, Moore MB, Kronsberg SS, Barton BA, NEOPAIN Trial Investigators Group: Effects of morphine analgesia in ventilated preterm neonates:

primary outcomes from the NEOPAIN randomised trial. *Lancet* 2004; 363:1673–82
16. Favrais G, Tourneux P, Lopez E, Durrmeyer X, Gascoin G, Ramful D, Zana-Taieb E, Baud O: Impact of common treatments given in the perinatal period on the developing brain. *Neonatology* 2014; 106:163–72
17. Stratmann G, Lee J, Sall JW, Lee BH, Alvi RS, Shih J, Rowe AM, Ramage TM, Chang FL, Alexander TG, Lempert DK, Lin N, Siu KH, Elphick SA, Wong A, Schnair CI, Vu AF, Chan JT, Zai H, Wong MK, Anthony AM, Barbour KC, Ben-Tzur D, Kazarian NE, Lee JYY, Shen JR, Liu E, Behniwal GS, Lammers CR, Quinones Z, et al.: Effect of general anesthesia in infancy on long-term recognition memory in humans and rats. *Neuropsychopharmacology* 2014; 39:2275–87
18. Laudenbach V, Mercier FJ, Rozé J-C, Larroque B, Ancel P-Y, Kaminski M, Bréart G, Diemunsch P, Subtil D, Lejus C, Fresson J, Arnaud C, Rachet B, Burguet A, Cambonie G, Epipage Study Group: Anaesthesia mode for caesarean section and mortality in very preterm infants: an epidemiologic study in the EPIPAGE cohort. *Int J Obstet Anesth* 2009; 18:142–9
19. Butwick AJ, El-Sayed YY, Blumenfeld YJ, Osmundson SS, Weiniger CF: Mode of anaesthesia for preterm caesarean delivery: secondary analysis from the Maternal-Fetal Medicine Units Network Caesarean Registry. *Br J Anaesth* 2015; 115:267–74
20. Durrmeyer X, Vutskits L, Anand KJS, Rimensberger PC: Use of analgesic and sedative drugs in the NICU: integrating clinical trials and laboratory data. *Pediatr Res* 2010; 67:117–27
21. Carbajal R, Eriksson M, Courtois E, Boyle E, Avila-Alvarez A, Andersen RD, Sarafidis K, Polkki T, Matos C, Lago P, Papadouri T, Montalto SA, Ilmoja M-L, Simons S, Tameliene R, Overmeire B van, Berger A, Dobrzanska A, Schroth M, Bergqvist L, Lagercrantz H, Anand KJS, EUROPAIN Survey Working Group: Sedation and analgesia practices in neonatal intensive care units (EUROPAIN): results from a prospective cohort study. *Lancet Respir Med* 2015; 3:796–812
22. Ranger M, Grunau RE: Early repetitive pain in preterm infants in relation to the developing brain. *Pain Manag* 2014; 4:57–67
23. Walker SM: Biological and neurodevelopmental implications of neonatal pain. *Clin Perinatol* 2013; 40:471–91
24. Walker SM: Neonatal pain. *Paediatr Anaesth* 2014; 24:39–48
25. Jevtovic-Todorovic V, Hartman RE, Izumi Y, Benshoff ND, Dikranian K, Zorumski CF, Olney JW, Wozniak DF: Early exposure to common anesthetic agents causes widespread neurodegeneration in the developing rat brain and persistent learning deficits. *J Neurosci* 2003; 23:876–82
26. Lin EP, Lee J-R, Lee CS, Deng M, Loepke AW: Do anesthetics harm the developing human brain? An integrative analysis of animal and human studies. *Neurotoxicol Teratol* 2017; 60:117–28
27. Atici S, Cinel L, Cinel I, Doruk N, Aktekin M, Akca A, Camdeviren H, Oral U: Opioid neurotoxicity: comparison of morphine and tramadol in an experimental rat model. *Int J Neurosci* 2004; 114:1001–11
28. Seatriz JV, Hammer RP: Effects of opiates on neuronal development in the rat cerebral

cortex. *Brain Res Bull* 1993; 30:523–7
29. Boasen JF, McPherson RJ, Hays SL, Juul SE, Gleason CA: Neonatal stress or morphine treatment alters adult mouse conditioned place preference. *Neonatology* 2009; 95:230–9
30. Ferguson SA, Ward WL, Paule MG, Hall RW, Anand KJS: A pilot study of preemptive morphine analgesia in preterm neonates: effects on head circumference, social behavior, and response latencies in early childhood. *Neurotoxicol Teratol* 2012; 34:47–55
31. Steinhorn R, McPherson C, Anderson PJ, Neil J, Doyle LW, Inder T: Neonatal morphine exposure in very preterm infants: cerebral development and outcomes. *J Pediatr* 2015; 166:1200–7.e4
32. Schuurmans J, Benders M, Lemmers P, van Bel F: Neonatal morphine in extremely and very preterm neonates: its effect on the developing brain—a review. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2015; 28:222–8
33. Penido MG, Garra R, Sammartino M, Pereira e Silva Y: Remifentanil in neonatal intensive care and anaesthesia practice. *Acta Paediatr* 2010; 99:1454–63
34. Giannantonio C, Sammartino M, Valente E, Cota F, Fioretti M, Papacci P: Remifentanil analgosedation in preterm newborns during mechanical ventilation. *Acta Paediatr* 2009; 98:1111–5
35. Marsh DF, Hodkinson B: Remifentanil in paediatric anaesthetic practice. *Anaesthesia* 2009; 64:301–8
36. Welzing L, Kribs A, Huenseler C, Eifinger F, Mehler K, Roth B: Remifentanil for INSURE in preterm infants: a pilot study for evaluation of efficacy and safety aspects. *Acta Paediatr* 2009; 98:1416–20
37. Guntz E, Dumont H, Roussel C, Gall D, Dufrasne F, Cuvelier L, Blum D, Schiffmann SN, Sosnowski M: Effects of remifentanil on N-methyl-D-aspartate receptor: an electrophysiologic study in rat spinal cord. *Anesthesiology* 2005; 102:1235–41
38. Joly V, Richebe P, Guignard B, Fletcher D, Maurette P, Sessler DI, Chauvin M: Remifentanil-induced postoperative hyperalgesia and its prevention with small-dose ketamine. *Anesthesiology* 2005; 103:147–55
39. Zhao M, Joo DT: Enhancement of spinal N-methyl-D-aspartate receptor function by remifentanil action at delta-opioid receptors as a mechanism for acute opioid-induced hyperalgesia or tolerance. *Anesthesiology* 2008; 109:308–17
40. Li X, Angst MS, Clark JD: Opioid-induced hyperalgesia and incisional pain. *Anesth Analg* 2001; 93:204–9
41. Desfeux A, El Ghazi F, Jégou S, Legros H, Marret S, Laudenbach V, Gonzalez BJ: Dual effect of glutamate on GABAergic interneuron survival during cerebral cortex development in mice neonates. *Cereb Cortex* 2010; 20:1092–108
42. Tourrel F, Lendeu PK de, Abily-Donval L, Chollat C, Marret S, Dufrasne F, Compagnon P, Ramdani Y, Dureuil B, Laudenbach V, Gonzalez BJ, Jégou S: The antiapoptotic effect of remifentanil on the immature mouse brain: an ex vivo study. *Anesth Analg* 2014; 118:1041–51
43. Marret S, Gressens P, Gadisseux JF, Evrard P: Prevention by magnesium of excitotoxic neuronal death in the developing brain: an animal model for clinical intervention studies. *Dev Med Child Neurol* 1995; 37:473–84

44. Gressens P, Marret S, Evrard P: Developmental spectrum of the excitotoxic cascade induced by ibotenate: a model of hypoxic insults in fetuses and neonates. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1996; 22:498–502
45. Husson I, Rangon C-M, Lelièvre V, Bemelmans A-P, Sachs P, Mallet J, Kosofsky BE, Gressens P: BDNF-induced white matter neuroprotection and stage-dependent neuronal survival following a neonatal excitotoxic challenge. *Cereb Cortex* 2005; 15:250–61
46. Arquié C, Leroux P, Bodenant C, Laquerrière A, Marpeau L, Marret S: Glucocorticoid treatment in an ischaemic-like excitotoxic model of periventricular leucomalacia in mice. *BJOG* 2002; 109:989–96
47. Sfaello I, Baud O, Arzimanoglou A, Gressens P: Topiramate prevents excitotoxic damage in the newborn rodent brain. *Neurobiol Dis* 2005; 20:837–48
48. Degos V, Charpentier TL, Chhor V, Brissaud O, Lebon S, Schwendimann L, Bednareck N, Passemard S, Mantz J, Gressens P: Neuroprotective effects of dexmedetomidine against glutamate agonist-induced neuronal cell death are related to increased astrocyte brain-derived neurotrophic factor expression. *Anesthesiology* 2013; 118:1123–32
49. Gressens P, Marret S, Hill JM, Brenneman DE, Gozes I, Fridkin M, Evrard P: Vasoactive intestinal peptide prevents excitotoxic cell death in the murine developing brain. *J Clin Invest* 1997; 100:390–7
50. Hennebert O, Laudenbach V, Laquerriere A, Verney C, Carmeliet P, Marret S, Leroux P: Ontogenic study of the influence of tissue plasminogen activator (t-PA) in neonatal excitotoxic brain insult and the subsequent microglia/macrophage activation. *Neuroscience* 2005; 130:697–712
51. Kohlhauer M, Lidouren F, Remy-Jouet I, Mongardon N, Adam C, Bruneval P, Hocini H, Levy Y, Blengio F, Carli P, Vivien B, Ricard J-D, Micheau P, Walti H, Nadeau M, Robert R, Richard V, Mulder P, Maresca D, Demené C, Pernot M, Tanter M, Ghaleb B, Berdeaux A, Tissier R: Hypothermic total liquid ventilation is highly protective through cerebral hemodynamic preservation and sepsis-like mitigation after asphyxial cardiac arrest. *Crit Care Med* 2015; 43:e420-430
52. Altman J, Sudarshan K: Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. *Anim Behav* 1975; 23:896–920
53. Ishii T, Kuwaki T, Masuda Y, Fukuda Y: Postnatal development of blood pressure and baroreflex in mice. *Auton Neurosci* 2001; 94:34–41
54. Demirel N, Bas AY, Kavurt S, Celik IH, Yucel H, Turkbay D, Hekimoğlu E, Koc O: Remifentanil analgesia during laser treatment for retinopathy of prematurity: a practical approach in neonatal intensive care unit. *Am J Perinatol* 2014; 31:983–6
55. Welzing L, Oberthuer A, Junghaenel S, Harnischmacher U, Stützer H, Roth B: Remifentanil/midazolam versus fentanyl/midazolam for analgesia and sedation of mechanically ventilated neonates and young infants: a randomized controlled trial. *Intensive Care Med* 2012; 38:1017–24
56. Kort EHM de, Hanff LM, Roofthooft D, Reiss IKM, Simons SHP: Insufficient sedation and severe side effects after fast administration of remifentanil during INSURE in preterm newborns. *Neonatology* 2017; 111:172–6
57. Badiee Z, Vakiliamini M, Mohammadizadeh M: Remifentanil for endotracheal intubation

in premature infants: a randomized controlled trial. *J Res Pharm Pract* 2013; 2:75–82
58. Young C, Jevtovic-Todorovic V, Qin Y-Q, Tenkova T, Wang H, Labruyere J, Olney JW: Potential of ketamine and midazolam, individually or in combination, to induce apoptotic neurodegeneration in the infant mouse brain. *Br J Pharmacol* 2005; 146:189–97
59. Lecointre M, Vézier C, Bénard M, Ramdani Y, Dupré N, Brasse-Lagnel C, Henry VJ, Roy V, Marret S, Gonzalez BJ, Jégou S, Leroux-Nicollet I: Age-dependent alterations of the NMDA receptor developmental profile and adult behavior in postnatally ketamine-treated mice. *Dev Neurobiol* 2015; 75:315–33
60. Ross AK, Davis PJ, Dear Gd GL, Ginsberg B, McGowan FX, Stiller RD, Henson LG, Huffman C, Muir KT: Pharmacokinetics of remifentanil in anesthetized pediatric patients undergoing elective surgery or diagnostic procedures. *Anesth Analg* 2001; 93:1393–1401, table of contents
61. Egan TD, Minto CF, Hermann DJ, Barr J, Muir KT, Shafer SL: Remifentanil versus alfentanil: comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics in healthy adult male volunteers. *Anesthesiology* 1996; 84:821–33
62. Chanavaz C, Tirel O, Wodey E, Bansard JY, Senhadji L, Robert JC, Ecoffey C: Haemodynamic effects of remifentanil in children with and without intravenous atropine: an echocardiographic study. *Br J Anaesth* 2005; 94:74–9
63. Askie LM, Darlow BA, Davis PG, Finer N, Stenson B, Vento M, Whyte R: Effects of targeting lower versus higher arterial oxygen saturations on death or disability in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2017; 4:CD011190
64. Janvier A, Khairy M, Kokkotis A, Cormier C, Messmer D, Barrington KJ: Apnea is associated with neurodevelopmental impairment in very low birth weight infants. *J Perinatol* 2004; 24:763–8
65. Poets CF, Roberts RS, Schmidt B, Whyte RK, Asztalos EV, Bader D, Bairam A, Moddemann D, Peliowski A, Rabi Y, Solimano A, Nelson H, Canadian Oxygen Trial Investigators: Association between intermittent hypoxemia or bradycardia and late death or disability in extremely preterm infants. *JAMA* 2015; 314:595–603
66. Omer M, Molloy EJ: QUESTION 2: Is permissive hypercapnia beneficial to preterm infants? *Arch Dis Child* 2017; 102:113–5
67. Thome UH, Ambalavanan N: Permissive hypercapnia to decrease lung injury in ventilated preterm neonates. *Semin Fetal Neonatal Med* 2009; 14:21–7
68. Ambalavanan N, Carlo WA, Wrage LA, Das A, Laughon M, Cotten CM, Kennedy KA, Laptook AR, Shankaran S, Walsh MC, Higgins RD, SUPPORT Study Group of the NICHD Neonatal Research Network: PaCO2 in surfactant, positive pressure, and oxygenation randomised trial (SUPPORT). *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2015; 100:F145–9
69. Fabres J, Carlo WA, Phillips V, Howard G, Ambalavanan N: Both extremes of arterial carbon dioxide pressure and the magnitude of fluctuations in arterial carbon dioxide pressure are associated with severe intraventricular hemorrhage in preterm infants. *Pediatrics* 2007; 119:299–305
70. Das S, Du Z, Bassly S, Singer L, Vicencio AG: Effects of chronic hypercapnia in the neonatal mouse lung and brain. *Pediatr Pulmonol* 2009; 44:176–82

71. Honoré J-C, Kooli A, Hou X, Hamel D, Rivera JC, Picard E, Hardy P, Tremblay S, Varma DR, Jankov RP, Mancini JA, Balazy M, Chemtob S: Sustained hypercapnia induces cerebral microvascular degeneration in the immature brain through induction of nitrative stress. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2010; 298:R1522–30
72. Vannucci RC, Towfighi J, Heitjan DF, Brucklacher RM: Carbon dioxide protects the perinatal brain from hypoxic-ischemic damage: an experimental study in the immature rat. *Pediatrics* 1995; 95:868–74
73. Alderliesten T, Lemmers PMA, Haastert IC van, Vries LS de, Bonestroo HJC, Baerts W, Bel F van: Hypotension in preterm neonates: low blood pressure alone does not affect neurodevelopmental outcome. *J Pediatr* 2014; 164:986–91
74. Barrington KJ: Low blood pressure in extremely preterm infants: Does treatment affect outcome? *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2011; 96:F316–7
75. Dempsey EM, Al Hazzani F, Barrington KJ: Permissive hypotension in the extremely low birthweight infant with signs of good perfusion. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2009; 94:F241–4
76. O'Shea TM, Allred EN, Dammann O, Hirtz D, Kuban KCK, Paneth N, Leviton A, ELGAN study Investigators: The ELGAN study of the brain and related disorders in extremely low gestational age newborns. *Early Hum Dev* 2009; 85:719–25
77. Logan JW, O'Shea TM, Allred EN, Laughon MM, Bose CL, Dammann O, Batton DG, Engelke SC, Leviton A, ELGAN Study Investigators: Early postnatal hypotension and developmental delay at 24 months of age among extremely low gestational age newborns. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2011; 96:F321–8
78. Dommergues MA, Patkai J, Renauld JC, Evrard P, Gressens P: Proinflammatory cytokines and interleukin-9 exacerbate excitotoxic lesions of the newborn murine neopallium. *Ann Neurol* 2000; 47:54–63
79. Kaindl AM, Degos V, Peineau S, Gouadon E, Chhor V, Loron G, Le Charpentier T, Josserand J, Ali C, Vivien D, Collingridge GL, Lombet A, Issa L, Rene F, Loeffler J-P, Kavelaars A, Verney C, Mantz J, Gressens P: Activation of microglial N-methyl-D-aspartate receptors triggers inflammation and neuronal cell death in the developing and mature brain. *Ann Neurol* 2012; 72:536–49
80. Tahraoui SL, Marret S, Bodénant C, Leroux P, Dommergues MA, Evrard P, Gressens P: Central role of microglia in neonatal excitotoxic lesions of the murine periventricular white matter. *Brain Pathol* 2001; 11:56–71
81. Portera-Cailliau C, Price DL, Martin LJ: Excitotoxic neuronal death in the immature brain is an apoptosis-necrosis morphological continuum. *J Comp Neurol* 1997; 378:70–87
82. Park S-W, Yi J-W, Kim Y-M, Kang J-M, Kim DO, Shin M-S, Kim C-J, Lee DI, Kim D-H, Lee BJ: Remifentanil alleviates transient cerebral ischemia-induced memory impairment through suppression of apoptotic neuronal cell death in gerbils. *Korean J Anesthesiol* 2011; 61:63–8
83. Jeong S, Kim SJ, Jeong C, Lee S, Jeong H, Lee J, Yoo KY: Neuroprotective effects of remifentanil against transient focal cerebral ischemia in rats. *J Neurosurg Anesthesiol* 2012; 24:51–7
84. Hagberg H, Mallard C, Ferriero DM, Vannucci SJ, Levison SW, Vexler ZS, Gressens P:

The role of inflammation in perinatal brain injury. *Nat Rev Neurol* 2015; 11:192–208
85. Hallenbeck JM: Significance of the inflammatory response in brain ischemia. *Acta Neurochir Suppl* 1996; 66:27–31
86. Zhang Y, Li Y-W, Wang Y-X, Zhang H-T, Zhang X-M, Liang Y, Zhang X-S, Wang W-S, Liu H-G, Zhang Y, Zhang L, Zheng Y-H: Remifentanil preconditioning alleviating brain damage of cerebral ischemia reperfusion rats by regulating the JNK signal pathway and TNF-α/TNFR1 signal pathway. *Mol Biol Rep* 2013; 40:6997–7006
87. Hu X, Xie C, He S, Zhang Y, Li Y, Jiang L: Remifentanil postconditioning improves global cerebral ischemia-induced spatial learning and memory deficit in rats via inhibition of neuronal apoptosis through the PI3K signaling pathway. *Neurol Sci* 2013; 34:1955–62
88. Hofbauer R, Frass M, Gmeiner B, Sandor N, Schumann R, Wagner O, Kaye AD: Effects of remifentanil on neutrophil adhesion, transmigration, and intercellular adhesion molecule expression. *Acta Anaesthesiol Scand* 2000; 44:1232–7
89. Hyejin J, Mei L, Seongheon L, Cheolwon J, Seokjai K, Hongbeom B, Minsun K, Sungsu C, Sanghyun K: Remifentanil attenuates human neutrophils activation induced by lipopolysaccharide. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2013; 35:264–71
90. Wu L-L, Zhang L, Shao J, Qin Y-F, Yang R-W, Zhao Z-Y: Effect of perinatal iron deficiency on myelination and associated behaviors in rat pups. *Behav Brain Res* 2008; 188:263–70
91. Jenkins WM, Merzenich MM: Reorganization of neocortical representations after brain injury: a neurophysiological model of the bases of recovery from stroke. *Prog Brain Res* 1987; 71:249–66
92. Chu CJ, Jones TA: Experience-dependent structural plasticity in cortex heterotopic to focal sensorimotor cortical damage. *Exp Neurol* 2000; 166:403–14
93. Lutz P-E, Kieffer BL: Opioid receptors: distinct roles in mood disorders. *Trends Neurosci* 2013; 36:195–206

Figure legends

Fig 1: Effect of remifentanil exposure on postural righting reflex latency time and physiological parameters in P2 neonates. (A) Time differences needed to turn over and return to prone position between remifentanil-treated and control P2 mice. Pups received three injections of remifentanil (50, 250, or 500 ng/g) or NaCl 0.9% and each test was performed for 5 min. ***p<0.001, ****p < 0.0001 vs. NaCl, ●● p < 0.01, ●●●● p < 0.0001 vs. remifentanil (50 ng/g), #p < 0.05, ##p < 0.01 vs. remifentanil (250 ng/g) (two-way ANOVA, Bonferroni post-test). **(B)** Respiratory frequency evaluated during a 1-min period in untreated, remifentanil- (3 × 500 ng/g), and NaCl-treated P2 mice. **p < 0.01 vs. untreated, *p < 0.05 vs NaCl (Kruskal–Wallis test). **(C–E)** Blood gas analyses (pH, pO_2, and pCO_2) performed in remifentanil- (3 × 500 ng/g) and NaCl-treated P2 mice. **p < 0.01 (Mann–Whitney test). **(F)** Effect of remifentanil anesthesia on heart rate in P2 pups. Representative electrocardiogram tracing from P2 mice injected with remifentanil (3 × 500 ng/g) or saline (left panel). Quantification of heart beats recorded during 1 min in remifentanil and control groups (right panel) *p < 0.05 (Mann Whitney test). All values are expressed as mean ± SEM. Number of animals is indicated in parentheses.

Fig. 2: Effect of remifentanil exposure on ibotenate-induced ROS production and cell death in neonate mice brain. (A–C) Photomicrograhs illustrating the intracortical site injection at P2. **(A)** Visualization of cleaved caspase-3 immunoreactivity in P2 brain 5 h after intracortical injection of saline. Arrow indicates the injection site in P2 cortex. **(B)** CellTracker Red (CT-red) was used to retrieve the depth of injection site. Note the cavity induced by the injection (*). **(C)** Overlay of A and B. Scale bar 400 µm. **(D)** The ROS production was assessed at 10 min and 5 h post-lesion by electron paramagnetic resonance

spectroscopy in brain ipsilateral hemisphere of Ibo/NaCl and Ibo/remi groups and compared to ROS production in unlesioned group. ## $p < 0.01$, # $p < 0.05$ vs. unlesioned group (Mann–Whitney test). **(E–G)** Effect of remifentanil exposure (3 × 500 ng/g) on *in situ* caspase activity in P2 cortex 5 h after ic ibotenate injection. Visualization of FITC-VAD-FMK signal in cortex of **(E)** NaCl- or **(F)** remifentanil-treated P2 pups and injected with ic ibotenate. Note a stronger FITC-VAD-FMK signal around the site of injection in the cortex of Ibo/NaCl pup **(E)** as compared to Ibo/remifentanil pup **(F)**. Scale bar 200 µm. **(G)** Remifentanil exposure significantly decreased *in situ* caspase activity (FITC-VAD-FMK signal) in ibotenate-injected pups (Ibo/remi). *$p < 0.05$ vs. Ibo/NaCl group (Mann–Whitney test). **(H, I)** Cleaved-caspase-3 immunoreactivity visualized on P3 in two frontal successive brain sections from (H1-2) NaCl- or (I1-2) remifentanil-treated pups and injected with ic ibotenate. Note that the apoptotic signal in the injected side of the brain was weaker in the remifentanil-treated pup. Scale bar 100 µm. **(J)** Quantitative analysis on P3 of DNA fragmentation in brain extracts from NaCl- or remifentanil-treated pups injected with ic ibotenate on P2 as compared to unlesioned P3 pups. ## $p < 0.01$, #### $p < 0.0001$ vs. unlesioned group (Kruskal–Wallis test), * $p < 0.05$ vs. Ibo/NaCl group (Mann–Whitney test). Values are expressed as mean ± SEM. Number of animals is indicated in parentheses.

Fig. 3: Effect of remifentanil exposure on reactive astrogliosis and lesion size induced by ibotenate injection. (A, B) GFAP immunolabeling performed at P3 in frontal brain sections from (A1-2) NaCl- or (B1-2) remifentanil-treated pups and injected with ic ibotenate at P2. In the ipsilateral hemisphere of a NaCl-treated pup (Ibo/NaCl), significant red GFAP immunostaining was visualized in the cortex (cx), thalamus (Th), striatum (Str), and areas bordering the lateral ventricle (LV) (A1-2). In brain from a remifentanil-treated pup (Ibo/remi), the GFAP signal appeared weaker (B1-2). White arrows mark sites of ibotenate

injection performed at P2. Asterisks indicate white matter cysts. In Ibo/NaCl slice, blood autofluorescence occurred in cyst. Arrowheads indicate GFAP immunolabeling observed under the lateral ventricle. Scale bars: 500 µm (A1, B1) and 50 µm (A2, B2). **(C)** Quantitative analysis of GFAP immunostaining detected in interior area bordering the lateral ventricle (illustrated in A2 and B2 by arrowheads). * $p < 0.05$ vs. Ibo/NaCl group (Mann–Whitney test). **(D)** Quantification by western blot of GFAP protein expression in cortical extracts from P3 Ibo/NaCl and Ibo/remi pups. Representative immunoblots from cortical extracts are shown. Densitometric measurements were normalized for β-actin. Values are expressed as mean ± SEM. * $p < 0.05$ vs. Ibo/NaCl group (Mann–Whitney test). **(E)** Cresyl violet-stained section showing brain lesion induced by ibotenate injected at P2 and studied at age P7. Arrow points to the neuronal loss in cortical layers II–VI and star indicates the white matter lesion (cyst). LV, lateral ventricle. Scale bar 1 mm. **(F)** Effect of remifentanil exposure on lesion size induced by ic ibotenate at P2 and studied at P7. The neuroprotective effect of remifentanil against neonatal excitotoxic damage is significant in both male and female pups. *$p < 0.05$, **$p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. Ibo/NaCl group (Mann–Whitney test). Values represent the mean ± SEM. Number of animals is indicated in parentheses.

Fig. 4: Effect of remifentanil exposure on sensorimotor performances of mice neonates injected with ibotenate at P2. (A, B) Quantification of negative geotaxis reflex in male **(A)** and female **(B)** neonates. Time necessary to rotate 180° was measured at P6 to P8 in unlesioned pups and ibotenate-injected pups exposed or not to remifentanil at P2. **(C, D)** Quantification of the grasping reflex in male **(C)** and female **(D)** neonates. Time latency before failing on the wire suspension test was measured at P10 to P12. Values are expressed as mean ± SEM. *$p < 0.05$, **$p < 0.01$ Ibo/remi vs. Ibo/NaCl, #$p < 0.05$, ##$p < 0.01$, ###$p <$

0.001 Ibo/NaCl vs. untreated (two-way ANOVA test, Bonferroni post-test). Values represent the mean length of the lesions ± SEM. Number of animals is indicated in parentheses.

Fig. 5: Effect of remifentanil exposure at P2 on sensorimotor performances of unlesioned mice neonates. (A, B) Quantification of negative geotaxis reflex in male **(A)** and female **(B)** neonates. Time necessary to rotate 180° was measured at P6 to P8 in untreated pups and pups exposed or not to remifentanil at P2. **(C, D)** Quantification of the grasping reflex in male **(C)** and female **(D)** neonates. Time latency before failing on the wire suspension test was measured at P10 to P12. No differences were found (two-way ANOVA). Values are expressed as mean ± SEM. Number of animals is indicated in parentheses.

Fig. 6: Effect of remifentanil exposure in neonatal period on spontaneous motor activity of P18 juvenile mice lesioned with ibotenate at P2. (A, B) Quantification over 30 min of the total distance covered in the entire compartment **(A, C)** and the time spent in the center zone by **(B, D)** males **(A, B)** and females **(C, D)**. Animals were ic injected with ibotenate and exposed or not to remifentanil at P2 and studied at P18. Displacements were measured for three consecutive periods of 10 min. The time spent in the center was measured for the first five consecutive periods of 1 min. Comparison of experimental groups was performed using a two-way ANOVA analysis. Values are expressed as mean ± SEM. Number of animals is indicated in parentheses.

Fig.7: Effect of remifentanil exposure in neonatal period on spontaneous motor activity of P18 juvenile unlesioned mice. (A, B) Quantification over 30 min of the total distance covered in the entire compartment **(A, C)** and the time spent in the center zone by **(B, D)** males **(A, B)** and females **(C, D)**. Animals were injected with remifentanil or NaCl at P2 and

studied at P18. Displacements were measured for three consecutive periods of 10 min. The time spent in the center was measured for the first five consecutive periods of 1 min. No differences were found (two-way ANOVA). Number of animals is indicated in parentheses.

Supplemental Digital Content 3, Fig. 1: Weight intake in male and female pups from P2 to P12. (A, B) Weight intake in male (A) and female (B) pups lesioned with ibotenate at P2 and injected with ip NaCl (Ibo/NaCl) or remifentanil (Ibo/remi). **(C, D)** Weight intake in unlesioned male **(C)** and female **(D)** pups injected at P2 with NaCl or remifentanil. Comparison of experimental groups was performed using a two-way ANOVA. Values are expressed as mean ± SEM. Number of animals is indicated in parentheses.

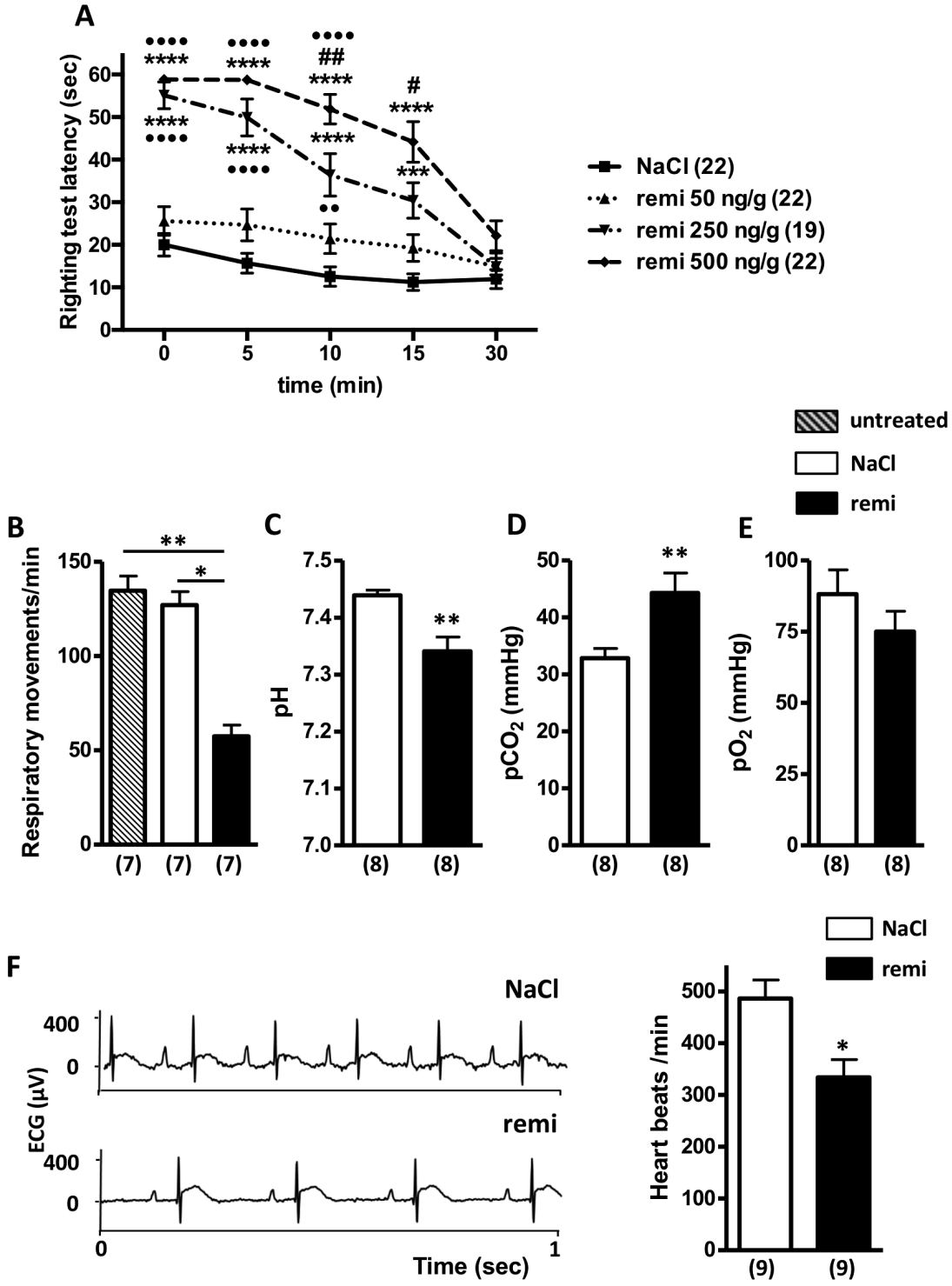

A
Righting test latency (sec)
time (min)
NaCl (22)
remi 50 ng/g (22)
remi 250 ng/g (19)
remi 500 ng/g (22)
untreated
NaCl
remi
B
Respiratory movements/min
C
pH
D
pCO2 (mmHg)
E
pO2 (mmHg)
F
NaCl
remi
ECG (µV)
Time (sec)
Heart beats /min

Fig. 1

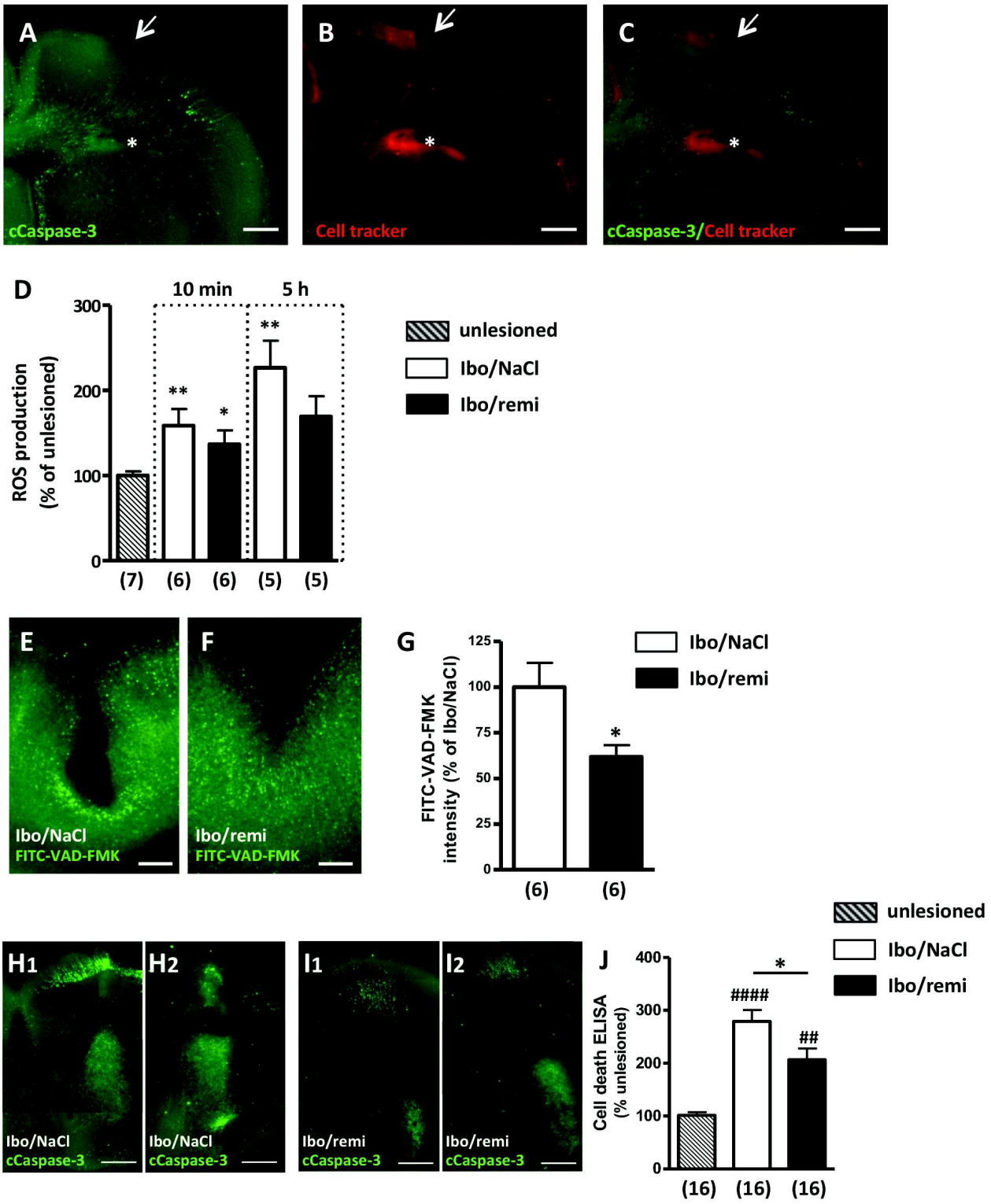

A
cCaspase-3
B
Cell tracker
C
cCaspase-3/Cell tracker
D
10 min
5 h
ROS production (% of unlesioned)
300
200
100
0
**
*
**
(7)
(6)
(6)
(5)
(5)
unlesioned
Ibo/NaCl
Ibo/remi
E
Ibo/NaCl
FITC-VAD-FMK
F
Ibo/remi
FITC-VAD-FMK
G
FITC-VAD-FMK intensity (% of Ibo/NaCl)
125
100
75
50
25
0
*
(6)
(6)
Ibo/NaCl
Ibo/remi
H1
Ibo/NaCl
cCaspase-3
H2
Ibo/NaCl
cCaspase-3
I1
Ibo/remi
cCaspase-3
I2
Ibo/remi
cCaspase-3
J
Cell death ELISA (% unlesioned)
400
300
200
100
0
*
####
##
(16)
(16)
(16)
unlesioned
Ibo/NaCl
Ibo/remi

Fig. 2

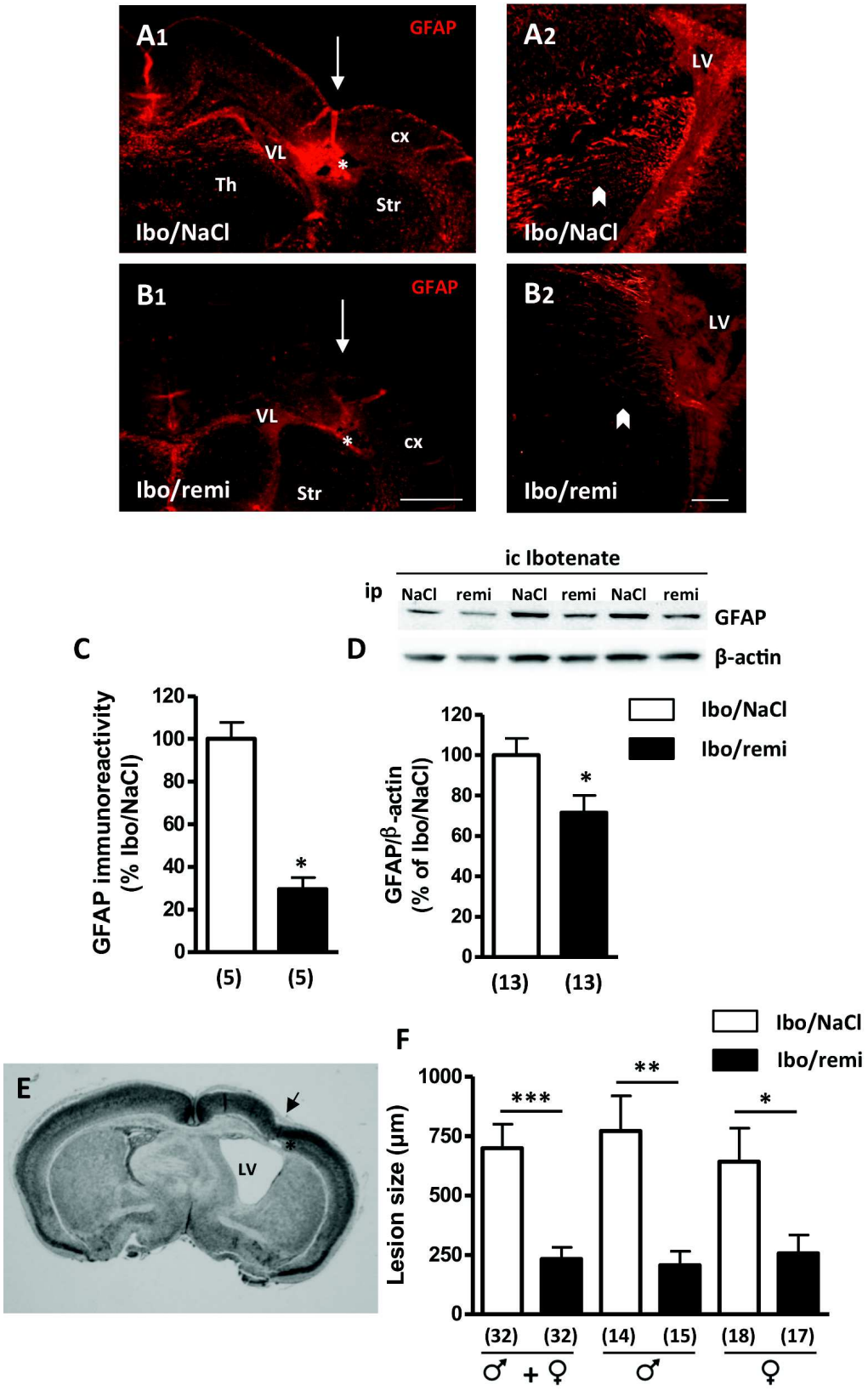

A1
GFAP
VL
cx
Th
Str
Ibo/NaCl
A2
LV
Ibo/NaCl
B1
GFAP
VL
cx
Ibo/remi
Str
B2
LV
Ibo/remi
ic Ibotenate
ip
NaCl
remi
NaCl
remi
NaCl
remi
GFAP
β-actin
C
GFAP immunoreactivity (% Ibo/NaCl)
120
100
80
60
40
20
0
*
(5)
(5)
D
GFAP/β-actin (% of Ibo/NaCl)
120
100
80
60
40
20
0
*
(13)
(13)
Ibo/NaCl
Ibo/remi
E
LV
F
Lesion size (µm)
1000
750
500
250
0
***
**
*
(32)
(32)
(14)
(15)
(18)
(17)
♂ + ♀
♂
♀
Ibo/NaCl
Ibo/remi

Fig. 3

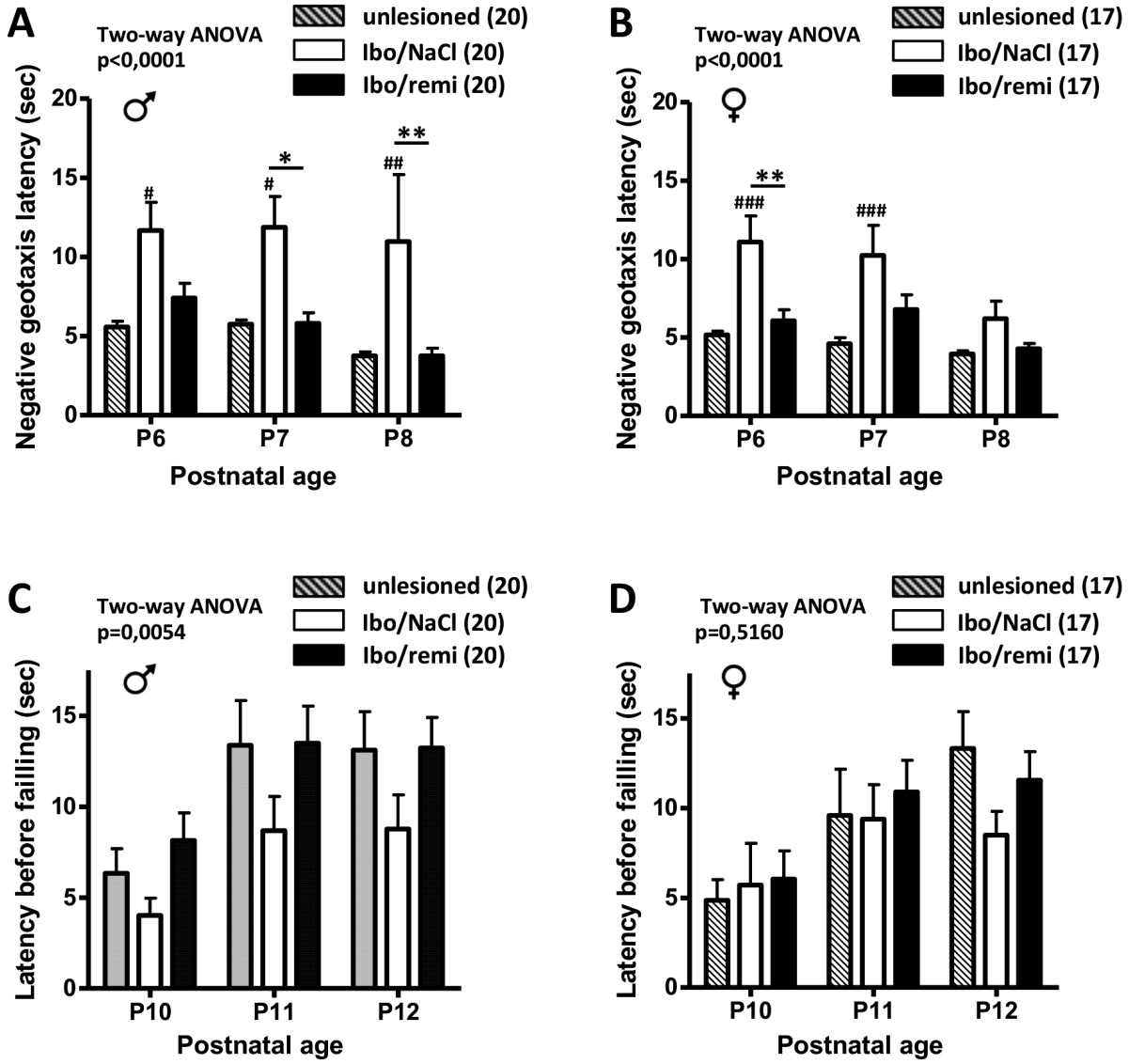

A
Two-way ANOVA
p<0,0001
unlesioned (20)
Ibo/NaCl (20)
Ibo/remi (20)
Negative geotaxis latency (sec)
Postnatal age
P6
P7
P8
B
Two-way ANOVA
p<0,0001
unlesioned (17)
Ibo/NaCl (17)
Ibo/remi (17)
Negative geotaxis latency (sec)
Postnatal age
C
Two-way ANOVA
p=0,0054
Latency before failling (sec)
P10
P11
P12
D
Two-way ANOVA
p=0,5160
Latency before failling (sec)

Fig. 4

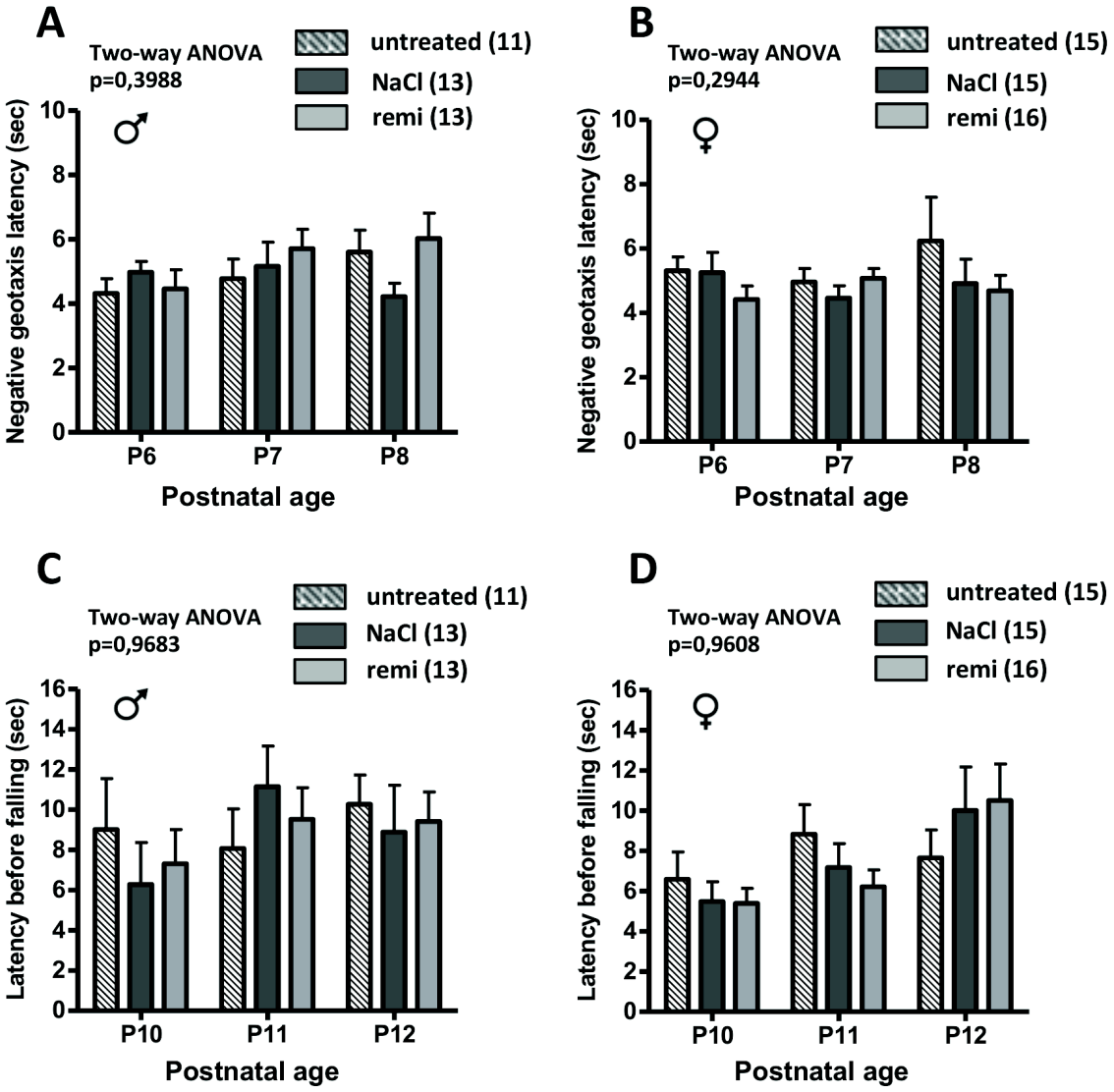

A
Two-way ANOVA
p=0,3988
untreated (11)
NaCl (13)
remi (13)
♂
Negative geotaxis latency (sec)
0
2
4
6
8
10
P6
P7
P8
Postnatal age
B
Two-way ANOVA
p=0,2944
untreated (15)
NaCl (15)
remi (16)
♀
Negative geotaxis latency (sec)
0
2
4
6
8
10
P6
P7
P8
Postnatal age
C
Two-way ANOVA
p=0,9683
untreated (11)
NaCl (13)
remi (13)
♂
Latency before falling (sec)
0
2
4
6
8
10
12
14
16
P10
P11
P12
Postnatal age
D
Two-way ANOVA
p=0,9608
untreated (15)
NaCl (15)
remi (16)
♀
Latency before falling (sec)
0
2
4
6
8
10
12
14
16
P10
P11
P12
Postnatal age

Fig. 5

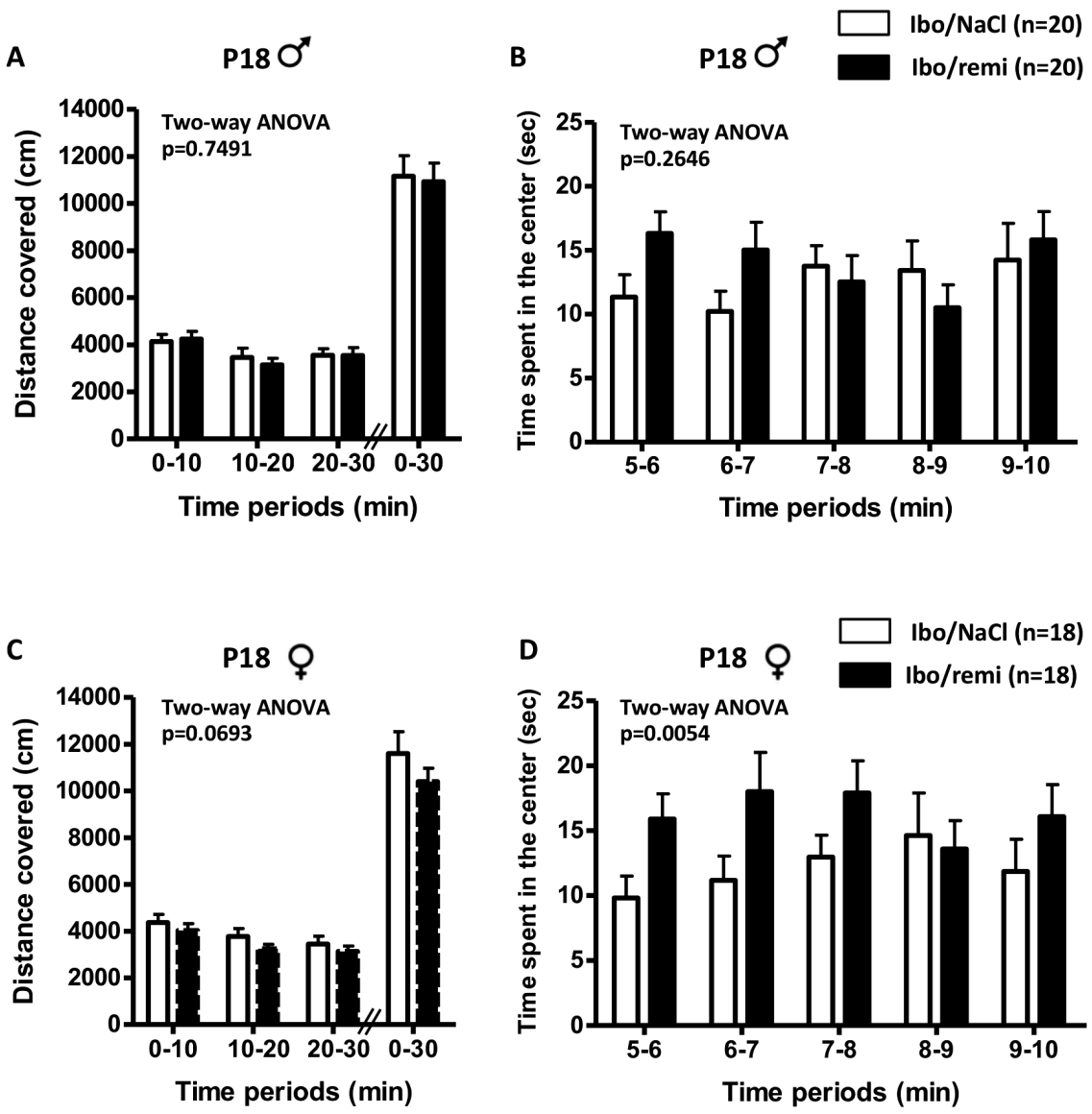

A
P18 ♂
Two-way ANOVA
p=0.7491
Distance covered (cm)
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
0-10
10-20
20-30
0-30
Time periods (min)
B
P18 ♂
Ibo/NaCl (n=20)
Ibo/remi (n=20)
Two-way ANOVA
p=0.2646
Time spent in the center (sec)
25
20
15
10
5
0
5-6
6-7
7-8
8-9
9-10
Time periods (min)
C
P18 ♀
Two-way ANOVA
p=0.0693
Distance covered (cm)
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
0-10
10-20
20-30
0-30
Time periods (min)
D
P18 ♀
Ibo/NaCl (n=18)
Ibo/remi (n=18)
Two-way ANOVA
p=0.0054
Time spent in the center (sec)
25
20
15
10
5
0
5-6
6-7
7-8
8-9
9-10
Time periods (min)

Fig. 6

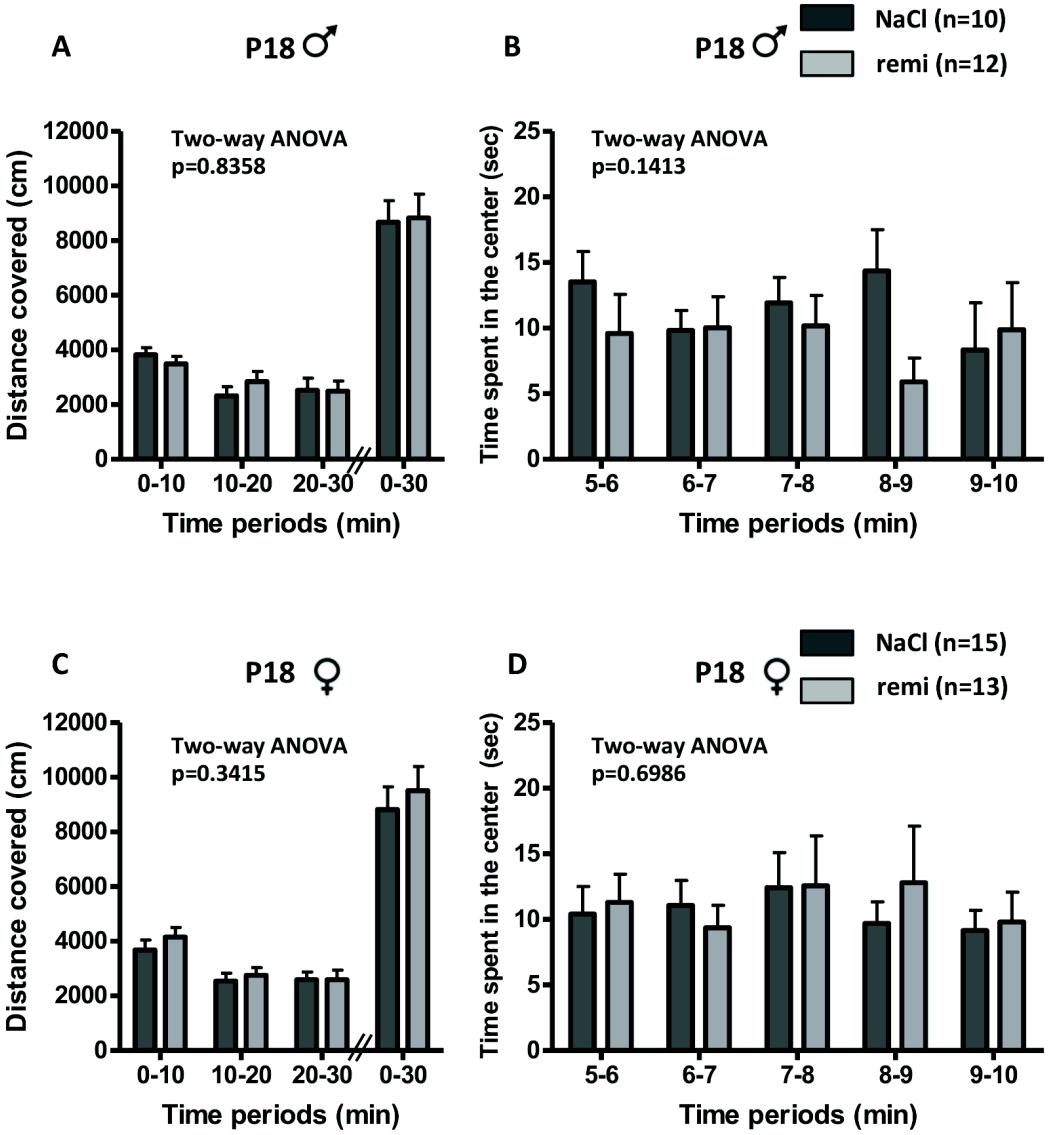

A
P18 ♂
Distance covered (cm)
Two-way ANOVA
p=0.8358
0-10
10-20
20-30
0-30
Time periods (min)
B
P18 ♂
NaCl (n=10)
remi (n=12)
Time spent in the center (sec)
Two-way ANOVA
p=0.1413
5-6
6-7
7-8
8-9
9-10
Time periods (min)
C
P18 ♀
Distance covered (cm)
Two-way ANOVA
p=0.3415
0-10
10-20
20-30
0-30
Time periods (min)
D
P18 ♀
NaCl (n=15)
remi (n=13)
Time spent in the center (sec)
Two-way ANOVA
p=0.6986
5-6
6-7
7-8
8-9
9-10
Time periods (min)

Fig. 7

Supplemental Digital Content 1

Materials and Methods

Determination of plasma remifentanil concentrations

Only P2 pups ip injected with 3 × 500 ng/g of remifentanil were used. At 5 min after the last injection, trunk blood from five pups was collected, pooled in a heparinized tube, and immediately maintained on ice until remifentanil measurement. The quantification of remifentanil from 14 plasma pools was investigated by combining reverse-phase high-performance liquid chromatography analysis with tandem mass spectrometry. After precipitation of plasma in methanol, samples were centrifuged (14 000 rpm, 5 min) and supernatants were analyzed on a 0.21 × 50 mm Alltima HP C18 HL, 3 μm (Grace, Epernon, France) at a constant flow rate (200 μl/min). The mobile phase consisted of a gradient established over 5 min with 0.2% formic acid and 2 mM ammonium formate in acetonitrile. The concentration of remifentanil was determined using a calibration curve.

Ibotenate administration: model of excitotoxic brain lesions

Ibotenic acid was purchased from Tocris Bioscience (Bristol, UK) and diluted in 0.1 M phosphate buffered saline (PBS) containing 0.02% acetic acid. Intracortical (ic) injection of ibotenate was performed on P2 pups immediately after the last ip injection of remifentanil (500 ng/g) (Ibo/remi group) or NaCl (Ibo/NaCl group). In some experiments, a third group of unlesioned and untreated pups was added (unlesioned group). As previously described,[1–3] injection was given under a warming lamp using a 26-gauge needle mounted on a Hamilton syringe microdispenser device. The needle was inserted 2 mm under the external surface of scalp skin in the frontoparietal area of the right hemisphere, 2 mm from the middle in the lateral-medial plane, and 2 mm anterior from the sagittal suture in the rostro-caudal plane.

Two 1-µl boluses each containing 5 µg of ibotenate were injected 30 sec apart. After the procedure, the pups were returned to their dams. Pilot injection tests were done with CellTracker™ Red (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) to standardize the injection protocol.

Measurement of ROS production by electron paramagnetic resonance spectroscopy

The production of ROS was evaluated using electron paramagnetic resonance spectroscopy as described by Kohlhauer et al.[4] P2 pups were sacrificed at 10 min and 5 h post-lesion. At the same time, unlesioned P2 pups from the same litters were used. Five to seven pups from three litters were included in each group. Brains from Ibo/NaCl and Ibo/remi groups were rapidly dissected and a frontal section bracketing the ibotenate injection site was dissected. An equivalent section was dissected from brain of unlesioned pups. Tissues were frozen in liquid nitrogen and kept at –80°C until analysis. Tissues were homogenized (Polytron, Montreal, Canada) in Krebs/HEPES buffer (pH 7.4) and incubated at 37°C for 60 min in the same buffer containing chelators deferoxamine (25 mM) and diethyldithiocarbamate (5 mM), and spin probe CMH (1-hydroxy-3-methocarbonyl-2,2,5,5-tetramethyl pyrrolidine hydrochloride; 500 mM; Noxygen, Hamburg, Germany). Then, samples were introduced into an insulin syringe, frozen in liquid nitrogen, and kept at –80°C until electron paramagnetic resonance measurement. Spectra of the oxidized product of CMH (CM°) were recorded at 77 K in a liquid nitrogen-cooled Dewar, using an MS400 spectrometer (Magnettech, Berlin, Germany) with the following acquisition parameters: microwave power 20 mW; microwave frequency 9.5 GHz; modulation amplitude 5 G; modulation frequency 100 kHz; gain 500; team sweep time 60 sec; one scan. Intensity of the spectra was expressed in arbitrary units (AU) per milligram of protein.

***In situ* labeling and quantification of cortical caspase activity**

For *in situ* labeling, caspase activity was visualized using the CaspACE FITC-VAD-FMK *in situ* marker from Promega (Charbonnières les Bains, France). This fluorescent caspase inhibitor enters cells and is cleaved by activated caspases releasing the fluorescent FITC group. P2 pups from Ibo/NaCl and Ibo/remi groups were sacrificed at 5 h post-lesion. Six pups from three litters were included in each group. Brains were rapidly dissected to isolate the cerebral hemisphere. Meninges covering the brain were carefully removed and the brain was immediately placed into ice-cold artificial cerebrospinal fluid (aCSF) containing (in mM): NaCl, 125; KCl, 3; $CaCl_2$, 2; NaH_2PO4, 1.2; $NaHCO_3$, 26; D-glucose 10; pH 7.4. Frontal sections (250 µm) were cut at 4°C by using a vibratome VT1000S (Leica, France). For each pup, two slices immediately adjacent to the site of ic injection were collected and incubated with 10 µM CaspACE FITC-VAD-FMK for 20 min at 37°C in a humidified incubator under controlled atmosphere of 5% CO_2/95% air. Then, slices were washed three times with warm aCSF and fixed overnight in 4% PFA in PBS. Labeling was visualized with a Leica DMI 6000B microscope. Green signal visualized at the excitation and emission wavelengths 485 and 520 nm, respectively, was acquired and saved in TIFF format using the Metamorph image analysis station (Roper Scientific, Lisses, France). A region of interest (ROI) around the site of injection was defined and the proportion of labeled area was determined by image segmentation with the Metamorph analysis software.

Cleaved caspase-3 immunohistochemistry

P2 pups from Ibo/NaCl and Ibo/remi groups were sacrificed at 24 h post-lesion. For each P3 pup, two frontal slices (250 µm) immediately adjacent to the site of ic injection were cut as previously described. Brain slices were fixed with 4% PFA, incubated overnight at 4°C with rabbit antibodies directed against cleaved caspase-3 (#9661, Cell Signaling Technology,

Boston, MA, USA), and diluted (1:200) in PBS containing 1% bovine serum albumin and 0.1% Triton X-100. Sections were then rinsed twice with PBS for 20 min and incubated with the same incubation buffer containing an Alexa Fluor® 488 donkey anti-rabbit IgG (Invitrogen). The specificity of the immunoreaction was controlled by substituting the primary antibodies by PBS.

Fragmented DNA detection by enzyme-linked immunosorbent assay

The presence of fragmented DNA after cell death was assessed by measuring the cytoplasmic histone-associated DNA using a specific two-sided enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with an anti-histone primary antibody and a secondary anti-DNA antibody according to the manufacturer's instructions (Cell Death Detection ELISA^{PLUS}, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). P2 pups from Ibo/NaCl and Ibo/remi groups were sacrificed at 24 h post-lesion. At P3, brains from Ibo/NaCl, Ibo/remi, or unlesioned pups from the same litters were rapidly dissected. Sixteen pups from four litters were included in each group. From each right hemisphere, a frontal section (2-mm thickness) from either side of ibotenate injection site was dissected for cell death detection ELISA assay. An equivalent section was dissected from brain of unlesioned pups. Brain tissue was homogenized in 1 ml of lysis buffer and incubated for 30 min at room temperature. After centrifugation to remove nuclei and cellular debris, the cytoplasmic fractions were diluted 1:2 (vol:vol) with lysis buffer. Then, 20 µl from each sample were transferred to a 96-well plate precoated with anti-histone antibody to which 80 µl immunoreagent mix were added. After incubation and washes, the wells were treated with the chromogen 2,2'-azinobis (3-ethylbinzothiazoline) sulfonic acid as a substrate. The color intensity was read at 405 nm, while that at 490 nm was used as a blank. The optical density of each sample was normalized by each sample's protein concentration.

GFAP immunohistochemistry and western blot

For immunohistochemistry, five pups from Ibo/NaCl and Ibo/remi groups were sacrificed 24 h later. Brains were immediately fixed in 4% formalin for 7 days and embedded in paraffin. Glial fibrillary acidic protein (GFAP, a marker of astrocytes) immunostaining was performed on 7-µm-thick slices using successively a goat anti-GFAP (sc-6170, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA; dilution 1:200) and an Alexa Fluor 594 donkey anti-goat IgG (A-11058, Invitrogen; dilution 1:400). The specificity of the immunoreaction was controlled by substituting the primary antibody by PBS.

Red signal was acquired and saved in TIFF format using the Metamorph image analysis station. For each animal, ROI in the interior zone bordering the lateral ventricle of ibotenate-injected hemisphere was defined and the proportion of labeled area was determined by image segmentation with the Metamorph analysis software.

For western blot analysis, 13 pups from Ibo/NaCl and Ibo/remi groups and from four litters were sacrificed 24 h later. Cortex from the ibotenate-injected hemisphere was rapidly dissected and total proteins were extracted using 250 µl lysis buffer containing 1% phosphatase inhibitor and 1% protease inhibitor. After centrifugation of the homogenates (15000 ×*g*, 4°C, 15 min), the supernatants were used for western blot. Protein extracts (75 µg) were suspended in Laemmli buffer (100 mM Hepes, pH 6.8, 10% β-mercaptoethanol, 20% SDS) and heated for 5 min. They were then loaded on 15% SDS-polyacrylamide gel and electroblotted on nitrocellulose membrane. Commercial markers (BioRad, Marnes la Coquette, France) were used as molecular weight standards. Membranes were incubated in blocking solution (5% milk in Tris buffered saline containing 0.1% Tween 20) at room temperature for 1 h, then overnight with goat anti-GFAP (sc-6170; 1:1000). After incubation with the corresponding secondary antibodies coupled with peroxidase (donkey anti-goat, sc-2033, Santa Cruz Biotechnology; dilution 1:10000), proteins were visualized using enhanced

chemiluminescence ECL Plus immunoblotting (BioRad). To check equal protein loading, membranes were stripped and reprobed with mouse β-actin antibodies (A5441, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; 1:5000). The intensity of the immunoreactive bands was quantified using a blot analysis system (BioRad), and data were expressed as GFAP/β-actin.

Determination of lesion size

Thirty-two Ibo/NaCl and 32 Ibo/remi pups from eight litters were sacrificed by decapitation 5 days after ic ibotenate injection. Brains were immediately fixed in 4% formalin for 7 days and embedded in paraffin. Coronal sections (7-μm thick) were cut and stained with cresyl violet to determine the maximal extent of the lesion. Previous reports have shown an excellent correlation between the maximal radial, lateral-medial, and fronto-occipital diameters of ibotenate-induced lesions.[5,6] Therefore, sectioning the entire brain in the coronal plane provided an accurate and reproducible determination of the maximal fronto-occipital diameter of the lesion, which was used as an index of lesion size. Two investigators blinded to the treatment groups (CC and FT) determined the lesion size in each brain.

Behavioral assessments of neonate mice sensorimotor development

In the first set of experiments the effect of remifentanil was evaluated in the lesional model, and in a second set the proper effect of remifentanil was evaluated in unlesioned pups. A third group of untreated P2 pups was included in both sets of experiments. Pups from seven litters were experimental subjects (11–20 pups per experimental group). Males and females were randomly assigned to the different groups. The measures of sensorimotor development were assessed by negative geotaxis and suspension tests according to methods described by Altman and Sudarshan.[7] The pups were weighed and tested between 09:00 and 11:00 h. Negative geotaxis is a postural reaction bringing the animal in the upright position when it is placed

downward. The animals were placed on a 20° tilted plane, with their head facing down, and the mean time to realize a full rotation of 180°, face up, was measured in each group. The negative reflex was assessed from P6 to P8. For the suspension test, a nylon thread was suspended 15 cm above a soft surface. Pups were gently held and their forepaws were brought into contact with the thread to provoke a grasping reflex. The mean time the pups were able to hold onto the thread with their forepaws was recorded. Grasping reflex/grip strength was measured from P10 to P12.

Juvenile mouse behavior in open field

P2 lesioned (Ibo/NaCl and Ibo/remi groups) and unlesioned (NaCl and remi groups) pups were observed for exploratory and locomotor activity at P18. All tests were performed between 09:00. and 13:00 h. Total distance travelled in an open field during a 30-min period was recorded using an automated image analysis system (Ethovision XT9.0, Noldus Information Technologies, Vageningen, The Netherlands). Animals were isolated for 10 min in individual cages before being placed in the experimental device (40 × 40 × 30 cm) and behavior was videotaped for later analysis. When mice are introduced in the open field, they are inclined to explore mainly the peripheral zone of the apparatus. This tendency to remain close the wall, called thigmotaxis, was shown to be selectively sensitive of the action of anxiolytic drugs and is considered as an index of anxiety in rodent.[8] After a 5-min period of habituation, thigmotaxis was assessed by the time spent in the central area of the open field (30 × 30 cm) during five successive 1-min periods. Four animals could be tested in parallel, and male and female mice were tested separately.

References

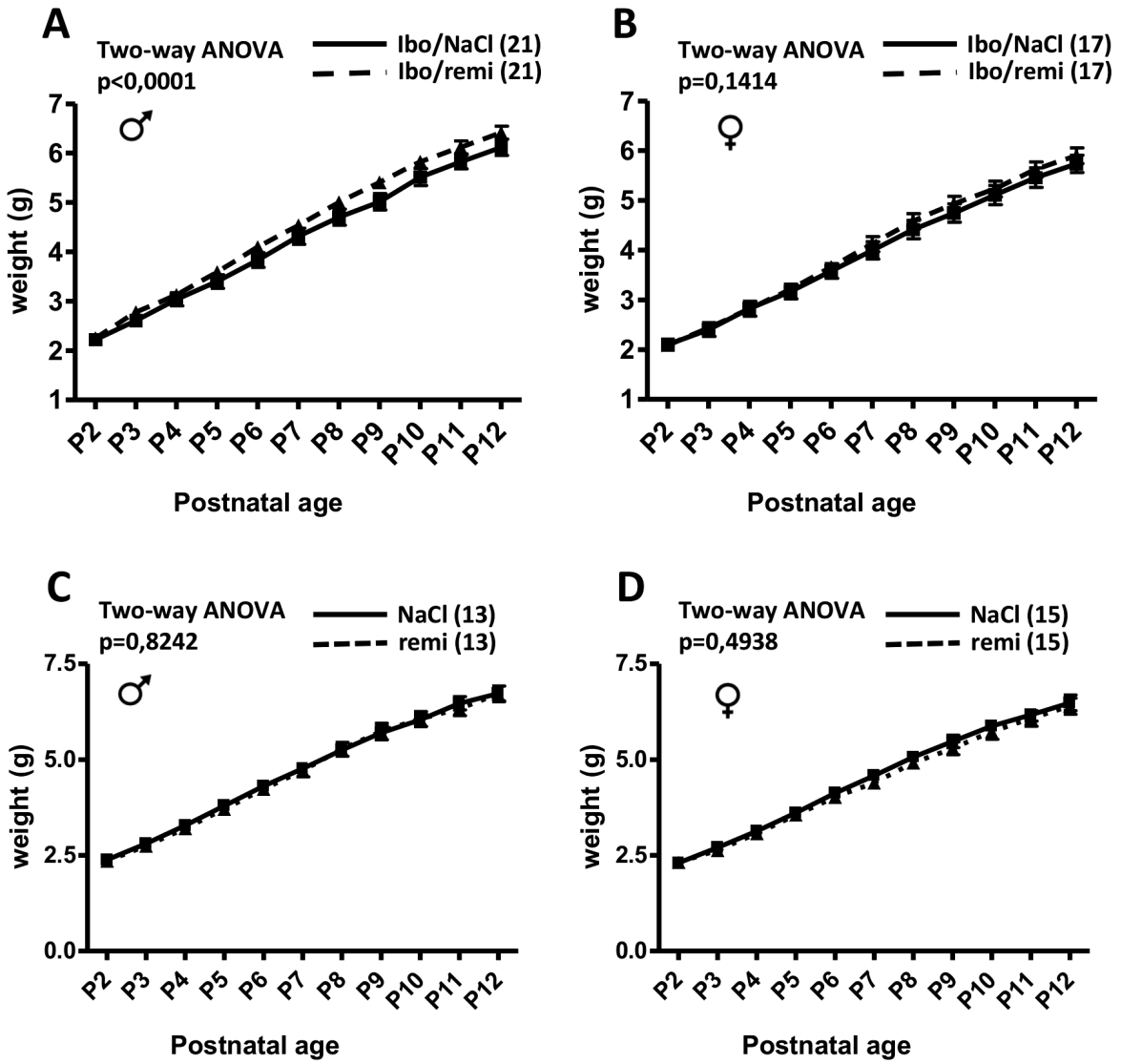
1. Tourrel F, Lendeu PK de, Abily-Donval L, Chollat C, Marret S, Dufrasne F, Compagnon P, Ramdani Y, Dureuil B, Laudenbach V, Gonzalez BJ, Jégou S: The antiapoptotic effect of remifentanil on the immature mouse brain: an ex vivo study. *Anesth Analg* 2014; 118:1041–51
2. Degos V, Charpentier TL, Chhor V, Brissaud O, Lebon S, Schwendimann L, Bednareck N, Passemard S, Mantz J, Gressens P: Neuroprotective effects of dexmedetomidine against glutamate agonist-induced neuronal cell death are related to increased astrocyte brain-derived neurotrophic factor expression. *Anesthesiology* 2013; 118:1123–32
3. Gressens P, Marret S, Hill JM, Brenneman DE, Gozes I, Fridkin M, Evrard P: Vasoactive intestinal peptide prevents excitotoxic cell death in the murine developing brain. *J Clin Invest* 1997; 100:390–7
4. Kohlhauer M, Lidouren F, Remy-Jouet I, Mongardon N, Adam C, Bruneval P, Hocini H, Levy Y, Blengio F, Carli P, Vivien B, Ricard J-D, Micheau P, Walti H, Nadeau M, Robert R, Richard V, Mulder P, Maresca D, Demené C, Pernot M, Tanter M, Ghaleh B, Berdeaux A, Tissier R: Hypothermic total liquid ventilation is highly protective through cerebral hemodynamic preservation and sepsis-like mitigation after asphyxial cardiac arrest. *Crit Care Med* 2015; 43:e420–30
5. Marret S, Gressens P, Gadisseux JF, Evrard P: Prevention by magnesium of excitotoxic neuronal death in the developing brain: an animal model for clinical intervention studies. *Dev Med Child Neurol* 1995; 37:473–84
6. Husson I, Rangon C-M, Lelièvre V, Bemelmans A-P, Sachs P, Mallet J, Kosofsky BE, Gressens P: BDNF-induced white matter neuroprotection and stage-dependent neuronal survival following a neonatal excitotoxic challenge. *Cereb Cortex* 2005; 15:250–61
7. Altman J, Sudarshan K: Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. *Anim Behav* 1975; 23:896–920
8. Treit D, Fundytus M: Thigmotaxis as a test for anxiolytic activity in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1988; 31:959–62

Supplemental Digital Content 2 Statistical analysis

Experiments	Test	n independents experiments	p value *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001, ****p<0.0001
Righting reflex latency time (Fig. 1A)	Two-way ANOVA, Bonferroni post-test	n= 22 NaCl, n= 22 remi 50 ng/g, n= 19 remi 250 ng/g, n= 22 remi 500 ng/g	**At 0 min** remi 500 ng/g *vs* NaCl p= **** remi 250 ng/g *vs* NaCl p= **** remi 500 ng/g *vs* remi 50 ng/g p= •••• remi 250 ng/g *vs* remi 50 ng/g p= •••• **At 5 min** remi 500 ng/g *vs* NaCl p= **** remi 250 ng/g *vs* NaCl p= **** remi 500 ng/g *vs* remi 50 ng/g p= •••• remi 250 ng/g *vs* remi 50 ng/g p= •••• **At 10 min** remi 500 ng/g *vs* NaCl p= **** remi 250 ng/g *vs* NaCl p= **** remi 500 ng/g *vs* remi 50 ng/g p= •••• remi 250 ng/g *vs* remi 50 ng/g p= 0.0074 •• remi 500 ng/g *vs* remi 250 ng/g p= 0.0053 ## **At 15 min** remi 500 ng/g *vs* NaCl p= **** remi 250 ng/g *vs* NaCl p= 0.0002*** remi 500 ng/g *vs* remi 250 ng/g p= 0.0181#
Respiratory movements (Fig. 1B)	Kruskall-Wallis test	n= 7	remi *vs* untreated p= 0.0015** remi *vs* NaCl p= 0.0134*
Blood gas analysis (Fig. 1C-D-E)	Mann Whitney test	n= 8	Fig. 1C p= 0.0047 ** Fig 1D p= 0.0074 **
Heart rate (Fig. 1F)	Mann Whitney test	n= 9	p= 0.0142 *
ROS production (Fig. 2D)	Mann Whitney test	unlesioned n= 7 At 10 min n= 6 At 5 hours n= 5	**At 10 min** Ibo/NaCl *vs* unlesioned p= 0.0047 ** Ibo/remi *vs* unlesioned p= 0.0303 * **At 5 hours** Ibo/NaCl *vs* unlesioned p= 0.0025 **
in situ caspase activity (Fig. 2G)	Mann Whitney test	n=6	p= 0.0411 *
DNA fragmentation (Fig. 2J)	Mann Whitney test and Kuskall-Wallis test	n=16	Mann Whitney test Ibo/remi *vs* Ibo/NaCl p= 0.0275 * Kuskall-Wallis test Ibo/NaCl *vs* unlesioned p= #### Ibo/remi *vs* unlesioned p= 0.0014 ##
Quantitative analysis of GFAP (Fig. 3C)	Mann Whitney test	n=5	p= 0.0159 *
WB GFAP (Fig. 3D)	Mann Whitney test	n= 13	p= 0.0355 *
Size lesion induced by ibotenate (Fig. 3F)	Mann Whitney test	n=32 Ibo/NaCl: ♂=14; ♀=18 Ibo/remi: ♂=15; ♀=17	Ibo/remi *vs* Ibo/NaCl (both gender) p= 0.0003 *** Ibo/remi *vs* Ibo/NaCl (♂) p= 0.0018 ** Ibo/remi *vs* Ibo/NaCl (♀) p= 0.0420 *

Experiments	Test	n independents experiments	p value *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001, ****p<0.0001
Negative geotaxis of male mice with ibotenate (Fig. 4A)	Two-way ANOVA, Bonferroni post-test	n=20	Two-way ANOVA $p < 0.001$ P6 Ibo/NaCl *vs* unlesioned p= 0.0405 # P7 Ibo/NaCl *vs* unlesioned p= 0.0369 # Ibo/remi *vs* Ibo/NaCl p= 0.0335 * P8 Ibo/NaCl *vs* unlesioned p= 0.0097 ## Ibo/remi *vs* Ibo/NaCl p= 0.0078 **
Negative geotaxis of female mice with ibotenate (Fig. 4B)	Two-way ANOVA, Bonferroni post-test	n=17	Two-way ANOVA $p < 0.001$ P6 Ibo/NaCl *vs* unlesioned p= 0.0002### Ibo/remi *vs* Ibo/NaCl p= 0.0021** P7 Ibo/NaCl *vs* unlesioned p= 0.0005 ###
Latency before falling of female mice with ibotenate (Fig. 4C)	Two-way ANOVA, Bonferroni post-test	n=20	Two-way ANOVA p= 0.0054
Latency before falling of female mice with ibotenate (Fig. 4D)	Two-way ANOVA, Bonferroni post-test	n=17	Two-way ANOVA p= 0.5160
Negative geotaxis of male mice unlesioned (Fig. 5A)	Two-way ANOVA	untreated n=11 NaCl n= 13 remi n= 13	Two-way ANOVA p= 0.3988
Negative geotaxis of female mice unlesioned (Fig. 5B)	Two-way ANOVA	untreated n=15 NaCl n= 15 remi n= 16	Two-way ANOVA p= 0.2944
Latency before falling of female mice unlesioned (Fig. 5C)	Two-way ANOVA	untreated n=11 NaCl n= 13 remi n= 13	Two-way ANOVA p= 0.9683
Latency before falling of female mice unlesioned (Fig. 5D)	Two-way ANOVA	untreated n=15 NaCl n= 15 remi n= 16	Two-way ANOVA p= 0.9608
Spontaneous motor activity at P18 in males with ibotenate (Fig. 6A-B)	Two-way ANOVA	n=20	Fig. 6A Distance covered Two-way ANOVA p= 0.7491 Fig. 6B Time spent in the center Two-way ANOVA p=0.2646
Spontaneous motor activity at P18 in females with ibotenate (Fig. 6C-D)	Two-way ANOVA	n=18	Fig. 6C Distance covered Two-way ANOVA p= 0.0693 Fig. 6D Time spent in the center Two-way ANOVA p= 0.0054
Spontaneous motor activity at P18 in males unlesioned (Fig. 7 A-B)	Two-way ANOVA	NaCl n=10 remi n=12	Fig. 7A Distance covered Two-way ANOVA p= 0.8358 Fig. 7B Time spent in the center Two-way ANOVA p= 0.1413

Experiments	Test	n independents experiments	p value *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001, ****p<0.0001
Spontaneous motor activity at P18 in females unlesioned (Fig. 7 C-D)	Two-way ANOVA	NaCl n=15 remi n=13	Fig. 7C Distance covered Two-way ANOVA p= 0.3415 Fig. 7D Time spent in the center Two-way ANOVA p= 0.6986
Weight intake in male with ibotenate (Supplementary Fig. 1A)	Two-way ANOVA	n=21	Two-way ANOVA p< 0.0001
Weight intake in female with ibotenate (Supplementary Fig. 1B)	Two-way ANOVA	n=17	Two-way ANOVA p= 0.1414
Weight intake in male unlesioned (Supplementary Fig. 1C)	Two-way ANOVA	n=13	Two-way ANOVA p= 0.8242
Weight intake in male with ibotenate (Supplementary Fig. 1D)	Two-way ANOVA	n=15	Two-way ANOVA p= 0.4938



Supplementary Fig. 1

DISCUSSION & PERSPECTIVES

DISCUSSION & PERSPECTIVES

L'essor de la néonatologie a permis de repousser les limites de prise en charge du nouveau-né prématuré et d'améliorer la qualité des soins lors de l'hospitalisation. Ces progrès ont permis la diminution de la morbi-mortalité néonatale du prématuré (Stoll et al., 2015). La prématurité reste néanmoins pourvoyeuse de nombreuses complications chez l'enfant en devenir, notamment au niveau cérébral. La mise en pratique de stratégies de neuroprotection du cerveau immature est par conséquent un enjeu considérable pour la médecine néonatale du 21ème siècle. L'origine des lésions cérébrales liées à la prématurité étant multifactorielle, une approche holistique est donc nécessaire pour améliorer le devenir neurologique du prématuré. En effet, si une seule intervention à visée neuroprotectrice ne semble pas suffisante, l'association de plusieurs interventions pourrait permettre la diminution des séquelles neurodéveloppementales. Parmi ces interventions, l'administration anténatale de sulfate de magnésium en cas de menace d'accouchement prématuré est une action simple dont l'efficacité a été démontrée (Oddie et al., 2015). Une autre approche est de limiter la prescription de médicaments possiblement délétères pour le neurodéveloppement. La potentielle neurotoxicité des agents anesthésiques sur le cerveau immature oblige le néonatologiste à évaluer la balance bénéfice/risque de chaque molécule et de prescrire l'anesthésique le moins toxique chez le nouveau-né. L'évaluation des agents anesthésiques chez l'Animal et chez l'Homme est donc essentielle pour améliorer les pratiques en néonatologie et, *in fine*, la trajectoire neurodéveloppementale des enfants nés prématurés.

Les travaux entrepris au cours de cette thèse s'inscrivent dans le cadre de l'effort de recherche pour la neuroprotection du prématuré et comportent une partie de recherche clinique et une partie de recherche fondamentale. Nous avons évalué à l'âge scolaire les enfants inclus dans l'essai randomisé contrôlé Premag et ayant été exposés avant l'accouchement au sulfate de magnésium ou à un placebo. Nous avons également analysé *in vivo* l'effet du rémifentanil, morphinique de synthèse utilisé en période périnatale, sur le cerveau immature de souriceaux en contexte lésionnel.

I Devenir à l'âge scolaire d'enfants nés prématurés exposés au sulfate de magnésium en anténatal à visée neuroprotectrice (essai randomisé contrôlé Premag)

L'impact neuroprotecteur de l'exposition au sulfate de magnésium sur le cerveau immature a été évalué chez l'Animal par de nombreuses études précliniques et chez l'Homme par des études observationnelles et cinq essais randomisés contrôlés multicentriques. Ces essais randomisés ont fait l'objet de méta-analyses (Conde-Agudelo et Romero, 2009 ; Costantine et al., 2009 ; Doyle et al., 2009a, 2009b ; Oddie et al., 2015 ; Zeng et al., 2016) concluant également à un effet bénéfique sur le devenir neurologique de l'enfant à deux ans.

Six cent quatre-vingt-huit fœtus avaient été inclus dans l'essai randomisé français Premag, dont 352 avaient été exposés au sulfate de magnésium. Le suivi à deux ans de la cohorte avait permis la mise en évidence d'un effet protecteur, mais non significatif, du magnésium sur les anomalies motrices et cognitives. En effet, la diminution des anomalies motrices approchait de la significativité (p = 0,06), et les critères combinés (décès associé au retard moteur ou à la paralysie cérébrale ou au retard cognitif) étaient moins fréquents dans le groupe $MgSO_4$ que dans le groupe placebo (Marret et al., 2007, 2008).

Le suivi à long terme des enfants inclus dans l'essai Premag s'avérait nécessaire :

- d'une part afin de s'assurer de l'absence d'effet délétère du sulfate de magnésium chez l'enfant exposé. En effet, l'action d'une molécule sur le cerveau en développement peut avoir des effets multiples, à la fois bénéfiques mais aussi délétères. Par exemple, il a été démontré au sein de notre équipe de recherche que le NMDA avait un effet double sur le cortex immature de souris âgées de 2 jours : pro-nécrotique dans les couches neuronales profondes (les plus matures) et anti-apoptotique dans les couches superficielles (les plus immatures) (Desfeux et al., 2010).

- d'autre part afin d'évaluer leur devenir neurologique. En effet, la mise en évidence de troubles moteurs mineurs et de troubles cognitifs est plus fiable à 10 ans qu'à 2 ans et affirmer l'absence de paralysie cérébrale à 2 ans peut s'avérer difficile.

Le suivi à long terme de la cohorte Premag a donc permis d'analyser le devenir neurologique des enfants nés prématurés avant 33 SA et exposés au sulfate de magnésium

en période anténatale. Les devenirs sensoriel et cognitif, les troubles du langage, de l'alimentation et du sommeil ne semblent pas modifiés par l'exposition anténatale au magnésium à l'âge scolaire. En revanche, le devenir moteur est meilleur, les troubles du comportement, notamment les syndromes d'hyperactivité, sont diminués, les difficultés scolaires sont moins importantes et les parents ont un meilleur ressenti de la santé de leur enfant dans le groupe sulfate de magnésium.

Ce travail représente le premier suivi à long terme d'une cohorte d'enfants exposés au magnésium en période anténatale (Chollat et al., 2014), le suivi de la cohorte ACTOMgSO_4 a été publié secondairement en 2014 (Doyle et al., 2014a). Aucun effet délétère sur le développement neurologique, qui aurait pu s'opposer au bénéfice démontré à 2 ans, n'a été retrouvé. Une tendance neuroprotectrice du magnésium a été mise en avant, confortant ainsi l'analyse des données périnatales et du suivi à 2 ans. L'évaluation à 10 ans révèle également un effet bénéfique sur la survenue de troubles du comportement et le devenir scolaire. Ces éléments rassurants sont des arguments supplémentaires pour promouvoir au mieux l'utilisation du sulfate de magnésium dans les situations d'accouchement prématuré.

Limites de l'étude

Les résultats de l'étude doivent toutefois être nuancés, car le suivi à long terme de la cohorte Premag présente certaines limites.

I.1.1 Limites liées à l'étude initiale

Tout d'abord, la puissance statistique est une des limites importantes de l'essai Premag. Du fait des difficultés à maintenir un niveau de recrutement élevé, l'inclusion des patientes a été suspendue six ans après le début de l'essai (juillet 1997-juillet 2003), alors que seules 564 mères avaient été incluses permettant la randomisation de 688 fœtus, soit 62% de la taille cible de l'effectif (1162 patients). Seuls les enfants nés de mères ayant eu une menace d'accouchement prématuré, avec ou sans rupture des membranes, avaient été inclus ; les maladies vasculaires étaient un critère de non-inclusion dans un souci d'homogénéité d'effectif et afin de restreindre l'étude aux patients les plus à risque de développer des troubles neurologiques. En incluant ces patientes, la taille de l'effectif aurait pu être augmentée. En effet, les maladies vasculaires liées à la grossesse sont la cause

principale des naissances prématurées avant 33 SA, représentant un tiers des naissances prématurées (Larroque et al., 2003).

De plus, le nombre de sujets nécessaires avait été calculé pour détecter une diminution de 50% du risque d'anomalies sévères de la substance blanche à l'échographie transfontanellaire, définies par la présence de leucomalacie périventriculaire kystique, d'une hémorragie périventriculaire parenchymateuse ou d'une lésion porencéphalique, (critère de jugement principal de l'étude). Il a été prouvé que le taux de leucomalacies cavitaires a franchement diminué depuis les années 1990 (van Haastert et al., 2011), alors que les lésions diffuses de la substance blanche ont tendance à augmenter (Back, 2006). Compte tenu de cette évolution des lésions cérébrales, le nombre de sujets nécessaires pour le critère de jugement principal est donc probablement sous-estimé. Par ailleurs, l'évaluation échographique ne permet pas de visualiser correctement les formes diffuses de la maladie de la substance blanche et la corrélation anomalie sévère de la substance blanche (comme définie dans l'essai initial) /survenue de paralysie cérébrale est mauvaise. En effet, dans cet essai, seule moins de la moitié des enfants atteints de paralysie cérébrale présentait une anomalie sévère de la substance blanche diagnostiquée par une échographie transfontanellaire. L'évaluation systématique du parenchyme cérébral par IRM lors d'essais de neuroprotection pourrait améliorer le dépistage des anomalies de la substance blanche.

La puissance de l'essai pour le suivi à long terme (critère de jugement principal : paralysie cérébrale) est seulement de 14%. Pour obtenir une puissance de 80%, avec un risque alpha de 5% il aurait fallu évaluer 2122 patients par groupe soit un effectif global de 4244 patients, c'est à dire un échantillon dix fois plus important.

Par ailleurs, les patientes ont été incluses pendant 6 ans alors que le suivi à long terme s'est déroulé sur 2 ans. Il existe donc une hétérogénéité de l'âge des enfants lors de la réponse au questionnaire (entre 7 ans et 9 mois et 14 ans et 4 mois). Cette longue durée d'inclusion peut aussi être à l'origine d'un biais de sélection. En effet, les pratiques obstétricales et néonatales évoluent, et les prises en charges des patients ont pu être différentes entre le début et la fin de la période d'inclusion, modifiant potentiellement le devenir développemental des patients. Toutefois, la randomisation à l'inclusion permet de minimiser ce biais.

Enfin, le protocole Premag prévoyait une injection unique de quatre grammes de sulfate de magnésium alors que les autres études évaluant l'effet neuroprotecteur du magnésium proposaient une dose d'entretien d'un gramme par heure pendant 12 heures après la dose de charge initiale. S'il existe un effet-dose du sulfate de magnésium sur le devenir neurologique, l'impact bénéfique attendu du sulfate de magnésium pourrait être moins important en cas de dose de charge unique comme dans l'essai Premag.

I.1.2 Limites liées au questionnaire

L'évaluation neurologique des patients par questionnaire présente un avantage logistique et financier certain en comparaison à une évaluation médico-psychologique lors d'une consultation hospitalière. Il permet également de s'affranchir de la collaboration active des 13 centres ayant inclus des patients. Organiser une consultation, convaincre des pédiatres qui n'avaient probablement pas participé à l'étude initiale, et monopoliser un « espace » de consultation au sein de programmes souvent surchargés auraient été des contraintes inhérentes au suivi médical à long terme.

Mais l'utilisation d'un questionnaire rempli par les parents comporte des limites. Les diagnostics élaborés à partir du questionnaire sont moins précis que ceux résultant d'une consultation. Plusieurs éléments peuvent fausser les réponses au questionnaire comme la barrière de la langue et/ou de l'écriture, la mauvaise compréhension des questions, le regard subjectif des parents et la véracité des réponses. Néanmoins, les questionnaires parentaux ont l'avantage d'être des outils simples, peu coûteux et fiables pour évaluer le suivi à long terme des enfants (Wilson et al., 2000 ; Bortolus et al., 2002 ; Riley, 2004 ; Flamant et al., 2011).

Par ailleurs, le questionnaire avait été initialement élaboré pour un suivi à l'âge de 10 ans. Les outils utilisés pour la création de la grille sont validés pour des tranches d'âge précises : le K-ABC pour les enfants de 2 ans et demi à 12 ans et demi, le WISC-IV de 6 ans à 14 ans, le SDQ de 3 à 16 ans et le questionnaire de suivi EPIPAGE 1 concernait les enfants de 8 ans. Certains patients suivis ne sont pas exactement dans la cible. Afin de valider le questionnaire sur la tranche d'âge concernée (7 ans et 9 mois – 14 ans et 4 mois), il aurait fallu tester la grille auprès d'un échantillon témoin d'enfants nés à terme et ne présentant pas de trouble neurodéveloppemental.

Enfin, le questionnaire est propre à l'étude française. Compte tenu du manque de significativité de l'étude, il aurait été judicieux de combiner les données de l'étude australienne et néo-zélandaise à celles de l'étude française dans le cadre d'une méta-analyse, comme cela avait déjà été fait pour le suivi à deux ans (Doyle et al. 2009). Mais comme le suivi à long terme de la cohorte ACTOMgSO_4 repose sur une évaluation clinique et celui de la cohorte française sur un questionnaire parental, une telle méta-analyse n'est pas possible. Un questionnaire commun au suivi des cohortes Premag et ACTOMgSO_4 aurait été un outil précieux pour une étude internationale de qualité.

I.1.3 Limites liées aux perdus de vue

Malgré les nombreuses démarches mises en œuvre pour retrouver les patients de la cohorte, 26,9 % des patients étaient perdus de vue à l'âge scolaire, et l'effectif étudié est donc restreint à 431 patients. Le biais de perdus de vue est à considérer dans l'analyse des données. L'absence de différence significative des caractéristiques générales des patients suivis et perdus de vue permet néanmoins d'affirmer que les perdus de vue sont comparables aux patients suivis, notamment en termes d'exposition au sulfate de magnésium. En revanche, la réduction de la taille de l'échantillon entraîne une diminution de la puissance statistique du test. Pour optimiser le suivi, et ainsi réduire le nombre de patients perdus de vue, l'anticipation de l'étude à long terme aurait été pertinente. Mentionner le suivi à 10 ans dans le protocole de recherche clinique initial et en informer les parents à l'inclusion, anticiper les changements d'adresse des familles en les contactant régulièrement pour s'assurer des bonnes coordonnées postales… auraient été des modalités à envisager lors de l'élaboration de l'étude initiale.

I.1.4 Limites liées à la représentativité du groupe contrôle

Afin d'extrapoler les résultats obtenus au sein de la cohorte Premag à la population générale, les taux des déficits neurologiques du groupe contrôle doivent être représentatifs des taux de la population générale des enfants nés prématurés avant 33 SA entre 1997 et 2003. Le groupe contrôle a alors été comparé à la cohorte EPIPAGE 1. Deux mille trois cent quatre-vingt-deux enfants nés entre 22 et 32 semaines d'aménorrhée, issus de 9 régions françaises en 1997 ont été inclus dans la cohorte EPIPAGE 1 et 1817 ont été suivis à 5 ans (Larroque et al., 2008). Les taux de paralysie cérébrale, de déficit sensoriel et de

redoublement sont moins élevés dans la cohorte EPIPAGE 1 que dans le groupe placebo de la cohorte Premag. En revanche, les taux d'enfants atteints de troubles du comportement, d'hyperactivité ou les types de scolarisation sont comparables (Tableau 4).

	EPIPAGE 1	Premag	
		Placebo	$MgSO_4$
Paralysie cérébrale	9	15,5	13,3
Déficit sensoriel			
Visuel	3	46	48,2
Auditif	<1	6,6	4,1
Trouble du comportement (SDQ)			
Score global	20	20,2	16,5
Hyperactivité	17	20,2	17,4
Scolarité			
Redoublement	18	25,5	17,6
Classe ordinaire	95	94,3	94,3
Classe spécialisée	3	3,8	3,3
Institut spécialisé	2	1,9	1,8

Tableau 4 : Comparaison des devenirs neurologiques et scolaires des cohortes EPIPAGE 1 et Premag
Les valeurs sont exprimées en %. D'après Larroque et al. 2008 et Chollat et al., 2014.

Les critères composites, créés à partir des réponses au questionnaire, peuvent être mis en cause et entraîner une surestimation des taux de survenue des troubles neurologiques dans la cohorte Premag :

-pour la paralysie cérébrale, le critère composite s'appuie sur une graduation fonctionnelle du handicap, adoptée notamment pour la cohorte EPIPAGE 1 : incapacité de marcher, marche avec aide et marche sans aide. L'absence de doublon et de patient comptabilisé dans plusieurs groupes a été vérifiée. Il existe donc une proportion plus importante d'enfants atteints de paralysie cérébrale dans la cohorte Premag à 10 ans que dans la cohorte EPIPAGE 1 à 8 ans.

- pour le déficit auditif, l'étude EPIPAGE 1 retient une perte auditive sévère de 70 dB alors que pour Premag le critère comprend un critère de jugement subjectif des parents (question 10 : « Votre enfant entend-il bien ? »), et un critère objectif (question 11 : « Votre enfant porte-t-il actuellement un appareil pour mieux entendre ? »).

- pour le déficit visuel, le critère est probablement surestimé dans l'étude Premag. Le critère composite comprend tous les enfants porteurs de lunettes ou ayant une rééducation orthoptique, alors que pour EPIPAGE 1 seuls les enfants avec une acuité visuelle bilatérale < 3/10 étaient classés comme présentant un déficit visuel. Ces limites sont inhérentes à la nature même du questionnaire, les parents ne pouvant pas fournir des informations médicales aussi précises que la mesure d'acuité visuelle.

Le taux de redoublement est plus élevé dans la cohorte Premag, et cette augmentation ne semble pas être imputable au questionnaire.

La différence des taux de survenue des déficits neurologiques entre les cohortes Premag et EPIPAGE 1 peut aussi être expliquée par les différences de critères d'inclusion des essais. En effet, dans Premag, les femmes présentant une pathologie vasculaire liée à la grossesse (prééclampsie, retard de croissance intra-utérin, HELLP syndrome ou hématome rétroplacentaire) étaient exclues de l'essai. Les infections materno-fœtales et les ruptures prolongées des membranes sont donc plus représentées dans la cohorte Premag que dans celle d'EPIPAGE 1. Les pathologies obstétricales vasculaires ne sont pas associées à la survenue de paralysie cérébrale, contrairement au sexe masculin, à la chorioamniotite ou à la rupture prolongée des membranes (Beaino et al., 2010). Les cohortes Premag et EPIPAGE 1 ne sont donc pas parfaitement comparables, notamment car les critères d'inclusion sont différents. Il existe un biais de sélection qui pourrait expliquer le moins bon devenir neurologique du groupe contrôle de la cohorte Premag par rapport à celui de la cohorte EPIPAGE 1.

I.2 *Intérêts de l'étude*

Premag est la première étude qui évalue à long terme l'effet du sulfate de magnésium, utilisé dans un but de neuroprotection, chez l'enfant né grand prématuré. En effet, sur les cinq essais évaluant l'effet de l'exposition anténatale au sulfate de magnésium chez le grand prématuré, seuls les essais français (Premag) et australien (ACTOMgSO_4) ont

bénéficié d'un suivi à long terme. Le suivi à 10 ans de la cohorte Premag est le premier à avoir été finalisé et publié.

Un des points forts de l'étude est sa conception même. En effet, Premag est une étude prospective, randomisée, multicentrique, en simple aveugle et réalisée en intention de traiter.

De plus, l'essai a permis le suivi d'enfants nés prématurément avant 33 semaines d'aménorrhée, jusqu'à l'âge de 14 ans. Le devenir neurologique des enfants nés prématurés est souvent évalué jusqu'à 8 ans, mais peu d'études évaluent les patients après l'âge de 10 ans. Par exemple, Moster et collaborateurs avaient évalué à l'âge adulte une cohorte d'enfants nés prématurés entre 1967 et 1983 (Moster et al., 2008) et un suivi à 11 ans avait été programmé pour l'étude épidémiologique EPICure (enfants nés prématurément avant 26 semaines d'aménorrhée, en Grande-Bretagne et en Irlande, en 1995) (Johnson et al., 2009).

Les efforts mis en œuvre pour retrouver les patients ont permis de minimiser le taux de perdus de vue (seulement 26,9% pour le suivi à 10 ans). Pour l'étude EPICure, il existait 29% de perdus de vue à 11 ans (Johnson et al., 2009) et 35% à 8 ans pour EPIPAGE 1 (Larroque et al., 2011). Le taux de patients suivis est donc aussi un des atouts de l'étude.

Le suivi à long terme des enfants ne met pas en évidence d'effet délétère lié à l'exposition anténatale au sulfate de magnésium, notamment sur le devenir cognitif, comportemental, scolaire et sensoriel. L'effet bénéfique du sulfate de magnésium sur les troubles moteurs, mis en évidence par les études randomisées, semble confirmé par le suivi à long terme. Il semble même exister un bénéfice sur les troubles du comportement, notamment l'hyperactivité, et la scolarité des enfants.

Par ailleurs, il faut noter que parmi les patients suivis, dans le groupe $MgSO_4$ le poids de naissance est significativement diminué et la proportion de patients de sexe masculin est significativement plus importante par rapport au groupe placebo. Ces facteurs sont connus pour être associés à un excès de déficits neurologiques et sont donc des facteurs de confusion. Les comparaisons des déficits neurologiques ont été ajustées notamment sur le poids de naissance, mais pas sur le sexe masculin. Ainsi, l'effet bénéfique du magnésium pourrait donc être sous-estimé dans cette étude. L'ajustement sur le sexe améliorerait peut-être la significativité de certains résultats.

Les résultats de cette étude confortent l'effet neuroprotecteur de l'injection anténatale de sulfate de magnésium en cas de menace d'accouchement prématuré, préalablement démontré par les essais randomisés et les méta-analyses. Le suivi à long terme de la cohorte Premag est un élément supplémentaire en faveur de l'utilisation en routine du sulfate de magnésium.

Comparaison avec le suivi à l'âge scolaire de l'essai ACTOMgSO$_4$

Lors de l'essai ACTOMgSO$_4$, 1062 femmes enceintes avait été initialement randomisées, soit 1235 fœtus. A l'âge scolaire, 334 enfants exposés au sulfate de magnésium et 335 enfants exposés au placebo ont pu être évalués (Doyle et al., 2014a). Aucun effet significatif du sulfate de magnésium n'a été mis en évidence sur le devenir neurologique, notamment les troubles cognitifs, les troubles du comportement ou les troubles moteurs. Comme pour le suivi à l'âge scolaire de Premag, le taux de perdus de vue reste élevé (23%) ce qui peut diminuer la puissance de l'essai. De manière similaire, la caféine administrée pour prévenir les apnées du nouveau-né prématuré les premières semaines de vie réduisait le taux de paralysie cérébrale et de retard de développement à 18 mois (Schmidt et al., 2012), mais cet effet n'était pas retrouvé à 5 ans (Schmidt et al., 2012 ; Doyle et al., 2014c). De façon générale, les facteurs sociaux et environnementaux influencent grandement le développement de l'enfant et peuvent contribuer à la difficulté de confirmer l'effet à long terme d'un traitement administré précocement. Il faut néanmoins rappeler que ni l'étude Premag, ni ACTOMgSO$_4$ n'avaient un effectif suffisant pour démontrer une différence significative à 2 ans sur la paralysie cérébrale. Seules les méta-analyses de l'ensemble des essais randomisés avaient mis en évidence un effet bénéfique du sulfate de magnésium sur la survie sans paralysie cérébrale. De plus, une diminution non significative de la mortalité a été observée à l'âge scolaire dans le groupe magnésium par rapport au groupe placebo (14% versus 18%, p=0,08). Une méta-analyse des deux suivis prolongés aurait pu permettre d'apporter des réponses supplémentaires, mais l'étude française s'appuyant sur des questionnaires parentaux et l'étude australienne et néo-zélandaise sur des observations directes, il ne paraît pas possible de combiner l'ensemble des données. Il faut également souligner l'absence d'effet délétère retrouvé à l'âge scolaire en cas d'exposition au sulfate de magnésium à la fois dans l'essai ACTOMgSO$_4$ et dans l'essai Premag.

I.4 *Utilisation du sulfate de magnésium en France et à l'étranger*

En 2011, seulement 2% (21/1020) des nouveau-nés prématurés avant 27 SA et inclus dans EPIPAGE 2 avaient bénéficié d'une adminsitration anténatale de sulfate de magnésium (Diguisto et al., 2017). Une enquête européenne récente réalisée dans 11 pays et 119 maternités a mis en évidence que l'utilisation de sulfate de magnésium à visée neuroprotectrice avant 32 SA ne concernait que 23% des centres interrogés (7% de manière systématique et 16% de manière occasionnelle) (Wolf et al., 2017). En 2015, nous avons mené une enquête d'utilisation du sulfate de magnésium à visée neuroprotectrice dans les maternités de niveau 3 en France (Chollat et al., *in press ;* Annexe 1). Soixante pour cent des maternités utilisaient le sulfate de magnésium à visée neuroprotectrice. Les protocoles utilisés étaient hétérogènes, notamment au niveau des termes limites d'utilisation (3% <28 SA, 71% <33 SA, 18% <34 SA et 8% < 35 SA). Quatre-vingt-sept pour cent des centres administraient une deuxième cure si besoin et 92% des maternités interrogées utilisaient un protocole avec une dose de charge de 4 grammes suivie d'une dose d'entretien de 1 gramme par heure pendant 12 heures au maximum. Cette enquête a eu lieu avant les nouvelles recommandations françaises de 2017. En effet, le Collège National des Gynécologues Obstétriciens Français recommande depuis mars 2017 l'administration de sulfate de magnésium en cas de menace d'accouchement prématuré avant 32 SA (Grade A) (Sentilhes et al., 2017). Nous pouvons penser que la publication de telles recommandations permettra une plus large utilisation du sulfate de magnésium dans les maternités françaises.

Avant la publication des recommandations françaises, des sociétés savantes nationales avaient recommandé à partir de 2010 l'utilisation du sulfate de magnésium à visée neuroprotectrice, notamment aux Etats-Unis, en Australie et en Nouvelle-Zélande, en Belgique, en Irlande, en Angleterre et au Canada (American College of Obstetricians and Gynecologists Committee on Obstetric Practice and Society for Maternal-Fetal Medicine, 2010 p.455 ; Antenatal Magnesium Sulphate for Neuroprotection Guideline Development Panel et al., 2010 ; Magee et al., 2011 ; Royal College of Physicians of Ireland, 2013 ; Belgian Health Care Knowledge Centre, 2014 ; American College of Obstetricians and Gynecologists and Society for Maternal-Fetal Medicine, 2015 ; National Collaborating Centre for Women's and Children's Health (UK), 2015). Les modalités d'administration varient selon les pays en

ce qui concerne le terme maximal d'utilisation (de 29+6 SA à 33+6 SA), la durée de la dose d'entretien (de 12 à 24 heures) et la possibilité d'une deuxième cure (seules les recommandations australiennes, néozélandaises et irlandaises évoquent la possibilité d'une cure supplémentaire). Enfin, les recommandations américaines ne précisent pas de modalité spécifique et laissent le prescripteur se référer aux essais publiés dans la littérature (Tableau 5).

	Date des recommandations	Terme maximum d'utilisation (SA)	Dose de charge (gramme)	Dose d'entretien	2ème cure
Australie et Nouvelle-Zélande	2010	29+6	4	1 gramme/ heure pendant 24 heures	Possible
Belgique	2014	31+6	4	1 gramme/ heure pendant 24 heures	Non précisé
Canada	2011	31+6	4	1 gramme/heure pendant 24 heures	Non précisé
France	2017	31+6	4	1 gramme/ heure pendant 12 heures	Non précisé
Irlande	2013	31+6	4	1 gramme/heure	Possible
Royaume-Uni	2015	29+6 voire 33+6	4	1 gramme/ heure pendant 12 heures	Non précisé
Etats-Unis	2010	Modalités d'administration en fonction des essais randomisés contrôlés			

Tableau 5 : Protocoles d'administration du sulfate de magnésium à visée neuroprotectrice selon les recommandations nationales

I.5 *Effet-dose du sulfate de magnésium sur le cerveau immature*

La dose optimale de sulfate de magnésium nécessaire pour obtenir un effet neuroprotecteur n'est pas encore clairement définie. S'il n'existe pas d'essai clinique comparant l'efficacité de différentes doses de sulfate de magnésium administré chez la parturiente, les recommandations internationales actuelles semblent s'accorder sur l'utilisation d'un protocole excluant l'administration de fortes doses. En général, les protocoles proposés chez l'Homme comprennent une dose de charge de 4 grammes de sulfate de magnésium suivie d'une dose d'entretien de 1 gramme par heure pendant 12 heures, soit 16 grammes au maximum. Des effets indésirables à type de vasculopathie lenticulostriée ont été décrits chez le nouveau-né en cas d'administration de fortes doses de sulfate de magnésium (environ 50 grammes de sulfate de magnésium en dose cumulée (Mittendorf et al., 2005, 2006 ; Jacquemyn et al., 2015)). Afin d'explorer l'effet-dose du sulfate de magnésium, nous avons évalué au laboratoire différentes posologies de

magnésium et leurs effets sur la neuroprotection et sur la vascularisation cérébrale du souriceau. L'effet du sulfate de magnésium sur l'hémodynamique cérébrale des fœtus humains a été également observé (Lecuyer et al., 2017 ; Annexe 2). Nous avons mis en évidence chez la Souris que le sulfate de magnésium exerçait un effet neuroprotecteur avec des faibles et des fortes doses. En revanche un effet dose-dépendant sur la vascularisation cérébrale a été démontré. A forte dose, le sulfate de magnésium semblait être responsable d'hypoperfusion cérébrale, d'altération de la viabilité endothéliale et de l'angiogenèse corticale. Les anomalies de la perfusion cérébrale observées chez la Souris nous ont incité à évaluer l'hémodynamique fœtale chez l'Homme au niveau cérébral, après l'injection de la dose de charge de 4 grammes de sulfate de magnésium, soit une faible dose. Ces travaux de recherche clinique ont été menés au CHU de Rouen. Le bolus de sulfate de magnésium ne modifiait pas les paramètres hémodynamiques au niveau de la circulation cérébrale du fœtus. Ce travail transversal semble conforter le choix de protocoles d'administration de faibles doses de sulfate de magnésium pour la neuroprotection du fœtus.

I.6 *Perspectives*

Si l'effet bénéfique du sulfate de magnésium administré en période anténatale sur le cerveau des nouveau-nés est démontré, certains aspects restent toutefois à préciser. La dose optimale de sulfate de magnésium à administrer, l'intérêt d'une dose de charge unique ou répétée, ou celui d'une dose d'entretien, la possibilité d'une deuxième cure, l'intervalle inter-cure, l'existence d'une fenêtre thérapeutique d'utilisation ou l'âge gestationnel limite d'injection ne sont pas encore bien définis. De même, l'efficacité du sulfate de magnésium en fonction de l'étiologie de la prématurité doit être précisée. Les résultats d'une méta-analyse des données individuelles des patients (*Individual Patient Data meta-analysis)* des cinq essais randomisés contrôlés existants, réalisée actuellement par le groupe AMICABLE, apporteront probablement des éléments de réponse (AMICABLE Group, 2012).

Par ailleurs, une étude exposés/non exposés au sulfate de magnésium dans la cohorte EPIPAGE 2 est en projet. Enfin une analyse de la morphologie cérébrale à l'âge du terme corrigé d'enfants prématurés a été réalisée sur un sous-échantillon d'enfants inclus dans l'étude EPIPAGE 2 (projet complémentaire EPIRMEX). Nous projetons de comparer les

imageries cérébrales d'enfants exposés en anténatal au magnésium à un groupe d'enfants non exposés.

II Effet neuroprotecteur du rémifentanil dans un modèle murin de lésion excitotoxique néonatale

L'impact des agents anesthésiques, notamment des morphiniques, sur le cerveau en développement est débattu et controversé depuis les années 2000 (Anand et al., 1999 ; Jevtovic-Todorovic et al., 2003). Chez le prématuré, l'exposition aux anesthésiques est fréquente : *i)* en période anténatale en cas d'anesthésie générale maternelle car les anesthésiques franchissent la barrière placentaire (Laudenbach et al., 2009 ; Heesen et Klimek, 2016), *ii)* en période post-natale lors de l'hospitalisation en réanimation néonatale ou en soins intensifs néonataux dans le cadre de la prise en charge de la douleur (Carbajal et al., 2015). Parmi les morphiniques disponibles, le rémifentanil semble être un bon candidat pour une utilisation néonatale, compte tenu de ses propriétés pharmacocinétiques (Penido et al., 2010 ; Kamata et Tobias, 2016). Son utilisation chez le nouveau-né prématuré ou à terme a été proposée pour la prise en charge de la douleur aigüe lors de gestes invasifs comme une intubation endotrachéale, l'administration de surfactant par méthode mini-invasive ou la pose de cathéter central (Lago et al., 2008 ; Welzing et al., 2009 ; Choong et al., 2010 ; Norman et al., 2011 ; Avino et al., 2014). Le rémifentanil peut également être utilisé en administration continue pendant des périodes plus prolongées, lors d'interventions chirurgicales (Galinkin et al., 2001) ou pour l'analgésie en cas de ventilation trachéale en réanimation néonatale (Welzing et al., 2012). L'impact de ce morphinique sur le cerveau immature n'avait pas encore été évalué jusqu'à nos premiers travaux en 2014. Nous avions démontré *ex vivo* que le rémifentanil exerçait une action anti-apoptotique sur le cerveau de souriceau à P2, impliquant la voie intrinsèque de l'apoptose. Cet effet semblait impliquer la sous-unité GluN2B du récepteur NMDA (Tourrel et al., 2014). Le potentiel effet neuroprotecteur du rémifentanil mis en évidence dans le modèle *ex vivo* nous a incité à évaluer *in vivo* l'impact du morphinique en contexte lésionnel. Les lésions cérébrales induites ont été obtenues par administration intracorticale d'iboténate, agoniste glutamatergique, à P2 chez le souriceau. Les lésions obtenues par ce modèle sont comparables aux potentielles lésions cérébrales de type leucomalacie périventriculaire du prématuré à 24 SA (Marret et al., 1995a, 1998 ; Volpe, 2009). Après une mise au point du modèle, nous avons évalué la production cérébrale des dérivés réactifs de l'oxygène (*reactive oxygen species*, ROS), la

mort cellulaire, l'astrogliose et la taille de la lésion induite par l'iboténate, après administration intrapéritonéale de rémifentanil ou de sérum physiologique. Des tests comportementaux ont également été réalisés jusqu'à P18.

II.1 *Quelle est la posologie de rémifentanil à administrer chez le souriceau ?*

Chez l'Homme, l'analgésie par rémifentanil est généralement obtenue par titration (bolus de 1 à 3 µg/kg par voie intraveineuse, répétés si besoin). En cas de nécessité d'analgésie prolongée, une dose d'entretien continue peut-être débutée (0,5 à 1 µg/kg/min) (Bürkle et al., 1996). Chez la Souris adulte, les protocoles de recherche utilisent des posologies variant de 40 à 80 µg/kg, par voie intraveineuse (Zongze et al., 2010 ; Seo et al., 2017). Compte tenu des particularités physiologiques du souriceau à P2 et de l'impossibilité technique de l'abord intraveineux à cet âge, la première partie du travail a consisté à définir une posologie de rémifentanil permettant une analgésie du souriceau comparable à celle obtenue chez l'Homme, en administrant le morphinique par voie intrapéritonéale. L'effet du morphinique a été évalué pour trois posologies différentes (50, 250 et 500 µg/kg) par un test de retournement. La dose de 500 µg/kg a été retenue car elle permettait une anesthésie plus efficace 10 minutes après la dernière injection, sans surmortalité, et avec un retour à un comportement normal à 30 minutes. L'effet sédatif ne différait pas selon le sexe (données non présentées). Le dosage plasmatique du rémifentanil évalué à 10 nmol/L dans notre étude a conforté ce choix car il correspondait aux taux plasmatiques mesurés chez l'Homme, en pédiatrie (10 à 100 nmol/L, (Ross et al., 2001)). La posologie utilisée dans notre étude peut sembler très élevée (environ 100 fois la posologie administrée chez l'Homme, 6 à 12 fois la posologie utilisée chez la Souris adulte). La voie d'administration, la différence de métabolisme entre le souriceau et la Souris adulte et entre la Souris et l'Homme peuvent expliquer la nécessité d'utiliser des doses élevées dans notre modèle. Par ailleurs, dans beaucoup d'expérimentations chez la Souris adulte, le rémifentanil est associé à une benzodiazépine ou un gaz halogéné, permettant un effet synergique des agents anesthésiques et entraînant une probable épargne morphinique. Enfin, il est habituel de devoir utiliser des doses supérieures d'anesthésiques chez l'Animal par rapport à l'Homme, comme pour la kétamine (10 fois la dose utilisée chez l'Homme, (Lecointre et al., 2015)) ou le midazolam (30 fois la dose utilisée chez l'Homme, (Young et al., 2005)).

II.2 *Impact du rémifentanil sur la survie du souriceau*

La mortalité des souriceaux dans nos travaux peut être expliquée d'une part par l'injection intracérébrale d'iboténate elle-même, pouvant entraîner des lésions hémorragiques intracrâniennes entraînant le décès, ou d'autre part par l'injection intrapéritonéale pouvant causer une hémorragie digestive potentiellement létale. L'administration de morphinique pourrait également théoriquement augmenter la mortalité par la survenue de troubles respiratoires (apnées, bradypnées), ou par un défaut d'alimentation des souriceaux causé par une sédation excessive. Enfin, la manipulation des animaux pourrait aussi entraver la relation du souriceau avec sa mère, entraînant au final la mort du rongeur nouveau-né (défaut d'allaitement par exemple). Dans notre étude, l'exposition au rémifentanil était associée à une survie significativement améliorée 5 heures après la lésion (81% pour le groupe contrôle *versus* 97% pour le groupe rémifentanil, p <0,01). Cet effet était présent chez les mâles (76% pour le groupe contrôle *versus* 100% pour le groupe rémifentanil, p<0,01), alors que chez les femelles l'effet n'était pas statistiquement significatif (85% pour le groupe contrôle *versus* 94% pour le groupe rémifentanil, p 0,43). Cinq jours après la lésion, la survie des groupes placebo et rémifentanil n'était pas significativement différente, même s'il existait une tendance vers une amélioration de la survie dans le groupe exposé au morphinique, particulièrement chez les mâles (83% pour le groupe contrôle *versus* 91% pour le groupe rémifentanil, p 0,3). L'exposition au rémifentanil semblait donc améliorer la survie des souriceaux 5 heures après la lésion, et n'entraînait pas de surmortalité 5 jours après. Les mâles présentaient une mortalité supérieure à celle des femelles dans le groupe placebo (5 heures après la lésion, la survie était de 76% pour les mâles *versus* 85% pour les femelles, et 5 jours après la lésion, la survie était de 83% pour les mâles *versus* 90% pour les femelles). La surmortalité liée au sexe masculin est également observée chez le prématuré humain (Kent et al., 2012 ; Peacock et al., 2012 ; Roy et al., 2014). L'effet du rémifentanil sur la survie pourrait s'expliquer en partie par son effet protecteur sur la taille de la lésion induite par l'iboténate. Une anesthésie précédant l'administration d'iboténate pourrait également améliorer le devenir du souriceau, notamment car lors de la procédure d'injection, l'animal est endormi et donc moins agité que le souriceau non sédaté. L'effet du rémifentanil sur la survie des souriceaux est

probablement d'origine multifactorielle et les mécanismes ne sont pas encore clairement établis.

II.3 *Effets du rémifentanil sur les paramètres cardio-respiratoires du souriceau : impacts potentiels sur le cerveau immature.*

Les bradypnées, les apnées, les bradycardies et les hypotensions artérielles sont des effets indésirables observés habituellement chez l'Homme après une administration de morphinique, notamment de rémifentanil (Chanavaz et al., 2005). Dans notre étude, la fréquence respiratoire, la fréquence cardiaque et les gaz du sang ont été monitorés lors de l'exposition au rémifentanil. Le monitorage de la saturation en oxygène et de la pression artérielle n'a pu être réalisé compte tenu des difficultés techniques rencontrées chez un souriceau à P2, pesant en moyenne 2 grammes. Dans le groupe rémifentanil, il a été observé une augmentation significative de la capnie, associée à une diminution non significative de la pression partielle en oxygène. Cette modification des paramètres ventilatoires est le reflet d'une hypoventilation alvéolaire consécutive à une diminution de la fréquence respiratoire induite par le morphinique. Chez le prématuré, l'hypoxémie prolongée est associée à un devenir neurologique altéré et à une surmortalité (Janvier et al., 2004 ; Poets et al., 2015 ; Askie et al., 2017). Quoique controversée (Omer et Molloy, 2017), l'hypercapnie « permissive » est incriminée dans la survenue de troubles neurologiques chez le prématuré (Fabres et al., 2007 ; Ambalavanan et al., 2015 ; Thome et al., 2015, 2017). Chez le rongeur immature, une hypercapnie (60-70 mm Hg) entraîne une mort cellulaire cérébrale associée à une dégénérescence vasculaire corticale (Das et al., 2009 ; Honoré et al., 2010). Dans un modèle d'hypoxo-ischémie chez le Rat, une hypercapnie modérée (55 mm Hg) n'entraînait pas de majoration des lésions cérébrales par rapport à une normocapnie (38 mm Hg). En revanche, une hypercapnie (100 mm Hg) ou une hypocapnie (26 mm Hg) sévères majoraient les lésions cérébrales (Vannucci et al., 1995, 2001). Dans notre modèle, l'impact de l'élévation de la capnie dans le groupe rémifentanil par rapport au groupe contrôle (45 *versus* 35 mm Hg, respectivement) paraît négligeable. Enfin, les souriceaux exposés au rémifentanil présentaient une fréquence cardiaque diminuée par rapport au groupe contrôle. Cette diminution peut être associée à une diminution de la pression artérielle comme décrite chez l'Homme (Chanavaz et al., 2005). Chez le prématuré, une hypotension

artérielle modérée isolée ne semble pas avoir d'impact sur le développement neurologique ultérieur (Dempsey et al., 2009 ; O'Shea et al., 2009 ; Barrington, 2011 ; Alderliesten et al., 2014). Au regard de la littérature, les effets ventilatoires et hémodynamiques du rémifentanil dans notre modèle pourraient être très peu délétères sur le cerveau immature.

II.4 *Impact du rémifentanil sur la mort cellulaire neuronale en cas de lésion induite par l'iboténate : effet neuroprotecteur ?*

Pour certains aspects, les lésions cérébrales induites par l'iboténate chez le souriceau sont comparables aux lésions observées chez le prématuré humain (Marret et al., 1995a ; Gressens et al., 1996). En effet, l'iboténate entraîne une série de modifications cellulaires et moléculaires semblables à celles associées aux lésions cérébrales liées aux phénomènes d'excitotoxicité périnatale. Un processus inflammatoire est observé au cours des premières heures suivant l'administration d'iboténate, marqué par une activation microgliale, une astrogliose réactionnelle, une production de ROS et de cytokines inflammatoires (Dommergues et al., 2000 ; Tahraoui et al., 2001 ; Kaindl et al., 2012). Il a également été démontré que l'administration intracérébrale d'agoniste glutamatergique entraîne une mort cellulaire neuronale par des mécanismes d'apoptose et de nécrose (Portera-Cailliau et al., 1997). Injecté à P2 chez la souris, l'iboténate induit une mort neuronale corticale associée à des lésions kystiques de la substance blanche périventriculaire (Marret et al., 1995a ; Gressens et al., 1996). Dans notre modèle, après une exposition au rémifentanil, la taille de la lésion induite par l'iboténate était significativement réduite à P7 (jusqu'à 67% de diminution, $p<0,001$). L'effet protecteur semblait plus prononcé chez les mâles ($p<0,01$), comparé à l'effet retrouvé chez les femelles ($p<0,05$). De manière similaire, une diminution significative de l'activité caspase-3 était observée 5 heures après l'injection d'iboténate en cas d'exposition préalable au rémifentanil. Vingt-quatre heures après la lésion induite par l'iboténate, le signal caspase-3 clivée observé par immunohistochimie ainsi que la fragmentation de l'ADN étaient diminués dans le groupe rémifentanil par rapport au groupe contrôle. Ces effets potentiellement bénéfiques du rémifentanil pourraient expliquer en partie la diminution significative de la taille de la lésion induite par l'iboténate observée à P7. Ces résultats obtenus *in vivo* sur la mort cellulaire sont en accord avec l'action anti-apoptotique observée *ex vivo* au cours de nos premiers travaux (Tourrel et al., 2014). L'effet

potentiellement neuroprotecteur du rémifentanil avait également été suggéré par des études sur le rongeur adulte dans des modèles d'ischémie cérébrale, ainsi qu'une action anti-apoptotique (Park et al., 2011 ; Jeong et al., 2012 ; Hu et al., 2013).

II.5 *Rôle du récepteur NMDA dans l'effet potentiellement neuroprotecteur du rémifentanil*

Les mécanismes à l'origine de l'effet anti-apoptotique voire neuroprotecteur du rémifentanil ne sont pas encore clairement établis. Il semble que le rémifentanil interagisse avec le récepteur NMDA, via une cascade de phosphorylation, comme le suggère le modèle d'hyperalgésie induite par les morphiniques (Simonnet et Rivat, 2003 ; Gu et al., 2009). Le récepteur NMDA joue un rôle central dans la transmission synaptique, la plasticité synaptique, l'apprentissage et la mémoire (Hardingham, 2009). Cependant, la suractivation du récepteur entraîne une mort cellulaire par différents mécanismes, dont la mise en route d'une cascade excitotoxique initiée par un influx calcique excessif (Lipton et Rosenberg, 1994 ; Arundine et Tymianski, 2004). Le blocage du récepteur est également à l'origine d'une mort cellulaire excessive, notamment par apoptose, ainsi que d'effets à long terme comme la survenue de troubles cognitifs (Dalmau et al., 2011 ; Sinner et al., 2015). La réponse des neurones au glutamate ou au NMDA semble ainsi suivre une courbe de Gauss (en forme de « cloche ») (Figure 34) : une activité trop importante ou trop réduite du récepteur peut être potentiellement délétère à la cellule, alors qu'une activité modérée pourrait être bénéfique à la vitalité cellulaire (Lipton et Nakanishi, 1999 ; Ikonomidou et Turski, 2002 ; Hardingham et Bading, 2003).

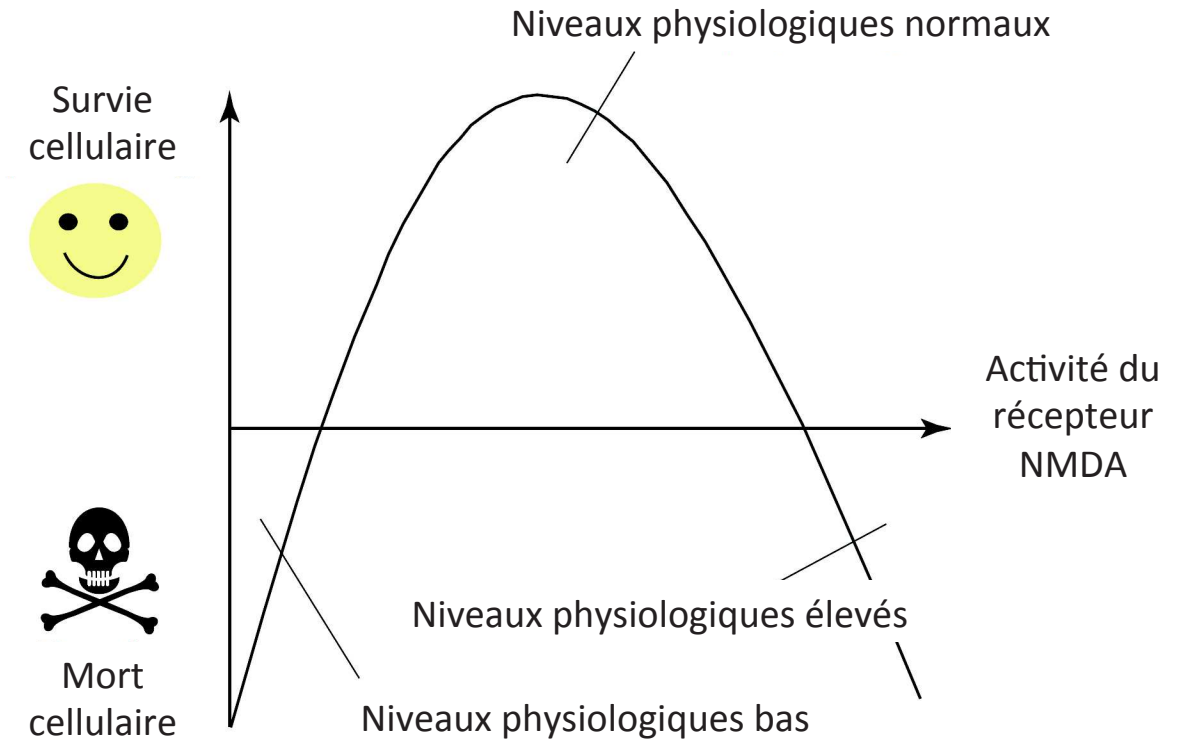


Figure 34 : Impact de l'activité du récepteur NMDA sur la survie cellulaire
Des taux physiologiques de NMDA sont nécessaires pour promouvoir la survie cellulaire. L'activation excessive (hyper ou hypo stimulation) entraîne une mort cellulaire par nécrose et/ou apoptose. D'après Hardingham et Bading, 2003.

L'activité physiologique du récepteur NMDA est donc nécessaire à la survie neuronale et la modulation de l'activité du récepteur pourrait ainsi jouer un rôle neuroprotecteur. L'action neuroprotectrice ou excitotoxique du récepteur semble être dépendante de l'intensité du signal, de la localisation du récepteur NMDA (synaptique ou extra-synaptique) ou de la composition du récepteur en sous-unités (Hardingham, 2009). L'action neuroprotectrice du rémifentanil en contexte d'excitotoxicité pourrait être en partie expliquée par une action modulatrice de l'activité du récepteur, favorisant la survie cellulaire. Par ailleurs, une même concentration de NMDA peut exercer un effet double sur le cortex immature de souriceau : à la fois excitotoxique sur les couches corticales profondes et anti-apoptotique sur les couches corticales superficielles (Desfeux et al., 2010). Enfin, le rémifentanil est associé à la glycine (3,6mM) comme excipient dans sa forme commerciale (Ultiva). Nous avions démontré *ex vivo* que la glycine et le rémifentanil seuls n'avait pas

d'effet propre sur la mort cellulaire, mais une fois associés, une diminution significative de l'activité caspase-3 était observée (Tourrel et al., 2014). En fonction de sa concentration, la glycine seule peut avoir des effets opposés : délétère en cas de doses faibles et neuroprotecteur en cas de doses élevées (Yao et al., 2012). Un agoniste partiel du site de liaison de la glycine au récepteur NMDA, GLYX-13, exerce également des propriétés neuroprotectrices en cas de lésions ischémiques cérébrales en modulant la composition du récepteur en sous-unités (diminution de l'expression de GluN2B et augmentation de l'expression de GluN2A) (Zheng et al., 2017). L'action synergique du rémifentanil et de la glycine sur le récepteur NMDA pourrait participer à l'effet neuroprotecteur observé au cours de nos travaux, mais les mécanismes potentiellement impliqués restent à préciser.

II.6 *Inflammation, rémifentanil et neuroprotection*

L'inflammation est impliquée dans la survenue de lésions cérébrales néonatales (Hagberg et al., 2015). En situation d'excitotoxicité, l'activation microgliale, l'infiltration leucocytaire et l'astrogliose réactionnelle participent à l'inflammation cérébrale et provoquent la libération de composés neurotoxiques comme des cytokines ou des radicaux libres (Marret et al., 1995a ; Hallenbeck, 1996 ; Tahraoui et al., 2001). L'injection intracorticale d'iboténate est connue pour induire une astrogliose modérée et diffuse, révélée par le marquage astrocytaire GFAP (Marret et al., 1995b). L'astrogliose réactionnelle est marquée par l'activation des astrocytes et la modification de leur phénotype morphologique et fonctionnel lors d'un épisode d'hypoxo-ischémie (Pekny et Nilsson, 2005). Au cours de ce processus, les astrocytes sécrètent des cytokines et des chémokines, participant ainsi à l'inflammation cérébrale (Dong et Benveniste, 2001). La microglie activée sécrète également des facteurs inflammatoires qui peuvent activer les astrocytes (notamment de type A1) et promouvoir la mort de neurones et d'oligodendrocytes (Liddelow et al., 2017). Au cours de nos travaux, l'immunomarquage GFAP chez les animaux lésés était diminué dans la région périventriculaire dans le groupe rémifentanil. De même, la quantification par *western blot* révélait une réduction de l'expression de la protéine GFAP au niveau du cortex de l'hémisphère lésé après exposition au morphinique, suggérant une diminution de l'astrogliose réactionnelle induite par l'iboténate. Par ailleurs, l'injection intracorticale d'iboténate provoquait une augmentation de la production de radicaux libres

au niveau de l'hémisphère lésé au bout de 10 minutes, et cette production se majorait 5 heures après l'injection. Il a été démontré que la production de radicaux libres amplifie les lésions cérébrales induites par l'iboténate (Dommergues et al., 1998 ; Marret et al., 1999). Lors d'une exposition au rémifentanil, la production de ROS était atténuée à 10 minutes et devenait comparable à celle de cerveaux non lésés 5 heures après l'administration d'iboténate. Au total, en condition d'excitotoxicité induite par l'iboténate, nous avons donc mis en évidence une diminution de la production cérébrale de ROS et de l'astrogliose réactionnelle après exposition au rémifentanil, suggérant ainsi une modulation de la neuroinflammation par le morphinique. Cet effet sur l'inflammation a déjà été observé chez l'Animal adulte. En effet, chez le rongeur adulte en condition septique, le rémifentanil exerce une action anti-inflammatoire traduite notamment par une diminution de l'expression des interleukines 6 et 10 (Zongze et al., 2010), du TNFα, de NF-κB ainsi que de HMGB1 (*High Mobility Group Box 1*), médiateur central dans la progression du sepsis (Seo et al., 2017). De la même manière chez le Rat adulte en condition de stress induit par une chirurgie, l'exposition au rémifentanil entraîne une diminution du TNFα et de l'interleukine 6 (Hasegawa et al., 2011). Enfin chez l'Homme, l'administration de rémifentanil atténue l'activation des polynucléaires neutrophiles, ainsi que la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme le TNFα et les interleukines 6 et 8 (Hofbauer et al., 2000 ; Hyejin et al., 2013). Le rémifentanil semble donc exercer une action anti-inflammatoire qui pourrait participer à la protection du cerveau immature. Des travaux préliminaires ont été initiés au laboratoire afin d'évaluer le profil des cytokines pro-inflammatoires après administration d'iboténate en condition rémifentanil et placebo. Les expérimentations doivent être poursuivies afin de préciser l'effet du rémifentanil sur l'inflammation dans notre modèle.

II.7 *L'analgésie induite par le rémifentanil participe-t-elle à la protection du cerveau immature ?*

L'analgésie induite par l'injection de rémifentanil pourrait avoir un impact propre bénéfique sur la vitalité neuronale des souriceaux. Dans notre modèle, seuls les animaux exposés au rémifentanil ont bénéficié d'une analgésie avant l'injection intracorticale d'iboténate. L'administration d'iboténate est un geste invasif, considéré comme douloureux. La douleur ressentie par les souriceaux est donc plus importante dans le groupe placebo, ce

qui pourrait être à l'origine d'une aggravation des lésions induites par l'iboténate. En effet, l'exposition précoce à des stimuli douloureux ou stressants chez le rongeur induit des modifications neurobiologiques et comportementales à long terme (Ranger et Grunau, 2014). Peu d'études évaluent l'effet d'une douleur néonatale sur le cerveau en développement à court terme. Cependant, il a tout de même été démontré que la stimulation douloureuse générée par une douleur inflammatoire chez le raton accentue l'excitation neuronale et augmente la mort cellulaire dans certaines régions corticales et sous-corticales, suggérant que la douleur pourrait avoir un effet délétère sur le cerveau immature (Anand et al., 2007 ; Dührsen et al., 2013). De manière similaire, une douleur inflammatoire chronique ou des stimulations douloureuses répétées peuvent engendrer une apoptose neuronale et altérer l'expression de protéines nécessaires au développement du cerveau du souriceau (Dührsen et al., 2013). Ainsi dans notre modèle, l'effet analgésique propre du rémifentanil pourrait potentiellement protéger de l'effet délétère de la douleur sur le cerveau immature. Afin de discriminer l'impact du rémifentanil de son effet antalgique, il faudrait comparer l'action du morphinique sur le cerveau immature avec d'autres analgésiques, dans un modèle animal de douleur néonatale.

II.8 *L'exposition néonatale au rémifentanil a-t-elle un impact sur le comportement du souriceau à court et à long terme ?*

Afin de déterminer si l'effet neuroprotecteur du rémifentanil observé se traduisait par un effet fonctionnel sur l'animal, des tests comportementaux ont été réalisés entre P2 et P18. Le test de géotaxie négative (ou test de réaction antigravitaire) a pour but d'évaluer la réaction motrice mise en œuvre par le souriceau en réponse à une position inhabituelle dans l'espace. Un bon niveau de coordination des pattes antérieures est nécessaire pour réussir ce test. L'animal est placé sur un plan incliné de 20° par rapport à l'horizontale, la tête dirigée vers le bas. Le test est terminé lorsque l'animal a effectué une rotation de 180° lui permettant d'avoir la tête dirigée vers le haut de la planche. Ce test est réalisé entre P6 et P8 et évalue notamment la coordination, l'équilibre et le système vestibulaire (Fox, 1965 ; Altman et Sudarshan, 1975). Dans notre étude, les souris lésées et exposées au rémifentanil se retournaient plus rapidement que celles exposées au placebo, et leurs performances étaient similaires à celles des souris non lésées. Pour le test de suspension, les pattes avant

de l'animal sont placées sur un fil de nylon suspendu 15 cm au-dessus d'une surface souple, provoquant un réflexe d'agrippement (*grasping reflex*). Le test est terminé lorsque l'animal lâche le fil et chute. Le test a été réalisé entre P10 et P12 et permet d'évaluer l'activité motrice, la force musculaire et la résistance physique des animaux (Fox, 1965 ; Altman et Sudarshan, 1975). Au cours de nos travaux, les souris lésées mâles exposées au rémifentanil présentaient une durée d'agrippement similaire aux souris non lésées, et supérieure aux souris mâles exposées au placebo. Chez les femelles, les durées d'agrippement étaient faibles jusqu'à P11. Cette observation pourrait être expliquée par une masse musculaire plus faible chez les femelles. A P12, les femelles lésées exposées au morphinique présentaient des durées d'agrippement supérieures aux femelles lésées exposées au placebo, mais la différence n'était pas significative. Compte tenu d'un temps d'agrippement plus faible chez les femelles, l'effet protecteur du rémifentanil est plus difficile à démontrer. Dans l'ensemble, ces tests ont mis en évidence de meilleures performances sensori-motrices chez les animaux ayant reçu du rémifentanil avant l'administration d'iboténate, chez les mâles et les femelles pour la géotaxie négative, et particulièrement chez les mâles pour l'agrippement. L'exposition au rémifentanil semble améliorer le comportement sensori-moteur des animaux 4 à 10 jours après la lésion et permet d'obtenir des performances comparables à celles d'animaux non lésés. Ces résultats sont à confronter à la diminution de la taille de la lésion induite par l'iboténate observée en cas d'exposition préalable au rémifentanil. En effet, la diminution des performances sensori-motrices des rongeurs peut être en rapport avec une hypomyélinisation de la substance blanche sous-corticale (Wu et al., 2008). Ainsi, en réduisant la taille de la lésion excitotoxique et en préservant de la sorte l'intégrité de la substance blanche et de la structure corticale, le rémifentanil pourrait protéger en partie les afférences motrices et les centres intégrateurs des informations proprioceptives provenant de la périphérie (muscles, articulations), permettant le déclenchement du réflexe de retournement. Les neurones thalamo-corticaux qui intègrent notamment les informations provenant du système vestibulaire pourraient de manière similaire être épargnés, autorisant la perception de la rotation et de l'orientation vers le haut de la surface inclinée. La préservation des capacités sensori-motrices, notamment de la géotaxie négative, avait également été démontrée chez la souris lésée (modèle Rice-

Vannucci) bénéficiant d'hypothermie thérapeutique, outil dont l'efficacité neuroprotectrice a été démontrée chez l'Homme (Diaz et al., 2017).

Les compétences sensori-motrices des souriceaux ont été évaluées quelques jours avant le sevrage (P18) par le test d'*open field*. Ce dispositif consiste en une enceinte circulaire de 40 cm de diamètre avec des parois de 30 cm de hauteur. Le souriceau est placé initialement au centre de l'espace puis est laissé libre d'explorer son environnement. Ce test permet l'évaluation du niveau d'activité locomotrice et exploratoire de l'animal placé dans une situation nouvelle. La thigmotaxie ou tendance à longer les parois est observée dans la plupart des espèces de rongeur et s'apparente à de l'anxiété (Treit et Fundytus, 1988). Ce comportement est probablement lié à l'instinct du rongeur d'éviter de grands espaces ouverts, non protégés, susceptibles de le mettre en danger (Seibenhener et Wooten, 2015). Dans notre étude, la distance totale parcourue dans l'enceinte du dispositif était comparable chez les souriceaux lésés traités par le rémifentanil ou par le placebo. Cette absence de différence entre les deux groupes pourrait être expliquée par la plasticité cérébrale considérable du rongeur, particulièrement pendant la période de synaptogenèse des trois premières semaines de vie (Jenkins et Merzenich, 1987). En revanche, la durée passée au centre du dispositif était plus longue chez les femelles lésées exposées au rémifentanil par rapport à celles exposées au placebo, suggérant que les femelles traitées par le morphinique présentaient un comportement anxieux diminué. Chez les mâles, cet effet n'était observé qu'au cours des deux premières minutes de l'expérience. Cette différence de comportement entre les femelles et les mâles avait été observée chez des souris adultes exposées à de la morphine. Les mâles étaient plus sujets à des comportements anxieux que les femelles, suggérant une sensibilité différente aux morphiniques selon le sexe (Zhan et al., 2015). Cet effet anxiolytique associé aux morphiniques avait également été observé chez le Rat adulte, exposé en période néonatale à de la morphine, en condition de douleur aigue ou chronique au cours des premiers jours de vie (Parent et al., 2012 ; Victoria et al., 2015). Parmi les hypothèses mécanistiques, il semble que les récepteurs aux opiacés (Lutz et Kieffer, 2013), ou encore la voie de signalisation Wnt/β-caténine (Wang et al., 2017) pourraient être impliqués dans l'effet anxiolytique attribué aux morphiniques. Enfin, si le rémifentanil provoque un effet anxiolytique, il est également possible que, comme décrite chez l'Homme (Vinall et al., 2013b), l'expérience d'un acte douloureux en période néonatale chez le

rongeur en contexte lésionnel provoque une majoration de l'état anxieux à long terme. Ainsi l'analgésie provoquée par le rémifentanil avant l'injection intracorticale d'iboténate préviendrait la survenue d'un état anxieux par une diminution du ressenti douloureux en période néonatale.

Enfin, l'impact du rémifentanil a été évalué chez des animaux non lésés. Il n'a pas été mis en évidence de différence de poids entre les groupes rémifentanil et sérum physiologique. Les performances aux tests de géotaxie négative, d'agrippement et d'*open field* étaient comparables en cas d'exposition au rémifentanil ou au placebo, quel que soit le sexe. L'effet anxiolytique n'est donc présent qu'en contexte lésionnel (et douloureux) dans notre étude. L'action du rémifentanil sur la prévention des troubles anxieux pourrait s'expliquer d'une part par l'effet neuroprotecteur observé et/ou d'autre part par l'effet antalgique du morphinique. L'évaluation du comportement des souris à l'âge adulte après un épisode de douleur néonatale autre que l'injection intracorticale d'iboténate, en présence ou non de rémifentanil, pourrait permettre d'identifier le rôle de l'analgésie dans la survenue de comportements anxieux.

II.9 *Utilisation périnatale du rémifentanil : exemple de la césarienne sous anesthésie générale et de l'intubation endotrachéale du nouveau-né*

L'ensemble de nos travaux précliniques chez la Souris est rassurant quant à l'effet du rémifentanil sur le cerveau immature. Chez l'Homme, l'effort de recherche clinique doit être maintenu pour favoriser son utilisation.

II.9.1 Utilisation du rémifentanil en cas de césarienne en urgence : étude REAGI

Une des problématiques de l'anesthésie générale pour une césarienne est la place des agents opioïdes au cours de la procédure. Si l'administration de morphinique dès l'induction est bénéfique pour la mère, l'impact potentiel sur le nouveau-né peut être néfaste, notamment en termes de détresse respiratoire. Afin d'évaluer l'effet du rémifentanil administré chez la mère sur l'état du nouveau-né à la naissance, l'étude REAGI (étude prospective, randomisée, monocentrique, en double aveugle) a été menée au CHU de Rouen (numéro EudraCT 2013-001850-83). Les femmes nécessitant une anesthésie générale pour une césarienne en urgence avant 37 SA étaient incluses et randomisées en deux

groupes : anesthésie par rémifentanil/thiopental/succinylcholine ou placebo/thiopental/succinylcholine. L'objectif principal était de comparer l'état clinique de l'enfant à la naissance après exposition anténatale au rémifentanil ou à un placebo. Un des objectifs secondaires était le devenir neurologique à 2 ans des enfants. Cinquante-deux femmes ont été incluses entre février 2014 et août 2016. Le suivi à 2 ans sera donc terminé en août 2018. Les résultats de cette étude nous informeront sur l'état du nouveau-né prématuré à la naissance après exposition anténatale au rémifentanil ainsi que sur l'impact d'une telle exposition sur le devenir neurologique à 2 ans.

II.9.2 Mise au point d'un protocole de sédation du nouveau-né par du rémifentanil en cas d'intubation endotrachéale

Si l'utilisation du rémifentanil en anesthésie obstétricale a tendance à progresser, l'utilisation du rémifentanil chez le nouveau-né prématuré ou à terme reste confidentielle, notamment en France. Le rémifentanil est pourtant un morphinique à considérer en cas de nécessité d'analgésie chez le nouveau-né, notamment en raison de ses propriétés pharmacocinétiques (demi-vie plasmatique courte, effet « *on-off* », métabolisme indépendant des fonctions hépatique et rénale (Glass, 1995 ; Glass et al., 1999)). Comme souvent, le rémifentanil a tout d'abord été utilisé chez l'adulte et le grand enfant. Son utilisation en néonatologie est relativement récente, ce qui peut expliquer une partie des réticences. Par ailleurs, la crainte de la survenue d'une rigidité thoracique associée aux morphiniques est particulièrement importante avec le rémifentanil. Récemment, de Kort et al. concluaient à une dangerosité et une inefficacité du rémifentanil chez le prématuré en cas de sédation pour une procédure INSURE (de Kort et al., 2017). Comme nous l'avons souligné dans une lettre à l'éditeur en réponse à cet article (Chollat et al., 2017 ; Annexe 3), à la fois le protocole d'administration et la posologie utilisés nous semblaient inadéquats et pourvoyeurs d'effets indésirables. Comme avec les autres morphiniques, l'administration en continu avec une posologie minimale efficace devraient être privilégiées afin de réduire le risque d'évènements indésirables comme la rigidité thoracique. Afin d'optimiser l'utilisation du rémifentanil en néonatologie, un protocole de recherche a été initié à l'Hôpital Port-Royal en réanimation néonatale pour la sédation des nouveau-nés (prématurés ou à terme) en cas d'intubation endotrachéale. Il s'agit d'une étude pilote, observationnelle, visant à s'assurer

de l'efficacité et de la sécurité du rémifentanil en cas d'intubation endotrachéale. Les inclusions sont en cours.

L'effort de recherche clinique sur l'évaluation du rémifentanil chez le nouveau-né doit être maintenu. Son utilisation pour une analgésie de courte durée, notamment pour la sédation en cas d'administration de surfactant par méthode mini-invasive, est séduisante mais doit encore être évaluée par des essais cliniques randomisés de plus grande ampleur.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

ACOG Committee on Obstetric Practice (2011) ACOG Committee Opinion No. 474: nonobstetric surgery during pregnancy. Obstet Gynecol 117:420–421.

Adams SM, de Rivero Vaccari JC, Corriveau RA (2004) Pronounced cell death in the absence of NMDA receptors in the developing somatosensory thalamus. J Neurosci 24:9441–9450.

Ahmadi S, Golbaghi H, Azizbeigi R, Esmailzadeh N (2014) N-methyl-D-aspartate receptors involved in morphine-induced hyperalgesia in sensitized mice. Eur J Pharmacol 737:85–90.

Akazawa C, Shigemoto R, Bessho Y, Nakanishi S, Mizuno N (1994) Differential expression of five N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNAs in the cerebellum of developing and adult rats. J Comp Neurol 347:150–160.

Alderliesten T, Lemmers PMA, van Haastert IC, de Vries LS, Bonestroo HJC, Baerts W, van Bel F (2014) Hypotension in preterm neonates: low blood pressure alone does not affect neurodevelopmental outcome. J Pediatr 164:986–991.

Aligny C, Roux C, Dourmap N, Ramdani Y, Do-Rego J-C, Jégou S, Leroux P, Leroux-Nicollet I, Marret S, Gonzalez BJ (2014) Ketamine alters cortical integration of GABAergic interneurons and induces long-term sex-dependent impairments in transgenic Gad67-GFP mice. Cell Death Dis 5:e1311.

Allbutt C (1880) On the abuse of hypodermic injections of morphia. Available at: http://publikationen.ub.uni-frankfurt.de/frontdoor/index/index/docId/9551 [Accessed May 30, 2017].

Allen NJ (2013) Role of glia in developmental synapse formation. Curr Opin Neurobiol 23:1027–1033.

Althabe F, Howson CP, Kinney M, Lawn J, World Health Organization (2012) Born too soon: the global action report on preterm birth. Available at: http://www.who.int/pmnch/media/news/2012/201204_borntoosoon-report.pdf [Accessed February 9, 2017].

Altman D, Carroli G, Duley L, Farrell B, Moodley J, Neilson J, Smith D (2002) Do women with pre-eclampsia, and their babies, benefit from magnesium sulphate? The Magpie Trial: a randomised placebo-controlled trial. Lancet 359:1877–1890.

Altman J, Sudarshan K (1975) Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. Anim Behav 23:896–920.

Ambalavanan N, Carlo WA, Wrage LA, Das A, Laughon M, Cotten CM, Kennedy KA, Laptook AR, Shankaran S, Walsh MC, Higgins RD, SUPPORT Study Group of the NICHD Neonatal Research Network (2015) PaCO2 in surfactant, positive pressure, and oxygenation randomised trial (SUPPORT). Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed 100:F145-149.

American College of Obstetricians and Gynecologists Committee on Obstetric Practice, Society for Maternal-Fetal Medicine (2010) Committee Opinion No. 455: Magnesium sulfate before anticipated preterm birth for neuroprotection. Obstet Gynecol 115:669–671.

American College of Obstetricians and Gynecologists, Society for Maternal-Fetal Medicine (2015) ACOG Obstetric Care Consensus No. 3: Periviable Birth. Obstet Gynecol 126:e82-94.

AMICABLE Group (2012) Antenatal magnesium individual participant data international collaboration: assessing the benefits for babies using the best level of evidence (AMICABLE). Syst Rev 1:21.

Amiel-Tison C (1997) L'Infirmité motrice d'origine cérébrale. Paris; Milan; Barcelone: Masson.

Anand KJ, Barton BA, McIntosh N, Lagercrantz H, Pelausa E, Young TE, Vasa R (1999) Analgesia and sedation in preterm neonates who require ventilatory support: results from the NOPAIN trial. Neonatal Outcome and Prolonged Analgesia in Neonates. Arch Pediatr Adolesc Med 153:331–338.

Anand KJ, Hickey PR (1987) Pain and its effects in the human neonate and fetus. N Engl J Med 317:1321–1329.

Anand KJ, Scalzo FM (2000) Can adverse neonatal experiences alter brain development and subsequent behavior? Biol Neonate 77:69–82.

Anand KJ, Sippell WG, Aynsley-Green A (1987a) Pain, anaesthesia, and babies. Lancet 2:1210.

Anand KJ, Sippell WG, Aynsley-Green A (1987b) Randomised trial of fentanyl anaesthesia in preterm babies undergoing surgery: effects on the stress response. Lancet 1:243–248.

Anand KJS, Garg S, Rovnaghi CR, Narsinghani U, Bhutta AT, Hall RW (2007) Ketamine reduces the cell death following inflammatory pain in newborn rat brain. Pediatr Res 62:283–290.

Anand KJS, Hall RW (2006) Morphine, hypotension, and intraventricular hemorrhage. Pediatrics 117:250-252; author reply 252-253.

Anand KJS, Hall RW, Desai N, Shephard B, Bergqvist LL, Young TE, Boyle EM, Carbajal R, Bhutani VK, Moore MB, Kronsberg SS, Barton BA, NEOPAIN Trial Investigators Group (2004) Effects of morphine analgesia in ventilated preterm neonates: primary outcomes from the NEOPAIN randomised trial.

Lancet 363:1673–1682.

Anand KJS, Willson DF, Berger J, Harrison R, Meert KL, Zimmerman J, Carcillo J, Newth CJL, Prodhan P, Dean JM, Nicholson C, Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development Collaborative Pediatric Critical Care Research Network (2010) Tolerance and withdrawal from prolonged opioid use in critically ill children. Pediatrics 125:e1208-1225.

Ancel P-Y et al. (2015) Survival and morbidity of preterm children born at 22 through 34 weeks' gestation in France in 2011: results of the EPIPAGE-2 cohort study. JAMA Pediatr 169:230–238.

Ancel P-Y, Goffinet F, EPIPAGE 2 Writing Group (2014) EPIPAGE 2: a preterm birth cohort in France in 2011. BMC Pediatr 14:97.

Ancel P-Y, Livinec F, Larroque B, Marret S, Arnaud C, Pierrat V, Dehan M, N'Guyen S, Escande B, Burguet A, Thiriez G, Picaud J-C, André M, Bréart G, Kaminski M, EPIPAGE Study Group (2006) Cerebral palsy among very preterm children in relation to gestational age and neonatal ultrasound abnormalities: the EPIPAGE cohort study. Pediatrics 117:828–835.

Anderson CM, Torres F, Faoro A (1985) The EEG of the early premature. Electroencephalogr Clin Neurophysiol 60:95–105.

Anderson EM, Reeves T, Kapernaros K, Neubert JK, Caudle RM (2015) Phosphorylation of the N-methyl-d-aspartate receptor is increased in the nucleus accumbens during both acute and extended morphine withdrawal. J Pharmacol Exp Ther 355:496–505.

Andropoulos DB, Ahmad HB, Haq T, Brady K, Stayer SA, Meador MR, Hunter JV, Rivera C, Voigt RG, Turcich M, He CQ, Shekerdemian LS, Dickerson HA, Fraser CD, Dean McKenzie E, Heinle JS, Blaine Easley R (2014) The association between brain injury, perioperative anesthetic exposure, and 12-month neurodevelopmental outcomes after neonatal cardiac surgery: a retrospective cohort study. Paediatr Anaesth 24:266–274.

Angevine JB, Sidman RL (1961) Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse. Nature 192:766–768.

Anggono V, Huganir RL (2012) Regulation of AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. Curr Opin Neurobiol 22:461–469.

Anon (2017) Committee Opinion No. 696: Nonobstetric Surgery During Pregnancy. Obstet Gynecol 129:777–778.

Anson LC, Chen PE, Wyllie DJ, Colquhoun D, Schoepfer R (1998) Identification of amino acid residues

of the NR2A subunit that control glutamate potency in recombinant NR1/NR2A NMDA receptors. J Neurosci 18:581–589.

Antal M, Fukazawa Y, Eördögh M, Muszil D, Molnár E, Itakura M, Takahashi M, Shigemoto R (2008) Numbers, densities, and colocalization of AMPA- and NMDA-type glutamate receptors at individual synapses in the superficial spinal dorsal horn of rats. J Neurosci 28:9692–9701.

Antenatal Magnesium Sulphate for Neuroprotection Guideline Development Panel, Australian Research Centre for Health of Women and Babies, National Health and Medical Research Council (Australia) (2010) Antenatal magnesium sulphate prior to preterm birth for neuroprotection of the fetus, infant, and child 2010: national clinical practice guidelines. Adelaide: Australian Research Centre for Health of Women and Babies, the University of Adelaide. Available at: http://www.nhmrc.gov.au/_files_nhmrc/file/publications/synopses/cp128_mag_sulphate_child.pdf [Accessed May 26, 2017].

Armstrong N, Gouaux E (2000) Mechanisms for activation and antagonism of an AMPA-sensitive glutamate receptor: crystal structures of the GluR2 ligand binding core. Neuron 28:165–181.

Arnaud C, Daubisse-Marliac L, White-Koning M, Pierrat V, Larroque B, Grandjean H, Alberge C, Marret S, Burguet A, Ancel P-Y, Supernant K, Kaminski M (2007) Prevalence and associated factors of minor neuromotor dysfunctions at age 5 years in prematurely born children: the EPIPAGE Study. Arch Pediatr Adolesc Med 161:1053–1061.

Arundine M, Tymianski M (2004) Molecular mechanisms of glutamate-dependent neurodegeneration in ischemia and traumatic brain injury. Cell Mol Life Sci 61:657–668.

Askie LM, Darlow BA, Davis PG, Finer N, Stenson B, Vento M, Whyte R (2017) Effects of targeting lower versus higher arterial oxygen saturations on death or disability in preterm infants. Cochrane Database Syst Rev 4:CD011190.

Attwell D, Gibb A (2005) Neuroenergetics and the kinetic design of excitatory synapses. Nat Rev Neurosci 6:841–849.

Avino D, Zhang W-H, De Villé A, Johansson A-B (2014) Remifentanil versus morphine-midazolam premedication on the quality of endotracheal intubation in neonates: a noninferiority randomized trial. J Pediatr 164:1032–1037.

Ayuk J, Gittoes NJL (2014) Contemporary view of the clinical relevance of magnesium homeostasis. Ann Clin Biochem 51:179–188.

B

Back SA (2006) Perinatal white matter injury: the changing spectrum of pathology and emerging insights into pathogenetic mechanisms. Ment Retard Dev Disabil Res Rev 12:129–140.

Back SA (2014) Cerebral white and gray matter injury in newborns: new insights into pathophysiology and management. Clin Perinatol 41:1–24.

Back SA, Miller SP (2014) Brain injury in premature neonates: A primary cerebral dysmaturation disorder? Ann Neurol 75:469–486.

Back SA, Tuohy TMF, Chen H, Wallingford N, Craig A, Struve J, Luo NL, Banine F, Liu Y, Chang A, Trapp BD, Bebo BF, Rao MS, Sherman LS (2005) Hyaluronan accumulates in demyelinated lesions and inhibits oligodendrocyte progenitor maturation. Nat Med 11:966–972.

Backeljauw B, Holland SK, Altaye M, Loepke AW (2015) Cognition and Brain Structure Following Early Childhood Surgery With Anesthesia. Pediatrics 136:e1-12.

Backes CH, Rivera BK, Haque U, Bridge JA, Smith CV, Hutchon DJR, Mercer JS (2014) Placental transfusion strategies in very preterm neonates: a systematic review and meta-analysis. Obstet Gynecol 124:47–56.

Backman ME, Kopf AW (1986) Iatrogenic effects of general anesthesia in children: considerations in treating large congenital nevocytic nevi. J Dermatol Surg Oncol 12:363–367.

Badawi N, Kurinczuk JJ, Keogh JM, Alessandri LM, O'Sullivan F, Burton PR, Pemberton PJ, Stanley FJ (1998) Antepartum risk factors for newborn encephalopathy: the Western Australian case-control study. BMJ 317:1549–1553.

Badiee Z, Vakiliamini M, Mohammadizadeh M (2013) Remifentanil for endotracheal intubation in premature infants: A randomized controlled trial. J Res Pharm Pract 2:75–82.

Bagasrawala I, Memi F, V Radonjić N, Zecevic N (2016) N-Methyl d-Aspartate Receptor Expression Patterns in the Human Fetal Cerebral Cortex. Cereb Cortex.

Bahn S, Volk B, Wisden W (1994) Kainate receptor gene expression in the developing rat brain. J Neurosci 14:5525–5547.

Bajic D, Commons KG, Soriano SG (2013) Morphine-enhanced apoptosis in selective brain regions of neonatal rats. Int J Dev Neurosci 31:258–266.

Bakhouche H, Noskova P, Svetlik S, Bartosova O, Ulrichova J, Kubatova J, Marusicova P, Parizek A,

Blaha J, Slanar O (2015) Maternal and neonatal effects of remifentanil in women undergoing cesarean section in relation to ABCB1 and OPRM1 polymorphisms. Physiol Res 64 Suppl 4:S529-538.

Balazs R (2006) Trophic effect of glutamate. Curr Top Med Chem 6:961–968.

Ball G, Boardman JP, Rueckert D, Aljabar P, Arichi T, Merchant N, Gousias IS, Edwards AD, Counsell SJ (2012) The effect of preterm birth on thalamic and cortical development. Cereb Cortex 22:1016–1024.

Ball G, Srinivasan L, Aljabar P, Counsell SJ, Durighel G, Hajnal JV, Rutherford MA, Edwards AD (2013) Development of cortical microstructure in the preterm human brain. Proc Natl Acad Sci USA 110:9541–9546.

Ballabh P (2014) Pathogenesis and prevention of intraventricular hemorrhage. Clin Perinatol 41:47–67.

Bard L, Groc L (2011) Glutamate receptor dynamics and protein interaction: lessons from the NMDA receptor. Mol Cell Neurosci 48:298–307.

Barres BA (2008) The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. Neuron 60:430–440.

Barrington KJ (2011) Low blood pressure in extremely preterm infants: does treatment affect outcome? Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed 96:F316-317.

Bartels M, Althoff RR, Boomsma DI (2009) Anesthesia and cognitive performance in children: no evidence for a causal relationship. Twin Res Hum Genet 12:246–253.

Bax M, Goldstein M, Rosenbaum P, Leviton A, Paneth N, Dan B, Jacobsson B, Damiano D, Executive Committee for the Definition of Cerebral Palsy (2005) Proposed definition and classification of cerebral palsy, April 2005. Dev Med Child Neurol 47:571–576.

Bax M, Tydeman C, Flodmark O (2006) Clinical and MRI correlates of cerebral palsy: the European Cerebral Palsy Study. JAMA 296:1602–1608.

Bax MC (1964) TERMINOLOGY AND CLASSIFICATION OF CEREBRAL PALSY. Dev Med Child Neurol 6:295–297.

Bayatti N, Moss JA, Sun L, Ambrose P, Ward JFH, Lindsay S, Clowry GJ (2008) A molecular neuroanatomical study of the developing human neocortex from 8 to 17 postconceptional weeks revealing the early differentiation of the subplate and subventricular zone. Cereb Cortex 18:1536–1548.

Beaino G, Khoshnood B, Kaminski M, Pierrat V, Marret S, Matis J, Ledésert B, Thiriez G, Fresson J, Rozé J-C, Zupan-Simunek V, Arnaud C, Burguet A, Larroque B, Bréart G, Ancel P-Y (2010) Predictors of cerebral palsy in very preterm infants: the EPIPAGE prospective population-based cohort study. Dev Med Child Neurol 52:e119-125.

Behar TN, Scott CA, Greene CL, Wen X, Smith SV, Maric D, Liu QY, Colton CA, Barker JL (1999) Glutamate acting at NMDA receptors stimulates embryonic cortical neuronal migration. J Neurosci 19:4449–4461.

Behdad S, Ayatollahi V, Harrazi H, Nazemian N, Heiranizadeh N, Baghianimoghadam B (2013) Remifentanil at induction of general anesthesia for cesarean section: Double blind,randomized clinical trial. Colomb Med 44:87–91.

Belgian Health Care Knowledge Centre (2014) Prevention of preterm birth in women at risk: selected topics. Available at: https://kce.fgov.be/sites/default/files/page_documents/KCE_228Cs_Preterm%20birth_Synthesis.pdf.

Ben Khalifa S, Blidi S, Trifa M, Skhiri A, Drira M, Regaya T, Fekih Hassen A (2009) Time to extubation in infants undergoing pyloromyotomy -- isoflurane inhalation vs remifentanil infusion. Middle East J Anaesthesiol 20:277–280.

Bénichou J, Zupan V, Fernandez H, Marpeau L, Marret S (1998) Tocolytic magnesium sulphate and paediatric mortality. Lancet 351:290–291.

Berger R, Söder S (2015) Neuroprotection in preterm infants. Biomed Res Int 2015:257139.

Berry M, Rogers AW (1965) The migration of neuroblasts in the developing cerebral cortex. J Anat 99:691–709.

Bettler B, Mulle C (1995) Review: neurotransmitter receptors. II. AMPA and kainate receptors. Neuropharmacology 34:123–139.

Bialas AR, Stevens B (2012) Glia: regulating synaptogenesis from multiple directions. Curr Biol 22:R833-835.

Black RE, Allen LH, Bhutta ZA, Caulfield LE, de Onis M, Ezzati M, Mathers C, Rivera J, Maternal and Child Undernutrition Study Group (2008) Maternal and child undernutrition: global and regional exposures and health consequences. Lancet 371:243–260.

Blencowe H, Cousens S, Chou D, Oestergaard M, Say L, Moller A-B, Kinney M, Lawn J, Born Too Soon Preterm Birth Action Group (2013) Born too soon: the global epidemiology of 15 million preterm

births. Reprod Health 10 Suppl 1:S2.

Blencowe H, Cousens S, Oestergaard MZ, Chou D, Moller A-B, Narwal R, Adler A, Vera Garcia C, Rohde S, Say L, Lawn JE (2012) National, regional, and worldwide estimates of preterm birth rates in the year 2010 with time trends since 1990 for selected countries: a systematic analysis and implications. Lancet 379:2162–2172.

Block RI, Thomas JJ, Bayman EO, Choi JY, Kimble KK, Todd MM (2012) Are anesthesia and surgery during infancy associated with altered academic performance during childhood? Anesthesiology 117:494–503.

Blomgren K, Leist M, Groc L (2007) Pathological apoptosis in the developing brain. Apoptosis 12:993–1010.

Blondel B, Lelong N, Kermarrec M, Goffinet F, National Coordination Group of the National Perinatal Surveys (2012) Trends in perinatal health in France from 1995 to 2010. Results from the French National Perinatal Surveys. J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris) 41:e1–e15.

Blondel B, Macfarlane A, Gissler M, Breart G, Zeitlin J, PERISTAT Study Group (2006) Preterm birth and multiple pregnancy in European countries participating in the PERISTAT project. BJOG 113:528–535.

Bolaños JP, Medina JM (1997) Effect of valproate on the metabolism of the central nervous system. Life Sci 60:1933–1942.

Bolisetty S, Dhawan A, Abdel-Latif M, Bajuk B, Stack J, Lui K, New South Wales and Australian Capital Territory Neonatal Intensive Care Units' Data Collection (2014) Intraventricular hemorrhage and neurodevelopmental outcomes in extreme preterm infants. Pediatrics 133:55–62.

Bonde C, Noraberg J, Noer H, Zimmer J (2005) Ionotropic glutamate receptors and glutamate transporters are involved in necrotic neuronal cell death induced by oxygen-glucose deprivation of hippocampal slice cultures. Neuroscience 136:779–794.

Bong CL, Allen JC, Kim JTS (2013) The effects of exposure to general anesthesia in infancy on academic performance at age 12. Anesth Analg 117:1419–1428.

Borja-Del-Rosario P, Basu SK, Haberman S, Bhutada A, Rastogi S (2014) Neonatal serum magnesium concentrations are determined by total maternal dose of magnesium sulfate administered for neuroprotection. J Perinat Med 42:207–211.

Bortolus R, Parazzini F, Trevisanuto D, Cipriani S, Ferrarese P, Zanardo V (2002) Developmental

assessment of preterm and term children at 18 months: reproducibility and validity of a postal questionnaire to parents. Acta Paediatr 91:1101–1107.

Bouvier G, Bidoret C, Casado M, Paoletti P (2015) Presynaptic NMDA receptors: Roles and rules. Neuroscience 311:322–340.

Boyle CA, Yeargin-Allsopp M, Schendel DE, Holmgreen P, Oakley GP (2000) Tocolytic magnesium sulfate exposure and risk of cerebral palsy among children with birth weights less than 1,750 grams. Am J Epidemiol 152:120–124.

Bradl M, Lassmann H (2010) Oligodendrocytes: biology and pathology. Acta Neuropathol 119:37–53.

Brambrink AM, Back SA, Riddle A, Gong X, Moravec MD, Dissen GA, Creeley CE, Dikranian KT, Olney JW (2012) Isoflurane-induced apoptosis of oligodendrocytes in the neonatal primate brain. Ann Neurol 72:525–535.

Braun A, Xu H, Hu F, Kocherlakota P, Siegel D, Chander P, Ungvari Z, Csiszar A, Nedergaard M, Ballabh P (2007) Paucity of pericytes in germinal matrix vasculature of premature infants. J Neurosci 27:12012–12024.

Brazel CY, Nuñez JL, Yang Z, Levison SW (2005) Glutamate enhances survival and proliferation of neural progenitors derived from the subventricular zone. Neuroscience 131:55–65.

Bredt DS, Nicoll RA (2003) AMPA receptor trafficking at excitatory synapses. Neuron 40:361–379.

Briner A, De Roo M, Dayer A, Muller D, Habre W, Vutskits L (2010) Volatile anesthetics rapidly increase dendritic spine density in the rat medial prefrontal cortex during synaptogenesis. Anesthesiology 112:546–556.

Brown AM, Ransom BR (2007) Astrocyte glycogen and brain energy metabolism. Glia 55:1263–1271.

Brummelte S, Grunau RE, Chau V, Poskitt KJ, Brant R, Vinall J, Gover A, Synnes AR, Miller SP (2012) Procedural pain and brain development in premature newborns. Ann Neurol 71:385–396.

Budday S, Steinmann P, Kuhl E (2015) Physical biology of human brain development. Front Cell Neurosci 9 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4495345/ [Accessed January 20, 2017].

Bürkle H, Dunbar S, Van Aken H (1996) Remifentanil: a novel, short-acting, mu-opioid. Anesth Analg 83:646–651.

Burnashev N, Monyer H, Seeburg PH, Sakmann B (1992) Divalent ion permeability of AMPA receptor channels is dominated by the edited form of a single subunit. Neuron 8:189–198.

Burnashev N, Zhou Z, Neher E, Sakmann B (1995) Fractional calcium currents through recombinant GluR channels of the NMDA, AMPA and kainate receptor subtypes. J Physiol (Lond) 485 (Pt 2):403–418.

Buser JR, Maire J, Riddle A, Gong X, Nguyen T, Nelson K, Luo NL, Ren J, Struve J, Sherman LS, Miller SP, Chau V, Hendson G, Ballabh P, Grafe MR, Back SA (2012) Arrested preoligodendrocyte maturation contributes to myelination failure in premature infants. Ann Neurol 71:93–109.

Bystron I, Blakemore C, Rakic P (2008) Development of the human cerebral cortex: Boulder Committee revisited. Nat Rev Neurosci 9:110–122.

C

Canterino JC, Verma UL, Visintainer PF, Figueroa R, Klein SA, Tejani NA (1999) Maternal magnesium sulfate and the development of neonatal periventricular leucomalacia and intraventricular hemorrhage. Obstet Gynecol 93:396–402.

Carbajal R et al. (2015) Sedation and analgesia practices in neonatal intensive care units (EUROPAIN): results from a prospective cohort study. Lancet Respir Med 3:796–812.

Carbajal R, Rousset A, Danan C, Coquery S, Nolent P, Ducrocq S, Saizou C, Lapillonne A, Granier M, Durand P, Lenclen R, Coursol A, Hubert P, de Saint Blanquat L, Boëlle P-Y, Annequin D, Cimerman P, Anand KJS, Bréart G (2008) Epidemiology and treatment of painful procedures in neonates in intensive care units. JAMA 300:60–70.

Carson MJ, Doose JM, Melchior B, Schmid CD, Ploix CC (2006) CNS immune privilege: hiding in plain sight. Immunol Rev 213:48–65.

Catts VS, Lai YL, Weickert CS, Weickert TW, Catts SV (2016) A quantitative review of the postmortem evidence for decreased cortical N-methyl-D-aspartate receptor expression levels in schizophrenia: How can we link molecular abnormalities to mismatch negativity deficits? Biol Psychol 116:57–67.

Caviness VS, Rakic P (1978) Mechanisms of cortical development: a view from mutations in mice. Annu Rev Neurosci 1:297–326.

Chambers N, Lopez T, Thomas J, James MFM (2002) Remifentanil and the tunnelling phase of paediatric ventriculoperitoneal shunt insertion. A double-blind, randomised, prospective study. Anaesthesia 57:133–139.

Chanavaz C, Tirel O, Wodey E, Bansard JY, Senhadji L, Robert JC, Ecoffey C (2005) Haemodynamic

effects of remifentanil in children with and without intravenous atropine. An echocardiographic study. Br J Anaesth 94:74–79.

Chandrasekar R (2013) Alcohol and NMDA receptor: current research and future direction. Front Mol Neurosci 6:14.

Chang E (2015) Preterm birth and the role of neuroprotection. BMJ 350:g6661.

Chater TE, Goda Y (2014) The role of AMPA receptors in postsynaptic mechanisms of synaptic plasticity. Front Cell Neurosci 8 Available at: http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2014.00401/full [Accessed February 7, 2017].

Chazot PL, Stephenson FA (1997) Biochemical evidence for the existence of a pool of unassembled C2 exon-containing NR1 subunits of the mammalian forebrain NMDA receptor. J Neurochem 68:507–516.

Chien L-N, Lin H-C, Shao Y-HJ, Chiou S-T, Chiou H-Y (2015) Risk of autism associated with general anesthesia during cesarean delivery: a population-based birth-cohort analysis. J Autism Dev Disord 45:932–942.

Chien LY, Whyte R, Aziz K, Thiessen P, Matthew D, Lee SK, Canadian Neonatal Network (2001) Improved outcome of preterm infants when delivered in tertiary care centers. Obstet Gynecol 98:247–252.

Chiruvolu A, Tolia VN, Qin H, Stone GL, Rich D, Conant RJ, Inzer RW (2015) Effect of delayed cord clamping on very preterm infants. Am J Obstet Gynecol 213:676.e1-7.

Choi DW (1987) Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. J Neurosci 7:369–379.

Choi DW (1992) Excitotoxic cell death. J Neurobiol 23:1261–1276.

Chollat C, Enser M, Houivet E, Provost D, Bénichou J, Marpeau L, Marret S (2014) School-Age Outcomes following a Randomized Controlled Trial of Magnesium Sulfate for Neuroprotection of Preterm Infants. J Pediatr.

Chollat C, Le Doussal L, De la Villéon G, Provost D, Marret S (2017) Antenatal magnesium sulphate administration for fetal neuroprotection: a French national survey. BMC Pregnancy Childbirth.

Chollat C, Tourrel F, Marret S (2017) Does Remifentanil Have a Place for Sedation in the Case of Endotracheal Intubation or Minimally Invasive Surfactant Therapy in Neonates? Neonatology 112:372–373.

Choong K, AlFaleh K, Doucette J, Gray S, Rich B, Verhey L, Paes B (2010) Remifentanil for

endotracheal intubation in neonates: a randomised controlled trial. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed 95:F80-84.

Choquet D, Triller A (2013) The dynamic synapse. Neuron 80:691–703.

Chorne N, Leonard C, Piecuch R, Clyman RI (2007) Patent ductus arteriosus and its treatment as risk factors for neonatal and neurodevelopmental morbidity. Pediatrics 119:1165–1174.

Ciabarra AM, Sullivan JM, Gahn LG, Pecht G, Heinemann S, Sevarino KA (1995) Cloning and characterization of chi-1: a developmentally regulated member of a novel class of the ionotropic glutamate receptor family. J Neurosci 15:6498–6508.

Cismaru AL, Gui L, Vasung L, Lejeune F, Barisnikov K, Truttmann A, Borradori Tolsa C, Hüppi PS (2016) Altered Amygdala Development and Fear Processing in Prematurely Born Infants. Front Neuroanat 10:55.

Clark GD, Rothman SM (1987) Blockade of excitatory amino acid receptors protects anoxic hippocampal slices. Neuroscience 21:665–671.

Clausen NG, Pedersen DA, Pedersen JK, Møller SE, Grosen D, Wehby GL, Christensen K, Hansen TG (2016) Oral Clefts and Academic Performance in Adolescence: The Impact of Anesthesia-Related Neurotoxicity, Timing of Surgery, and Type of Oral Clefts. Cleft Palate Craniofac J.

Cohen SM, Tsien RW, Goff DC, Halassa MM (2015) The impact of NMDA receptor hypofunction on GABAergic neurons in the pathophysiology of schizophrenia. Schizophr Res 167:98–107.

Colella M, Biran V, Baud O (2016) Melatonin and the newborn brain. Early Hum Dev 102:1–3.

Coleman LG, Oguz I, Lee J, Styner M, Crews FT (2012) Postnatal day 7 ethanol treatment causes persistent reductions in adult mouse brain volume and cortical neurons with sex specific effects on neurogenesis. Alcohol 46:603–612.

Committee on Obstetric Practice, American College of Obstetricians and Gynecologists (2012) Committee Opinion No.543: Timing of umbilical cord clamping after birth. Obstet Gynecol 120:1522–1526.

Committee on Practice Bulletins—Obstetrics, The American College of Obstetricians and Gynecologists (2012) Practice bulletin no. 130: prediction and prevention of preterm birth. Obstet Gynecol 120:964–973.

Conde-Agudelo A, Romero R (2009) Antenatal magnesium sulfate for the prevention of cerebral palsy in preterm infants less than 34 weeks' gestation: a systematic review and metaanalysis. Am J Obstet

Gynecol 200:595–609.

Conn PJ, Pin JP (1997) Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. Annu Rev Pharmacol Toxicol 37:205–237.

Constant I, Louvet N, Guye M-L, Sabourdin N (2012) [General anaesthesia in children: a French survey of practices]. Ann Fr Anesth Reanim 31:709–723.

Contractor A, Mulle C, Swanson GT (2011) Kainate receptors coming of age: milestones of two decades of research. Trends Neurosci 34:154–163.

Cook-Sather SD, Tulloch HV, Cnaan A, Nicolson SC, Cubina ML, Gallagher PR, Schreiner MS (1998) A comparison of awake versus paralyzed tracheal intubation for infants with pyloric stenosis. Anesth Analg 86:945–951.

Coonen JB, Marcus M a. E, Joosten E a. J, van Kleef M, Neef C, van Aken H, Gogarten W (2010) Transplacental transfer of remifentanil in the pregnant ewe. Br J Pharmacol 161:1472–1476.

Copits BA, Swanson GT (2012) Dancing partners at the synapse: auxiliary subunits that shape kainate receptor function. Nat Rev Neurosci 13:675–686.

Coq J-O, Delcour M, Massicotte VS, Baud O, Barbe MF (2016) Prenatal ischemia deteriorates white matter, brain organization, and function: implications for prematurity and cerebral palsy. Dev Med Child Neurol 58 Suppl 4:7–11.

Corlew R, Brasier DJ, Feldman DE, Philpot BD (2008) Presynaptic NMDA receptors: newly appreciated roles in cortical synaptic function and plasticity. Neuroscientist 14:609–625.

Costantine MM, Weiner SJ, Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development Maternal-Fetal Medicine Units Network (2009) Effects of antenatal exposure to magnesium sulfate on neuroprotection and mortality in preterm infants: a meta-analysis. Obstet Gynecol 114:354–364.

Costeloe KL, Hennessy EM, Haider S, Stacey F, Marlow N, Draper ES (2012) Short term outcomes after extreme preterm birth in England: comparison of two birth cohorts in 1995 and 2006 (the EPICure studies). BMJ 345:e7976.

Counsell SJ, Boardman JP (2005) Differential brain growth in the infant born preterm: current knowledge and future developments from brain imaging. Semin Fetal Neonatal Med 10:403–410.

Coyle JT, Bird SJ, Evans RH, Gulley RL, Nadler JV, Nicklas WJ, Olney JW (1981) Excitatory amino acid neurotoxins: selectivity, specificity, and mechanisms of action. Based on an NRP one-day conference

held June 30, 1980. Neurosci Res Program Bull 19:1–427.

Craik FIM, Bialystok E (2006) Cognition through the lifespan: mechanisms of change. Trends Cogn Sci (Regul Ed) 10:131–138.

Crawford MW, Hickey C, Zaarour C, Howard A, Naser B (2006) Development of acute opioid tolerance during infusion of remifentanil for pediatric scoliosis surgery. Anesth Analg 102:1662–1667.

Creeley C, Dikranian K, Dissen G, Martin L, Olney J, Brambrink A (2013) Propofol-induced apoptosis of neurones and oligodendrocytes in fetal and neonatal rhesus macaque brain. Br J Anaesth 110 Suppl 1:i29-38.

Creeley CE, Dikranian KT, Dissen GA, Back SA, Olney JW, Brambrink AM (2014) Isoflurane-induced apoptosis of neurons and oligodendrocytes in the fetal rhesus macaque brain. Anesthesiology 120:626–638.

Crowther C, Hiller J, Doyle L, Lumley J, Carlin J (1998) Tocolytic magnesium sulphate and paediatric mortality. Lancet 351:291.

Crowther CA, Hiller JE, Doyle LW, Haslam RR (2003) Effect of magnesium sulfate given for neuroprotection before preterm birth: a randomized controlled trial. JAMA 290:2669–2676.

Cui C, Mayer ML (1999) Heteromeric kainate receptors formed by the coassembly of GluR5, GluR6, and GluR7. J Neurosci 19:8281–8291.

Cull-Candy S, Brickley S, Farrant M (2001) NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. Curr Opin Neurobiol 11:327–335.

Cull-Candy SG, Leszkiewicz DN (2004) Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. Sci STKE 2004:re16.

D

Dadure C, Marie A, Seguret F, Capdevila X (2015) One year of anaesthesia in France: A comprehensive survey based on the national medical information (PMSI) database. Part 1: In-hospital patients. Anaesth Crit Care Pain Med 34:191–197.

Dalmau J, Lancaster E, Martinez-Hernandez E, Rosenfeld MR, Balice-Gordon R (2011) Clinical experience and laboratory investigations in patients with anti-NMDAR encephalitis. Lancet Neurol 10:63–74.

Darlow BA (2015) Retinopathy of prematurity: New developments bring concern and hope. J Paediatr

Child Health 51:765–770.

Das S, Du Z, Bassly S, Singer L, Vicencio AG (2009) Effects of chronic hypercapnia in the neonatal mouse lung and brain. Pediatr Pulmonol 44:176–182.

Datta-Nemdharry P, Dattani N, Macfarlane AJ (2012) Birth outcomes for African and Caribbean babies in England and Wales: retrospective analysis of routinely collected data. BMJ Open 2.

Davidson AJ et al. (2016) Neurodevelopmental outcome at 2 years of age after general anaesthesia and awake-regional anaesthesia in infancy (GAS): an international multicentre, randomised controlled trial. Lancet 387:239–250.

Davis PJ, Galinkin J, McGowan FX, Lynn AM, Yaster M, Rabb MF, Krane EJ, Kurth CD, Blum RH, Maxwell L, Orr R, Szmuk P, Hechtman D, Edwards S, Henson LG (2001) A randomized multicenter study of remifentanil compared with halothane in neonates and infants undergoing pyloromyotomy. I. Emergence and recovery profiles. Anesth Analg 93:1380–1386, table of contents.

Davis PJ, Wilson AS, Siewers RD, Pigula FA, Landsman IS (1999) The effects of cardiopulmonary bypass on remifentanil kinetics in children undergoing atrial septal defect repair. Anesth Analg 89:904–908.

de Graaf J, van Lingen RA, Simons SHP, Anand KJS, Duivenvoorden HJ, Weisglas-Kuperus N, Roofthooft DWE, Groot Jebbink LJM, Veenstra RR, Tibboel D, van Dijk M (2011) Long-term effects of routine morphine infusion in mechanically ventilated neonates on children's functioning: five-year follow-up of a randomized controlled trial. Pain 152:1391–1397.

de Graaf J, van Lingen RA, Valkenburg AJ, Weisglas-Kuperus N, Groot Jebbink L, Wijnberg-Williams B, Anand KJS, Tibboel D, van Dijk M (2013) Does neonatal morphine use affect neuropsychological outcomes at 8 to 9 years of age? Pain 154:449–458.

de Jongh BE, Paul DA, Hoffman M, Locke R (2014) Effects of pre-pregnancy obesity, race/ethnicity and prematurity. Matern Child Health J 18:511–517.

de Kort EHM, Hanff LM, Roofthooft D, Reiss IKM, Simons SHP (2017) Insufficient Sedation and Severe Side Effects after Fast Administration of Remifentanil during INSURE in Preterm Newborns. Neonatology 111:172–176.

de Kort EHM, Reiss IKM, Simons SHP (2013) Sedation of newborn infants for the INSURE procedure, are we sure? Biomed Res Int 2013:892974.

De Roo M, Klauser P, Briner A, Nikonenko I, Mendez P, Dayer A, Kiss JZ, Muller D, Vutskits L (2009)

Anesthetics rapidly promote synaptogenesis during a critical period of brain development. PLoS ONE 4:e7043.

de Rouffignac C, Quamme G (1994) Renal magnesium handling and its hormonal control. Physiol Rev 74:305–322.

Dean JM, McClendon E, Hansen K, Azimi-Zonooz A, Chen K, Riddle A, Gong X, Sharifnia E, Hagen M, Ahmad T, Leigland LA, Hohimer AR, Kroenke CD, Back SA (2013) Prenatal cerebral ischemia disrupts MRI-defined cortical microstructure through disturbances in neuronal arborization. Sci Transl Med 5:168ra7.

Dean SV, Lassi ZS, Imam AM, Bhutta ZA (2014) Preconception care: nutritional risks and interventions. Reprod Health 11 Suppl 3:S3.

Del Bigio MR (2011) Cell proliferation in human ganglionic eminence and suppression after prematurity-associated haemorrhage. Brain 134:1344–1361.

DeMauro SB, Douglas E, Karp K, Schmidt B, Patel J, Kronberger A, Scarboro R, Posencheg M (2013) Improving delivery room management for very preterm infants. Pediatrics 132:e1018-1025.

Demirel N, Bas AY, Kavurt S, Celik IH, Yucel H, Turkbay D, Hekimoğlu E, Koc O (2014) Remifentanil analgesia during laser treatment for retinopathy of prematurity: a practical approach in neonatal intensive care unit. Am J Perinatol 31:983–986.

Dempsey EM, Al Hazzani F, Barrington KJ (2009) Permissive hypotension in the extremely low birthweight infant with signs of good perfusion. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed 94:F241-244.

Dershwitz M, Hoke JF, Rosow CE, Michałowski P, Connors PM, Muir KT, Dienstag JL (1996) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of remifentanil in volunteer subjects with severe liver disease. Anesthesiology 84:812–820.

Desfeux A, El Ghazi F, Jégou S, Legros H, Marret S, Laudenbach V, Gonzalez BJ (2010) Dual effect of glutamate on GABAergic interneuron survival during cerebral cortex development in mice neonates. Cereb Cortex 20:1092–1108.

Deutsch SI, Mastropaolo J, Rosse RB (1998) Neurodevelopmental consequences of early exposure to phencyclidine and related drugs. Clin Neuropharmacol 21:320–332.

Devabhakthuni S (2013) Efficacy and safety of remifentanil as an alternative labor analgesic. Clin Med Insights Womens Health 6:37–49.

Devroe S, Van de Velde M, Rex S (2015) General anesthesia for caesarean section. Curr Opin

Anaesthesiol 28:240–246.

Dewhirst E, Naguib A, Tobias JD (2012) Chest wall rigidity in two infants after low-dose fentanyl administration. Pediatr Emerg Care 28:465–468.

Diaz J, Abiola S, Kim N, Avaritt O, Flock D, Yu J, Northington FJ, Chavez-Valdez R (2017) Therapeutic Hypothermia Provides Variable Protection against Behavioral Deficits after Neonatal Hypoxia-Ischemia: A Potential Role for Brain-Derived Neurotrophic Factor. Dev Neurosci 39:257–272.

Diguisto C, Goffinet F, Lorthe E, Kayem G, Roze J-C, Boileau P, Khoshnood B, Benhammou V, Langer B, Sentilhes L, Subtil D, Azria E, Kaminski M, Ancel P-Y, Foix-L'Hélias L (2017) Providing active antenatal care depends on the place of birth for extremely preterm births: the EPIPAGE 2 cohort study. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.

DiMaggio C, Sun LS, Ing C, Li G (2012) Pediatric anesthesia and neurodevelopmental impairments: a Bayesian meta-analysis. J Neurosurg Anesthesiol 24:376–381.

DiMaggio C, Sun LS, Kakavouli A, Byrne MW, Li G (2009) A retrospective cohort study of the association of anesthesia and hernia repair surgery with behavioral and developmental disorders in young children. J Neurosurg Anesthesiol 21:286–291.

DiMaggio C, Sun LS, Li G (2011) Early childhood exposure to anesthesia and risk of developmental and behavioral disorders in a sibling birth cohort. Anesth Analg 113:1143–1151.

Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF (1999) The glutamate receptor ion channels. Pharmacol Rev 51:7–61.

Domingues AM de J, Neugebauer KM, Fern R (2011) Identification of four functional NR3B isoforms in developing white matter reveals unexpected diversity among glutamate receptors. J Neurochem 117:449–460.

Dommergues MA, Gallego J, Evrard P, Gressens P (1998) Iron supplementation aggravates periventricular cystic white matter lesions in newborn mice. Eur J Paediatr Neurol 2:313–318.

Dommergues MA, Patkai J, Renauld JC, Evrard P, Gressens P (2000) Proinflammatory cytokines and interleukin-9 exacerbate excitotoxic lesions of the newborn murine neopallium. Ann Neurol 47:54–63.

Dong Y, Benveniste EN (2001) Immune function of astrocytes. Glia 36:180–190.

Doyle LW, Anderson PJ, Haslam R, Lee KJ, Crowther C, Australasian Collaborative Trial of Magnesium Sulphate (ACTOMgSO4) Study Group (2014a) School-age outcomes of very preterm infants after

antenatal treatment with magnesium sulfate vs placebo. JAMA 312:1105–1113.

Doyle LW, Crowther CA, Middleton P, Marret S (2009a) Antenatal magnesium sulfate and neurologic outcome in preterm infants: a systematic review. Obstet Gynecol 113:1327–1333.

Doyle LW, Crowther CA, Middleton P, Marret S, Rouse D (2009b) Magnesium sulphate for women at risk of preterm birth for neuroprotection of the fetus. Cochrane Database Syst Rev:CD004661.

Doyle LW, Ehrenkranz RA, Halliday HL (2014b) Early (< 8 days) postnatal corticosteroids for preventing chronic lung disease in preterm infants. Cochrane Database Syst Rev:CD001146.

Doyle LW, Schmidt B, Anderson PJ, Davis PG, Moddemann D, Grunau RE, O'Brien K, Sankaran K, Herlenius E, Roberts R, Caffeine for Apnea of Prematurity Trial investigators (2014c) Reduction in developmental coordination disorder with neonatal caffeine therapy. J Pediatr 165:356–359.e2.

Drobish JK, Gan ZS, Cornfeld AD, Eckenhoff MF (2016) From the Cover: Volatile Anesthetics Transiently Disrupt Neuronal Development in Neonatal Rats. Toxicol Sci 154:309–319.

Du J, Li X-H, Li Y-J (2016) Glutamate in peripheral organs: Biology and pharmacology. Eur J Pharmacol 784:42–48.

Duguid IC, Smart TG (2009) Presynaptic NMDA Receptors. In: Biology of the NMDA Receptor (Van Dongen AM, ed) Frontiers in Neuroscience. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5275/ [Accessed February 15, 2017].

Dührsen L, Simons SHP, Dzietko M, Genz K, Bendix I, Boos V, Sifringer M, Tibboel D, Felderhoff-Mueser U (2013) Effects of repetitive exposure to pain and morphine treatment on the neonatal rat brain. Neonatology 103:35–43.

Duley L, Gülmezoglu AM, Henderson-Smart DJ, Chou D (2010) Magnesium sulphate and other anticonvulsants for women with pre-eclampsia. Cochrane Database Syst Rev:CD000025.

Durkin MS, Maenner MJ, Benedict RE, Van Naarden Braun K, Christensen D, Kirby RS, Wingate M, Yeargin-Allsopp M (2015) The role of socio-economic status and perinatal factors in racial disparities in the risk of cerebral palsy. Dev Med Child Neurol 57:835–843.

Durlach J, Guiet-Bara A, Pagès N, Bac P, Bara M (2005) Magnesium chloride or magnesium sulfate: a genuine question. Magnes Res 18:187–192.

E

e Silva YP, Gomez RS, Marcatto J de O, Maximo TA, Barbosa RF, e Silva ACS (2008) Early awakening

and extubation with remifentanil in ventilated premature neonates. Paediatr Anaesth 18:176–183.

Egan TD, Kern SE, Muir KT, White J (2004) Remifentanil by bolus injection: a safety, pharmacokinetic, pharmacodynamic, and age effect investigation in human volunteers. Br J Anaesth 92:335–343.

Egan TD, Lemmens HJM, Fiset P, Hermann DJ, Muir KT, Stanski DR, Shafer SL (1993) The Pharmacokinetics of the New Short-acting Opioid Remifentanil (GI87084B) in Healthy Adult Male Volunteers. Anesthesiology 79:881–892.

El-Khoury N, Braun A, Hu F, Pandey M, Nedergaard M, Lagamma EF, Ballabh P (2006) Astrocyte end-feet in germinal matrix, cerebral cortex, and white matter in developing infants. Pediatr Res 59:673–679.

Emeterio EP-S, Tramullas M, Hurlé MA (2006) Modulation of apoptosis in the mouse brain after morphine treatments and morphine withdrawal. J Neurosci Res 83:1352–1361.

Engelman HS, MacDermott AB (2004) Presynaptic ionotropic receptors and control of transmitter release. Nat Rev Neurosci 5:135–145.

Erasso DM, Camporesi EM, Mangar D, Saporta S (2013) Effects of isoflurane or propofol on postnatal hippocampal neurogenesis in young and aged rats. Brain Res 1530:1–12.

Eriksson M, Nilsson A, Froelich-Fabre S, Akesson E, Dunker J, Seiger A, Folkesson R, Benedikz E, Sundström E (2002) Cloning and expression of the human N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR3A. Neurosci Lett 321:177–181.

Esiri MM, al Izzi MS, Reading MC (1991) Macrophages, microglial cells, and HLA-DR antigens in fetal and infant brain. J Clin Pathol 44:102–106.

Ethell IM, Pasquale EB (2005) Molecular mechanisms of dendritic spine development and remodeling. Prog Neurobiol 75:161–205.

Euser AG, Cipolla MJ (2009) Magnesium sulfate for the treatment of eclampsia: a brief review. Stroke 40:1169–1175.

F

Fabres J, Carlo WA, Phillips V, Howard G, Ambalavanan N (2007) Both extremes of arterial carbon dioxide pressure and the magnitude of fluctuations in arterial carbon dioxide pressure are associated with severe intraventricular hemorrhage in preterm infants. Pediatrics 119:299–305.

Fahey MC, Maclennan AH, Kretzschmar D, Gecz J, Kruer MC (2017) The genetic basis of cerebral

palsy. Dev Med Child Neurol.

Falkowska A, Gutowska I, Goschorska M, Nowacki P, Chlubek D, Baranowska-Bosiacka I (2015) Energy Metabolism of the Brain, Including the Cooperation between Astrocytes and Neurons, Especially in the Context of Glycogen Metabolism. Int J Mol Sci 16:25959–25981.

Fan Q, Cai Y, Chen K, Li W (2013) Prognostic study of sevoflurane-based general anesthesia on cognitive function in children. J Anesth 27:493–499.

Fedder KN, Sabo SL (2015) On the Role of Glutamate in Presynaptic Development: Possible Contributions of Presynaptic NMDA Receptors. Biomolecules 5:3448–3466.

Fellin T, D'Ascenzo M, Haydon PG (2007) Astrocytes control neuronal excitability in the nucleus accumbens. ScientificWorldJournal 7:89–97.

Ferguson SA, Ward WL, Paule MG, Hall RW, Anand KJS (2012) A pilot study of preemptive morphine analgesia in preterm neonates: effects on head circumference, social behavior, and response latencies in early childhood. Neurotoxicol Teratol 34:47–55.

Ferraguti F, Shigemoto R (2006) Metabotropic glutamate receptors. Cell Tissue Res 326:483–504.

Ferré C, Callaghan W, Olson C, Sharma A, Barfield W (2016) Effects of Maternal Age and Age-Specific Preterm Birth Rates on Overall Preterm Birth Rates - United States, 2007 and 2014. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 65:1181–1184.

Filan PM, Hunt RW, Anderson PJ, Doyle LW, Inder TE (2012) Neurologic outcomes in very preterm infants undergoing surgery. J Pediatr 160:409–414.

Fisher JL, Mott DD (2013) Modulation of homomeric and heteromeric kainate receptors by the auxiliary subunit Neto1. J Physiol (Lond) 591:4711–4724.

Fiske BK, Brunjes PC (2001) NMDA receptor regulation of cell death in the rat olfactory bulb. J Neurobiol 47:223–232.

Fitzgerald M (1991) Development of pain mechanisms. Br Med Bull 47:667–675.

Fitzgerald M (2005) The development of nociceptive circuits. Nat Rev Neurosci 6:507–520.

Fitzgerald M, Beggs S (2001) The neurobiology of pain: developmental aspects. Neuroscientist 7:246–257.

Fitzgerald M, Shaw A, MacIntosh N (1988) Postnatal development of the cutaneous flexor reflex: comparative study of preterm infants and newborn rat pups. Dev Med Child Neurol 30:520–526.

Flamant C, Branger B, Nguyen The Tich S, de la Rochebrochard E, Savagner C, Berlie I, Rozé J-C (2011) Parent-completed developmental screening in premature children: a valid tool for follow-up programs. PLoS ONE 6:e20004.

Flick RP, Katusic SK, Colligan RC, Wilder RT, Voigt RG, Olson MD, Sprung J, Weaver AL, Schroeder DR, Warner DO (2011a) Cognitive and behavioral outcomes after early exposure to anesthesia and surgery. Pediatrics 128:e1053-1061.

Flick RP, Lee K, Hofer RE, Beinborn CW, Hambel EM, Klein MK, Gunn PW, Wilder RT, Katusic SK, Schroeder DR, Warner DO, Sprung J (2011b) Neuraxial labor analgesia for vaginal delivery and its effects on childhood learning disabilities. Anesth Analg 112:1424–1431.

Food and Drug Administration (2017) FDA Drug Safety Communication: FDA approves label changes for use of general anesthetic and sedation drugs in young children. Available at: https://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/ucm554634.htm.

Forero M, Chan PSL, Restrepo-Garces CE (2012) Successful reversal of hyperalgesia/myoclonus complex with low-dose ketamine infusion. Pain Pract 12:154–158.

Foster AC, Gill R, Woodruff GN (1988) Neuroprotective effects of MK-801 in vivo: selectivity and evidence for delayed degeneration mediated by NMDA receptor activation. J Neurosci 8:4745–4754.

Fox WM (1965) Reflex-ontogeny and behavioural development of the mouse. Anim Behav 13:234–241.

Fredriksson A, Archer T, Alm H, Gordh T, Eriksson P (2004) Neurofunctional deficits and potentiated apoptosis by neonatal NMDA antagonist administration. Behav Brain Res 153:367–376.

Freeman LM et al. (2015) Patient controlled analgesia with remifentanil versus epidural analgesia in labour: randomised multicentre equivalence trial. BMJ 350:h846.

Freeman MR (2010) Specification and Morphogenesis of Astrocytes. Science 330:774–778.

Frerking M, Schmitz D, Zhou Q, Johansen J, Nicoll RA (2001) Kainate receptors depress excitatory synaptic transmission at CA3-->CA1 synapses in the hippocampus via a direct presynaptic action. J Neurosci 21:2958–2966.

Furukawa H, Singh SK, Mancusso R, Gouaux E (2005) Subunit arrangement and function in NMDA receptors. Nature 438:185–192.

G

Galinkin JL, Davis PJ, McGowan FX, Lynn AM, Rabb MF, Yaster M, Henson LG, Blum R, Hechtman D, Maxwell L, Szmuk P, Orr R, Krane EJ, Edwards S, Kurth CD (2001) A randomized multicenter study of remifentanil compared with halothane in neonates and infants undergoing pyloromyotomy. II. Perioperative breathing patterns in neonates and infants with pyloric stenosis. Anesth Analg 93:1387–1392, table of contents.

Gallo V, Upson LM, Hayes WP, Vyklicky L, Winters CA, Buonanno A (1992) Molecular cloning and development analysis of a new glutamate receptor subunit isoform in cerebellum. J Neurosci 12:1010–1023.

Galvin KA, Oorschot DE (1998) Postinjury magnesium sulfate treatment is not markedly neuroprotective for striatal medium spiny neurons after perinatal hypoxia/ischemia in the rat. Pediatr Res 44:740–745.

Garcia Guerra G, Robertson CMT, Alton GY, Joffe AR, Cave DA, Yasmin F, Dinu IA, Creighton DE, Ross DB, Rebeyka IM, Western Canadian Complex Pediatric Therapies Follow-up Group (2014) Neurotoxicity of sedative and analgesia drugs in young infants with congenital heart disease: 4-year follow-up. Paediatr Anaesth 24:257–265.

Gardoni F, Mauceri D, Fiorentini C, Bellone C, Missale C, Cattabeni F, Di Luca M (2003) CaMKII-dependent phosphorylation regulates SAP97/NR2A interaction. J Biol Chem 278:44745–44752.

Gargiulo PÁ, Landa De Gargiulo AI (2014) Glutamate and modeling of schizophrenia symptoms: review of our findings: 1990-2014. Pharmacol Rep 66:343–352.

Garner CC, Waites CL, Ziv NE (2006) Synapse development: still looking for the forest, still lost in the trees. Cell Tissue Res 326:249–262.

Gavaldà N, Pérez-Navarro E, García-Martínez JM, Marco S, Benito A, Alberch J (2008) Bax deficiency promotes an up-regulation of Bim(EL) and Bak during striatal and cortical postnatal development, and after excitotoxic injury. Mol Cell Neurosci 37:663–672.

Germany L, Saurel-Cubizolles M-J, Ehlinger V, Napoletano A, Alberge C, Guyard-Boileau B, Pierrat V, Genolini C, Ancel P-Y, Arnaud C, EPIPAGE Study Group (2015) Social context of preterm delivery in France in 2011 and impact on short-term health outcomes: the EPIPAGE 2 cohort study. Paediatr Perinat Epidemiol 29:184–195.

Giannantonio C, Sammartino M, Valente E, Cota F, Fioretti M, Papacci P (2009) Remifentanil

analgosedation in preterm newborns during mechanical ventilation. Acta Paediatr 98:1111–1115.

Gielen M (2010) [Molecular operation of ionotropic glutamate receptors: proteins that mediate the excitatory synaptic neurotransmission]. Med Sci (Paris) 26:65–72.

Gilbert SF, Singer SR (2004) Biologie du développement. Bruxelles: De Boeck.

Gilo NB, Amini D, Landy HJ (2009) Appendicitis and cholecystitis in pregnancy. Clin Obstet Gynecol 52:586–596.

Glass HC, Bonifacio SL, Chau V, Glidden D, Poskitt K, Barkovich AJ, Ferriero DM, Miller SP (2008) Recurrent postnatal infections are associated with progressive white matter injury in premature infants. Pediatrics 122:299–305.

Glass PS (1995) Pharmacology of remifentanil. Eur J Anaesthesiol Suppl 10:73–74.

Glass PS, Gan TJ, Howell S (1999) A review of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of remifentanil. Anesth Analg 89:S7-14.

Glucksmann A (1951) Cell deaths in normal vertebrate ontogeny. Biol Rev Camb Philos Soc 26:59–86.

Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R (2008) Epidemiology and causes of preterm birth. Lancet 371:75–84.

Goldenberg RL, Gravett MG, Iams J, Papageorghiou AT, Waller SA, Kramer M, Culhane J, Barros F, Conde-Agudelo A, Bhutta ZA, Knight HE, Villar J (2012) The preterm birth syndrome: issues to consider in creating a classification system. Am J Obstet Gynecol 206:113–118.

Gomez TM, Letourneau PC (2014) Actin dynamics in growth cone motility and navigation. J Neurochem 129:221–234.

Goodacre S, Cohen J, Bradburn M, Stevens J, Gray A, Benger J, Coats T, 3Mg Research Team (2014) The 3Mg trial: a randomised controlled trial of intravenous or nebulised magnesium sulphate versus placebo in adults with acute severe asthma. Health Technol Assess 18:1–168.

Gould E, Cameron HA, McEwen BS (1994) Blockade of NMDA receptors increases cell death and birth in the developing rat dentate gyrus. J Comp Neurol 340:551–565.

Graham EM, Ruis KA, Hartman AL, Northington FJ, Fox HE (2008) A systematic review of the role of intrapartum hypoxia-ischemia in the causation of neonatal encephalopathy. Am J Obstet Gynecol 199:587–595.

Graham MR, Brownell M, Chateau DG, Dragan RD, Burchill C, Fransoo RR (2016)

Neurodevelopmental Assessment in Kindergarten in Children Exposed to General Anesthesia before the Age of 4 Years: A Retrospective Matched Cohort Study. Anesthesiology 125:667–677.

Gravett MG, Rubens CE, Nunes TM, GAPPS Review Group (2010) Global report on preterm birth and stillbirth (2 of 7): discovery science. BMC Pregnancy Childbirth 10 Suppl 1:S2.

Greenwood K, Cox P, Mehmet H, Penrice J, Amess PN, Cady EB, Wyatt JS, Edwards AD (2000) Magnesium sulfate treatment after transient hypoxia-ischemia in the newborn piglet does not protect against cerebral damage. Pediatr Res 48:346–350.

Gregory KJ, Noetzel MJ, Niswender CM (2013) Pharmacology of metabotropic glutamate receptor allosteric modulators: structural basis and therapeutic potential for CNS disorders. Prog Mol Biol Transl Sci 115:61–121.

Gressens P (2000) Mechanisms and disturbances of neuronal migration. Pediatr Res 48:725–730.

Gressens P, Marret S, Evrard P (1996) Developmental spectrum of the excitotoxic cascade induced by ibotenate: a model of hypoxic insults in fetuses and neonates. Neuropathol Appl Neurobiol 22:498–502.

Grether J, Hirtz D, McNellis D, Nelson K, Rouse DJ (1998) Tocolytic magnesium sulphate and paediatric mortality. Lancet 351:292; author reply 293.

Grether JK, Hoogstrate J, Walsh-Greene E, Nelson KB (2000) Magnesium sulfate for tocolysis and risk of spastic cerebral palsy in premature children born to women without preeclampsia. Am J Obstet Gynecol 183:717–725.

Griffith TN, Swanson GT (2015) Identification of critical functional determinants of kainate receptor modulation by auxiliary protein Neto2. J Physiol 593:4815–4833.

Grimes DA, Nanda K (2006) Magnesium sulfate tocolysis: time to quit. Obstet Gynecol 108:986–989.

Gris P, Gauthier J, Cheng P, Gibson DG, Gris D, Laur O, Pierson J, Wentworth S, Nackley AG, Maixner W, Diatchenko L (2010) A novel alternatively spliced isoform of the mu-opioid receptor: functional antagonism. Mol Pain 6:33.

Grunau RE, Weinberg J, Whitfield MF (2004) Neonatal procedural pain and preterm infant cortisol response to novelty at 8 months. Pediatrics 114:e77-84.

Grunau RE, Whitfield MF, Petrie-Thomas J, Synnes AR, Cepeda IL, Keidar A, Rogers M, Mackay M, Hubber-Richard P, Johannesen D (2009) Neonatal pain, parenting stress and interaction, in relation to cognitive and motor development at 8 and 18 months in preterm infants. Pain 143:138–146.

Gu X, Wu X, Liu Y, Cui S, Ma Z (2009) Tyrosine phosphorylation of the N-Methyl-D-Aspartate receptor 2B subunit in spinal cord contributes to remifentanil-induced postoperative hyperalgesia: the preventive effect of ketamine. Mol Pain 5:76.

Gu Z, Liu W, Wei J, Yan Z (2012) Regulation of N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) receptors by metabotropic glutamate receptor 7. J Biol Chem 287:10265–10275.

Guerra GG, Robertson CMT, Alton GY, Joffe AR, Cave DA, Dinu IA, Creighton DE, Ross DB, Rebeyka IM, Western Canadian Complex Pediatric Therapies Follow-up Group (2011) Neurodevelopmental outcome following exposure to sedative and analgesic drugs for complex cardiac surgery in infancy. Paediatr Anaesth 21:932–941.

Guerri C (1998) Neuroanatomical and neurophysiological mechanisms involved in central nervous system dysfunctions induced by prenatal alcohol exposure. Alcohol Clin Exp Res 22:304–312.

Guerri C (2002) Mechanisms involved in central nervous system dysfunctions induced by prenatal ethanol exposure. Neurotox Res 4:327–335.

Guignard B, Bossard AE, Coste C, Sessler DI, Lebrault C, Alfonsi P, Fletcher D, Chauvin M (2000) Acute opioid tolerance: intraoperative remifentanil increases postoperative pain and morphine requirement. Anesthesiology 93:409–417.

Guntz E, Dumont H, Roussel C, Gall D, Dufrasne F, Cuvelier L, Blum D, Schiffmann SN, Sosnowski M (2005) Effects of remifentanil on N-methyl-D-aspartate receptor: an electrophysiologic study in rat spinal cord. Anesthesiology 102:1235–1241.

Gupta A, Tsai L-H, Wynshaw-Boris A (2002) Life is a journey: a genetic look at neocortical development. Nat Rev Genet 3:342–355.

Gutierrez S, Carnes A, Finucane B, Musci G, Oelsner W, Hicks L, Russell GB, Liu C, Turner CP (2010) Is age-dependent, ketamine-induced apoptosis in the rat somatosensory cortex influenced by temperature? Neuroscience 168:253–262.

H

Hackos DH, Hanson JE (2017) Diverse modes of NMDA receptor positive allosteric modulation: Mechanisms and consequences. Neuropharmacology 112:34–45.

Hadzic M, Jack A, Wahle P (2017) Ionotropic glutamate receptors: Which ones, when, and where in the mammalian neocortex. J Comp Neurol 525:976–1033.

Hagberg H, Mallard C, Ferriero DM, Vannucci SJ, Levison SW, Vexler ZS, Gressens P (2015) The role of inflammation in perinatal brain injury. Nat Rev Neurol 11:192–208.

Hall RW, Kronsberg SS, Barton BA, Kaiser JR, Anand KJS, NEOPAIN Trial Investigators Group (2005) Morphine, hypotension, and adverse outcomes among preterm neonates: who's to blame? Secondary results from the NEOPAIN trial. Pediatrics 115:1351–1359.

Hallak M, Berry SM, Madincea F, Romero R, Evans MI, Cotton DB (1993) Fetal serum and amniotic fluid magnesium concentrations with maternal treatment. Obstet Gynecol 81:185–188.

Hallak M, Cotton DB (1993) Transfer of maternally administered magnesium sulfate into the fetal compartment of the rat: assessment of amniotic fluid, blood, and brain concentrations. Am J Obstet Gynecol 169:427–431.

Hallenbeck JM (1996) Significance of the inflammatory response in brain ischemia. Acta Neurochir Suppl 66:27–31.

Hamburger V, Levi-Montalcini R (1949) Proliferation, differentiation and degeneration in the spinal ganglia of the chick embryo under normal and experimental conditions. J Exp Zool 111:457–501.

Han S, Crowther CA, Moore V (2013) Magnesium maintenance therapy for preventing preterm birth after threatened preterm labour. Cochrane Database Syst Rev:CD000940.

Hansen TG, Pedersen JK, Henneberg SW, Morton NS, Christensen K (2013) Educational outcome in adolescence following pyloric stenosis repair before 3 months of age: a nationwide cohort study. Paediatr Anaesth 23:883–890.

Hansen TG, Pedersen JK, Henneberg SW, Pedersen DA, Murray JC, Morton NS, Christensen K (2011) Academic performance in adolescence after inguinal hernia repair in infancy: a nationwide cohort study. Anesthesiology 114:1076–1085.

Harding JE, Dalziel SR (2016) Re: Antenatal corticosteroids: a time for more careful scrutiny of the indications?: The most reliable evidence is reassuring. BJOG 123:1707–1708.

Hardingham GE (2009) Coupling of the NMDA receptor to neuroprotective and neurodestructive events. Biochem Soc Trans 37:1147–1160.

Hardingham GE, Bading H (2003) The Yin and Yang of NMDA receptor signalling. Trends Neurosci 26:81–89.

Harlan RE, Song DD (1994) Prenatal morphine treatment and the development of the striatum. Regulatory Peptides 54:117–118.

Harry GJ (2013) Microglia during development and aging. Pharmacol Ther 139:313–326.

Hasegawa A, Iwasaka H, Hagiwara S, Hasegawa R, Kudo K, Kusaka J, Asai N, Noguchi T (2011) Remifentanil and glucose suppress inflammation in a rat model of surgical stress. Surg Today 41:1617–1621.

Hathway GJ, Koch S, Low L, Fitzgerald M (2009) The changing balance of brainstem-spinal cord modulation of pain processing over the first weeks of rat postnatal life. J Physiol (Lond) 587:2927–2935.

Hatten ME (1993) The role of migration in central nervous system neuronal development. Curr Opin Neurobiol 3:38–44.

Hayashi H, Dikkes P, Soriano SG (2002) Repeated administration of ketamine may lead to neuronal degeneration in the developing rat brain. Paediatr Anaesth 12:770–774.

Haydar TF, Wang F, Schwartz ML, Rakic P (2000) Differential modulation of proliferation in the neocortical ventricular and subventricular zones. J Neurosci 20:5764–5774.

Haydon PG, Carmignoto G (2006) Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling. Physiol Rev 86:1009–1031.

He H, Butz A, Keet CA, Minkovitz CS, Hong X, Caruso DM, Pearson C, Cohen RT, Wills-Karp M, Zuckerman BS, Hughes ME, Wang X (2015) Preterm Birth with Childhood Asthma: The Role of Degree of Prematurity and Asthma Definitions. Am J Respir Crit Care Med 192:520–523.

Heesen M, Klimek M (2016) Nonobstetric anesthesia during pregnancy. Curr Opin Anaesthesiol 29:297–303.

Hemminki K, Li X, Sundquist K, Sundquist J (2007) High familial risks for cerebral palsy implicate partial heritable aetiology. Paediatr Perinat Epidemiol 21:235–241.

Henley JM, Wilkinson KA (2016) Synaptic AMPA receptor composition in development, plasticity and disease. Nat Rev Neurosci 17:337–350.

Henson MA, Roberts AC, Pérez-Otaño I, Philpot BD (2010) Influence of the NR3A subunit on NMDA receptor functions. Prog Neurobiol 91:23–37.

Herroeder S, Schönherr ME, De Hert SG, Hollmann MW (2011) Magnesium--essentials for anesthesiologists. Anesthesiology 114:971–993.

Hevner RF (2000) Development of connections in the human visual system during fetal mid-gestation: a DiI-tracing study. J Neuropathol Exp Neurol 59:385–392.

Himmelmann K (2013) Epidemiology of cerebral palsy. Handb Clin Neurol 111:163–167.

Himmelmann K, Uvebrant P (2014) The panorama of cerebral palsy in Sweden. XI. Changing patterns in the birth-year period 2003-2006. Acta Paediatr 103:618–624.

Hintz SR, Kendrick DE, Stoll BJ, Vohr BR, Fanaroff AA, Donovan EF, Poole WK, Blakely ML, Wright L, Higgins R, NICHD Neonatal Research Network (2005) Neurodevelopmental and growth outcomes of extremely low birth weight infants after necrotizing enterocolitis. Pediatrics 115:696–703.

Hjern A, Thorngren-Jerneck K (2008) Perinatal complications and socio-economic differences in cerebral palsy in Sweden - a national cohort study. BMC Pediatr 8:49.

Hoerder-Suabedissen A, Molnár Z (2015) Development, evolution and pathology of neocortical subplate neurons. Nat Rev Neurosci 16:133–146.

Hofbauer R, Frass M, Gmeiner B, Sandor N, Schumann R, Wagner O, Kaye AD (2000) Effects of remifentanil on neutrophil adhesion, transmigration, and intercellular adhesion molecule expression. Acta Anaesthesiol Scand 44:1232–1237.

Hoffman DJ, Marro PJ, McGowan JE, Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos M (1994) Protective effect of MgSO4 infusion on nmda receptor binding characteristics during cerebral cortical hypoxia in the newborn piglet. Brain Res 644:144–149.

Hoke JF, Cunningham F, James MK, Muir KT, Hoffman WE (1997) Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics of remifentanil, its principle metabolite (GR90291) and alfentanil in dogs. J Pharmacol Exp Ther 281:226–232.

Honoré J-C, Kooli A, Hou X, Hamel D, Rivera JC, Picard E, Hardy P, Tremblay S, Varma DR, Jankov RP, Mancini JA, Balazy M, Chemtob S (2010) Sustained hypercapnia induces cerebral microvascular degeneration in the immature brain through induction of nitrative stress. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 298:R1522-1530.

Horak M, Petralia RS, Kaniakova M, Sans N (2014) ER to synapse trafficking of NMDA receptors. Front Cell Neurosci 8:394.

Hrbek A, Karlberg P, Olsson T (1973) Development of visual and somatosensory evoked responses in pre-term newborn infants. Electroencephalogr Clin Neurophysiol 34:225–232.

Hu L, Pan J, Zhang S, Yu J, He K, Shu S, Wang R (2017) Propofol in combination with remifentanil for cesarean section: Placental transfer and effect on mothers and newborns at different induction to delivery intervals. Taiwan J Obstet Gynecol 56:521–526.

Hu X, Xie C, He S, Zhang Y, Li Y, Jiang L (2013) Remifentanil postconditioning improves global cerebral ischemia-induced spatial learning and memory deficit in rats via inhibition of neuronal apoptosis through the PI3K signaling pathway. Neurol Sci 34:1955–1962.

Huang J, Jing S, Chen X, Bao X, Du Z, Li H, Yang T, Fan X (2016) Propofol Administration During Early Postnatal Life Suppresses Hippocampal Neurogenesis. Mol Neurobiol 53:1031–1044.

Huettner JE (2003) Kainate receptors and synaptic transmission. Prog Neurobiol 70:387–407.

Hume RI, Dingledine R, Heinemann SF (1991) Identification of a site in glutamate receptor subunits that controls calcium permeability. Science 253:1028–1031.

Humphrey T (1964) EMBRYOLOGY OF THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM: WITH SOME CORRELATIONS WITH FUNCTIONAL DEVELOPMENT. Ala J Med Sci 1:60–64.

Hüppi PS, Murphy B, Maier SE, Zientara GP, Inder TE, Barnes PD, Kikinis R, Jolesz FA, Volpe JJ (2001) Microstructural brain development after perinatal cerebral white matter injury assessed by diffusion tensor magnetic resonance imaging. Pediatrics 107:455–460.

Hyejin J, Mei L, Seongheon L, Cheolwon J, Seokjai K, Hongbeom B, Minsun K, Sungsu C, Sanghyun K (2013) Remifentanil attenuates human neutrophils activation induced by lipopolysaccharide. Immunopharmacol Immunotoxicol 35:264–271.

I

Iacopetti P, Michelini M, Stuckmann I, Oback B, Aaku-Saraste E, Huttner WB (1999) Expression of the antiproliferative gene TIS21 at the onset of neurogenesis identifies single neuroepithelial cells that switch from proliferative to neuron-generating division. Proc Natl Acad Sci USA 96:4639–4644.

Ikonomidou C, Bosch F, Miksa M, Bittigau P, Vöckler J, Dikranian K, Tenkova TI, Stefovska V, Turski L, Olney JW (1999) Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. Science 283:70–74.

Ikonomidou C, Stefovska V, Turski L (2000) Neuronal death enhanced by N-methyl-D-aspartate antagonists. Proc Natl Acad Sci USA 97:12885–12890.

Ikonomidou C, Turski L (2002) Why did NMDA receptor antagonists fail clinical trials for stroke and traumatic brain injury? Lancet Neurol 1:383–386.

Ing C, DiMaggio C, Whitehouse A, Hegarty MK, Brady J, von Ungern-Sternberg BS, Davidson A, Wood AJJ, Li G, Sun LS (2012) Long-term differences in language and cognitive function after childhood

exposure to anesthesia. Pediatrics 130:e476-485.

Ing CH, DiMaggio CJ, Malacova E, Whitehouse AJ, Hegarty MK, Feng T, Brady JE, von Ungern-Sternberg BS, Davidson AJ, Wall MM, Wood AJJ, Li G, Sun LS (2014a) Comparative analysis of outcome measures used in examining neurodevelopmental effects of early childhood anesthesia exposure. Anesthesiology 120:1319–1332.

Ing CH, DiMaggio CJ, Whitehouse AJO, Hegarty MK, Sun M, von Ungern-Sternberg BS, Davidson AJ, Wall MM, Li G, Sun LS (2014b) Neurodevelopmental outcomes after initial childhood anesthetic exposure between ages 3 and 10 years. J Neurosurg Anesthesiol 26:377–386.

Institut national de la santé et de la recherche médicale (France) (2004) Déficiences et handicaps d'origine périnatale: dépistage et prise en charge. Paris: Inserm.

Isaac JTR, Ashby MC, McBain CJ (2007) The role of the GluR2 subunit in AMPA receptor function and synaptic plasticity. Neuron 54:859–871.

Itoh K, Maki T, Shindo A, Egawa N, Liang AC, Itoh N, Lo EH, Lok J, Arai K (2016) Magnesium sulfate protects oligodendrocyte lineage cells in a rat cell-culture model of hypoxic-ischemic injury. Neurosci Res 106:66–69.

J

Jablonska B, Scafidi J, Aguirre A, Vaccarino F, Nguyen V, Borok E, Horvath TL, Rowitch DH, Gallo V (2012) Oligodendrocyte regeneration after neonatal hypoxia requires FoxO1-mediated p27Kip1 expression. J Neurosci 32:14775–14793.

Jacquemyn Y, Zecic A, Van Laere D, Roelens K (2015) The use of intravenous magnesium in non-preeclamptic pregnant women: fetal/neonatal neuroprotection. Arch Gynecol Obstet 291:969–975.

Jaiswal P, Upadhyay A, Gothwal S, Singh D, Dubey K, Garg A, Vishnubhatala S (2015) Comparison of two types of intervention to enhance placental redistribution in term infants: randomized control trial. Eur J Pediatr 174:1159–1167.

Jakovcevski I, Filipovic R, Mo Z, Rakic S, Zecevic N (2009) Oligodendrocyte development and the onset of myelination in the human fetal brain. Front Neuroanat 3:5.

James MF, Cronjé L (2004) Pheochromocytoma crisis: the use of magnesium sulfate. Anesth Analg 99:680–686, table of contents.

Jansson LC, Åkerman KE (2014) The role of glutamate and its receptors in the proliferation, migration,

differentiation and survival of neural progenitor cells. J Neural Transm (Vienna) 121:819–836.

Jantzie LL, Talos DM, Jackson MC, Park H-K, Graham DA, Lechpammer M, Folkerth RD, Volpe JJ, Jensen FE (2015) Developmental expression of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor subunits in human white and gray matter: potential mechanism of increased vulnerability in the immature brain. Cereb Cortex 25:482–495.

Janvier A, Khairy M, Kokkotis A, Cormier C, Messmer D, Barrington KJ (2004) Apnea is associated with neurodevelopmental impairment in very low birth weight infants. J Perinatol 24:763–768.

Jarvis S, Glinianaia SV, Arnaud C, Fauconnier J, Johnson A, McManus V, Topp M, Uvebrant P, Cans C, Krägeloh-Mann I, SCPE collaboration of European Cerebral Palsy Registers (2005) Case gender and severity in cerebral palsy varies with intrauterine growth. Arch Dis Child 90:474–479.

Jelin AC, Salmeen K, Gano D, Burd I, Thiet M-P (2016) Perinatal neuroprotection update. F1000Res 5.

Jelting Y, Weibel S, Afshari A, Pace NL, Jokinen J, Artmann T, Eberhart LHJ, Kranke P (2017) Patient-controlled analgesia with remifentanil vs. alternative parenteral methods for pain management in labour: a Cochrane systematic review. Anaesthesia 72:1016–1028.

Jenkins WM, Merzenich MM (1987) Reorganization of neocortical representations after brain injury: a neurophysiological model of the bases of recovery from stroke. Prog Brain Res 71:249–266.

Jeong S, Kim SJ, Jeong C, Lee S, Jeong H, Lee J, Yoo KY (2012) Neuroprotective effects of remifentanil against transient focal cerebral ischemia in rats. J Neurosurg Anesthesiol 24:51–57.

Jevtovic-Todorovic V (2012) Developmental synaptogenesis and general anesthesia: a kiss of death? Curr Pharm Des 18:6225–6231.

Jevtovic-Todorovic V (2016) General Anesthetics and Neurotoxicity: How Much Do We Know? Anesthesiol Clin 34:439–451.

Jevtovic-Todorovic V, Hartman RE, Izumi Y, Benshoff ND, Dikranian K, Zorumski CF, Olney JW, Wozniak DF (2003) Early exposure to common anesthetic agents causes widespread neurodegeneration in the developing rat brain and persistent learning deficits. J Neurosci 23:876–882.

Jeyifous O, Waites CL, Specht CG, Fujisawa S, Schubert M, Lin EI, Marshall J, Aoki C, de Silva T, Montgomery JM, Garner CC, Green WN (2009) SAP97 and CASK mediate sorting of NMDA receptors through a previously unknown secretory pathway. Nat Neurosci 12:1011–1019.

Johnson RF, Herman N, Arney TL, Johnson HV, Paschall RL, Downing JW (1997) The placental transfer

of sufentanil: effects of fetal pH, protein binding, and sufentanil concentration. Anesth Analg 84:1262–1268.

Johnson S, Hennessy E, Smith R, Trikic R, Wolke D, Marlow N (2009) Academic attainment and special educational needs in extremely preterm children at 11 years of age: the EPICure study. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed 94:F283-289.

Johnston MV, Hagberg H (2007) Sex and the pathogenesis of cerebral palsy. Dev Med Child Neurol 49:74–78.

Joly V, Richebe P, Guignard B, Fletcher D, Maurette P, Sessler DI, Chauvin M (2005) Remifentanil-induced postoperative hyperalgesia and its prevention with small-dose ketamine. Anesthesiology 103:147–155.

Juang J, Gabriel RA, Dutton RP, Palanisamy A, Urman RD (2017) Choice of Anesthesia for Cesarean Delivery: An Analysis of the National Anesthesia Clinical Outcomes Registry. Anesth Analg.

Juul SE, Beyer RP, Bammler TK, Farin FM, Gleason CA (2011) Effects of neonatal stress and morphine on murine hippocampal gene expression. Pediatr Res 69:285–292.

K

Kaindl AM, Degos V, Peineau S, Gouadon E, Chhor V, Loron G, Le Charpentier T, Josserand J, Ali C, Vivien D, Collingridge GL, Lombet A, Issa L, Rene F, Loeffler J-P, Kavelaars A, Verney C, Mantz J, Gressens P (2012) Activation of microglial N-methyl-D-aspartate receptors triggers inflammation and neuronal cell death in the developing and mature brain. Ann Neurol 72:536–549.

Kalkman CJ, Peelen L, Moons KG, Veenhuizen M, Bruens M, Sinnema G, de Jong TP (2009) Behavior and development in children and age at the time of first anesthetic exposure. Anesthesiology 110:805–812.

Kamata M, Tobias JD (2016) Remifentanil: applications in neonates. J Anesth 30:449–460.

Kan RE, Hughes SC, Rosen MA, Kessin C, Preston PG, Lobo EP (1998) Intravenous remifentanil: placental transfer, maternal and neonatal effects. Anesthesiology 88:1467–1474.

Kang SW, Choi S-K, Park E, Chae S-J, Choi S, Jin Joo H, Lee G-J, Park H-K (2011) Neuroprotective effects of magnesium-sulfate on ischemic injury mediated by modulating the release of glutamate and reduced of hyperreperfusion. Brain Res 1371:121–128.

Kapila A, Glass PS, Jacobs JR, Muir KT, Hermann DJ, Shiraishi M, Howell S, Smith RL (1995) Measured

context-sensitive half-times of remifentanil and alfentanil. Anesthesiology 83:968–975.

Káradóttir R, Cavelier P, Bergersen LH, Attwell D (2005) NMDA receptors are expressed in oligodendrocytes and activated in ischaemia. Nature 438:1162–1166.

Kato H, Narita M, Suzuki M, Yoshimoto K, Yasuhara M, Suzuki T (2007) Role of tyrosine kinase-dependent phosphorylation of NR2B subunit-containing NMDA receptor in morphine reward. Nihon Arukoru Yakubutsu Igakkai Zasshi 42:13–20.

Kawakami R, Shinohara Y, Kato Y, Sugiyama H, Shigemoto R, Ito I (2003) Asymmetrical allocation of NMDA receptor epsilon2 subunits in hippocampal circuitry. Science 300:990–994.

Keith RCM, Mackenzie ICK, Polani PE (2008) The Little Club: Memorandum on Terminology and Classification of “Cerebral Palsy.” Developmental Medicine & Child Neurology 1:27–35.

Kent AL, Wright IMR, Abdel-Latif ME, New South Wales and Australian Capital Territory Neonatal Intensive Care Units Audit Group (2012) Mortality and adverse neurologic outcomes are greater in preterm male infants. Pediatrics 129:124–131.

Kersten I, Lange AE, Haas JP, Fusch C, Lode H, Hoffmann W, Thyrian JR (2014) Chronic diseases in pregnant women: prevalence and birth outcomes based on the SNiP-study. BMC Pregnancy Childbirth 14:75.

Kessaris N, Fogarty M, Iannarelli P, Grist M, Wegner M, Richardson WD (2006) Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage. Nat Neurosci 9:173–179.

Kettenmann H, Kirchhoff F, Verkhratsky A (2013) Microglia: new roles for the synaptic stripper. Neuron 77:10–18.

Keunen K, van Elburg RM, van Bel F, Benders MJNL (2015) Impact of nutrition on brain development and its neuroprotective implications following preterm birth. Pediatr Res 77:148–155.

Kew KM, Kirtchuk L, Michell CI (2014) Intravenous magnesium sulfate for treating adults with acute asthma in the emergency department. Cochrane Database Syst Rev:CD010909.

Kinney HC, Haynes RL, Xu G, Andiman SE, Folkerth RD, Sleeper LA, Volpe JJ (2012) Neuron deficit in the white matter and subplate in periventricular leukomalacia. Ann Neurol 71:397–406.

Kirov SA, Goddard CA, Harris KM (2004) Age-dependence in the homeostatic upregulation of hippocampal dendritic spine number during blocked synaptic transmission. Neuropharmacology 47:640–648.

Klimach VJ, Cooke RW (1988) Maturation of the neonatal somatosensory evoked response in preterm infants. Dev Med Child Neurol 30:208–214.

Ko W-R, Huang J-Y, Chiang Y-C, Nfor ON, Ko P-C, Jan S-R, Lung C-C, Chang H-C, Lin L-Y, Liaw Y-P (2015) Risk of autistic disorder after exposure to general anaesthesia and surgery: a nationwide, retrospective matched cohort study. Eur J Anaesthesiol 32:303–310.

Ko W-R, Liaw Y-P, Huang J-Y, Zhao D-H, Chang H-C, Ko P-C, Jan S-R, Nfor ON, Chiang Y-C, Lin L-Y (2014) Exposure to general anesthesia in early life and the risk of attention deficit/hyperactivity disorder development: a nationwide, retrospective matched-cohort study. Paediatr Anaesth 24:741–748.

Köhler M, Kornau HC, Seeburg PH (1994) The organization of the gene for the functionally dominant alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptor subunit GluR-B. J Biol Chem 269:17367–17370.

Komuro H, Rakic P (1993) Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. Science 260:95–97.

Konstantinidou AD, Silos-Santiago I, Flaris N, Snider WD (1995) Development of the primary afferent projection in human spinal cord. J Comp Neurol 354:11–12.

Kosodo Y (2012) Interkinetic nuclear migration: beyond a hallmark of neurogenesis. Cell Mol Life Sci 69:2727–2738.

Kostovic I, Goldman-Rakic PS (1983) Transient cholinesterase staining in the mediodorsal nucleus of the thalamus and its connections in the developing human and monkey brain. J Comp Neurol 219:431–447.

Kostovic I, Rakic P (1984) Development of prestriate visual projections in the monkey and human fetal cerebrum revealed by transient cholinesterase staining. J Neurosci 4:25–42.

Kostovic I, Rakic P (1990) Developmental history of the transient subplate zone in the visual and somatosensory cortex of the macaque monkey and human brain. J Comp Neurol 297:441–470.

Kramer MS (2015) Socioeconomic disparities in preterm birth. Paediatr Perinat Epidemiol 29:169–171.

Kribs A, Pillekamp F, Hünseler C, Vierzig A, Roth B (2007) Early administration of surfactant in spontaneous breathing with nCPAP: feasibility and outcome in extremely premature infants (postmenstrual age </=27 weeks). Paediatr Anaesth 17:364–369.

Kriegstein AR, Noctor SC (2004) Patterns of neuronal migration in the embryonic cortex. Trends

Neurosci 27:392–399.

L

Lago P, Tiozzo C, Boccuzzo G, Allegro A, Zacchello F (2008) Remifentanil for percutaneous intravenous central catheter placement in preterm infant: a randomized controlled trial. Paediatr Anaesth 18:736–744.

Lamarca B, Brewer J, Wallace K (2011) IL-6-induced pathophysiology during pre-eclampsia: potential therapeutic role for magnesium sulfate? Int J Interferon Cytokine Mediat Res 2011:59–64.

Larroque B, Ancel P-Y, Marchand-Martin L, Cambonie G, Fresson J, Pierrat V, Rozé J-C, Marpeau L, Thiriez G, Alberge C, Bréart G, Kaminski M, Marret S (2011) Special care and school difficulties in 8-year-old very preterm children: the Epipage cohort study. PLoS ONE 6:e21361.

Larroque B, Ancel P-Y, Marret S, Marchand L, André M, Arnaud C, Pierrat V, Rozé J-C, Messer J, Thiriez G, Burguet A, Picaud J-C, Bréart G, Kaminski M (2008) Neurodevelopmental disabilities and special care of 5-year-old children born before 33 weeks of gestation (the EPIPAGE study): a longitudinal cohort study. Lancet 371:813–820.

Larroque B, Marret S, Ancel P-Y, Arnaud C, Marpeau L, Supernant K, Pierrat V, Rozé J-C, Matis J, Cambonie G, Burguet A, Andre M, Kaminski M, Bréart G, EPIPAGE Study Group (2003) White matter damage and intraventricular hemorrhage in very preterm infants: the EPIPAGE study. J Pediatr 143:477–483.

Lau A, Tymianski M (2010) Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. Pflugers Arch 460:525–542.

Laube B, Hirai H, Sturgess M, Betz H, Kuhse J (1997) Molecular determinants of agonist discrimination by NMDA receptor subunits: analysis of the glutamate binding site on the NR2B subunit. Neuron 18:493–503.

Laudenbach V, Mercier FJ, Rozé J-C, Larroque B, Ancel P-Y, Kaminski M, Bréart G, Diemunsch P, Subtil D, Lejus C, Fresson J, Arnaud C, Rachet B, Burguet A, Cambonie G, Epipage Study Group (2009) Anaesthesia mode for caesarean section and mortality in very preterm infants: an epidemiologic study in the EPIPAGE cohort. Int J Obstet Anesth 18:142–149.

Laurie DJ, Seeburg PH (1994) Regional and developmental heterogeneity in splicing of the rat brain NMDAR1 mRNA. J Neurosci 14:3180–3194.

Lavdas AA, Grigoriou M, Pachnis V, Parnavelas JG (1999) The medial ganglionic eminence gives rise to a population of early neurons in the developing cerebral cortex. J Neurosci 19:7881–7888.

Le Meur K, Galante M, Angulo MC, Audinat E (2007) Tonic activation of NMDA receptors by ambient glutamate of non-synaptic origin in the rat hippocampus. J Physiol (Lond) 580:373–383.

Le Ray C, Blondel B, Prunet C, Khireddine I, Deneux-Tharaux C, Goffinet F (2015) Stabilising the caesarean rate: which target population? BJOG 122:690–699.

Lecointre M, Vézier C, Bénard M, Ramdani Y, Dupré N, Brasse-Lagnel C, Henry VJ, Roy V, Marret S, Gonzalez BJ, Jégou S, Leroux-Nicollet I (2015) Age-dependent alterations of the NMDA receptor developmental profile and adult behavior in postnatally ketamine-treated mice. Dev Neurobiol 75:315–333.

Lecuyer M, Rubio M, Chollat C, Lecointre M, Jégou S, Leroux P, Cleren C, Leroux-Nicollet I, Marpeau L, Vivien D, Marret S, Gonzalez BJ (2017) Experimental and clinical evidence of differential effects of magnesium sulfate on neuroprotection and angiogenesis in the fetal brain. Pharmacol Res Perspect 5.

Lee M, Zhu F, Moodie J, Zhang Z, Cheng D, Martin J (2017) Remifentanil as an alternative to epidural analgesia for vaginal delivery: A meta-analysis of randomized trials. J Clin Anesth 39:57–63.

Lee SJ, Ralston HJP, Drey EA, Partridge JC, Rosen MA (2005) Fetal pain: a systematic multidisciplinary review of the evidence. JAMA 294:947–954.

Legendre G, Bouet P-E, Sentilhes L (2015) [Impact of simulation to reduce neonatal and maternal morbidity of shoulder dystocia]. J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris) 44:1285–1293.

Leong WL, Sng BL, Sia ATH (2011) A comparison between remifentanil and meperidine for labor analgesia: a systematic review. Anesth Analg 113:818–825.

Lerma J (2003) Roles and rules of kainate receptors in synaptic transmission. Nat Rev Neurosci 4:481–495.

Lerma J (2006) Kainate receptor physiology. Curr Opin Pharmacol 6:89–97.

Lerma J, Marques JM (2013) Kainate receptors in health and disease. Neuron 80:292–311.

Leveno KJ (1998) Tocolytic magnesium sulphate and paediatric mortality. Lancet 351:291–292; author reply 293.

Leviton A, Paneth N, Susser M, Reuss ML, Allred EN, Kuban K, Sanocka U, Hegyi T, Hiatt M, Shahrivar F, Van Marter LJ (1997) Maternal receipt of magnesium sulfate does not seem to reduce the risk of

neonatal white matter damage. Pediatrics 99:E2.

L'her E (2002) [Revision of the 3rd Consensus Conference in Intensive Care and Emergency Medicine in 1988: management of acute asthmatic crisis in adults and chidren (excluding infants)]. Rev Mal Respir 19:658–665.

L'Hommedieu CS, Nicholas D, Armes DA, Jones P, Nelson T, Pickering LK (1983) Potentiation of magnesium sulfate--induced neuromuscular weakness by gentamicin, tobramycin, and amikacin. J Pediatr 102:629–631.

Li C, Li Y, Wang K, Kong X (2015) Comparative Evaluation of Remifentanil and Dexmedetomidine in General Anesthesia for Cesarean Delivery. Med Sci Monit 21:3806–3813.

Li C, Xiao L, Liu X, Yang W, Shen W, Hu C, Yang G, He C (2013) A functional role of NMDA receptor in regulating the differentiation of oligodendrocyte precursor cells and remyelination. Glia 61:732–749.

Liddelow SA et al. (2017) Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. Nature 541:481–487.

Liedtke W, Edelmann W, Bieri PL, Chiu FC, Cowan NJ, Kucherlapati R, Raine CS (1996) GFAP is necessary for the integrity of CNS white matter architecture and long-term maintenance of myelination. Neuron 17:607–615.

Liesi P (1997) Ethanol-exposed central neurons fail to migrate and undergo apoptosis. J Neurosci Res 48:439–448.

Liggins GC, Howie RN (1972) A controlled trial of antepartum glucocorticoid treatment for prevention of the respiratory distress syndrome in premature infants. Pediatrics 50:515–525.

Lim WH (2016) Cerebral palsy: Causes, pathways, and the role of genetic variants. Am J Obstet Gynecol 214:670–671.

Lin EI, Jeyifous O, Green WN (2013) CASK regulates SAP97 conformation and its interactions with AMPA and NMDA receptors. J Neurosci 33:12067–12076.

Lin EP, Lee J-R, Lee CS, Deng M, Loepke AW (2017) Do anesthetics harm the developing human brain? An integrative analysis of animal and human studies. Neurotoxicol Teratol 60:117–128.

Lin PW, Stoll BJ (2006) Necrotising enterocolitis. Lancet 368:1271–1283.

Lin R, Tao Y, Yu Y, Xu Z, Su J, Liu Z (2014) Intravenous remifentanil versus epidural ropivacaine with sufentanil for labour analgesia: a retrospective study. PLoS ONE 9:e112283.

Lipton SA, Nakanishi N (1999) Shakespeare in love--with NMDA receptors? Nat Med 5:270–271.

Lipton SA, Rosenberg PA (1994) Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. N Engl J Med 330:613–622.

Liu F, Patterson TA, Sadovova N, Zhang X, Liu S, Zou X, Hanig JP, Paule MG, Slikker W, Wang C (2013) Ketamine-induced neuronal damage and altered N-methyl-D-aspartate receptor function in rat primary forebrain culture. Toxicol Sci 131:548–557.

Liu L, Oza S, Hogan D, Chu Y, Perin J, Zhu J, Lawn JE, Cousens S, Mathers C, Black RE (2016) Global, regional, and national causes of under-5 mortality in 2000-15: an updated systematic analysis with implications for the Sustainable Development Goals. Lancet.

Liu SJ, Zukin RS (2007) Ca2+-permeable AMPA receptors in synaptic plasticity and neuronal death. Trends Neurosci 30:126–134.

Liu X, Liu Y, Zhang J, Zhang W, Sun Y-E, Gu X, Ma Z (2014a) Intrathecal administration of roscovitine prevents remifentanil-induced postoperative hyperalgesia and decreases the phosphorylation of N-methyl-D-aspartate receptor and metabotropic glutamate receptor 5 in spinal cord. Brain Res Bull 106:9–16.

Liu X-B, Murray KD, Jones EG (2004) Switching of NMDA receptor 2A and 2B subunits at thalamic and cortical synapses during early postnatal development. J Neurosci 24:8885–8895.

Liu Z-Q, Chen X-B, Li H-B, Qiu M-T, Duan T (2014b) A comparison of remifentanil parturient-controlled intravenous analgesia with epidural analgesia: a meta-analysis of randomized controlled trials. Anesth Analg 118:598–603.

Lockshin RA, Zakeri Z (2001) Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory. Nat Rev Mol Cell Biol 2:545–550.

Logtenberg S, Oude Rengerink K, Verhoeven CJ, Freeman LM, van den Akker E, Godfried MB, van Beek E, Borchert O, Schuitemaker N, van Woerkens E, Hostijn I, Middeldorp JM, van der Post JA, Mol BW (2017) Labour pain with remifentanil patient-controlled analgesia versus epidural analgesia: a randomised equivalence trial. BJOG 124:652–660.

Lohmann C, Kessels HW (2014) The developmental stages of synaptic plasticity. J Physiol (Lond) 592:13–31.

Lowery CL, Hardman MP, Manning N, Hall RW, Anand KJS, Clancy B (2007) Neurodevelopmental changes of fetal pain. Semin Perinatol 31:275–282.

Lu LX, Yon J-H, Carter LB, Jevtovic-Todorovic V (2006) General anesthesia activates BDNF-dependent neuroapoptosis in the developing rat brain. Apoptosis 11:1603–1615.

Lu Y, Wu X, Dong Y, Xu Z, Zhang Y, Xie Z (2010) Anesthetic sevoflurane causes neurotoxicity differently in neonatal naïve and Alzheimer disease transgenic mice. Anesthesiology 112:1404–1416.

Lucas DR, Newhouse JP (1957) The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. AMA Arch Ophthalmol 58:193–201.

Lui JH, Hansen DV, Kriegstein AR (2011) Development and evolution of the human neocortex. Cell 146:18–36.

Luján R, Shigemoto R, López-Bendito G (2005) Glutamate and GABA receptor signalling in the developing brain. Neuroscience 130:567–580.

Luk KC, Kennedy TE, Sadikot AF (2003) Glutamate promotes proliferation of striatal neuronal progenitors by an NMDA receptor-mediated mechanism. J Neurosci 23:2239–2250.

Lunardi N, Hucklenbruch C, Latham JR, Scarpa J, Jevtovic-Todorovic V (2011) Isoflurane impairs immature astroglia development in vitro: the role of actin cytoskeleton. J Neuropathol Exp Neurol 70:281–291.

Lund RD, Lund JS (1972) Development of synaptic patterns in the superior colliculus of the rat. Brain Res 42:1–20.

Luo L (2002) Actin cytoskeleton regulation in neuronal morphogenesis and structural plasticity. Annu Rev Cell Dev Biol 18:601–635.

Lutz P-E, Kieffer BL (2013) Opioid receptors: distinct roles in mood disorders. Trends Neurosci 36:195–206.

M

MacGregor R, Evans D, Sugden D, Gaussen T, Levene M (1998) Outcome at 5-6 years of prematurely born children who received morphine as neonates. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed 79:F40-43.

MacLennan AH, Thompson SC, Gecz J (2015) Cerebral palsy: causes, pathways, and the role of genetic variants. Am J Obstet Gynecol 213:779–788.

Magee L, Sawchuck D, Synnes A, von Dadelszen P (2011) SOGC Clinical Practice Guideline. Magnesium sulphate for fetal neuroprotection. J Obstet Gynaecol Can 33:516–529.

Magpie Trial Follow-Up Study Collaborative Group (2007) The Magpie Trial: a randomised trial comparing magnesium sulphate with placebo for pre-eclampsia. Outcome for children at 18 months. BJOG 114:289–299.

Malik S, Vinukonda G, Vose LR, Diamond D, Bhimavarapu BBR, Hu F, Zia MT, Hevner R, Zecevic N, Ballabh P (2013) Neurogenesis continues in the third trimester of pregnancy and is suppressed by premature birth. J Neurosci 33:411–423.

Mami AG, Ballesteros J, Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos M (2006a) Effects of magnesium sulfate administration during hypoxia on Ca(2+) influx and IP(3) receptor modification in cerebral cortical neuronal nuclei of newborn piglets. Neurochem Res 31:63–70.

Mami AG, Ballesteros JR, Fritz KI, Kubin J, Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos M (2006b) Effects of magnesium sulfate administration during hypoxia on CaM kinase IV and protein tyrosine kinase activities in the cerebral cortex of newborn piglets. Neurochem Res 31:57–62.

Männistö T, Mendola P, Kiely M, O'Loughlin J, Werder E, Chen Z, Ehrenthal DB, Grantz KL (2016) Maternal psychiatric disorders and risk of preterm birth. Ann Epidemiol 26:14–20.

Mao J, Sung B, Ji R-R, Lim G (2002) Neuronal apoptosis associated with morphine tolerance: evidence for an opioid-induced neurotoxic mechanism. J Neurosci 22:7650–7661.

Marinov MB, Harbaugh KS, Hoopes PJ, Pikus HJ, Harbaugh RE (1996) Neuroprotective effects of preischemia intraarterial magnesium sulfate in reversible focal cerebral ischemia. J Neurosurg 85:117–124.

Marret S (2003) [Physiopathology of periventricular leukomalacia]. Rev Med Brux 24:416–419.

Marret S, Bonnier C, Raymackers JM, Delpech A, Evrard P, Gressens P (1999) Glycine antagonist and NO synthase inhibitor protect the developing mouse brain against neonatal excitotoxic lesions. Pediatr Res 45:337–342.

Marret S, Chollat C, de Quelen R, Pinto Cardoso G, Abily-Donval L, Chadie A, Torre S, Vanhulle C, Mellier D, Charollais A, Ancel P-Y, Réseau de périnatalité en Haute-Normandie (2015) [Course and neurological/behavioral development of preterm children]. Arch Pediatr 22:195–202.

Marret S, Gressens P, Gadisseux JF, Evrard P (1995a) Prevention by magnesium of excitotoxic neuronal death in the developing brain: an animal model for clinical intervention studies. Dev Med Child Neurol 37:473–484.

Marret S, Gressens P, Van-Maele-Fabry G, Picard J, Evrard P (1997) Caffeine-induced disturbances of

early neurogenesis in whole mouse embryo cultures. Brain Res 773:213–216.

Marret S, Marchand-Martin L, Picaud J-C, Hascoët J-M, Arnaud C, Rozé J-C, Truffert P, Larroque B, Kaminski M, Ancel P-Y, EPIPAGE Study Group (2013a) Brain injury in very preterm children and neurosensory and cognitive disabilities during childhood: the EPIPAGE cohort study. PLoS ONE 8:e62683.

Marret S, Marpeau L, Bénichou J (2008) Benefit of magnesium sulfate given before very preterm birth to protect infant brain. Pediatrics 121:225–226.

Marret S, Marpeau L, Zupan-Simunek V, Eurin D, Lévêque C, Hellot M-F, Bénichou J (2007) Magnesium sulphate given before very-preterm birth to protect infant brain: the randomised controlled PREMAG trial*. BJOG 114:310–318.

Marret S, Mukendi R, Gadisseux JF, Gressens P, Evrard P (1995b) Effect of ibotenate on brain development: an excitotoxic mouse model of microgyria and posthypoxic-like lesions. J Neuropathol Exp Neurol 54:358–370.

Marret S, Vanhulle C, Laquerriere A (2013b) Pathophysiology of cerebral palsy. Handb Clin Neurol 111:169–176.

Marret S, Zupan V, Gressens P, Lagercrantz H, Evrard P (1998) [Periventricular leukomalacia and brain protection. II. Diagnosis, sequelae and neuroprotection]. Arch Pediatr 5:538–545.

Massa H, Lacoh C-M, Vutskits L (2012) Effects of morphine on the differentiation and survival of developing pyramidal neurons during the brain growth spurt. Toxicol Sci 130:168–179.

Masuko T, Kashiwagi K, Kuno T, Nguyen ND, Pahk AJ, Fukuchi J, Igarashi K, Williams K (1999) A regulatory domain (R1-R2) in the amino terminus of the N-methyl-D-aspartate receptor: effects of spermine, protons, and ifenprodil, and structural similarity to bacterial leucine/isoleucine/valine binding protein. Mol Pharmacol 55:957–969.

Matsuda K, Fletcher M, Kamiya Y, Yuzaki M (2003) Specific assembly with the NMDA receptor 3B subunit controls surface expression and calcium permeability of NMDA receptors. J Neurosci 23:10064–10073.

Matsuda K, Kamiya Y, Matsuda S, Yuzaki M (2002) Cloning and characterization of a novel NMDA receptor subunit NR3B: a dominant subunit that reduces calcium permeability. Brain Res Mol Brain Res 100:43–52.

Mattison HA, Popovkina D, Kao JPY, Thompson SM (2014) The role of glutamate in the morphological

and physiological development of dendritic spines. Eur J Neurosci 39:1761–1770.

Mauceri D, Gardoni F, Marcello E, Di Luca M (2007) Dual role of CaMKII-dependent SAP97 phosphorylation in mediating trafficking and insertion of NMDA receptor subunit NR2A. J Neurochem 100:1032–1046.

Maulik D, Qayyum I, Powell SR, Karantza M, Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos M (2001) Post-hypoxic magnesium decreases nuclear oxidative damage in the fetal guinea pig brain. Brain Res 890:130–136.

Maulik D, Zanelli S, Numagami Y, Ohnishi ST, Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos M (1999) Oxygen free radical generation during in-utero hypoxia in the fetal guinea pig brain: the effects of maturity and of magnesium sulfate administration. Brain Res 817:117–122.

Mayer ML (2006) Glutamate receptors at atomic resolution. Nature 440:456–462.

McAnulty G, Duffy FH, Kosta S, Weisenfeld NI, Warfield SK, Butler SC, Bernstein JH, Zurakowski D, Als H (2012) School Age Effects of the Newborn Individualized Developmental Care and Assessment Program for Medically Low-Risk Preterm Infants: Preliminary Findings. J Clin Neonatol 1:184–194.

McCormick MC, Litt JS, Smith VC, Zupancic JAF (2011) Prematurity: an overview and public health implications. Annu Rev Public Health 32:367–379.

McDonald JW, Silverstein FS, Johnston MV (1990) Magnesium reduces N-methyl-D-aspartate (NMDA)-mediated brain injury in perinatal rats. Neurosci Lett 109:234–238.

McGeer PL, McGeer EG (1982) Kainic acid: The neurotoxic breakthrough. Crit Rev Toxicol 10:1–26.

McGrath PJ, Unruh AM (2002) The social context of neonatal pain. Clin Perinatol 29:555–572.

McIntosh TK, Vink R, Yamakami I, Faden AI (1989) Magnesium protects against neurological deficit after brain injury. Brain Res 482:252–260.

McManus MF, Nasrallah IM, Gopal PP, Baek WS, Golden JA (2004) Axon mediated interneuron migration. J Neuropathol Exp Neurol 63:932–941.

McNamara HC, Crowther CA, Brown J (2015) Different treatment regimens of magnesium sulphate for tocolysis in women in preterm labour. Cochrane Database Syst Rev:CD011200.

McPherson C, Haslam M, Pineda R, Rogers C, Neil JJ, Inder TE (2015) Brain Injury and Development in Preterm Infants Exposed to Fentanyl. Ann Pharmacother 49:1291–1297.

McQuillen PS, Sheldon RA, Shatz CJ, Ferriero DM (2003) Selective vulnerability of subplate neurons

after early neonatal hypoxia-ischemia. J Neurosci 23:3308–3315.

Mduma E, Ersdal H, Svensen E, Kidanto H, Auestad B, Perlman J (2015) Frequent brief on-site simulation training and reduction in 24-h neonatal mortality--an educational intervention study. Resuscitation 93:1–7.

Meddows E, Le Bourdelles B, Grimwood S, Wafford K, Sandhu S, Whiting P, McIlhinney RA (2001) Identification of molecular determinants that are important in the assembly of N-methyl-D-aspartate receptors. J Biol Chem 276:18795–18803.

Meldrum BS (2000) Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. J Nutr 130:1007S–15S.

Melzack R, Wall PD (1965) Pain mechanisms: a new theory. Science 150:971–979.

Menon R (2008) Spontaneous preterm birth, a clinical dilemma: etiologic, pathophysiologic and genetic heterogeneities and racial disparity. Acta Obstet Gynecol Scand 87:590–600.

Ment LR, Hirtz D, Hüppi PS (2009) Imaging biomarkers of outcome in the developing preterm brain. Lancet Neurol 8:1042–1055.

Ment LR, Vohr BR (2008) Preterm birth and the developing brain. Lancet Neurol 7:378–379.

Mercer BM, Goldenberg RL, Moawad AH, Meis PJ, Iams JD, Das AF, Caritis SN, Miodovnik M, Menard MK, Thurnau GR, Dombrowski MP, Roberts JM, McNellis D (1999) The preterm prediction study: effect of gestational age and cause of preterm birth on subsequent obstetric outcome. National Institute of Child Health and Human Development Maternal-Fetal Medicine Units Network. Am J Obstet Gynecol 181:1216–1221.

Mercer JS, Erickson-Owens DA, Vohr BR, Tucker RJ, Parker AB, Oh W, Padbury JF (2016) Effects of Placental Transfusion on Neonatal and 18 Month Outcomes in Preterm Infants: A Randomized Controlled Trial. J Pediatr 168:50–55.e1.

Messier AM, Ohls RK (2014) Neuroprotective effects of erythropoiesis-stimulating agents in term and preterm neonates. Curr Opin Pediatr 26:139–145.

Michel F, Lando A, Aubry C, Arnaud S, Merrot T, Martin C (2008) Experience with remifentanil-sevoflurane balanced anesthesia for abdominal surgery in neonates and children less than 2 years. Paediatr Anaesth 18:532–538.

Micu I, Jiang Q, Coderre E, Ridsdale A, Zhang L, Woulfe J, Yin X, Trapp BD, McRory JE, Rehak R, Zamponi GW, Wang W, Stys PK (2006) NMDA receptors mediate calcium accumulation in myelin

during chemical ischaemia. Nature 439:988–992.

Milanovic D, Pesic V, Loncarevic-Vasiljkovic N, Avramovic V, Tesic V, Jevtovic-Todorovic V, Kanazir S, Ruzdijic S (2017) Neonatal Propofol Anesthesia Changes Expression of Synaptic Plasticity Proteins and Increases Stereotypic and Anxyolitic Behavior in Adult Rats. Neurotox Res.

Miller SP, Vigneron DB, Henry RG, Bohland MA, Ceppi-Cozzio C, Hoffman C, Newton N, Partridge JC, Ferriero DM, Barkovich AJ (2002) Serial quantitative diffusion tensor MRI of the premature brain: development in newborns with and without injury. J Magn Reson Imaging 16:621–632.

Mintz CD, Barrett KMS, Smith SC, Benson DL, Harrison NL (2013) Anesthetics interfere with axon guidance in developing mouse neocortical neurons in vitro via a γ-aminobutyric acid type A receptor mechanism. Anesthesiology 118:825–833.

Mitha A, Foix-L'Hélias L, Arnaud C, Marret S, Vieux R, Aujard Y, Thiriez G, Larroque B, Cambonie G, Burguet A, Boileau P, Rozé JC, Kaminski M, Truffert P, Ancel P-Y, EPIPAGE Study Group (2013) Neonatal infection and 5-year neurodevelopmental outcome of very preterm infants. Pediatrics 132:e372-380.

Mitra S (2008) Opioid-induced hyperalgesia: pathophysiology and clinical implications. J Opioid Manag 4:123–130.

Mittendorf R, Covert R, Boman J, Khoshnood B, Lee KS, Siegler M (1997) Is tocolytic magnesium sulphate associated with increased total paediatric mortality? Lancet 350:1517–1518.

Mittendorf R, Dambrosia J, Pryde PG, Lee K-S, Gianopoulos JG, Besinger RE, Tomich PG (2002) Association between the use of antenatal magnesium sulfate in preterm labor and adverse health outcomes in infants. Am J Obstet Gynecol 186:1111–1118.

Mittendorf R, Dammann O, Lee K-S (2006) Brain lesions in newborns exposed to high-dose magnesium sulfate during preterm labor. J Perinatol 26:57–63.

Mittendorf R, Kuban K, Pryde PG, Gianopoulos JG, Yousefzadeh D (2005) Antenatal risk factors associated with the development of lenticulostriate vasculopathy (LSV) in neonates. J Perinatol 25:101–107.

Miyamoto A, Wake H, Ishikawa AW, Eto K, Shibata K, Murakoshi H, Koizumi S, Moorhouse AJ, Yoshimura Y, Nabekura J (2016) Microglia contact induces synapse formation in developing somatosensory cortex. Nat Commun 7:12540.

Miyata T, Kawaguchi A, Okano H, Ogawa M (2001) Asymmetric inheritance of radial glial fibers by

cortical neurons. Neuron 31:727–741.

Mondin M, Tessier B, Thoumine O (2013) Assembly of synapses: biomimetic assays to control neurexin/neuroligin interactions at the neuronal surface. Curr Protoc Neurosci Chapter 2:Unit 2.19.

Monier A, Evrard P, Gressens P, Verney C (2006) Distribution and differentiation of microglia in the human encephalon during the first two trimesters of gestation. J Comp Neurol 499:565–582.

Monti B, Contestabile A (2000) Blockade of the NMDA receptor increases developmental apoptotic elimination of granule neurons and activates caspases in the rat cerebellum. Eur J Neurosci 12:3117–3123.

Mony L, Zhu S, Carvalho S, Paoletti P (2011) Molecular basis of positive allosteric modulation of GluN2B NMDA receptors by polyamines. EMBO J 30:3134–3146.

Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B, Seeburg PH (1994) Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. Neuron 12:529–540.

Moore T, Hennessy EM, Myles J, Johnson SJ, Draper ES, Costeloe KL, Marlow N (2012) Neurological and developmental outcome in extremely preterm children born in England in 1995 and 2006: the EPICure studies. BMJ 345:e7961.

Moore TA, Wilson ME (2011) Feeding intolerance: a concept analysis. Adv Neonatal Care 11:149–154.

Morag I, Rotem I, Frisch M, Hendler I, Simchen MJ, Leibovitz L, Maayan-Metzger A, Strauss T (2017) Cumulative pain-related stress and developmental outcomes among low-risk preterm infants at one year corrected age. Early Hum Dev 109:1–5.

Mori H, Mishina M (1995) Structure and function of the NMDA receptor channel. Neuropharmacology 34:1219–1237.

Morisaki N, Togoobaatar G, Vogel JP, Souza JP, Rowland Hogue CJ, Jayaratne K, Ota E, Mori R, WHO Multicountry Survey on Maternal and Newborn Health Research Network (2014) Risk factors for spontaneous and provider-initiated preterm delivery in high and low Human Development Index countries: a secondary analysis of the World Health Organization Multicountry Survey on Maternal and Newborn Health. BJOG 121 Suppl 1:101–109.

Moriyoshi K, Masu M, Ishii T, Shigemoto R, Mizuno N, Nakanishi S (1991) Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. Nature 354:31–37.

Morrow T, Song MR, Ghosh A (2001) Sequential specification of neurons and glia by developmentally

regulated extracellular factors. Development 128:3585–3594.

Moster D, Lie RT, Markestad T (2008) Long-term medical and social consequences of preterm birth. N Engl J Med 359:262–273.

Mourani PM, Kinsella JP, Clermont G, Kong L, Perkins AM, Weissfeld L, Cutter G, Linde-Zwirble WT, Abman SH, Angus DC, Watson RS, Prolonged Outcomes after Nitric Oxide (PrONOx) Investigators (2014) Intensive care unit readmission during childhood after preterm birth with respiratory failure. J Pediatr 164:749–755.e3.

Möykkynen T, Korpi ER (2012) Acute effects of ethanol on glutamate receptors. Basic Clin Pharmacol Toxicol 111:4–13.

Mrzljak L, Uylings HB, Kostovic I, Van Eden CG (1988) Prenatal development of neurons in the human prefrontal cortex: I. A qualitative Golgi study. J Comp Neurol 271:355–386.

Muglia LJ, Katz M (2010) The enigma of spontaneous preterm birth. N Engl J Med 362:529–535.

Murdoch H, Scrutton M, Laxton CH (2013) Choice of anaesthetic agents for caesarean section: a UK survey of current practice. Int J Obstet Anesth 22:31–35.

Murry CE, Keller G (2008) Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development. Cell 132:661–680.

Mutch L, Alberman E, Hagberg B, Kodama K, Perat MV (1992) Cerebral palsy epidemiology: where are we now and where are we going? Dev Med Child Neurol 34:547–551.

N

Nadarajah B, Brunstrom JE, Grutzendler J, Wong ROL, Pearlman AL (2001) Two modes of radial migration in early development of the cerebral cortex. Nat Neurosci 4:143–150.

National Collaborating Centre for Women's and Children's Health (UK) (2015) Preterm Labour and Birth. London: National Institute for Health and Care Excellence (UK). Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK327571/ [Accessed January 20, 2016].

Navathe R, Berghella V (2016) Tocolysis for Acute Preterm Labor: Where Have We Been, Where Are We Now, and Where are We Going? Am J Perinatol 33:229–235.

Nedergaard M, Takano T, Hansen AJ (2002) Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. Nat Rev Neurosci 3:748–755.

Nelson KB (2008) Causative factors in cerebral palsy. Clin Obstet Gynecol 51:749–762.

Nelson KB, Grether JK (1995) Can magnesium sulfate reduce the risk of cerebral palsy in very low birthweight infants? Pediatrics 95:263–269.

Neubauer A-P, Voss W, Kattner E (2008) Outcome of extremely low birth weight survivors at school age: the influence of perinatal parameters on neurodevelopment. Eur J Pediatr 167:87–95.

Ngan Kee WD, Khaw KS, Ma KC, Wong ASY, Lee BB, Ng FF (2006) Maternal and neonatal effects of remifentanil at induction of general anesthesia for cesarean delivery: a randomized, double-blind, controlled trial. Anesthesiology 104:14–20.

Niswender CM, Conn PJ (2010) Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease. Annu Rev Pharmacol Toxicol 50:295–322.

Noctor SC, Martínez-Cerdeño V, Ivic L, Kriegstein AR (2004) Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. Nat Neurosci 7:136–144.

Norman E, Wikström S, Hellström-Westas L, Turpeinen U, Hämäläinen E, Fellman V (2011) Rapid sequence induction is superior to morphine for intubation of preterm infants: a randomized controlled trial. J Pediatr 159:893–899.e1.

Norman E, Wikström S, Rosén I, Fellman V, Hellström-Westas L (2013) Premedication for intubation with morphine causes prolonged depression of electrocortical background activity in preterm infants. Pediatr Res 73:87–94.

Noskova P, Blaha J, Bakhouche H, Kubatova J, Ulrichova J, Marusicova P, Smisek J, Parizek A, Slanar O, Michalek P (2015) Neonatal effect of remifentanil in general anaesthesia for caesarean section: a randomized trial. BMC Anesthesiol 15:38.

Nunes EA, Medeiros LF, de Freitas JS, Macedo IC, Kuo J, de Souza A, Rozisky JR, Caumo W, Torres ILS (2016) Morphine exposure during early life alters thermal and mechanical thresholds in rats. Int J Dev Neurosci.

O

Oberto A, Marks N, Evans HL, Guidotti A (1996) Lead (Pb+2) promotes apoptosis in newborn rat cerebellar neurons: pathological implications. J Pharmacol Exp Ther 279:435–442.

O'Callaghan ME, MacLennan AH, Gibson CS, McMichael GL, Haan EA, Broadbent JL, Goldwater PN, Dekker GA, Australian Collaborative Cerebral Palsy Research Group (2011) Epidemiologic associations

with cerebral palsy. Obstet Gynecol 118:576–582.

Oddie S, Tuffnell DJ, McGuire W (2015) Antenatal magnesium sulfate: Neuro-protection for preterm infants. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed 100:F553-557.

Odom MJ, Zuckerman SL, Mocco J (2013) The role of magnesium in the management of cerebral vasospasm. Neurol Res Int 2013:943914.

Ohashi Y, Baghirzada L, Sumikura H, Balki M (2016) Remifentanil for labor analgesia: a comprehensive review. J Anesth 30:1020–1030.

Oladosu FA, Conrad MS, O'Buckley SC, Rashid NU, Slade GD, Nackley AG (2015) Mu Opioid Splice Variant MOR-1K Contributes to the Development of Opioid-Induced Hyperalgesia. PLoS ONE 10:e0135711.

O'Leary JD, Janus M, Duku E, Wijeysundera DN, To T, Li P, Maynes JT, Crawford MW (2016) A Population-based Study Evaluating the Association between Surgery in Early Life and Child Development at Primary School Entry. Anesthesiology 125:272–279.

Olney JW (1969) Glutaate-induced retinal degeneration in neonatal mice. Electron microscopy of the acutely evolving lesion. J Neuropathol Exp Neurol 28:455–474.

Olney JW (1986) Inciting excitotoxic cytocide among central neurons. Adv Exp Med Biol 203:631–645.

Olney JW, Sharpe LG (1969) Brain lesions in an infant rhesus monkey treated with monsodium glutamate. Science 166:386–388.

Olney JW, Wozniak DF, Farber NB, Jevtovic-Todorovic V, Bittigau P, Ikonomidou C (2002) The enigma of fetal alcohol neurotoxicity. Ann Med 34:109–119.

Olney JW, Wozniak DF, Jevtovic-Todorovic V, Ikonomidou C (2001) Glutamate signaling and the fetal alcohol syndrome. Ment Retard Dev Disabil Res Rev 7:267–275.

Omer M, Molloy EJ (2017) QUESTION 2: Is permissive hypercapnia beneficial to preterm infants? Arch Dis Child 102:113–115.

O'Rahilly R, Müller F (1986) The meninges in human development. J Neuropathol Exp Neurol 45:588–608.

O'Rourke NA, Dailey ME, Smith SJ, McConnell SK (1992) Diverse migratory pathways in the developing cerebral cortex. Science 258:299–302.

Ortinau C, Neil J (2015) The neuroanatomy of prematurity: normal brain development and the impact

of preterm birth. Clin Anat 28:168–183.

O'Shea TM, Allred EN, Dammann O, Hirtz D, Kuban KCK, Paneth N, Leviton A, ELGAN study Investigators (2009) The ELGAN study of the brain and related disorders in extremely low gestational age newborns. Early Hum Dev 85:719–725.

O'Shea TM, Klinepeter KL, Meis PJ, Dillard RG (1998) Intrauterine infection and the risk of cerebral palsy in very low-birthweight infants. Paediatr Perinat Epidemiol 12:72–83.

Oskoui M, Messerlian C, Blair A, Gamache P, Shevell M (2016) Variation in cerebral palsy profile by socio-economic status. Dev Med Child Neurol 58:160–166.

P

Pachernegg S, Strutz-Seebohm N, Hollmann M (2012) GluN3 subunit-containing NMDA receptors: not just one-trick ponies. Trends Neurosci 35:240–249.

Palacios-Filardo J, Aller MI, Lerma J (2016) Synaptic Targeting of Kainate Receptors. Cereb Cortex 26:1464–1472.

Paneth N, Jetton J, Pinto-Martin J, Susser M (1997) Magnesium sulfate in labor and risk of neonatal brain lesions and cerebral palsy in low birth weight infants. The Neonatal Brain Hemorrhage Study Analysis Group. Pediatrics 99:E1.

Panov A, Scarpa A (1996) Mg2+ control of respiration in isolated rat liver mitochondria. Biochemistry 35:12849–12856.

Paoletti P (2011) Molecular basis of NMDA receptor functional diversity. Eur J Neurosci 33:1351–1365.

Paoletti P, Bellone C, Zhou Q (2013) NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. Nat Rev Neurosci 14:383–400.

Paoletti P, Neyton J (2007) NMDA receptor subunits: function and pharmacology. Curr Opin Pharmacol 7:39–47.

Paoletti P, Neyton J, Ascher P (1995) Glycine-independent and subunit-specific potentiation of NMDA responses by extracellular Mg2+. Neuron 15:1109–1120.

Paoletti P, Perin-Dureau F, Fayyazuddin A, Le Goff A, Callebaut I, Neyton J (2000) Molecular organization of a zinc binding n-terminal modulatory domain in a NMDA receptor subunit. Neuron 28:911–925.

Papadia S, Soriano FX, Léveillé F, Martel M-A, Dakin KA, Hansen HH, Kaindl A, Sifringer M, Fowler J, Stefovska V, McKenzie G, Craigon M, Corriveau R, Ghazal P, Horsburgh K, Yankner BA, Wyllie DJA, Ikonomidou C, Hardingham GE (2008) Synaptic NMDA receptor activity boosts intrinsic antioxidant defenses. Nat Neurosci 11:476–487.

Papile LA, Burstein J, Burstein R, Koffler H (1978) Incidence and evolution of subependymal and intraventricular hemorrhage: a study of infants with birth weights less than 1,500 gm. J Pediatr 92:529–534.

Papouin T, Ladépêche L, Ruel J, Sacchi S, Labasque M, Hanini M, Groc L, Pollegioni L, Mothet J-P, Oliet SHR (2012) Synaptic and extrasynaptic NMDA receptors are gated by different endogenous coagonists. Cell 150:633–646.

Parent AJ, Beaudet N, Beaudry H, Bergeron J, Bérubé P, Drolet G, Sarret P, Gendron L (2012) Increased anxiety-like behaviors in rats experiencing chronic inflammatory pain. Behav Brain Res 229:160–167.

Park S-W, Yi J-W, Kim Y-M, Kang J-M, Kim DO, Shin M-S, Kim C-J, Lee DI, Kim D-H, Lee BJ (2011) Remifentanil alleviates transient cerebral ischemia-induced memory impairment through suppression of apoptotic neuronal cell death in gerbils. Korean J Anesthesiol 61:63–68.

Parpura V, Verkhratsky A (2013) Astroglial amino acid-based transmitter receptors. Amino Acids 44:1151–1158.

Pasternak GW, Pan Y-X (2013) Mu opioids and their receptors: evolution of a concept. Pharmacol Rev 65:1257–1317.

Patel RM (2016) Short- and Long-Term Outcomes for Extremely Preterm Infants. Am J Perinatol 33:318–328.

Patel SS, Spencer CM (1996) Remifentanil. Drugs 52:417–427; discussion 428.

Paternain AV, Cohen A, Stern-Bach Y, Lerma J (2003) A role for extracellular Na+ in the channel gating of native and recombinant kainate receptors. J Neurosci 23:8641–8648.

Paternain AV, Herrera MT, Nieto MA, Lerma J (2000) GluR5 and GluR6 kainate receptor subunits coexist in hippocampal neurons and coassemble to form functional receptors. J Neurosci 20:196–205.

Paton MCB, McDonald CA, Allison BJ, Fahey MC, Jenkin G, Miller SL (2017) Perinatal Brain Injury As a Consequence of Preterm Birth and Intrauterine Inflammation: Designing Targeted Stem Cell

Therapies. Front Neurosci 11:200.

Paule MG, Li M, Allen RR, Liu F, Zou X, Hotchkiss C, Hanig JP, Patterson TA, Slikker W, Wang C (2011) Ketamine anesthesia during the first week of life can cause long-lasting cognitive deficits in rhesus monkeys. Neurotoxicol Teratol 33:220–230.

Pazaiti A, Soubasi V, Spandou E, Karkavelas G, Georgiou T, Karalis P, Guiba-Tziampiri O (2009) Evaluation of long-lasting sensorimotor consequences following neonatal hypoxic-ischemic brain injury in rats: the neuroprotective role of MgSO4. Neonatology 95:33–40.

Peacock JL, Marston L, Marlow N, Calvert SA, Greenough A (2012) Neonatal and infant outcome in boys and girls born very prematurely. Pediatr Res 71:305–310.

Pekny M, Nilsson M (2005) Astrocyte activation and reactive gliosis. Glia 50:427–434.

Penido MG, de Oliveira Silva DF, Tavares EC, Silva YP (2011) Propofol versus midazolam for intubating preterm neonates: a randomized controlled trial. J Perinatol 31:356–360.

Penido MG, Garra R, Sammartino M, Pereira e Silva Y (2010) Remifentanil in neonatal intensive care and anaesthesia practice. Acta Paediatr 99:1454–1463.

Penn AA, Gressens P, Fleiss B, Back SA, Gallo V (2016) Controversies in preterm brain injury. Neurobiol Dis 92:90–101.

Penrice J, Amess PN, Punwani S, Wylezinska M, Tyszczuk L, D'Souza P, Edwards AD, Cady EB, Wyatt JS, Reynolds EO (1997) Magnesium sulfate after transient hypoxia-ischemia fails to prevent delayed cerebral energy failure in the newborn piglet. Pediatr Res 41:443–447.

Perego C, Vanoni C, Bossi M, Massari S, Basudev H, Longhi R, Pietrini G (2000) The GLT-1 and GLAST glutamate transporters are expressed on morphologically distinct astrocytes and regulated by neuronal activity in primary hippocampal cocultures. J Neurochem 75:1076–1084.

Pereira e Silva Y, Gomez RS, Barbosa RF, Simões e Silva AC (2005) Remifentanil for sedation and analgesia in a preterm neonate with respiratory distress syndrome. Paediatr Anaesth 15:993–996.

Pereira e Silva Y, Gomez RS, Marcatto J de O, Maximo TA, Barbosa RF, Simões e Silva AC (2007) Morphine versus remifentanil for intubating preterm neonates. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed 92:F293-294.

Pérez-Otaño I, Ehlers MD (2004) Learning from NMDA receptor trafficking: clues to the development and maturation of glutamatergic synapses. Neurosignals 13:175–189.

Pérez-Otaño I, Larsen RS, Wesseling JF (2016) Emerging roles of GluN3-containing NMDA receptors in

the CNS. Nat Rev Neurosci 17:623–635.

Perez-Otano I, Schulteis CT, Contractor A, Lipton SA, Trimmer JS, Sucher NJ, Heinemann SF (2001) Assembly with the NR1 subunit is required for surface expression of NR3A-containing NMDA receptors. J Neurosci 21:1228–1237.

Perlman JM (2005) Morphine, hypotension, and intraventricular hemorrhage in the ventilated premature infant. Pediatrics 115:1416–1418.

Perlman JM, Goodman S, Kreusser KL, Volpe JJ (1985) Reduction in intraventricular hemorrhage by elimination of fluctuating cerebral blood-flow velocity in preterm infants with respiratory distress syndrome. N Engl J Med 312:1353–1357.

Perlman JM, McMenamin JB, Volpe JJ (1983) Fluctuating cerebral blood-flow velocity in respiratory-distress syndrome. Relation to the development of intraventricular hemorrhage. N Engl J Med 309:204–209.

Perlman JM, Wyllie J, Kattwinkel J, Wyckoff MH, Aziz K, Guinsburg R, Kim H-S, Liley HG, Mildenhall L, Simon WM, Szyld E, Tamura M, Velaphi S, Neonatal Resuscitation Chapter Collaborators (2015) Part 7: Neonatal Resuscitation: 2015 International Consensus on Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care Science With Treatment Recommendations. Circulation 132:S204-241.

Peters KL, Rosychuk RJ, Hendson L, Coté JJ, McPherson C, Tyebkhan JM (2009) Improvement of short- and long-term outcomes for very low birth weight infants: Edmonton NIDCAP trial. Pediatrics 124:1009–1020.

Pfeiffer SE, Warrington AE, Bansal R (1993) The oligodendrocyte and its many cellular processes. Trends Cell Biol 3:191–197.

Pharoah POD (2007) Prevalence and pathogenesis of congenital anomalies in cerebral palsy. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed 92:F489-493.

Pierrat V, Marchand-Martin L, Arnaud C, Kaminski M, Resche-Rigon M, Lebeaux C, Bodeau-Livinec F, Morgan AS, Goffinet F, Marret S, Ancel P-Y, and the EPIPAGE-2 writing group (2017) Neurodevelopmental outcome at 2 years for preterm children born at 22 to 34 weeks' gestation in France in 2011: EPIPAGE-2 cohort study. BMJ 358:j3448.

Pilli J, Kumar SS (2012) Triheteromeric N-methyl-D-aspartate receptors differentiate synaptic inputs onto pyramidal neurons in somatosensory cortex: involvement of the GluN3A subunit. Neuroscience 222:75–88.

Piña-Crespo JC, Gibb AJ (2002) Subtypes of NMDA receptors in new-born rat hippocampal granule cells. J Physiol (Lond) 541:41–64.

Pinheiro P, Mulle C (2006) Kainate receptors. Cell Tissue Res 326:457–482.

Platt MJ (2014) Outcomes in preterm infants. Public Health 128:399–403.

Plunkett J, Muglia LJ (2008) Genetic contributions to preterm birth: implications from epidemiological and genetic association studies. Ann Med 40:167–195.

Poets CF, Roberts RS, Schmidt B, Whyte RK, Asztalos EV, Bader D, Bairam A, Moddemann D, Peliowski A, Rabi Y, Solimano A, Nelson H, Canadian Oxygen Trial Investigators (2015) Association Between Intermittent Hypoxemia or Bradycardia and Late Death or Disability in Extremely Preterm Infants. JAMA 314:595–603.

Pogledic I, Kostovic I, Fallet-Bianco C, Adle-Biassette H, Gressens P, Verney C (2014) Involvement of the subplate zone in preterm infants with periventricular white matter injury. Brain Pathol 24:128–141.

Pontious A, Kowalczyk T, Englund C, Hevner RF (2008) Role of intermediate progenitor cells in cerebral cortex development. Dev Neurosci 30:24–32.

Portera-Cailliau C, Price DL, Martin LJ (1997) Excitotoxic neuronal death in the immature brain is an apoptosis-necrosis morphological continuum. J Comp Neurol 378:70–87.

Powell EM, Geller HM (1999) Dissection of astrocyte-mediated cues in neuronal guidance and process extension. Glia 26:73–83.

Pryde PG, Mittendorf R (2009) Contemporary usage of obstetric magnesium sulfate: indication, contraindication, and relevance of dose. Obstet Gynecol 114:669–673.

Punnakkal P, Jendritza P, Köhr G (2012) Influence of the intracellular GluN2 C-terminal domain on NMDA receptor function. Neuropharmacology 62:1985–1992.

Q

Qiu S, Zhang X, Cao J, Yang W, Yan Y, Shan L, Zheng J, Luo J (2009) An endoplasmic reticulum retention signal located in the extracellular amino-terminal domain of the NR2A subunit of N-Methyl-D-aspartate receptors. J Biol Chem 284:20285–20298.

R

Rabe H, Sawyer A, Amess P, Ayers S, Brighton Perinatal Study Group (2016) Neurodevelopmental Outcomes at 2 and 3.5 Years for Very Preterm Babies Enrolled in a Randomized Trial of Milking the Umbilical Cord versus Delayed Cord Clamping. Neonatology 109:113–119.

Rakic P (1995) A small step for the cell, a giant leap for mankind: a hypothesis of neocortical expansion during evolution. Trends Neurosci 18:383–388.

Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G (2016) Rang and Dale's pharmacology, Eighth edition. Edinburgh: Elsevier, Churchill Livingstone.

Ranger M, Chau CMY, Garg A, Woodward TS, Beg MF, Bjornson B, Poskitt K, Fitzpatrick K, Synnes AR, Miller SP, Grunau RE (2013) Neonatal pain-related stress predicts cortical thickness at age 7 years in children born very preterm. PLoS ONE 8:e76702.

Ranger M, Grunau RE (2014) Early repetitive pain in preterm infants in relation to the developing brain. Pain Manag 4:57–67.

Ranger M, Zwicker JG, Chau CMY, Park MTM, Chakravarthy MM, Poskitt K, Miller SP, Bjornson BH, Tam EWY, Chau V, Synnes AR, Grunau RE (2015) Neonatal Pain and Infection Relate to Smaller Cerebellum in Very Preterm Children at School Age. J Pediatr 167:292–298.e1.

Rankin J, Cans C, Garne E, Colver A, Dolk H, Uldall P, Amar E, Krageloh-Mann I (2010) Congenital anomalies in children with cerebral palsy: a population-based record linkage study. Dev Med Child Neurol 52:345–351.

Rantone TH, Grönlund JU, Jalonen JO, Ekblad UU, Kääpä PO, Kero PO, Välimäki IAT (2002) Comparison of the effects of antenatal magnesium sulphate and ritodrine exposure on circulatory adaptation in preterm infants. Clin Physiol Funct Imaging 22:13–17.

Raybaud C, Ahmad T, Rastegar N, Shroff M, Al Nassar M (2013) The premature brain: developmental and lesional anatomy. Neuroradiology 55 Suppl 2:23–40.

Reemst K, Noctor SC, Lucassen PJ, Hol EM (2016) The Indispensable Roles of Microglia and Astrocytes during Brain Development. Front Hum Neurosci 10:566.

Rees CM, Pierro A, Eaton S (2007) Neurodevelopmental outcomes of neonates with medically and surgically treated necrotizing enterocolitis. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed 92:F193-198.

Reid SM, Meehan E, McIntyre S, Goldsmith S, Badawi N, Reddihough DS, Australian Cerebral Palsy

Register Group (2016) Temporal trends in cerebral palsy by impairment severity and birth gestation. Dev Med Child Neurol 58 Suppl 2:25–35.

Reynolds IJ, Hastings TG (1995) Glutamate induces the production of reactive oxygen species in cultured forebrain neurons following NMDA receptor activation. J Neurosci 15:3318–3327.

Rice D, Barone S (2000) Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. Environ Health Perspect 108 Suppl 3:511–533.

Rice JE, Vannucci RC, Brierley JB (1981) The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. Ann Neurol 9:131–141.

Riddle A, Maire J, Gong X, Chen KX, Kroenke CD, Hohimer AR, Back SA (2012) Differential susceptibility to axonopathy in necrotic and non-necrotic perinatal white matter injury. Stroke 43:178–184.

Rigby-Jones AE, Priston MJ, Sneyd JR, McCabe AP, Davis GI, Tooley MA, Thorne GC, Wolf AR (2007) Remifentanil-midazolam sedation for paediatric patients receiving mechanical ventilation after cardiac surgery. Br J Anaesth 99:252–261.

Riley AW (2004) Evidence that school-age children can self-report on their health. Ambul Pediatr 4:371–376.

Rivosecchi RM, Rice MJ, Smithburger PL, Buckley MS, Coons JC, Kane-Gill SL (2014) An evidence based systematic review of remifentanil associated opioid-induced hyperalgesia. Expert Opin Drug Saf 13:587–603.

Rizzi S, Carter LB, Ori C, Jevtovic-Todorovic V (2008) Clinical anesthesia causes permanent damage to the fetal guinea pig brain. Brain Pathol 18:198–210.

Roberts D, Brown J, Medley N, Dalziel SR (2017) Antenatal corticosteroids for accelerating fetal lung maturation for women at risk of preterm birth. Cochrane Database Syst Rev 3:CD004454.

Roberts D, Dalziel S (2006) Antenatal corticosteroids for accelerating fetal lung maturation for women at risk of preterm birth. Cochrane Database Syst Rev:CD004454.

Rodkey EN, Pillai Riddell R (2013) The infancy of infant pain research: the experimental origins of infant pain denial. J Pain 14:338–350.

Rodríguez-Moreno A, Banerjee A, Paulsen O (2010) Presynaptic NMDA Receptors and Spike Timing-Dependent Depression at Cortical Synapses. Front Synaptic Neurosci 2:18.

Rodríguez-Moreno A, Sihra TS (2007) Metabotropic actions of kainate receptors in the CNS. J

Neurochem 103:2121–2135.

Rodríguez-Muñoz M, Sánchez-Blázquez P, Vicente-Sánchez A, Berrocoso E, Garzón J (2012) The mu-opioid receptor and the NMDA receptor associate in PAG neurons: implications in pain control. Neuropsychopharmacology 37:338–349.

Roeckel L-A, Le Coz G-M, Gavériaux-Ruff C, Simonin F (2016) Opioid-induced hyperalgesia: Cellular and molecular mechanisms. Neuroscience 338:160–182.

Rogers M, Dani JA (1995) Comparison of quantitative calcium flux through NMDA, ATP, and ACh receptor channels. Biophys J 68:501–506.

Rosenbaum P, Paneth N, Leviton A, Goldstein M, Bax M, Damiano D, Dan B, Jacobsson B (2007) A report: the definition and classification of cerebral palsy April 2006. Dev Med Child Neurol Suppl 109:8–14.

Ross AK, Davis PJ, Dear Gd GL, Ginsberg B, McGowan FX, Stiller RD, Henson LG, Huffman C, Muir KT (2001) Pharmacokinetics of remifentanil in anesthetized pediatric patients undergoing elective surgery or diagnostic procedures. Anesth Analg 93:1393–1401, table of contents.

Rouse DJ et al. (2008) A randomized, controlled trial of magnesium sulfate for the prevention of cerebral palsy. N Engl J Med 359:895–905.

Roy P, Kumar A, Kaur IR, Faridi MMA (2014) Gender differences in outcomes of low birth weight and preterm neonates: the male disadvantage. J Trop Pediatr 60:480–481.

Royal College of Physicians of Ireland (2013) Antenatal magnesium sulphate for fetal neuroprotection. Available at: http://www.rcpi.ie/content/docs/000001/780_5_media.pdf.

Rozas JL, Paternain AV, Lerma J (2003) Noncanonical signaling by ionotropic kainate receptors. Neuron 39:543–553.

Rozé J-C, Denizot S, Carbajal R, Ancel P-Y, Kaminski M, Arnaud C, Truffert P, Marret S, Matis J, Thiriez G, Cambonie G, André M, Larroque B, Bréart G (2008) Prolonged sedation and/or analgesia and 5-year neurodevelopment outcome in very preterm infants: results from the EPIPAGE cohort. Arch Pediatr Adolesc Med 162:728–733.

Rozisky JR, da Silva RS, Adachi LS, Capiotti KM, Ramos DB, Bogo MR, Bonan CD, Sarkis JJF, Torres IL da S (2010) Neonatal morphine exposure alters E-NTPDase activity and gene expression pattern in spinal cord and cerebral cortex of rats. Eur J Pharmacol 642:72–76.

Rozisky JR, Laste G, de Macedo IC, Santos VS, Krolow R, Noschang C, Vanzella C, Bertoldi K, Lovatel

GA, de Souza ICC, Siqueira IR, Dalmaz C, Caumo W, Torres ILS (2013) Neonatal morphine administration leads to changes in hippocampal BDNF levels and antioxidant enzyme activity in the adult life of rats. Neurochem Res 38:494–503.

Rozisky JR, Medeiros LF, Adachi LS, Espinosa J, de Souza A, Neto AS, Bonan CD, Caumo W, Torres IL da S (2011) Morphine exposure in early life increases nociceptive behavior in a rat formalin tonic pain model in adult life. Brain Res 1367:122–129.

Rozisky JR, Nonose Y, Laste G, Dos Santos VS, de Macedo IC, Battastini AMO, Caumo W, Torres IL (2012) Morphine treatment alters nucleotidase activities in rat blood serum. J Exp Pharmacol 4:187–193.

Ruangkit C, Moroney V, Viswanathan S, Bhola M (2015) Safety and efficacy of delayed umbilical cord clamping in multiple and singleton premature infants - A quality improvement study. J Neonatal Perinatal Med 8:393–402.

Rubio-Gurung S, Putet G, Touzet S, Gauthier-Moulinier H, Jordan I, Beissel A, Labaune J-M, Blanc S, Amamra N, Balandras C, Rudigoz R-C, Colin C, Picaud J-C (2014) In situ simulation training for neonatal resuscitation: an RCT. Pediatrics 134:e790-797.

Rudin M, Ben-Abraham R, Gazit V, Tendler Y, Tashlykov V, Katz Y (2005) Single-dose ketamine administration induces apoptosis in neonatal mouse brain. J Basic Clin Physiol Pharmacol 16:231–243.

Ruiz A, Sachidhanandam S, Utvik JK, Coussen F, Mulle C (2005) Distinct subunits in heteromeric kainate receptors mediate ionotropic and metabotropic function at hippocampal mossy fiber synapses. J Neurosci 25:11710–11718.

S

Saab AS et al. (2016) Oligodendroglial NMDA Receptors Regulate Glucose Import and Axonal Energy Metabolism. Neuron 91:119–132.

Salter MG, Fern R (2005) NMDA receptors are expressed in developing oligodendrocyte processes and mediate injury. Nature 438:1167–1171.

Salter MW, Kalia LV (2004) Src kinases: a hub for NMDA receptor regulation. Nat Rev Neurosci 5:317–328.

Sam WJ, Hammer GB, Drover DR (2009) Population pharmacokinetics of remifentanil in infants and

children undergoing cardiac surgery. BMC Anesthesiol 9:5.

Sameshima H, Ota A, Ikenoue T (1999) Pretreatment with magnesium sulfate protects against hypoxic-ischemic brain injury but postasphyxial treatment worsens brain damage in seven-day-old rats. Am J Obstet Gynecol 180:725–730.

Sammartino M, Bocci MG, Ferro G, Mercurio G, Papacci P, Conti G, Lepore D, Molle F (2003) Efficacy and safety of continuous intravenous infusion of remifentanil in preterm infants undergoing laser therapy in retinopathy of prematurity: clinical experience. Paediatr Anaesth 13:596–602.

Sammartino M, Garra R, Sbaraglia F, De Riso M, Continolo N, Papacci P (2011) Experience of remifentanil in extremely low-birth-weight babies undergoing laparotomy. Pediatr Neonatol 52:176–179.

Sandstead HH (2013) Human zinc deficiency: discovery to initial translation. Adv Nutr 4:76–81.

Sans N, Wang PY, Du Q, Petralia RS, Wang Y-X, Nakka S, Blumer JB, Macara IG, Wenthold RJ (2005) mPins modulates PSD-95 and SAP102 trafficking and influences NMDA receptor surface expression. Nat Cell Biol 7:1179–1190.

Scallet AC, Schmued LC, Slikker W, Grunberg N, Faustino PJ, Davis H, Lester D, Pine PS, Sistare F, Hanig JP (2004) Developmental neurotoxicity of ketamine: morphometric confirmation, exposure parameters, and multiple fluorescent labeling of apoptotic neurons. Toxicol Sci 81:364–370.

Schendel DE, Berg CJ, Yeargin-Allsopp M, Boyle CA, Decoufle P (1996) Prenatal magnesium sulfate exposure and the risk for cerebral palsy or mental retardation among very low-birth-weight children aged 3 to 5 years. JAMA 276:1805–1810.

Scher AI, Petterson B, Blair E, Ellenberg JH, Grether JK, Haan E, Reddihough DS, Yeargin-Allsopp M, Nelson KB (2002) The risk of mortality or cerebral palsy in twins: a collaborative population-based study. Pediatr Res 52:671–681.

Schiffer HH, Swanson GT, Heinemann SF (1997) Rat GluR7 and a carboxy-terminal splice variant, GluR7b, are functional kainate receptor subunits with a low sensitivity to glutamate. Neuron 19:1141–1146.

Schmidt B, Anderson PJ, Doyle LW, Dewey D, Grunau RE, Asztalos EV, Davis PG, Tin W, Moddemann D, Solimano A, Ohlsson A, Barrington KJ, Roberts RS, Caffeine for Apnea of Prematurity (CAP) Trial Investigators (2012) Survival without disability to age 5 years after neonatal caffeine therapy for apnea of prematurity. JAMA 307:275–282.

Schmidt B, Roberts RS, Davis P, Doyle LW, Barrington KJ, Ohlsson A, Solimano A, Tin W, Caffeine for Apnea of Prematurity Trial Group (2007) Long-term effects of caffeine therapy for apnea of prematurity. N Engl J Med 357:1893–1902.

Schnabel A, Hahn N, Broscheit J, Muellenbach RM, Rieger L, Roewer N, Kranke P (2012) Remifentanil for labour analgesia: a meta-analysis of randomised controlled trials. Eur J Anaesthesiol 29:177–185.

Schrott LM, Franklin L 'Tonya M, Serrano PA (2008) Prenatal opiate exposure impairs radial arm maze performance and reduces levels of BDNF precursor following training. Brain Res 1198:132–140.

Schubert F, Gallinat J, Seifert F, Rinneberg H (2004) Glutamate concentrations in human brain using single voxel proton magnetic resonance spectroscopy at 3 Tesla. Neuroimage 21:1762–1771.

Schuurmans J, Benders M, Lemmers P, van Bel F (2015) Neonatal morphine in extremely and very preterm neonates: its effect on the developing brain - a review. J Matern Fetal Neonatal Med 28:222–228.

Seibenhener ML, Wooten MC (2015) Use of the Open Field Maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. J Vis Exp:e52434.

Sellier E, Platt MJ, Andersen GL, Krägeloh-Mann I, De La Cruz J, Cans C, Surveillance of Cerebral Palsy Network (2016) Decreasing prevalence in cerebral palsy: a multi-site European population-based study, 1980 to 2003. Dev Med Child Neurol 58:85–92.

Sentilhes L et al. (2017) Prevention of spontaneous preterm birth: Guidelines for clinical practice from the French College of Gynaecologists and Obstetricians (CNGOF). Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 210:217–224.

Seo KH, Choi JW, Jung HS, Yoo H, Joo JD (2017) The Effects of Remifentanil on Expression of High Mobility Group Box 1 in Septic Rats. J Korean Med Sci 32:542–551.

Setou M, Nakagawa T, Seog DH, Hirokawa N (2000) Kinesin superfamily motor protein KIF17 and mLin-10 in NMDA receptor-containing vesicle transport. Science 288:1796–1802.

Shah DK, Doyle LW, Anderson PJ, Bear M, Daley AJ, Hunt RW, Inder TE (2008) Adverse neurodevelopment in preterm infants with postnatal sepsis or necrotizing enterocolitis is mediated by white matter abnormalities on magnetic resonance imaging at term. J Pediatr 153:170–175, 175.e1.

Shah V, Ohlsson A (2002) The effectiveness of premedication for endotracheal intubation in mechanically ventilated neonates. A systematic review. Clin Perinatol 29:535–554.

Shaylor R, Ginosar Y, Avidan A, Eventov-Friedman S, Amison N, Weiniger CF (2016) Pre-delivery remifentanil infusion for placenta accreta cesarean delivery under general anesthesia: an observational study. J Matern Fetal Neonatal Med 29:2793–2797.

Shen X, Dong Y, Xu Z, Wang H, Miao C, Soriano SG, Sun D, Baxter MG, Zhang Y, Xie Z (2013a) Selective anesthesia-induced neuroinflammation in developing mouse brain and cognitive impairment. Anesthesiology 118:502–515.

Shen X, Liu Y, Xu S, Zhao Q, Guo X, Shen R, Wang F (2013b) Early life exposure to sevoflurane impairs adulthood spatial memory in the rat. Neurotoxicology 39:45–56.

Sheng M, Cummings J, Roldan LA, Jan YN, Jan LY (1994) Changing subunit composition of heteromeric NMDA receptors during development of rat cortex. Nature 368:144–147.

Sheng M, Kim MJ (2002) Postsynaptic signaling and plasticity mechanisms. Science 298:776–780.

Sherwin CMT, Balch A, Campbell SC, Fredrickson J, Clark EAS, Varner M, Stockmann C, Korgenski EK, Bonkowsky JL, Spigarelli MG (2014) Maternal magnesium sulphate exposure predicts neonatal magnesium blood concentrations. Basic Clin Pharmacol Toxicol 114:318–322.

Shi Q, Guo L, Patterson TA, Dial S, Li Q, Sadovova N, Zhang X, Hanig JP, Paule MG, Slikker W, Wang C (2010) Gene expression profiling in the developing rat brain exposed to ketamine. Neuroscience 166:852–863.

Shinohara Y, Hirase H, Watanabe M, Itakura M, Takahashi M, Shigemoto R (2008) Left-right asymmetry of the hippocampal synapses with differential subunit allocation of glutamate receptors. Proc Natl Acad Sci USA 105:19498–19503.

Short EJ, Kirchner HL, Asaad GR, Fulton SE, Lewis BA, Klein N, Eisengart S, Baley J, Kercsmar C, Min MO, Singer LT (2007) Developmental sequelae in preterm infants having a diagnosis of bronchopulmonary dysplasia: analysis using a severity-based classification system. Arch Pediatr Adolesc Med 161:1082–1087.

Sidman RL, Rakic P (1973) Neuronal migration, with special reference to developing human brain: a review. Brain Res 62:1–35.

Siegenthaler JA, Pleasure SJ (2011) We have got you “covered”: how the meninges control brain development. Curr Opin Genet Dev 21:249–255.

Sihra TS, Flores G, Rodríguez-Moreno A (2014) Kainate receptors: multiple roles in neuronal plasticity. Neuroscientist 20:29–43.

Sihra TS, Rodríguez-Moreno A (2011) Metabotropic actions of kainate receptors in the control of GABA release. Adv Exp Med Biol 717:1–10.

Silverman RA, Osborn H, Runge J, Gallagher EJ, Chiang W, Feldman J, Gaeta T, Freeman K, Levin B, Mancherje N, Scharf S, Acute Asthma/Magnesium Study Group (2002) IV magnesium sulfate in the treatment of acute severe asthma: a multicenter randomized controlled trial. Chest 122:489–497.

Silverman SM (2009) Opioid induced hyperalgesia: clinical implications for the pain practitioner. Pain Physician 12:679–684.

Simonnet G, Rivat C (2003) Opioid-induced hyperalgesia: abnormal or normal pain? Neuroreport 14:1–7.

Simons M, Trajkovic K (2006) Neuron-glia communication in the control of oligodendrocyte function and myelin biogenesis. J Cell Sci 119:4381–4389.

Simons SHP, van Dijk M, van Lingen RA, Roofthooft D, Duivenvoorden HJ, Jongeneel N, Bunkers C, Smink E, Anand KJS, van den Anker JN, Tibboel D (2003) Routine morphine infusion in preterm newborns who received ventilatory support: a randomized controlled trial. JAMA 290:2419–2427.

Sinner B, Friedrich O, Lindner R, Bundscherer A, Graf BM (2015) Long-term NMDA receptor inhibition affects NMDA receptor expression and alters glutamatergic activity in developing rat hippocampal neurons. Toxicology 333:147–155.

Slikker W, Zou X, Hotchkiss CE, Divine RL, Sadovova N, Twaddle NC, Doerge DR, Scallet AC, Patterson TA, Hanig JP, Paule MG, Wang C (2007) Ketamine-induced neuronal cell death in the perinatal rhesus monkey. Toxicol Sci 98:145–158.

Solaski M, Majnemer A, Oskoui M (2014) Contribution of socio-economic status on the prevalence of cerebral palsy: a systematic search and review. Dev Med Child Neurol 56:1043–1051.

Song L, Wu C, Zuo Y (2015) Melatonin prevents morphine-induced hyperalgesia and tolerance in rats: role of protein kinase C and N-methyl-D-aspartate receptors. BMC Anesthesiol 15:12.

Soul JS, Hammer PE, Tsuji M, Saul JP, Bassan H, Limperopoulos C, Disalvo DN, Moore M, Akins P, Ringer S, Volpe JJ, Trachtenberg F, du Plessis AJ (2007) Fluctuating pressure-passivity is common in the cerebral circulation of sick premature infants. Pediatr Res 61:467–473.

Sprung J, Flick RP, Katusic SK, Colligan RC, Barbaresi WJ, Bojanić K, Welch TL, Olson MD, Hanson AC, Schroeder DR, Wilder RT, Warner DO (2012) Attention-deficit/hyperactivity disorder after early exposure to procedures requiring general anesthesia. Mayo Clin Proc 87:120–129.

Sprung J, Flick RP, Wilder RT, Katusic SK, Pike TL, Dingli M, Gleich SJ, Schroeder DR, Barbaresi WJ, Hanson AC, Warner DO (2009) Anesthesia for cesarean delivery and learning disabilities in a population-based birth cohort. Anesthesiology 111:302–310.

Steinhorn R, McPherson C, Anderson PJ, Neil J, Doyle LW, Inder T (2015) Neonatal morphine exposure in very preterm infants-cerebral development and outcomes. J Pediatr 166:1200–1207.e4.

Stephenson FA, Cousins SL, Kenny AV (2008) Assembly and forward trafficking of NMDA receptors (Review). Mol Membr Biol 25:311–320.

Stern-Bach Y, Bettler B, Hartley M, Sheppard PO, O'Hara PJ, Heinemann SF (1994) Agonist selectivity of glutamate receptors is specified by two domains structurally related to bacterial amino acid-binding proteins. Neuron 13:1345–1357.

Stiles J, Jernigan TL (2010) The basics of brain development. Neuropsychol Rev 20:327–348.

Stoll BJ et al. (2015) Trends in Care Practices, Morbidity, and Mortality of Extremely Preterm Neonates, 1993-2012. JAMA 314:1039–1051.

Stoppa F, Perrotta D, Tomasello C, Cecchetti C, Marano M, Pasotti E, Barbieri MA, Conti G, Pirozzi N (2004) Low dose remifentanyl infusion for analgesia and sedation in ventilated newborns. Minerva Anestesiol 70:753–761.

Stratmann G et al. (2014) Effect of general anesthesia in infancy on long-term recognition memory in humans and rats. Neuropsychopharmacology 39:2275–2287.

Stratmann G, Sall JW, May LDV, Bell JS, Magnusson KR, Rau V, Visrodia KH, Alvi RS, Ku B, Lee MT, Dai R (2009) Isoflurane differentially affects neurogenesis and long-term neurocognitive function in 60-day-old and 7-day-old rats. Anesthesiology 110:834–848.

Straub C, Hunt DL, Yamasaki M, Kim KS, Watanabe M, Castillo PE, Tomita S (2011) Distinct functions of kainate receptors in the brain are determined by the auxiliary subunit Neto1. Nat Neurosci 14:866–873.

Straub C, Tomita S (2012) The regulation of glutamate receptor trafficking and function by TARPs and other transmembrane auxiliary subunits. Curr Opin Neurobiol 22:488–495.

Sucher NJ, Akbarian S, Chi CL, Leclerc CL, Awobuluyi M, Deitcher DL, Wu MK, Yuan JP, Jones EG, Lipton SA (1995) Developmental and regional expression pattern of a novel NMDA receptor-like subunit (NMDAR-L) in the rodent brain. J Neurosci 15:6509–6520.

Sugihara H, Moriyoshi K, Ishii T, Masu M, Nakanishi S (1992) Structures and properties of seven

isoforms of the NMDA receptor generated by alternative splicing. Biochem Biophys Res Commun 185:826–832.

Sugimoto J, Romani AM, Valentin-Torres AM, Luciano AA, Ramirez Kitchen CM, Funderburg N, Mesiano S, Bernstein HB (2012) Magnesium decreases inflammatory cytokine production: a novel innate immunomodulatory mechanism. J Immunol 188:6338–6346.

Sun LS, Li G, Miller TLK, Salorio C, Byrne MW, Bellinger DC, Ing C, Park R, Radcliffe J, Hays SR, DiMaggio CJ, Cooper TJ, Rauh V, Maxwell LG, Youn A, McGowan FX (2016) Association Between a Single General Anesthesia Exposure Before Age 36 Months and Neurocognitive Outcomes in Later Childhood. JAMA 315:2312–2320.

Sun T, Hevner RF (2014) Growth and folding of the mammalian cerebral cortex: from molecules to malformations. Nat Rev Neurosci 15:217–232.

Suzuki M, Nelson AD, Eickstaedt JB, Wallace K, Wright LS, Svendsen CN (2006) Glutamate enhances proliferation and neurogenesis in human neural progenitor cell cultures derived from the fetal cortex. Eur J Neurosci 24:645–653.

Swanson GT, Sakai R (2009) Ligands for Ionotropic Glutamate Receptors. Prog Mol Subcell Biol 46:123–157.

T

Taddio A, Katz J, Ilersich AL, Koren G (1997) Effect of neonatal circumcision on pain response during subsequent routine vaccination. Lancet 349:599–603.

Taddio A, Shah V, Gilbert-MacLeod C, Katz J (2002) Conditioning and hyperalgesia in newborns exposed to repeated heel lances. JAMA 288:857–861.

Taghon TA, Masunga AN, Small RH, Kashou NH (2015) A comparison of functional magnetic resonance imaging findings in children with and without a history of early exposure to general anesthesia. Paediatr Anaesth 25:239–246.

Tahraoui SL, Marret S, Bodénant C, Leroux P, Dommergues MA, Evrard P, Gressens P (2001) Central role of microglia in neonatal excitotoxic lesions of the murine periventricular white matter. Brain Pathol 11:56–71.

Talos DM, Follett PL, Folkerth RD, Fishman RE, Trachtenberg FL, Volpe JJ, Jensen FE (2006) Developmental regulation of AMPA receptor subunit expression in forebrain and relationship to

regional susceptibility to hypoxic/ischemic injury: Part II. Human cerebral white matter and cortex. J Comp Neurol 497:61–77.

Tan H, Ren R, Xiong Z, Wang Y (2009) Effects of ketamine and midazolam on morphology of dendritic spines in hippocampal CA1 region of neonatal mice. Chin Med J 122:455–459.

Tan X, Shi S-H (2013) Neocortical neurogenesis and neuronal migration. Wiley Interdiscip Rev Dev Biol 2:443–459.

Tashiro A, Sandler VM, Toni N, Zhao C, Gage FH (2006) NMDA-receptor-mediated, cell-specific integration of new neurons in adult dentate gyrus. Nature 442:929–933.

Thome UH et al. (2015) Permissive hypercapnia in extremely low birthweight infants (PHELBI): a randomised controlled multicentre trial. Lancet Respir Med 3:534–543.

Thome UH et al. (2017) Neurodevelopmental outcomes of extremely low birthweight infants randomised to different PCO2 targets: the PHELBI follow-up study. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.

Tomassy GS, Dershowitz LB, Arlotta P (2016) Diversity Matters: A Revised Guide to Myelination. Trends in Cell Biology 26:135–147.

Topp M, Huusom LD, Langhoff-Roos J, Delhumeau C, Hutton JL, Dolk H, SCPE Collaborative Group (2004) Multiple birth and cerebral palsy in Europe: a multicenter study. Acta Obstet Gynecol Scand 83:548–553.

Torchin H, Ancel P-Y (2016) [Epidemiology and risk factors of preterm birth]. J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris).

Torres F, Anderson C (1985) The normal EEG of the human newborn. J Clin Neurophysiol 2:89–103.

Tourrel F, de Lendeu PK, Abily-Donval L, Chollat C, Marret S, Dufrasne F, Compagnon P, Ramdani Y, Dureuil B, Laudenbach V, Gonzalez BJ, Jégou S (2014) The antiapoptotic effect of remifentanil on the immature mouse brain: an ex vivo study. Anesth Analg 118:1041–1051.

Traudt CM, Tkac I, Ennis KM, Sutton LM, Mammel DM, Rao R (2012) Postnatal morphine administration alters hippocampal development in rats. J Neurosci Res 90:307–314.

Traynelis SF, Wahl P (1997) Control of rat GluR6 glutamate receptor open probability by protein kinase A and calcineurin. J Physiol (Lond) 503 (Pt 3):513–531.

Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, Ogden KK, Hansen KB, Yuan H, Myers SJ, Dingledine R (2010) Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. Pharmacol Rev 62:405–496.

Treit D, Fundytus M (1988) Thigmotaxis as a test for anxiolytic activity in rats. Pharmacol Biochem Behav 31:959–962.

Turina D, Loitto VM, Björnström K, Sundqvist T, Eintrei C (2008) Propofol causes neurite retraction in neurones. Br J Anaesth 101:374–379.

Türkyilmaz C, Türkyilmaz Z, Atalay Y, Söylemezoglu F, Celasun B (2002) Magnesium pre-treatment reduces neuronal apoptosis in newborn rats in hypoxia-ischemia. Brain Res 955:133–137.

Tzivoni D, Keren A (1990) Suppression of ventricular arrhythmias by magnesium. Am J Cardiol 65:1397–1399.

V

Vacanti FX, Ames A 3rd (1984) Mild hypothermia and Mg++ protect against irreversible damage during CNS ischemia. Stroke 15:695–698.

van den Bosch GE, White T, El Marroun H, Simons SHP, van der Lugt A, van der Geest JN, Tibboel D, van Dijk M (2015) Prematurity, Opioid Exposure and Neonatal Pain: Do They Affect the Developing Brain? Neonatology 108:8–15.

van Haastert IC, Groenendaal F, Uiterwaal CSPM, Termote JUM, van der Heide-Jalving M, Eijsermans MJC, Gorter JW, Helders PJM, Jongmans MJ, de Vries LS (2011) Decreasing incidence and severity of cerebral palsy in prematurely born children. J Pediatr 159:86–91.e1.

Van Laecke S, Nagler EVT, Vanholder R (2012) Thrombotic microangiopathy: a role for magnesium? Thromb Haemost 107:399–408.

van Praag H, Frenk H (1991) The development of stimulation-produced analgesia (SPA) in the rat. Brain Res Dev Brain Res 64:71–76.

Vannucci RC, Towfighi J, Brucklacher RM, Vannucci SJ (2001) Effect of extreme hypercapnia on hypoxic-ischemic brain damage in the immature rat. Pediatr Res 49:799–803.

Vannucci RC, Towfighi J, Heitjan DF, Brucklacher RM (1995) Carbon dioxide protects the perinatal brain from hypoxic-ischemic damage: an experimental study in the immature rat. Pediatrics 95:868–874.

Verder H, Robertson B, Greisen G, Ebbesen F, Albertsen P, Lundstrøm K, Jacobsen T (1994) Surfactant therapy and nasal continuous positive airway pressure for newborns with respiratory distress syndrome. Danish-Swedish Multicenter Study Group. N Engl J Med 331:1051–1055.

Viberg H, Pontén E, Eriksson P, Gordh T, Fredriksson A (2008) Neonatal ketamine exposure results in changes in biochemical substrates of neuronal growth and synaptogenesis, and alters adult behavior irreversibly. Toxicology 249:153–159.

Victoria NC, Karom MC, Murphy AZ (2015) Analgesia for early-life pain prevents deficits in adult anxiety and stress in rats. Dev Neurosci 37:1–13.

Vidaeff AC, Belfort MA, Steer P (2016a) Authors' reply re: Antenatal corticosteroids: a time for more careful scrutiny of the indications? BJOG 123:1708.

Vidaeff AC, Belfort MA, Steer PJ (2016b) Antenatal corticosteroids: a time for more careful scrutiny of the indications? BJOG 123:1067–1069.

Vigil-De Gracia P, Ludmir J (2015) The use of magnesium sulfate for women with severe preeclampsia or eclampsia diagnosed during the postpartum period. J Matern Fetal Neonatal Med 28:2207–2209.

Villemure E et al. (2017) GluN2A-Selective Pyridopyrimidinone Series of NMDAR Positive Allosteric Modulators with an Improved in Vivo Profile. ACS Med Chem Lett 8:84–89.

Vinall J, Grunau RE, Brant R, Chau V, Poskitt KJ, Synnes AR, Miller SP (2013a) Slower postnatal growth is associated with delayed cerebral cortical maturation in preterm newborns. Sci Transl Med 5:168ra8.

Vinall J, Miller SP, Bjornson BH, Fitzpatrick KPV, Poskitt KJ, Brant R, Synnes AR, Cepeda IL, Grunau RE (2014) Invasive procedures in preterm children: brain and cognitive development at school age. Pediatrics 133:412–421.

Vinall J, Miller SP, Chau V, Brummelte S, Synnes AR, Grunau RE (2012) Neonatal pain in relation to postnatal growth in infants born very preterm. Pain 153:1374–1381.

Vinall J, Miller SP, Synnes AR, Grunau RE (2013b) Parent behaviors moderate the relationship between neonatal pain and internalizing behaviors at 18 months corrected age in children born very prematurely. Pain 154:1831–1839.

Vinik HR, Kissin I (1998) Rapid development of tolerance to analgesia during remifentanil infusion in humans. Anesth Analg 86:1307–1311.

Vogel JP, Lee ACC, Souza JP (2014) Maternal morbidity and preterm birth in 22 low- and middle-income countries: a secondary analysis of the WHO Global Survey dataset. BMC Pregnancy Childbirth 14:56.

Volgraf M et al. (2016) Discovery of GluN2A-Selective NMDA Receptor Positive Allosteric Modulators

(PAMs): Tuning Deactivation Kinetics via Structure-Based Design. J Med Chem 59:2760–2779.

Volpe JJ (2008) Neurology of the newborn, 5th ed. Philadelphia: Saunders/Elsevier.

Volpe JJ (2009) Brain injury in premature infants: a complex amalgam of destructive and developmental disturbances. Lancet Neurol 8:110–124.

Vukadinovic Z (2014) NMDA receptor hypofunction and the thalamus in schizophrenia. Physiol Behav 131:156–159.

W

Walker SM (2013) Biological and neurodevelopmental implications of neonatal pain. Clin Perinatol 40:471–491.

Walker SM (2014) Neonatal pain. Paediatr Anaesth 24:39–48.

Walls AB, Waagepetersen HS, Bak LK, Schousboe A, Sonnewald U (2015) The glutamine-glutamate/GABA cycle: function, regional differences in glutamate and GABA production and effects of interference with GABA metabolism. Neurochem Res 40:402–409.

Wang J, Zhu G, Huang L, Nie T, Tao K, Li Y, Gao G (2017) Morphine administration induces change in anxiety-related behavior via Wnt/β-catenin signaling. Neurosci Lett 639:199–206.

Wang W, Lu R, Feng D-Y, Zhang H (2016) Sevoflurane Inhibits Glutamate-Aspartate Transporter and Glial Fibrillary Acidic Protein Expression in Hippocampal Astrocytes of Neonatal Rats Through the Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription (JAK/STAT) Pathway. Anesth Analg 123:93–102.

Wang Y, Qin Z-H (2010) Molecular and cellular mechanisms of excitotoxic neuronal death. Apoptosis 15:1382–1402.

Weibel S, Jelting Y, Afshari A, Pace NL, Eberhart LH, Jokinen J, Artmann T, Kranke P (2017) Patient-controlled analgesia with remifentanil versus alternative parenteral methods for pain management in labour. Cochrane Database Syst Rev 4:CD011989.

Weintraub Z, Solovechick M, Reichman B, Rotschild A, Waisman D, Davkin O, Lusky A, Bental Y, Israel Neonatal Network (2001) Effect of maternal tocolysis on the incidence of severe periventricular/intraventricular haemorrhage in very low birthweight infants. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed 85:F13-17.

Welzing L, Ebenfeld S, Dlugay V, Wiesen MHJ, Roth B, Mueller C (2011) Remifentanil degradation in

umbilical cord blood of preterm infants. Anesthesiology 114:570–577.

Welzing L, Kribs A, Huenseler C, Eifinger F, Mehler K, Roth B (2009) Remifentanil for INSURE in preterm infants: a pilot study for evaluation of efficacy and safety aspects. Acta Paediatr 98:1416–1420.

Welzing L, Oberthuer A, Junghaenel S, Harnischmacher U, Stützer H, Roth B (2012) Remifentanil/midazolam versus fentanyl/midazolam for analgesia and sedation of mechanically ventilated neonates and young infants: a randomized controlled trial. Intensive Care Med 38:1017–1024.

Welzing L, Roth B (2006) Experience with remifentanil in neonates and infants. Drugs 66:1339–1350.

Wenthold RJ, Sans N, Standley S, Prybylowski K, Petralia RS (2003) Early events in the trafficking of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors. Biochem Soc Trans 31:885–888.

Wichterle H, Garcia-Verdugo JM, Herrera DG, Alvarez-Buylla A (1999) Young neurons from medial ganglionic eminence disperse in adult and embryonic brain. Nat Neurosci 2:461–466.

Wilder RT, Flick RP, Sprung J, Katusic SK, Barbaresi WJ, Mickelson C, Gleich SJ, Schroeder DR, Weaver AL, Warner DO (2009) Early exposure to anesthesia and learning disabilities in a population-based birth cohort. Anesthesiology 110:796–804.

Williams BA, Beatch GN (1997) Magnesium shifts voltage dependence of activation of delayed rectifier I(K) in guinea pig ventricular myocytes. Am J Physiol 272:H1292-1301.

Williams K (1993) Ifenprodil discriminates subtypes of the N-methyl-D-aspartate receptor: selectivity and mechanisms at recombinant heteromeric receptors. Mol Pharmacol 44:851–859.

Williams K, Zappia AM, Pritchett DB, Shen YM, Molinoff PB (1994) Sensitivity of the N-methyl-D-aspartate receptor to polyamines is controlled by NR2 subunits. Mol Pharmacol 45:803–809.

Wilson BN, Kaplan BJ, Crawford SG, Campbell A, Dewey D (2000) Reliability and validity of a parent questionnaire on childhood motor skills. Am J Occup Ther 54:484–493.

Wisden W, Seeburg PH (1993) A complex mosaic of high-affinity kainate receptors in rat brain. J Neurosci 13:3582–3598.

Wolf HT, Hegaard HK, Greisen G, Huusom L, Hedegaard M (2012) Treatment with magnesium sulphate in pre-term birth: a systematic review and meta-analysis of observational studies. J Obstet Gynaecol 32:135–140.

Wolf HT, Huusom L, Weber T, Piedvache A, Schmidt S, Norman M, Zeitlin J, and the EPICE Research

Group (2017) Use of magnesium sulfate before 32 weeks of gestation: a European population-based cohort study. BMJ Open 7:e013952.

Wollmuth LP, Kuner T, Sakmann B (1998) Adjacent asparagines in the NR2-subunit of the NMDA receptor channel control the voltage-dependent block by extracellular Mg2+. J Physiol (Lond) 506 (Pt 1):13–32.

Woodall AJ, Naruo H, Prince DJ, Feng ZP, Winlow W, Takasaki M, Syed NI (2003) Anesthetic treatment blocks synaptogenesis but not neuronal regeneration of cultured Lymnaea neurons. J Neurophysiol 90:2232–2239.

World Health Organization (2016) International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 10th Revision.

Wu L-L, Zhang L, Shao J, Qin Y-F, Yang R-W, Zhao Z-Y (2008) Effect of perinatal iron deficiency on myelination and associated behaviors in rat pups. Behav Brain Res 188:263–270.

Wu N, Veillette A (2011) Immunology: Magnesium in a signalling role. Nature 475:462–463.

Wu YW, Escobar GJ, Grether JK, Croen LA, Greene JD, Newman TB (2003) Chorioamnionitis and cerebral palsy in term and near-term infants. JAMA 290:2677–2684.

X

Xiao L, Hu C, Yang W, Guo D, Li C, Shen W, Liu X, Aijun H, Dan W, He C (2013) NMDA receptor couples Rac1-GEF Tiam1 to direct oligodendrocyte precursor cell migration. Glia 61:2078–2099.

Xu H, Hu F, Sado Y, Ninomiya Y, Borza D-B, Ungvari Z, Lagamma EF, Csiszar A, Nedergaard M, Ballabh P (2008) Maturational changes in laminin, fibronectin, collagen IV, and perlecan in germinal matrix, cortex, and white matter and effect of betamethasone. J Neurosci Res 86:1482–1500.

Y

Yan J, Li Y, Zhang Y, Lu Y, Jiang H (2014) Repeated exposure to anesthetic ketamine can negatively impact neurodevelopment in infants: a prospective preliminary clinical study. J Child Neurol 29:1333–1338.

Yao W, Ji F, Chen Z, Zhang N, Ren S-Q, Zhang X-Y, Liu S-Y, Lu W (2012) Glycine exerts dual roles in ischemic injury through distinct mechanisms. Stroke 43:2212–2220.

Yao Y, Mayer ML (2006) Characterization of a soluble ligand binding domain of the NMDA receptor

regulatory subunit NR3A. J Neurosci 26:4559–4566.

Yi P, Pryzbylkowski P (2015) Opioid Induced Hyperalgesia. Pain Med 16 Suppl 1:S32-36.

Yoon WJ, Won SJ, Ryu BR, Gwag BJ (2003) Blockade of ionotropic glutamate receptors produces neuronal apoptosis through the Bax-cytochrome C-caspase pathway: the causative role of Ca2+ deficiency. J Neurochem 85:525–533.

Young C, Jevtovic-Todorovic V, Qin Y-Q, Tenkova T, Wang H, Labruyere J, Olney JW (2005) Potential of ketamine and midazolam, individually or in combination, to induce apoptotic neurodegeneration in the infant mouse brain. Br J Pharmacol 146:189–197.

Z

Zecevic N (2004) Specific characteristic of radial glia in the human fetal telencephalon. Glia 48:27–35.

Zeitlin J, Szamotulska K, Drewniak N, Mohangoo AD, Chalmers J, Sakkeus L, Irgens L, Gatt M, Gissler M, Blondel B, Euro-Peristat Preterm Study Group (2013) Preterm birth time trends in Europe: a study of 19 countries. BJOG 120:1356–1365.

Zeng X, Xue Y, Tian Q, Sun R, An R (2016) Effects and Safety of Magnesium Sulfate on Neuroprotection: A Meta-analysis Based on PRISMA Guidelines. Medicine (Baltimore) 95:e2451.

Zhan B, Ma H-Y, Wang J-L, Liu C-B (2015) Sex differences in morphine-induced behavioral sensitization and social behaviors in ICR mice. Zool Res 36:103–108.

Zhang C, Li SS, Zhao N, Yu C (2015) Phosphorylation of the GluN1 subunit in dorsal horn neurons by remifentanil: a mechanism for opioid-induced hyperalgesia. Genet Mol Res 14:1846–1854.

Zhang L, Zheng X, Paupard MC, Wang AP, Santchi L, Friedman LK, Zukin RS, Bennett MV (1994) Spermine potentiation of recombinant N-methyl-D-aspartate receptors is affected by subunit composition. Proc Natl Acad Sci USA 91:10883–10887.

Zhang W, St-Gelais F, Grabner CP, Trinidad JC, Sumioka A, Morimoto-Tomita M, Kim KS, Straub C, Burlingame AL, Howe JR, Tomita S (2009) A transmembrane accessory subunit that modulates kainate-type glutamate receptors. Neuron 61:385–396.

Zhang Y, Lu H, Fu Z, Zhang H, Li Y, Li W, Gao J (2017) Effect of remifentanil for general anesthesia on parturients and newborns undergoing cesarean section: a meta-analysis. Minerva Anestesiol 83:858–866.

Zhao M, Joo DT (2008) Enhancement of spinal N-methyl-D-aspartate receptor function by

remifentanil action at delta-opioid receptors as a mechanism for acute opioid-induced hyperalgesia or tolerance. Anesthesiology 109:308–317.

Zhao Q, Zhang L, Shu R, Wang C, Yu Y, Wang H, Wang G (2017) Involvement of Spinal PKMζ Expression and Phosphorylation in Remifentanil-Induced Long-Term Hyperalgesia in Rats. Cell Mol Neurobiol 37:643–653.

Zhao Y-L, Chen S-R, Chen H, Pan H-L (2012) Chronic opioid potentiates presynaptic but impairs postsynaptic N-methyl-D-aspartic acid receptor activity in spinal cords: implications for opioid hyperalgesia and tolerance. J Biol Chem 287:25073–25085.

Zhao YL, Xiang Q, Shi QY, Li SY, Tan L, Wang JT, Jin XG, Luo AL (2011) GABAergic excitotoxicity injury of the immature hippocampal pyramidal neurons' exposure to isoflurane. Anesth Analg 113:1152–1160.

Zheng C, Qiao ZH, Hou MZ, Liu NN, Fu B, Ding R, Li YY, Wei LP, Liu AL, Shen H (2017) GLYX-13, a NMDA Receptor Glycine-Site Functional Partial Agonist, Attenuates Cerebral Ischemia Injury In Vivo and Vitro by Differential Modulations of NMDA Receptors Subunit Components at Different Post-Ischemia Stage in Mice. Front Aging Neurosci 9:186.

Zhou X, Chen Z, Yun W, Ren J, Li C, Wang H (2015) Extrasynaptic NMDA Receptor in Excitotoxicity: Function Revisited. Neuroscientist 21:337–344.

Zhu C, Gao J, Karlsson N, Li Q, Zhang Y, Huang Z, Li H, Kuhn HG, Blomgren K (2010) Isoflurane anesthesia induced persistent, progressive memory impairment, caused a loss of neural stem cells, and reduced neurogenesis in young, but not adult, rodents. J Cereb Blood Flow Metab 30:1017–1030.

Zhu D, Wu X, Strauss KI, Lipsky RH, Qureshi Z, Terhakopian A, Novelli A, Banaudha K, Marini AM (2005) N-methyl-D-aspartate and TrkB receptors protect neurons against glutamate excitotoxicity through an extracellular signal-regulated kinase pathway. J Neurosci Res 80:104–113.

Zhu JJ, Esteban JA, Hayashi Y, Malinow R (2000) Postnatal synaptic potentiation: delivery of GluR4-containing AMPA receptors by spontaneous activity. Nat Neurosci 3:1098–1106.

Zhu S, Paoletti P (2015) Allosteric modulators of NMDA receptors: multiple sites and mechanisms. Curr Opin Pharmacol 20:14–23.

Zongze Z, Jia Z, Chang C, Kai C, Yanlin W (2010) Protective effects of remifentanil on septic mice. Mol Biol Rep 37:2803–2808.

Zou X, Liu F, Zhang X, Patterson TA, Callicott R, Liu S, Hanig JP, Paule MG, Slikker W, Wang C (2011) Inhalation anesthetic-induced neuronal damage in the developing rhesus monkey. Neurotoxicol Teratol 33:592–597.

Zuchero JB, Barres BA (2015) Glia in mammalian development and disease. Development 142:3805–3809.

Zukin RS, Bennett MV (1995) Alternatively spliced isoforms of the NMDARI receptor subunit. Trends Neurosci 18:306–313.

Zwicker JG, Grunau RE, Adams E, Chau V, Brant R, Poskitt KJ, Synnes A, Miller SP (2013) Score for neonatal acute physiology-II and neonatal pain predict corticospinal tract development in premature newborns. Pediatr Neurol 48:123–129.e1.

Zwicker JG, Miller SP, Grunau RE, Chau V, Brant R, Studholme C, Liu M, Synnes A, Poskitt KJ, Stiver ML, Tam EWY (2016) Smaller Cerebellar Growth and Poorer Neurodevelopmental Outcomes in Very Preterm Infants Exposed to Neonatal Morphine. J Pediatr 172:81–87.e2.

ANNEXES

I Annexe 1 : Antenatal Magnesium Sulphate Administration For Fetal Neuroprotection: A French National Survey

Chollat *et al. BMC Pregnancy and Childbirth* (2017) 17:304
DOI 10.1186/s12884-017-1489-z

BMC Pregnancy and Childbirth

RESEARCH ARTICLE Open Access

Antenatal magnesium sulphate administration for fetal neuroprotection: a French national survey

Clément Chollat[1,2,3*], Lise Le Doussal[3], Gaëlle de la Villéon[3], Delphine Provost[4] and Stéphane Marret[2,3]

Abstract

Background: Magnesium sulphate ($MgSO_4$) is the only treatment approved for fetal neuroprotection. No information on its use is available in the absence of a national registry of neonatal practices. The objective of our study was to evaluate the use of $MgSO_4$ for fetal neuroprotection in French tertiary maternity hospitals (FTMH).

Methods: Online and phone survey of all FTMH between August 2014 and May 2015. A participation was expected from one senior obstetrician, one senior anaesthetist and one senior neonatologist from each FTMH. Information was obtained from 63/63 (100%) FTMH and 138/189 (73%) physicians. Use of $MgSO_4$ for fetal neuroprotection, regimen and injection protocols, reasons for non-use were the main outcome measures.

Results: 60.3% of FTMH used $MgSO_4$ for fetal neuroprotection. No significant difference was observed between university and non-university hospitals or according to the annual number of births. Protocols differed especially in terms of the maximum gestational age (3% <28 WG, 71% <33 WG, 18% <34 WG and 8% < 35 WG). Eighty seven percent of centers using $MgSO_4$ prescribed retreatment when necessary, but according to non-consensual modalities in terms of number of treatments or between-treatment intervals. Injections and monitoring were mostly performed in the delivery room (97%) but also in the recovery room in one half of hospitals. Lack of experience (52%), absence of a written protocol (49%) and national guidelines (46%) were the reasons most commonly reported to explain non-use of $MgSO_4$ as a neuroprotective agent.

Conclusions: Sixty percent of FTMH used $MgSO_4$ for fetal neuroprotection, but according to heterogeneous regimens. National guidelines could allow standardization of practices and better $MgSO_4$ coverage.

Keywords: Magnesium sulphate, Neuroprotection, Neonatology, Very preterm infants, National survey

Background

Protection of the immature brain of premature infants constitutes a crucial challenge for obstetricians and neonatologists. Although the survival of premature infants is continuously improving [1], their neurological outcome remains a major concern, as preterm birth is associated with neurodevelopmental impairments such as neuromotor deficits, cognitive deficits, learning disabilities, behavioral and psychiatric disorders and neurosensory deficiencies [2]. The prevalence of cerebral palsy (CP) in Europe slowly decreased from 1.90 to 1.77 per 1000 live births between 1980 to 2003, but still remains high [3]. Almost 40% of individuals with CP were born preterm and the risk of CP increases with decreasing gestational age [4]. Neuroprotection in the context of preterm birth is the subject of extensive research, but few strategies have currently been demonstrated to be effective. There is strong evidence to support antenatal magnesium sulphate ($MgSO_4$) infusion in order to prevent CP in context of prematurity [5]. Based on animal and human observational studies that demonstrated a neuroprotective effect of $MgSO_4$ [6, 7], five randomised controlled trials (RCTs) published between 2002 and 2008 were conducted to evaluate its effect [8–13]. Four

* Correspondence: clement.chollat@gmail.com
[1]Assistance Publique - Hôpitaux de Paris, Service de Médecine et Réanimation Néonatales de Port-Royal, Groupe Hospitalier Cochin, Broca, Hôtel-Dieu, Hôpital Port-Royal 123 bd de Port-Royal, 75014 Paris, France
[2]INSERM U1245, Team "Genetics and Pathophysiology of Neurodevelopmental Disorders", Rouen University, Normandie University, Faculty of Medicine, 22 Boulevard Gambetta, 76183 Rouen Cedex, France
Full list of author information is available at the end of the article

BioMed Central

© The Author(s). 2017 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

meta-analysis of these five trials demonstrated that antenatal $MgSO_4$ treatment significantly reduced the risk of CP in very preterm 2-year-old infants (for the Cochrane meta-analysis: overall RR 0.68; 95%CI 0.54 to 0.87; five trials, 6145 infants) [5, 14–17]. Sixty-three women had to be treated in order to prevent CP in one child (95% CI 43 to 155). However, no statistically significant effect on infantile mortality was observed [5]. In the light of these convincing results, several national authorities (USA, Australia and New Zealand, Canada, UK, Belgium and Ireland) have recommended antenatal administration of $MgSO_4$ in women at imminent risk of very preterm birth in order to prevent cerebral palsy [18–24].

In France, no guidelines have been drafted in view of the ongoing debate concerning this evidence. No information on the use of $MgSO_4$ in France is available in the absence of a national registry of neonatal practices.

Methods

Study design

This study was designed to evaluate the use of $MgSO_4$ prior to preterm birth in all French tertiary maternity hospitals (FTMH) to describe the various protocols used and to analyze the reasons for non-use. This questionnaire-based study was conducted between August 2014 and May 2015 among all FTMH. Sixty-three FTMH were identified (61 in metropolitan France and two in overseas territories). In France, $MgSO_4$ is usually prescribe by obstetricians. Midwives or nurses administer it under the responsibility of the anaesthetists, in case of side effects. Paediatricians, on the other hand, are most often initiators of the $MgSO_4$ protocol at maternity. The point of view of theses three medical specialists is therefore crucial to adress this issue in a holistic way. Accordingly, in each center, the Heads of Departments of Obstetrics, Anaesthesia and Neonatology were contacted by mail and/or phone. Surveys were completed by the Head of Department or a senior physician. Each participant was able to answer the survey online, by e-mail or by phone. The Local Ethics Committee of Rouen University Hospital ruled that no formal ethics approval was required for such a current practice survey. Informed consent to participate was obtained from all participants involved in this study. The survey was designed and conducted using Google Forms software (https://www.google.com, Mountain View, CA, USA).

Collected data

The first part of the questionnaire comprised three general questions:

1) In your opinion, what are the advantages of administering $MgSO_4$ to the mother before preterm birth?
2) Have you ever read one or more scientific articles on this topic?
3) Do you use $MgSO_4$ in your center for neuroprotection prior to very preterm birth?

The second part of the questionnaire focused on $MgSO_4$ users. Participants answered 20 questions about their $MgSO_4$ administration protocol and their patterns of use.

The third part concerned $MgSO_4$ non-users. Participants had to indicate their reasons for not using $MgSO_4$:

- lack of knowledge on the subject
- lack of scientific evidence
- expected benefit/risk balance not in favor of the use of $MgSO_4$
- lack of local experience
- no written protocol in the department
- reluctance of obstetricians or anaesthetists or paediatricians or all three.

Data analysis

Data were recorded on an Excel database. Results were analyzed descriptively. Statistical analysis was performed with Statview 5.0 (SAS Institute Inc.). Statistical analysis was done with the chi-squared test. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

A total of 138 responses were obtained from the 189 physicians contacted (73%). A response to the survey was obtained from all 63 FTMH (100%) and from 54% of anaesthetists (34/63), 76% of obstetricians (48/63) and 89% of paediatricians (56/63). Respondents were distributed as follows: 40% (56/138) from paediatricians, 35% (48/138) from obstetricians and 25% (34/138) from anaesthetists. Respondents were distributed equally between university hospitals and non-university hospitals and according to the annual number of births per center. Among the respondents, 91% were familiar with the neuroprotective effect of $MgSO_4$ and 79% had read at least one scientific article on this topic, with no significant difference between specialities (Table 1). Thirty-eight (60%) of the 63 centers used $MgSO_4$ prior to preterm birth in order to protect the infant's immature brain. No significant difference was observed according to the type of hospital (university hospital or non-university hospital, $P = .47$) or the annual number of births in each hospital (<3000 births per year or >3000 births per year, $P = .71$). Among the FTMH that routinely used $MgSO_4$, 95% had a written administration protocol per hospital. The maximum gestational age for $MgSO_4$ administration ranged between 32 (27/38 centers, 71%) and 33 WG (7/38 centers, 18%), while three centers continued to administer $MgSO_4$ up to 34 WG. However, one center did not prescribe $MgSO_4$ after 28 WG. The majority of centers (35/38, 92%) prescribed a loading dose of 4 g followed by maintenance

Table 1 Description of respondents

	Speciality					Center n/N (%)
	Anaesthetists n/N (%)	Obstetricians n/N (%)	Paediatricians n/N (%)	Total n/N (%)	*P*	
Number of respondents	34/63 (54)	48/63 (76)	56/63 (89)	138/138 (100)	<.001	63/63 (100)
University Hospital	25/41 (61)	32/41 (78)	36/41 (88)	93/123 (76)	.66	41/63 (65)
Non-university Hospital	9/22 (41)	16/22 (73)	20/22 (91)	45/66 (68)		22/63 (35)
Annual number of births						
<3000	17/36 (47)	23/36 (64)	33/36 (92)	73/108 (68)	.49	36/63 (57)
>3000	17/27 (63)	25/27 (93)	23/27 (85)	65/81 (80)		27/63 (43)
Familiar with the neuroprotective value of $MgSO_4$	30/34 (88)	44/48 (92)	51/56 (91)	125/138 (91)	.76	N/A
Had read at least one article on this topic	24/34 (71)	40/48 (83)	45/56 (80)	109/138 (79)	.36	N/A

Values are n/N (%)
Percentages may not sum to 100 because of rounding

treatment at a dose of 1 g per hour for 12 h. Thirty-three FTMH repeated the regimen when necessary. The modalities of subsequent courses were less clearly defined: 50% of written protocols did not specify the minimum interval between two doses and 76% did not specify the maximum number of doses. Nevertheless, the subsequent course was started within 24 h for 26% of centers, between 24 and 48 h for 16% of centers, and after 48 h for 8% of centers. Seven FTMH (18%) repeated the infusion once, one center repeated the infusion twice, and one center did not set any limits. Calcium channel blockers were coprescribed by 33 centers (87%) (Table 2). Contraindications and criteria for discontinuation of the $MgSO_4$ infusion are shown in Table 3. $MgSO_4$ was administered in the delivery room (97%), but also in the recovery room (50%), intensive care unit (24%) or obstetrics unit (21%). The reasons for non-use of $MgSO_4$ are described in Table 4. None of the anaesthetists who did not use $MgSO_4$ answered the question of non-use of $MgSO_4$ (0/4). Lack of experience (52%), lack of a written protocol (49%) and the absence of national guidelines (46%) were the reasons most commonly reported by respondents to explain the absence of use of $MgSO_4$ as a neuroprotective agent in their unit.

Discussion

Main findings

This study provides an update on the reported use of $MgSO_4$ for fetal neuroprotection in France, in the absence of a national registry of neonatal practices in France. Our survey showed that 60% (38/63) of FTMH stated that they used $MgSO_4$ for fetal neuroprotection. This practice is not widespread and remains heterogeneous in France, despite a good knowledge by respondents of the scientific evidence and the benefits of $MgSO_4$ in this context.

Another important finding is that the absence of national guidelines is one of reasons for non use $MgSO_4$ for fetal neuroprotection.

Strenghts and limitations

This study presents a number of limitations: 1) our findings are based on physicians' statements and not on written protocols; 2) only one representative of each speciality in each hospital was asked to complete the survey, which may not be representative of the whole team; 3) although at least one response was obtained from each FTMH, the various specialities were not equally represented (anaesthetists: 54%, obstetricians: 76% and paediatricians: 89%, $P < .001$); 4) albeit we have a clear idea of the number of tertiary maternity units that use MgSO4, actual coverage remains unknown as data for each center were not available (i.e number of preterm birth and number of fetuses exposed to $MgSO_4$). We took into account only the reported policies and not the actual use of $MgSO_4$.

Despite these major limitations, this survey is useful to describe the conditions of use of $MgSO_4$ in real-life practice and to understand the lack of generalisation of such a protocol in France.

Interpretation

Our findings cannot be compared with others because there are no previous surveys about the use of $MgSO_4$ for fetal neuroprotection. Our study highlighted the diversity of regimens and protocols in France. According to international guidelines, the most consensual regimen consisted of a 4 g loading dose following by 1 g/h maintenance treatment. However, heterogeneous practices were observed for several procedures, particularly the possibility of retreatment and the minimum interval between two treatments, as these particular issues are not clearly discussed in the scientific literature (especially in the five

Table 2 $MgSO_4$ protocols

$MgSO_4$ indications	n/N (%)
Pre-eclampsia	46/63 (73)
Neuroprotection	38/63 (60)
Pre-eclampsia and neuroprotection	37/63 (59)
None	17/63 (27)
Written protocol for indication and administration	36/38 (95)
Maximum gestational age	
34	3/38 (8)
33	7/38 (18)
32	27/38 (71)
31	0/38 (0)
30	0/38 (0)
29	0/38 (0)
28	1/38 (3)
$MgSO_4$ regimen	
Loading dose of 4 g then maintenance with 1 g/h for 12 h	35/38 (92)
Loading dose of 4 g then maintenance with 2 g/h for 12 h	1/38 (3)
Only maintenance with 1 g/h for 12 h	2/38 (5)
Repeat $MgSO_4$ if birth does not occur after the first course of $MgSO_4$	33/38 (87)
Minimum interval between 2 treatments	
< 24 h	10/38 (26)
24 to 48 h	6/38 (16)
> 48 h	3/38 (8)
Not specified by protocol	19/38 (50)
Maximum number of treatments	
2	7/38(18)
3	1/38 (3)
No maximum number	1/38 (3)
Not specified by the protocol	29/38 (76)
Start of $MgSO_4$ administration in the case of imminent delivery < 4 h (without delaying obstetric management)	34/38 (90)
Coprescription of calcium channel blockers	33/38 (87)

Values are n/N (%)
Percentages may not sum to 100 because of rounding

Table 3 Contraindications, criteria for discontinuation of the infusion and place of administration and monitoring

Contraindications	n/N (%)
Renal failure	33/38 (87)
Electrolyte disorders	19/38 (50)
Cardiovascular disease	27/38 (71)
Respiratory distress	2/38 (5)
Myasthenia gravis	23/38 (61)
Delivery <30 min	18/38 (47)
Digitalis interaction	22/38 (58)
MgSO4 intolerance	1/38 (3)
Stop the infusion if	
Oliguria <120 mL/4 h	2/38 (5)
Oliguria <100 mL/4 h	29/38 (76)
Hemodynamic instability	31/38 (82)
Respiratory rate < 12/min	6/38 (16)
Respiratory rate < 10/min	28/38 (74)
Hyporeflexia	35/38 (92)
Disorders of consciousness	33/38 (87)
Other	4/38 (1)
Place of administration	
Delivery room	37/38 (97)
Recovery room	19/38 (50)
Intensive care unit	9/38 (24)
Obstetrics unit	8/38 (21)

Values are n/N (%)
Multiple answers were possible

randomised controlled trials and meta-analysis). Meta-analysis of the individual data of participants in these five RCT is currently underway and could clarify these issues [25]. In our study, only one center (3%) prescribed $MgSO_4$ up until 28 WG, whereas 71% of centers prescribed $MgSO_4$ up until 32 WG. This difference could be explained by the number of women who need to be treated to avoid one case of cerebral palsy: 29 before 28 WG and 63 before 32 WG [5]. No data are available in the literature concerning the indication for $MgSO_4$ after a gestational age of 32 WG, but a randomised controlled trial is ongoing (MAGENTA study protocol) [26]. However, in France, 18% and 8% of $MgSO_4$ users centers prescribed this agent up until 33 WG and 34 WG, respectively. A similar heterogeneity is also observed in international guidelines. For example, the Australia and New Zealand Binational Clinical Practice guidelines established 30 WG as a limit [27]. Canadian, Belgian and Irish guidelines recommend that $MgSO_4$ administration be proposed before 32 WG [21, 23, 24]. UK guidelines proposed the use of $MgSO_4$ up until 30 WG and indicated that it should be considered up until 34 WG [22]. The American College of Obstetricians and Gynecologists recommended the development of specific guidelines, especially concerning gestational age, "in accordance with one of the larger trials" but with no specific details [18].

Contraindications and criteria for discontinuation of the infusion seem to be more consensual in our survey, with minor differences for oliguria or bradypnea cut-off values. Almost all units administered $MgSO_4$ in the delivery room, while one half of units administered $MgSO_4$ also in the recovery room. Administration of this treatment obviously requires close cardiorespiratory monitoring and the place of administration should be determined according to the unit's usual practice and the possibility of close monitoring by

Table 4 Reasons why $MgSO_4$ was not used

	Speciality					Center n/N (%)
	Anaesthetists n/N (%)	Obstetricians n/N (%)	Paediatricians n/N (%)	Total n/N (%)	P[a]	
Lack of knowledge	0/4	2/12 (17)	4/21 (19)	6/37 (16)	.95	6/25 (24)
Lack of scientific evidence	0/4	2/12 (17)	2/21 (10)	4/37 (11)	.55	3/25 (12)
Lack of guidelines	0/4	4/12 (33)	11/21 (52)	15/37 (41)	.29	13/25 (52)
Benefit-risk balance	0/4	2/12 (17)	3/21 (14)	5/37 (14)	.85	5/25 (20)
Lack of experience	0/4	7/12 (58)	10/21 (48)	17/37 (46)	.55	17/25 (68)
Lack of written protocol	0/4	7/12 (58)	9/21 (43)	16/37 (43)	.39	13/25 (52)
Reluctance of obstetricians	0/4	2/12 (17)	2/21 (10)	4/37 (11)	.55	3/25 (12)
Reluctance of anesthesiologists	0/4	2/12 (17)	3/21 (14)	5/37 (14)	.85	5/25 (20)
Reluctance of pediatricians	0/4	2/12 (17)	2/21 (10)	4/37 (11)	.55	4/25 (16)

Values are n/N (%)
Multiple answers were possible
[a]Comparison between the answers provided by obstetricians and pediatricians, as anesthesiologists did not answer this question when they did not use $MgSO_4$

appropriate staff (nurse, midwife and/or anaesthetist). Drafting a written protocol seems essential to define the treatment regimen and to optimise its implementation. A few studies have demonstrated the feasibility of this type of protocol, with adequate selection of women at high risk of imminent preterm birth, ensuring optimal $MgSO_4$ coverage for infants born preterm with a minimum of unnecessary maternal exposure [28–31]. The American College of Obstetricians and Gynecologists published a patient safety checklist, which could be used to improve targeting and safety of $MgSO_4$ administration [32].

Non-users reported lack of experience and the absence of a written protocol to explain their practice. Only a few respondents reported a low level of scientific evidence (4/37, 11%, representing 3/25 maternity units, 12%), suggesting that the majority of respondents consider that $MgSO_4$ is beneficial for fetal neuroprotection. In contrast, the absence of national guidelines was reported by 46% of non-users, representing 13/25 maternity units, 52%. In France, national guidelines are necessary to ensure more widespread use of $MgSO_4$. At the present time, $MgSO_4$ is the only specific fetal neuroprotective medical treatment able to improve the neurodevelopment of preterm infants. As the development of preterm children is a long process which can be influenced by several environmental factors, optimal brain neuroprotective strategies comprising pharmacological interventions associated with educational measures need to be determined.

Conclusions

Sixty percent of FTMH used $MgSO_4$ for fetal neuroprotection. Administration protocols differed from one center to another, particularly concerning the maximum gestational age, the possibility of retreatment, and the place of administration and monitoring. National guidelines could allow standardization of practices and better $MgSO_4$ coverage. In the future, the use of $MgSO_4$ should be as systematic as that of corticosteroids, allowing paediatricians to rightfully ask obstetricians: "Have you injected both corticosteroids and $MgSO_4$?" in case of preterm birth.

Abbreviations

CP: Cerebral palsy; FTMH: French tertiary maternity hospitals; $MgSO_4$: Magnesium sulphate

Acknowledgments

We are grateful to Anthony Saul for editorial assistance and linguistic support.

Funding

This follow-up study was funded by a grant from the European Regional Development Fund (ERDF) and by a grant from the Upper-Normandy region. The funding sponsors had no role in the design of the study; in the collection, analyses or interpretation of data; and in the writing of the manuscript.

Availability of data and materials

Please contact Doctor Clement Chollat (clement.chollat@gmail.com) or Professor Marret (stephane.marret@chu-rouen.fr) for data requests.

Authors' contributions

CC, LLD, and SM are responsible for the conception, design, and planning of the study. CC, LLD, GDV and DP carried out data extraction and analyses,. CC, LLD, and SM drafted the article; GDV and DP revised the article for important intellectual content. All authors revised and approved the final version of the article for publication.

Ethics approval and consent to participate

No patient or doctor identifiers were provided to the authors for this survey. The Local Ethics Committee of Rouen University Hospital ruled that no formal ethics approval was required for such a current practice survey. Informed consent to participate was obtained from all participants involved in this study. The consent was obtained online or in written according to the method of response to the questionnaire (online, email or phone).

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors and the individuals referenced in the Acknowledgments section have no conflicts of interest to disclose.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details
[1]Assistance Publique - Hôpitaux de Paris, Service de Médecine et Réanimation Néonatales de Port-Royal, Groupe Hospitalier Cochin, Broca, Hôtel-Dieu, Hôpital Port-Royal 123 bd de Port-Royal, 75014 Paris, France. [2]INSERM U1245, Team "Genetics and Pathophysiology of Neurodevelopmental Disorders", Rouen University, Normandie University, Faculty of Medicine, 22 Boulevard Gambetta, 76183 Rouen Cedex, France. [3]Department of Neonatal Paediatrics and Intensive Care – Neuropaediatrics, Rouen University Hospital, Hôpital Charles Nicolle 1 rue de Germont, 76000 Rouen, France. [4]Department of Anaesthetics and Intensive Care, Rouen University Hospital, Hôpital Charles Nicolle 1 rue de Germont, 76000 Rouen, France.

Received: 26 May 2016 Accepted: 8 September 2017
Published online: 13 September 2017

References

1. Ancel P-Y, Goffinet F, EPIPAGE-2 Writing Group, Kuhn P, Langer B, Matis J, et al. Survival and morbidity of preterm children born at 22 through 34 weeks' gestation in France in 2011: results of the EPIPAGE-2 cohort study. JAMA Pediatr. 2015;169:230–8.
2. Larroque B, Ancel P-Y, Marret S, Marchand L, André M, Arnaud C, et al. Neurodevelopmental disabilities and special care of 5-year-old children born before 33 weeks of gestation (the EPIPAGE study): a longitudinal cohort study. Lancet. 2008;371:813–20.
3. Sellier E, Platt MJ, Andersen GL, Krägeloh-Mann I, De La Cruz J, Cans C, et al. Decreasing prevalence in cerebral palsy: a multi-site European population-based study, 1980 to 2003. Dev Med Child Neurol. 2016;58:85–92.
4. Himmelmann K, Uvebrant P. The panorama of cerebral palsy in Sweden. XI. Changing patterns in the birth-year period 2003-2006. Acta Paediatr. 2014; 103:618–24.
5. Doyle LW, Crowther CA, Middleton P, Marret S, Rouse D. Magnesium sulphate for women at risk of preterm birth for neuroprotection of the fetus. Cochrane Database Syst Rev. 2009;(1):CD004661.
6. Marret S, Gressens P, Gadisseux JF, Evrard P. Prevention by magnesium of excitotoxic neuronal death in the developing brain: an animal model for clinical intervention studies. Dev Med Child Neurol. 1995;37:473–84.
7. Wolf HT, Hegaard HK, Greisen G, Huusom L, Hedegaard M. Treatment with magnesium sulphate in pre-term birth: a systematic review and meta-analysis of observational studies. J Obstet Gynaecol. 2012;32:135–40.
8. Mittendorf R, Dambrosia J, Pryde PG, Lee K-S, Gianopoulos JG, Besinger RE, et al. Association between the use of antenatal magnesium sulfate in preterm labor and adverse health outcomes in infants. Am J Obstet Gynecol. 2002;186:1111–8.
9. Altman D, Carroli G, Duley L, Farrell B, Moodley J, Neilson J, et al. Do women with pre-eclampsia, and their babies, benefit from magnesium sulphate? The Magpie Trial: a randomised placebo-controlled trial. Lancet. 2002;359:1877–90.
10. Crowther CA, Hiller JE, Doyle LW, Haslam RR. Effect of magnesium sulfate given for neuroprotection before preterm birth: a randomized controlled trial. JAMA. 2003;290:2669–76.
11. Rouse DJ, Hirtz DG, Thom E, Varner MW, Spong CY, Mercer BM, et al. A randomized, controlled trial of magnesium sulfate for the prevention of cerebral palsy. N Engl J Med. 2008;359:895–905.
12. Marret S, Marpeau L, Zupan-Simunek V, Eurin D, Lévêque C, Hellot M-F, et al. Magnesium sulphate given before very-preterm birth to protect infant brain: the randomised controlled PREMAG trial. BJOG. 2007;114:310–8.
13. Marret S, Marpeau L, Bénichou J. Benefit of magnesium sulfate given before very preterm birth to protect infant brain. Pediatrics. 2008;121:225–6.
14. Doyle LW, Crowther CA, Middleton P, Marret S. Magnesium sulphate for women at risk of preterm birth for neuroprotection of the fetus. Cochrane Database Syst Rev. 2007;(3):CD004661.
15. Costantine MM, Weiner SJ. Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development Maternal-Fetal Medicine Units Network. Effects of antenatal exposure to magnesium sulfate on neuroprotection and mortality in preterm infants: a meta-analysis. Obstet Gynecol. 2009;114:354–64.
16. Conde-Agudelo A, Romero R. Antenatal magnesium sulfate for the prevention of cerebral palsy in preterm infants less than 34 weeks' gestation: a systematic review and metaanalysis. Am J Obstet Gynecol. 2009;200:595–609.
17. Zeng X, Xue Y, Tian Q, Sun R, An R. Effects and Safety of Magnesium Sulfate on Neuroprotection: A Meta-analysis Based on PRISMA Guidelines. Medicine. 2016;95:e2451.
18. American College of Obstetricians and Gynecologists Committee on Obstetric Practice, Society for Maternal-Fetal Medicine. Committee Opinion No. 455: Magnesium sulfate before anticipated preterm birth for neuroprotection. Obstet Gynecol. 2010;115:669–71.
19. American College of Obstetricians and Gynecologists, Society for Maternal-Fetal Medicine. ACOG Obstetric Care Consensus No. 3: Periviable Birth. Obstet Gynecol. 2015;126:e82–94.
20. The Antenatal Magnesium Sulphate for Neuroprotection Guideline Development Panel. Antenatal magnesium sulphate prior to preterm birth for neuroprotection of the fetus, infant and child: National clinical practice guidelines. 2010. Available from: https://www.adelaide.edu.au/arch/antenatalMagnesiumSulphateGuidlines.pdf. Accessed 26 May 2017.
21. Magee L, Sawchuck D, Synnes A, von Dadelszen P. SOGC Clinical Practice Guideline. Magnesium sulphate for fetal neuroprotection. J Obstet Gynaecol Can. 2011;33:516–29.
22. National Collaborating Centre for Women's and Children's Health (UK). Preterm Labour and Birth. 2015. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK327571. Accessed 12 Sept 2017.
23. Belgian Helath Care Knowledge Centre. Prevention of preterm birth in women at risk: selected topics. 2014. Available from: https://kce.fgov.be/en/prevention-of-preterm-birth-in-women-at-risk-selected-topics. Accessed 12 Sept 2017.
24. Royal College of Physicians of Ireland. Antenatal magnesium sulphate for fetal neuroprotection. 2013. Available from: https://www.rcpi.ie/faculties/obstetricians-and-gynaecologists/national-clinical-guidelines-in-obstetrics-and-gynaecology/. Accessed 12 Sept 2017.
25. AMICABLE group. Antenatal magnesium individual participant data international collaboration: assessing the benefits for babies using the best level of evidence (AMICABLE). Syst Rev. 2012;1:21.
26. Crowther CA, Middleton PF, Wilkinson D, Ashwood P, Haslam R, MAGENTA Study Group. Magnesium sulphate at 30 to 34 weeks' gestational age: neuroprotection trial (MAGENTA)–study protocol. BMC Pregnancy Childbirth. 2013;13:91.
27. Ow LL, Kennedy A, McCarthy EA, Walker SP. Feasibility of implementing magnesium sulphate for neuroprotection in a tertiary obstetric unit. Aust N Z J Obstet Gynaecol. 2012;52:356–60.
28. Gibbins KJ, Browning KR, Lopes VV, Anderson BL, Rouse DJ. Evaluation of the clinical use of magnesium sulfate for cerebral palsy prevention. Obstet Gynecol. 2013;121:235–40.
29. Tan YH, Groom KM. A prospective audit of the adherence to a new magnesium sulphate guideline for the neuroprotection of infants born less than 30 weeks' gestation. Aust N Z J Obstet Gynaecol. 2015;55:90–3.
30. Bouet P-E, Brun S, Madar H, Baisson A-L, Courtay V, Gascoin-Lachambre G, et al. Implementation of an antenatal magnesium sulfate protocol for fetal neuroprotection in preterm infants. Sci Rep. 2015;5:14732.
31. AMICABLE group. Patient safety checklist No. 7: magnesium sulfate before anticipated preterm birth for neuroprotection. Obstet Gynecol. 2012;120:432–3.

II Annexe 2 : Experimental and clinical evidence of differential effects of magnesium sulfate on neuroprotection and angiogenesis

PRP Pharmacology Research & Perspectives Open Access

ORIGINAL ARTICLE

Experimental and clinical evidence of differential effects of magnesium sulfate on neuroprotection and angiogenesis in the fetal brain

Matthieu Lecuyer[1], Marina Rubio[2], Clément Chollat[1,3,4], Maryline Lecointre[1], Sylvie Jégou[1], Philippe Leroux[1], Carine Cleren[1], Isabelle Leroux-Nicollet[1], Loic Marpeau[1,5], Denis Vivien[2], Stéphane Marret[1,3] & Bruno J.Gonzalez[1]

[1]Normandie University, UNIROUEN, INSERM U1245 NeoVasc Team, Rouen University Hospital, IRIB, F76000 Normandy Centre for Genomic and Personalized Medicine, Rouen, France
[2]INSERM U1237 unit "Serine proteases and Pathophysiology of the neurovascular Unit", Normandy University, Caen, France
[3]Department of Neonatal Paediatrics and Intensive Care, Rouen Hospital, Rouen, France
[4]Department of Neonatal Intensive Care, Port-Royal University Hospital, APHP, Paris, France
[5]Department of Obstetrics, Rouen Hospital, Rouen, France

Keywords
Cerebral palsy, Hif, Neurovascular, side effects, translational medicine

Correspondence
Bruno J. Gonzalez, Normandy University, UNIRouen, Inserm U1245, Faculty of Medicine, Laboratory of Microvascular Endothelium and Neonatal Brain Lesions, 76183 Rouen Cedex, France.
Tel: 33 (0) 235 148 547;
E-mail: bruno.gonzales@univ-rouen.fr

Funding Information
This work was supported by INSERM, Normandy University, the Regional Platform for Cell Imaging PRIMACEN, the Conseil Régional de Haute-Normandie, FEDER DO-IT, and the LARC-Neuroscience Network. L.M. was the recipient of a fellowship from the Conseil Régional de Haute-Normandie.

Received: 14 October 2016; Revised: 5 January 2017; Accepted: 10 January 2017

Pharma Res Per, 5(4), 2017, e00315, https//org.doi/10.1002/prp2.315

doi: 10.1002/prp2.315

Abstract

Clinical studies showed beneficial effects of magnesium sulfate regarding the risk of cerebral palsy. However, regimen protocols fluctuate worldwide and risks of adverse effects impacting the vascular system have been reported for human neonates, keeping open the question of the optimal dosing. Using clinically relevant concentrations and doses of magnesium sulfate, experiments consisted of characterizing, respectively, ex vivo and in vivo, the effects of magnesium sulfate on the nervous and vascular systems of mouse neonates by targeting neuroprotection, angiogenesis, and hemodynamic factors and in measuring, in human fetuses, the impact of a 4-g neuroprotective loading dose of magnesium sulfate on brain hemodynamic parameters. Preclinical experiments using cultured cortical slices from mouse neonates showed that the lowest and highest tested concentrations of magnesium sulfate were equally potent to prevent excitotoxic-induced cell death, cell edema, cell burst, and intracellular calcium increase, whereas no side effects were found regarding apoptosis. In contrast, in vivo data revealed that magnesium sulfate exerted dose-dependent vascular effects on the fetal brain. In particular, it induced brain hypoperfusion, stabilization of Hif-1α, long-term upregulation of VEGF-R2 expression, impaired endothelial viability, and altered cortical angiogenesis. Clinically, in contrast to 6-g loading doses used in some protocols, a 4-g bolus of magnesium sulfate did not altered fetal brain hemodynamic parameters. In conclusion, these data provide the first mechanistic evidence of double-sword and dose-dependent actions of magnesium sulfate on nervous and vascular systems. They strongly support the clinical use of neuroprotection protocols validated for the lowest (4-g) loading dose of magnesium sulfate.

Abbreviations

7-AAD, 7-aminoactinomycin D; aCS, artificial cerebrospinal fluid; CP, cerebral palsy; GD15, gestational day 15; LDH, lactate dehydrogenase; MCA, middle cerebral artery; $MgSO_4$, magnesium sulfate; NADH, β-nicotinamide adenine dinucleotide; NADPH, β-nicotinamide adenine dinucleotide 2′-phosphate reduced tetrasodium salt hydrate; NMRI, National Marine Research Institute; P2, postnatal day 2; PI, pulsatility index; PMSF, phenylmethanesulfonyl fluoride; RI, resistance index; ROI, region of interest; WG, week of gestation.

© 2017 The Authors. *Pharmacology Research & Perspectives* published by John Wiley & Sons Ltd, British Pharmacological Society and American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Introduction

Cerebral palsy (CP) is the most prevalent cause of motor dysfunction in neonates. It is defined as a group of permanent movement and posture disorders strongly associated with fetal or perinatal brain lesions (Volpe 2009). It affects both preterm and term neonates, even if the level of risk at birth is inversely related to gestational age (Nelson and Blair 2015). CP is associated with substantial healthcare and societal costs, as well as a significant reduction in health-related quality of life for patients with moderate to severe disabilities (Koman et al. 2004).

Administration of magnesium sulfate ($MgSO_4$) to pregnant women at risk for imminent preterm delivery has been shown to be neuroprotective for the fetus (Doyle et al. 2007) and several randomized controlled trials (Altman et al. 2002; Mittendorf et al. 2002; Crowther et al. 2003; Marret et al. 2007; Rouse et al. 2008), and meta-analysis (Costantine and Weiner 2009; Zeng et al. 2016) revealed beneficial effects of $MgSO_4$ regarding the risk of cerebral palsy. As a consequence, the antenatal use of $MgSO_4$ is now recommended for neuroprotection by several colleges of obstetricians and gynecologists worldwide (Obstetric Care Consensus No. 3: Periviable Birth, 2015). Nevertheless, clinical studies have mentioned the possibility of adverse effects for preterm neonates with high serum magnesium levels (Basu et al. 2012) and have described the risk of vasculopathy and increased neonatal morbidity and mortality (Mittendorf et al. 2005, 2006; Jacquemyn et al. 2015), thus retaining questions regarding optimal dosing (Pryde and Mittendorf 2011).

Several hypotheses could be used to explain uncertainties regarding $MgSO_4$. First, $MgSO_4$ can be prescribed to pregnant women for various indications and, therefore, different physiopathologic contexts, such as neuroprotection of the fetal brain (Doyle et al. 2007), prevention of eclampsia (Ueda et al. 2016), or tocolysis (McNamara et al. 2015). Second, protocols and modalities of administration differ worldwide, and doses of $MgSO_4$ administered to the mother and received by the fetus markedly fluctuate. Depending on the $MgSO_4$ regimen protocols, total doses administered can vary from 4 g to more than 50 g, particularly when administered for prevention of eclampsia (Pryde and Mittendorf 2011). Third, even if the active component of $MgSO_4$ appears to be the Mg^{2+} ion, its large spectrum of action in living cells is a major limitation to decipher mechanisms involved in beneficial and/or adverse effects (Romani 2011). In particular, the Mg^{2+} ion is the physiologic blocker of the glutamate NMDA receptor, which is expressed by neural cells and plays a critical role in the excitotoxic cascade (Desfeux et al. 2010). However, in the developing brain and contrasting to adults, functional NMDA receptors have been recently shown to be highly expressed by endothelial cells from immature microvessels (Henry et al. 2013; Lecointre et al. 2014; Porte et al. 2017).

Consequently, we hypothesized that $MgSO_4$ effects leading to neuroprotection and/or vascular adverse effects would result from dose-related and cell-specific mechanisms involving the glutamatergic system. Using preclinical and clinical approaches, the objectives of the present study were to perform functional and mechanistic characterization of the effects of clinically relevant doses of $MgSO_4$ on neural and vascular cells by targeting neuroprotection, angiogenesis, and hemodynamic parameters and to measure the impact of a 4-g loading dose of $MgSO_4$ on brain hemodynamic parameters in human fetuses by following administration procedures of a validated neuroprotection clinical protocol involving women at imminent risk for preterm delivery.

Materials and Methods

Animals

NMRI (National Marine Research Institute) mice (Janvier, Le Genest Saint Isle, France) were kept in a temperature-controlled room (21 ± 1°C) with an established photoperiod (the lights are on from 7:00 AM to 7:00 PM) and with free access to food and tap water. Animal manipulations were performed according to the recommendations of the French Ethical Committee (B7645005) and under the supervision of authorized investigators (B.J.G., authorization no. 7687 from the Ministère de l'Agriculture et de la Pêche).

Chemicals

5-Methyl-10,11-di-hydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine maleate (MK801) and isolectin-B4-FITC were purchased from Tocris (Bristol, United Kingdom). 7-aminoactinomycin D (7-AAD), lactate dehydrogenase (LDH), phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), phosphatase inhibitor, protease inhibitor cocktails 2 and 3, Hoechst 33258, glutamate, β-nicotinamide adenine dinucleotide (NADH), sodium pyruvate, β-nicotinamide adenine dinucleotide 2′-phosphate reduced tetrasodium salt hydrate (NADPH), $MgSO_4$, and nitro blue tetrazolium were from Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). The ratiometric intracellular calcium probe Fura-2, pluronic® F-127 and Cell Tracker green were from Invitrogen (Cergy Pontoise, France). The Apo-ONE homogeneous caspase-3/7 kit was provided by Charbonnières-les-Bains, France. Isoflurane was from CSF (Cournon, France). Characteristics of the antibodies used in the present study

© 2017 The Authors. *Pharmacology Research & Perspectives* published by John Wiley & Sons Ltd, British Pharmacological Society and American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics.

for immunohistofluorescence and Western blot experiments are summarized in Table S1.

Preparation and treatment of organotypic slices

Brain slices (250 μm) from postnatal day 2 (P2) mouse neonates were cut at 4°C using a vibratome VT1000S Leica (Rueil-Malmaison, France) as previously described (Henry et al. 2013). Slices were incubated for 6 h at 37°C in artificial cerebrospinal fluid (aCSF) alone (control condition) and in absence or presence of 20 μmol/L MK801, 400 μmol/L glutamate, and (1–8 mmol/L) $MgSO_4$. Then, slices were washed with aCSF and metabolic reactions were stopped on ice. Finally, cortical slices were used for immunohistology, Western blot, LDH, and caspase-3 activity experiments.

Visualization of necrotic and apoptotic cells

Experiments were conducted in cultured brain slices incubated in the presence of glutamate and/or different concentrations of $MgSO_4$. Necrosis is characterized by rapid loss of cytosolic membrane integrity and cell lysis (Maes et al. 2015). Based on these statements, necrotic cell death was visualized using 7-AAD, a cell-impermeant fluorescent marker for DNA. Thus, 7-AAD labeling was detected in cells where the membrane integrity was lost. Red fluorescence was acquired with a Leica DMI 6000B microscope (Rueil-Malmaison, France). Apoptotic cells were visualized in cultured brain slices using immunohistochemistry targeting the cleaved caspase-3. 7-AAD and cleaved caspase-3 labeling were performed on the same cortical slices to simultaneously visualize the effects of glutamate and $MgSO_4$ on cell lysis and apoptosis, respectively.

Lactate dehydrogenase activity assay

Quantification of LDH activity in the aCSF of cultured cerebral slices was used as an index of cell lysis representative of cellular edema and necrosis (Chan et al. 2013). After the 6 h treatments, 30 μL of aCSF was collected and mixed with 100 μL of a freshly made solution containing 0.5 mmol/L NADH. Conversion of NADH to its oxidized form NAD^+ was initiated by the addition of 20 μL of 5 mmol/L sodium pyruvate; LDH activity was followed-up for a period of 15 min by spectrophotometry at 340 nm by measuring the decrease in NADH absorbance with a plate reader (Chameleon; Mustionkatu, Turku, Finland).

Caspase-3 activity

Control and treated cortices from brain slices were resuspended in 500 μL of hypotonic lysis buffer and 20 μg of proteins was incubated at 30°C with 100 μL of caspase-3 buffer containing 1 μL of the caspase-3 substrate Z-DEVD-R110 provided within the Apo-ONE homogeneous caspase-3/7 kit from Promega. Fluorescence intensity was quantified every 5 min for 2 h at excitation and emission wavelengths of 485 and 520 nm, respectively, using a plate reader (Chameleon; Mustionkatu).

Time-lapse recording of cellular edema

Transverse brain slices from P2 mice were labeled with Cell Tracker green to visualize living cells and cultured under a fluorescent inverted Leica DM microscope under controlled temperatures. Slices were then perfused with aCSF, 400 μmol/L glutamate alone, or in the presence of 1 mmol/L $MgSO_4$. Z-series images of cell tracker green-positive cells were acquired every 10 min and saved in TIFF format using a computer-assisted image analysis station (Metamorph; Roper Scientific, Lisses, France). Then, regions of interest (ROIs) corresponding to fluorescent cell bodies present in cortical layers V and VI were integrated to compute cell volume using the Mercator Software (Explora Nova, La Rochelle, France).

Neuronal and endothelial calcimetry on brain slices

Transverse brain slices from P2 neonates were incubated for 15 min in aCSF with 10 μmol/L of the calcium probe Fura-2/AM and 0.03% Pluronic® F-127. Double labeling of the ratiometric calcium probe Fura-2/AM with (10 μmol/L) isolectin B4-FITC was used to discriminate between neural and vascular endothelial cells. The fluorescent signals associated with calcium-bound and calcium-free Fura-2 were measured as previously described in both neural and endothelial cells (Jégou et al. 2012). Data were exported to the biostatistic software Prism (GraphPad Inc., San Diego, CA) and two parameters (maximal intensity and area under the curve) were quantified.

Time-lapse recording of vascular remodeling and endothelial cell suffering in cortical slices

For imaging of living microvessels, 250-μm slices from P2 mouse brains and endothelial cells labeled with isolectin-B4-FITC were used. Brain slices were cultured for 6 h at a constant temperature (37°C) in a controlled atmosphere (5% CO_2) under an inverted microscope (Leica) equipped with an incubation chamber (Pecon, Erbach, Germany), computer-controlled illumination shutters, and filter wheels (Roper Scientific). Slices were continuously perfused with aCSF containing or not containing low

© 2017 The Authors. *Pharmacology Research & Perspectives* published by John Wiley & Sons Ltd, British Pharmacological Society and American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics.

(1 mmol/L) and high (6.5 mmol/L) concentrations of $MgSO_4$. Images were acquired with ×10 objective every 30 min for 6 h. After acquisition, two parameters, microvessel length and diameters, were quantified using Metamorph software (Jégou et al. 2012). Endothelial cell death was visualized by overlapping 7-AAD and isolectin-B4-FITC acquisitions to discriminate between neuronal and endothelial cell death.

Immunohistochemistry

After overnight fixation with 4% PFA in PBS, brain slices were rinsed twice with PBS for 10 min and incubated overnight at 4°C with different primary antibodies (Table S1) diluted in the incubation buffer consisting of 1% BSA and 3% Triton X-100 in PBS. Then, slices were rinsed twice with PBS for 10 min and incubated with the same incubation buffer containing the adequate secondary antibody (Table S1). Fluorescent signals were observed with a Leica DMI 6000B microscope. The specificity of immunoreactions was controlled by replacement of the primary antibodies by PBS.

In vivo treatment of pregnant mice with $MgSO_4$ and quantification of the fetal cortical vasculature

Pregnant mice received a daily subcutaneous injection of sodium chloride (NaCl 9‰) or different doses of $MgSO_4$ (100–600 mg/kg) diluted in NaCl from gestational day 15 (GD15) to GD20. The spectrum of doses administered was selected to bracket and compare the low (270 mg/kg; Louzoun-Kaplan et al. 2008) and high (600 mg/kg; Hoffman et al. 1994) doses of $MgSO_4$ used in the literature. These low- and high-injected doses corresponded to a blood peak of magnesium of 1.52 mmol/L and 2.5 mmol/L after 30 min, respectively (Wolf et al. 1991; Hallak et al. 2000). The highest value is consistent with hypermagnesemia values >4.5 mEq/L (2.5 mmol/L) found in some preterm infants (2.5 mmol/L; Ali et al. 2003). Brains were collected at P2 and slices were labeled with isolectin B4-FITC to visualize the vasculature. For measurement of the vascular network, a ratiometric approach involving Metamorph software (Roper Scientific) was used as previously described (Jégou et al. 2012). For each slice, a threshold was set to distinguish the isolectin B4-FITC-positive structures from the background, and the corresponding ROIs were selected by segmentation. For each ROI, the vascular area/cortical area ratio and the thickness of microvessels were calculated. For measurement of the angular position of microvessels, a frame of lines perpendicular to the cortical border for each slice was defined. For microvessels parallel to these lines, Metamorph software arbitrarily attributed an angular value of 0°. The maximal angular value affected was 90°.

Quantitative real-time PCR

Generation of polymerase chain reaction (PCR) products was measured in real time by incorporation of the fluorescent dye SYBR Green I using a Bio-Rad iCycler real-time PCR machine (Bio-Rad, Hercules, CA). PCR products were generated using primers described in Table S2.

Western blot analysis

After in vivo treatment of pregnant mice, cortices from control and $MgSO_4$-treated animals were homogenized in 250 μL of lysis buffer (50 μmol/L HEPES; pH 7.5; 150 mmol/L NaCl; 10 mmol/L EDTA; 10 mmol/L glycerophosphate; 100 mmol/L sodium fluoride; 1% triton ×100; 1 mmol/L PMSF and PI cocktail). After centrifugation of the homogenate (20,000*g*, 15 min), the supernatants were used for Western blotting as previously described (Desfeux et al. 2010). Commercial markers (Seeblue prestained standard; Invitrogen) were used as molecular weight standards.

In vivo quantification of the fetal cerebral blood flow

Effects of maternal injection of $MgSO_4$ on hemodynamic parameters in the fetal brain were analyzed at GD18 using a surgery approach associated with a laser speckle moorFLPI-2 recording (MOOR Instrument, Axminster, UK). Pregnant mice received a low (100 mg/kg) and high (600 mg/kg) subcutaneous injection of $MgSO_4$ and were rapidly anesthetized with isoflurane using an isoflurane Vaporizer (Datex-Ohmeda; GE Healthcare, Aulnay sous bois, France). Laparotomy was performed to allow access to the uterine horns. The abdominal cavity, especially the exposed uterine horn, was kept moist with warmed physiologic solution. During surgery, the body temperature of the mouse was maintained using a hotplate (Lab-Line Instruments, Melrose Park, IL). Fetal cerebral blood flow dynamics were measured during 1 min with a pace of 15 pictures acquired per minute. In utero quantification of the fetal cerebral blood flow was performed between 20 and 30 min after the injection of $MgSO_4$ to the mother. After measurements, the uterine horn was carefully replaced in the abdominal cavity. The muscles and skin of the surgical wound were sutured separately with sterile Silk Suture Prolene 6-0, MPP2832H (Ethicon, Lidingö, Sweden).

© 2017 The Authors. *Pharmacology Research & Perspectives* published by John Wiley & Sons Ltd, British Pharmacological Society and American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics.

Quantification and visualization of Hif-1α after in vivo exposure to $MgSO_4$

Thirty min after the low (100 mg/kg) and high (600 mg/kg) subcutaneous injections of $MgSO_4$ to GD18 pregnant mice, cortices of the embryos were rapidly removed. For immunohistochemistry, brains were fixed in defrosted PFA 4%, dehydrated by saccharose 30%, and frozen in isopentane immersion (−35°C). Frontal sections (10 μm thick) were cut in a Microm Microtech cryomicrotome HM560 (Brignais, France) and stored in a cryoprotective solution (20% glycerol, 30% ethylene glycol in 0.05 mol/L PBS) at −25°C until use. For Western blot studies, the cortices were rapidly dissected out on ice, immediately frozen on dry ice, and stored at −80°C until homogenization.

Doppler analysis of fetal cerebral blood flow in human fetuses exposed to 4-g bolus of $MgSO_4$

A prospective, observational cohort was conducted in pregnant women in preterm labor before 33 weeks of gestation admitted to the Department of Obstetrics of Rouen University Hospital. Women with a diagnosis of preeclampsia were not included in the study to restrict patients without pregnancy vascular disease. Patients were enrolled consecutively between July 2014 and November 2015. All patients received $MgSO_4$ for fetal neuroprotection according to the local injection protocol: a 4-g loading dose during 30 min followed by a 1-g/h maintenance dose during 12 h intravenously. Doppler acquisitions were performed using the ProSound F37 ultrasonographer (Hitachi Aloka Medical America, Inc., Wallingford, CT) attached to a 3.75-MHz convex transducer. Doppler velocimetry was performed by experienced senior obstetricians just before and after administration of the $MgSO_4$ loading dose. Doppler acquisition was similar to that used in the literature to assess fetal anemia (Mari et al. 2000) or the impact of $MgSO_4$ on fetal cerebral Doppler flow (Souza et al. 2010). An axial brain section including thalami and cavum septum pellucidi was obtained. The spectral Doppler cursor was placed on the middle cerebral artery within 1 mm of the proximal vessel branch and at least two acquisitions were obtained. The angle between the ultrasound beam and the direction of blood flow were kept as close as possible to 0° to minimize the need for correction. Maximal systole (peak systole velocity; PSV), end diastole, and time-average maximum velocity were obtained from spectral form. Pulsatility index (PI) and resistance index (RI) were calculated from previous measurements. Comparisons of these parameters before and after the $MgSO_4$ loading dose were evaluated. Gestational age, cause of preterm delivery, and Doppler measurements are reported in Table 1. The study was approved by the Local Ethics Committee of Rouen University Hospital (protocol agreement number E2016-05).

Statistical analysis

Statistical tests were performed using the biostatistic software Prism (Graph-Pad Inc., San Diego, CA). Data are reported as mean ± SEM or sampling distributions. Tests used for each experiment, the number of independent experiments, and *P* values are summarized in Table S3.

Results

Effect of $MgSO_4$ on cell lysis and intracellular calcium mobilization in nervous cells under excitotoxic conditions

Quantification of lactate dehydrogenase activity in the culture medium of cultured brain slices is an indicator of loss of cell membrane integrity. Associated with cell edema and cell bursting, it is a good indicator of necrotic cell death (Chan et al. 2013). Six-h treatment of cultured brain slices from P2 neonates with $MgSO_4$ alone in concentrations ranging from 1 to 8 mmol/L induced a concentration-dependent reduction of LDH activity (Fig. 1A). The same effect was quantified with MK801 ($P < 0.0001$; 20 μmol/L), whereas glutamate (400 μmol/L), which was used as a positive control of excitotoxicity, induced a strong increase in LDH activity ($P < 0.0001$; Fig. 1A). Visualization of cells with altered membrane integrity was performed using 7-AAD labeling (Fig. 1B–E). Whereas in control, MK801 (20 μmol/L), and $MgSO_4$ (1 mmol/L) conditions, the dotted 7-AAD labeling was weak (Fig. 1B–D), the treatment of brain slices with glutamate (400 μmol/L) resulted in a strong increase in the fluorescence intensity which was obvious in deep cortical layers V and VI of the P2 neocortex (Fig. 1E). When $MgSO_4$ and glutamate (400 μmol/L) were co-incubated, both low (1 mmol/L; $P < 0.001$) and high (6.5 mmol/L; $P < 0.0001$) concentrations of $MgSO_4$ prevented the effect of glutamate on LDH activity, indicating potent anti-excitotoxic action of $MgSO_4$ (Fig. 1F). Consistent with these data, MK801 (20 μmol/L) mimicked the effect of $MgSO_4$ on glutamate-induced LDH activity ($P < 0.0001$; Fig. 1F).

In addition to membrane disruption, cell edema is another criterion of excitotoxicity. Cell swelling results from a massive entry of water into the cells and overstimulation of the ionotropic glutamate receptors AMPA/Kainate and NMDA (Ingvar et al. 1988). Because the anti-excitotoxic effect of $MgSO_4$ was similar between 1 mmol/L and 6.5 mmol/L concentrations (Fig. 1F), we

© 2017 The Authors. *Pharmacology Research & Perspectives* published by John Wiley & Sons Ltd, British Pharmacological Society and American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics.

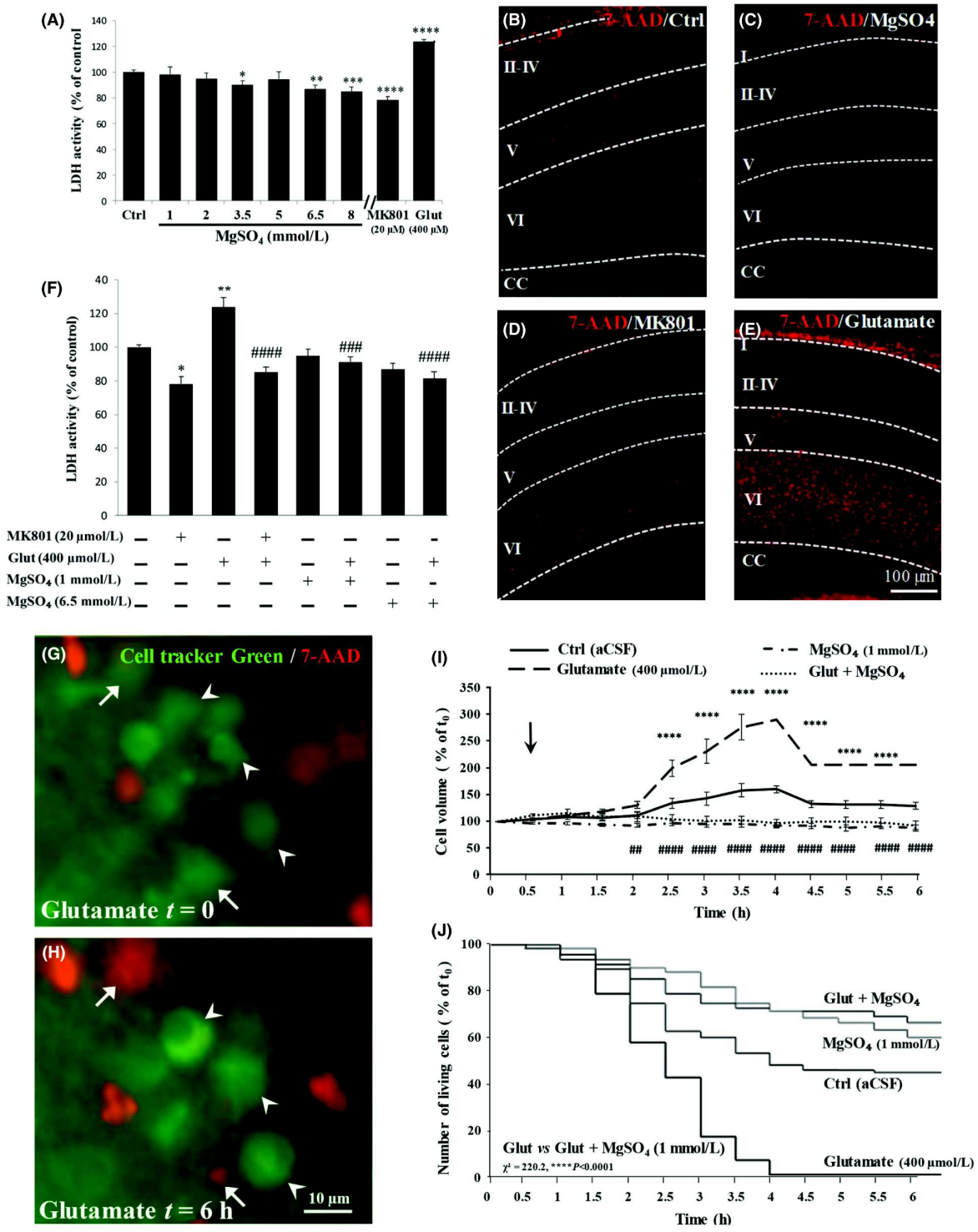
Table 1. Doppler indexes and measures of middle cerebral artery of fetuses before and after the administration of a 30-min loading dose of 4-g $MgSO_4$ in pregnant women.

	Before administration			30 min after							
Case no.	PSV	IP	IR	PSV	IP	IR	ΔPSV	ΔIP	ΔIR	Gestational age (WG + days)	Cause of preterm delivery
1	0.596	1.383	0.728	0.525	1.171	0.664	0.071	0.212	0.064	33	Cesarean delivery for fetal ventricular dilatation
2	0.511	2.57	0.93	0.387	1.82	0.84	0.124	0.75	0.09	30	Placenta abruption
3	0.329	4.42	1.13	0.237	2.78	0.805	0.092	1.64	0.325	29 + 1	Preterm labor
4	0.24	1.63	0.76	0.29	1.44	0.75	−0.05	0.19	0.01	26 + 6	Fetal heart rate abnormalities
5	0.21	1.63	0.8	0.34	1.62	0.8	−0.13	0.01	0	26	Fetal heart rate abnormalities
6	0.357	1.29	0.69	0.228	0.65	0.58	0.129	0.64	0.11	26	Fetal heart rate abnormalities
7	0.374	1.12	0.71	0.407	1.31	0.76	−0.033	−0.19	−0.05	32 + 1	Maternal cause: vaso-occlusive crisis
8	0.432	1.58	0.86	0.324	2.15	1.19	0.108	−0.57	−0.33	32 + 1	Preterm labor
9	0.353	2.42	0.84	0.284	1.61	0.77	0.069	0.81	0.07	30 + 1	Preterm labor, chorioamnionitis
10	0.427	1.47	0.73	0.386	1.58	0.75	0.041	−0.11	−0.02	33	Fetal growth restriction
11	0.425	1.57	0.79	0.421	1.38	0.76	0.004	0.19	0.03	27	Chorioamniotis, fetal heart rate abnormalities
12	0.272	2.5	1.02	0.245	3.24	1.11	0.027	−0.74	−0.09	27 + 5	Preterm labor
13	0.548	2.76	0.92	0.394	1.89	0.83	0.154	0.87	0.09	31 + 5	Preterm labor
14	0.448	1.5	0.75	0.522	1.8	0.82	−0.074	−0.3	−0.07	32	Fetal heart rate abnormalities
15	0.544	1.65	0.8	0.53	1.42	0.76	0.014	0.23	0.04	28 + 6	PPROM, chorioamnionitis
16	0.592	2.15	0.87	0.471	2.88	1	0.121	−0.73	−0.13	32	Preterm labor
17	0.278	1.62	0.82	0.298	1.5	0.77	−0.02	0.12	0.05	26 + 5	Preterm labor
18	0.291	2.05	0.84	0.361	2.46	0.89	−0.07	−0.41	−0.05	26 + 5	Preterm labor
19	0.367	1.87	0.82	0.34	1.31	0.71	0.027	0.56	0.11	27	PPROM, preterm labor
20	0.303	3.65	1.22	0.296	1.94	0.87	0.007	1.71	0.35	28	PPROM, preterm labor
21	0.318	1.79	0.78	0.423	1.37	0.73	−0.105	0.42	0.05	28 + 2	Preterm labor
22	0.425	1.89	0.83	0.444	1.76	0.81	−0.019	0.13	0.02	28 + 2	Preterm labor
23	0.459	1.34	0.71	0.478	1.54	0.77	−0.019	−0.2	−0.06	32 + 1	Fetal growth restriction, fetal heart rate abnormalities
24	0.459	0.81	0.56	0.437	0.97	0.62	0.022	−0.16	−0.06	29	Preterm labor
25	0.432	1.99	0.79	0.436	2.58	1	−0.004	−0.59	−0.21	31 + 5	Chorioamnionitis, preterm labor
26	0.326	0.64	0.47	0.539	0.7	0.47	−0.213	−0.06	0	31 + 1	Fetal growth restriction, fetal heart rate abnormalities
27	0.293	1.36	0.73	0.299	1.44	0.78	−0.006	−0.08	−0.05	25	Preterm labor

PPROM, Preterm premature rupture of membrane.

Figure 1. Effects of graded concentrations of $MgSO_4$ on excitotoxicity. (A) Quantification of LDH activity on cortical slices from P2 neonates after 6 h of incubation in the absence (Ctrl) or presence of graded concentrations (1–8 mmol/L) of $MgSO_4$ alone. The NMDA antagonist MK801 (20 μmol/L) and glutamate (400 μmol/L) were used as negative and positive controls, respectively. One-way ANOVA test showed a group effect ($F = 14.14$; $P < 0.0001$), and the Dunnett's multiple comparison test indicated the following: *$P < 0.05$; **$P < 0.01$; ***$P < 0.001$; **** $P < 0.0001$ versus control. (B–E) Visualization by 7-AAD labeling of excitotoxic cell death in brain slices from P2 neonates after 6-h incubation in the absence (B) or presence of 1 mmol/L $MgSO_4$ (C), MK801 (20 μmol/L; D), and glutamate (400 μmol/L; E). Note that the pro-excitotoxic effect of glutamate is preferentially localized in the deep layers. (F) Quantification of LDH activity under excitotoxic conditions. Cortex slices were incubated during 6 h with glutamate (400 μmol/L) in the absence or presence of low (1 mmol/L) and high (6.5 mmol/L) concentrations of $MgSO_4$ or MK801 (20 μmol/L). One-way ANOVA test showed a group effect ($F = 8.911$; $P < 0.0001$) and the Tukey's multiple comparison test indicated the following: *$P < 0.05$; **$P < 0.01$ versus control; ###$P < 0.001$; ####$P < 0.0001$ versus glutamate. (G,H) Microphotographs from time-lapse recording visualizing cellular edema in layers V and VI after exposure of cultured cortical slices to glutamate (400 μmol/L). Living cells are labeled with Cell Tracker green and dead cells with 7-AAD. Arrow heads indicate cells presenting swelling of the cytoplasm and nucleus. Arrows indicate living cells at t0 (G), which were dead (7-AAD positive) after 6 h (H). (I) Quantification of the cellular edema in cortical layers V and VI from P2 cortical slices exposed for 6 h to aCSF (Ctrl), $MgSO_4$ (1 mmol/L), or glutamate (400 μmol/L) alone, or co-incubated with $MgSO_4$ (1 mmol/L). Note that glutamate (400 μmol/L) induces a rapid increase in cell volume representative of cellular edema, which is prevented by $MgSO_4$. The arrow indicates the time when drugs were perfused. Two-way ANOVA test showed a group effect ($F = 17.19$; $P < 0.0001$) and the Tukey's multiple comparison test indicated the following: ****$P < 0.0001$ versus control; ##$P < 0.01$; ####$P < 0.0001$ versus glutamate. (J) Survival curves of Cell Tracker green-positive neurons from layer VI. Cultured slices from P2 neonates were exposed for 6 h to aCSF (Ctrl), $MgSO_4$ (1 mmol/L), or glutamate (400 μmol/L) alone, or co-incubated with $MgSO_4$ (1 mmol/L). Log-rank (Mantel-Cox) indicated: ****$P < 0.0001$ Glut versus Glut.MgSO4 (1 mmol/L).

© 2017 The Authors. *Pharmacology Research & Perspectives* published by John Wiley & Sons Ltd, British Pharmacological Society and American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics.



performed time-lapse experiments on cultured brain slices to further characterize the effects of the 1 mmol/L concentration of $MgSO_4$ on cell swelling. In deep cortical layers V and VI, treatment of cultured brain slices with glutamate (400 μmol/L) resulted in a rapid increase in the volume of cortical neurons previously labeled with

© 2017 The Authors. *Pharmacology Research & Perspectives* published by John Wiley & Sons Ltd, British Pharmacological Society and American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics.

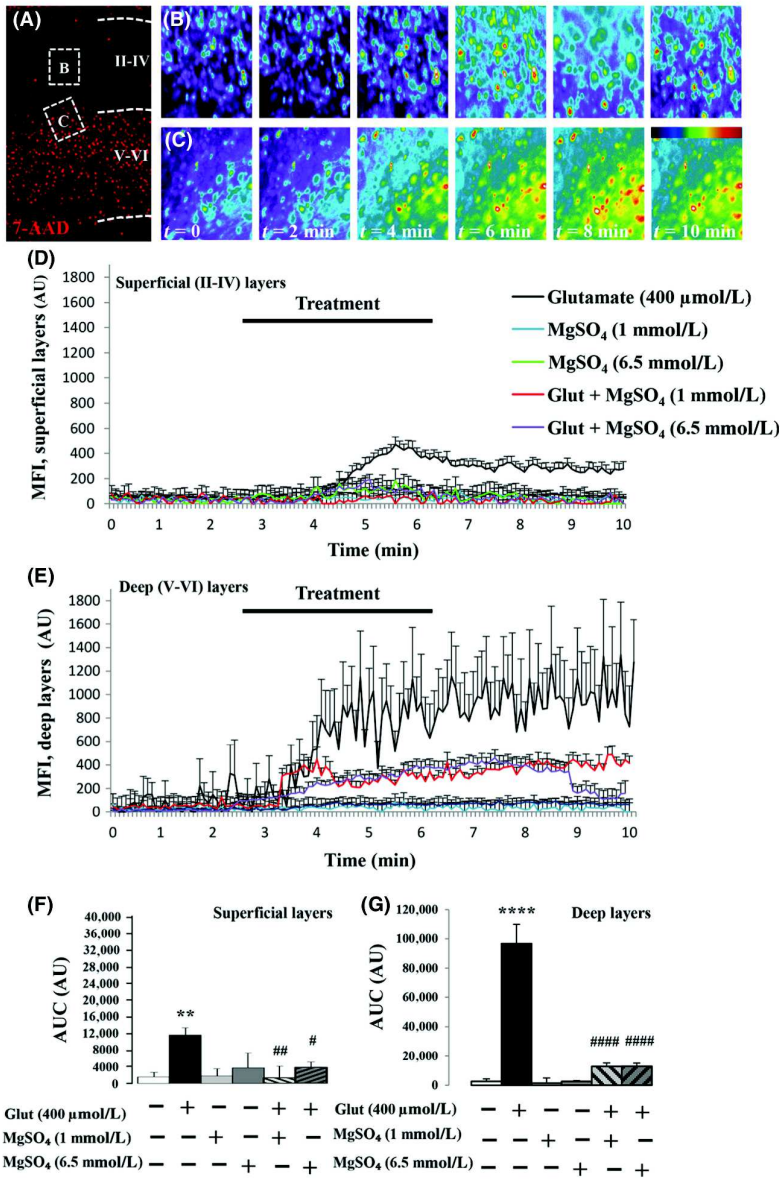


Figure 2. Effects of $MgSO_4$ on intracellular calcium levels under basal and excitotoxic conditions. (A) Visualization at low magnification of the excitotoxic cell death (7-AAD labeling) induced by 400 μ glutamate. Dead cells are mainly localized in deep cortical layers V and VI. The inserts indicate the fields recorded for calcimetry experiments in the superficial (B) and deep (C) cortical layers. (B, C) Microphotographs visualizing the kinetics of intracellular calcium mobilization in cells exposed to glutamate (400 μmol/L) in superficial (B) and deep (C) cortical layers. The color bar indicates low (blue) and high (red) levels of calcium. (D) Mean kinetics of calcium mobilization in cells from the superficial layers. Calcimetry was performed after incubation of P2 cortical slices with the ratiometric calcium probe Fura-2. In basal conditions, slices were perfused with aCSF. After 3 min, aCSF was replaced by different bathing solutions consisting of glutamate (400 μmol/L), $MgSO_4$ (1 mmol/L), and $MgSO_4$ (6.5 mmol/L), alone or in association. (E) Mean kinetics of calcium mobilization in cells from the deep cortical layers. In basal condition, slices were perfused with aCSF. After 3 min, aCSF was replaced by different bathing solutions consisting of glutamate (400 μmol/L), $MgSO_4$ (1 mmol/L), and $MgSO_4$ (6.5 mmol/L), alone or in association. (F) Statistical analysis of the mean areas under the curve quantified for each tested condition in the superficial layers. One-way ANOVA test ($F = 3.251$; $P = 0.0088$) followed by Dunnett's multiple comparison test $^{**}P < 0.01$ versus control; $^{\#}P < 0.05$; $^{\#\#}P < 0.01$ versus glutamate. (G) Statistical analysis of the mean areas under the curve quantified for each tested condition in the deep layers. One-way ANOVA test ($F = 47.24$; $P < 0.0001$) and Dunnett's multiple comparison test indicated the following: $^{****}P < 0.0001$ versus control; $^{\#\#\#\#}P < 0.0001$ versus glutamate.

© 2017 The Authors. *Pharmacology Research & Perspectives* published by John Wiley & Sons Ltd, British Pharmacological Society and American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics.

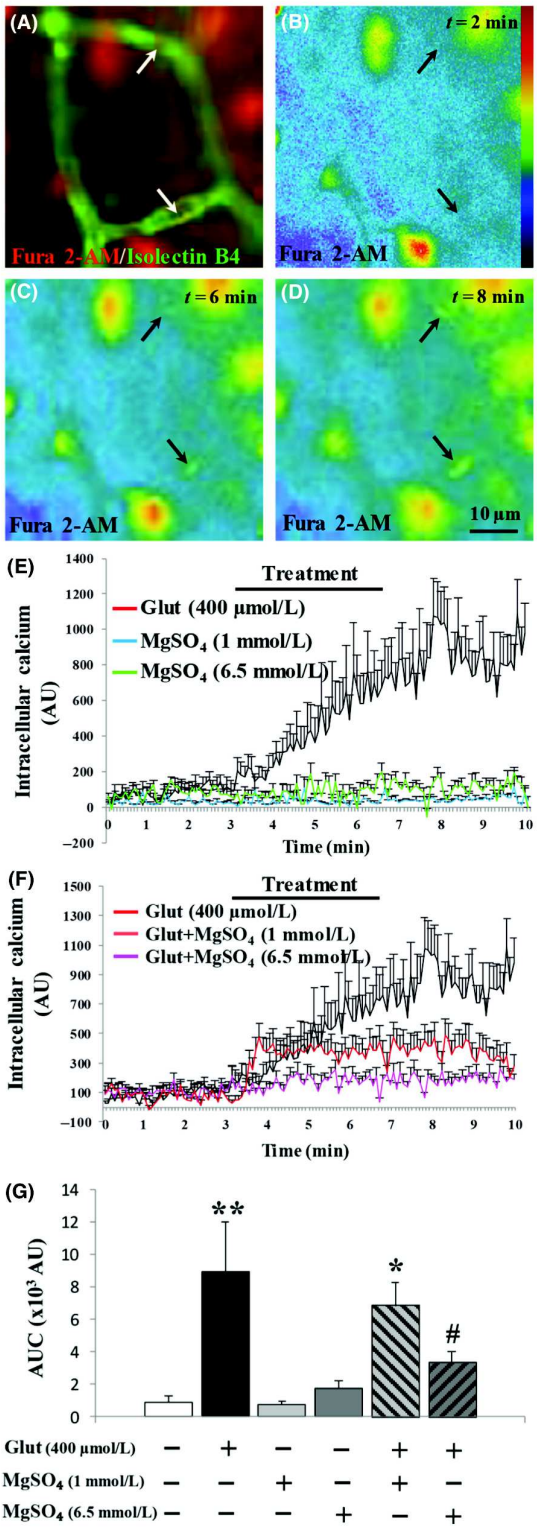


Figure 3. Effects of $MgSO_4$ on intracellular calcium mobilization in endothelial cells from P2 neonate cortices. (A) Microphotographs visualizing endothelial cells labeled with isolectin B4-FITC and loaded with the calcium probe Fura-2/AM (arrow). (B-D) False color kinetics of the 340 nm/380 nm ratio representative of intracellular calcium mobilization in cortical endothelial cells exposed to glutamate (400 μmol/L; arrows). The color bar is indicative of low (blue) and high (red) intracellular levels of calcium. (E) Mean kinetics of calcium mobilization in endothelial cells exposed to low (1 mmol/L) and high (6.5 mmol/L) concentrations of $MgSO_4$ and glutamate (400 μmol/L) alone. (F) Mean kinetics of calcium mobilization in endothelial cells exposed to low (1 mmol/L) and high (6.5 mmol/L) concentrations of $MgSO_4$ in association with glutamate (400 μmol/L). (G) Statistical analysis of the mean areas under the curve quantified for each tested condition. One-way ANOVA test showed a group effect ($F = 5.54$; $P = 0.0016$) and Dunnett's multiple comparison test indicated the following: $^*P < 0.05$; $^{**}P < 0.01$ versus control and $\#P < 0.05$ versus glutamate.

the Cell Tracker green probe (Fig. 1G–I). Several cells presenting a typical fusiform shape became progressively round (Fig. 1H; arrowheads). Morphometric analysis revealed a significant effect of glutamate (400 μmol/L) on cell volume 2 h after the beginning of treatment ($P < 0.0001$; Fig. 1I). With longer incubation periods with glutamate (400 μmol/L), cell swelling resulted in cell burst and cell death revealed by 7-AAD labeling (Fig. 1H; arrows). As found for LDH activity, the low (1 mmol/L) concentration of $MgSO_4$ abrogated the effects of glutamate on both cell swelling (Fig. 1I) and cell death ($P < 0.0001$; Fig. 1J). In addition to excitotoxic cell death, we also analyzed several indicators of apoptosis (caspase-3 cleavage, caspase activity, Bax expression) and found no significant effect of $MgSO_4$ (Fig. S1).

Glutamate-induced excitotoxicity is associated with a massive increase in intracellular calcium levels (Stanika et al. 2009). Thus, to further characterize the neuroprotective effect of $MgSO_4$, we investigated its effects on glutamate-induced calcium mobilization in P2 cortical slices (Fig. 2). Calcium microfluorimetry experiments revealed two patterns of calcium response after incubation with 400 μmol/L glutamate (Fig. 2A–C). In superficial cortical layers, where glutamate is not excitotoxic at this developmental stage, treatment of slices with the neurotransmitter induced a moderate increase in intracellular calcium levels (Fig. 2B and D). When low (1 mmol/L) and high (6.5 mmol/L) concentrations of $MgSO_4$ were co-incubated, they abrogated the effect of glutamate on calcium mobilization (Fig. 2D). In deep cortical layers, where glutamate is excitotoxic, treatment of slices with the neurotransmitter induced a massive increase in intracellular calcium levels that remained sustained even after washing (Fig. 2C and E). The co-incubation of glutamate with low (1 mmol/L) and high (6.5 mmol/L) concentrations

© 2017 The Authors. *Pharmacology Research & Perspectives* published by John Wiley & Sons Ltd, British Pharmacological Society and American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics.

of $MgSO_4$ strongly reduced the calcium mobilization (Fig. 2E). Quantification of the areas under the curves revealed that glutamate was much more potent to promote calcium flux in deep layers than in superficial layers, and that low and high concentrations of $MgSO_4$ were equally potent to prevent the glutamate-induced calcium mobilization in deep layers ($P < 0.0001$; Fig. 2F and G). Altogether, these data indicate for the first time that a large range of $MgSO_4$ concentrations exerts similar neuroprotective effects against glutamate-induced excitotoxicity.

Low and high neuroprotective concentrations of $MgSO_4$ exert differential effects on endothelial cell activity

Several recent studies demonstrated the expression of functional glutamatergic (NMDA) receptors by neonatal endothelial cells from brain microvessels (Henry et al. 2013; Lecointre et al. 2014), suggesting that $MgSO_4$ would impact their activity. Thus, we investigated the effects of $MgSO_4$ on calcium mobilization in brain microvessels by fluorimetry. Isolectin B4-FITC was used to co-label endothelial cells previously loaded with the calcium probe Fura 2-AM (Fig. 3A). False color representation (Fig. 3B-D; arrows) and cell quantification (Fig. 3E) showed an increase in the 340/380 nm ratio in endothelial cells of brain slices perfused with glutamate (400 μmol/L). When $MgSO_4$ was applied alone at low (1 mmol/L) and high (6.5 mmol/L) concentrations on brain slices, no effect was found regarding calcium mobilization (Fig. 3 E and G). When it was co-incubated, $MgSO_4$ inhibited the stimulatory effect of glutamate. However, in contrast to nervous cells (Fig. 2 E and G), the effect of $MgSO_4$ was concentration-dependent and significant only for the high (6.5 mmol/L) concentration of $MgSO_4$ ($P < 0.05$; Fig. 3F and G). Altogether, these data indicate that two concentrations of $MgSO_4$ with similar neuroprotective actions exert dose-dependent effects on the endothelial cell activity and would be able to impact the vascular plasticity.

Low and high neuroprotective concentrations of $MgSO_4$ differently impact vascular suffering and endothelial cell death

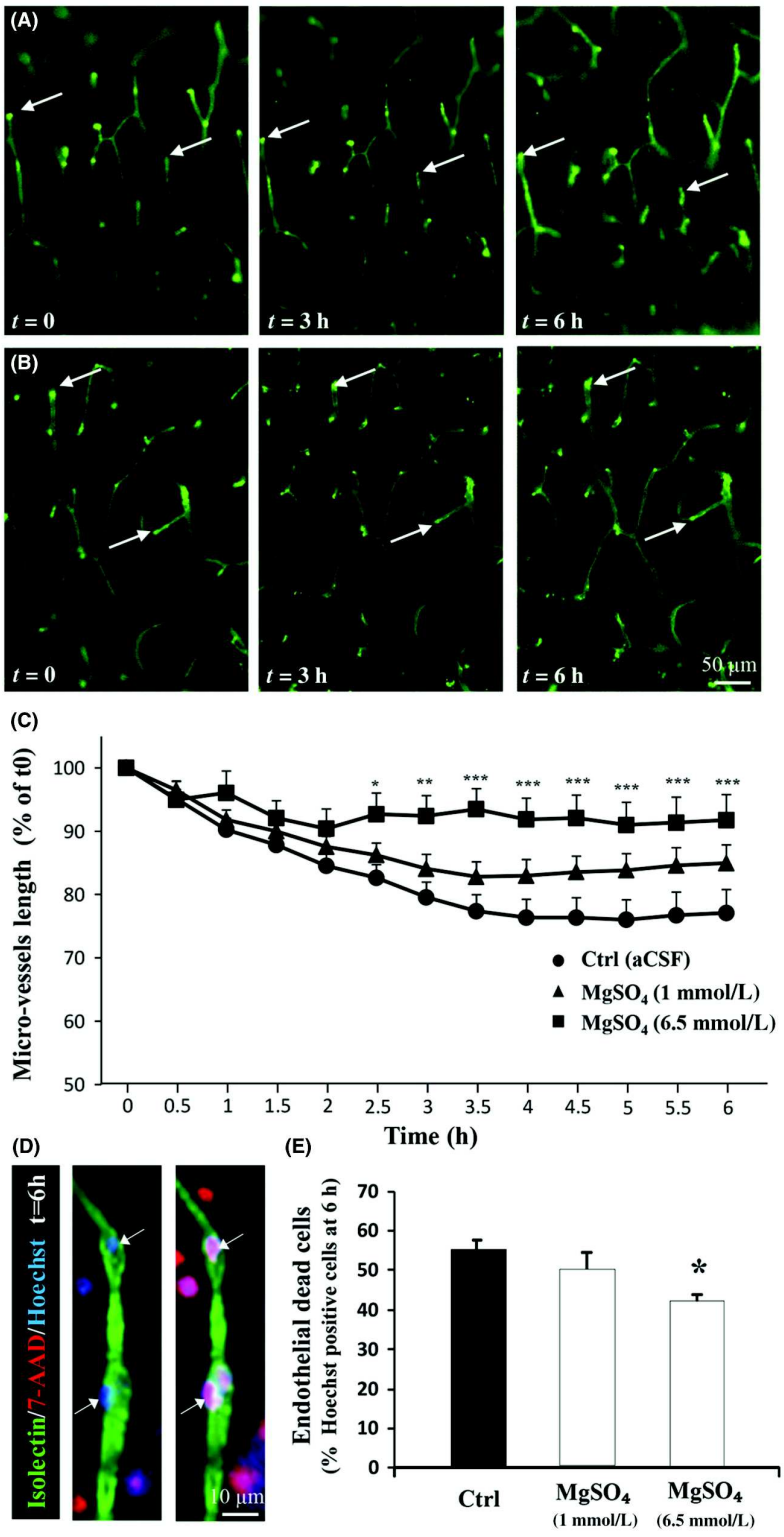
Time-lapse tracking is a potent approach to follow the suffering of cortical microvessels in cultured neonatal brain slices (Jégou et al. 2012). In basal conditions, a 6-h recording period showed that several cortical microvessels progressively retracted within the slice (Fig. 4A; arrows). In contrast, in the presence of a high (6.5 mmol/L) concentration of $MgSO_4$, this effect was markedly reduced (Fig. 4B; arrows). Time course quantification of brain microvessel length showed that, in the control condition, the vessel retraction was approximately 20% after 4 h and reached a plateau from 4 to 6 h (Fig. 4C). $MgSO_4$ induced a concentration-dependent inhibition of the vascular suffering, which was significantly reduced only for the high concentration (6.5 mmol/L; Fig. 4C; $P < 0.05$; $P < 0.01$; $P < 0.001$). Triple fluorescent labeling with isolectin-B4-FITC, 7-AAD, and Hœchst revealed that vascular retraction was associated with endothelial cell death (Fig. 4D; arrows). Quantification of 7-AAD-positive nuclei indicated that only the high concentration of $MgSO_4$ reduced death of immature endothelial cells (Fig. 4E; $P < 0.05$). These data give the first indication of a concentration-dependent action of $MgSO_4$ on microvessel plasticity and endothelial cell death in cultured brain slices from mouse neonates, and support in vivo impairments of brain angiogenesis.

Low and high neuroprotective doses of $MgSO_4$ differently alter brain angiogenesis in vivo

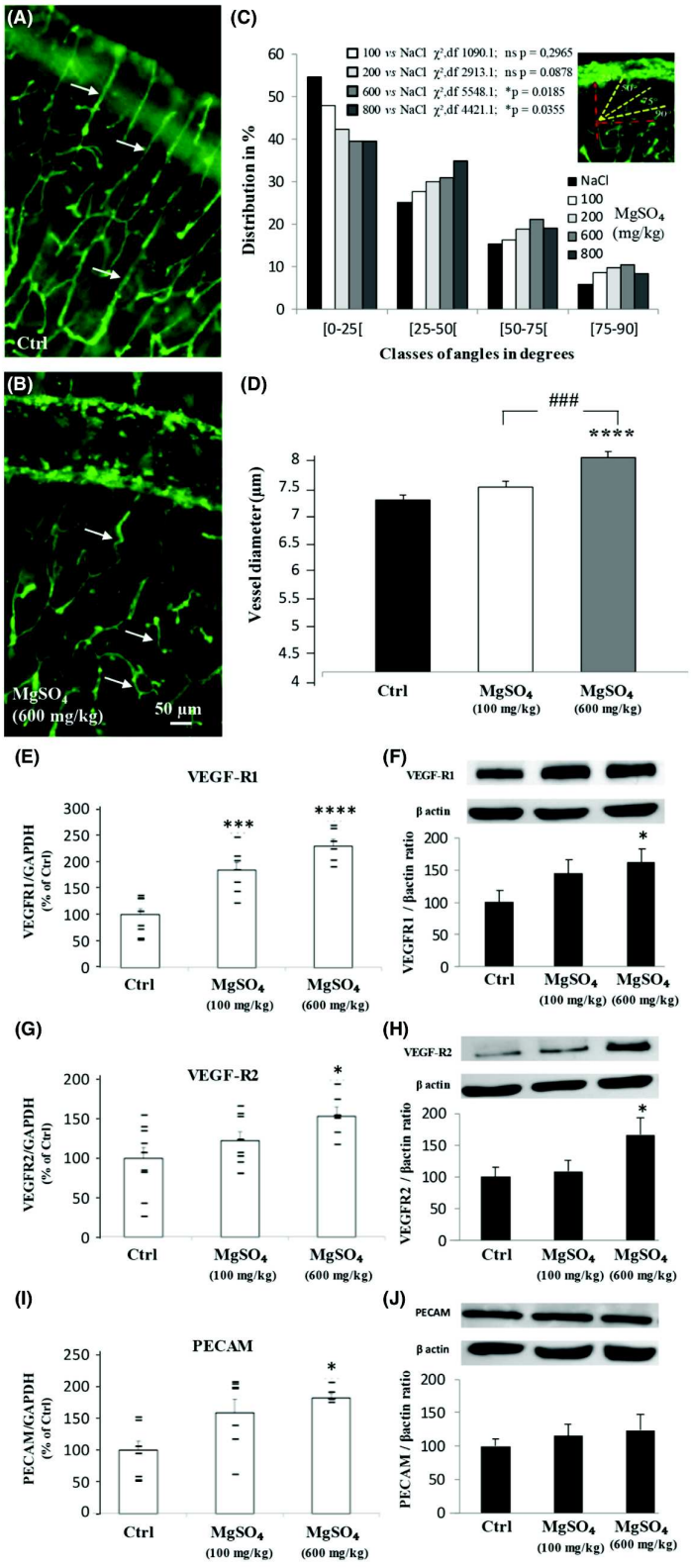
Pregnant mice were exposed to graded doses of $MgSO_4$ from GD15 to GD20, a period of intense angiogenesis and vascular-dependent neuronal migration in the developing cortex (Won et al. 2013). Visualization of the microvascular network in the cortex of P2 neonates revealed that in control animals, microvessels present a

Figure 4. Effects of $MgSO_4$ on vascular plasticity and endothelial cell death in cultured cortical slices. (A, B) Time-lapse acquisition of cortical microvessels labeled with isolectin-B4-FITC in control conditions (A) and in a high (6.5 mmol/L) concentration of $MgSO_4$ (B). Note that in control conditions, brain microvessels progressively retract within the slice, a criterion of vascular suffering. This vascular suffering is prevented by $MgSO_4$. (C) Quantification of the vascular retraction observed in the cortex of neonatal brain slices cultured under control (aCSF), low (1 mmol/L), and high (6.5 mmol/L) concentrations of $MgSO_4$. Two-way ANOVA test showed a group effect ($F = 1.343$; $P = 0.1662$) and Tukey's multiple comparison test indicated the following: $^*P < 0.05$; $^{**}P < 0.01$; $^{***}P < 0.001$ versus control. (D) High magnification to visualize triple fluorescent labeling of microvessels (isolectine B4-FITC), dead cells (7-AAD), and nuclei (Hœchst) in the cortex from P2 brain slices cultured in control conditions during two incubation periods. Note that cell death occurred in neural cells and also in endothelial cells (arrows). (E) Quantification of the effects of low (1 mmol/L) and high (6.5 mmol/L) concentrations of $MgSO_4$ on endothelial cell death. One-way ANOVA test showed a group effect ($F = 3.242$; $P = 0.0547$) and Tukey's multiple comparison test indicated $^*P < 0.05$ versus control.

© 2017 The Authors. *Pharmacology Research & Perspectives* published by John Wiley & Sons Ltd, British Pharmacological Society and American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics.



© 2017 The Authors. *Pharmacology Research & Perspectives* published by John Wiley & Sons Ltd, British Pharmacological Society and American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics.



© 2017 The Authors. *Pharmacology Research & Perspectives* published by John Wiley & Sons Ltd, British Pharmacological Society and American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics.

Figure 5. In vivo effects of in utero $MgSO_4$ exposure on cortical microvasculature of P2 neonates and on the expression of cortical pro-angiogenic factors. (A, B) Effects of treatment of pregnant mice with 0.9% NaCl (A) and $MgSO_4$ 600 mg/kg (B) from GD15 to GD20 on the cortical microvasculature of P2 neonates. Note the preferential radial orientation of the cortical microvessels in the control group (A; arrows) and the predominance of tortuous vessels in treated animals (B; arrows). (C) Dose-dependent effect of $MgSO_4$ on the distribution of cortical microvessels by class of angles in the neocortex of P2 neonates. Statistical analysis was performed using the χ^2 test. (D) Effect of in utero exposure to low (100 mg/kg) and high (600 mg/kg) concentrations of $MgSO_4$ on the mean diameter of cortical microvessels. One-way ANOVA test showed a group effect ($F = 13.20$; $P < 0.0001$) and Tukey's multiple comparison test indicated the following: ****$P < 0.0001$ versus control and ###$P < 0.001$ versus $MgSO_4$ (600 mg/kg). (E, F) Quantification of VEGF-R1 mRNA (E) and protein (F) levels in the neocortex from P2 pups whose mothers were exposed to NaCl (0.9%; Ctrl) or low (100 mg/kg) and high (600 mg/kg) doses of $MgSO_4$ from GD15 to GD20. (E) One-way ANOVA test showed a group effect ($F = 24.95$; $P < 0.0001$) and Tukey's multiple comparison test indicated the following: ***$P < 0.001$; ****$P < 0.0001$ versus control. (F) One-way ANOVA test showed a group effect ($F = 3.707$; $P = 0.0329$) and Tukey's multiple comparison test indicated *$P < 0.05$ versus control. (G, H) Quantification of VEGF-R2 mRNA (G) and protein (H) levels in the neocortex from P2 pups whose mothers were exposed to NaCl (0.9%; Ctrl) or low (100 mg/kg) and high (600 mg/kg) doses of $MgSO_4$ from GD15 to GD20. (G) One-way ANOVA test showed a group effect ($F = 5.072$; $P = 0.0165$); Tukey's multiple comparison test indicated *$P < 0.05$ versus control. (H) One-way ANOVA test showed a group effect ($F = 3.539$; $P = 0.038$) and Tukey's multiple comparison test indicated *$P < 0.05$ versus control. (I, J) Quantification of PECAM/CD31 mRNA (I) and protein (J) levels in the neocortex from P2 pups whose mothers were exposed to NaCl (0.9%; Ctrl) or low (100 mg/kg) and high (600 mg/kg) doses of $MgSO_4$ from GD15 to GD20. (I) One-way ANOVA test showed a group effect ($F = 4.348$; $P = 0.0288$); Tukey's multiple comparison test indicated *$P < 0.05$ versus control. (J) Tukey's multiple comparison test indicated no significance versus control ($F = 0.3927$; $P = 0.6795$).

preferential radial organization (Fig. 5A; arrows). In contrast, after in utero exposure to a high dose of $MgSO_4$ (600 mg/kg), brain microvessels were disorganized and tortuous (Fig. 5B; arrows). Quantification of the angular orientation of the microvessels in the neocortex of newborns revealed a dose-dependent effect of $MgSO_4$ comprising a progressive disorganization of blood vessels (Fig. 5C). In addition, $MgSO_4$ induced a significant and dose-dependent increase in the diameter of the microvessels ($P < 0.0001$; Fig. 5D). These data constitute the first preclinical demonstration that in vivo $MgSO_4$ administration during fetal life exerts dose-dependent impairments on the cortical vasculature, suggesting an action of $MgSO_4$ on the expression of angiogenic pathways.

Quantitative RT-PCR experiments revealed that in vivo treatment of pregnant mice with low (100 mg/kg) and high (600 mg/kg) doses of $MgSO_4$ induced a significant increase in VEGF-R1 mRNA levels (Fig. 5E). At the protein level, Western blot experiments indicated that VEGF-R1 expression was significantly ($P < 0.05$) increased in the neocortex of animals exposed to the high dose of $MgSO_4$ (Fig. 5F). Regarding VEGF-R2, in vivo $MgSO_4$ treatment induced a dose-dependent ($P < 0.05$) increase in mRNA levels (Fig. 5G). However, in contrast to VEGF-R1, only the high dose of $MgSO_4$ was efficient ($P < 0.05$; Fig. 5G). Similarly, a strong increase in VEGF-R2 protein levels was found for the high dose of $MgSO_4$ tested ($P < 0.05$; Fig. 5H). Quantification of the endothelial cell marker PECAM/CD31 revealed a significant increase in mRNA levels for the high dose of $MgSO_4$, which was not found at the protein level (Fig. 5I and J). These data constitute the first demonstration that the treatment of pregnant mice with high doses of $MgSO_4$ impairs in a dose-dependent manner the expression of VEGF-R1 and VEGF-R2 in the cortex of mouse neonates.

Low and high neuroprotective doses of $MgSO_4$ differently affect fetal brain perfusion and Hif-1α stabilization in vivo

A mechanistic link has been established between increased VEGF-R2 expression and hypoxia (Marti et al. 2000). To determine whether $MgSO_4$ would induce hemodynamic impairments in the brain of fetuses, we performed in utero laser speckle recordings in GD18 pregnant mice exposed to low and high doses of $MgSO_4$ (Fig. 6). In vivo blood flow imaging of fetuses in uterine horns was performed under control conditions (Fig. 6A) and 30 min after the administration of low (100 mg/kg; Fig. 6B) and high (600 mg/kg; Fig. 6C) doses of $MgSO_4$. With the high dose of $MgSO_4$, false color images revealed a strong and global decrease in the fetal perfusion (Fig. 6C). Quantification of blood perfusion within fetal heads (Fig. 6A–C; squares) showed a significant reduction of blood flow in brain fetuses exposed to the high dose of $MgSO_4$ ($P < 0.001$; Fig. 6D–G). Immunohistochemistry experiments targeting Hif-1α showed that in the cortex of fetuses whose mothers were treated with 0.9% NaCl (Fig. 6H) or 100 mg/kg $MgSO_4$ (Fig. 6I), Hif-1α immunolabeling was mainly cytosolic and poorly co-localized with nuclei (arrows; Fig. 6H and I). In contrast, in the brain of fetuses from pregnant mice exposed to the high (600 mg/kg) dose of $MgSO_4$, Hif-1α immunolabeling co-localized with nuclei in several nervous cells (Fig. 6J). Quantification by Western blot of the nuclear fraction of Hif-1α in cortex extracts revealed a significant effect of the high (600 mg/kg) dose of $MgSO_4$ ($P < 0.05$; Fig. 6K). These data indicate for the first time that in vivo

© 2017 The Authors. *Pharmacology Research & Perspectives* published by John Wiley & Sons Ltd, British Pharmacological Society and American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics.

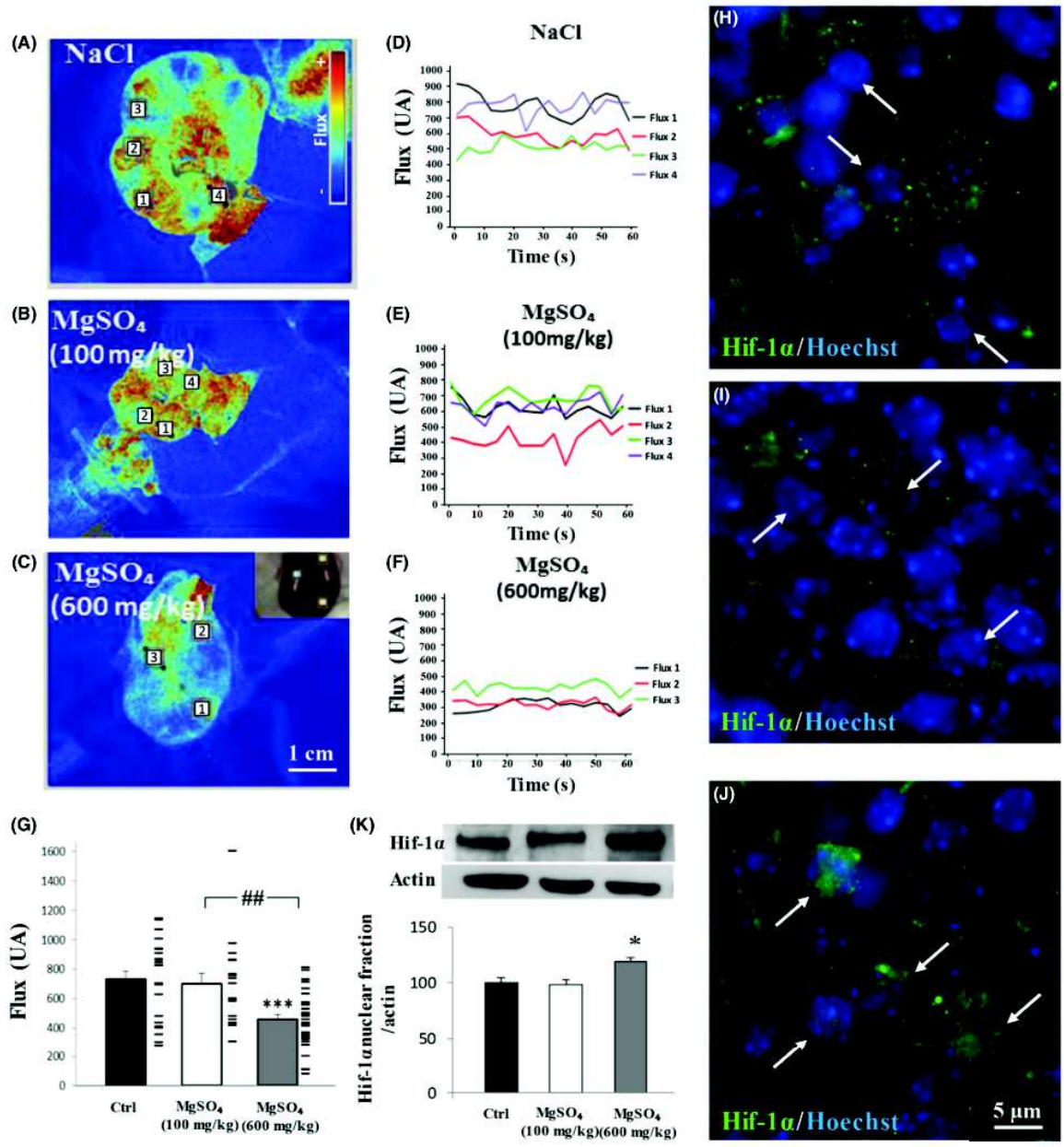


Figure 6. Effects of in utero $MgSO_4$ exposure on brain perfusion of fetuses and on Hif-1α expression. (A–C) False color visualization by laser speckle imagery of blood–brain perfusion in fetuses whose mothers were exposed to NaCl (0.9%; A) or low (100 mg/kg; B) and high (600 mg/kg; C) doses of $MgSO_4$. The color bar is indicative of low (blue) and high (red) cerebral blood perfusion. Numbers indicate the fetal heads selected for the quantification of cerebral blood perfusion. (D–F) 1-min in utero recording of the cerebral blood flux from fetuses whose mother were injected 30 min earlier with NaCl (0.9%; A) or low (100 mg/kg; B) and high (600 mg/kg; C) doses of $MgSO_4$. For each condition, the curve numbers correspond to the fetuses identified in A–C. (G) One-way ANOVA analysis showed a group effect ($F = 8.469$; $P = 0.0005$) and Tukey's multiple comparison test indicated the following: $^{***}P < 0.001$ versus control; $^{\#\#}P < 0.01$. (H–J) Visualization by immunohistochemistry of Hif-1α labeling in cortical neurons of fetuses 30 min after treatment of the GD18 pregnant mice with NaCl (0.9%; H) or low (100 mg/kg; I) and high (600 mg/kg, J) doses of $MgSO_4$. Note that in control conditions, Hif-1α immunoreactivity is cytosolic (H), whereas nuclear translocation occurred (J) for the highest dose of $MgSO_4$. (K) Quantification by Western blot of Hif-1α levels in the nuclear fraction of cortices from GD20 fetuses exposed in utero to NaCl (0.9%) or low (100 mg/kg) and high (600 mg/kg) concentrations of $MgSO_4$. One-way ANOVA analysis showed a group effect ($F = 6.212$; $P = 0.0345$) and Tukey's multiple comparison test indicated the following: $^{*}P < 0.05$ versus control; $^{\#}P < 0.05$ versus $MgSO_4$ 100 mg/kg.

© 2017 The Authors. *Pharmacology Research & Perspectives* published by John Wiley & Sons Ltd, British Pharmacological Society and American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics.

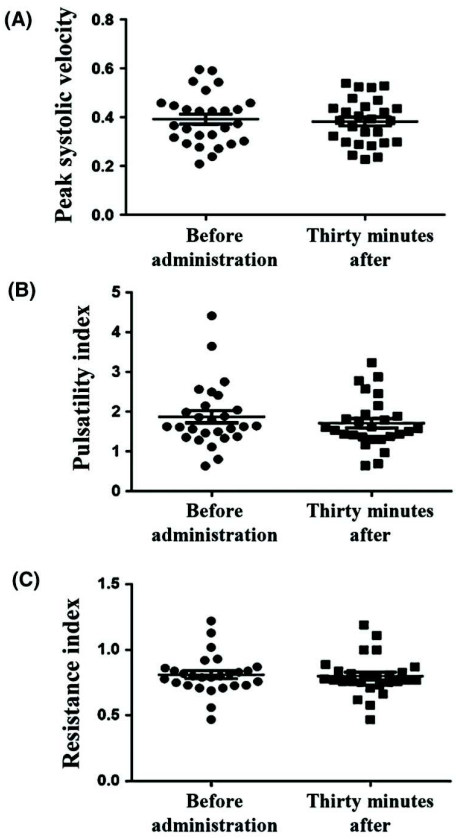
treatment of pregnant mice with a high dose of $MgSO_4$ results in brain hypoperfusion and Hif-1α stabilization in nervous cells.

A low (4-g) loading dose of $MgSO_4$ does not impair hemodynamic indicators in the human fetal brain

Previous studies from Souza and co-workers investigated in humans the effect of $MgSO_4$ on fetal cerebral blood flow in preeclampsia (Souza et al. 2010). Results revealed that after a 6-g $MgSO_4$ loading dose, resistance index (RI) and pulsatility index (PI) significantly decreased in the fetal middle cerebral artery. We performed a similar follow-up of hemodynamic criteria in the middle cerebral artery of fetuses exposed to a bolus of 4-g $MgSO_4$, a dose that is in accordance with currently used and validated neuroprotection protocols (Crowther et al. 2003; Marret et al. 2007). In all. 27 human fetuses were included in the study (Table 1). Mean gestational age when Doppler velocimetry was performed was 29.3 ± 0.5 weeks of gestation (WG). Contrasting to results obtained with a 6-g loading dose, data analysis revealed no statistically significant reduction in the mean RI, PI, and PSV (Fig. 7A–D). These results demonstrate that intravenous infusion of 4-g $MgSO_4$ in pregnant women does not impair hemodynamic indicators in the middle cerebral artery of fetuses.

Discussion

Currently, $MgSO_4$ is used in obstetrics departments for several indications, that is, preeclampsia (Ueda et al. 2016), tocolysis (McNamara et al. 2015), and neuroprotection (Doyle et al. 2007). However, modalities and doses of $MgSO_4$ administered to pregnant women strongly vary worldwide. Some case reports showed adverse effects, including brain vasculopathies on fetuses from women who received cumulative high doses of $MgSO_4$ (Mittendorf et al. 2006; Abbassi-Ghanavati et al. 2012; De Jesus et al. 2015). For these reasons, despite that the use of $MgSO_4$ is recommended for neuroprotection by several colleges of obstetricians and gynecologists, no consensus exists regarding the optimal regimen of $MgSO_4$ (McPherson et al. 2014). These uncertainties result from the fact that mechanisms leading to neuroprotection and/or vascular side effects of $MgSO_4$ in the developing brain are not understood or controversial (Hoffman et al. 1994; Galinsky et al. 2016). Based on these statements, using preclinical models and clinical approaches, we performed molecular and mechanistic characterization of the effects of graded doses of $MgSO_4$ on several physiologic and pathophysiologic processes occurring in the developing brain of fetuses and neonates by focusing on excitotoxicity, apoptosis, and angiogenesis. In addition, we measured, in human fetuses, hemodynamic action of a 4-g bolus of $MgSO_4$, a loading dose already validated and currently used in neuroprotection clinical protocols



(D)

	Loading dose	
	4 g	6 g
Resistance index (MCA)	No significant effect $P = 0.6858$	Significantly decreased ***$P = 0.001$
Pulsatility index (MCA)	No significant effect $P = 0.1922$	Significantly decreased ***$P < 0.001$
[a]PSV ; [b]S/D ratio	[a]No significant effect $P = 0.5530$	[b]Significantly decreased ***$P = 0.001$
Reference		Souza et al., 2010

Figure 7. Effects of $MgSO_4$ administration in pregnant women on Doppler flow parameters of the fetal brain. (A–C) Pregnant women with gestational ages ranging from 26 to 33 weeks received an intravenous bolus of 4-g $MgSO_4$. The quantity and the mode of administration of $MgSO_4$ were those defined by protocols which are routinely used in clinics for fetal neuroprotection (Crowther et al. 2003; Marret et al. 2007). Peak systolic velocity (A), pulsatility index (B), and resistance index (C) were measured in the middle cerebral artery of fetuses before and 30 min after the administration of $MgSO_4$ to the pregnant women. Statistical analysis revealed no significant differences using the paired *t* test. (D) Comparison of Doppler flow parameters acquired in the fetal brain after 4 g or 6 g loading doses of $MgSO_4$.

© 2017 The Authors. *Pharmacology Research & Perspectives* published by John Wiley & Sons Ltd, British Pharmacological Society and American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics.

(Crowther et al. 2003; Marret et al. 2007), to compare it to higher loading doses used in preeclampsia protocols, and which have been shown to induce hemodynamic perturbations in the fetal brain (Souza et al. 2010; Farshchian et al. 2012).

In preterm and term neonates, excitotoxicity represents a major process leading to brain lesions (Volpe 2009), and the biologic plausibility for the neuroprotective role of $MgSO_4$ would result, at least in part, from anti-excitotoxic action (Clerc et al. 2013). Thus, we investigated the effects of graded **concentrations** of $MgSO_4$ on excitotoxic cell death by focusing on cellular edema, cell burst, and LDH activity. Experiments revealed that $MgSO_4$ markedly prevented glutamate-induced excitotoxicity and that the anti-excitotoxic effect of $MgSO_4$ was similar between the lowest (1 mmol/L) and the highest (6 mmol/L) neuroprotective concentrations tested. The lack of difference in terms of neuroprotection between the two concentrations resulted from a maximum effect or "plateau" supporting that, when neuroprotection is effective, increasing $MgSO_4$ levels would not improve beneficial effects. Moreover, it has been shown that, in the developing brain, blockade of the NMDA receptor would be pro-apoptotic (Hansen et al. 2004; Aligny et al. 2014). These data raised the question of pro-apoptotic side effects of $MgSO_4$. Using cultured brain slices from mouse neonates, our results revealed that $MgSO_4$ is not pro-apoptotic on its own and no significant effect of $MgSO_4$ was found on caspase-3 activity, caspase-3 cleavage, or Bax expression for all the concentrations tested, whereas a positive control, MK801, did. These differential effects of $MgSO_4$ and MK801 or ketamine on apoptosis could be explained by specific pharmacological properties. On depolarization, the Mg^{2+} block of all NMDA receptor subtypes is relieved (Huang and Gibb 2014); in contrast, the blocking effect of ketamine and MK801 on the NMDA receptor is much longer (Jin et al. 2013).

Several clinical studies suggested that in utero exposure to $MgSO_4$ would impact the vascular system and hemodynamic parameters of the fetus (Mittendorf et al. 2006; De Jesus et al. 2015). Consistent with these clinical observations, $MgSO_4$ is vasodilatator and hypotensive, with hypermagnesemia >4.5 mEq/L (2.5 mmol/L) in preterm infants (Ali et al. 2003). We previously demonstrated the expression of functional NMDA receptors by endothelial cells from neonatal brain microvessels (Henry et al. 2013; Porte et al. 2017). Thus, we investigated the effects of $MgSO_4$ on calcium activity, vascular plasticity, and cell survival in neonatal endothelial cells. Major differences were found between neurons and endothelial cells. Whereas in neurons 1-mmol/L and 6.5-mmol/L concentrations of $MgSO_4$ were similarly neuroprotective, in the vascular system in vivo and in vitro experiments revealed a marked and significant dose-dependent effect of $MgSO_4$ on brain angiogenesis, vessel suffering, calcium mobilization, and endothelial cell survival. Similarly, a dose effect was found at a hemodynamic level. Laser speckle experiments showed that the highest neuroprotective dose of $MgSO_4$ induced a reduction of the brain blood flux indicative of hypoperfusion in the fetal brain, whereas the lowest neuroprotective dose of $MgSO_4$ did not. Finally, at a molecular level, a dose effect of $MgSO_4$ was also found regarding VEGF-R2 expression and Hif-1α nuclear translocation. Consistent with these data, Hif-1α is a hypoxia sensor and one of the most well-studied and predominant effects of HIF-induced transcription is the induction of VEGF and its receptors under hypoxic conditions (Marti et al. 2000). In addition, it has been shown that VEGF-R2 plays a key role in the sprouting and branching of vessels by regulating the expression of the Notch ligand DLL4 (de Bock et al. 2013). Altogether, these data indicate, for the first time, that a high dose of $MgSO_4$ impairs brain angiogenesis in the mouse and the expression of pro-angiogenic receptors from the VEGF family. They provide new highlights regarding the mechanistic pathways that would contribute to the side effects of high and cumulative doses of $MgSO_4$ in the vascular system of the neonatal brain in humans.

The present study showed that $MgSO_4$ induced neuroprotection against excitotoxicity in cultured brain slices, but also angiogenic/hemodynamic effects in vivo when increasing the injected dose. These results raised the question of the bioavailability into the brain of peripherally administered $MgSO_4$. Experiments performed in animal models and/or in human showed that when blood–brain barrier is established, plasmatic hypermagnesemia only produced a marginal increase in magnesium levels in the cerebrospinal fluid suggesting a low bioavailability of $MgSO_4$ to the mature brain (McKee et al. 2005). In contrast, even if studies investigating the bioavailability of $MgSO_4$ in the fetal brain are scarce, a preclinical study from Hallak's group showed that $MgSO_4$ injected subcutaneously in pregnant rats crosses the placenta within 2 h, enters the fetal brain, and concentrates into the forebrain (Hallak and Cotton 1993). These data suggest age-dependent brain availability of $MgSO_4$ when it is peripherally administered.

Our preclinical data showed that, in the fetal mouse brain, $MgSO_4$ induced dose-dependent effects on cortical vasculature, on Hif-1α stabilization as well as on the expression of proteins involved in angiogenesis. In human, several protocols are used worldwide with $MgSO_4$ for neuroprotection and prevention of cerebral palsy (Doyle et al. 2007; Rouse et al. 2008; Chollat et al. 2014) or treatment of preeclampsia (Ueda et al. 2016). In particular, studies performed in humans in the context of

© 2017 The Authors. *Pharmacology Research & Perspectives* published by John Wiley & Sons Ltd, British Pharmacological Society and American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics.

preeclampsia showed that loading doses of $MgSO_4$ ranging from 6 to 14 g significantly affected hemodynamic parameters in the middle cerebral artery (MCA) of the fetus (Souza et al. 2010; Farshchian et al. 2012). In particular, Souza and co-workers showed that 6-g bolus of $MgSO_4$ administered within 20 min to pregnant women significantly reduced Doppler indexes, such as the resistance index (−4%; 95% CI, 0.03; $P < 0.001$), pulsatility index (−10%; 95% CI, 0.15; $P < 0.001$), and systolic/diastolic ratio (−13%; 95% CI, 0.55; $P < 0.001$) in the MCA of the fetus (Souza et al. 2010). These data support that $MgSO_4$ is able to impact hemodynamic parameters of the human fetal brain. Based on these statements, we performed a Doppler analysis of the MCA of fetuses to evaluate the hemodynamic effects of a 4-g loading dose of $MgSO_4$ administered to women in the context of neuroprotection. In contrast to the 6-g and 14-g $MgSO_4$ loading doses, we found no effect of $MgSO_4$ on Doppler indexes quantified before and during administration of 4-g $MgSO_4$ supporting that hemodynamic effects of $MgSO_4$ in the human fetal brain are dose-dependent. However, retrospective analysis constitutes a limitation for the interpretation of clinical data. Consequently and in order to overcome this limitation, we also performed in vivo laser speckle acquisitions in fetal brains from pregnant mice exposed to different doses of $MgSO_4$. Interestingly, results showed that increasing $MgSO_4$ concentration was associated with an increase in brain hemodynamic alterations supporting clinical data as well as the retrospective analysis.

In addition to loading doses, a strong variability of $MgSO_4$ regimens is described in the literature regarding maintenance doses and treatment durations. For example, in the PREMAG trial, women received a single 4-g loading dose without maintenance (Marret et al. 2007). In the ACTOMgSO4 trial, women received a 4-g loading dose followed by a maintenance infusion of 1 g/h for up to 24 h (Crowther et al., 2003), whereas in the trial published by Rouse and co-workers, women received a 6-g bolus followed by a constant infusion of 2 g/h during 12 h (Rouse et al. 2008). Consequently, total dose of $MgSO_4$ received by the fetus can markedly change from one trial to another one. Several studies reported possible adverse effects, including vasculopathies on fetuses from women treated for severe preeclampsia and whose received high doses of $MgSO_4$ (Abbassi-Ghanavati et al. 2012; De Jesus et al. 2015). Altogether, these data raise the question of the added value of long periods of $MgSO_4$ maintenance doses for the fetus in particular in case of preeclampsia.

Even though, for reasons of metabolic specificities, it is important to be cautious when comparing doses used in animal models and in clinic (Perrin 2014). For an injection of 270 mg/kg of $MgSO_4$ to pregnant rats, Hallak and co-workers found a blood peak of magnesium at 1.52 mmol/L after 30 min (Hallak et al. 2000). Regarding the highest tested dose of $MgSO_4$ (600 mg/kg), a time course experiment showed a serum peak at 2.5 mmol/L after 30 min (Wolf et al. 1991). In the present study, we compared, for the first time, the vascular effects of graded neuroprotective doses of $MgSO_4$ ranging from 100 to 600 mg/kg. These doses were chosen to include those previously used in the literature (Wolf et al. 1991; Hallak et al. 2000). Our data clearly showed angiogenic effects for the high (600 mg/kg), but not for the low (100 mg/kg), dose of $MgSO_4$. Interestingly, a retrospective cohort study showed that clinical outcomes were found in a subset of preterm human neonates with serum magnesium levels >2.3 mmol/L (Basu et al. 2012). Moreover, in this clinical study, mothers received a loading dose of 6-g $MgSO_4$ infused over 30 min, followed by a maintenance infusion of 2 g/h until the time of delivery. Despite evident precautions regarding species transposition, these values are consistent with those found in the blood of animals (2.5 mmol/L) treated with the high dose of $MgSO_4$ (600 mg/kg; (Wolf et al. 1991).

In conclusion, using preclinical approaches, the present study provides the first mechanistic evidence that $MgSO_4$ differently impacts the activity and survival of neuronal and endothelial cells in the fetal brain. In particular, double-sword and dose-dependent actions of $MgSO_4$ on neuroprotection and angiogenesis were revealed. At a clinical level, these results indicated that, in contrast to higher loading doses, a 4-g $MgSO_4$ bolus does not induce adverse effects on brain hemodynamic parameters in the fetus. These data support the use of neuroprotection protocols with a 4-g $MgSO_4$ loading dose and a maintenance regimen limited to 1 or 2 g/h during 12 h to limit the cumulative dose.

Acknowledgements

This work was supported by INSERM, Normandy University, the Regional Platform for Cell Imaging PRIMACEN, the Conseil Régional de Haute-Normandie, FEDER DO-IT, and the LARC-Neuroscience Network. L.M. was the recipient of a fellowship from the Conseil Régional de Haute-Normandie. The authors have no conflicts of interest to declare.

Author Contributions

Participated in research design: Gonzalez, Marret, Vivien. Conducted experiments: Chollat, Lecuyer, Lecointre, Rubio. Performed data analysis: Chollat, Gonzalez, Lecuyer, Marret. Wrote and contributed to the writing of the manuscript: All authors.

© 2017 The Authors. *Pharmacology Research & Perspectives* published by John Wiley & Sons Ltd, British Pharmacological Society and American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics.

Disclosure

None declared.

References

Abbassi-Ghanavati M, Alexander JM, McIntire DD, Savani RC, Leveno KJ (2012). Neonatal effects of magnesium sulfate given to the mother. Am J Perinatol 29: 795–799.

Ali A, Walentik C, Mantych GJ, Sadiq HF, Keenan WJ, Noguchi A (2003). Iatrogenic acute hypermagnesemia after total parenteral nutrition infusion mimicking septic shock syndrome: two case reports. Pediatrics 112: e70–e72.

Aligny C, Roux C, Dourmap N, Ramdani Y, Do-Rego J-C, Jégou S, et al. (2014). Ketamine alters cortical integration of GABAergic interneurons and induces long-term sex-dependent impairments in transgenic Gad67-GFP mice. Cell Death Dis 5: e1311.

Altman D, Carroli G, Duley L, Farrell B, Moodley J, Neilson J, et al.; Magpie Trial Collaboration Group (2002). Do women with pre-eclampsia, and their babies, benefit from magnesium sulphate? The Magpie Trial: a randomised placebo-controlled trial. Lancet Lond Eng 359:1877–1890.

Basu SK, Chickajajur V, Lopez V, Bhutada A, Pagala M, Rastogi S (2012). Immediate clinical outcomes in preterm neonates receiving antenatal magnesium for neuroprotection. J Perinat Med 40: 185–189.

de Bock K, Georgiadou M, Carmeliet P (2013). Role of endothelial cell metabolism in vessel sprouting. Cell Metab 18: 634–647.

Chan FK-M, Moriwaki K, De Rosa MJ (2013). Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase (LDH) activity. Methods Mol Biol 979: 65–70.

Chollat C, Enser M, Houivet E, Provost D, Bénichou J, Marpeau L, et al. (2014). School-age outcomes following a randomized controlled trial of magnesium sulfate for neuroprotection of preterm infants. J Pediatr 165: 398–400e3.

Clerc P, Young CA, Bordt EA, Grigore AM, Fiskum G, Polster BM (2013). Magnesium sulfate protects against the bioenergetic consequences of chronic glutamate receptor stimulation. PLoS ONE 8: e79982.

Costantine MM, Weiner SJ, Institute Eunice Kennedy Shriver National of Child Health and Human Development Maternal-Fetal Medicine Units Network (2009). Effects of antenatal exposure to magnesium sulfate on neuroprotection and mortality in preterm infants: a meta-analysis. Obstet Gynecol 114: 354–364.

Crowther CA, Hiller JE, Doyle LW, Haslam RR, Australasian Collaborative Trial of Magnesium Sulphate (ACTOMg SO4) Collaborative Group (2003). Effect of magnesium sulfate given for neuroprotection before preterm birth: a randomized controlled trial. JAMA 290: 2669–2676.

De Jesus LC, Sood BG, Shankaran S, Kendrick D, Das A, Bell EF, et al., and Eunice Kennedy Shriver National Institute of Health and Human Development Neonatal Research Network (2015). Antenatal magnesium sulfate exposure and acute cardiorespiratory events in preterm infants. Am J Obstet Gynecol 212:94.e1–94.e7.

Desfeux A, El Ghazi F, Jégou S, Legros H, Marret S, Laudenbach V, et al. (2010). Dual effect of glutamate on GABAergic interneuron survival during cerebral cortex development in mice neonates. Cereb Cortex 20: 1092–1108.

Doyle LW, Crowther CA, Middleton P, Marret S (2007). Magnesium sulphate for women at risk of preterm birth for neuroprotection of the fetus. Cochrane Database Syst Rev 3: CD004661.

Farshchian N, Rezavand N, Mohammadi S (2012). Effect of magnesium sulfate on Doppler parameters of fetal umbilical and middle cerebral arteries in women with severe preeclampsia. J Clin Imaging Sci 2: 85.

Galinsky R, Davidson JO, Drury PP, Wassink G, Lear CA, van den Heuij LG, et al. (2016). Magnesium sulphate and cardiovascular and cerebrovascular adaptations to asphyxia in preterm fetal sheep. J Physiol 594: 1281–1293.

Hallak M, Cotton DB (1993). Transfer of maternally administered magnesium sulfate into the fetal compartment of the rat: assessment of amniotic fluid, blood, and brain concentrations. Am J Obstet Gynecol 169: 427–431.

Hallak M, Hotra JW, Kupsky WJ (2000). Magnesium sulfate protection of fetal rat brain from severe maternal hypoxia. Obstet Gynecol 96: 124–128.

Hansen HH, Briem T, Dzietko M, Sifringer M, Voss A, Rzeski W, et al. (2004). Mechanisms leading to disseminated apoptosis following NMDA receptor blockade in the developing rat brain. Neurobiol Dis 16: 440–453.

Henry VJ, Lecointre M, Laudenbach V, Ali C, Macrez R, Jullienne A, et al. (2013). High t-PA release by neonate brain microvascular endothelial cells under glutamate exposure affects neuronal fate. Neurobiol Dis 50: 201–208.

Hoffman DJ, Marro PJ, McGowan JE, Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos M (1994). Protective effect of MgSO4 infusion on nmda receptor binding characteristics during cerebral cortical hypoxia in the newborn piglet. Brain Res 644: 144–149.

Huang Z, Gibb AJ (2014). Mg2 + block properties of triheteromeric GluN1-GluN2B-GluN2D NMDA receptors on neonatal rat substantia nigra pars compacta dopaminergic neurones. J Physiol 592: 2059–2078.

Ingvar M, Morgan PF, Auer RN (1988). The nature and timing of excitotoxic neuronal necrosis in the cerebral cortex, hippocampus and thalamus due to flurothyl-induced status epilepticus. Acta Neuropathol (Berl) 75: 362–369.

© 2017 The Authors. *Pharmacology Research & Perspectives* published by John Wiley & Sons Ltd, British Pharmacological Society and American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics.

Jacquemyn Y, Zecic A, Van Laere D, Roelens K (2015). The use of intravenous magnesium in non-preeclamptic pregnant women: fetal/neonatal neuroprotection. Arch Gynecol Obstet 291: 969–975.

Jégou S, El Ghazi F, de Lendeu PK, Marret S, Laudenbach V, Uguen A, et al. (2012). Prenatal alcohol exposure affects vasculature development in the neonatal brain. Ann Neurol 72: 952–960.

Jin J, Gong K, Zou X, Wang R, Lin Q, Chen J (2013). The blockade of NMDA receptor ion channels by ketamine is enhanced in developing rat cortical neurons. Neurosci Lett 539: 11–15.

Koman LA, Smith BP, Shilt JS (2004). Cerebral palsy. Lancet Lond Eng 363: 1619–1631.

Lecointre M, Hauchecorne M, Chaussivert A, Marret S, Leroux P, Jegou S, et al. (2014). The efficiency of glutamate uptake differs between neonatal and adult cortical microvascular endothelial cells. J Cereb Blood Flow Metab 34: 764–767.

Louzoun-Kaplan V, Zuckerman M, Perez-Polo JR, Golan HM (2008). Prenatal hypoxia down regulates the GABA pathway in newborn mice cerebral cortex; partial protection by MgSO4. Int J Dev Neurosci 26: 77–85.

Maes M, Vanhaecke T, Cogliati B, Yanguas SC, Willebrords J, Rogiers V, et al. (2015). Measurement of Apoptotic and Necrotic Cell Death in Primary Hepatocyte Cultures. Methods Mol Biol Clifton NJ 1250: 349–361.

Mari G, Deter RL, Carpenter RL, Rahman F, Zimmerman R, Moise KJ, et al. (2000). Noninvasive diagnosis by Doppler ultrasonography of fetal anemia due to maternal red-cell alloimmunization. Collaborative Group for doppler assessment of the blood velocity in anemic fetuses. N Engl J Med 342: 9–14.

Marret S, Marpeau L, Zupan-Simunek V, Eurin D, Lévêque C, Hellot M-F, et al., PREMAG trial group (2007). Magnesium sulphate given before very-preterm birth to protect infant brain: the randomised controlled PREMAG trial* BJOG. Int J Obstet Gynaecol 114: 310–318.

Marti HJ, Bernaudin M, Bellail A, Schoch H, Euler M, Petit E, et al. (2000). Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression precedes neovascularization after cerebral ischemia. Am J Pathol 156: 965–976.

McKee JA, Brewer RP, Macy GE, Phillips-Bute B, Campbell KA, Borel CO, et al. (2005). Analysis of the brain bioavailability of peripherally administered magnesium sulfate: a study in humans with acute brain injury undergoing prolonged induced hypermagnesemia. Crit Care Med 33: 661–666.

McNamara HC, Crowther CA, Brown J (2015). Different treatment regimens of magnesium sulphate for tocolysis in women in preterm labour. Cochrane Database Syst Rev 12: CD011200.

McPherson JA, Rouse DJ, Grobman WA, Palatnik A, Stamilio DM (2014). Association of duration of neuroprotective magnesium sulfate infusion with neonatal and maternal outcomes. Obstet Gynecol 124: 749–755.

Mittendorf R, Dambrosia J, Dammann O, Pryde PG, Lee K-S, Ben-Ami TE, et al. (2002). Association between maternal serum ionized magnesium levels at delivery and neonatal intraventricular hemorrhage. J Pediatr 140: 540–546.

Mittendorf R, Kuban K, Pryde PG, Gianopoulos JG, Yousefzadeh D (2005). Antenatal risk factors associated with the development of lenticulostriate vasculopathy (LSV) in neonates. J Perinatol 25: 101–107.

Mittendorf R, Dammann O, Lee K-S (2006). Brain lesions in newborns exposed to high-dose magnesium sulfate during preterm labor. J Perinatol 26: 57–63.

Nelson KB, Blair E (2015). Prenatal factors in cerebral Palsy. N Engl J Med 373: 2288–2289.

Obstetric Care Consensus No 3(2015). Periviable birth. Obstet Gynecol 126: e82–e94.

Perrin S (2014). Preclinical research: make mouse studies work. Nature 507: 423–425.

Porte B, Hardouin J, Zerdoumi Y, Derambure C, Hauchecorne M, Dupre N, et al. (2017). Major remodeling of brain microvessels during neonatal period in the mouse: a proteomic and transcriptomic study. J Cereb Blood Flow Metab. 37: 495–513.

Pryde PG, Mittendorf R (2011). Using prophylactic, but not tocolytic, magnesium sulfate to reduce cerebral palsy related to prematurity: what dose, and what about infant mortality? J Perinat Med 39: 375–378.

Romani AMP (2011). Cellular magnesium homeostasis. Arch Biochem Biophys 512: 1–23.

Rouse DJ, Hirtz DG, Thom E, Varner MW, Spong CY, Mercer BM, et al. (2008). A randomized, controlled trial of magnesium sulfate for the prevention of cerebral palsy. N Engl J Med 359: 895–905.

Souza ASR, Amorim MMR, Coutinho ICANC, de Lima MMS, Noronha Neto C, Figueroa JN, (2010). Effect of the loading dose of magnesium sulfate (MgSO4) on the parameters of Doppler flow velocity in the uterine, umbilical and middle cerebral arteries in severe preeclampsia. Hypertens Pregnancy 29: 123–134.

Stanika RI, Pivovarova NB, Brantner CA, Watts CA, Winters CA, Andrews SB (2009). Coupling diverse routes of calcium entry to mitochondrial dysfunction and glutamate excitotoxicity. Proc Natl Acad Sci USA 106: 9854–9859.

Ueda A, Kondoh E, Kawasaki K, Mogami H, Chigusa Y, Konishi I (2016). Magnesium sulphate can prolong pregnancy in patients with severe early-onset preeclampsia. J Matern-Fetal Neonatal Med 29: 3115–3120.

© 2017 The Authors. *Pharmacology Research & Perspectives* published by John Wiley & Sons Ltd, British Pharmacological Society and American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics.

Volpe JJ (2009). Brain injury in premature infants: a complex amalgam of destructive and developmental disturbances. Lancet Neurol 8: 110–124.

Wolf G, Fischer S, Hass P, Abicht K, Keilhoff G (1991). Magnesium sulphate subcutaneously injected protects against kainate-induced convulsions and neurodegeneration: in vivo study on the rat hippocampus. Neuroscience 43: 31–34.

Won C, Lin Z, Kumar TP, Li S, Ding L, Elkhal A, et al. (2013). Autonomous vascular networks synchronize GABA neuron migration in the embryonic forebrain. Nat Commun 4: 2149.

Zeng X, Xue Y, Tian Q, Sun R, An R (2016). Effects and safety of magnesium sulfate on neuroprotection: a meta-analysis based on PRISMA guidelines. Medicine (Baltimore) 95: e2451.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article:

Data S1. Supplementary Results.
Figure S1. Effects of graded concentrations of $MgSO_4$ on indicators of apoptotic death under basal and excitotoxic conditions.
Table S1. Origin and characteristics of the antibodies used for immunohistochemical and Western blot studies.
Table S2. Sequences of the primers used for quantitative RT-PCR experiments.
Table S3. Statistical analysis data.

© 2017 The Authors. *Pharmacology Research & Perspectives* published by John Wiley & Sons Ltd, British Pharmacological Society and American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics.

III Annexe 3 : Does remifentanil have a place for sedation in case of endotracheal intubation or minimally invasive surfactant therapy in neonates ?

Neonatology. 2017;112(4):372-373. doi: 10.1159/000479622. Epub 2017 Sep 2