



Effet neuroprotecteur d'une supplémentation maternelle en polyphénols dans le cadre de l'hypoxie-ischémie néonatale

Ursule Dumont

► To cite this version:

Ursule Dumont. Effet neuroprotecteur d'une supplémentation maternelle en polyphénols dans le cadre de l'hypoxie-ischémie néonatale. Médecine humaine et pathologie. Université de Bordeaux; Université de Lausanne, 2021. Français. NNT : 2021BORD0022 . tel-03164206

HAL Id: tel-03164206

<https://theses.hal.science/tel-03164206>

Submitted on 9 Mar 2021

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.

THÈSE EN COTUTELLE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX
ET DE L'UNIVERSITÉ DE LAUSANNE

ÉCOLE DOCTORALE UB & ÉCOLE DOCTORALE UNIL
SPÉCIALITÉ Nutrition

Par Ursule DUMONT

**Effet neuroprotecteur d'une supplémentation maternelle en polyphénols dans
le cadre de l'hypoxie-ischémie néonatale.**

Sous la direction de Anne-Karine BOUZIER-SORE
et de Mehdi TAFTI

Soutenue le 18 Janvier 2021

Membres du jury :

M. GUILLARD Jérôme	Professeur	Université de Poitiers	Président
Mme. PAGE Guylène	Professeure	Université de Poitiers	Rapporteur
Mme. CHALON Sylvie	Professeur	Université de Tours	Rapporteur
Mme. GIRARD Nadine	Directeur de recherche	Université de Tours	Examineur
M. PELLERIN Luc	Professeur	Université de Poitiers	Invité
Mme. ROUMES Hélène	Chercheur	Université de Bordeaux	Invitée

Effet neuroprotecteur d'une supplémentation maternelle en polyphénols dans le cadre de l'hypoxie-ischémie néonatale.

L'hypoxie-ischémique (HI) néonatale est une pathologie qui touche 1-8 ‰ nourrissons. Elle est caractérisée par une privation d'oxygène et du flux sanguin vers le cerveau au moment de la naissance. Les lésions à long terme peuvent être limitées par l'hypothermie, seule thérapie actuellement appliquée en clinique, mais de nombreux nouveau-nés n'y répondent pas. Le *trans*-resvératrol (RSV) joue un rôle neuroprotecteur dans diverses pathologies neurodégénératives. Notre objectif est d'étudier les effets de différents fenêtres de supplémentation maternelle en RSV sur les conséquences cérébrales d'une HI néonatale chez le rat et de décrire les différentes voies neuroprotectrices empruntées par ce polyphénol. Pour cela différents groupes de supplémentations ont été définis en fonction de la présence du RSV (0,15mg/kg/jour) dans l'eau de boisson de la rate (préventif ou curatif). L'originalité du projet repose sur le mode d'administration qui est transgénérationnel et nutritionnel. Les rats ont subi une HI à P7 et un suivi longitudinal des dommages a été effectué avec la mesure des volumes lésionnels par IRM (Bruker 4,7T) et divers tests comportementaux. Afin de décrypter la mécanistique du RSV, des RT-qPCR, Western Blot et analyses histologiques ont été réalisés permettant une grande complémentarité des techniques. Le rôle neuroprotecteur de la supplémentation maternelle en RSV a pu être mis en évidence, plus particulière pour le groupe rsvGL (supplémentation en RSV deux semaines avant l'HI). En effet, ce groupe a présenté des plus petites lésions et des meilleures performances comportementales. Les analyses ont montré une augmentation de l'expression des gènes des voies de signalisations connus du RSV (SIRT1, SOD et Bcl2) et du métabolisme cérébrale (MCTs, LDHs, GLAST, GLT1, Na⁺/K⁺ATPase). En conclusion, le RSV a indéniablement des propriétés neuroprotectrices qui sont dues à l'activation de la voie des sirtuines (antioxydantes et anti apoptotiques). Néanmoins, le RSV a aussi un impact sur le métabolisme cérébral et plus particulièrement sur la navette lactate astrocyte-neurone (ANLS) comme suggèrent les données de RT-qPCR et de western-blot, qui contribuent aux effets neuroprotecteurs.

IRM, hypoxie-ischémie néonatale, polyphénol, resvératrol, métabolisme cérébral.

Neuroprotective effect of maternal resveratrol supplementation in a rat model of neonatal hypoxia-ischemia

Neonatal hypoxia-ischemia (HI) is a major cause of death or subsequent disabilities in infants. HI causes brain lesions, which are induced by a strong reduction in oxygen and nutrient supply. Hypothermia is the only validated beneficial intervention, but not all newborns respond to it. Trans-resveratrol (RSV) is an interesting candidate as it has been reported to exhibit neuroprotective effects in some neurodegenerative diseases. This experimental study aimed to investigate a possible neuroprotection of RSV in rat neonatal HI, when administered to the pregnant rat female, at a nutritional dose. Several groups of pregnant female rats were studied in which RSV was added to drinking water either during the last week of pregnancy, the first week of lactation, or both. Then, 7-day old pups underwent an HI event. Pups were followed longitudinally, using both MRI and behavioral testing. To decipher the molecular mechanism of this neuroprotection, RT-qPCR and western blots were also performed on pup brain samples. Data clearly indicated that when dams were supplemented with RSV, HI pup brain lesions were significantly reduced. Maternal RSV supplementation allowed to reverse HI pup sensorimotor and cognitive deficits caused by the insult. The best recoveries were observed when RSV was administered during both gestation and lactation rsvGL group. Our hypothesis is that RSV, in addition to the well-known neuroprotective benefits via the sirtuin's pathway (antioxidant properties, inhibition of apoptosis), has an impact on brain metabolism, and more specifically on the astrocyte-neuron lactate shuttle (ANLS), as suggested by RT-qPCR and western-blot data that contributes to the neuroprotective effects.

MRI, neonatal hypoxia-ischemia, polyphenol, resveratrol, brain metabolism.

**Centre de Résonance Magnétique des Systèmes Biologique (Bordeaux) et
Département des Sciences Biomédicales (Lausanne)**

Par ces quelques lignes, je voudrais remercier toutes les personnes qui ont participé, de près et de loin, à l'aboutissement de mon projet de thèse.

Je remercie les membres du Jury d'avoir pris part à la lecture de mon manuscrit et l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail. Le jury de la soutenance Suisse : **Pauline Lafenêtre, Lorenz Hirt** et le président **Vincent Barras**. Et le jury de la soutenance Française **Sylvie Chalon, Nadine Girard, Guylène Page** et le président **Jérôme Guillard**.

Je souhaite remercier également **Mehdi Tafti** qui a accepté de prendre le relai administratif comme directeur de thèse Suisse pendant la dernière année.

Tout d'abord, je tiens à remercier le Centre de Résonance Magnétique des Systèmes Biologiques qui m'a accepté en Master 2 puis lors de première partie de thèse et je remercie tout particulièrement, le directeur **Sylvain Miraux**. Ensuite, je souhaite remercier le Département des Science Biomédicales et son directeur **Romano Regazzi** qui m'a accueilli pendant la deuxième partie de thèse.

Ensuite, je souhaite remercier ceux à qui je dois tant : **Luc, Anne-Karine et Hélène**. Ceux qui m'ont fait confiance et qui ont cru en moi depuis le début.

Je tiens à remercier chaleureusement mes deux directeurs de thèse, **Anne-Karine Bouzier** et **Luc Pellerin**. Merci pour ce beau projet, ces années m'ont beaucoup apporté, autant scientifiquement qu'humainement. Je remercie Anne-Karine de m'avoir formé en métabolisme cérébrale et en IRM. Je partais de très loin et elle a su m'apprendre énormément de choses et je lui en sais gré. Je remercie Luc d'avoir apporté la fameuse ANLS et pour ses compétences très enrichissantes. Je les remercie également pour l'opportunité de cette cotutelle.

Je remercie **Hélène Roumes Rodriguez** d'avoir relu la thèse, les publications, les posters, et même tous les mails. Le picéatannol ne serait pas présent dans ce manuscrit sans ces conseils scientifiques et ses compétences en nutrition et en neuroscience. Merci, d'avoir brillamment mis en place le comportement dans mon projet. Je n'oublierai pas son temps record pour placer correctement les rats dans l'IRM.

Je souhaite ensuite remercier ceux avec qui j'ai commencé et fini ce beau projet, ceux qui étaient là dans les bons comme dans les mauvais moments : **Coralie Brotropcomplique, Angélique Rivot** et **Stéphane Loubrie**. Et tout particulièrement **Colleen Cardiet**, la rencontre la plus importante dans ce doctorat. Je tiens à la remercier pour son soutien moral et son amitié.

Et bien évidemment, je tiens à remercier les autres doctorants qui sont passés durant ces cinq années au RMSB. **Jordy Blanc** qui m'a apporté beaucoup de réponses à mes doutes au début de thèse et qui a su apporter de la bonne humeur quotidienne. Merci à **Samuel, Aimée, François, Dahmane, Emile** qui ont su montrer de la sympathie et de l'humour jusqu'au dernier jour.

Je tiens à remercier sincèrement tous mes collègues du RMBS. Merci à **Stéphane Sanchez** pour la ligature des carotides parfaites à chaque fois. Merci **Philippe Massot, William** et **Marc Biran** pour leurs précieux conseils et leurs disponibilités lors des

problèmes techniques. Merci à **Véronique Bouchaud** et **Noel Pinaud** pour leur soutien si précieux et pour ces nombreuses discussions au RU.

Ensuite, je souhaiterais remercier ceux sans qui mon séjour en Suisse n'aurait pas été aussi facile. Je tiens à remercier **Anna Hadjichambi** pour sa sympathie et sa bonne humeur. Un grand merci à **Cendrine Répond** pour sa formation en biologie moléculaire et ces précieux conseils. Je tiens à remercier tout particulièrement **Charlotte Jollé** et **Cathy Gouelle** étaient là quand ça n'allait pas et lorsque les expérimentations étaient au plus bas. Je souhaite les remercier pour leurs présences et les conseils scientifiques qu'elles m'ont apportés.

Je tiens à remercier **mes amis Bordelais** pour leur présence et leur bonne humeur. Je remercie également **mes copines** de longues dates (Angoulême, Dubaï, Montpellier, Paris) qui m'ont toujours soutenu et supporté.

Enfin, je tiens à remercier ceux qui sont présent depuis 28 ans et principalement durant ces trois dernières années de thèse. Je remercie chaleureusement **mes parents** pour leur soutien indéfectible dans la continuité de mes études, les nombreuses relectures et leur amour.

Merci à **mes frères**, toujours là quand il faut.

Et finalement, je tiens à remercier, **Murphy**, pour sa patience et son amour quotidien.

Table des matières

LISTE DES ABREVIATIONS	- 3 -
LISTE DES FIGURES.....	- 4 -
LISTE DES TABLEAUX.....	- 5 -
LISTES DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	- 6 -
CHAPITRE I : ÉTAT DE L'ART	- 8 -
1. LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL ET SON METABOLISME	- 9 -
1.1. AVANT-PROPOS.....	- 9 -
1.2. LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL.....	- 9 -
1.3. NAVETTE LACTATE ASTROCYTE-NEURONE.....	- 13 -
2. HYPOXIE-ISCHEMIE DES NOUVEAU-NES.....	- 18 -
2.1. GENERALITES SUR L'HYPOXIE-ISCHEMIE NEONATALE	- 18 -
2.2. MECANISTIQUE DE L'HYPOXIE-ISCHEMIE NEONATALE.....	- 19 -
2.3. METHODES DE DIAGNOSTIC/PRONOSTIC	- 23 -
2.4. TRAITEMENTS PROPOSES.....	- 25 -
3. LE RESVERATROL (RSV)	- 28 -
3.1. AVANT-PROPOS.....	- 28 -
3.2. HISTORIQUE.....	- 28 -
3.3. NEUROPROTECTION DU RSV DANS UN CONTEXTE D'AVC.....	- 30 -
4. EFFETS NEUROPROTECTEURS DU RSV DANS LE CADRE DE L'HI NEONATALE	- 34 -
4.1. ÉTUDES AYANT MONTRE UN EFFET NEUROPROTECTEUR PREVENTIF DANS LE CADRE D'UNE HI NEONATALE, MAIS PAS D'EFFET CURATIF	- 34 -
4.2. ÉTUDES AYANT MONTRE UN EFFET NEUROPROTECTEUR CURATIF DANS LE CADRE D'UNE HI NEONATALE, MAIS PAS D'EFFET PREVENTIF	- 36 -
5. BIBLIOGRAPHIE.....	- 39 -
CHAPITRE II : LES METHODES UTILISEES	- 43 -
1. LE MODELE CLASSIQUE D'HYPOXIE-ISCHEMIE NEONATALE DE RICE-VANNUCCI	- 44 -
1.1. LE PROTOCOLE D'HYPOXIE-ISCHEMIE NEONATALE.....	- 44 -
1.2. LES LIMITES DU PROTOCOLE D'HYPOXIE-ISCHEMIE	- 46 -
2. LA SUPPLEMENTATION MATERNELLE.....	- 49 -
2.1. ALIMENTATION ET LITIÈRE DES RATES.....	- 49 -
2.2. SUPPLEMENTATION EN POLYPHENOL.....	- 50 -
2.3. FENÊTRES DE SUPPLEMENTATION.....	- 52 -
3. IMAGERIE PAR RESONANCE MAGNETIQUE.....	- 54 -
3.1. L'IMAGERIE DE DIFFUSION	- 54 -
3.2. L'ANGIOGRAPHIE ET LA PERFUSION.....	- 59 -
4. LES TESTS DE COMPORTEMENT.....	- 60 -
4.1. LES REFLEXES PRECOCES	- 61 -
4.2. ÉVALUATION DES TROUBLES NEUROLOGIQUES : MODIFIED NEUROLOGICAL SEVERITY SCORE (MNSS).....	- 61 -
4.3. LA RECONNAISSANCE DU NOUVEL OBJET	- 62 -
5. PRELEVEMENTS DES STRUCTURES CÉRÉBRALES ET DES CERVEAUX DES RATONS	- 63 -

5.1.	PRELEVEMENTS DES STRUCTURES CEREBRALES POUR LES WESTERN BLOT (WB) ET LES REACTIONS EN CHAINE PAR LA POLYMERASE (PCR)	- 63 -
5.2.	HISTOLOGIE	- 65 -
6.	ANALYSES MOLECULAIRES.....	- 66 -
6.1.	RT-QPCR.....	- 66 -
6.2.	WESTERN BLOT.....	- 68 -
6.3.	COLORATION DE NISSL.....	- 72 -
7.	ANALYSES STATISTIQUES	- 72 -
8.	BIBLIOGRAPHIE.....	- 73 -
	CHAPITRE III : EFFET NEUROPROTECTEUR D'UNE SUPPLEMENTATION MATERNELLE EN RESVERATROL DANS LE CADRE DE L'HYPOXIE-ISCHEMIE NEONATALE.....	- 74 -
1.	INTRODUCTION.....	- 75 -
2.	METHODES	- 76 -
3.	RESULTATS.....	- 77 -
4.	DISCUSSION	- 83 -
5.	BIBLIOGRAPHIE ET PUBLICATION	- 87 -
	CHAPITRE IV : EFFET NEUROPROTECTEUR D'UNE SUPPLEMENTATION MATERNELLE EN PICEATANNOL DANS LE CADRE DE L'HYPOXIE-ISCHEMIE NEONATALE.....	- 105 -
1.	INTRODUCTION.....	- 106 -
2.	METHODES	- 107 -
3.	RESULTATS.....	- 108 -
4.	DISCUSSION	- 111 -
5.	BIBLIOGRAPHIE ET PUBLICATION	- 113 -
	CHAPITRE V : EFFET NEUROPROTECTEUR D'UNE SUPPLEMENTATION MATERNELLE EN POLYPHENOLS DANS LE CADRE DE L'HYPOXIE-ISCHEMIE NEONATALE COUPLEE A UN SYNDROME D'ALCOOLISME FOETAL.....	- 123 -
1.	INTRODUCTION.....	- 124 -
2.	METHODES	- 126 -
	<i>EXPLICATION DU TEST DU RETRAIT ADHESIF.....</i>	<i>- 127 -</i>
3.	RESULTATS.....	- 127 -
4.	DISCUSSION	- 131 -
5.	BIBLIOGRAPHIE ET PUBLICATION	- 134 -
	CHAPITRE VI : CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	- 146 -
1.	CONCLUSION.....	- 147 -
2.	PERSPECTIVES	- 150 -
3.	BIBLIOGRAPHIE.....	- 154 -

Liste des abréviations

ACC	Artère carotide commune
ADC	Apparent diffusion coefficient (coefficient de diffusion apparent)
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-méthylisoazole-4- propionique
ANLS	La navette lactate astrocyte-neurone (Astrocyte- Neuron lactate Shuttle)
AVC	Accident vasculaire cérébral
Bax	Bcl2-associated X
Bcl2	B-cell lymphoma 2
BHE	Barrière hémato-encéphalique
DSC	Débit sanguin cérébral
DTI	Diffusion imaging tensor (imagerie des tenseurs de diffusion)
DWI	Imagerie pondéré de diffusion
EI	Évitement inhibiteur
EPO	Érythropoïétine
EROs	Espèces réactive à l'oxygène
FA	Fraction d'anisotropie
FAD	Flavine adénine dinucléotide
GABA	acide γ -aminobutyrique
GLAST	Glutamate aspartate transporter 1
GLT-1	Glutamate transporter 1
GPx	Glutathion-peroxydase
GSH	Glutathion réduit
HI	Hypoxie-ischémie
HT	Hypothermie thérapeutique
IL-1b	Interleukine 1b
IL-6	Interleukine 6
i.p.	Injection en intrapéritonéal
IRM	Imagerie par résonance magnétique
LDH	Lactate déshydrogénase
MA	Maladie d'Alzheimer
MCAO	Occlusion de l'artère cérébrale moyenne
MCT	Transporteur de monocarboxylate
MMP	Métalloprotéase matricielles
mNSS	Modified neurological severity score
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide
Na ⁺ /K ⁺ ATPase	Pompe sodium / potassium ATP-dépendante
NMDA	Acide N-méthyl-D-aspartate
Nrf2	Nuclear erythroid 2 related factor 2
OGD/R	Oxygen glucose deprivation / reperfusion
P	Post-natal day
PIC	Picéatannol
rHuEPO	Érythropoïétine recombinante humaine
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RT-qPCR	Real Time – quantitative PCR
RSV	Resvératrol
Sirt1	Silent mating type Information Regulator 1
SNC	Système nerveux central
SOD	Superoxyde dismutase
TNF- α	Facteur de nécrose tumoral alpha
UCP2	Uncoupling protein 2
WB	Western Blot

Liste des figures

Figure 1 : Les grandes familles cellulaires du SNC.....	- 10 -
Figure 2 : Les principales voies métaboliques du SNC.....	- 12 -
Figure 3: Coopération métabolique entre les astrocytes et les neurones.....	- 13 -
Figure 4: ANLS (Astrocyte Neuron Lactate Shuttle ou Navette lactate astrocyte-neurone) et ses partenaires clés.....	- 15 -
Figure 5 : Impact de l'HI néonatale.....	- 18 -
Figure 6: Les différentes étapes de l'HI.....	- 20 -
Figure 7 : Les deux modes de refroidissement utilisés en clinique.....	- 25 -
Figure 8 : Les dates clés du RSV.....	- 28 -
Figure 9 : Voie de synthèse du RSV.....	- 29 -
Figure 10: Les deux isomères du RSV.....	- 30 -
Figure 11: Potentielles cibles associées aux propriétés neuroprotectrices du RSV dans le cadre de l'AVC.....	- 30 -
Figure 12: Résumé du mode d'action connu du RSV après un AVC.....	- 33 -
Figure 13 : Schéma descriptif du protocole d'HI néonatale.....	- 45 -
Figure 14 : Photo du lit chauffant en résine.....	- 49 -
Figure 15 : Répartition des groupes de supplémentation maternelle en RSV.....	- 52 -
Figure 16: Répartition des groupes de supplémentation maternelle en PIC :.....	- 53 -
Figure 17 : Séquence de diffusion [15] :.....	- 55 -
Figure 18: Représentation de la vitesse de l'ADC dans différents environnements :.....	- 56 -
Figure 19: Définition de l'isotropie et l'anisotropie.....	- 56 -
Figure 20: Représentation des ROIs pour la quantification de la lésion.....	- 58 -
Figure 21: Représentation des ROIs pour obtenir les valeurs d'ADC et FA.....	- 58 -
Figure 22: Vérification de la ligature de l'ACC par angiographie et imagerie de perfusion :.....	- 60 -
Figure 23: Chronologie du suivi longitudinal par tests comportementaux.....	- 60 -
Figure 24: Récapitulatif des prélèvements de structures par rat.....	- 64 -
Figure 25 : Étapes de la dissection des structures cérébrales pour les jeunes rats à P48/50.....	- 65 -
Figure 26: Protocole d'extraction et purification des ARNs.....	- 66 -
Figure 27 : Procédure d'extraction des protéines.....	- 69 -
Figure 28 : Récapitulatif des groupes expérimentaux répartis en fonction des fenêtres de supplémentation en RSV.....	- 77 -
Figure 29: Effet neuroprotecteur à court et long terme d'une supplémentation maternelle en RSV après un accident d'HI à P7.....	- 79 -
Figure 30 : Impact de la supplémentation maternelle en RSV sur l'expression génique corticale et sur l'histologie du cerveau des nouveau-nés, 48h après l'HI.....	- 81 -
Figure 31: Expression de l'ARNm des gènes impliqués dans la plasticité synaptique et du récepteur NMDA.....	- 82 -
Figure 32: Schéma récapitulatif des effets neuroprotecteurs d'une supplémentation maternelle en RSV après un accident d'HI à P7.....	- 86 -
Figure 33: Structures chimiques du RSV et du PIC [2].....	- 106 -
Figure 34: Récapitulatif des groupes expérimentaux répartis en fonction des fenêtres de supplémentation en PIC.....	- 107 -
Figure 35: Effet neuroprotecteur à court et long terme d'une supplémentation maternelle en PIC après un accident d'HI à P7.....	- 109 -
Figure 36 : Effet neuroprotecteur du PIC sur les fonctions motrices et cognitives à court et à long terme.....	- 111 -
Figure 37: Récapitulatif des groupes expérimentaux répartis en fonction des fenêtres de supplémentation en polyphénols et en alcool.....	- 126 -

<i>Figure 38: Impact à court terme d'une supplémentation nutritionnelle maternelle en polyphénols, sur les effets délétères de l'HI néonatale couplée à la prise modérée d'alcool.....</i>	<i>- 129 -</i>
<i>Figure 39: Impact à long terme d'une supplémentation nutritionnelle maternelle en RSV ou PIC, sur les effets délétères cérébraux de l'HI néonatale couplée à la prise modérée d'alcool.....</i>	<i>- 130 -</i>
<i>Figure 40 : La structure du resvératrol et ses analogues.....</i>	<i>- 152 -</i>

Liste des tableaux

<i>Tableau 1 : Quelques études montrant les effets neuroprotecteurs des polyphénols sur l'HI néonatale chez le rat.....</i>	<i>- 27 -</i>
<i>Tableau 2: Effet neuroprotecteur d'un pré-traitement en polyphénol sur l'HI néonatale.....</i>	<i>- 35 -</i>
<i>Tableau 3 : Effet neuroprotecteur d'un post-traitement en polyphénols sur l'HI néonatale.....</i>	<i>- 37 -</i>
<i>Tableau 4 : Tableau comparatif des solubilités des deux polyphénols.....</i>	<i>- 51 -</i>
<i>Tableau 5: Table du modified Neurological Severity Score.....</i>	<i>- 62 -</i>
<i>Tableau 6: Liste des amorces utilisées.....</i>	<i>- 68 -</i>
<i>Tableau 7: liste des anticorps primaires utilisés.....</i>	<i>- 71 -</i>

Listes des publications et communications

Publications:

Publication issues de cette thèse :

- 1- Dumont U., *et al.*, *Maternal consumption of piceatannol: A nutritional neuroprotective strategy against hypoxia-ischemia in rat neonates. Brain Res*, 2019. 1717: p. 86-94.
- 2- Dumont U., *et al.*, *Maternal alcoholism and neonatal hypoxia-ischemia: neuroprotection by stilbenoid polyphenols. Brain Res*, 2020. 1738, 146798.
- 3- Dumont U., *et al.*, *Neuroprotective effect of maternal resveratrol supplementation in a rat model of neonatal hypoxia-ischemia. Submission Frontiers in Nutrition*

Autres publications:

- 1- Borel P., *et al.*, *Dietary calcium impairs tomato lycopene bioavailability in healthy humans. Br J Nutr*, 2016. **116**(12): p. 2091-2096
- 2- Cremillieux Y., *et al.*, *Online (1) H-MRS measurements of time-varying lactate production in an animal model of glioma during administration of an anti-tumoral drug. NMR Biomed*, 2018. **31**(2).
- 3- Cremillieux Y., *et al.*, *Online Quantification of Lactate Concentration in Microdialysate During Cerebral Activation Using (1)H-MRS and Sensitive NMR Microcoil. Front Cell Neurosci*, 2019. 13: p. 89.
- 4- Roumes H., *et al.*, *Neuroprotective role of lactate in rat neonatal hypoxia-ischemia. J Cereb Blood Flow Metab*, 2020, 271678X20908355.

Communications orales :

1. 20/10/2017: Online MRS measurement of extracellular lactate concentration during administration of anti-tumoral drugs in an animal model of glioma. R. Salvati, **U. Dumont**, L. Mazuel, V. Bouchaud, S. Sanchez, A-K. Bouzier-Sore, N. Pinaud and Y. Crémillieux. European Society for Magnetic Resonance in Medicine and Biology, Barcelone – Espagne.
2. 13-15/11/2017: Supplémentation nutritionnelle en resvératrol: neuroprotection dans l'hypoxie-ischémie du rat nouveau-né. **U. Dumont**, H. Roumes, B. Daher, S. Sanchez, J. Blanc, V. Bouchaud, J-F. Chateil, M-C. Beauvieux, A-K. Bouzier-Sore. Journée Francophone de Nutrition, Nantes, France – Flash Poster 2017.
3. 19-21/03/2019 : Supplémentation maternelle en resvératrol : neuroprotection dans le contexte d'hypoxie-ischémie du nouveau-né. **U. Dumont**, H. Roumes, S. Sanchez, J-F. Chateil, M-C. Beauvieux, L. Pellerin, A-K. Bouzier-Sore. SFRMBM, Strasbourg

Communications affichées :

- 1- 13-15/03/2017 : Effet d'une supplémentation maternelle en resvératrol et/ou éthanol sur l'encéphalopathie hypoxie ischémique néonatale chez le rat nouveau-né. H. Roumes, L. Mazuel, **U. Dumont**, S. Sanchez, J. Blanc, V. Bouchaud, J-F. Chateil, M-C. Beauvieux et A-K. Bouzier-Sore. SFRMBM, Bordeaux (33) – France
- 2- 13-15/03/2017 : Rôle neuroprotecteur du lactate lors d'une hypoxie-ischémie néonatale chez le rat nouveau-né. L. Mazuel, **U. Dumont**, S. Sanchez, H. Roumes, J. Blanc, V. Bouchaud, J-F. Chateil, A-K. Bouzier-Sore. SFRMBM, Bordeaux (33) – France.
- 3- 16/05/2017: Online quantification of lactate concentration in microdialysate during cerebrale activation using ¹H-MRS and sensitive NMR microcoil. L. Mazuel, **U. Dumont**, R. Salvati, V. Zendre, S. Rizzitelli, J. Blanc, H. Roumes, A-K. Bouzier-Sore and Y. Crémillieux. Magnétique Résonnance of the New Aquitaine, Pessac (33) – France.
- 4- 16/05/2017: Effect of maternal supplementation with resveratrol and /or ethanol on neonatal hypoxic ischemic encephalopathy in rat neonates. H. Roumes, L. Mazuel, **U. Dumont**, B. Daher, S. Sanchez, J. Blanc, V. Bouchaud, J-F. Chateil, M-C. Beauvieux, A-K. Bouzier-Sore. Magnétique Résonnance of the New Aquitaine, Pessac (33) – France.
- 5- 17-19/05/2017: Effect of maternal supplementation with resveratrol and /or ethanol on neonatal hypoxic ischemic encephalopathy in rat neonates. H. Roumes, L. Mazuel, **U. Dumont**, B. Daher, S. Sanchez, J. Blanc, V. Bouchaud, J-F. Chateil, M-C. Beauvieux, A-K. Bouzier-Sore. NeuroFrance 2017, Bordeaux (33) – France.
- 6- 11/2017: Supplémentation nutritionnelle en resvératrol: neuroprotection dans l'hypoxie-ischémie du rat nouveau-né. **U. Dumont**, H. Roumes, B. Daher, S. Sanchez, J. Blanc, V. Bouchaud, J-F. Chateil, M-C. Beauvieux, A-K. Bouzier-Sore. Journée Francophone de Nutrition, Nantes, France.
- 7- 15/05/2018: Effet neuroprotecteur du resvératrol dans l'hypoxie-ischémie. **U. Dumont**, H. Roumes, S. Sanchez, J. Blanc, J-F. Chateil, M-C. Beauvieux, L. Pellerin, A-K. Bouzier-Sore. Journée FR Technologie pour la Santé, IECH Pessac, France.
- 8- 24-25/05/2018: Maternal consumption of polyphenolic stilbenoids: a nutritional strategy to prevent neonatal hypoxia-ischemia brain damages. H. Roumes, **U. Dumont**, M-C. Beauvieux, L. Pellerin, D. Deffieux, S. Quideau and A-K. Bouzier-Sore. 11th Young Scientist Symposium, IECB Pessac, France.
- 9- 7-8/06/2018: Maternal resveratrol diet supplementation: a neuroprotective role in neonatal hypoxia-ischemia brain damages. **U. Dumont**, H. Roumes, L. Mazuel, J-F. Chateil, M-C. Beauvieux, L. Pellerin, A-K. Bouzier-Sore. Journée thématique des neurosciences, Strasbourg, France.
- 10- 19-21/03/2019 : Neuroprotection d'une supplémentation maternelle en polyphénols dans le cadre de l'hypoxie-ischémie néonatale. H. Roumes, **U. Dumont**, S. Sanchez, M-C. Beauvieux, L. Pellerin, D. Deffieux, S. Quideaux, J-F. Chateil, A-K. Bouzier-Sore. SFRMBM Strasbourg 2019.
- 11- 22-24/05/2019 : Neuroprotective effect of maternal polyphenol supplementation during hypoxia-ischemia of the newborn. Resveratrol or Piceatannol. **U. Dumont**, S. Sanchez, D. Deffieux, S. Quideau, J-F. Chateil, M-C. Beauvieux, L. Pellerin, A-K. Bouzier-Sore, H. Roumes. NeuroFrance Marseille 2019
- 12- 3-5/10/2019 : Transgenerational neuroprotection of polyphenol supplementation in neonatal hypoxia-ischemia. **U. Dumont**, S. Sanchez, M-C. Beauvieux, L. Pellerin, D. Deffieux, S. Quideau, J-F. Chateil, A-K. Bouzier-Sore, H. Roumes. ESMRMB Rotterdam 2019.

CHAPITRE I : État de l'art

1. Le système nerveux central et son métabolisme

1.1. Avant-propos

Dans ce chapitre nous allons nous concentrer sur le cerveau et plus particulièrement son métabolisme.

Objectifs de la partie 1 :

L'objectif de cette partie est de faire le bilan des connaissances actuelles sur le métabolisme énergétique cérébral.

1.2. Le système nerveux central

Le système nerveux central (SNC) a un rôle fondamental dans l'intégration des informations reçues et la coordination de l'activité de l'organisme. Il contrôle/régule/coordonne toutes les grandes fonctions de l'organisme comme la motricité, la perception (les 5 cinq sens), les fonctions intellectuelles et émotionnelles ainsi que la régulation des organes. Une atteinte au niveau cérébral peut donc avoir des conséquences dramatiques. Le SNC comprend l'encéphale (soit le cerveau, le tronc cérébral et le cervelet), qui est protégé par la boîte crânienne et la moelle épinière, qui est protégée par la colonne vertébrale. Le SNC héberge plusieurs types cellulaires distincts.

1.2.1. Organisation des éléments cellulaires du SNC

Les neurones sont considérés comme la base fonctionnelle du SNC. Ils sont composés d'un corps cellulaire appelé aussi le soma (contenant entre autre le noyau où se trouve le code génétique de la cellule) à partir duquel se forme des extensions appelées neurites. Ces neurites sont divisées en deux groupes : les dendrites et l'axone. L'axone est l'axe principal qui permet la transduction du signal. L'extrémité axonale entre en contact avec les dendrites des neurones voisins. La zone de contact entre les deux s'appelle la synapse. Les neurones sont physiologiquement spécialisés dans la réception, l'intégration et la transmission des informations. Un neurone isolé n'aurait aucun intérêt. C'est pourquoi ils sont intégrés dans des réseaux multiples et ordonnés permettant un traitement complexe des informations.

Bien que les neurones soient connus comme les cellules principales du cerveau humain, il existe une population deux à trois fois plus abondante dans le cerveau : les cellules gliales [1]. Ces cellules gliales forment l'environnement des neurones et jouent,

entre autre, un rôle de soutien et de protection en apportant des nutriments et de l'oxygène. Les cellules gliales les plus connues sont réparties en 3 grands groupes : les astrocytes, les oligodendrocytes et la microglie (figure 1 [2]).

- Les astrocytes : l'étymologie du mot astrocyte provient de *astro* : étoile et *cyte* : cellule. Comme leur nom l'indique, ces cellules ont généralement une forme étoilée. Leur fonction principale est la protection des neurones. En effet ils recapturent le glutamate en excès et maintiennent l'homéostasie pour éviter l'excitotoxicité. Plus récemment, leurs rôles et leurs implications dans la modulation de la transmission synaptique (notion de synapse « tripartite ») ainsi que dans le soutien du métabolisme neuronal ont été établis [3].
- Les oligodendrocytes : ils ont pour principale fonction de former la gaine de myéline entourant les axones. Celle-ci induit l'accélération de la vitesse de propagation du signal (ou potentiel d'action) le long du neurone. Un seul oligodendrocyte est capable de myéliniser jusqu'à 50 axones [4].
- La microglie : les cellules microgliales sont les cellules immunitaires du SNC [5]. Ces cellules s'activent lors d'une inflammation ou d'une infection extérieure et sécrètent massivement des cytokines et des chimiokines qui engendrent alors une réponse inflammatoire.

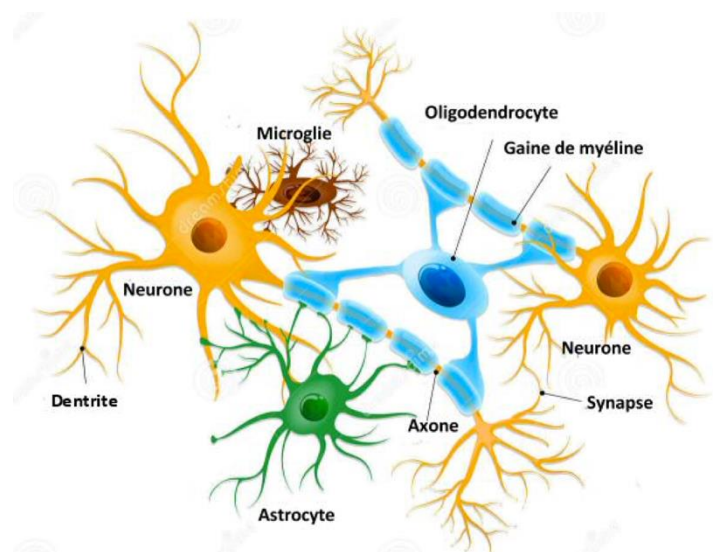


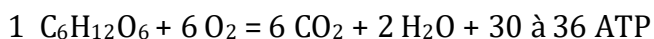
Figure 1 : Les grandes familles cellulaires du SNC.

À l'échelle macroscopique, le SNC est composé de la substance grise et de la substance blanche. La substance grise est le lieu de la transmission et du stockage des informations et correspond majoritairement aux corps cellulaires. La substance blanche correspond aux millions de câbles de communication appelés aussi fibres neuronales. Ces fibres sont composées principalement d'axones et relient les neurones entre eux d'une région du cerveau à l'autre.

1.2.2. Le métabolisme cérébral

Le cerveau est un organe très gourmand, il mobilise 25 % de l'énergie disponible alors qu'il ne représente que 2 % du poids total du corps. « *Sauf stress majeur, le cerveau est toujours le premier organe servi en énergie, et heureusement, car il supporte très mal le manque de glucose* » selon le Prof. Pierre Gressens, professeur de neurologie néonatale à l'INSERM. Il est largement admis que la source d'énergie majoritaire du cerveau est le **glucose et que son oxydation, impliquant une forte consommation d'oxygène cérébrale, en est le mécanisme de consommation principal**. Au niveau cellulaire, l'oxydation du glucose permet la production d'énergie sous forme d'adénosine triphosphate (ATP).

En condition aérobie, c'est-à-dire en condition normale d'oxygénation, cette production d'ATP résulte d'une série de voies métaboliques présentées figure 2 : la glycolyse (1), le cycle de Krebs (4) et la phosphorylation oxydative (5). L'utilisation d'une molécule de glucose et de 6 molécules d'oxygène *via* la respiration aérobie permet de fournir entre 30 à 36 molécules d'ATP (*c.f.* équation de l'oxydation du glucose).



Lors de la **glycolyse**, le glucose est doublement phosphorylé puis clivé et oxydé, menant à la production de 2 pyruvates, 2 ATP et 2 NADH (nicotinamide adénine dinucléotide, qui seront réoxydés dans la mitochondrie). Cette suite de réactions se déroule dans le cytoplasme des cellules et correspond au métabolisme glycolytique. Le pyruvate, issu de la glycolyse, a deux possibilités (figure 2 (2) ou (3)). En effet, il peut après transformation en acétyl-CoA (figure 2 (3)) entrer dans le cycle de Krebs (figure 2 (4)) et continuer son oxydation dans la mitochondrie. Le NADH est alors reconverti en NAD⁺ par la phosphorylation oxydative et engendre une production d'ATP importante. Le pyruvate, formé à l'issue de la glycolyse, peut aussi former du lactate *via* la lactate déshydrogénase (LDH) dans le cytosol régénérant ainsi du NAD⁺ (figure 2 (2)) et permettre le maintien d'un métabolisme glycolytique (cas des tumeurs). Dans des conditions standard (ou aérobiques), le pyruvate va préférentiellement emprunter la voie (3) et entrer dans le cycle de Krebs. Au niveau mitochondrial, l'acétyl-CoA est engagé de manière irréversible dans le **cycle de Krebs** où il permet la production de nombreux précurseurs impliqués dans diverses voies métaboliques. Une molécule d'acétyl-CoA va produire une molécule d'ATP, 3 NADH (qui seront réoxydés dans la chaîne respiratoire) et un FADH₂ (flavine adénine dinucléotide), lui aussi réoxydé lors de la phosphorylation oxydative. Au niveau de la **chaîne respiratoire**, étape ultime du catabolisme du glucose, les molécules de NADH et de FADH₂ formées durant la glycolyse, l'oxydation du pyruvate et le cycle de Krebs transfèrent leurs électrons à la chaîne de transport des électrons, située au niveau de la membrane mitochondriale interne. Cette chaîne de transport d'électrons produit un gradient de protons qui mène à la production d'ATP *via* l'ATP

synthase. Ces complexes nécessitent la présence d'oxygène pour pouvoir fonctionner correctement. Ces deux étapes se déroulent dans la mitochondrie et correspondent au métabolisme oxydatif. Le bilan énergétique global pour une molécule de glucose est donc de 36 ATP. Cependant, la membrane mitochondriale laissant s'échapper par diffusion passive quelques protons qui ne traverseront pas l'ATP synthase, ce bilan énergétique peut donc varier de quelques molécules d'ATP.

Ces notions de base du métabolisme énergétique sont des notions clés pour comprendre ensuite l'un des objectifs de la thèse.

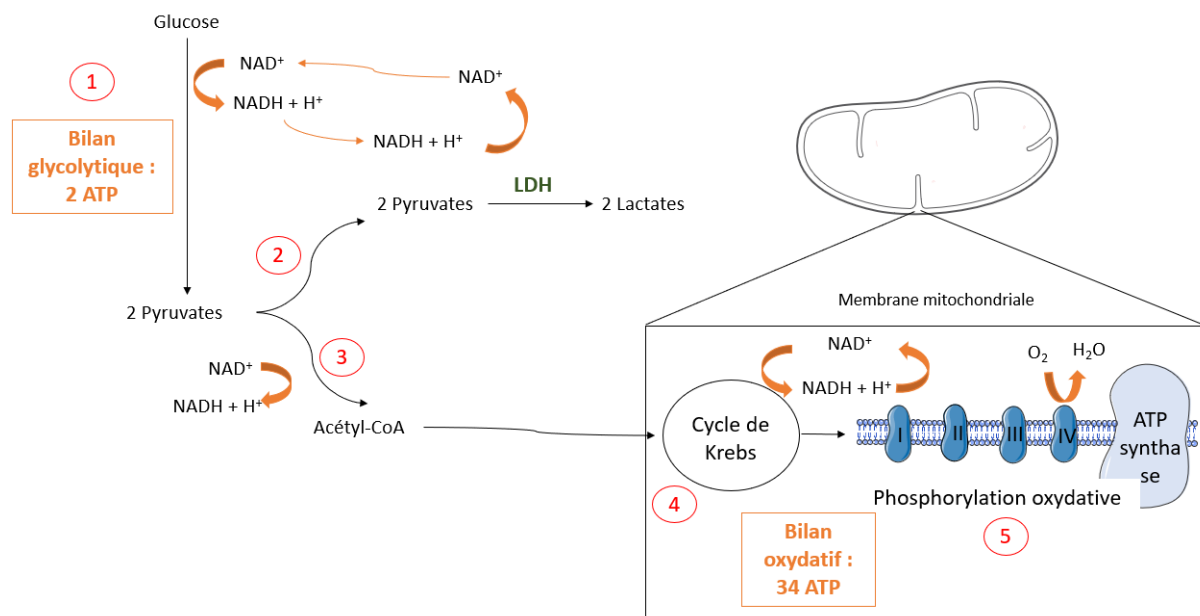


Figure 2 : Les principales voies métaboliques du SNC.

Comprenant la glycolyse ((1) cytoplasme), le cycle de Krebs (4) et la phosphorylation oxydative ((5) mitochondrie).

1.2.3. La transmission synaptique

La fente synaptique est bordée d'un côté par une terminaison pré-synaptique et de l'autre par une zone de spécialisation post-synaptique (figure 3). La terminaison pré-synaptique contient des vésicules, lieu de stockage de nombreux neurotransmetteurs. Les neurotransmetteurs, composés chimiques, sont stockés et libérés dans l'espace synaptique au moment de l'arrivée d'un train de potentiels d'action. Deux types principaux de neurotransmetteurs existent : les neurotransmetteurs inhibiteurs (tels que la glycine et l'acide γ -aminobutyrique (GABA)) et les neurotransmetteurs excitateurs (tels que le glutamate et l'acétylcholine, par exemple).

Le glutamate est le principal neurotransmetteur impliqué dans la transmission synaptique excitatrice. Libéré dans la fente synaptique, le glutamate peut se fixer au

niveau post-synaptique, sur ses récepteurs de différents sous-types, identifiés par le nom de l'un de leur agonistes sélectifs : le N-méthyl-D-aspartate (NMDA), l' α -amino-3-hydroxy-5-méthylisoazole-4-propionate (AMPA), et le kaïnate (KA). Le glutamate, libéré en excès lors de l'activité synaptique, est rapidement capté par les astrocytes voisins *via* les transporteurs au glutamate ou EAAT (excitatory amino acid transporter : EAAT1 ou glutamate/aspartate transporter 1 : GLAST et EAAT2 ou glutamate transporter 1 : GLT1). Au niveau astrocytaire, il est métabolisé principalement en glutamine *via* la glutamine synthétase (enzyme spécifique des astrocytes), qui est alors transportée *via* les transporteurs glutamiques (transporteurs d'acides aminés solutés neutres : SNAT) vers les neurones pour être reconverti en glutamate et stocké dans les vésicules jusqu'au prochain potentiel d'action. C'est le **cycle glutamate-glutamine** (figure 3). L'entrée de glutamate dans les astrocytes est couplée à une entrée de 3 sodium (Na^+). L'équilibre ionique entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule est alors rétabli par la pompe sodium/potassium ATP-dépendante (Na^+/K^+ ATPase), consommatrice d'ATP.

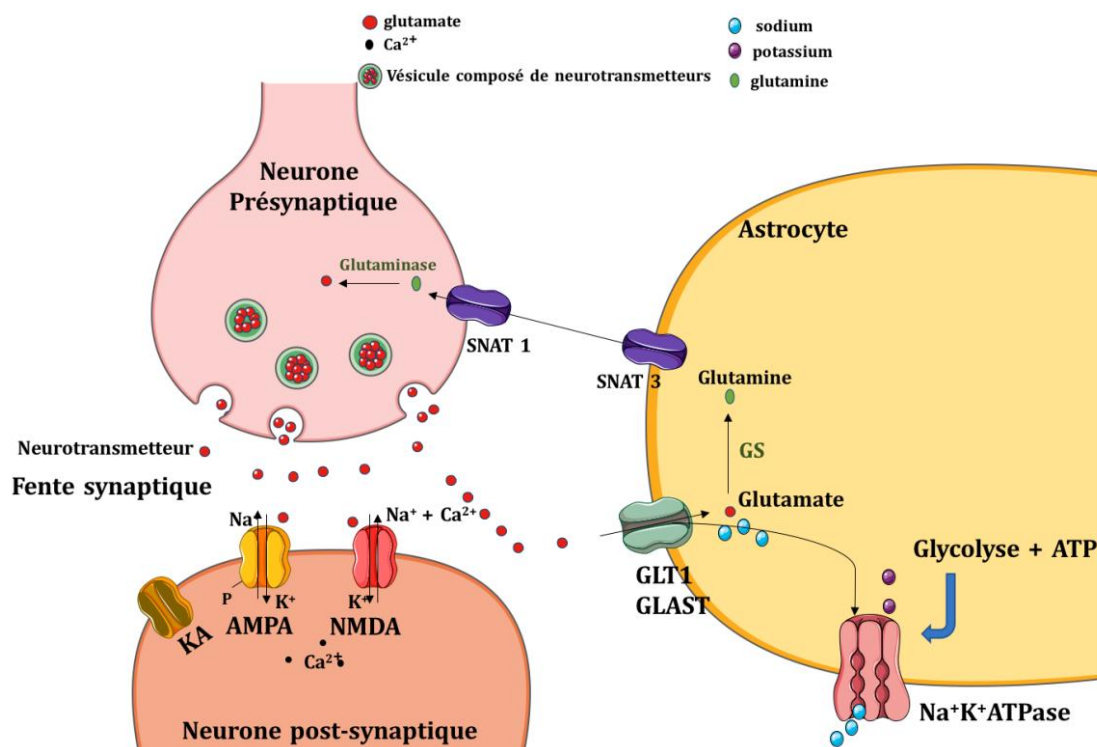


Figure 3: Coopération métabolique entre les astrocytes et les neurones.

Cycle glutamate-glutamine. Ca^{2+} : calcium, ATP : adénosine triphosphate, Na^+ : sodium, K^+ : potassium, AMPA : α -amino-3-hydroxy-5-méthylisoazole-4-propionique, NMDA : acide N-méthyl-D-aspartate, GLT-1 : glutamate transporter 1, GLAST : glutamate aspartate transporter 1, SNAT : transporteurs d'acides aminés solutés neutres, KA : acide kaïnique. GS : glutamine synthétase.

1.3. Navette Lactate Astrocyte-Neurone

Le glucose est considéré comme le substrat énergétique majeur du cerveau. Mais est-ce l'unique substrat permettant d'assurer les besoins énergétiques des neurones?

1.3.1. Origine de la navette lactate astrocyte-neurone

Le lactate a longtemps été considéré comme un déchet produit par les cellules. Il traduit même une souffrance cérébrale lors d'une ischémie cérébrale. Cependant, il y a une vingtaine d'années, une hypothèse a été émise par les chercheurs Luc Pellerin et Pierre Magistretti après des études *in vitro*. Ils ont montré que lorsque du glutamate est ajouté dans le milieu de culture des astrocytes, ces dernières augmentent leur consommation de glucose et leur production de lactate, libéré dans le milieu. Sur la base de ces résultats, l'ANLS (*Astrocyte-Neuron Lactate Shuttle*) a été proposée [6]. Effectivement, les astrocytes, localisés entre les neurones et les capillaires sanguins, sont idéalement situés pour capter le glucose présent dans la circulation sanguine. Ainsi, la recapture du glutamate (libéré pendant l'activité synaptique) va stimuler la glycolyse astrocytaire et, *in fine*, la production de lactate. Ce lactate astrocytaire est alors libéré puis capté par les neurones *via* des transporteurs spécifiques (les transporteurs aux monocarboxylates : MCTs) où il sera utilisé comme substrat énergétique, après conversion en pyruvate.

L'ANLS fait intervenir de nombreux partenaires clés présentés dans la figure 4 qui ont été identifiés au fil des années. Parmi eux on trouve :

- **les MCTs** qui sont des protéines transmembranaires (famille de 14 membres) codées par des gènes du groupe *SLC16A* [7]. Ils permettent le transport du lactate, du pyruvate et des corps cétoniques. Dans le cerveau, ils s'expriment de façon sélective en fonction des types cellulaires : MCT1 est localisé sur les astrocytes et les cellules endothéliales, MCT4 sur les astrocytes et MCT2 est spécifique des neurones (figure 4, A). Les affinités (Km) de ces isoformes ne sont pas identiques. En effet, MCT2 possède une affinité entre 10 et 40 fois plus importante que MCT1 et 4 pour le lactate (0,5-0,75 mM, 3,5-10 mM et 22-28 mM, respectivement) [8]. Ces paramètres cinétiques sont donc en faveur d'une entrée du lactate dans le neurone, sachant que la concentration extracellulaire cérébrale du lactate est de 1 à 2 mM.
- Un second acteur clé est la **LDH**, enzyme qui permet la conversion du lactate en pyruvate et inversement en fonction des concentrations (figure 4, B). En effet, cette enzyme travaille à l'équilibre. Il existe deux sous-unités : **LDHa** et **LDHb**. Une LDH fonctionnelle est un tétramère formé à partir de l'un, l'autre ou les deux sous-unités. Il y a donc 5 isoformes possibles: LDH1 (formée de 4 LDHb), LDH2 (3 LDHb + 1 LDHa), LDH3 (2 LDHb + 2 LDHa), LDH4 (1 LDHb + 3 LDHa) et LDH5 (formée de 4 LDHa). Comme les MCTs, leur distribution est spécifique en fonction des types cellulaires. Les isoformes enrichies en LDHa sont plus abondantes dans les tissus glycolytiques (comme le muscle) tandis que les isoformes enrichies en LDHb sont prédominantes dans les tissus oxydatifs (comme le cœur) [9]. Une étude a montré que les neurones ont une concentration plus importante d'isoformes enrichies en

LDHb traduisant un métabolisme préférentiellement oxydatif, à l'inverse des astrocytes qui ont plus d'isoformes enrichies en LDHa traduisant un métabolisme glycolytique [10].

- On retrouve aussi les **transporteurs au glutamate** (GLAST et GLT1) associés à la pompe **Na⁺/K⁺ ATPase**. Ces transporteurs ont déjà été présentés plus haut, ils permettent la recapture du glutamate par l'astrocyte en co-transport avec l'entrée de Na⁺. L'entrée abondante du Na⁺ dans la cellule cause un déséquilibre ionique dans l'astrocyte et entraîne l'activation de la pompe Na⁺/K⁺ ATPase qui va consommer de l'ATP et activer la glycolyse astrocytaire (figure 4, C) [11]

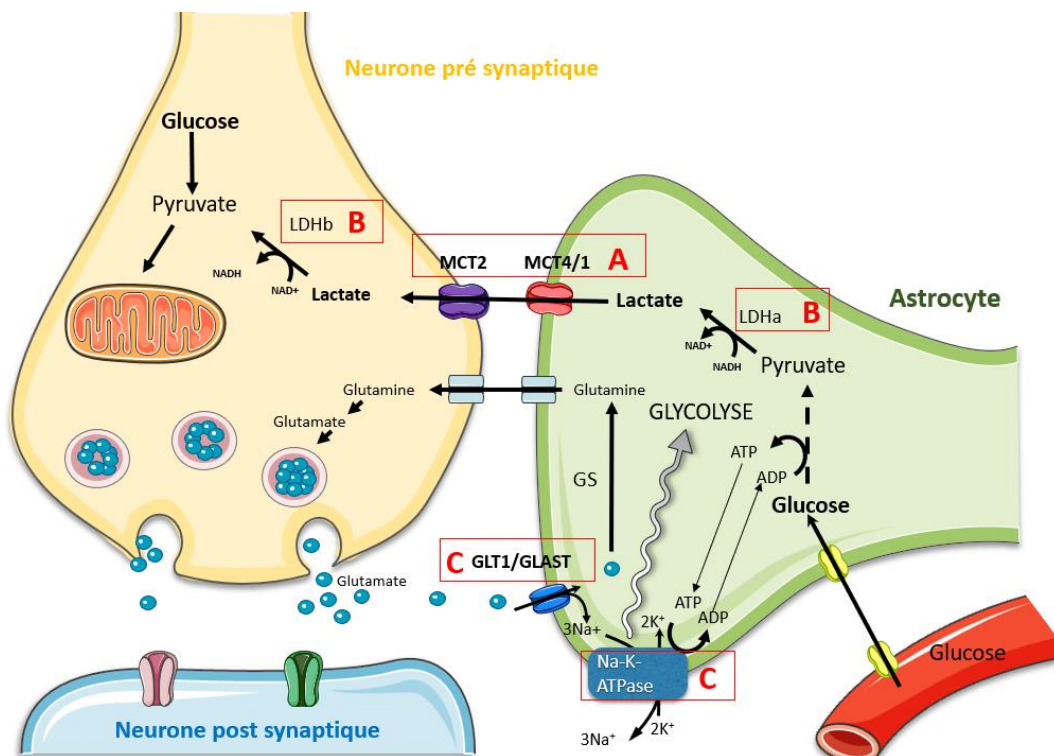


Figure 4: ANLS (Astrocyte Neuron Lactate Shuttle ou Navette lactate astrocyte-neurone) et ses partenaires clés.
 A : les MCTs, B : LDH (deux isoformes : a (dans l'astrocyte) et b (dans le neurone)) et C : GLAST et GLT1 et la pompe Na⁺/K⁺ ATPase.

Cette navette, l'ANLS, couple donc l'activité neuronale à la capture de glucose et la production de lactate par l'astrocyte et propose que ce lactate astrocytaire soit par la suite utilisé comme substrat énergétique par le neurone. De nombreux travaux ont été menés pour démontrer l'existence de cette navette. Dès 2003, Bouzier-Sore *et al.* ont réalisé une compétition de substrat (glucose et lactate) sur des cultures primaires de neurones. En marquant de façon alternatives ces substrats au carbone-13, ils ont pu montrer que les neurones utilisaient préférentiellement le lactate pour leur métabolisme oxydatif [12].

Bien que de nombreux travaux aient apporté un ensemble de données en faveur de l'ANLS, cette navette reste encore débattue à l'heure actuelle [13].

1.3.2. Importance de l'ANLS dans l'apprentissage et la mémoire

L'ANLS joue un rôle dans la formation de la mémoire à long terme. Suzuki *et al.* ont démontré, chez les rats adultes *via* une tâche d'évitement inhibiteur (EI), que le lactate transporté des astrocytes vers les neurones dans l'hippocampe, joue un rôle essentiel dans la consolidation de la mémoire à long terme. De plus, ils ont montré l'importance du glycogène astrocytaire pour l'apprentissage, la formation et le stockage des souvenirs [14]. Une étude plus récente a confirmé le rôle du lactate astrocytaire dans la formation de la mémoire en montrant une augmentation de l'expression hippocampique des molécules impliquées dans son transport et son utilisation aux niveaux astrocytaire et neuronal, telles que les MCTs, la LDHa et la LDHb [15]. De plus, Monika Tadi *et al.* ont montré que des souris déficientes en MCT1 présentaient une altération de la mémoire dans la tâche EI. Très récemment, une étude a montré le rôle des MCTs dans l'acquisition et la consolidation des informations. À l'aide de souris transgéniques ayant une forte diminution de l'expression de chaque transporteur dans l'hippocampe, Netzhualcoyotzi et Pellerin ont montré, *in vivo*, que MCT2 et MCT4 étaient nécessaires dans l'acquisition et la rétention d'information spatiale sur une période de 24 heures. De manière intéressante, MCT2 s'est révélé essentiel pour la formation de la mémoire à (très) long terme (> 7 jours) à travers un rôle inédit dans la neurogenèse [12]. Ces résultats suggèrent des contributions importantes, mais distinctes de MCT2 et de MCT4 dans les processus d'apprentissage et de mémoire [16].

1.3.3. Importance de l'ANLS dans certaines pathologies cérébrales

La maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer (MA), pour laquelle il n'existe toujours pas de thérapie, reste la principale cause de démence chez les personnes âgées. Les efforts pour développer des thérapies ciblant la MA se sont largement concentrés sur le traitement des pathologies neuronales tardives. Compte tenu du rôle suggéré du glycogène dans la formation de la mémoire décrit plus haut et du dysfonctionnement de la mémoire bien décrit dans la MA [17, 18], toutes altérations du métabolisme du glycogène astrocytaire pourrait contribuer aux difficultés associées de la MA pour évoquer ou consolider des souvenirs. De plus, la MA est caractérisée par un état de stress oxydatif et d'inflammation pouvant compromettre l'intégrité de l'interaction entre les astrocytes et les neurones. Un dysfonctionnement de l'ANLS serait un des éléments déclencheurs de la MA et le dysfonctionnement énergétique astrocytaire favoriserait la production de plaques amyloïdes [19]. Une autre étude a montré, par imagerie utilisant la tomographie par émission de positrons (TEP) et le ¹⁸fluorodésoxyglucose (¹⁸FDG) sur des personnes montrant des prédispositions à la MA (expression de la présénilline 1) mais

asymptomatiques, une diminution de la consommation de glucose dans les zones du cerveau qui éventuellement verront apparaître des signes de dégénérescence [20]. Comme il a été proposé que le signal en ^{18}F FDG TEP dépendrait en grande partie de la recapture du glutamate par les astrocytes [21], ceci implique à nouveau l'ANLS dans cette pathologie.

Accidents vasculaires cérébraux

Dans le cadre des accidents vasculaires cérébraux (AVC), il a été montré chez le rongeur que le lactate était neuroprotecteur après une ischémie cérébrale. Berthet *et al.* ont montré, *in vivo*, qu'une administration de lactate (2 μl /100 mmol/L, injection intra-cérébroventriculaire) après une occlusion de l'artère cérébrale moyenne (MCAO : modèle d'AVC connu) chez la souris entraînait une diminution significative des volumes lésionnels et améliorait les données neurologiques [22].

L'administration de lactate a déjà été utilisée en clinique, dans le cadre du traumatisme crânien [23]. En effet, Bouzat *et al.* ont examiné l'effet neuroprotecteur d'une supplémentation de lactate sur le métabolisme énergétique cérébral chez l'homme après un traumatisme crânien sévère. Une solution intraveineuse de lactate (5 mmol/L) a été perfusée environ 33 heures après le traumatisme. Ils ont montré que le lactate exogène était préférentiellement utilisé comme substrat énergétique par le cerveau, car ils ont observé une économie du glucose cérébral. L'augmentation du glucose associée à une diminution du glutamate cérébral et une diminution de la pression intracrânienne, suggèrent un effet neuroprotecteur du lactate sur le métabolisme énergétique cérébral après un traumatisme crânien sévère [23].

Plus récemment, notre équipe a montré un effet neuroprotecteur du lactate dans un modèle d'hypoxie-ischémie (HI) néonatale chez le raton âgé de sept jours (P7) [11]. En effet, Roumes *et al.* ont montré, *in vivo*, que 3 injections consécutives de lactate (40 μmol en intra-péritonéale (i.p.), 3h, 24h et 48h post-ligature) permettaient de réduire les volumes lésionnels au niveau du cerveau et de récupérer complètement les fonctions motrices et cognitives. Les données d'IRM ont montré une réduction de 30 % du volume des lésions cérébrales dans les 30 min suivant son injection et une diminution de la sévérité de l'œdème. De plus, la co-injection d'oxamate (un inhibiteur de la LDH) a prévenu la neuroprotection du lactate [11]. Ces données dans le cadre de l'AVC démontrent que l'administration de lactate est une thérapie prometteuse.

L'ensemble de ces observations indique que le couplage métabolique astrocyte-neurone s'avère être une cible potentielle pour la recherche de thérapies, notamment dans le cadre de l'HI néonatale.

2. Hypoxie-ischémie des nouveau-nés

Objectifs de la partie 2 :

Ce chapitre décrit en détail les mécanismes impliqués dans l'HI néonatale et présente les différentes thérapies proposées aux niveaux préclinique et clinique.

2.1. Généralités sur l'hypoxie-ischémie néonatale

L'HI néonatale est une des causes principales de décès ou de handicaps lourds affectant le nourrisson né à terme (36 semaines de grossesse ou plus). L'HI touche entre 0,7 à 1,2 millions de nouveau-nés par an et est responsable de 24 % de la mortalité infantile dans le monde [24] (figure 5). L'HI est caractérisée par un arrêt temporaire du flux sanguin dans le cerveau du fœtus, engendrant une réduction d'apport en oxygène et en substrats énergétiques. Les conséquences sont le décès du nouveau-né dans environ 1/3 des cas, dans les deux premières semaines. Un tiers des nourrissons qui survivent présentent des lésions cérébrales graves ayant des répercussions irréversibles sur les fonctions motrices et cognitives (retard mental, épilepsie, paralysie cérébrale) [25].



Figure 5 : Impact de l'HI néonatale.

Ces chiffres résument le nombre de nouveau-nés affectés par l'HI néonatale chaque année dans le monde par rapport au nombre de naissances par an.

2.1.1. Les différentes causes de l'HI néonatale

Les causes liées à l'HI sont multiples et peuvent être :

- des facteurs maternels tels que l'hypertension.
- des facteurs fœtaux tels que les AVC fœtaux. L'AVC du fœtus est l'une des causes les plus fréquentes chez les nourrissons à terme ou prématurés, se produisant entre la 14^{ème} semaine et l'accouchement.
- des facteurs utérins tels qu'une rupture utérine, un décollement prématuré du placenta ou lorsque le bébé naît avec le cordon ombilical autour du cou.
- des facteurs extérieurs comme l'intervention des praticiens lors des accouchements difficiles (utilisation de forceps ou manipulation intra-utérine). De plus lorsqu'un travail est trop long, il comporte des risques comme une privation de l'apport en oxygène vers le cerveau.

Il est important de connaître les mécanismes de l'HI pour comprendre le fonctionnement des thérapies émergentes notamment pour l'approche de nouvelles cibles thérapeutiques

2.2. Mécanistique de l'hypoxie-ischémie néonatale

2.2.1. Les différentes étapes de l'hypoxie-ischémie néonatale

Les études expérimentales et cliniques ont mis en évidence que l'HI n'était pas un événement unique mais un processus dynamique. L'HI est définie par un enchaînement d'événements moléculaires et physiopathologiques qui engendrent des séquelles plus ou moins importantes. À l'échelle cellulaire, l'HI est caractérisée par différentes étapes [29, 30] résumées dans la figure 6 et détaillées dans les parties suivantes.

2.2.1.1. Phase I de défaillance énergétique primaire

Entre 0 et 6h post-HI, la phase de défaillance énergétique primaire correspond à la baisse ou l'arrêt temporaire du débit sanguin cérébral (DSC). Ce dysfonctionnement de la perfusion cérébrale provoque une insuffisance d'apport en oxygène et glucose au niveau cellulaire, entraînant une diminution significative de production d'ATP. La cellule est alors au ralenti et pour garder une production d'ATP minimale, elle active le métabolisme anaérobie, qui augmente la production de lactate. Les faibles niveaux d'ATP entraînent un dysfonctionnement des mécanismes énergivores et notamment une défaillance de la pompe Na^+/K^+ ATPase. Le ralentissement de la pompe Na^+/K^+ ATPase entraîne (i) un influx de Ca^{2+} en réponse à la perte de l'homéostasie ionique et (ii) un influx excessif d'ions Na^+ conduisant à la dépolarisation massive des neurones. La dépolarisation neuronale induit la libération de glutamate, dans la fente synaptique. Ce glutamate à forte concentration devient toxique pour le devenir des cellules : c'est le phénomène

d'**excitotoxicité**. Ces afflux importants de Ca^{2+} intracellulaire induisent une entrée massive d'eau dans la cellule responsable de la formation d'un œdème cérébral cytotoxique et d'une mort cellulaire précoce des neurones. **La durée et la sévérité de cette phase sont déterminantes pour le devenir de la cellule.**

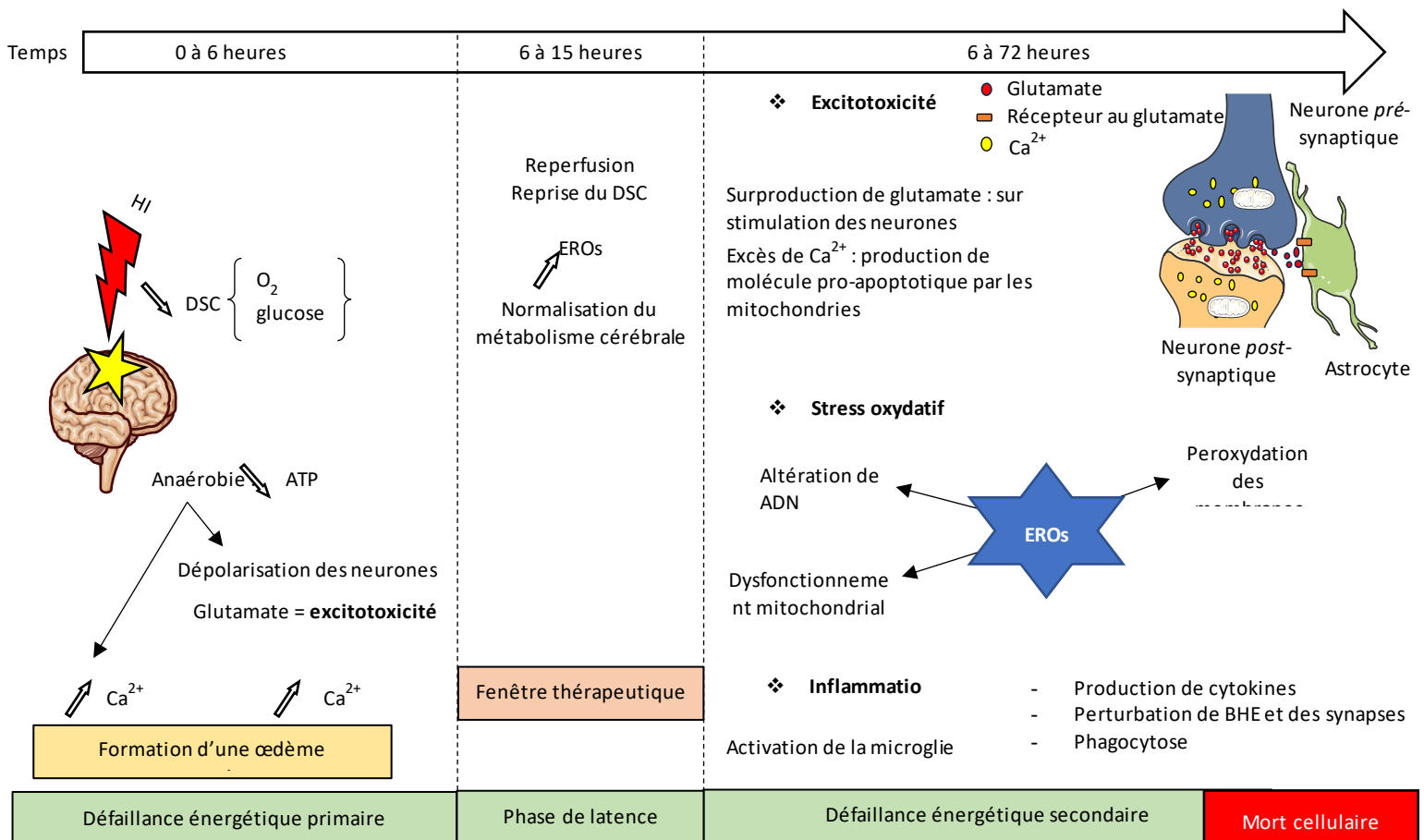
2.2.1.2. Phase de reperfusion : phase de latence

L'étape de reperfusion correspond à la reprise du flux sanguin qui est suivit par la phase de latence. Elle s'associe avec une formation importante d'espèces réactives de l'oxygène (EROs ou ROS). La phase de latence est une phase de récupération (6h - 15h) avec une normalisation du pH et une activation des processus apoptotiques. Elle est considérée comme la fenêtre optimale pour les interventions thérapeutiques [31]. Plus l'HI est sévère, plus la phase de latence est réduite. Elle est suivie par une phase de défaillance énergétique secondaire.

2.2.1.3. Phase II de défaillance énergétique secondaire

La phase de défaillance énergétique secondaire se déclenche entre 6 et 72h après l'accident d'HI. La mécanistique exacte de cette phase est encore obscure mais semble être liée au stress oxydatif, à l'excitotoxicité et à l'inflammation (figure 6).

Figure 6: Les différentes étapes de l'HI.



Toutes ces réactions liées à l'ischémie (**excitotoxicité, le stress oxydatif et inflammation**) activent de nombreuses cascades qui finissent par entraîner la **mort cellulaire** *via* l'apoptose ou la nécrose.

La mort cellulaire

La mort cellulaire est caractérisée par deux phénomènes distincts, l'apoptose (mort programmée) et la nécrose (mort prématurée) et dépend de la sévérité et de la durée de l'HI. L'apoptose se déclenche dans les zones où la lésion est moins grave et souvent quelques heures après l'HI.

Deux mécanismes moléculaires existent dans l'apoptose. Un grand nombre de molécules sont impliquées dans l'initiation et l'exécution de l'apoptose médiée par les mitochondries notamment :

- Une voie dite intrinsèque à la mitochondrie ayant pour éléments déclencheurs des agressions intracellulaires (augmentation des EROs, altération de l'ADN...). Cette voie implique les membres de la famille des *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2), famille de protéines régulatrices connues pour leurs activités pro-apoptotiques (Bcl-2 associated (**Bax**)) ou anti-apoptotiques (**Bcl-2**).
- Une voie dite extrinsèque impliquant des récepteurs appartenant à la superfamille de protéines des récepteurs au facteur de nécrose tumorale (**TNF- α**).

Ces deux voies conduisent à l'activation des caspases qui sont responsables du clivage des molécules conduisant à une mort cellulaire : point de non-retour pour la cellule. L'activation d'une molécule pro-apoptotique (**la caspase 3**) prolongée et persistante a été rapportée quelques jours après l'HI chez des rats nouveau-nés. Ces données suggèrent un rôle prolongé de l'apoptose après un accident HI chez les rats nouveau-nés [32].

Lorsque l'HI est sévère, la nécrose prédomine. La nécrose se caractérise tout d'abord par un gonflement généralisé des organites intracellulaires, une rupture de la membrane puis une désintégration de toute la cellule. Malgré les différences marquées entre les formes de mort cellulaire, il semble qu'elles impliquent un mécanisme commun, soit l'induction transitoire de la perméabilisation de la membrane mitochondriale mais à des degrés différents. Elle entraîne une régulation à la hausse des facteurs de transcription (composés pro-inflammatoires) qui provoque la rupture des membranes et déclenche des cascades d'inflammation (NF- κ B, TNF- α).

Stress oxydatif

Le stress oxydatif intervient lorsque la cellule ne parvient pas à équilibrer la production d'EROs et leur élimination par des systèmes de défenses antioxydantes.

Les EROs sont des espèces réactives produites en permanence dans notre organisme. Elles ont un rôle dans la régulation de l'expression des gènes, de l'apoptose et le maintien de l'homéostasie cellulaire. Les EROS sont des molécules avec un ou plusieurs électrons libres, non appariés sur une orbitale, ce qui leur confère une très grande instabilité et une réactivité chimique extrême. Pour rétablir leur état d'équilibre ionique, les EROS vont capturer des électrons à d'autres molécules (au niveau de l'ADN, des protéines et des lipides). Ce processus délétère va provoquer, à long terme, la destruction des cellules. La source majeure endogène de production d'EROs est la mitochondrie avec la production de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), de radicaux hydroxyles ($HO\bullet$) et d'anions superoxydes ($O_2\bullet^-$). L'équilibre entre antioxydant et EROS se fait naturellement en permanence. Lors d'un accident d'HI, la production d'EROs par les mitochondries dépasse les capacités antioxydantes de la cellule, ce qui entraîne la destruction des molécules d'ADN, des membranes cellulaires et finalement enclenche l'apoptose. Ainsi, la fonction mitochondriale est un déterminant crucial pour la survie lors d'une lésion hypoxique-ischémique [33].

Les défenses contre ce stress oxydant sont, comme leur nom l'indique, les antioxydants. Ils ont pour rôle de retarder ou inhiber ces processus d'oxydation. On retrouve deux groupes d'antioxydants : les antioxydants enzymatiques : principale source endogène comprenant la superoxyde dismutase (SOD) et le glutathion peroxydase (GPX) et les antioxydants non enzymatique comme le glutathion réduit (GSH), les vitamines C et E, les caroténoïdes ou les polyphénols...

Rôles des neurotransmetteurs dans l'excitotoxicité

Le glutamate est le principal neurotransmetteur de type acides aminés excitateurs (AAE) du cerveau et les voies neuronales qui l'utilisent sont omniprésentes assurant la médiation de la vision, de la mémoire, de l'apprentissage et des fonctions somato-sensorielles [34]. Lorsque l'équilibre est rompu et que la concentration en glutamate atteint des concentrations importantes dans la fente synaptique, il est responsable de **l'excitotoxicité**. Le terme excitotoxicité désigne la toxicité, l'altération et la destruction des neurones par l'hyper activation du glutamate et permet d'expliquer la propagation des lésions cérébrales après une ischémie.

L'excitotoxicité s'explique par l'hyperstimulation des récepteurs ionotropes de manière disproportionnée par le glutamate bloqué dans la fente synaptique. Cela provoque une entrée massive de Ca^{2+} , qui va à son tour activer une batterie d'enzymes délétères telles que des phospholipases, des endonucléases et des protéases. Ces enzymes seront responsables de la dégradation des membranes, de l'ADN et des protéines.

Inflammation

La réaction inflammatoire est due au recrutement des macrophages qui vont envahir rapidement le site de lésion et engendrer une réaction inflammatoire locale. Cette réaction inflammatoire se traduit par l'activation de la microglie et une production rapide de molécules pro-inflammatoires (cytokines) : telles que les interleukines (IL-1 β , IL-6) ou la famille du TNF- α . Chez les nouveau-nés, l'HI déclenche une réponse immunitaire innée immédiate, même quelques minutes après l'HI [35].

La microglie est une composante gliale majeure du SNC et de l'immuno-surveillance du cerveau. Lors d'une ischémie cérébrale, l'activation de la microglie se met en route dans les tissus lésés et produit des quantités excessives de cytokines pro-inflammatoires et une libération des métalloprotéases matricielles (MMP). Les MMP sont des protéases qui ont un rôle dans la modification de la matrice extracellulaire. Dans l'ensemble, les MMP sont peu présentes dans les tissus sains, mais leurs concentrations augmentent lors d'un stress.

Tous ces processus sont responsables de la mort cellulaire, de la dégénérescence axonale et de la rupture de la barrière hémato-encéphalique (BHE).

2.3. Méthodes de diagnostic/pronostic

Le diagnostic d'une HI s'appuie en premier lieu sur des arguments anamnestiques et biologiques. En effet, il convient d'éliminer certaines pathologies mimant une HI telles que certaines maladies neuromusculaires, métaboliques ou les encéphalites d'origine génétique. Les méthodes de classification ou les dosages sont déterminant mais ne présentent pas de valeur pronostic suffisamment solide. L'évaluation du pronostic neurologique repose sur des examens spécifiques comme l'échographie cérébrale, la tomographie, l'électroencéphalographie ou l'imagerie cérébrale.

2.3.1. Échographie cérébrale (EC)

L'EC est une technique d'imagerie accessible et non invasive [36]. L'utilisation des ultrasons permet de visualiser la morphologie et la vascularisation du cerveau, il permet aussi de détecter des anomalies cérébrales fréquentes chez les nouveau-nés et d'étudier l'évolution des lésions. Cependant, sa sensibilité et sa spécificité restent faibles surtout dans l'analyse de l'étendue des lésions cérébrales. L'ultrason est rapidement amorti dans l'organisme examiné et ne permet pas d'exploration profonde. Chez l'enfant, il n'est pas toujours possible de visualiser la fosse postérieure (tronc cérébrale, cervelet). Dans les pays développés l'EC n'est pas utilisée de manière systématique mais constitue une alternative pour les pays en voie de développement où les autres techniques sont trop coûteuses ou indisponibles [37]. Cependant il n'est pas toujours très fiable chez les

enfants prématurés puisque 30 à 50 % des enfants prématurés montrant une EC normale présentent des anomalies de la substance blanche à l'IRM [36].

2.3.2. Tomographie assistée par ordinateur (computed tomography : CT)

La CT est une technique de neuro-imagerie médicale importante dans le diagnostic des lésions cérébrales chez les enfants. Après avoir été beaucoup utilisée en neurologie chez les enfants à la fin des années 1990 et au début des années 2000, l'IRM a désormais suppléé la CT. En effet, la CT, qui produit des images en 3D, utilise l'absorption des rayons X par les tissus et est donc une technique irradiante. Cet examen, tout comme l'IRM, nécessite l'utilisation d'un sédatif pour maintenir le nouveau-né immobile.

2.3.3. Électroencéphalographie (EEG)

L'EEG est une méthode de détection qui mesure l'activité électrique cérébrale à l'aide d'une centaine d'électrodes positionnées autour du cerveau tel un casque. Cette technique permet l'exploration fonctionnelle du cerveau et cible plus particulièrement le cortex cérébral (zone la plus proche des électrodes). Cet enregistrement est un examen indolore et très rapide à mettre en place. L'EEG ne permet pas de donner de valeur prédictive de récupération après un accident d'HI néonatale car il n'est pas assez précis pour évaluer l'étendue des lésions cérébrales. Cependant il peut être combiné à une autre des techniques et peut donner des informations en temps réel sur l'activité cérébrale [38].

2.3.4. Imagerie par Résonance Magnétique (IRM)

L'IRM est une méthode non invasive qui permet d'imager et d'étudier avec une bonne résolution de nombreux organes profonds, notamment le cerveau. Concernant le pronostic à long terme pour l'HI néonatale, il s'est amélioré ces dernières années grâce aux nouvelles techniques d'imagerie paramétrique comme la diffusion (Diffusion-Weighted Imaging : DWI) qui permet la mise en évidence de lésions cérébrales précocement. La DWI détecte les œdèmes qui se forment dans les minutes/heures après un accident d'HI en cartographiant *in vivo* la diffusion des molécules d'eau extracellulaires [39]. L'IRM, et plus particulièrement la DWI, est la méthode de choix dans l'établissement d'un diagnostic pour des nourrissons ayant souffert d'une HI. De par son aspect non invasif, l'IRM est une technique particulièrement adaptée pour faire un suivi longitudinal, à la fois en clinique et en préclinique.

2.4. Traitements proposés

2.4.1. Traitements utilisés actuellement en clinique : l'hypothermie thérapeutique

2.4.1.1. Généralités sur l'hypothermie thérapeutique (HT)

Il existe actuellement un seul traitement proposé en clinique pour lutter contre les lésions liées à l'HI néonatale. Il s'agit de l'hypothermie thérapeutique (HT). L'HT consiste à refroidir (diminution de 3 à 4°C) le nouveau-né pour atteindre une température corporelle entre 33°C et 34°C pendant 72h. L'hypothermie modérée contrôlée doit être mise en place le plus rapidement possible pour limiter les lésions, idéalement dans les 90 min après l'HI. Elle reste cependant neuroprotectrice si elle est mise en place dans un délai inférieur à 6h. L'hypothermie modérée va placer le nouveau-né en « hibernation », ralentissant ainsi toutes les réactions métaboliques ce qui va, *in fine*, limiter l'impact de l'arrêt des pompes Na⁺/K⁺ ATPase, réduire la formation de l'œdème, la production d'EROs et donc réduire la mort neuronale [40, 41]. Ce traitement améliore le devenir neurologique des nouveau-nés à terme dans 50 % des cas. Il existe deux principaux types de refroidissement [42] (figure 7):

- Le refroidissement sélectif de la tête : qui est associé à un gradient important de température intracérébral (différence de température jusqu'à $7,5 \pm 3,5^{\circ}\text{C}$ entre le cortex et les structures cérébrales profondes).
- Le refroidissement corporel global de l'enfant : avec une répartition homogène de la température intracérébrale.

Actuellement il n'y a pas de distinction préférentielle entre ces deux modes de refroidissement.



Figure 7 : Les deux modes de refroidissement utilisés en clinique
Refroidissement après l'HI du nouveau-né : corps entier (gauche) ou tête uniquement (droite).

2.4.1.2. Les limites de l'hypothermie thérapeutique

Bien que l'HT soit utilisée en routine dans le cadre de l'HI, il existe des limites importantes, non négligeables, à prendre en compte. Au cours des essais cliniques sur l'HT dans le cadre d'une HI, de nombreux effets secondaires indésirables et spécifiques ont été trouvés et méritent une grande prudence dans l'utilisation de cette thérapie. Tout d'abord certains nouveau-nés ne sont pas disposés à recevoir cette thérapie :

- Nouveau-nés prématurés : l'HT s'associe à un taux de mortalité élevé et aucune donnée probante ne démontre que l'hypothermie soit bénéfique au nouveau-né de moins de 35 semaines de grossesse.
- Nouveau-nés moribonds.
- Nouveau-nés avec des anomalies congénitales ou génétiques majeures.

De plus, Thoresen *et al.* ont montré qu'une HT modérée entraînait des modifications du rythme cardiaque et de la pression artérielle. Ces modifications ne sont pas directement dangereuses mais la combinaison avec un refroidissement trop rapide, ou un sédatif, peut provoquer de l'hypertension [43]. L'utilisation de l'HT est à prendre avec précautions et doit être mise en place avec rigueur, d'autant plus que les essais cliniques actuels suggèrent que 44 à 53 % des nourrissons qui reçoivent une HT décèdent ou souffrent d'un handicap neurologique modéré à sévère [44]. La première limite prévisible tient à la gravité initiale de l'HI. Certains enfants ont souffert d'une HI sévère et ont d'emblée un état neurologique gravissime. Les lésions constituées immédiatement dans ce cas ne seront donc pas réversibles. Les connaissances actuelles concernant la physiopathologie des lésions doivent également tempérer l'enthousiasme actuel car tous les enfants ne pourront pas bénéficier de ce type de neuroprotection : la contrainte de temps entre l'accident et l'instauration de l'hypothermie est le principal facteur limitant. Elle est également difficilement mise en place dans les pays en voie de développement. Il est donc urgent de mettre au point de nouvelles thérapies neuroprotectrices complémentaires pour réduire le taux de gravité des troubles neurologiques provoqués par l'HI.

2.4.2. Stratégies thérapeutiques utilisées en préclinique

2.4.2.1. Érythropoïétine (EPO)

L'érythropoïétine (EPO) est une glycoprotéine qui a montré des effets neuroprotecteurs remarquables chez les animaux. Des études récentes ont démontré l'intérêt de l'EPO recombinante humaine (rHuEPO).

L'effet neuroprotecteur de la rHuEPO a été testé sur un modèle d'HI de rat nouveau-né. Brissaud *et al.* ont montré qu'une administration de rHuEPO (3000 U/kg, i.p.) chez des rats nouveau-nés ayant subi une HI à 7 jours (P7, modèle de Rice et Vannucci)

avait des effets neuroprotecteurs précoces. En effet, le rHuEPO a permis de diminuer la sévérité de l'œdème grâce à une augmentation des aquaporines 4 permettant d'éliminer l'excès d'eau dans les cellules, entraînant une diminution de l'œdème cytotoxique et des tailles de lésions [45]. Une autre équipe a montré qu'une injection de rHuEPO (1000 U/kg, i.p.) chez des rats P7 juste après avoir subi l'épisode d'HI (modèle de Rice et Vannucci) a permis de diminuer la taille des lésions [46].

En clinique, la rHuEPO est utilisée pour remplacer les perfusions sanguines des patients en réanimation atteints d'une anémie [47]. Au niveau des essais cliniques chez l'enfant, en raison des effets bénéfiques de l'EPO sur la production de globules rouges, elle est utilisée depuis 1990 pour traiter l'anémie des prématurés [48]. Basée sur les résultats d'études précliniques, la première étude humaine de Zhu *et al.* a utilisé l'EPO dans le traitement de l'HI néonatale. Dans cet essai, une amélioration des résultats à long terme chez les nourrissons traités à la rHuEPO était mise en évidence après une HI modérée, uniquement, et pas lors d'une HI sévère. Aucun effet secondaire du traitement n'a par ailleurs été rapporté [49]. De plus, la combinaison de l'HT et de l'EPO après une HI néonatale a donné de meilleurs résultats moteurs à 12 mois d'âge que l'HT seule [50].

L'EPO seule ou l'EPO combinée à l'HT ont montré des résultats prometteurs après une HI néonatale

2.4.2.2. L'apport en polyphénols

L'apport en polyphénols dans le cadre de l'HI néonatale a montré des effets neuroprotecteurs. Plusieurs études ont montré qu'une injection en i.p. de polyphénols permettait de réduire les dommages causés par l'HI, particulièrement le resvératrol (RSV). Quelques-unes sont récapitulées dans le tableau suivant. Cependant ces études seront largement détaillées dans la partie 4, récapitulant tous les travaux ciblant les polyphénols dans un contexte l'HI néonatale.

Polyphénols	Dose	Model HI	Administration	Cibles	Références
Amenoflavone	10 et 30mg/kg	P7 ratons Rice et Vannucci Hypoxie 2,5h	i.p. 5min avant l'HI et 30min, 3,5h avant l'HI.	Amenoflavone: diminution de l'apoptose et de l'excitotoxicité. Diminue aussi l'activation de la microglie.	Dong Hoon Shin <i>et al</i> , Neurochemistry, 2007
Jus de Grenade Resveratrol	0,9g de PPE / mg 20mg/kg 200ug/kg	P7 ratons et souris Rice et Vannucci Hypoxie 45min souris et 2,5h rats	Eau de boisson (avant et après HI) i.p. 10 min avant l'HI et 3h après HI	RSV et PPE : diminution de l'apoptose et des lésions cérébrales	Tim West <i>et al</i> , Dev Neurosci, 2007
Resveratrol	90mg/kg	P7 ratons Rice et Vannucci Hypoxie 1h	i.p. juste après HI.	RSV : préservation de cortex et préservation de la myélinisation. Préservation de la mémoire et de l'apprentissage.	Filippos Karalis <i>et al</i> , Brain research, 2011

Tableau 1 : Quelques études montrant les effets neuroprotecteurs des polyphénols sur l'HI néonatale chez le rat.

3. Le resvératrol (RSV)

3.1. Avant-propos

De tous les polyphénols, le RSV est le plus étudié dans la recherche de stratégies thérapeutiques pour un large éventail de pathologies.

Objectifs de la partie 3 :

Les objectifs de cette partie sont de présenter les principales actions de ce polyphénol utilisé depuis des siècles en médecine traditionnelle chinoise, d'en préciser ses potentialités thérapeutiques, et de présenter les voies connues de son action neuroprotectrice.

3.2. Historique

3.2.1. Les dates clés du resvératrol

La découverte du RSV, à partir de vérâtre blanc ou *veratrum album*, date de 1939 [51]. Puis en 1963, Nonomura *et al.* ont décrit avec précision cette molécule, extraite à partir de la renoué du japon ou *polygonum cuspidatum* [52]. Ce n'est que 13 années plus tard qu'il est découvert dans la pellicule de raisin puis finalement, en 1992, dans le vin rouge, faisant ainsi naître le concept du « French paradoxe » [53]. Une revue résume les premiers études montrant une relation inverse entre la consommation de vin rouge et l'incidence des maladies coronariennes [54]. Les principaux effets cardioprotecteurs ont été attribués à l'action des polyphénols présents dans le vin rouge. Les premiers effets neuroprotecteurs du RSV ont été rapportés en 2002. Dans cette étude chez le rat, le RSV (i.p., 20 mg/kg, administré avant l'AVC) a induit une diminution du stress oxydatif induit par l'AVC [55]. Les dates clés du RSV sont résumées figure 8.

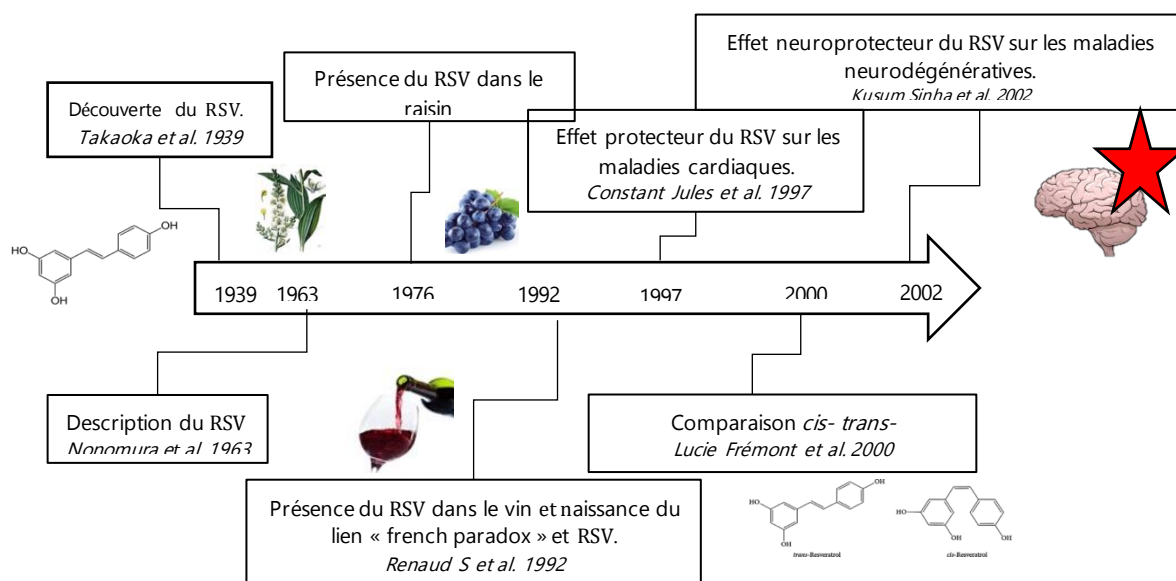


Figure 8 : Les dates clés du RSV

3.2.2. Origine du resvératrol

Le RSV est une phytoalexine c'est-à-dire qu'il est produit par la plante en réponse à un stress. Qu'il soit d'origine physico-chimique (rayon UV) ou biologique (réponse à une infection par un champignon), ce stress déclenche la production du RSV permettant à la plante de se défendre. D'un point de vue biochimique, le RSV est formé à partir de la phénylalanine comme le montre la figure 9 [56]. L'enzyme clé de cette synthèse est la stilbène synthase (STS) qui va coupler le 4-hydroxycoumaryl-CoA et trois molécules de malonyl-CoA pour former du RSV [57].

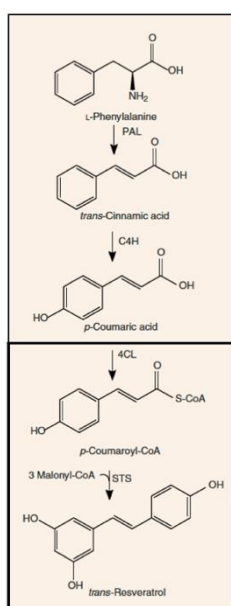


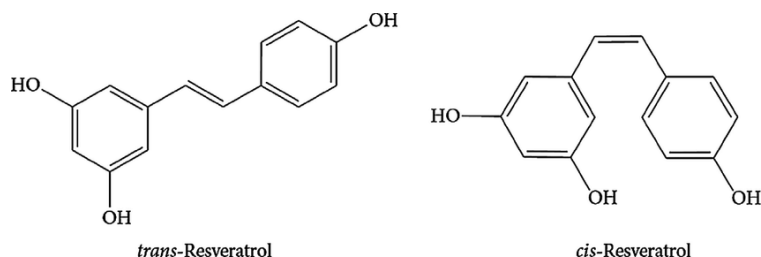
Figure 9 : Voie de synthèse du RSV.

PAL, phenylalanine ammonia-lyase; C4H, cinnamate 4-hydroxylase; 4CL, 4-coumarate-CoA ligase; STS, stilbene synthase.

3.2.3.

Propriétés physiques

Le RSV se présente sous deux formes isomères : *cis*- et *trans*-, avec un passage de la forme *trans*- (E) à la forme *cis*- (Z) lors d'une exposition aux UV (figure 10). Le *trans*-RSV est donc une molécule photosensible et une simple exposition suffit pour le transformer de manière irréversible en son isomère *cis*. De plus, l'isomère *trans* est la forme la plus bioactive [58]. En effet, l'isomère *cis* présente des propriétés antioxydantes 7 fois moins importantes que l'isomère *trans* [59].



La biodisponibilité du RSV est définie comme la fraction digérée, absorbée et métabolisée qui atteint la circulation sanguine et les tissus cibles où il peut exercer ses activités biologiques. Malheureusement, celle du RSV est relativement faible. En effet, si le RSV est bien absorbé au niveau de l'intestin (70 %), il est cependant présent en très faible concentration (nanomolaire à micromolaire) dans la circulation sanguine car il est rapidement métabolisé [60].

Après ingestion, le RSV est absorbé et métabolisé par l'organisme puis éliminé dans les urines. Le RSV traverse la barrière intestinale de différentes manières : soit *via* les jonctions entre les cellules, on parle alors de voie « para-cellulaire », ou à travers les cellules, on parle de voie « trans-cellulaire ». Une fois dans les cellules intestinales, le RSV est rapidement métabolisé sous forme de monoglucuronides (resvératrol-4'-O-D-glucuronide, resvératrol-3'-O-D-glucuronide) ou de monosulfates (resvératrol-3-sulfate). Ce sont ces métabolites qui sont principalement retrouvés dans la circulation sanguine et majoritairement éliminés par l'organisme. Cette forte métabolisation conduit à la présence de seulement 1 % de RSV actif (RSV libre ou ces dérivés métabolisés (monoglucuronides, monosulfate ou dihydroresveratrol) dans le sang par rapport à la dose ingérée.

Fixé à l'albumine, le 1 % de RSV non-éliminé est distribué dans l'organisme *via* le réseau artériel [61].

3.3. Neuroprotection du RSV dans un contexte d'AVC

Le RSV est, depuis des années, très étudié en préclinique et de nombreux effets bénéfiques lui ont été attribués. Un ensemble croissant de données *in vitro* et *in vivo* indique que le RSV agit sur de multiples voies et réduit les dommages cérébraux liés à un AVC. La plupart des actions biologiques protectrices du RSV sont associées à ses propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et anti-apoptotiques. Dans cette partie nous allons détailler les aspects neuroprotecteurs du RSV dans le cadre d'un AVC (figure 11 [62]).

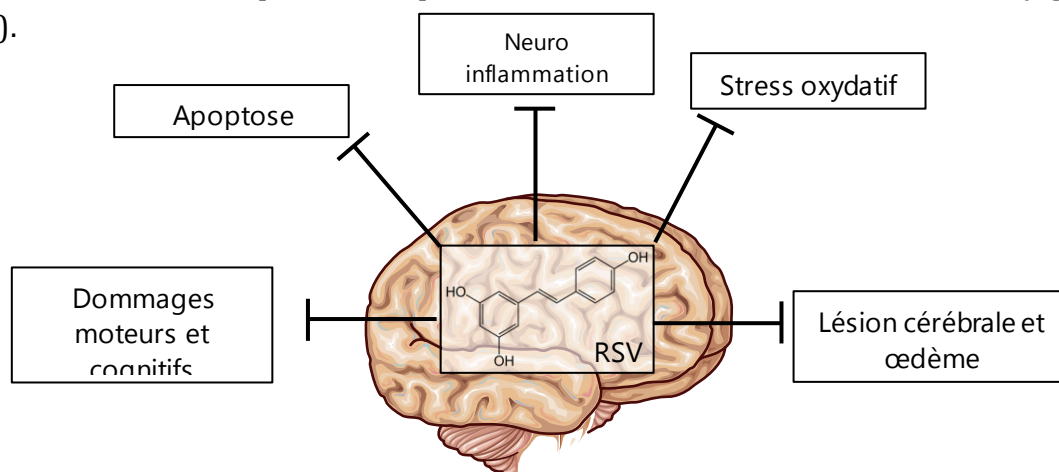


Figure 11: Potentielles cibles associées aux propriétés neuroprotectrices du RSV dans le cadre de l'AVC.

3.3.1. Le RSV, activateur des sirtuines et effets sur le métabolisme énergétique cérébral

Le RSV est connu comme étant un activateur de la voie des sirtuines et plus particulièrement de la sirtuine 1 (SIRT1). Le RSV est capable d'augmenter l'expression de SIRT1 jusqu'à 8 fois [63]. La SIRT1 est présente dans le noyau, c'est une désacétylase NAD⁺-dépendante qui établit un lien direct entre la régulation de la transcription et le niveau d'énergie de la cellule. Elle est impliquée dans l'activation et la répression de nombreux gènes impliqués dans l'apoptose, l'inflammation et le stress oxydatif. `

Les effets neuroprotecteurs du RSV n'ont pas été retrouvés chez des souris SIRT1-réprimé, dans un contexte ischémique. De plus, ces souris ont montré une altération du métabolisme glycolytique. Chez les animaux contrôles, le RSV a augmenté le taux de glycolyse de manière dépendante de SIRT1 [64]. Della Morte *et al.* ont montré qu'une injection de RSV (10-100 mg/kg ; i.p.) après une ischémie globale augmentait le niveau d'ATP mitochondriale hippocampique. Dans cette étude, le RSV a augmenté le niveau d'expression de SIRT1 induisant une diminution de la transcription d'une molécule mitochondriale appelée *uncoupling protein 2* (UCP2) de 35 %. L'UCP2 réprime l'expression de l'ATP synthase ; sa régulation négative SIRT1-dépendante entraîne donc une augmentation de la production d'ATP mitochondrial [65].

3.3.2. Le RSV et ses propriétés antioxydantes

Le rôle d'un antioxydant est de diminuer le stress oxydatif caractérisé par un déséquilibre de la balance oxydants (EROs)/antioxydants en faveur des EROs.

Le RSV est connu pour être un puissant antioxydant en stimulant la production de molécules antioxydantes endogènes *via* un effet sur l'expression de Nrf2 (Nuclear erythroid 2 related factor 2) [66]. Dans le cytoplasme, le RSV se lie à Nrf2, ce qui inhibe son ubiquitination et sa dégradation. Le Nrf2 ainsi accumulé se déplace vers le noyau, se lie à son élément de réponse, ARE et initie la transcription de nombreux gènes antioxydants tels que la SOD ou la CAT (catalase), pour réduire le stress oxydatif. Ce gène est principalement exprimé dans les astrocytes et entraîne la production d'antioxydants qui sont ensuite envoyés aux neurones [67]. Sur un modèle MCAO de souris Nrf2-réprimé, l'injection de RSV (10 mg/kg, i.p.) n'a pas pu contrecarrer les effets délétères alors qu'une augmentation de l'expression de Nrf2 a été mesurée chez les souris contrôles, diminuant ainsi le stress oxydatif [68]. Dans un contexte d'AVC, la neuroprotection obtenue par l'administration du RSV passe donc, au moins en partie, par la stimulation de Nrf2. Toujours dans un contexte de MCAO, chez le rat, Kusum Sinha *et al.* ont montré qu'un prétraitement au RSV (20mg/kg ; i.p.) diminuait les marqueurs du stress oxydatif (glutathion réduit et malondialdéhyde) [55].

Une dernière étude a montré qu'un prétraitement quotidien au RSV (20 mg/kg ; i.p.) 7 jours avant l'HI sur les rats P7 réduisait les marqueurs du stress oxydatif, mais augmentait aussi la présence d'antioxydants endogènes SOD et GPx [69].

Pour conclure, il faut retenir que le stress oxydatif est la première conséquence d'un AVC et est quasiment immédiat. Ce stress oxydatif joue un rôle important dans l'apparition des lésions et le développement des troubles neurodégénératifs. Le RSV permet d'atténuer ce stress oxydatif en piégeant directement les EROs et en augmentant indirectement les défenses antioxydantes des cellules.

3.3.3. Les RSV et ses propriétés anti-inflammatoires

Plusieurs travaux *in vitro* et *in vivo* ont montré les propriétés anti-inflammatoires du RSV. Sur des cultures primaires de neurones, l'ajout post-HI de RSV (100-500 μ M) dans le milieu a diminué de 50 % la sécrétion de l'IL-6 induite par l'hypoxie [70].

Parmi les études *in vivo*, Shin *et al.* ont montré, dans le cadre d'un AVC, qu'un traitement au RSV (5 mg/kg ; i.p. 3h après l'AVC) permettait de réduire l'activation de la microglie et de diminuer l'expression des cytokines (IL-1 β et TNF α) [71]. De plus, Gao *et al.* ont étudié l'effet du RSV sur la MMP-9 (métalloprotéase matricielle 9) induite par l'ischémie cérébrale. La MMP-9 est une protéase qui augmente la perméabilité de la BHE. L'originalité de ces travaux était que les souris ont été gavées avec du RSV (50 mg/kg) pendant 7 jours avant la procédure de MCAO et les niveaux élevés de MMP-9 ont été significativement atténués chez les souris traitées au RSV par rapport aux souris MCAO seul [72].

Pour conclure, dans un contexte d'AVC, les processus inflammatoires induisent des dommages cérébraux qui peuvent être réduits par l'administration de RSV, lui conférant des propriétés anti-inflammatoires intéressantes, qui viennent s'ajouter à ses propriétés antioxydantes.

3.3.4. Le RSV et ses propriétés anti-apoptotiques

L'AVC induit de nombreux processus (inflammation, stress oxydatif, ...) menant à la mort neuronale. Agrawad *et al.* ont montré sur un modèle d'AVC *in vitro* (OGD-R pour *oxygen glucose deprivation/reperfusion*) que l'administration de RSV (5, 10, 20 μ M, 24h avant et/ou après) diminuait significativement la teneur en caspase-3 et en bax : deux facteurs pro-apoptotiques [73]. De même, Li *et al.* ont montré sur un modèle MCAO chez des rats, que l'administration de RSV (30 mg/kg ; i.p., 3h post-occlusion et administré pendant 4 jours) entraînait une diminution de la mort neuronale hippocampique *via* une inhibition de bax et une augmentation de Bcl2 [74]. Dans un contexte d'HI néonatale chez le rat, une administration de RSV (100 mg/kg ; i.p.) a permis aussi de réduire

l'inflammation et les facteurs pro-apoptotiques tout en augmentant les facteurs anti-apoptotiques [75].

Les recherches sur le RSV sont encourageantes, particulièrement dans le cadre d'un AVC. Ses cibles potentielles sont illustrées dans la figure 12.

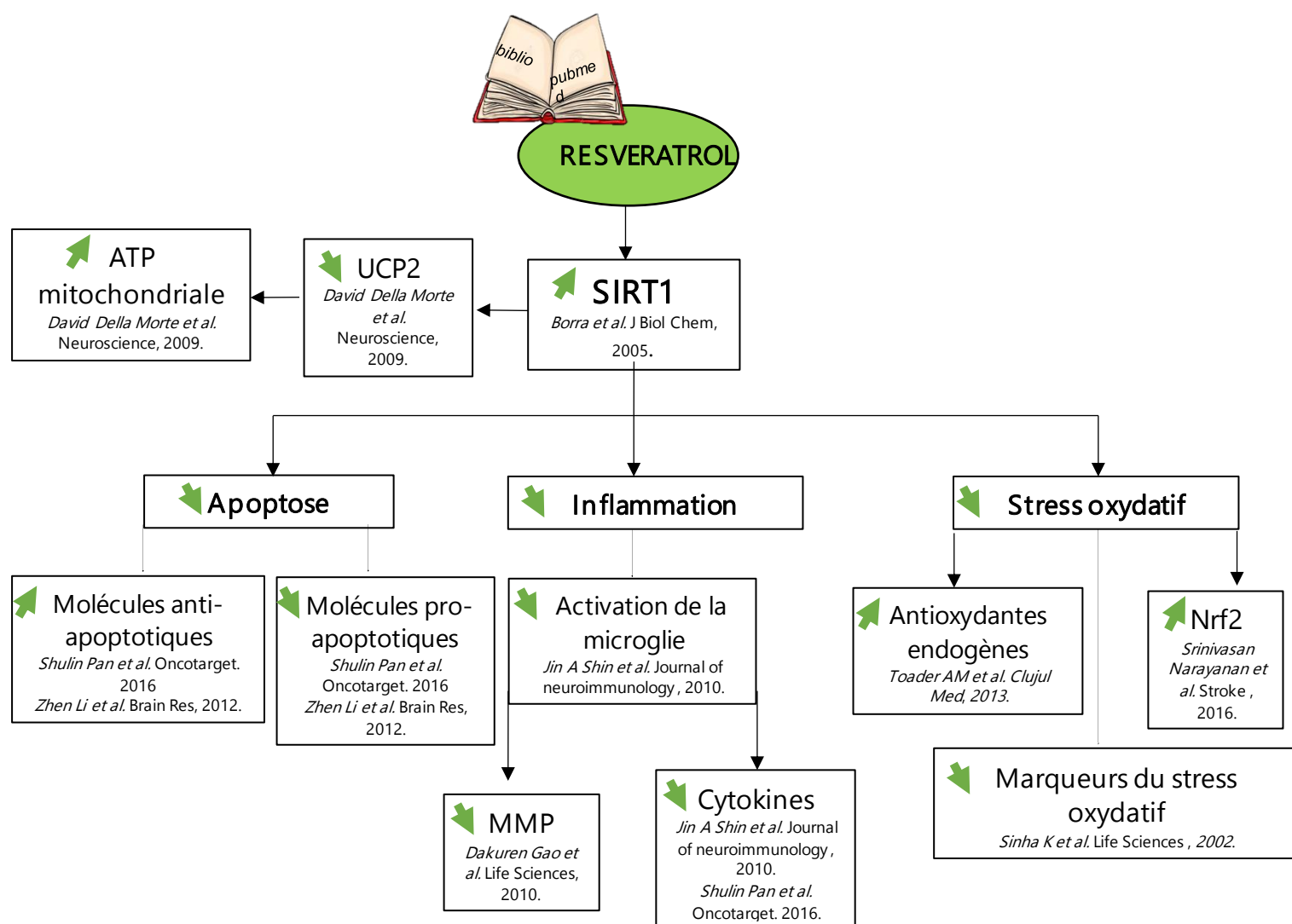


Figure 12: Résumé du mode d'action connu du RSV après un AVC.

4.Effets neuroprotecteurs du RSV dans le cadre de l'HI néonatale

Objectifs de la partie 4 :

L'objectif de ce chapitre est de rendre compte de l'état de l'art sur les effets neuroprotecteurs du RSV dans le cadre de l'HI néonatale.

4.1. Études ayant montré un effet neuroprotecteur préventif dans le cadre d'une HI néonatale, mais pas d'effet curatif

Au cours des 15 dernières années, plusieurs études ont montré les effets neuroprotecteurs des polyphénols, principalement du RSV, lors d'un traitement **préventif** suite à une HI néonatale. Ces études, souvent comparées avec une administration en curatif, sont résumées dans le tableau 2.

En 2005, une équipe américaine a été la première à étudier le rôle d'extrait de pépins de raisin (concentré de polyphénols) dans un contexte d'HI néonatale. L'injection d'extrait de raisin (50 mg/kg ; i.p.) réalisée 5 min avant l'HI sur des ratons P7 a permis de réduire la taille des lésions cérébrales et la peroxydation des lipides [76]. Loren *et al.* ont montré les effets bénéfiques des polyphénols avec une approche originale qui consistait à supplémenter des souris gestantes avec du jus de grenade, dans l'eau de boisson [77]. En effet, des études ont montré que le RSV pouvait traverser la barrière placentaire et accéder à l'organisme du nouveau-né *in utero* [78, 79]. Chez les souriceaux ayant subi une HI, cette supplémentation maternelle a induit une diminution dose-dépendante de la perte neuronale hippocampique et corticale (> 60 %) ainsi qu'une diminution de l'apoptose (réduction de l'expression de la caspase 3) [77]. C'est deux ans plus tard que cette même équipe a voulu savoir quels polyphénols étaient impliqués dans cette neuroprotection. West *et al.* ont alors injecté du RSV (20 mg/kg ; i.p.) à des souriceaux et des ratons P7, 10 min avant et 3 heures après l'HI. La diminution des lésions cérébrales ainsi que la diminution de l'expression de la caspase 3 ont été observées pour les groupes où le RSV a été administré 10 min avant l'accident mais pas 3 heures après [80]. En 2013, une étude a montré que l'administration du RSV (20 mg/kg ; i.p.) quotidiennement pendant 7 jours avant l'HI a permis de réduire les dommages cérébraux en diminuant les marqueurs du stress oxydatif et en augmentant les antioxydants endogènes [69].

De même, Olatz Arteaga *et al.* ont évalué l'effet neuroprotecteur d'une administration de RSV (20 mg/kg , i.p.) 10 min avant ou juste après l'accident d'HI chez les rats nouveau-nés P7. L'administration de RSV 10 min pré-HI s'est révélée neuroprotectrice. En effet, le RSV a permis de diminuer les lésions cérébrales en

préservant la myélinisation et en réduisant la réponse d'activation de la microglie. De plus, ces effets neuroprotecteurs ont perduré dans le temps puisque les résultats des tests comportementaux ont été considérablement améliorés à l'âge adulte [81]

Plus récemment, Yan Gao *et al.* ont montré aussi les effets neuroprotecteurs du RSV (40 mg/kg ; i.p.) sur les effets de l'HI mais pour des rats nouveau-nés à P14. Le RSV, injecté pendant 7 jours avant l'HI, a permis de diminuer l'œdème cérébral, la peroxydation des lipides, les marqueurs de l'inflammation, et d'augmenter de manière significative la présence d'antioxydants [82].

Polyphénols	Dose	Modèle HI	Administration	Effets neuroprotecteurs	Références
Extrait de pépins de raisins	50 mg/kg	P7 / rat Rice & Vannucci Hypoxie à 8% 2,5h à 37°C	i.p. 5 min avant HI	❖ Diminution des lésions cérébrales de 20% ❖ Diminution de la peroxydation des lipides	Yangzheng Feng <i>et al.</i> , Brain Research Bulletin, 2005. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15982528/
Jus de grenade	0,32um ol/jour	P7 / souris Hypoxie à 8% 45min à 37°C	Eau de boisson P-7 à P7 et P14	❖ Diminution des lésions cérébrales de <80% dans le cortex et l'hippocampe ❖ Diminution de l'expression de la caspase 3 dans le cortex et l'hippocampe (84% dans l'hippocampe et de 64% dans le cortex).	David D Loren <i>et al.</i> , Pediatric Research, 2005. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15774834/
Amentoflavone	30 mg/kg	P7 / rat Hypoxie à 8% 2,5h à 37°C	i.p. avant et jusqu'à 6h après HI	❖ Diminution des lésions cérébrales de 50% ❖ Diminution de l'expression de la caspase 3 jusqu'à 48h après l'HI ❖ Diminution de l'expression des molécules clés impliquées dans l'inflammation	Dong Hoon Shin <i>et al.</i> , Journal of neurochemistry, 2006. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16336627/
Resvératrol	20 mg/kg	P7 / souris et rat Rice & Vannucci Hypoxie à 8% 2,5h à 37°C	i.p. 10 min avant et 3 h après HI	❖ Diminution des lésions cérébrales ❖ Diminution de l'activation des caspases 3	Tim West <i>et al.</i> , Dev Neuroscience, 2007. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17762204/
Resvératrol	20 mg/kg	P7 / rat Rice & Vannucci Hypoxie à 8% 1,5h	i.p. Quotidiennement 7 jours avant l'HI	❖ Diminution des lésions cérébrales ❖ Diminution de l'expression des marqueurs du stress oxydatif ❖ Augmentation des antioxydants endogènes	Alina-Mihaela Toader <i>et al.</i> , Clujul Med, 2013. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4462492/
Resvératrol	20 mg/kg	P7 / rat Rice & Vannucci Hypoxie à 8% 2,15h à 36°C	i.p. 10 min avant et juste après l'HI	❖ Diminution des lésions cérébrales de 50% ❖ Préservation de la myélinisation et de l'activation de la microglie ❖ Préservation des fonctions motrices et cognitives au long terme	Olatz Arteaga <i>et al.</i> , Plos One, 2015. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26544861/
Resvératrol	40 mg/kg	P14 / rat Hypoxie à 8% 2,5h à 37°C	i.p. Quotidiennement de P7 à P14	❖ Diminution de la taille de l'infarctus de 57% et de l'œdème cérébral. ❖ Diminution des marqueurs de l'inflammation et de la peroxydation des lipides ❖ Augmentation des molécules antioxydantes	Yan Gao <i>et al.</i> , Pharmaceutical Biology, 2018. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30460866/

Tableau 2: Effet neuroprotecteur d'un pré-traitement en polyphénol sur l'HI néonatale.

4.2. Études ayant montré un effet neuroprotecteur curatif dans le cadre d'une HI néonatale, mais pas d'effet préventif

Dans la littérature, les avis sont assez partagés concernant la bonne fenêtre d'administration du RSV pour obtenir les meilleurs effets bénéfiques. Quelques études ont montré aussi des effets neuroprotecteurs par les polyphénols, principalement du RSV, lors d'un traitement **après** HI. Ces études sont résumées dans le tableau 3.

Feng *et al.* ont montré, en 2007, qu'une injection d'extrait de pépins de raisin, 3h post-HI, permettait de réduire la taille des lésions cérébrales, de diminuer la peroxydation des lipides et d'améliorer les performances motrices et cognitives altérées par l'HI [83].

Karalis *et al.* ont administré à des rats P7 du RSV (90 mg/kg ; i.p.) juste après l'HI et ont évalué les fonctions motrices et cognitives des rats sur le long terme de P8 à P66. À court terme, le RSV a permis d'améliorer les dommages cérébraux induits par l'HI. De plus, les analyses comportementales ont montré que les rats ayant reçu du RSV juste après l'HI avaient des meilleurs résultats tant au niveau des tests précoces (redressement et locomotion) qu'au niveau des tests à long terme. Ces données suggèrent que le RSV permet une préservation des fonctions comportementales aussi bien sur le court terme que sur le long terme [84].

Quatre ans plus tard, Pan *et al.* ont testé la neuroprotection du RSV sur le même modèle d'HI à P7, en post-traitement mais avec plusieurs répétitions de RSV. Dans cette étude, le RSV (100 mg/kg, i.p.) a été injecté juste après l'HI, 8 h et 18 h après l'HI. Ils ont rapporté une diminution significative des lésions cérébrales 7 jours après l'HI, une réduction des facteurs inflammatoires et une diminution de l'expression des gènes liés à l'apoptose (caspase 3) [75].

Enfin, Bian *et al.* ont combiné une étude *in vivo* et *in vitro*. Pour l'étude *in vivo*, le modèle d'HI de Rice et Vannucci a été utilisé sur des rats P7 avec une injection de RSV (100 mg/kg, i.p.) 10 min avant ou juste après l'HI. L'injection en pré-traitement n'a pas montré de résultats significativement différents. Cependant, les résultats *in vivo* et *in vitro* ont montré que la présence de RSV permettait de diminuer significativement l'apoptose dans le cortex et l'hippocampe lors d'un post-traitement [85].

Polyphénols	Dose	Model HI	Administration	Cibles	références
Amentoflavone	30mg/ kg	P7 / rat Hypoxie à 8% 2,5h à 37°C	i.p avant et jusqu'à 6h après HI	❖ Diminution des lésions cérébrales de 50% ❖ Diminution de l'expression de la caspase 3 jusqu'à 48h après l'HI ❖ Diminution de l'expression des molécules clés impliquées dans l'inflammation	Dong Hoon Shin <i>et al</i> , Journal of neurochemistry, 2006. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16336627/
Extrait de pépins de raisins	50 mg/kg	P7 / rat Rice & Vannucci Hypoxie à 8% 2,5h à 37°C	i.p Entre 5 min et 5h après l'HI	❖ Diminution des lésions cérébrales quand le traitement est donné 3h post HI ❖ Diminution de la peroxydation des lipides ❖ Amélioration des fonctions comportementales	Yangzheng Feng <i>et al</i> , Pediatric Research, 2007. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17314686/
Resvératrol	90 mg/kg	P7 / rat Rice & Vannucci Hypoxie à 8% 1h à 37°C	i.p Juste après l'HI	❖ Diminution des lésions cérébrales avec une préservation de la substance blanche (hippocampe) ❖ Préservation de la mémoire et de l'apprentissage	Filippos Karalis <i>et al</i> , Brain Research, 2011. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22018692/
Resvératrol	100 mg/kg	P7 / rat Rice & Vannucci Hypoxie à 8% 2,5h à 37,5°C	i.p Juste après l'HI, 8h et 18h après.	❖ Diminution des lésions cérébrales ❖ Diminution de l'expression des molécules clés impliquées dans l'inflammation et l'apoptose.	Shulin Pan <i>et al</i> , Oncotarget, 2016. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27811363/
Resvératrol	100 mg/kg	P7 / rat Rice & Vannucci Hypoxie à 8% 2,5h à 37°C	i.p 10min avant et juste après l'HI,	❖ Diminution des lésions cérébrales ❖ Diminution de l'expression des molécules clés impliquées dans l'apoptose et de miR96 dans l'hippocampe et le cortex	Hongen Bian <i>et al</i> , Childs Nerv Syst, 2017. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28721600/

Tableau 3 : Effet neuroprotecteur d'un post-traitement en polyphenols sur l'HI néonatale.

Il ne manque pas de preuves pour affirmer que le RSV montre des effets neuroprotecteurs sur l'HI néonatale. De manière évidente, le RSV permet de diminuer les lésions cérébrales provoquées par l'HI néonatale. De plus, il peut contrecarrer les dommages comportementaux induits par l'HI en préservant les fonctions motrices et cognitives. Dans ces publications, les voies de signalisations mises en évidence pour la neuroprotection du RSV sont l'inhibition de l'apoptose, de l'inflammation et du stress oxydatif que provoque l'HI.

Cependant, le meilleur protocole d'administration reste encore à être déterminé. La présence de RSV au moment de l'HI semblerait être nécessaire pour avoir les meilleurs effets neuroprotecteurs.

De plus, bien qu'ayant mis en évidence un effet neuroprotecteur du RSV, l'ensemble de ces publications présente un certain nombre de limites, notamment en ce qui concerne le mode d'administration en i.p. qui possède un caractère pro-inflammatoire non-négligeable et les doses de RSV utilisées qui sont de l'ordre de la pharmacologie (100 mg/kg de RSV correspondent à 1 000 kg de raisins (pépins et peau compris)).

Il reste également à comprendre le mode d'action du RSV. Deux études ont suggéré l'implication potentielle du RSV au niveau du métabolisme cérébral. Il y a quelques

années, notre équipe a montré *via* une étude par spectroscopie RMN (résonance magnétique nucléaire) *ex vivo* sur un modèle de foie isolé et perfusé, que le RSV pouvait activer la glycolyse [86]. Deux ans après, Girbovan *et al.* ont montré qu'une ischémie transitoire du cerveau de rat adulte provoquait une diminution du transporteur au glutamate astrocytaire (GLT1) et que cette diminution a été contrecarrée par un prétraitement au RSV (10 mg/kg ; i.p.) [87]. Le RSV, en plus d'activer les voies de signalisation classiques, pourrait aussi moduler le métabolisme cérébral et activer l'ANLS, des effets qui participeraient à ses propriétés neuroprotectrices.

Objectifs du projet :

Les objectifs de ma thèse sont multiples :

- Confirmer le rôle neuroprotecteur du RSV dans le cadre d'une HI néonatale, à des doses nutritionnelles (0,15 mg/kg/jour).
- Assurer un approvisionnement en RSV *via* la supplémentation transgénérationnelle (l'eau de boisson de la rate).
- Définir la fenêtre de supplémentation optimale avant (préventive) ou après (curative) l'HI.
- Comprendre l'aspect mécanistique de la neuroprotection du RSV dans le cerveau en étudiant les changements d'expression génique et protéique d'éléments clés.
- Décrypter l'impact d'une supplémentation maternelle en RSV sur le métabolisme cérébral et sur l'activation de l'ANLS

L'originalité du projet repose en partie sur l'aspect trans-générationnel et nutritionnel de l'administration du RSV.

5. Bibliographie

1. Brauch, R.A., et al., *Glial cell number and neuron/glial cell ratios in postmortem brains of bipolar individuals*. J Affect Disord, 2006. **91**(1): p. 87-90.
2. GFME, *Le système immunitaire du cerveau, la microglie, les vaccins, l'immunothérapie*. 2019.
3. Pellerin, L., et al., *Activity-dependent regulation of energy metabolism by astrocytes: an update*. Glia, 2007. **55**(12): p. 1251-62.
4. Baumann, N. and D. Pham-Dinh, *Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system*. Physiol Rev, 2001. **81**(2): p. 871-927.
5. Alliot, F., I. Godin, and B. Pessac, *Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain*. Brain Res Dev Brain Res, 1999. **117**(2): p. 145-52.
6. Pellerin, L. and P.J. Magistretti, *Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(22): p. 10625-9.
7. Perez-Escuredo, J., et al., *Monocarboxylate transporters in the brain and in cancer*. Biochim Biophys Acta, 2016. **1863**(10): p. 2481-97.
8. Pellerin, L., et al., *Cellular and subcellular distribution of monocarboxylate transporters in cultured brain cells and in the adult brain*. J Neurosci Res, 2005. **79**(1-2): p. 55-64.
9. Markert, C.L., J.B. Shaklee, and G.S. Whitt, *Evolution of a gene. Multiple genes for LDH isozymes provide a model of the evolution of gene structure, function and regulation*. Science, 1975. **189**(4197): p. 102-14.
10. Bittar, P.G., et al., *Selective distribution of lactate dehydrogenase isoenzymes in neurons and astrocytes of human brain*. J Cereb Blood Flow Metab, 1996. **16**(6): p. 1079-89.
11. Roumes, H., et al., *Neuroprotective role of lactate in rat neonatal hypoxia-ischemia*. J Cereb Blood Flow Metab, 2020: p. 271678X20908355.
12. Bouzier-Sore, A.K., et al., *Lactate is a preferential oxidative energy substrate over glucose for neurons in culture*. J Cereb Blood Flow Metab, 2003. **23**(11): p. 1298-306.
13. Barros, L.F. and B. Weber, *CrossTalk proposal: an important astrocyte-to-neuron lactate shuttle couples neuronal activity to glucose utilisation in the brain*. J Physiol, 2018. **596**(3): p. 347-350.
14. Suzuki, A., et al., *Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 810-23.
15. Tadi, M., et al., *Learning-Induced Gene Expression in the Hippocampus Reveals a Role of Neuron-Astrocyte Metabolic Coupling in Long Term Memory*. PLoS One, 2015. **10**(10): p. e0141568.
16. Netzhualcoyotzi, C. and L. Pellerin, *Neuronal and astroglial monocarboxylate transporters play key but distinct roles in hippocampus-dependent learning and memory formation*. Prog Neurobiol, 2020: p. 101888.
17. Goedert, M. and M.G. Spillantini, *A century of Alzheimer's disease*. Science, 2006. **314**(5800): p. 777-81.
18. Mu, Y. and F.H. Gage, *Adult hippocampal neurogenesis and its role in Alzheimer's disease*. Mol Neurodegener, 2011. **6**: p. 85.
19. Zulfiqar, S., P. Garg, and K. Nieweg, *Contribution of astrocytes to metabolic dysfunction in the Alzheimer's disease brain*. Biol Chem, 2019. **400**(9): p. 1113-1127.
20. Mosconi, L., et al., *Hypometabolism exceeds atrophy in presymptomatic early-onset familial Alzheimer's disease*. J Nucl Med, 2006. **47**(11): p. 1778-86.
21. Zimmer, E.R., et al., *[(18)F]FDG PET signal is driven by astroglial glutamate transport*. Nat Neurosci, 2017. **20**(3): p. 393-395.
22. Berthet, C., et al., *Neuroprotective role of lactate after cerebral ischemia*. J Cereb Blood Flow Metab, 2009. **29**(11): p. 1780-9.
23. Bouzat, P., et al., *Cerebral metabolic effects of exogenous lactate supplementation on the injured human brain*. Intensive Care Med, 2014. **40**(3): p. 412-21.
24. Millar, L.J., et al., *Neonatal Hypoxia Ischaemia: Mechanisms, Models, and Therapeutic Challenges*. Front Cell Neurosci, 2017. **11**: p. 78.
25. Kurinczuk, J.J., M. White-Koning, and N. Badawi, *Epidemiology of neonatal encephalopathy and hypoxic-ischaemic encephalopathy*. Early Hum Dev, 2010. **86**(6): p. 329-38.
26. Sarnat, H.B. and M.S. Sarnat, *Neonatal encephalopathy following fetal distress. A clinical and electroencephalographic study*. Arch Neurol, 1976. **33**(10): p. 696-705.
27. Amiel-Tison, C. and P. Ellison, *Birth asphyxia in the fullterm newborn: early assessment and outcome*. Dev Med Child Neurol, 1986. **28**(5): p. 671-82.
28. Thompson, C.M., et al., *The value of a scoring system for hypoxic ischaemic encephalopathy in predicting neurodevelopmental outcome*. Acta Paediatr, 1997. **86**(7): p. 757-61.

29. Douglas-Escobar, M. and M.D. Weiss, *Hypoxic-ischemic encephalopathy: a review for the clinician*. JAMA Pediatr, 2015. **169**(4): p. 397-403.
30. Allen, K.A. and D.H. Brandon, *Hypoxic Ischemic Encephalopathy: Pathophysiology and Experimental Treatments*. Newborn Infant Nurs Rev, 2011. **11**(3): p. 125-133.
31. Cotten, C.M. and S. Shankaran, *Hypothermia for hypoxic-ischemic encephalopathy*. Expert Rev Obstet Gynecol, 2010. **5**(2): p. 227-239.
32. Nakajima, W., et al., *Apoptosis has a prolonged role in the neurodegeneration after hypoxic ischemia in the newborn rat*. J Neurosci, 2000. **20**(21): p. 7994-8004.
33. Ham, P.B., 3rd and R. Raju, *Mitochondrial function in hypoxic ischemic injury and influence of aging*. Prog Neurobiol, 2017. **157**: p. 92-116.
34. Fatemi, A., M.A. Wilson, and M.V. Johnston, *Hypoxic-ischemic encephalopathy in the term infant*. Clin Perinatol, 2009. **36**(4): p. 835-58, vii.
35. Algra, S.O., et al., *Cerebral ischemia initiates an immediate innate immune response in neonates during cardiac surgery*. J Neuroinflammation, 2013. **10**: p. 24.
36. Annink, K.V., et al., *The development and validation of a cerebral ultrasound scoring system for infants with hypoxic-ischaemic encephalopathy*. Pediatr Res, 2020. **87**(Suppl 1): p. 59-66.
37. Clay, D.E., et al., *Evaluating Affordable Cranial Ultrasonography in East African Neonatal Intensive Care Units*. Ultrasound Med Biol, 2017. **43**(1): p. 119-128.
38. Weeke, L.C., et al., *Role of EEG background activity, seizure burden and MRI in predicting neurodevelopmental outcome in full-term infants with hypoxic-ischaemic encephalopathy in the era of therapeutic hypothermia*. Eur J Paediatr Neurol, 2016. **20**(6): p. 855-864.
39. Soul, J.S., et al., *Time course of changes in diffusion-weighted magnetic resonance imaging in a case of neonatal encephalopathy with defined onset and duration of hypoxic-ischemic insult*. Pediatrics, 2001. **108**(5): p. 1211-4.
40. Lei, B., et al., *Effect of moderate hypothermia on lipid peroxidation in canine brain tissue after cardiac arrest and resuscitation*. Stroke, 1994. **25**(1): p. 147-52.
41. Edwards, A.D., et al., *Specific inhibition of apoptosis after cerebral hypoxia-ischaemia by moderate post-insult hypothermia*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **217**(3): p. 1193-9.
42. Saliba, E., *Hypothermie : un standard de traitement de l'encéphalopathie hypoxie-ischémique néonatale*. Pédiatriques, Néonatalogie, 2011. **163**: p. 29-34.
43. Thoresen, M. and A. Whitelaw, *Cardiovascular changes during mild therapeutic hypothermia and rewarming in infants with hypoxic-ischemic encephalopathy*. Pediatrics, 2000. **106**(1 Pt 1): p. 92-9.
44. Wu, Y.W. and F.F. Gonzalez, *Erythropoietin: a novel therapy for hypoxic-ischaemic encephalopathy?* Dev Med Child Neurol, 2015. **57** Suppl3: p. 34-9.
45. Brissaud, O., et al., *Short-term effect of erythropoietin on brain lesions and aquaporin-4 expression in a hypoxic-ischemic neonatal rat model assessed by magnetic resonance diffusion weighted imaging and immunohistochemistry*. Pediatr Res, 2010. **68**(2): p. 123-7.
46. Kumral, A., et al., *Neuroprotective effect of erythropoietin on hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats*. Biol Neonate, 2003. **83**(3): p. 224-8.
47. Ventre, C., et al., *[Indications and limits of recombinant human erythropoietin in intensive care unit]*. Ann Fr Anesth Reanim, 2004. **23**(7): p. 714-21.
48. Halperin, D.S., et al., *Effects of recombinant human erythropoietin in infants with the anemia of prematurity: a pilot study*. J Pediatr, 1990. **116**(5): p. 779-86.
49. Zhu, C., et al., *Erythropoietin improved neurologic outcomes in newborns with hypoxic-ischemic encephalopathy*. Pediatrics, 2009. **124**(2): p. e218-26.
50. Wu, Y.W., et al., *High-Dose Erythropoietin and Hypothermia for Hypoxic-Ischemic Encephalopathy: A Phase II Trial*. Pediatrics, 2016. **137**(6).
51. Takao, M., *Resveratrol a new phenolic compound from veratrum grandiflorum* Nippon Kagaku Kaishi, 1939. **60**: p. 1090-1100.
52. Nonomura, S., H. Kanagawa, and A. Makimoto, *[Chemical Constituents of Polygonaceous Plants. I. Studies on the Components of Ko-J O-Kon. (Polygonum Cuspidatum Sieb. Et Zucc.)]*. Yakugaku Zasshi, 1963. **83**: p. 988-90.
53. Renaud, S. and M. de Lorgeril, *Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease*. Lancet, 1992. **339**(8808): p. 1523-6.
54. Constant, J., *Alcohol, ischemic heart disease, and the French paradox*. Coron Artery Dis, 1997. **8**(10): p. 645-9.
55. Sinha, K., G. Chaudhary, and Y.K. Gupta, *Protective effect of resveratrol against oxidative stress in middle cerebral artery occlusion model of stroke in rats*. Life Sci, 2002. **71**(6): p. 655-65.
56. Bessis, *Vin et Santé*. 1998. **3**: p. 61-73.
57. Planas, J.M., et al., *The bioavailability and distribution of trans-resveratrol are constrained by ABC transporters*. Arch Biochem Biophys, 2012. **527**(2): p. 67-73.

58. Fremont, L., *Biological effects of resveratrol*. Life Sci, 2000. **66**(8): p. 663-73.
59. Merillon, J.M., et al., *Antioxidant activity of the stilbene astringin, newly extracted from Vitis vinifera cell cultures*. Clin Chem, 1997. **43**(6 Pt 1): p. 1092-3.
60. Walle, T., et al., *High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans*. Drug Metab Dispos, 2004. **32**(12): p. 1377-82.
61. Jannin, B., et al., *Transport of resveratrol, a cancer chemopreventive agent, to cellular targets: plasmatic protein binding and cell uptake*. Biochem Pharmacol, 2004. **68**(6): p. 1113-8.
62. Nilendra Singh, M.A.a.S.D., *Neuroprotective Properties and Mechanisms of Resveratrol in in vitro and in vivo Experimenta Cerebral Stroke Models*. ACS Chem Neurosci, 2013. **4**: p. 1151-1162.
63. Borra, M.T., B.C. Smith, and J.M. Denu, *Mechanism of human SIRT1 activation by resveratrol*. J Biol Chem, 2005. **280**(17): p. 17187-95.
64. Raval, A.P., K.R. Dave, and M.A. Perez-Pinzon, *Resveratrol mimics ischemic preconditioning in the brain*. J Cereb Blood Flow Metab, 2006. **26**(9): p. 1141-7.
65. Della-Morte, D., et al., *Resveratrol pretreatment protects rat brain from cerebral ischemic damage via a sirtuin 1-uncoupling protein 2 pathway*. Neuroscience, 2009. **159**(3): p. 993-1002.
66. Lee, J.M., et al., *Identification of the NF-E2-related factor-2-dependent genes conferring protection against oxidative stress in primary cortical astrocytes using oligonucleotide microarray analysis*. J Biol Chem, 2003. **278**(14): p. 12029-38.
67. Bell, K.F., et al., *Activation of Nrf2-regulated glutathione pathway genes by ischemic preconditioning*. Oxid Med Cell Longev, 2011. **2011**: p. 689524.
68. Narayanan, S.V., et al., *Resveratrol Preconditioning Protects Against Cerebral Ischemic Injury via Nuclear Erythroid 2-Related Factor 2*. Stroke, 2015. **46**(6): p. 1626-32.
69. Toader, A.M., et al., *Neuroprotective strategy in an experimental newborn rat model of brain ischemia and hypoxia: effects of Resveratrol and hypothermia*. Clujul Med, 2013. **86**(3): p. 203-7.
70. Wang, M.J., et al., *Resveratrol inhibits interleukin-6 production in cortical mixed glial cells under hypoxia/hypoglycemia followed by reoxygenation*. J Neuroimmunol, 2001. **112**(1-2): p. 28-34.
71. Shin, J.A., et al., *Therapeutic effects of resveratrol during acute periods following experimental ischemic stroke*. J Neuroimmunol, 2010. **227**(1-2): p. 93-100.
72. Gao, D., et al., *Resveratrol reduces the elevated level of MMP-9 induced by cerebral ischemia-reperfusion in mice*. Life Sci, 2006. **78**(22): p. 2564-70.
73. Agrawal, M., et al., *Ischemic insult induced apoptotic changes in PC12 cells: protection by trans resveratrol*. Eur J Pharmacol, 2011. **666**(1-3): p. 5-11.
74. Li, Z., et al., *Resveratrol attenuates brain damage in a rat model of focal cerebral ischemia via up-regulation of hippocampal Bcl-2*. Brain Res, 2012. **1450**: p. 116-24.
75. Pan, S., et al., *Resveratrol post-treatment protects against neonatal brain injury after hypoxia-ischemia*. Oncotarget, 2016. **7**(48): p. 79247-79261.
76. Feng, Y., et al., *Grape seed extract suppresses lipid peroxidation and reduces hypoxic ischemic brain injury in neonatal rats*. Brain Res Bull, 2005. **66**(2): p. 120-7.
77. Loren, D.J., et al., *Maternal dietary supplementation with pomegranate juice is neuroprotective in an animal model of neonatal hypoxic-ischemic brain injury*. Pediatr Res, 2005. **57**(6): p. 858-64.
78. Bourque, S.L., et al., *Maternal resveratrol treatment during pregnancy improves adverse fetal outcomes in a rat model of severe hypoxia*. Placenta, 2012. **33**(5): p. 449-52.
79. Dolinsky, V.W., et al., *Continued postnatal administration of resveratrol prevents diet-induced metabolic syndrome in rat offspring born growth restricted*. Diabetes, 2011. **60**(9): p. 2274-84.
80. West, T., M. Atzeva, and D.M. Holtzman, *Pomegranate polyphenols and resveratrol protect the neonatal brain against hypoxic-ischemic injury*. Dev Neurosci, 2007. **29**(4-5): p. 363-72.
81. Arteaga, O., et al., *Pretreatment with Resveratrol Prevents Neuronal Injury and Cognitive Deficits Induced by Perinatal Hypoxia-Ischemia in Rats*. PLoS One, 2015. **10**(11): p. e0142424.
82. Gao, Y., et al., *Resveratrol mitigates the oxidative stress mediated by hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats via Nrf2/HO-1 pathway*. Pharm Biol, 2018. **56**(1): p. 440-449.
83. Feng, Y., et al., *Grape seed extract given three hours after injury suppresses lipid peroxidation and reduces hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats*. Pediatr Res, 2007. **61**(3): p. 295-300.
84. Karalis, F., et al., *Resveratrol ameliorates hypoxia/ischemia-induced behavioral deficits and brain injury in the neonatal rat brain*. Brain Res, 2011. **1425**: p. 98-110.

85. Bian, H., H. Shan, and T. Chen, *Resveratrol ameliorates hypoxia/ischemia-induced brain injury in the neonatal rat via the miR-96/Bax axis*. Childs Nerv Syst, 2017. **33**(11): p. 1937-1945.
86. Beauvieux, M.C., et al., *Resveratrol mainly stimulates the glycolytic ATP synthesis flux and not the mitochondrial one: a saturation transfer NMR study in perfused and isolated rat liver*. Pharmacol Res, 2013. **78**: p. 11-7.
87. Girbovan, C. and H. Plamondon, *Resveratrol downregulates type-1 glutamate transporter expression and microglia activation in the hippocampus following cerebral ischemia reperfusion in rats*. Brain Res, 2015. **1608**: p. 203-14.

CHAPITRE II :

Les méthodes utilisées

1. Le modèle classique d'hypoxie-ischémie néonatale de Rice-Vannucci

L'avancement de la recherche sur l'HI néonatale nécessite un modèle animal fiable et reproductible qui permet d'évaluer les différentes thérapies. Le modèle classique de Rice et Vannucci a été mis au point dès le début des années 80 et validé à de nombreuses reprises. Il est utilisé pour caractériser l'HI néonatale provoquant des lésions cérébrales [1]. Les dommages cérébraux résultent d'une combinaison de deux événements qui se suivent : (i) la réduction de la circulation sanguine cérébrale (**ischémie**) associée à (ii) une diminution de l'oxygène dans l'air (**hypoxie**). Ce modèle mime l'asphyxie et induit des lésions cérébrales analogues à celles observées chez les nouveau-nés en clinique. Les lésions conduisent à une atteinte de l'intégrité du cortex ipsilatéral, et parfois controlatéral, notamment au niveau du cortex somatosensoriel ainsi qu'une atteinte des hippocampe et striatum ipsilatéraux. Le modèle d'HI est réalisé sur des animaux âgés de 7 jours : P7 (*post-natal day 7*) car cela correspond à la maturité cérébrale des nouveau-nés humains nés à terme [2].

Le débit sanguin cérébral dans l'hémisphère ipsilatéral de la carotide ligaturée ne diminue pas de façon suffisante pour créer à lui seul des lésions cérébrales, en raison du débit sanguin collatéral *via* le polygone de Willis qui compense et alimente la totalité du cerveau. C'est la combinaison de la diminution du débit sanguin cérébral et de l'hypoxie qui va permettre la formation de lésions ischémiques unilatérales importantes.

1.1. Le protocole d'hypoxie-ischémie néonatale

1.1.1. Animaux

Toutes les expérimentations sur les animaux ont été menées conformément aux directives concernant l'expérimentation animale du Conseil des Communautés Européennes du 24 novembre 1986 (86/609/CEE). Les protocoles respectent les règles éthiques du ministère de l'Agriculture et des Forêts ont été approuvés par le comité d'éthique local (Bordeaux, autorisation n° 9476). Les expériences ont été réalisées sur des rats Wistar RJ-HAN et hébergés en cycle 12h/12h lumière/obscurité avec de la nourriture (A04, Charles River ou A03 pour les mères gestante) et de l'eau *ad libitum*.

1.1.2. Protocole d'HI

Le modèle d'HI néonatale de Rice et Vannucci a été utilisé (ratons P7 ; $16,2 \pm 1,2$ g). Il consiste en une ligature de l'artère carotide commune gauche suivie de 2h dans un environnement hypoxique. Les ratons ont été anesthésiés sous isoflurane (4 % pour l'induction et 1,5 % pour le maintien de l'anesthésie). Une légère dose d'anesthésique local (lidocaïne 0,5 %) a été injectée en sous-cutanée sur la partie ventrale du cou, désinfectée au préalable à la Bétadine, avant l'incision médiane. Après écartement de la

glande salivaire gauche, l'artère carotide commune des ratons était isolée du nerf vague (figure 13) et des autres structures puis ligaturée de façon permanente avec un fil de soie chirurgical Vicryl (7/0). La glande salivaire a été remise en place, les tissus réhydratés avec de la solution saline et la plaie a été suturée. Après 30 min de récupération dans une cage de réveil, disposée sur une plaque chauffante, les animaux ont été placés dans la chambre hypoxique. Lors de la procédure chirurgicale, la durée de l'anesthésie n'a pas excédée 14 min et les ratons ont été maintenus à $36,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$ (température contrôlée par sonde rectale reliée à un tapis chauffant ; CMA/ Microdialysis AB, Phymep, Paris). À l'issue des 30 min de récupération, les ratons ont été placés dans un caisson hypoxique (Intensive Care Unit Warmer, Harvard Apparatus, France) (enceinte de 840 cm^2) pendant 2 heures à $8 \pm 0,2\%$ O_2 , 92% N_2 et maintenu à une température de $33^\circ \pm 0,5^\circ\text{C}$ (permettant d'assurer une température rectale de $36,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$) avec une saturation en humidité de 80% . Un oxymètre permet de contrôler, toutes les 10 min, le taux d' O_2 dans l'enceinte (Vigaz, France). À la suite de l'hypoxie, les ratons ont été anesthésiés et placés dans l'aimant. Les animaux sham (sans HI) ont subi également le protocole opératoire, mais leur artère carotide commune a juste été exposée. Ils ont ensuite été isolés dans une cage de réveil pendant 2h avant de passer à l'IRM.

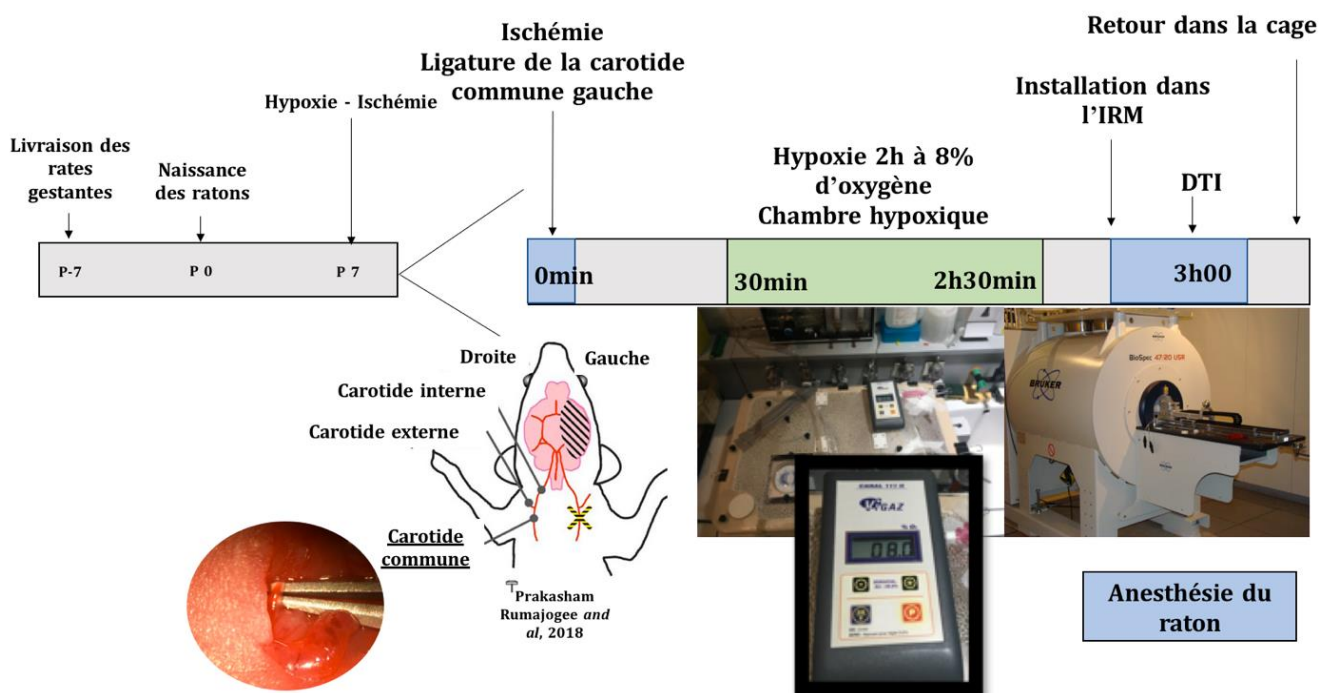


Figure 13 : Schéma descriptif du protocole d'HI néonatale.

Déroulement de l'HI pour chaque raton : ligature de l'artère carotide commune gauche puis l'hypoxie pendant 2h à 8 % d' O_2 suivis d'un IRM. L'IRM de diffusion a toujours été réalisée 3 h après la ligature.

1.2. Les limites du protocole d'hypoxie-ischémie

Il existe un grand nombre de paramètres physiologiques pouvant impacter la reproductibilité du modèle d'HI. Ci-dessous, les différents paramètres sont décrits ainsi que les solutions que nous avons mises en place pour optimiser l'intervention d'HI.

1.2.1. Limites intrinsèques de la procédure d'HI

Bien que la validité de ce modèle soit établie, il induit néanmoins une forte hétérogénéité au niveau des volumes lésionnels. Il existe un modèle plus homogène d'HI néonatale, une variante du modèle de Rice et Vannucci, qui consiste à ligaturer l'artère carotide externe en plus de l'artère carotide commune. Cette double ligature empêche la perfusion cérébrale rétrograde et permet d'obtenir une homogénéité des lésions à P7 [3]. Cependant, la mortalité est plus importante à 48h dans ce modèle modifié. Nous n'avons donc pas choisi ce modèle. Le modèle classique de Rice et Vannucci, réalisé sur un grand nombre d'animaux (31 rats) a permis d'obtenir une taille de lésions moyenne de $42,1 \pm 1,1$ % avec une barre d'erreur réduite illustrant la reproductibilité de la technique.

Cependant, dans les groupes dont la mère était supplémentée avec des polyphénols, certains rats ne présentaient pas, à P7, de lésion cérébrale détectable par IRM. Cette absence de lésion pouvait s'expliquer (i) par une ligature non fonctionnelle ou (ii) par une neuroprotection induite par la supplémentation maternelle. Il était donc important de pouvoir s'affranchir de la possibilité d'une ligature non efficace. Afin de vérifier la ligature de l'artère carotide commune du côté ipsilatéral, deux séquences IRM ont été mises en place : une séquence d'angiographie pour visualiser les gros vaisseaux sanguins et une séquence de perfusion pour mesurer la microcirculation du flux sanguin (cf. [3-2 Angiographie et perfusion](#)). Lorsqu'aucune asymétrie du réseau sanguin et de perfusion cérébrale n'a été détectée, les rats ont été exclus de l'étude. Dans notre étude, sur les 286 rats ayant subi une HI, 4 rats ont été exclus sur ce critère. De plus, 14 rats sont décédés pendant la procédure ce qui fait une mortalité < 5 %.

1.2.2. Mise-bas des rates

Dans l'état naturel, les rates ont une période de gestation variable, intrinsèque à chaque individu, allant de 21 à 22 j. De plus, il n'était pas évident de valider l'heure précise de la mise-bas, la rate gestante pouvait mettre bas le soir, dans la nuit ou tôt le lendemain matin. Ce paramètre était difficile à contrôler. Une variation de 10h pouvait donc exister entre les différentes portées. Or, il a été montré dans la littérature qu'un modèle d'HI réalisé à P6 ou P8 avait des conséquences non négligeable sur la taille des lésions [4].

En effet, plus l'HI se fait précocement moins le raton est susceptible de développer des lésions cérébrales importantes, et au contraire plus l'HI se fait tardivement, plus le raton a des risques de développer des lésions importantes et donc de montrer des déficits comportementaux. Pour pallier à cette variabilité temporelle, la solution aurait été l'installation d'une caméra infrarouge dans la cage des rates afin de connaître l'heure

exacte de la mise-bas et ainsi pouvoir adapter au mieux la procédure d'HI. Cette solution n'a pas été retenue ; seules les mise-bas retardées de 12 à 16h ont entraîné un report des expérimentations de 24h.

1.2.3. Anesthésie à l'isoflurane

L'anesthésie est un facteur important qui peut impacter l'expérimentation. L'anesthésique utilisé dans notre étude (pour la chirurgie et l'IRM) était l'**isoflurane**. L'isoflurane est un anesthésique volatile couramment utilisé en préclinique. Il a une fonction anesthésiante et myorelaxante. Les preuves s'accumulent en faveur de l'isoflurane pour montrer ses effets bénéfiques et assurer une neuroprotection dans les modèles *in vivo* et *in vitro*. Il a permis de réduire les lésions ischémiques dans différentes études. Dans le cas de l'HI néonatale, Zhou *et al.* ont montré en 2010 qu'une exposition à 2 % d'isoflurane immédiatement après HI sur des rats P10 avait un effet neuroprotecteur [5]. En effet, l'exposition à l'isoflurane a montré (i) une diminution de la mortalité post-HI (mortalité : 6,7 % pour le groupe HI + isoflurane et 9,8 % pour le groupe contrôle HI seul), (ii) une réduction du volume de la lésion (21,9 % pour le groupe HI + isoflurane et 31,9 % pour le groupe contrôle HI seul) et (iii) une amélioration des performances comportementales sur le long terme.

Néanmoins, dans notre cas, tous les rats ont suivis le même protocole sous isoflurane avec des temps bien définis et identiques pour chacun, ce paramètre n'a donc pas été considéré.

1.2.4. Les portées des rats

Le nombre de rats pouvait varier en fonction des portées. Une portée moyenne compte environ une douzaine de rats mais peut atteindre jusqu'à 18 rats. Ce nombre important de rats pouvait impacter leur alimentation. En effet, les rats ne possèdent que 12 tétines donc plus il y a de rats, plus l'accès aux tétines de la ratte est restreint. Des études ont montré l'impact du régime alimentaire maternel sur la neuroplasticité néonatale, celle-ci influencerait la récupération fonctionnelle des rats après un accident d'HI. Il a été mis en évidence que la restriction calorique était neuroprotectrice dans le cadre de HI néonatale [6] .

Le nombre de rats par portée pouvant moduler la prise alimentaire, ce facteur pouvait impacter la robustesse de notre modèle d'HI. Pour limiter ces fluctuations nutritionnelles, les portées ont été restreintes à 12 rats au maximum (euthanasie des rats surnuméraires). Avant chaque chirurgie la présence de lait dans les estomacs des rats était vérifiée : la peau des rats étant très fine, elle permet une visualisation aisée des estomacs par transparence. Enfin, l'évolution du poids des rats, relevé quotidiennement, était aussi un indicateur d'une bonne alimentation.

1.2.5. La différence entre les genres

Certaines études utilisant un modèle animal d'HI néonatale ont montré que les rats de sexe masculin présentaient des lésions plus grandes ainsi que des troubles moteurs et cognitifs plus profonds que les femelles après un accident d'HI. Ces variations entre les sexes pourraient s'expliquer par des différences hormonales et de processus apoptotiques entre les genres [7]. Après une ischémie modérée, les femelles développeraient moins de lésions que les mâles. Dans le cas d'une HI sévère, il n'y a pas de différence entre les genres. Notre modèle d'HI entraîne des volumes lésionnels de l'ordre de 40 %, il est donc considéré comme un modèle d'HI sévère [8]. Dans notre étude, nous avons pu vérifier qu'il n'y avait pas de différence significative entre les mâles et les femelles, tant au niveau des volumes lésionnels qu'au niveau des tests comportementaux. Les valeurs pour les deux sexes ont donc été regroupées. Cette non-discrimination sexuelle répond à la première partie de la règle des 3R (réduction, raffinement, remplacement).

1.2.6. La température

Parmi les paramètres externes, la température avait un impact pour la reproductibilité des lésions dans notre modèle d'HI néonatale. En effet, l'hypothermie est neuroprotectrice dans le cadre de l'HI (norme de soin standard : diminution de la température centrale dans les 6h post-HI) [9], mais au contraire l'hyperthermie est délétère [10]. Une étude clinique faite chez les nourrissons après HI a montré que les risques de décès ou d'invalidité ont été multipliés par 4 pour chaque augmentation de 1°C dans le quartile supérieur. Des températures relativement élevées pendant l'intervention des praticiens après une HI ont été associées à un risque accru d'effets indésirables. Dans notre étude, lors des canicules et/ou d'un problème de climatisation, une augmentation de quelques degrés dans la salle de la chambre hypoxique et dans la salle de l'IRM était mesurée.

Pour pallier ces variations de température, différents moyens ont été mis en place tout au long de l'expérimentation :

- Une chambre hypoxique avec double paroi remplie d'eau, permettant une stabilité optimale de la température à l'intérieur de l'enceinte a été installée.
- Dans la chambre hypoxique : les variations de température ont été suivies à l'aide de deux thermomètres et la température de consigne du bain marie du caisson a été modifiée en fonction des besoins pour assurer une température dans l'enceinte de $33,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ (température nécessaire pour maintenir une température rectale des rats de $36,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$)
- Dans l'IRM : un lit chauffant en résine a été conçu au laboratoire à l'aide d'une imprimante 3D présenté figure 14. Ce dispositif était relié à un bain-marie, ce qui

nous permettait de contrôler et de maintenir la température corporelle des rats dans l'IRM.

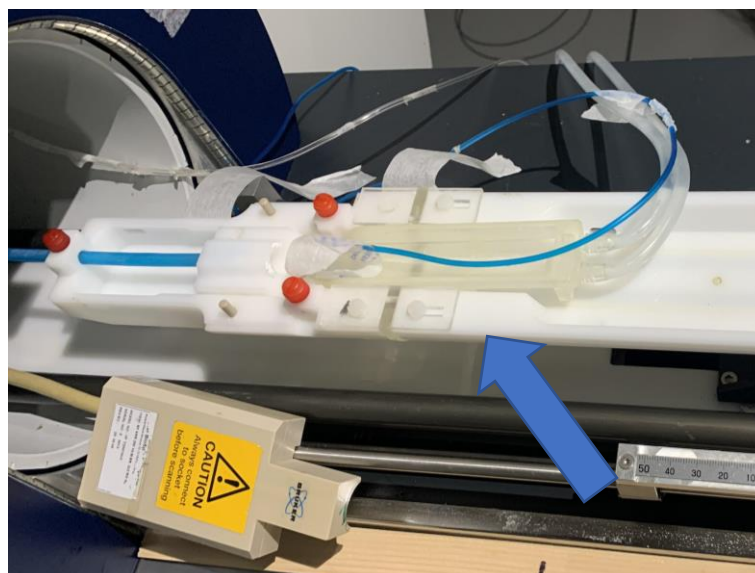


Figure 14 : Photo du lit chauffant en résine.

2. La supplémentation maternelle

Le RSV et le picéatannol (PIC) sont les deux polyphénols utilisés dans cette thèse. Comme nous employons une approche nutritionnelle, nous nous devons de respecter différents paramètres pour être le plus rigoureux possible. Notamment la litière et l'alimentation des rats ont été ajustés pour (i) le confort des rates et leurs ratons et (ii) éviter un biais concernant la supplémentation maternelle.

2.1. Alimentation et litière des rates

2.1.1. L'alimentation

Toutes nos rates ont reçu une alimentation **A03** (SAFE, Ugly France) adaptée à la gestation et à l'allaitement. À la différence de l'alimentation standard des rats (A04 SAFE, Ugly, France), l'A03 possède un indice calorique plus élevé, ainsi que des apports enrichis en protéines, vitamines (A,B,E), lipides et en acides aminés pour assurer la croissance optimale des ratons.

2.1.2. La litière

La litière des rates a été aussi adaptée pour notre protocole de supplémentation maternelle. Au laboratoire, la rafle de maïs est utilisée en routine comme litière pour les animaux (rat et souris). Elle présente deux désavantages majeurs pour notre étude : (i) au niveau du bien-être animal, sa granulométrie est inconfortable pour les rats et (ii) au niveau nutritionnel, les rats peuvent l'ingérer pendant l'expérimentation (source de fibres, choline, vitamines...). La rafle de maïs pouvant altérer le confort des rats et affecter notre protocole nutritionnel, elle a été remplacée par une **litière de peuplier** de granulométrie optimale, d'une plus grande efficacité absorbante et aux propriétés nutritionnelles inertes.

2.2. Supplémentation en polyphénol

2.2.1. Dose des polyphénols

Les doses uniques utilisées dans la littérature pour étudier l'impact des polyphénols sur l'HI néonatale (cf. chapitre I) varient entre 20 mg/kg et 100 mg/kg soit l'équivalent, dans le cas du RSV, de 150 kg de raisin à 1500 kg de raisin, respectivement. Ces doses élevées ne sont ni nutritionnelles ni physiologiques. Ayant pour objectif d'étudier les effets d'une supplémentation maternelle en polyphénols sur les effets délétères d'une HI néonatale, nous avons choisi d'utiliser une dose nutritionnelle de **0,15 mg/kg/jour** ce qui correspond, pour le RSV, à la consommation allant de 1,1 kg à 22 mg de raisin (avec les pépins) par jour pour l'homme. Cette variabilité importante dépendant des raisins (rouge/ blanc), du sol, du climat et du lieu de production.

Pour le PIC, contenu en grande quantité dans les fruits de la passion, d'après Matsuri *et al.* on retrouve 2,2 mg de picéatannol par gramme de fruit de la passion brut [11]. Le poids du fruit de la passion (grains compris) est de 5 à 10 g/fruit. Un fruit de la passion contient alors entre 10 à 20 mg de picéatannol. Les doses de picéatannol testées dans la supplémentation maternelle chez le rat correspondent à la consommation d'un seul fruit de la passion par jour par femme enceinte de 70 kg.

Les solutions stock :

→ 100 mg de polyphénol ont été dissous dans 2 ml d'éthanol absolu donnant une concentration finale de **50 mg/ml**.

Une rate gestante de 350 g boit en moyenne 50 ml par jour. Pour administrer une dose de **0,15 mg/kg/jour** : 4 µl de polyphénol de la solution stock (50 mg/ml) ont été ajoutés dans 200 ml d'eau du robinet chaque jour.

2.2.2. Solubilité des polyphénols et administration

2.2.2.1. Solubilité des polyphénols

Les polyphénols ont pour caractéristique commune de comporter un ou plusieurs noyaux benzènes sur lesquels sont fixés un ou plusieurs groupements alcool -OH. La présence de ces noyaux benzènes rend les polyphénols peu solubles (tableau 4). Le RSV (Sigma-Aldrich, France) et le PIC (Tokyo Chemical Industry Co, France) en poudre ont donc été ressuspendus dans de l'éthanol absolu.

	Resvératrol	Picéatannol
Eau	0,03 mg/ml	0,5 mg/ml
DMSO	16 mg/ml	10 mg/ml
Ethanol	50 mg/ml	10 mg/ml

Tableau 4 : Tableau comparatif des solubilités des deux polyphénols.

L'éthanol a-t-il un effet sur la gestation des rats et sur leur santé ?

Quotidiennement une rate boit l'équivalent de 50 ml. Lors des suppléments, la dose d'éthanol consommée chaque jour par les rates correspond à 0,002 %, soit 1000 fois inférieure au seuil minimum pour provoquer des dommages significatifs chez les rats exposés à l'éthanol [12]. Elle a donc été considérée comme négligeable car inoffensive pour la santé de la rate et de ses petits. Un groupe sham buvant dans l'eau contenant 0,002 % d'éthanol a été réalisé et comparé à un groupe sham seul : aucune différence significative n'a cependant été observée entre ces deux groupes.

2.2.2.2. Administration des polyphénols

Les polyphénols ont été ajoutés à l'eau de boisson des rates. Les polyphénols sont des molécules photosensibles et une simple exposition à la lumière est suffisante pour convertir de manière irréversible l'isomère *trans* en isomère *cis*. L'isomère *cis* est plus instable que l'isomère *trans* et possède des propriétés bioactives 7 fois plus faibles que l'isomère *trans* [13]. Les biberons ont donc été changés tous les jours afin de conserver l'isomère *trans* au maximum et protégés de la lumière en les enrobant de papier aluminium.

2.3. Fenêtres de supplémentation

2.3.1. Resvératrol

Les groupes d'étude ont été repartis en fonction de la fenêtre de supplémentation des rates en RSV dans l'eau de boisson (figure 15) :

- **sham** : Pas de supplémentation en RSV et pas d'HI (n= 18).
- **sham rsv** : 0,15 mg/kg/jour de RSV pendant la dernière semaine de gestation et la première semaine de lactation (P-7 à P7) et pas d'HI à P7 (n= 6).
- **HIC** : Pas de supplémentation en RSV et HI à P7 (n=31).
- **rsvGL** : 0,15 mg/kg/jour de RSV pendant la dernière semaine de gestation et la première semaine de lactation (P-7 à P7) et HI à P7 (n=11).
- **rsvG** : 0,15 mg/kg/jour de RSV pendant la dernière semaine de gestation (P-7 à P0) et HI à P7 (n= 11).
- **rsvL** : 0,15 mg/kg/jour de RSV pendant la première semaine de lactation (P0 à P7) et HI à P7 (n=12).
- **rsvC** : 0,15 mg/kg/jour de RSV pendant la deuxième semaine de lactation (soit juste après l'HI réalisée à P7 : P7 à P14) (n=8).

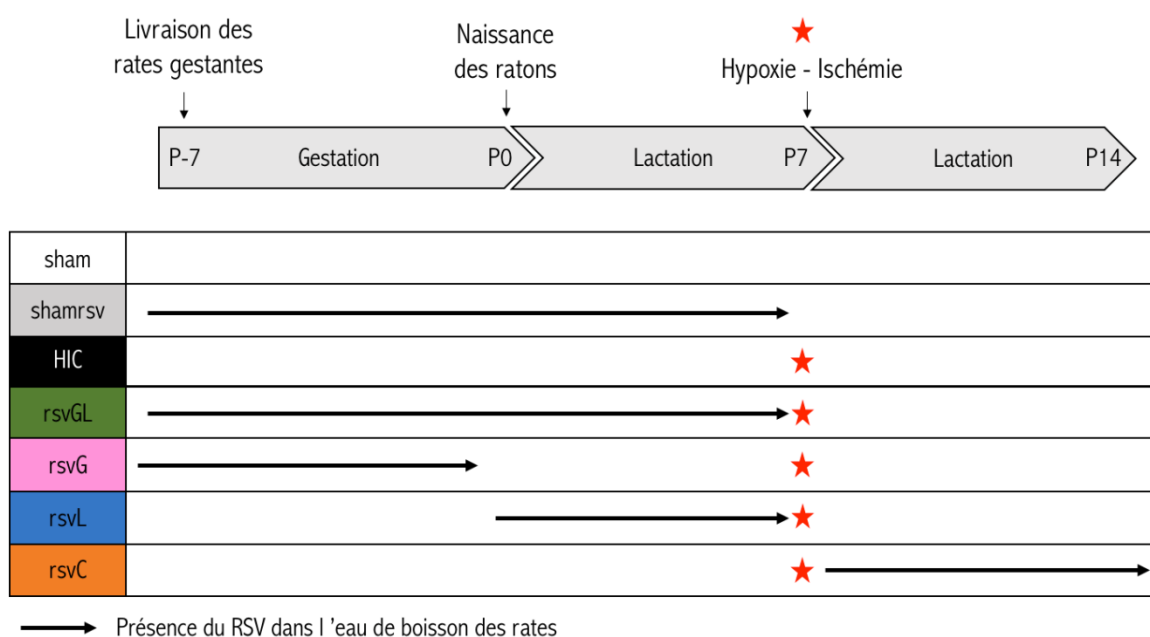


Figure 15 : Répartition des groupes de supplémentation maternelle en RSV.

L'étoile rouge correspond à l'accident d'HI et les flèches noires correspondent à la présence du polyphénol dans le biberon de la rate.

Les effets de la supplémentation maternelle en RSV sur les effets délétères de l'HI néonatale sont présentés dans le **chapitre III** « Neuroprotective effect of maternal resveratrol supplementation in a rat model of neonatal hypoxia-ischemia »

2.3.2. Picéatannol

Les groupes d'étude ont été repartis en fonction de la supplémentation maternelle des rates en PIC dans l'eau de boisson (figure 16):

- **sham** : Pas de supplémentation en PIC et pas d'HI (n=15).
- **HIC** : Pas de supplémentation en PIC et HI à P7 (n= 18).
- **sham pic** : 0,15 mg/kg/jour de PIC pendant la dernière semaine de gestation et la première semaine de lactation (P-7 à P7) et pas d'HI à P7 (n= 6).
- **picGL** : 0,15 mg/kg/jour de PIC pendant la dernière semaine de gestation et la première semaine de lactation (P-7 à P7) et HI à P7 (n= 11).
- **picL** : 0,15 mg/kg/jour de PIC pendant la première semaine de lactation (P0 à P7) et HI à P7 (n=8).

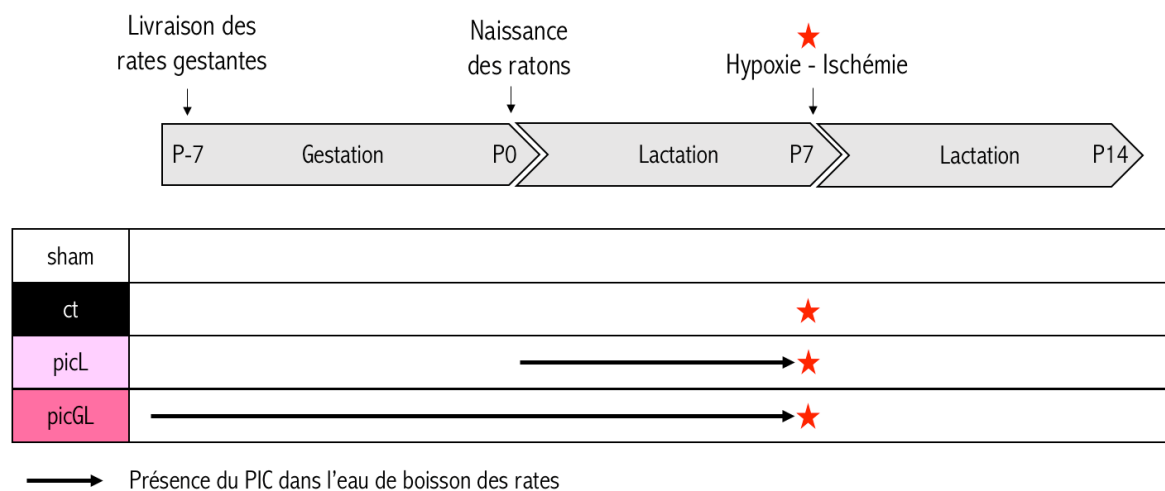


Figure 16: Répartition des groupes de supplémentation maternelle en PIC :

L'étoile rouge correspond à l'accident d'HI et les flèches noires correspondent à la présence du polyphénol dans le biberon de la rate.

Les effets de la supplémentation maternelle en PIC sur les effets délétères de l'HI néonatale sont présentés dans le **chapitre IV** « Maternal consumption of piceatannol: A nutritional neuroprotective strategy against hypoxia-ischemia in rat neonates. » Brain research 2020 [14]

3. Imagerie par Résonance Magnétique

L'IRM est l'outil privilégié dans le diagnostic et la prise en charge des nourrissons nés avec des complications. En effet, c'est une technique non-invasive, suffisamment sensible pour visualiser des anomalies cérébrales. Elle permet de faire un suivi longitudinal des dommages cérébraux sans effet délétère. Elle est utilisée depuis des années dans tous les types de diagnostics notamment en clinique et dans le cas de l'HI [14].

Notre corps est constitué d'environ 60 % d'eau (H_2O). L'IRM repose sur le phénomène de résonance magnétique nucléaire (RMN), c'est-à-dire l'aimantation des noyaux d'hydrogène (H). L'IRM consiste en l'observation des tissus biologiques au travers des propriétés magnétiques du proton de l'atome d'hydrogène de l'eau. Placés dans un champ magnétique $\vec{B}_0$, les spins (moments magnétiques des protons) s'orientent dans la direction de ce champ, dans une direction sens (majoritairement) ou anti-sens. L'aimantation macroscopique mesurée est proportionnelle à la quantité de noyaux d'hydrogène présents. Chaque tissu étant caractérisé par son contenu en eau, la carte d'aimantation reproduit alors l'anatomie des tissus. La résonance magnétique des protons est obtenue grâce à l'application d'une radiofréquence ($\vec{B}_1$: onde électromagnétique), perpendiculaire à $\vec{B}_0$, qui fait basculer les spins. Lorsque la radiofréquence est interrompue, les protons vont retourner à l'état d'équilibre, phénomène appelé relaxation. Cette relaxation est caractérisée par une repousse de la composante longitudinale de l'aimantation (T1) et par une décroissance de la composante transversale (T2). Ce retour à l'équilibre permet donc de recueillir un signal qui, après un post-traitement, donne une image contenant une information pertinente.

L'IRM a connu de nombreux développements et un progrès important avec différentes séquences permettant non seulement de faire de l'imagerie anatomique, mais également de l'imagerie paramétrique (dans ce dernier cas, les pixels dans l'image obtenue reflètent une valeur). Nous avons principalement utilisé **l'imagerie de diffusion ou diffusion weighted imaging** (DWI) qui apporte des informations complémentaires par rapport aux séquences d'imagerie anatomique.

3.1. L'imagerie de diffusion

L'imagerie pondérée en diffusion (DWI) permet d'obtenir une image paramétrique (ou fonctionnelle) dont l'image reflète les propriétés de diffusion des molécules d'eau dans le milieu environnant. Les séquences sont constituées d'une séquence T2 EPI (echo-planar imaging) en écho de spin (ES) sur laquelle sont appliqués de part et d'autre de l'impulsion (RF) de 180° , deux gradients de même amplitude et même direction (figure 17). L'intensité des gradients est représentée par un facteur de gradient b ($b = 1347 \text{ s/mm}^2$ dans notre étude). Le premier gradient va modifier le signal des spins de l'eau extracellulaire pendant la durée de son application. Après leur basculement à 180° par l'impulsion RF, si les molécules d'eau n'ont pas bougé elles vont subir le second gradient,

identique au premier, et revenir à leur position initiale. Il n'y aura donc pas de perte de signal. Par contre, si les molécules d'eau bougent, elles ne subiront pas le même déphasage lors du second gradient et il y aura une perte de signal. L'imagerie de diffusion permet donc de « visualiser » les mouvements de l'eau : plus les molécules diffusent vite, plus le signal sera atténué (hyposignal). C'est le cas du liquide céphalorachidien (LCR), où les mouvements des molécules d'eau sont importants et rapides : le signal apparaît alors en hyposignal. À l'inverse, lors d'un œdème, la vitesse de déplacement des molécules d'eau est réduite par rapport au tissu cérébral sain donc le signal augmente et la lésion apparaît en hypersignal comparé au tissu environnant.

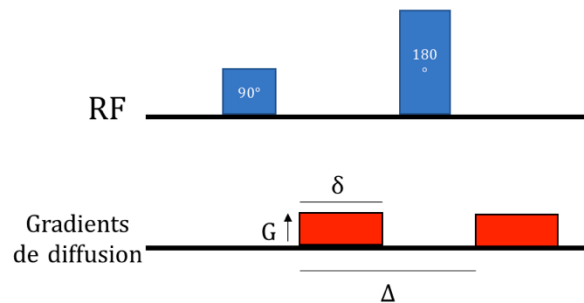


Figure 17 : Séquence de diffusion [15] :

Séquence T2 EPI en écho de spin sur laquelle sont appliqués de part et d'autre du pulse de 180° deux gradients de même amplitude mais de direction opposée. Dans notre étude, $b = 1347 \text{ s/mm}^2$, avec $b = \gamma^2 G^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3)$, γ étant le rapport gyromagnétique du proton, G : l'intensité des gradients, δ : la durée du gradient et Δ : le temps entre chaque gradient.

À partir de cette séquence, deux paramètres ont été mesurés : le coefficient de diffusion apparent (Apparent Diffusion Coefficient ou ADC) et la fraction d'anisotropie (FA).

3.1.1. Le coefficient de diffusion apparent

Le coefficient de diffusion apparent, ou ADC, est le paramètre le plus couramment utilisé et reflète la vitesse de diffusion des molécules d'eau dans un tissu biologique. Cette valeur est mesurée en mm^2/s . Plus précisément, dans un milieu sans obstacle, les molécules d'eau circulent librement ; on dit qu'elles suivent un mouvement Brownien ou une **diffusion isotrope**. Après des lésions cellulaires aiguës provoquant un œdème cytotoxique (cas de l'HI néonatale), le mouvement des molécules d'eau extracellulaire est réduit car les cellules gonflent et cela entraîne alors une diminution de la valeur de l'ADC. L'ADC permet donc de mesurer la sévérité de l'œdème : plus l'ADC est faible, moins les molécules d'eau extracellulaire sont mobiles et plus l'œdème est sévère (figure 18). Dans notre étude l'ADC a été mesuré dans la lésion, par structure, au niveau du cortex, de l'hippocampe et du striatum.

Les valeurs d'ADC moyenne observées dans le cortex pour un raton sham vs un raton HI sont $1,07 \cdot 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ et $0,62 \cdot 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ [15]. Mais ces valeurs types peuvent varier en fonction des conditions expérimentales.

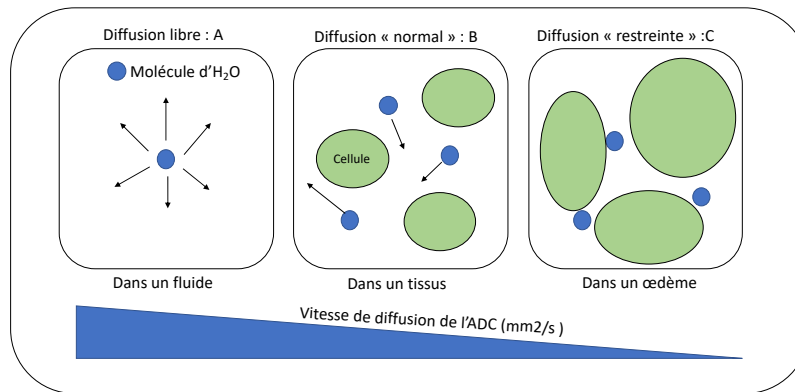


Figure 18: Représentation de la vitesse de l'ADC dans différents environnements :

(A) environnement sans obstacle, les molécules d'eau circulent librement (ADC rapide), (B) environnement dit « normal », les molécules d'eau circulent entre les cellules (ADC standard) et (C) dans le cas d'un gonflement cellulaire (œdème) la diffusion des molécules d'eau est ralentie ou restreinte (ADC réduit)

3.1.2. La fraction d'anisotropie

La fraction d'anisotropie (FA) permet d'évaluer l'intégrité tissulaire. Elle est un indicateur de l'organisation et de l'intégrité des faisceaux de la substance blanche. C'est une valeur comprise entre 0 et 1 :

- La **valeur 0** (pixel noir) montre que la diffusion est isotrope, ou libre, c'est-à-dire que toutes les molécules d'eau sont dites « libres », elles ne rencontrent pas de barrière biologiques et la diffusion s'effectue dans toutes les directions de l'espace (figure 19-A).
- La **valeur 1** (pixel blanc) montre que la diffusion est anisotrope, ou restreinte, c'est-à-dire que les molécules d'eau prennent une direction unique, facilitée par les barrières biologiques. La diffusion de l'eau est rapide le long des membranes cellulaires mais limitée perpendiculairement à celles-ci. Plus la valeur de la FA s'approche de 1, plus la diffusion de l'eau s'effectue dans une direction orientée dans l'espace, et plus le pixel est blanc (figure 19-B).

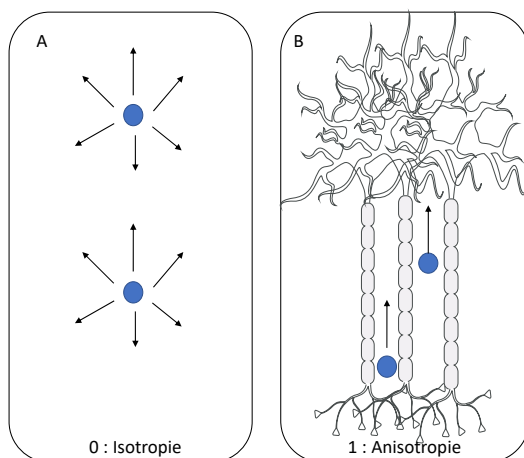


Figure 19: Définition de l'isotropie et l'anisotropie.

(A) FA = 0, les molécules d'eau circulent librement ou diffusion isotrope et (B) FA = 1, les molécules d'eau circulent dans une direction donnée ou diffusion anisotrope.

Dans le cerveau, la diffusion des molécules d'eau est orientée préférentiellement le long des fibres de la substance blanche. Ainsi, les processus de maturation et de myélinisation s'accompagnent d'une augmentation de la FA qui tend alors vers la valeur 1. À l'opposé, une perte des fibres neuronales se traduit par une diminution de la FA. En effet, une diminution de la FA est observée dans la substance blanche après des lésions périnatales [16]. Une étude *ex vivo* a montré, après une HI transitoire *in utéro*, que les dommages provoquaient une chute de la FA. En effet, après IRM sur des cerveaux prélevés à P35, une diminution de la FA a été mise en évidence, principalement dans la substance blanche mais aussi dans la substance grise pour certaines structures (l'hippocampe, le thalamus et le striatum) mais pas dans le cortex sensoriel (FA = 0,2) [17].

3.1.3. Données IRM

Les données d'IRM ont été obtenues à l'aide d'un aimant à 4,7T Biospec 47/50 (Bruker Biospec, Allemagne). Les rats ont été scannés à l'IRM à trois temps différents : à P7 (jour de la ligature), P9 (48h après la ligature) et P30 (23 jours après l'HI). Pour les deux premiers temps, les images ont été acquises à l'aide d'une antenne volumique de souris (P7 et P9) alors qu'une antenne rat est utilisée pour le temps P30 puisque les animaux grandissent. Différentes séquences d'acquisition ont été utilisées :

- **T2 turbo RARE** : IRM anatomique (pondérée T2) TE/TR 50/3000 ms, 20 coupes jointives de 0,7 mm d'épaisseur, facteur rare 8, FOV 2,5 x 2,5 cm, matrice 128 x 128 correspondant à un temps d'acquisition total de 4 min 48 s.
- **DTI_EPI_seg30 directions** : IRM de diffusion TE/TR 24/2000 ms, averages 4, segments 4, matrice 128 x 128, FOV 18 x 18 cm, b = 1347 s/mm², 20 coupes de 0,7 mm d'épaisseur, 30 directions, $\Delta = 8,11$ ms et $\delta = 2,5$ ms correspondant à un temps d'acquisition total de 17 min 04 s.

Les analyses ont été réalisées à l'aide du logiciel Paravision 6.0.1. (PV6.0.1) (Bruker Biospin).

3.1.3.1. Le volume des lésions

Le volume des lésions cérébrales pour chaque raton a été quantifié à P7, P9 et P30 sur PV6.0.1, sur l'image de diffusion. L'image de trace est une image paramétrique où les pixels reflètent la vitesse de déplacement de l'eau en mm²/s. La quantification des lésions a été effectuée sur les images de trace inversée pour nous simplifier la délimitation œdème vs tissu sain (la lésion apparaît alors en hyposignal). L'intégralité du cerveau était

répartie sur les 20 coupes jointives de 0,7 mm d'épaisseur. Pour chaque cerveau, sur chacune des 20 coupes, deux régions d'intérêt (ROI) ont été dessinées (figure 20).

- Contour du cerveau (1)
- Contour de la lésion (2)

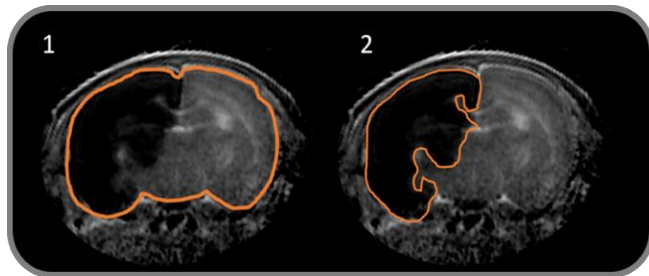


Figure 20: Représentation des ROIs pour la quantification de la lésion.

1) ROI-1 qui prend la totalité du cerveau, 2) ROI-2 qui prend la totalité de la lésion. Cette délimitation a été faite sur chacune des 20 coupes, jointive, ayant une épaisseur de 0,7 mm, on obtient ainsi le pourcentage du volume lésionnel. Exemple d'un raton HIC

Les volumes lésionnels ont été exprimés en % par rapport au volume total du cerveau.

3.1.3.2. L'ADC et la FA

Les valeurs de l'ADC et de FA ont été mesurées dans le cortex, l'hippocampe et le striatum (figure 21). L'ADC a été obtenu sur les images de trace inversée (figure 21-A) et les valeurs de FA ont été obtenues sur les images paramétriques de la fraction d'anisotropie (figure 21-B). Des ROIs ont été dessinées pour chaque structure dans la lésion. Pour l'hippocampe et le cortex, les ROIs ont été faites sur la même coupe, les ROIs au niveau du striatum ont été dessinées sur une coupe antérieure.

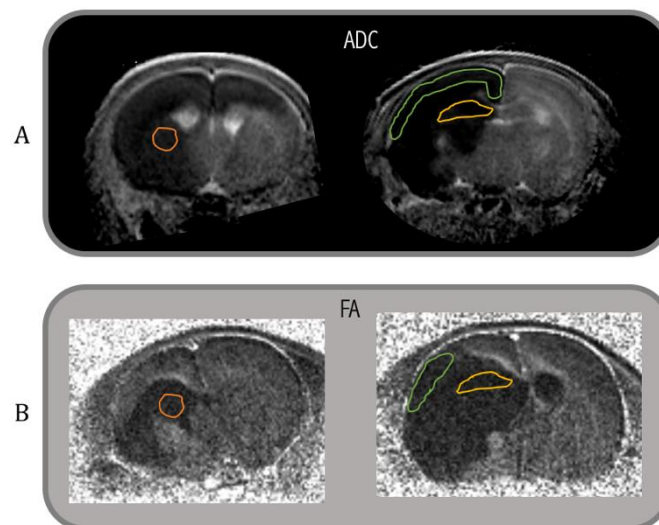


Figure 21: Représentation des ROIs pour obtenir les valeurs d'ADC et FA.

Représentation des coupes et des ROIs correspondant aux différentes structures. Les valeurs ont été obtenues sur les images de trace inversée pour les valeurs d'ADC (A) et sur les images paramétriques de FA pour mesurer les valeurs de FA dans chaque structure (B).

L'ADC a été mesuré uniquement à P7, car l'œdème évolue dans le temps et subit un phénomène de pseudonormalisation (résorption ou mort cellulaire). Déjà à P9, deux phénomènes coexistent donnant des valeurs opposées : l'œdème qui peut encore être présent et provoquer une chute des valeurs de ADC (comme à P7) et l'apoptose ou la nécrose qui induisent une mort cellulaire et entraînent une diffusion libre des molécules d'eau donnant des valeurs d'ADC élevées. Pour la FA, les mesures ont été réalisées à P30 cependant les résultats ont été très hétérogènes surtout lors de grosses lésions. Cette quantification doit être optimisée.

3.2. L'angiographie et la perfusion

Différentes séquences d'IRM peuvent fournir des informations complémentaires sur l'HI. Il est possible de combiner T2, DWI avec une séquence de perfusion ou d'angiographie pour avoir un diagnostic complet le jour de la ligature [18]. Ces séquences permettent de valider l'occlusion de l'artère carotide commune et valider l'inclusion des rats dans l'étude. L'HI provoque une réduction du débit sanguin cérébral visible en imagerie de perfusion et la ligature sera visible en angiographie.

3.2.1. Angiographie

La séquence **TOF-3D-FLASH** est une séquence d'angiographie qui permet de visualiser en hypersignal les vaisseaux sanguins en 3D, avec les caractéristiques suivantes : TE/TR/ 2,2/13 ms, angle de bascule : 15°, FOV 20 x 15 x 20, matrice 256 x 256 x 80, averages 3, épaisseur de la coupe 20 mm correspondant à un temps d'acquisition total de 10 min 59 s. Cette séquence est basée sur les différences d'aimantation longitudinale entre les protons stationnaires et les protons circulants. En effet, la séquence va saturer les protons stationnaires qui vont alors présenter peu ou pas de signal. À l'inverse, les protons circulants dans le sang, qui entrent dans la coupe, n'ont pas été soumis aux impulsions successives et présentent donc une magnétisation longitudinale maximale permettant la visualisation des vaisseaux en hypersignal par rapport aux tissus environnants. Cette séquence permet la visualisation des gros vaisseaux sanguins. La figure 22-A illustre deux images qui ont été obtenues après deux angiographies : l'une pour un raton sham et l'autre pour un raton HIC (3h après la ligature).

3.2.2. Imagerie de perfusion

Une séquence **ASL-perfusion** a été utilisée avec les caractéristiques suivantes : TE/TR 20/9117 ms, correspondant à un temps d'acquisition total de 5 min 37 s. Ce type de séquence représente la microcirculation sanguine des tissus, exprimée en ml/min/100g de tissu et apporte une information sur la perfusion cérébrale. Pour acquérir les images de perfusion, le sang artériel (noyaux d'hydrogène de l'eau intravasculaire) en amont du volume d'intérêt, est marqué grâce à une impulsion de radiofréquence par inversion de l'aimantation. Lors de l'acquisition EPI, le signal mesuré

dans le volume d'intérêt représente l'aimantation de cette région augmentée de l'aimantation du volume sanguin précédemment marqué. Une image sans marquage est aussi acquise. La soustraction des deux images permet de calculer, *in fine*, l'image de perfusion (figure 22-B).

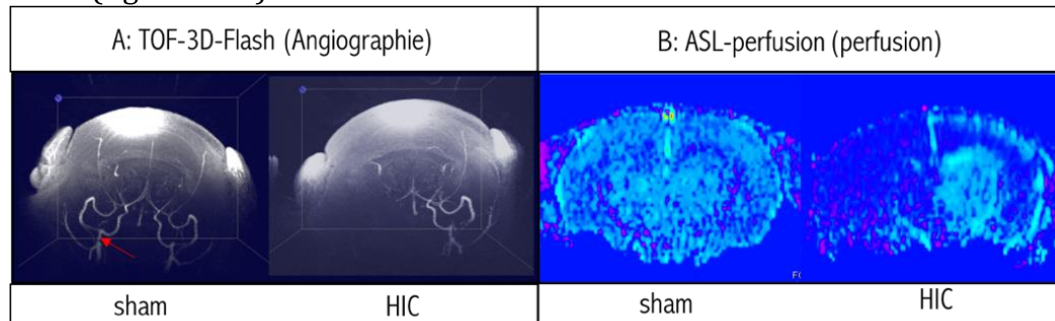


Figure 22: Vérification de la ligature de l'ACC par angiographie et imagerie de perfusion :
 Les imageries (A) par angiographie et (B) perfusion permettent de visualiser l'artère carotidienne commune gauche (sham) ou sa ligature (HIC) et son impact sur la perfusion cérébrale. L'HIC montre un arrêt de la circulation sanguine au niveau de l'artère carotidienne ligaturée du côté de l'hémisphère lésé. La flèche rouge correspond à l'artère carotidienne commune gauche soit l'emplacement de la ligature de la carotide.

Ces deux séquences (Arterial Spin Labeling – perfusion ou ASL-perfusion et Time Of Flight - 3D- Fast Low Angle Shot ou TOF-3D-FLASH) sont des séquences qui nous ont permis de valider la ligature de l'artère carotidienne commune.

4. Les tests de comportement

Dans cette étude différents tests de comportement ont été réalisés tout au long de la croissance des rats. Ces tests ont permis (i) d'évaluer les séquelles liées à l'HI sur les fonctions motrices et cognitives, (ii) de comparer les effets neuroprotecteurs des différentes fenêtres de supplémentation en polyphénols et enfin (iii) de tester la fonctionnalité des structures touchées par l'HI observées par IRM.

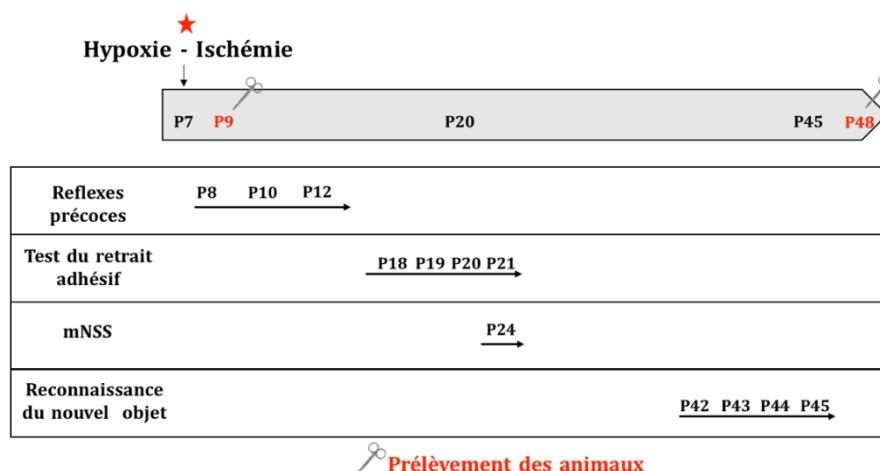


Figure 23: Chronologie du suivi longitudinal par tests comportementaux.
 De P8 à P12 : tests des réflexes précoces (redressement et locomotion). Puis de P18 à P21 : test du retrait adhésif et le modified Neurological Severity Score (mNSS). De P42 à P45 : test de reconnaissance du nouvel objet. Les cerveaux des rats ont été prélevés à P9 et à P48/50 pour les analyses histologique, néonormique et protéomique.

L'ordre chronologique des tests de comportement est présenté figure 23.

4.1. Les réflexes précoces

L'évaluation des réflexes précoces est considérée comme un indicateur fiable du développement postnatal. Le modèle d'HI de Rice et Vannucci entraîne une atrophie cérébrale importante mais, à la différence des nouveau-nés humains, les rats ayant subi une HI ne présentent pas de signes évidents de troubles postnataux. Ils se déplacent et s'alimentent normalement. Ceci est dû à la plasticité cérébrale importante des rats. Le cortex et le striatum sont impliqués dans le contrôle de la motricité c'est pourquoi on utilise les réflexes précoces pour détecter si la motricité est affectée suite aux lésions de ces structures. De plus, ces deux structures sont systématiquement affectées lors du modèle d'HI de type Rice et Vannucci [19].

Deux tests ont permis de caractériser les déficits de motricité automatique des rats (le test du redressement et de la locomotion).

4.1.1. Test du redressement / retournement

Le principe de ce test de redressement est de mettre l'animal dans une situation de déséquilibre pour qu'il puisse retrouver sa position quadrupède normale tout seul. Pour ce test, les rats ont été placés sur le dos sur une couche de feutrine. Le temps nécessaire à l'animal pour se rétablir sur ses quatre pattes a été chronométré. L'exercice a été réalisé 3 fois de suite puis moyenné à P8, P10 et P12.

4.1.2. Test de la locomotion

Le test de locomotion évalue la capacité des rats à se déplacer. Les animaux sont placés au centre de deux cercles de 25 cm et 45 cm de diamètre. Les temps pour sortir les deux pattes avant de chacun des cercles ont été mesurés (temps maximum du test : 60 secondes). L'exercice a été réalisé 1 fois à P8, P10 et P12.

4.2. Évaluation des troubles neurologiques : modified Neurological Severity Score (mNSS)

Le test du mNSS est l'échelle neurologique la plus couramment utilisée dans l'étude des AVC [20]. L'évaluation des troubles neurologiques est faite sur une échelle comprise entre 0 et 18. Le mNSS est un enchainement de tests (tableau 5) évaluant la motricité (état musculaire, déplacements anormaux), le système sensoriel (visuel, tactile ou proprioceptif), les réflexes et l'équilibre (table mNSS). Un point est attribué pour l'incapacité à effectuer la tâche alors qu'aucun point n'est donné lors d'un succès. Le total des points est ensuite calculé pour donner un score à chaque raton (de 0 : aucun atteinte à 18 : déficience totale). Plus le score est élevé, plus les déficits neurologiques liés à l'HI sont importants (0 : aucun atteinte à 18 : déficience totale). Plus le score est élevé, plus les déficits neurologiques liés à l'HI sont importants.

Tableau 5: Table du modified Neurological Severity Score.

Liste des tests faits sur les rats avec des points attribués en fonction des réponses de l'animal.

Table mNSS (modified neurological severity score)

Tests :

Tests moteurs : (/6)

- Rat suspendu par la queue : (/3)
 - Réponse normale, suspension équilibré (0)
 - Pas de flexion patte avant controlatérale (1)
 - Pas de flexion patte arrière controlatérale (2)
 - Déplacement de la tête > 10° par rapport à l'axe vertical en 30 secondes (3)
- Rat par terre : (/3)
 - Réponse normale, marche droit (0)
 - Incapacité à marcher droit (1)
 - Déficit moteur ipsilatéral ou déplacement en cercle (2)
 - Paralysie du coté ipsilatéral ou chute (3)

Test sensoriels : (/2)

- Test de placement : test visuel et tactile : rat à côté du bord de la table avec les vibrisses controlatérales touchant le bord.
 - Réponse normale, patte avec sur la table (0)
 - Pas de réponse de la patte avant (1)
- Test proprioceptif : sensation profonde, pousser les pattes contre le bord de la table pour stimuler les muscles des membres)
 - Réponse normale, résistance à la pression (0)
 - Pas de résistance (1)

Équilibre sur la poutre : rats placés sur une poutre pendant 60 s : (/6)

- Réponse normale : posture équilibré (0)
- Saisit le coté de la poutre (1)
- 1 membre tombe (2)
- 2 membres tombent (3)
- Chute > 40s (4)
- Chute > 20s (5)
- Aucune tentative d'équilibre : chute < 20s (6)

Réflexes absents et mouvement anormaux : (/4)

- Réflexes du pavillon de l'oreille (/1)
 - Réponse normale : secouage de la tête, reflexe pinéale (0)
 - Pas de reflexe (1)
- Réflexes cornéen (/1)
 - Réponse normale : clignement des yeux (0)
 - Pas de reflexe (1)
- Réflexes du sursaut (/1)
 - Réponse normale : sursaut (0)
 - Pas de reflexe (1)
- Observation quotidienne de 5 minutes (/1)
 - Réponse normale (0)
 - Crises, myoclonie ou myodytonie (1)

/18

4.3. La reconnaissance du nouvel objet

Le test de reconnaissance du nouvel objet ou le « Novel object recognition test » (NOR) a été décrit pour la première fois en 1988 par Ennaceur et Delacour et est basé sur l'instinct naturel des rongeurs à explorer la nouveauté [21]. Il permet d'étudier la mémoire déclarative chez les rongeurs et d'évaluer leur capacité à reconnaître un nouvel objet par rapport à un objet familier dans un environnement connu (tendance naturelle des rongeurs à explorer préférentiellement un nouvel élément).

Dans notre cas, ce test est représentatif de la mémoire à long terme car 24h séparent la première exposition aux objets et la seconde exposition (le test s'étale sur 4 jours). Le premier jour, les rats ont été placés dans une enceinte close (50 cm x 50 cm, appelée open field) pendant 10 min : c'est **la phase d'habituation**. Les deux jours suivant, les rats ont été placés dans ce même open field pendant 10 min avec deux objets identiques : c'est **la phase d'apprentissage**. Et le dernier jour (P45), les rats ont été placés dans le même open field mais un des anciens objets a été remplacé par un nouvel objet : c'est **la phase d'expérimentation**. À chaque début d'exposition, les rats ont été placés face à un côté de l'enceinte et à distance égale des deux objets. Une caméra a été placée au-dessus de l'open field afin de pouvoir mesurer par la suite le temps passé sur chaque objet et calculer l'indice de discrimination (I).

$$I = \frac{(\text{temps passé sur le nouvel objet}) - (\text{temps passé sur l'ancien objet})}{(\text{temps passé sur le nouvel objet}) + (\text{temps passé sur l'ancien objet})}$$

Le résultat peut varier entre -1 et +1, où un score positif indique plus de temps passé avec l'objet nouveau, un score négatif indique plus de temps passé avec l'objet familier, et un score nul n'indique aucune préférence (temps réparti de façon égale entre les deux objets). Lors d'une atteinte de l'hippocampe par l'HI, une diminution de l'index a été observée chez les rats dont la lésion touche l'hippocampe. Plus l'index est proche de zéro, plus l'hippocampe est atteint engendrant une altération des fonctions mnésiques.

5. Prélèvements des structures cérébrales et des cerveaux des rats

Des prélèvements de structures cérébrales (cortex, hippocampe et striatum) ont été faits à P9 pour faire des analyses d'expressions géniques et protéiques. Les cerveaux ont également été prélevés à P9 et P48/50 pour réaliser des colorations pour l'histologie. Ces analyses ont été faites i) pour valider les effets connus montrés avec des doses beaucoup plus importantes de polyphénols (antioxydants, anti-apoptotiques, principalement *via* la voie des sirtuines) et ii) pour mettre en évidence une potentielle action des polyphénols sur le métabolisme cérébral (hypothèse posée).

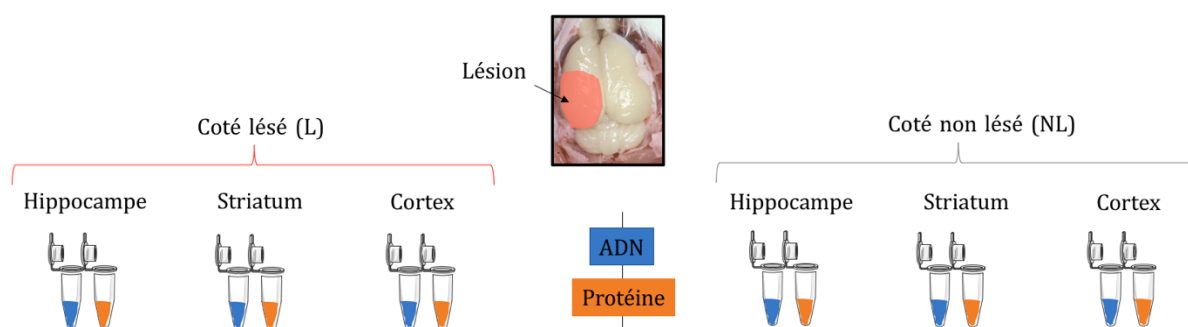
5.1. Prélèvements des structures cérébrales pour les Western blot (WB) et les réactions en chaîne par la polymérase (PCR)

Les rats ont été euthanasiés par décapitation après endormissement profond par injection en i.p. de Kétamine (Imalgene à 100 mg/kg) / Xylazine (Paxman à 20 mg/kg) administrées en dose létale. Tous les prélèvements ont été réalisés avec des gants en nitrile et des cônes adaptés pour la conservation des ARNs (PCR clean Protein Lobing

Tube Eppendorf Dutchers) pour éviter les dégradations. La paillasse où les extractions ont été faites a été au préalable désinfectée avec du RNase Zap® (Thermo Fisher).

5.1.1. Ratons (P9)

Pour les rats à P9, les cerveaux ont été rapidement extraits de la boîte crânienne et posés dans une boîte de pétri sur la glace pour éviter toute dégradation. La face ventrale des cerveaux a été exposée de manière à dérouler le cortex à l'aide d'une pince très fine, nous permettant ainsi de faire apparaître les structures. Le cortex peut être visualisé comme une coquille avec le striatum posé en son centre (boule d'aspect cotonneux) et l'hippocampe, un croissant sur le bord inférieur de cette coquille. L'hippocampe, le cortex et le striatum ont été prélevés pour chaque hémisphère et coupés en deux pour être repartis dans deux tubes Eppendorf (WB et PCR). Au final, 12 échantillons/rat ont été obtenus : 6 pour les WB et 6 pour les PCR avec les trois structures côté lésé (lorsque c'était possible) et les 3 structures côté non lésé comme le résume la figure 24.



5.1.2. Jeunes rats (P48/P50)

Pour le prélèvement sur les jeunes rats, un repère a été réalisé par perçage d'un trou à l'aide d'un foret d'1 mm de diamètre sur le point Bregma (figure 25 : (1) flèche noire = coordonné 0) du crâne. Les cerveaux ont été rapidement extraits et déposés dans une

Figure 24: Récapitulatif des prélèvements de structures par rat

matrice cérébrale de rat dans la glace (2). Des tranches de 2 mm d'épaisseur ont été découpées grâce à 4 lames de rasoir pour obtenir deux tranches bien définies : une située de -0,5 à 1,5 mm de Bregma où se situe le striatum et la seconde de 2,5 à 4,5 mm de Bregma où se trouvent l'hippocampe et le cortex. Une fois les tranches mises à plat dans une boîte de pétri (3) (posée sur la glace), les structures côté gauche (lésé) et droit (non lésé) ont été récupérées et coupées en deux (WB et PCR) et repartis dans des tubes Eppendorf appropriés (cf. figure 24).

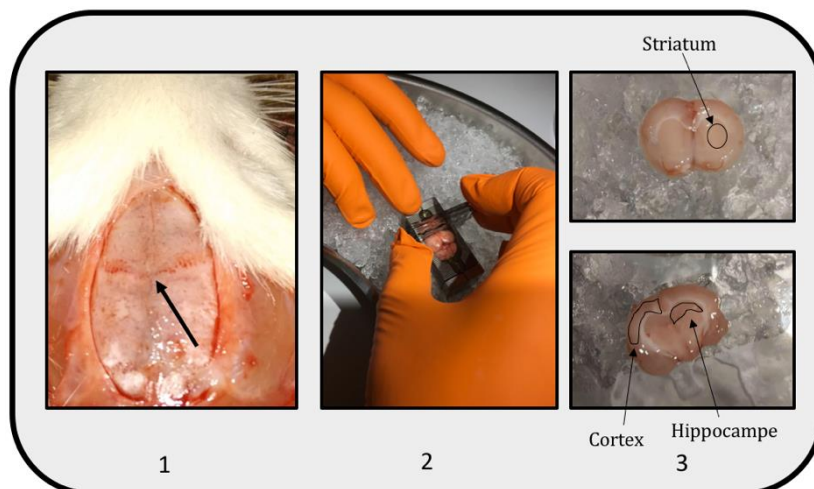


Figure 25 : Étapes de la dissection des structures cérébrales pour les jeunes rats à P48/50.
Les différentes étapes de dissection: 1) localisation du point Bregma, 2) cerveau dans la matrice et 3) découpage des tranches de 2 mm d'épaisseur permettant de visualiser les structures cibles.

Les différentes structures ont été mises dans différents tubes avec des tampons bien définis en fonction des extractions :

- Protéiques (WB) : dans les tubes Eppendorf 1,5 ml avec une solution de RIPA (RIPA Lysis and Extraction buffer 1X Thermo Fischer) avec un cocktail d'inhibiteurs de protéase et de phosphatase (10X Thermo Fischer).
- Nucléaires (RT-qPCR) : dans des tubes Eppendorf PCR clean de 1,5 ml avec une solution de stabilisation qui permet de préserver les ARNs (RNA later Qiagen 10 µl de solvant pour 1mg de tissu au minimum).

Après une nuit, le RNA later a été enlevé et tous les échantillons ont été placés à -80°C avant d'être transportés en Suisse.

5.2. Histologie

Après endormissement par inhalation d'isoflurane (4 %), les rats ont été euthanasiés par injection en i.p. de Kétamine (Imalgene à 100 mg/kg) / Xylazine (Paxman à 20 mg/kg). Les rats ont été positionnés sur le dos, une légère incision en boutonnière a été réalisée afin d'ouvrir l'abdomen. Le diaphragme a été perforé afin de visualiser le cœur. Le cœur doit continuer de battre afin d'assurer une bonne perfusion. Un cathéter a été placé dans le ventricule gauche du cœur et l'oreillette droite a été sectionnée pour libérer l'excès de tampon. **Une solution de tampon phosphate salin** a été perfusée (PBS 1X, 18 ml/h, 10min) à l'aide d'une pompe péristaltique, suivie par la perfusion d'**une solution de paraformaldéhyde** permettant de fixer les tissus (PFA 4 %, 18 ml/h pendant 10 min). Le PFA crée des liaisons covalentes entre les protéines ce qui entraîne la fixation du tissu, permettant une conservation de la localisation des protéines et stoppant

également le métabolisme. Une bonne perfusion induit un jaunissement du foie et un blanchissement des poumons. Les cerveaux ont ensuite été prélevés et immergés dans du PFA (4 %, 2h), puis dans du sucrose (20 % pendant 24h, puis 30 % pendant 24h) pour protéger l'intégrité des structures lors de la congélation. Les cerveaux ont été ensuite congelés dans les vapeurs d'azote, enveloppés avec du parafilm et stockés à -80°C jusqu'à leur envoi en Suisse.

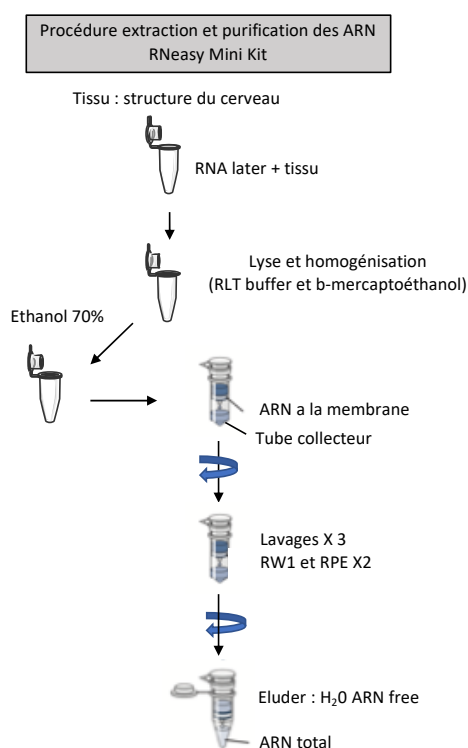
6. Analyses moléculaires

6.1. RT-qPCR

Cette technique permet de cloner rapidement et d'amplifier la séquence d'une région d'acides nucléiques bien définie. Elle permet d'obtenir un très grand nombre de copies d'une séquence d'ADN choisie (par des amorces). C'est une méthode très sensible et utilisée en routine au laboratoire. La technique de RT-qPCR s'est très vite imposée comme une méthode de choix dans la quantification et l'amplification des séquences cibles [22].

6.1.1. Extraction et purification des ARNs :

Les ARNs totaux des échantillons ont été extraits à partir d'un kit (RNeasy Mini Kit Qiagen) conçu pour la purification d'ARNs issus de tissus (figure 26). Les extractions ont été effectuées sur de la glace, dans des conditions ARN-free (sans ARNase).



Les échantillons ont été homogénéisés et broyés avec une solution de lyse (RLT buffer Qiagen) et de β -mercaptoéthanol. Après centrifugation (3 min / 16 000 g), les surnageants ont été mélangés avec 350 μ l d'éthanol 70 % pour précipiter les ARNs et ont ensuite été transférés dans les colonnes de filtration (RNeasy Spin column). Les ARNs se fixent dans la membrane de la colonne. Après une centrifugation (1 min / 8 800 g) et plusieurs lavages, les ARNs ont été élués dans 30 μ l d'eau ARN free.

Figure 26: Protocole d'extraction et purification des ARNs

6.1.2. Dosage des ARNs

Les ARNs ont été dosés à l'aide du NanoDrop® 1 000. Le NanoDrop est un spectromètre à micro volume (0,5 – 2 µl) qui permet de faire des quantifications simples et rapides pour les ADNs, ARNs et protéines. Il possède un spectre d'absorbance très large. Le blanc a été réalisé avec 1 µl d'eau ARN free. Les ARNs ont été dosés à partir d'1 µl d'échantillon. La lecture a été effectuée à une longueur d'onde d'absorbance de 260 nm (A_{260}) avec 40 µg/ml par unité d'absorbance.

6.1.3. Élaboration des ADNc (reverse transcriptase : RT)

Le protocole MultiScribe Reverse Transcriptase (RT) permet de passer des ARNs aux ADNc en utilisant deux mélanges réactionnels. Les ARNs ont été dilués dans des microtubes pour obtenir à une concentration finale de 200 ng/µl. Les ARNs et les mélanges réactionnels spécifiques au protocole ont été incubés dans un thermocycleur. Deux cycles ont été réalisés (1^{er} cycle : 10 min à 65°C, 2^{ème} cycle : 10 min à 25°C, 45 min à 48°C et 5 min à 95°C). À la fin de la RT, les ADNc ont été dilués pour obtenir une concentration finale de 4 ng/µl. Les PCR quantitatives ont été réalisées avec 0,4 ng/µl d'ARN en suivant le protocole du kit SYBR GREEN PCR Master mix.

6.1.4. Sélection des amorces

Avant de débiter les analyses de qPCR, il est important de choisir les bonnes amorces et un bon gène de référence. À l'aide de la littérature, des amorces ont été sélectionnées, basées sur des publications ayant utilisé le même modèle expérimental (HI néonatale ou AVC) et animal (ratons et/ou rats). Le RPS 29 est utilisé comme gène de référence. RPS 29 est une protéine ribosomale codée par le gène RPS29 qui est un composant de la sous-unité 40S des ribosomes. Dans le cas d'une HI néonatale, il est important d'avoir un gène de référence stable, qui ne soit pas affecté en cas de mort cellulaire. Le tableau 6 montre toutes les amorces utilisées dans le chapitre III.

Les amorces ont été remises en suspension dans de l'eau RNase Free afin d'obtenir une concentration finale de 100 µM. Les amorces ainsi dissous ont été diluées au 1/10^e dans des microtubes PCR. Les amorces ont été ensuite testées pour valider leur efficacité avec des plaques PCR de 96 puits et le thermocycleur StepOnePlus™ Real-Time PCR System.

Gene de référence RPS29	GGCTTTTAGGATGGAAGGGAC	TGAAGGTGACAGCAGTCGGTTG
Signalisation P9	Forward 5'-3'	Reverse 5'-3'
SIRT1	CATACTCGCCACCTAACCTAT	AACCTCTGCCTCATCTACATTT
Bcl2	GAGTACCTGAACCGGCATCT	GAAATCAAACAGAGGTCGCA
SOD	GAGCAAGGTCGCTTACAGA	CTCCCCAGTTGATTACATTC
ANLSH P9 et P48/50	Forward 5'-3'	Reverse 5'-3'
MCT1	CTTGTGGCGTGATCCT	GTTTCGGATGTCTCGGG
MCT2	GCTCCGTATGCTAAGGAC	CGATAGTGACGAGCCC
MCT4	GCTGTTTCATCAGGGC	CATAGCCAGCAGGATGGAGG
GLT1	GAGCATTGGTGAGCCAGTATT	GTTCTCATTCTATCCAGCAGCCAG
GLAST	CATCCAGGCCAACGAAACA	GAGTCTCCATGGCCTCTGACA
Na ⁺ K ⁺ ATPase	TGTGATTCTGGCTGAGAACG	CAAGTCAGCCCACTGCACTA
Plasticité Synaptique P48/50	Forward 5'-3'	Reverse 5'-3'
NR1	GCTGGGATTTTCCTCATTTTC	GGGCTCTGCTCTACCACTCTT
NR2a	AGGACAGCAAGAGGAGCAAG	ACCTCAAGGATGACCGAAGA
Synaptophysine	GCATTCTCAGCCCCCTATCT	AGGTCTGGTTCCTTCCTGT
Synapsine	GTCATCGACGAGCCGCACAC	CCACGGAGAARCCACCATTGGC

Tableau 6: Liste des amorces utilisées.

RPS29 est utilisé comme gène de référence pour toutes les PCR.

SIRT1, Bcl2 et SOD : amorces de la signalisation cellulaire utilisées sur les échantillons à P9.

MCT1, MCT2, MCT4, GLT1, GLAST, Na⁺K⁺ATPase : amorces pour étudier l'impact des polyphénols sur le métabolisme cérébral et plus particulièrement sur les gènes liés à l'ANLS.

NR1, NR2a, synaptophysine et synapsine : amorces pour la plasticité synaptique.

6.1.5. Analyse de la PCR quantitative (qPCR)

L'évaluation de la quantité de la séquence cible se fait à l'aide d'un paramètre important : le Cycle Threshold ou CT. Le CT correspond au seuil de fluorescence pour chaque échantillon. C'est une valeur numérique et spécifique à chaque échantillon. Il a été déterminé une fois par l'opérateur et reste le même pendant toute l'expérimentation. Le SYBR Green est un intercalant ADN non spécifique le plus couramment utilisé au cours des analyses de qPCR. C'est une cyanine asymétrique qui se lie de manière non systématique. Les qPCR ont été faites avec des plaques de 96 puits sur la PCR StepOnePlus™ Real-Time PCR System. Pour chaque couple d'amorces, un CT a été défini sur Software v2.3 StepOne. Toutes les données ont été rapportées par rapport aux shams et analysées sur GraphPad Prism 7.00.

6.2. Western blot

La méthode du Western blot est une technique de biologie moléculaire qui permet la détection et la quantification de protéines spécifiques sur une membrane. Cette détection se fait à l'aide d'anticorps spécifiques dirigés contre les protéines d'intérêts.

6.2.1. Extraction des protéines

Les échantillons ont été broyés et homogénéisés puis placés à 4°C pendant 1 h avec une agitation de 16 rpm. Après agitation, ils ont été soniqués et centrifugés à 16 000 g pendant 20 min. Les surnageants ont été prélevés et conservés à -20°C jusqu'à utilisation (figure 27). Toutes ces étapes ont été réalisées sur glace ou à 4°C pour éviter toute dégradation des protéines.

Procédure extraction et purification des protéines

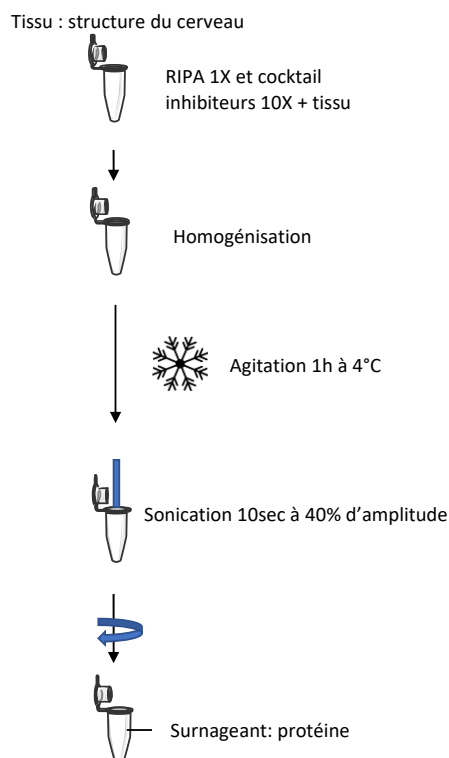


Figure 27 : Procédure d'extraction des protéines

Descriptif de l'extraction des protéines. Les tissus ont été homogénéisés dans une solution de RIPA, puis soniqués et centrifugés.

6.2.2. Dosage des protéines

Les protéines ont été dosées à l'aide d'un kit (ThermoScientific Pierce™ BCA Protein Assay). C'est un kit colorimétrique de haute sensibilité. En milieu alcalin, les protéines réduisent le Cu^{2+} en Cu^+ et le sel de l'acide bicinchoninique (BCA) forme un complexe coloré mesurable à 562 nm avec les ions Cu^+ . La réduction du Cu^{2+} par les liaisons peptidiques des protéines prend une couleur violette : plus il y a de violet plus la proportion en protéine est importante dans l'échantillon. La méthode BCA permet de doser une large gamme de concentrations (20 à 2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Le protocole suivant a été utilisé pour la quantification.

Avant chaque Western blot, les échantillons ont été dilués avec de l'eau pure à une concentration finale de 10 μg . Les protéines ont ensuite été dénaturées par ajout de 2,5 μl

β -mercaptoéthanol et 12,5 μ l de tampon Lammeli X4 (X4 Lammeli Sample Buffer Bio Rad) (1:10 pour chaque échantillon fait en duplicat).

6.2.3. Les différentes étapes du Western blot

6.2.3.1. Préparation du gel et migration

Des gels à 10 % d'acrylamide ciblant les protéines de 15-100 kDa ont été préparés. Le gel de séparation a été coulé entre les 2 plaques et de l'éthanol 70 % a été ajouté en surface pour le linéariser. Quelques minutes après, le gel d'empilement a été coulé et un peigne 10 puits a été rapidement inséré. Le dispositif avec les gels polymérisés a été ensuite installés dans la cuve d'électrophorèse et immergés dans un tampon de migration (1995 ml de TBT-T 1X et 5 ml de Sodium Dodécysulfate (SDS) 5 %) puis 30 μ l d'échantillon ont été déposés dans chaque puit. La migration permet la séparation des protéines en fonction de leurs poids moléculaires sous l'effet d'un champ électrique. Dans le premier puit, 2 μ l d'un mélange de protéines marquées servant d'échelle de poids moléculaires (PageRuler Prestained Protein Ladder, ThermoFisher) ont été déposés.

6.2.3.2. Transfert sur membrane de nitrocellulose

Après migration, les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose, à l'aide d'un système de transfert sec (Trans-Blot® Turbo transfer System Bio Rad). Les protéines étant chargées négativement, elles migrent vers l'anode (pôle +) et adhèrent ainsi à la membrane.

Au préalable, la membrane et les filtres ont été imbibés dans une solution de transfert (12 ml TBT-T 1X, 40 ml éthanol absolu et 40 ml solution de transfert (Trans-Blot Turbo 5X Transfer Buffer, Bio Rad) pour l'équilibration ionique. Puis les gels, la membrane et les filtres ont été disposés en sandwich (socle de la cassette, filtre 1, membrane, gel, filtre 2 puis couvercle de la cassette) et installés dans le système.

Une fois le transfert terminé, les membranes ont été rincées à l'eau et immergées dans une solution de Memcode™ Stain sous agitation permettant de visualiser les protéines en bleu turquoise. Le MemCode (MemCode™ Reversible Protein Stain Kit, Thermo Scientific) permet de détecter de manière sensible la totalité des protéines présente dans l'échantillon déposé. C'est une coloration réversible faite sur les membranes de nitrocellulose afin de valider l'efficacité du transfert et de contrôler que les échantillons sont quantitativement équivalents les uns des autres. Une image de la membrane a ensuite été obtenue au chemiDoc™ (Bio Rad) sur Image Lab en lumière blanche (chemi white 1 X 1). Le MemCode est utilisé pour colorer l'ensemble des protéines et permettre de les quantifier. Les membranes ont ensuite été rincées avec une solution de décoloration (Memcode™ Stain eraser) jusqu'à disparition des traces.

6.2.4. Anticorps I et II

L'utilisation d'anticorps permet de détecter spécifiquement une protéine d'intérêt. Les membranes ont été placées dans une solution de blocage (TBST-1 1 % lait / 0,1 % de BSA) pendant 1h, sous agitation lente, à température ambiante. Les membranes ont ensuite été incubées avec l'anticorps primaire toute la nuit, sous agitation, à 4°C. Après rinçages, les membranes ont été incubées avec un anticorps secondaire anti-rabbit Donkey (IgG Donkey Polyclonal antibody HRP, VWR, Cytiva) pendant 2 heures à température ambiante.

6.2.4.1. Sélection des anticorps

Nous avons ciblé en priorité les protéines impliquées dans l'ANLS (tableau 4), les voies de signalisation étant déjà connues. L'analyse de ces gènes a été réalisée sur les cerveaux prélevés à P9 sur les cortex (côtés lésés et non lésés), le cortex étant la structure la plus vulnérable à l'HI.

Anticorps	Sources	Identifier
Rabbit anti-MCT1	Homemade	Riderer Characterized in Pierre et al. (2000)
Rabbit anti-MCT2	Homemade	Riderer Characterized in Pierre et al. (2000)
Rabbit anti-LDHa	Cell signaling	2012S
Rabbit anti-LDHb	Sigma-Aldrich	AV48210
Rabbit anti-GLAST	Abcam	ab416

Tableau 7: liste des anticorps primaires utilisés

6.2.4.2. Révélation des membranes

La révélation a été réalisée avec un kit Sirius (Pierce™ Sirius Western Blotting Substrate, ThermoFisher). Un substrat chimio-luminescent tel que l'ECL (enhancer chemiluminescent) réagit avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase de raifort (HRP) et produit un signal visible sur film. Les membranes ont été lues dans le ChemiDoc™ (Bio Rad).

6.2.4.3. Quantification des protéines

La quantification des protéines a été réalisée à l'aide du logiciel Image Lab, en calculant le nombre de pixel pour chacune des bandes apparentes. Ces valeurs ont été comparées avec les valeurs du Memcode et calculées en pourcentage en fonction du groupe sham. C'est une coloration réversible de l'intégralité des protéines présentes, utilisée comme référence.

6.3. Coloration de Nissl

À P9, les cerveaux des rats (n=3 par condition) ont été prélevés après perfusion trans-cardiaque (PBS suivi de PFA 4 %) et cryocongelés. Des coupes de 16 µm ont été réalisées au cryostat et ont été colorées avec 0,5 % de crésyl violet (Sigma-Aldrich, France) pendant 5 min et lavées avec de l'eau distillée pendant 10 s. Les coupes ont ensuite été déshydratées dans 70, 95 et 100 % d'éthanol pendant 2 min et dégraissées par un bain de xylène (1 min). Les lames ont été montées avec un milieu de montage (mounting medium, Sigma-Aldrich, Allemagne). Les coupes ont ensuite été observées avec un microscope optique Leica *microsystems* (Leica STP6000) au niveau des structures du cortex et du striatum. Des images à un grossissement X 20, taille du champ 2,2 mm et les noyaux ont permis un comptage cellulaire à l'aide du logiciel Image J.

7. Analyses statistiques

L'analyse statistique et les graphiques ont été réalisés à l'aide du logiciel GraphPad Prism 7.00. Toutes les données ont été exprimées sous forme de moyenne $\pm$ erreur standard à la moyenne (e.s.m). Le nombre de rats est indiqué pour chaque expérience dans les légendes des figures. La significativité statistique des différences entre les groupes a été déterminée à l'aide du test ANOVA suivi d'un test post-hoc du LSD de Fisher. La significativité statistique a été définie comme $P < 0,05$.

8. Bibliographie

1. Rice, J.E., 3rd, R.C. Vannucci, and J.B. Brierley, *The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat*. Ann Neurol, 1981. **9**(2): p. 131-41.
2. Gidday, J.M., et al., *Neuroprotection from ischemic brain injury by hypoxic preconditioning in the neonatal rat*. Neurosci Lett, 1994. **168**(1-2): p. 221-4.
3. Edwards, A.B., et al., *Modification to the Rice-Vannucci perinatal hypoxic-ischaemic encephalopathy model in the P7 rat improves the reliability of cerebral infarct development after 48 hours*. J Neurosci Methods, 2017. **288**: p. 62-71.
4. J, V., *Hypoxic-ischemic encephalopathy: neuropathology and pathogenesis*. Neurology of the Newborn, 1995: p. 279-313.
5. Zhou, Y., et al., *Isoflurane posttreatment reduces neonatal hypoxic-ischemic brain injury in rats by the sphingosine-1-phosphate/phosphatidylinositol-3-kinase/Akt pathway*. Stroke, 2010. **41**(7): p. 1521-7.
6. Sanches, E.F., et al., *Effects of pre- and postnatal protein malnutrition in hypoxic-ischemic rats*. Brain Res, 2012. **1438**: p. 85-92.
7. Zhu, C., et al., *Different apoptotic mechanisms are activated in male and female brains after neonatal hypoxia-ischaemia*. J Neurochem, 2006. **96**(4): p. 1016-27.
8. Ashwal, S., et al., *Comparison of two neonatal ischemic injury models using magnetic resonance imaging*. Pediatr Res, 2007. **61**(1): p. 9-14.
9. Saliba, E. and T. Debillon, *[Hypothermia for hypoxic-ischemic encephalopathy in fullterm newborns]*. Arch Pediatr, 2010. **17 Suppl3**: p. S67-77.
10. Laptook, A., et al., *Elevated temperature after hypoxic-ischemic encephalopathy: risk factor for adverse outcomes*. Pediatrics, 2008. **122**(3): p. 491-9.
11. Matsui, Y., et al., *Extract of passion fruit (Passiflora edulis) seed containing high amounts of piceatannol inhibits melanogenesis and promotes collagen synthesis*. J Agric Food Chem, 2010. **58**(20): p. 11112-8.
12. Savage, D.D., et al., *Dose-dependent effects of prenatal ethanol exposure on synaptic plasticity and learning in mature offspring*. Alcohol Clin Exp Res, 2002. **26**(11): p. 1752-8.
13. Anisimova, N.Y., et al., *Trans-, cis-, and dihydro-resveratrol: a comparative study*. Chem Cent J, 2011. **5**: p. 88.
14. Dumont, U., et al., *Maternal consumption of piceatannol: A nutritional neuroprotective strategy against hypoxia-ischemia in rat neonates*. Brain Res, 2019. **1717**: p. 86-94.
15. Rumpel, H., et al., *Late glial swelling after acute cerebral hypoxia-ischemia in the neonatal rat: a combined magnetic resonance and histochemical study*. Pediatr Res, 1997. **42**(1): p. 54-9.
16. Morken, T.S., et al., *Brain development after neonatal intermittent hyperoxia-hypoxia in the rat studied by longitudinal MRI and immunohistochemistry*. PLoS One, 2013. **8**(12): p. e84109.
17. Robinson, S., et al., *Neonatal erythropoietin mitigates impaired gait, social interaction and diffusion tensor imaging abnormalities in a rat model of prenatal brain injury*. Exp Neurol, 2018. **302**: p. 1-13.
18. Meng, S., et al., *Evolution of magnetic resonance imaging changes associated with cerebral hypoxia-ischemia and a relatively selective white matter injury in neonatal rats*. Pediatr Res, 2006. **59**(4 Pt 1): p. 554-9.
19. Andrea Lubics, D.R., Andrea Tamas, Peter Kiss, Milan Szalai, Luca Szalontay, Istvan Lengvari, *Neurological reflexes and early motor behavior in rats subjected to neonatal hypoxic-ischemic injury*. Behavioural Brain Research, 2004. **157**: p. 157-165.
20. Morris, D.C., et al., *Thymosin beta4 improves functional neurological outcome in a rat model of embolic stroke*. Neuroscience, 2010. **169**(2): p. 674-82.
21. Ennaceur, A. and J. Delacour, *A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data*. Behav Brain Res, 1988. **31**(1): p. 47-59.
22. Chelly, J., et al., *Transcription of the dystrophin gene in human muscle and non-muscle tissue*. Nature, 1988. **333**(6176): p. 858-60.

CHAPITRE III : Effet neuroprotecteur d'une supplémentation maternelle en resvératrol dans le cadre de l'hypoxie-ischémie néonatale

Ce chapitre résume la publication « *Neuroprotective effect of maternal resveratrol supplementation in a rat model of neonatal hypoxia-ischemia* » montrant les points clés et les principaux résultats obtenus.

1. Introduction

Le RSV (3,5,4'-trihydroxystilbène) montre depuis des années des propriétés thérapeutiques enthousiasmantes. Comme décrit dans l'introduction, le RSV est un polyphénol de la famille des stilbénoides présent en grande quantité dans les arachides, les fruits rouges et particulièrement dans la peau et les pépins des raisins. D'après la littérature, il possède de nombreuses propriétés anti-inflammatoires [1], antioxydantes [2] et anti-apoptotiques [3]. Plus récemment, des études *in vivo* ont montré ses propriétés thérapeutiques évidentes [4]. Dans le cadre de l'accident vasculaire cérébrale (AVC), ses propriétés lui confèrent un effet neuroprotecteur [5]. En effet, une étude réalisée sur des rats mâles Wistar MCAO a montré qu'une injection intrapéritonéale de RSV (20 mg/kg ; i.p.) permettait de diminuer les volumes lésionnels et d'améliorer les déficits moteurs en diminuant la concentration de EROs [5]. Ces dernières années, plusieurs publications ont montré un effet neuroprotecteur du RSV dans le cadre de l'HI néonatale. Pan *et al.* ont montré que 3 injections de RSV (100 mg/kg en i.p. à 0, 8 et 18h après une HI néonatale (modèle de Rice et Vannucci P7)) ont permis de réduire les volumes lésionnels par une diminution d'au moins 50 % de l'expression génique des marqueurs pro-inflammatoires et pro-apoptotiques (IL-6, IL-1 β , IL-18 et TNF α) et une diminution de 35 % de l'expression protéique des marqueurs pro-apoptotiques (TNF α et bax) [6]. Arteaga *et al.* ont montré que le RSV administré 10 min avant l'HI (20 mg/kg en i.p. sur des ratons ayant subi le même modèle d'HI à P7) a induit une diminution de 70 % de la perte tissulaire provoquée par l'HI couplée à une amélioration des performances comportementales [7]. Ces études montrent les effets neuroprotecteurs du RSV sur le cerveau des nouveau-nés après une HI.

Dans une étude *ex vivo* par spectroscopie RMN sur du foie isolé et perfusé, notre équipe a montré que le RSV pouvait activer la glycolyse [8]. Cette stimulation de la glycolyse induite par le RSV a aussi été démontrée *in vivo* au niveau cérébral [9]. Notre hypothèse est qu'en plus des effets neuroprotecteurs connus du RSV *via* ses propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et anti-apoptotiques, le RSV pourrait aussi jouer un rôle neuroprotecteur *via* une modulation du métabolisme cérébral, plus particulièrement en modulant l'activité de l'ANLS. Le RSV pourrait stimuler la glycolyse astrocytaire et permettre ainsi d'augmenter la production de lactate. Ce lactate pourrait ensuite être utilisé comme substrat énergétique efficace par les neurones. Nous avons par ailleurs pu montrer que l'injection de lactate après un accident d'HI néonatale était neuroprotecteur [10].

Objectifs de l'étude :

Les objectifs ici sont (i) de valider l'effet neuroprotecteur du RSV dans le cadre de l'HI néonatale *via* une supplémentation maternelle par approche transgénérationnelle et nutritionnelle, (ii) de faire un suivi longitudinal des lésions cérébrales par IRM couplé à une évaluation cognitivo-motrice des rats par des tests de comportement et (iii) de déterminer les diverses cibles du RSV dans le cerveau afin de décrypter les voies de neuroprotection empruntées.

2. Méthodes

Le modèle de Rice et Vannucci est utilisé pour reproduire l'HI néonatale sur les rats P7 (*cf* chapitre II – 1-1-2). La supplémentation maternelle a été réalisée par ajout de RSV (0,15 mg/kg/jour) dans l'eau de boisson des rats, durant différentes fenêtres temporelles.

Sept groupes de rats ont été considérés (figure 28) :

- ◆ **sham** : aucune supplémentation maternelle en RSV et les rats ne subissent pas d'HI.
- ◆ **shamrsv** : RSV dans l'eau de boisson pendant la dernière semaine de gestation + la première semaine de lactation (P-7 à P7).
- ◆ **HIC** : aucune supplémentation maternelle en RSV et HI pour les rats à P7.
- ◆ **rsvGL** : RSV dans l'eau de boisson pendant la dernière semaine de gestation (G) + la première semaine de lactation (L) (P-7 à P7) et HI pour les rats à P7.
- ◆ **rsvG** : RSV dans l'eau de boisson pendant la dernière semaine de gestation (G) (P-7 à P0 : jour de la mise bas) et HI pour les rats à P7.
- ◆ **rsvL** : RSV dans l'eau de boisson pendant la première semaine de lactation (L) (P0 à P7) et HI pour les rats à P7.
- ◆ **rsvC** : HI pour les rats à P7 et RSV dans l'eau de boisson de la ratte pendant une semaine après l'HI (P7 à P14).

Le schéma expérimental résumant l'ensemble des méthodes utilisées sur les différents groupes de rats est présenté dans le chapitre II- 4- figure 23.

L'IRM, méthode non-invasive, permet (i) à court terme de mesurer le volume lésionnel cérébral et d'évaluer la sévérité de l'œdème dans les structures du cerveau (*via* la mesure de l'ADC) et (ii) de faire un suivi longitudinal de l'évolution des volumes lésionnels cérébraux des rats (P7, P9 et P30). Les fonctions cognitives et motrices sont évaluées en parallèle par différents tests de comportement, sensorimoteurs et de mémoire, de P8 à P45 (P8, P10, P12 : test du redressement, à P24 : le test du mNSS et à P45 : le test de la reconnaissance du nouvel objet). L'intégralité des tests est décrite dans le chapitre II-4.

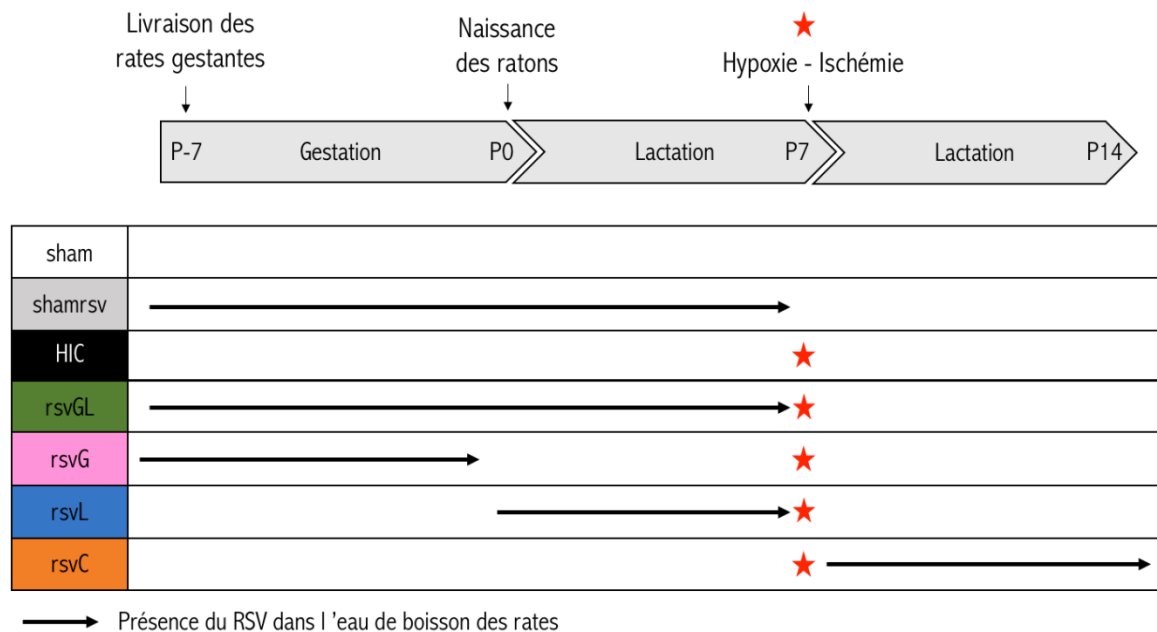


Figure 28 : Récapitulatif des groupes expérimentaux répartis en fonction des fenêtres de supplémentation en RSV.

La complémentarité des méthodes utilisées permet de comparer les données d'IRM (volumes lésionnels et localisation des structures lésées) et de comportement afin de corrélérer les dommages structuraux avec les conséquences fonctionnelles de l'HI néonatale.

À P9 et P48, les biopsies des groupes sham, HIC et rsvGL (cortex, hippocampe et striatum des hémisphères lésés et non lésés) ont été prélevées et analysées par RT-qPCR et WB afin de décrypter les mécanismes neuroprotecteurs mis en jeu. En plus des données publiées, ce chapitre présente des données préliminaires sur l'expression génique chez les animaux à P48 ciblant la plasticité synaptique.

3. Résultats

Le modèle classique de Rice et Vannucci est un modèle reproductible d'HI néonatale sévère et a permis, dans notre étude, d'obtenir des lésions de 42 ± 2 % du volume cérébral total. Ces dommages cérébraux reflètent les lésions typiques obtenues

dans la littérature pour ce modèle d'HI chez le rat sur les nouveau-nés P7 [11]. De plus, l'HI induit une chute d'environ 40 % de l'ADC dans chaque structure où la lésion est présente (diminution de 37 % pour le cortex, 44 % pour l'hippocampe et 43 % pour le striatum). Les valeurs d'ADC reflètent la sévérité de l'œdème. De ce fait, plus l'œdème est sévère, plus les valeurs d'ADC sont basses, traduisant une restriction importante de la diffusion des molécules d'eau extracellulaires. Deux jours après l'accident d'HI, le volume lésionnel diminue de 50 % grâce à la résorption de la zone de pénombre (zone où l'alimentation sanguine est perturbée), période à laquelle les valeurs d'ADC se « pseudo-normalisent ».

La neuroprotection de la supplémentation maternelle en RSV a varié en fonction des fenêtres de supplémentation. À court terme (P7), deux groupes de supplémentation ont montré une neuroprotection plus élevée par rapport aux autres groupes HI : le groupe rsvL et le groupe rsvGL (figure 29). Premièrement, l'IRM a montré que 100 % des rats des groupes HIC, rsvG et rsvC présentaient des lésions cérébrales à P7 alors que l'incidence des lésions était moindre pour les rats des groupes rsvGL et rsvL (80 % et 87 %, respectivement). Deuxièmement, en ne considérant que les rats présentant des lésions, à P7, les volumes lésionnels n'étaient significativement pas différents entre les groupes HIC, rsvG et rsvC (42 ± 2 %, 42 ± 1 % et 41 ± 3 %, respectivement). De façon intéressante, les volumes lésionnels obtenus pour les groupes rsvGL et rsvL étaient 26 % plus faibles par rapport aux autres groupes (33 ± 2 % et 31 ± 3 % du volume du cerveau, respectivement, comparé aux 42 % des autres groupes ; figure 29 A/C). Troisièmement, après l'HI, les valeurs d'ADC au niveau des lésions ont chuté pour tous les groupes. Cependant, cette diminution a été significativement moins importante dans l'hippocampe pour le groupe rsvL (une diminution de 37 % par rapport aux autres groupes où la diminution était de 44 %) et dans le striatum pour les groupes rsvGL et rsvL (diminution de 31 % pour ces deux groupes où la diminution était de 40 % pour les autres groupes). Finalement, les rats du groupe HIC ont été moins performants lors du test du redressement, en comparaison des autres groupes supplémentés. En effet les rats des groupes supplémentés ont mis deux fois moins de temps pour se remettre sur leurs quatre pattes que les rats du groupe HIC (à P8 $2,3 \pm 0,3$ s, $1,0 \pm 0,1$ s, $1,2 \pm 0,1$ s, $1,3 \pm 0,1$ s et $1,2 \pm 0,0$ s pour HIC, sham, rsvGL, rsvL et rsvG, respectivement).

À plus long terme (P30), une régression des volumes lésionnels a été observée pour tous les groupes mais cette régression a été plus marquée pour les groupes rsvGL et rsvC (diminution de 72 % et de 78 % entre P7 et P30, respectivement) par rapport aux autres groupes (diminution de 40 % pour HIC et rsvG et uniquement 24 % pour le groupe rsvL). À P30, les volumes lésionnels n'étaient pas significativement différents entre les groupes rsvGL et rsvC (9 ± 3 % et 9 ± 3 %, respectivement) ni entre les groupes par HIC, rsvG et rsvL (25 ± 4 %, 17 ± 4 % et 25 ± 5 %, respectivement) (Figure 29 B/C). Le mNSS permet de scorer la sévérité des dommages neurologiques. Les rats du groupe HIC ont présenté le score le plus élevé ($3,8 \pm 0,4$) comparé aux autres groupes ($0,6 \pm 0,1$; $1,6 \pm 0,1$; $2,7 \pm 0,3$; $1,7 \pm 0,3$ et $2,5 \pm 0,3$ pour les rats des groupes sham, rsvGL, rsvG, rsvL et rsvC,

respectivement), traduisant ainsi un déficit cognitif et moteur plus important pour ce groupe. Parmi les groupes supplémentés en RSV, les rats des groupes rsvGL et rsvL ont présenté les meilleurs résultats (figure 29 D). En ce qui concerne le test de reconnaissance du nouvel objet, permettant d'évaluer la mémoire à long terme hippocampo-dépendante, les rats des groupes HIC et rsvG ont montré un indice de discrimination significativement plus faible que les autres rats (indice de discrimination (I) : $0,47 \pm 0,06$ et $0,48 \pm 0,04$ pour les groupes HIC et rsvG, respectivement, contre $0,76 \pm 0,02$; $0,66 \pm 0,04$ et $0,64 \pm 0,05$ pour les groupes sham, rsvGL et rsvL, respectivement). Aucune différence significative n'a été mesurée entre les groupes sham, rsvGL et rsvL, témoignant d'une récupération complète de la fonction mnésique.

L'ensemble des données obtenues a montré que ce sont les rats du groupe rsvGL qui ont présentés la meilleure neuroprotection comparé aux autres groupes, à court terme, comme à long terme. Ce groupe a donc été utilisé pour l'analyse d'expression génique et protéique permettant d'identifier les mécanismes neuroprotecteurs induits par la supplémentation maternelle en RSV.

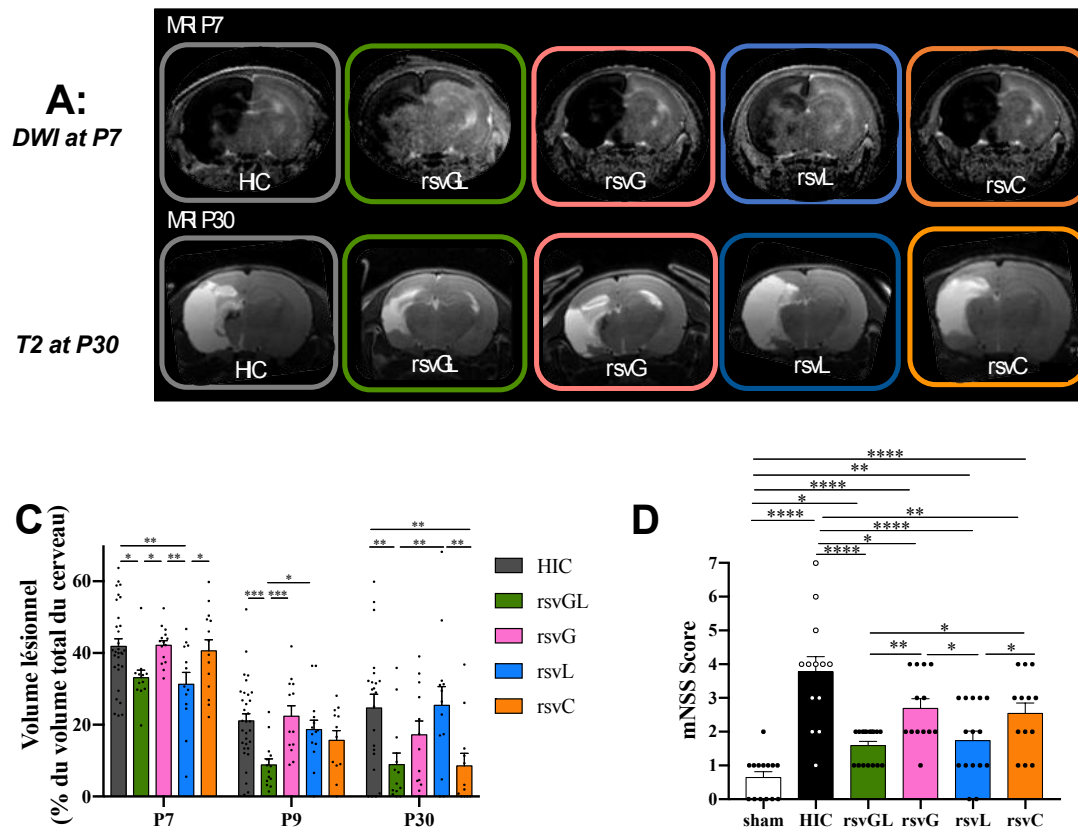


Figure 29: Effet neuroprotecteur à court et long terme d'une supplémentation maternelle en RSV après un accident d'HI à P7.

(A) Imagerie de diffusion (trace inversée) à P7 pour les rats 3h après la ligation de l'artère carotide commune gauche. La lésion apparaît en hyposignal pour chacun des groupes (HIC, rsvGL, rsvG et rsvL). (B) IRM (T2) des lésions 23 jours après l'accident d'HI montrant la lésion en hypersignal. (C) Quantification des volumes lésionnels pour chaque groupe en fonction du temps (P7, P9 et P30) calculés en % du volume total du cerveau. (D) Score du mNSS permettant d'estimer les séquelles neurologiques; plus le score est élevé plus les fonctions motrices et cognitives sont altérées. Les différences statistiques ont été définies comme $p < 0,05$ (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ et **** $p < 0,0001$).

Les analyses d'expression génique ont permis de mettre en évidence les voies de signalisations modulées par le RSV. En effet, à court terme (P9), la supplémentation maternelle en RSV a induit une augmentation de l'expression de SIRT1 (voie des sirtuines), Bcl2 (voie anti-apoptotique) et SOD2 (voie antioxydante) au niveau des hémisphères lésés et non-lésés.

Dans cette publication, l'impact de la supplémentation maternelle en RSV sur le métabolisme cérébral des rats, et plus particulièrement sur l'ANLS, a été mis en évidence (figure 30 A). L'expression des gènes suivants a été quantifiée : MCT1, MCT2, LDHa, LDHb, GLT1, GLAST et la sous-unité $\alpha 2$ de Na^+/K^+ ATPase. L'expression des ARNm dans le groupe HIC a diminué significativement pour MCT2, LDHa, LDHb et GLT1 au niveau du cortex lésé ($-80 \pm 5 \%$, $-41 \pm 5 \%$, $-39 \pm 6 \%$ et $-70 \pm 2 \%$, respectivement) alors qu'aucune différence significative n'a été observée du côté non lésé. De manière intéressante, la supplémentation a permis de restaurer des niveaux d'expressions identiques aux shams pour LDHa et LDHb ou une restauration partielle pour MCT2 et GLT1 du côté lésé. Du même côté, la supplémentation maternelle en RSV a permis aussi d'augmenter l'expression de GLAST. Au niveau cortical de l'hémisphère non lésé, le RSV a permis d'augmenter significativement l'expression de MCT1, LDHa, GLAST, GLT1 et $\alpha 2$ de la Na^+/K^+ ATPase ($+31 \pm 11 \%$, $+27 \pm 8 \%$, $+30 \pm 6 \%$ et $+28 \pm 2 \%$, respectivement) et une tendance à augmenter pour MCT2 et LDHb.

Les données obtenues par WB n'étaient pas toujours corrélées avec les variations mesurées par RT-qPCR. L'HI a diminué significativement l'expression protéique de MCT2 et LDHa ($-84 \pm 4 \%$ et $-60 \pm 7 \%$) et une tendance à diminuer l'expression de GLAST ($-46 \pm 1 \%$) au niveau du cortex côté lésé. La supplémentation maternelle en RSV a permis de contrecarrer ces diminutions pour MCT2 et GLAST uniquement. Dans l'hémisphère non lésé, l'HI a provoqué une chute de l'expression de LDHa qui n'a pas été évitée en présence du RSV. Par contre, une augmentation significative de l'expression de LDHb et GLAST a été mesurée en présence du RSV.

Les analyses histologiques ont permis de montrer que l'accident d'HI a provoqué une mort neuronale importante dans le cortex ipsilatéral ($81 \pm 4 \%$) (figure 30 B et C). Aucune mort neuronale n'a pu être mise en évidence pour le groupe rsvGL (différence non-significative avec le groupe sham).

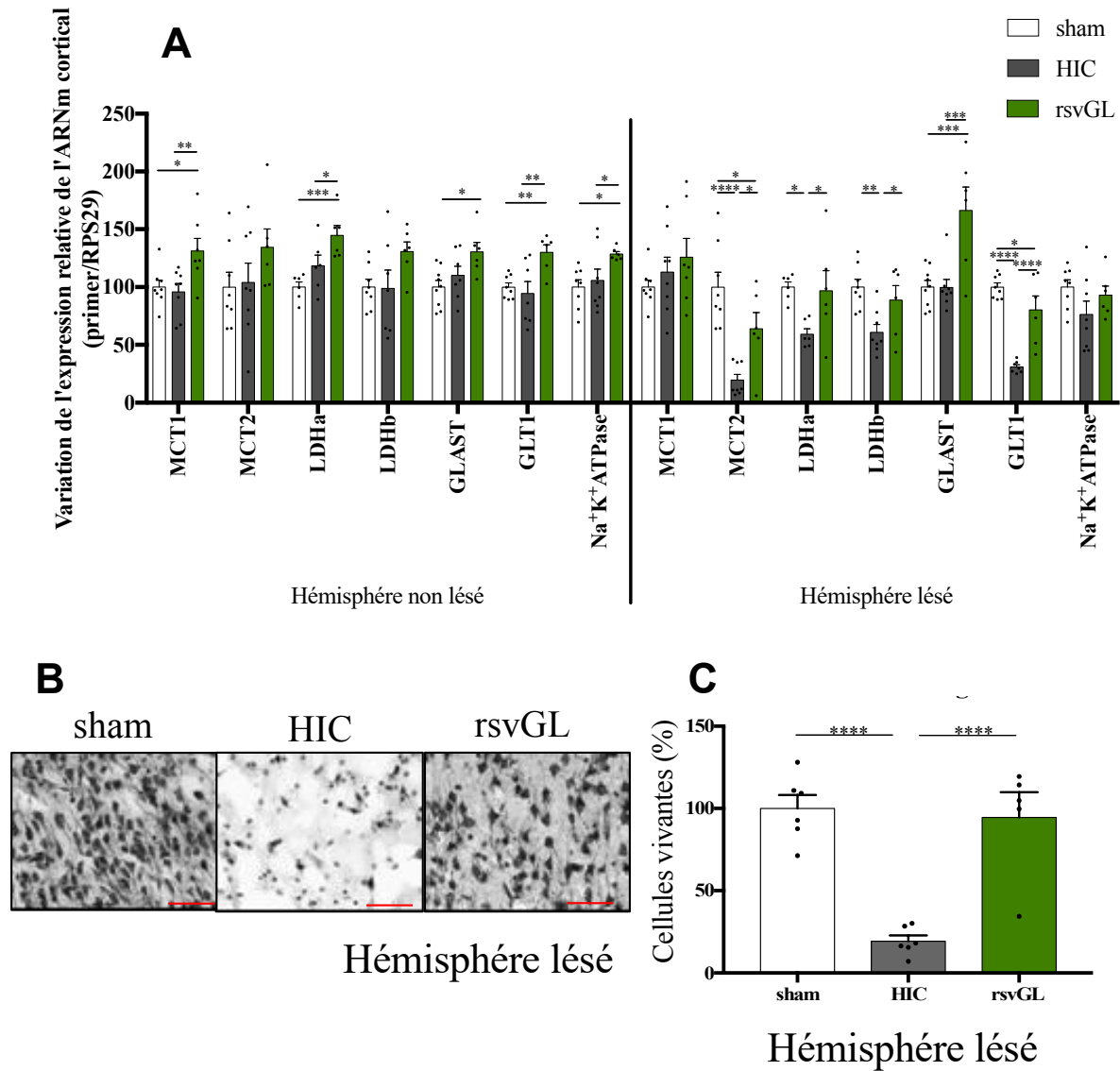


Figure 30 : Impact de la supplémentation maternelle en RSV sur l'expression génique corticale et sur l'histologie du cerveau des nouveau-nés, 48h après l'HI.

(A) RT-qPCR réalisée à P9 sur les cortex lésés et non-lésés des groupes sham, HIC et rsvGL. Les gènes ciblés sont en lien avec l'ANLS : MCT1, MCT2, LDHa, LDHb, GLAST, GLT1 et Na^+/K^+ ATPase. (B) Coloration au crésyl violet du cortex lésé (ipsilatéral) 48h après l'HI pour les groupes sham, HIC et rsvGL. Échelle 100 μm . (C) Pourcentage des cellules vivantes pour les groupes sham, HIC et rsvGL. Les différences statistiques ont été définies comme $p < 0,05$ (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ et **** $p < 0,0001$).

À plus long terme, les expressions d'ARNm de gènes impliqués dans la plasticité synaptique et des sous-unités du récepteur NMDA ont été mesurées afin d'évaluer l'adaptation des neurones après une HI et après une supplémentation maternelle en RSV (figure 31). Au niveau du cortex lésé, l'accident d'HI a provoqué une diminution de l'expression corticale de la synapsine, de la synaptophysine et de la sous-unité NR1 du récepteur NMDA (-54 %, -45 % et -53 % pour la synapsine, la synaptophysine, et NR1, respectivement). Les expressions d'ARNm des différents gènes considérés n'ont pas été impactées par l'HI pour le groupe rsvGL (pas de différence significative avec le groupe sham) sauf pour la sous-unité NR1 où la supplémentation en RSV n'a pas permis de contrecarrer la chute.

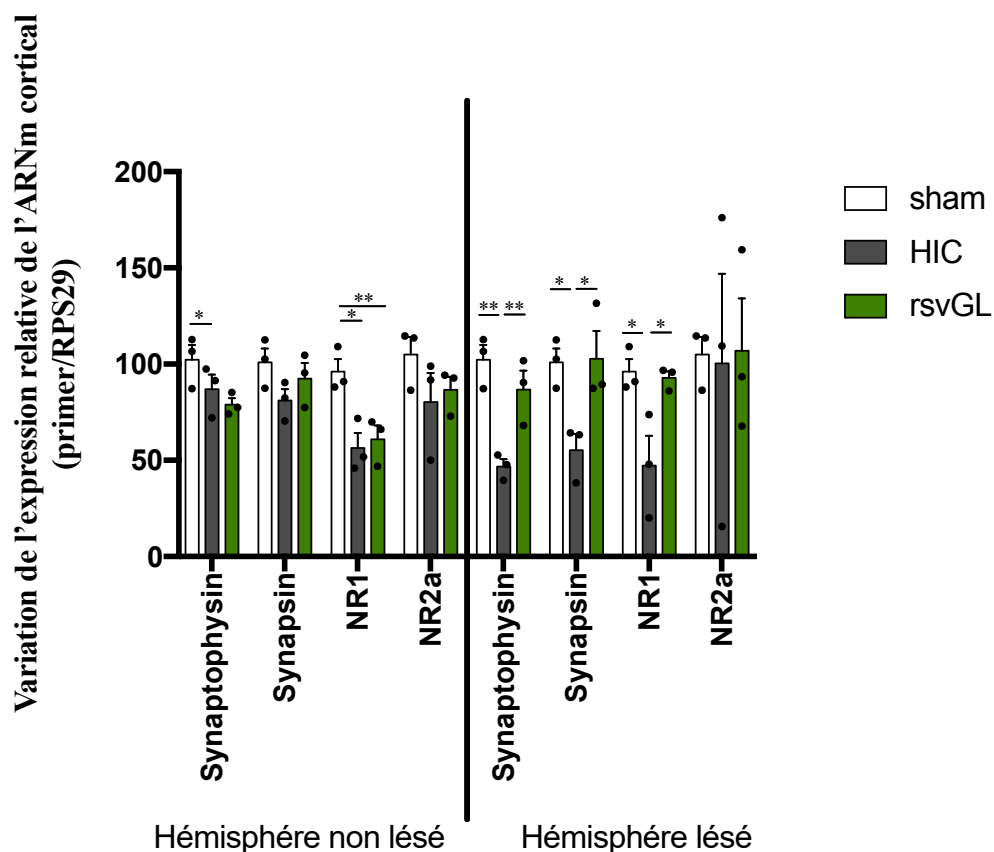


Figure 31: Expression de l'ARNm des gènes impliqués dans la plasticité synaptique et du récepteur NMDA.

RT-qPCR réalisées à P48 sur les cortex lésés et non-lésés des groupes sham, HIC et rsvGL. Les gènes principalement ciblés sont liés à la plasticité synaptique : synaptophysine et synapsine (protéines pré-synaptiques) et les sous-unités du récepteur NMDA : NR1 et NR2a (protéines post-synaptiques). Les différences statistiques ont été définies comme $p < 0,05$ (* $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$).

4. Discussion

L'HI néonatale est une cause majeure de décès chez les nouveau-nés (1-8 ‰). Les mécanismes induits par l'HI sont bien décrits dans la littérature et impliquent de nombreuses cascades biochimiques affectant le cerveau [12]. L'HI conduit à une défaillance énergétique engendrant de nombreux dommages (stress oxydatif, inflammation, mort cellulaire). Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à l'effet du RSV sur l'HI dans des conditions particulières et différentes des études déjà réalisées. À la différence des autres études, nous avons utilisé un mode d'administration transgénérationnelle, c'est-à-dire que c'est la mère qui ingère le RSV et ce sont les effets sur ses petits après un accident d'HI à P7 qui sont étudiés. De plus, nous avons utilisé des doses nutritionnelles de RSV (0,15 mg/kg/jour), ce qui correspond à une consommation entre 1,1 kg et 22 g de raisin (peau et pépins compris) par jour pour une femme enceinte [13].

À court terme, une neuroprotection a été mise en évidence pour les groupes rsvGL et rsvL ce qui suggère que la présence du RSV au moment de l'accident est un facteur déterminant pour assurer la meilleure neuroprotection face aux effets délétères de l'HI. Nous avons porté un intérêt tout particulier au groupe **rsvGL** qui présentait (i) une incidence des lésions plus faible, (ii) des lésions plus petites et (iii) des dysfonctionnements moteurs et cognitifs plus légers, par rapport aux autres groupes HI. Des résultats similaires ont été obtenus dans une autre étude réalisée dans notre équipe avec le PIC, analogue du RSV [14].

Les analyses géniques et protéiques ont permis de valider que la neuroprotection est en lien avec les voies de signalisation connues du RSV *via* l'activation de SIRT1, produisant des actions anti-apoptotiques et antioxydatives. En effet, la supplémentation maternelle de RSV a permis d'augmenter, chez les rats ayant subi une HI à P7, l'expression de SIRT1, Bcl2 et SOD. Mais l'idée principale était de montrer que le RSV pouvait moduler également le métabolisme cérébral et plus particulièrement avoir un effet sur l'ANLS, découverte en 1994 par deux grands chercheurs © [15]. De nombreux éléments cellulaires sont impliqués dans cette navette. Notamment les MCTs qui permettent de transporter le lactate des astrocytes aux neurones et les transporteurs du glutamate (GLT1 et GLAST) qui sont impliqués dans la recapture du glutamate par les astrocytes pour limiter l'excitotoxicité. La pompe Na⁺/K⁺ ATPase (et particulièrement sa sous-unité $\alpha 2$) dans les astrocytes joue un rôle majeur pour rétablir l'équilibre ionique perturbé lors de la recapture du glutamate. Son activation consomme de l'ATP cytosolique, ce qui conduit à l'activation de la glycolyse astrocytaire, et à la production de lactate. Ce lactate pourrait ensuite être utilisé comme substrat oxydatif pour fournir un complément d'énergie aux neurones.

Nos résultats ont montré que l'HI néonatale réduisait, dans le côté lésé, l'expression des partenaires clés dans cette ANLS et que la supplémentation maternelle

en RSV permettait de restaurer leurs expressions. Une étude chez le rat adulte a également montré qu'après une ischémie transitoire, l'expression de GLT1 diminuait [16]. Dans cette étude, la diminution du transporteur au glutamate a été contrecarrée par l'injection de RSV (1 ou 10 mg/kg; i.p.). Il avait également déjà été montré, *in vitro* sur un modèle d'excitotoxicité sur des tranches d'hippocampe, que le RSV (100 μ M) modulait à la hausse l'expression de la Na⁺/K⁺ ATPase et la libération de lactate, et réduisait le niveau de stress oxydatif [17]. Dans le côté non lésé, bien que l'HI n'ait pas diminué l'expression de ces gènes liés à l'ANLS, la supplémentation en RSV a tout de même augmenté leur niveau d'expression. Ainsi, que ce soit du côté non lésé ou du côté lésé, la supplémentation maternelle en RSV a permis soit d'augmenter l'expression de gènes liés à l'ANLS, soit de préserver leur niveau d'expression en contrecarrant leur baisse observée en condition d'HI seule.

Il peut paraître contre intuitif que l'augmentation ou la restauration de l'ANLS, et donc la production de lactate astrocytaire, puisse être neuroprotectrice. En effet, lors d'un épisode d'HI, une grande quantité de lactate est produite. Il a cependant été montré que le lactate lorsqu'il est administré **après** un accident d'HI est neuroprotecteur, que ce soit chez le nouveau-né [10] ou chez l'adulte [18]. L'injection de lactate est d'ailleurs en phase de test en clinique chez l'homme après un trauma crânien [19].

Au niveau de la plasticité synaptique, l'HI a induit une diminution importante de la synaptophysine, de la synapsine et de la sous-unité NR1 du récepteur N-méthyl-D-aspartate (NMDA). La synapsine et la synaptophysine sont les principales protéines impliquées dans la libération des vésicules synaptiques dans la fente synaptique [20]. La synaptophysine est souvent utilisée comme marqueur pour quantifier le nombre de synapses. Le récepteur NMDA, quant à lui, donne lieu à une transmission synaptique excitatrice [21]. C'est un hétérodimère contenant deux sous-unités NR1 et deux autres sous-unités comprenant des variantes de NR2 (A, B, C ou D) ou NR3 (A ou B) [22]. Leurs altérations reflètent un dysfonctionnement de la transmission synaptique. Dans notre étude, l'HI a induit une réduction de l'expression de ces protéines d'environ 50 % au niveau du cortex lésé. Une étude sur des rats ayant subi une HI néonatale a aussi montré que l'HI entraînait une diminution significative de l'expression de la synaptophysine dans l'hippocampe [23]. Des données récentes chez la souris ont montré que la répression de la synaptophysine entraînait des altérations comportementales telles qu'une réduction du comportement exploratoire, une altération des fonctions de mémoire et d'apprentissage [24]. Une diminution de l'expression de la synapsine, 30 jours après l'accident d'HI, a aussi été rapportée au niveau de l'hémisphère lésé du cerveau des rats [25]. Dans notre étude, l'HI a induit une diminution de ce marqueur qui traduit une altération de la plasticité synaptique causée par la mort neuronale. Hormis pour la sous-unité NR1, au niveau de l'hémisphère controlatéral, la supplémentation maternelle en RSV a contrecarré les diminutions de l'expression des gènes étudiés. De même, Feng *et al.* ont montré, chez le rat adulte, qu'un traumatisme cérébral induisait une diminution de l'expression des protéines synaptiques dont la synaptophysine [26]. Cette diminution a

été en partie contrecarrée par l'administration de RSV (100 mg/kg pendant 5 jours post-traumatisme).

L'originalité de cette étude était de montrer l'effet neuroprotecteur d'une supplémentation transgénérationnelle et nutritionnelle en RSV, dans le cadre de l'HI néonatale. La combinaison des différentes techniques (IRM, tests de comportement, analyses d'expression génique et protéique et l'histologie) a permis de valider les effets neuroprotecteurs du RSV et de préciser les voies impliquées. De façon intéressante, la présence du RSV, malgré sa faible concentration dans l'eau de boisson de la mère, a permis de réduire les volumes lésionnels et d'améliorer les performances motrices et cognitives altérées par l'HI sur les petits. Ces effets neuroprotecteurs sont dus aux propriétés antioxydantes et anti-apoptotiques du RSV mais aussi à la modulation du métabolisme *via* l'activation de l'ANLS et à l'augmentation de la plasticité synaptique comme le résume la figure 32.

Ce qu'il faut retenir :

- ◆ Malgré les doses nutritionnels et le mode d'administration transgénérationnelle, nous avons pu mettre en évidence une neuroprotection du RSV dans le cadre de l'HI néonatale.
- ◆ Le RSV diminue les volumes lésionnels et améliore les fonctions motrices et cognitives.
- ◆ La meilleure neuroprotection a été observée après administration de RSV (i) pendant les 15 jours précédant l'accident d'HI (action préventive, diminution de 72 % du volume de la lésion entre P7 et P30) et (ii) pendant 7 jours après l'accident d'HI (effet curatif, diminution de 78 % du volume de la lésion initiale à P30), comparé à une diminution entre 24 et 40 % entre P7 et P30 pour les autres groupes.
- ◆ Le RSV module les gènes impliqués dans le métabolisme cérébral, et plus particulièrement ceux liés à l'ANLS.

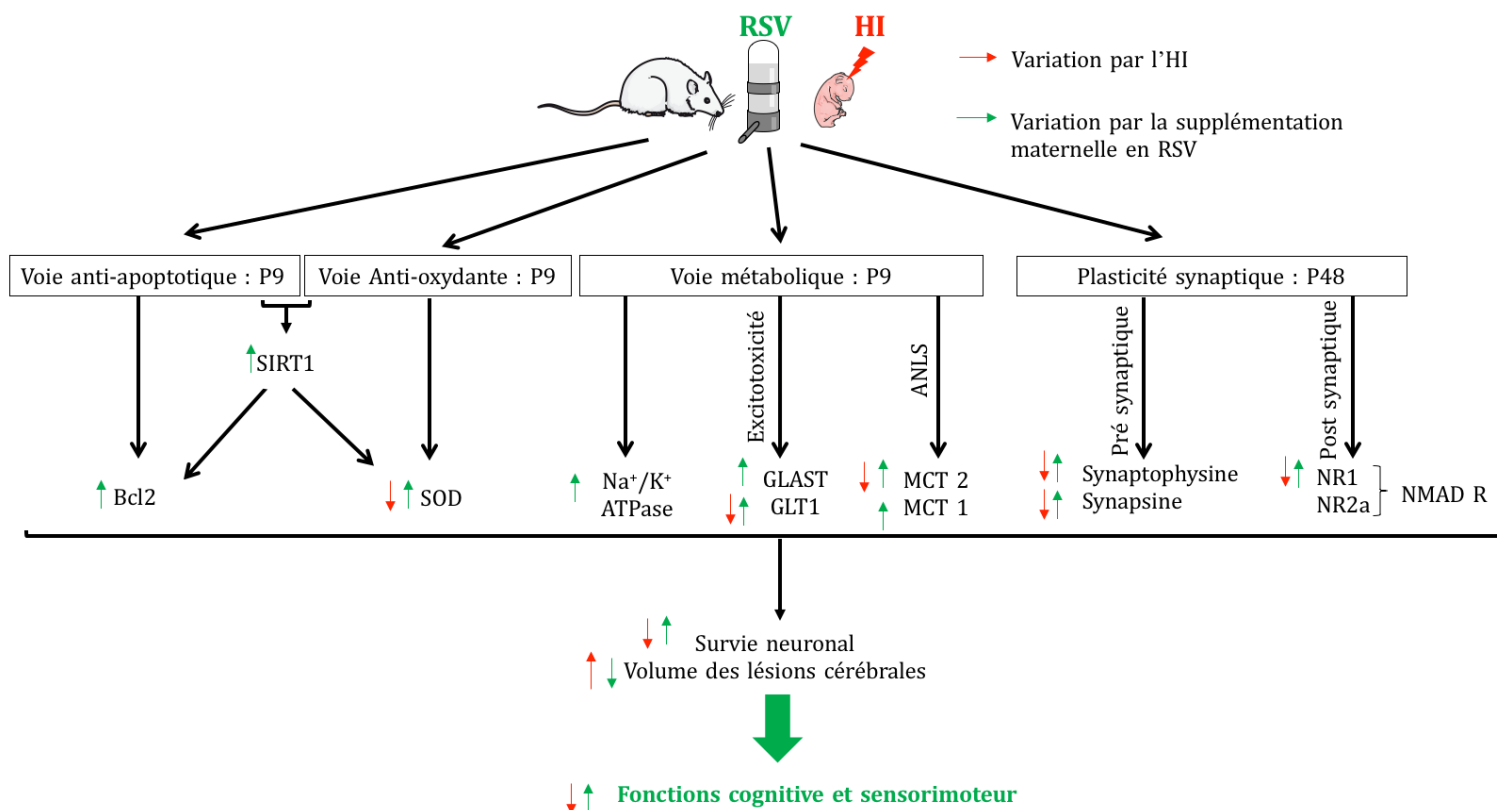


Figure 32: Schéma récapitulatif des effets neuroprotecteurs d'une supplémentation maternelle en RSV après un accident d'HI à P7.

*Schéma explicatif (i) des effets délétères de l'HI sur les gènes cibles (flèches rouges) et (ii) des effets neuroprotecteurs d'une supplémentation maternelle en RSV sur différentes voies (flèches vertes). La voie anti-apoptotique (*SIRT1*, *Bcl2*), la voie anti-oxydante (*SOD*), la voie métabolique (La pompe Na^+/K^+ ATPase, les transporteurs au glutamate astrocytaires (*GLAST* et *GLT1*) et les transporteurs au lactate (*MCT1* (astrocytaire) et *MCT2* (neuronal)) et enfin la plasticité synaptique à long terme (protéines pré-synaptiques (*synaptophysine* et *synapsine*) et post-synaptiques (sous-unités du récepteur NMDA: *NR1* et *NR2a*)).*

5. Bibliographie et publication

1. Das, S. and D.K. Das, *Anti-inflammatory responses of resveratrol*. Inflamm Allergy Drug Targets, 2007. **6**(3): p. 168-73.
2. Gao, Y., et al., *Resveratrol mitigates the oxidative stress mediated by hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats via Nrf2/HO-1 pathway*. Pharm Biol, 2018. **56**(1): p. 440-449.
3. Bian, H., H. Shan, and T. Chen, *Resveratrol ameliorates hypoxia/ischemia-induced brain injury in the neonatal rat via the miR-96/Bax axis*. Childs Nerv Syst, 2017. **33**(11): p. 1937-1945.
4. Baur, J.A. and D.A. Sinclair, *Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence*. Nat Rev Drug Discov, 2006. **5**(6): p. 493-506.
5. Sinha, K., G. Chaudhary, and Y.K. Gupta, *Protective effect of resveratrol against oxidative stress in middle cerebral artery occlusion model of stroke in rats*. Life Sci, 2002. **71**(6): p. 655-65.
6. Pan, S., et al., *Resveratrol post-treatment protects against neonatal brain injury after hypoxia-ischemia*. Oncotarget, 2016. **7**(48): p. 79247-79261.
7. Arteaga, O., et al., *Pretreatment with Resveratrol Prevents Neuronal Injury and Cognitive Deficits Induced by Perinatal Hypoxia-Ischemia in Rats*. PLoS One, 2015. **10**(11): p. e0142424.
8. Beauvieux, M.C., et al., *Resveratrol mainly stimulates the glycolytic ATP synthesis flux and not the mitochondrial one: a saturation transfer NMR study in perfused and isolated rat liver*. Pharmacol Res, 2013. **78**: p. 11-7.
9. Koronowski, K.B., et al., *Neuronal SIRT1 (Silent Information Regulator 2 Homologue 1) Regulates Glycolysis and Mediates Resveratrol-Induced Ischemic Tolerance*. Stroke, 2017. **48**(11): p. 3117-3125.
10. Roumes, H., et al., *Neuroprotective role of lactate in rat neonatal hypoxia-ischemia*. J Cereb Blood Flow Metab, 2020: p. 271678X20908355.
11. Ashwal, S., et al., *Comparison of two neonatal ischemic injury models using magnetic resonance imaging*. Pediatr Res, 2007. **61**(1): p. 9-14.
12. Kohlhauser, C., et al., *Histological changes and neurotransmitter levels three months following perinatal asphyxia in the rat*. Life Sci, 1999. **64**(23): p. 2109-24.
13. Dumont, U., et al., *Maternal alcoholism and neonatal hypoxia-ischemia: Neuroprotection by stilbenoid polyphenols*. Brain Res, 2020. **1738**: p. 146798.
14. Dumont, U., et al., *Maternal consumption of piceatannol: A nutritional neuroprotective strategy against hypoxia-ischemia in rat neonates*. Brain Res, 2019. **1717**: p. 86-94.
15. Pellerin, L. and P.J. Magistretti, *Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(22): p. 10625-9.
16. Girbovan, C. and H. Plamondon, *Resveratrol downregulates type-1 glutamate transporter expression and microglia activation in the hippocampus following cerebral ischemia reperfusion in rats*. Brain Res, 2015. **1608**: p. 203-14.
17. Quincozes-Santos, A., et al., *Oxidative stress mediated by NMDA, AMPA/KA channels in acute hippocampal slices: neuroprotective effect of resveratrol*. Toxicol In Vitro, 2014. **28**(4): p. 544-51.
18. Berthet, C., et al., *Neuroprotective role of lactate after cerebral ischemia*. J Cereb Blood Flow Metab, 2009. **29**(11): p. 1780-9.
19. Bouzat, P., et al., *Cerebral metabolic effects of exogenous lactate supplementation on the injured human brain*. Intensive Care Med, 2014. **40**(3): p. 412-21.
20. Thiel, G., *Synapsin I, synapsin II, and synaptophysin: marker proteins of synaptic vesicles*. Brain Pathol, 1993. **3**(1): p. 87-95.
21. Paoletti, P., C. Bellone, and Q. Zhou, *NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease*. Nat Rev Neurosci, 2013. **14**(6): p. 383-400.
22. Cull-Candy, S.G. and D.N. Leszkiewicz, *Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses*. Sci STKE, 2004. **2004**(255): p. re16.
23. Griva, M., et al., *Long-term effects of enriched environment following neonatal hypoxia-ischemia on behavior, BDNF and synaptophysin levels in rat hippocampus: Effect of combined treatment with G-CSF*. Brain Res, 2017. **1667**: p. 55-67.
24. Schmitt, U., et al., *Detection of behavioral alterations and learning deficits in mice lacking synaptophysin*. Neuroscience, 2009. **162**(2): p. 234-43.
25. Moretto, M.B., et al., *Effects of neonatal cerebral hypoxia-ischemia on the in vitro phosphorylation of synapsin 1 in rat synaptosomes*. Neurochem Res, 1999. **24**(10): p. 1263-9.
26. Feng, Y., et al., *Neuroprotective effects of resveratrol against traumatic brain injury in rats: Involvement of synaptic proteins and neuronal autophagy*. Mol Med Rep, 2016. **13**(6): p. 5248-54.



Neuroprotective Effect of Maternal Resveratrol Supplementation in a Rat Model of Neonatal Hypoxia-Ischemia

Ursule Dumont^{1,2}, Stéphane Sanchez¹, Cendrine Repond², Marie-Christine Beauvieux^{1,3}, Jean-François Chateil^{1,3}, Luc Pellerin^{2,4†}, Anne-Karine Bouzier-Sore^{1†} and Hélène Roumes^{1*†}

¹ CRMSB, UMR 5536, CNRS/University of Bordeaux, Bordeaux, France, ² Département de Physiologie, University of Lausanne, Lausanne, Switzerland, ³ CHU de Bordeaux, Place Amélie Raba Léon, Bordeaux, France, ⁴ IRTOMIT, Inserm U1082, University of Poitiers, Poitiers, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Eglantine Balland,
Monash University, Australia

Reviewed by:

Evelyne Gozal,
University of Louisville, United States
Oliver Kann,
Heidelberg University, Germany

*Correspondence:

Hélène Roumes
helene.roumes@rmsb.u-bordeaux.fr

[†]These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to
Neuroenergetics, Nutrition and Brain
Health,
a section of the journal
Frontiers in Neuroscience

Received: 13 October 2020

Accepted: 23 December 2020

Published: 15 January 2021

Citation:

Dumont U, Sanchez S, Repond C,
Beauvieux M-C, Chateil J-F, Pellerin L,
Bouzier-Sore A-K and Roumes H
(2021) Neuroprotective Effect
of Maternal Resveratrol
Supplementation in a Rat Model
of Neonatal Hypoxia-Ischemia.
Front. Neurosci. 14:616824.
doi: 10.3389/fnins.2020.616824

Neonatal hypoxia-ischemia (nHI) is a major cause of death or subsequent disabilities in infants. Hypoxia-ischemia causes brain lesions, which are induced by a strong reduction in oxygen and nutrient supply. Hypothermia is the only validated beneficial intervention, but not all newborns respond to it and today no pharmacological treatment exists. Among possible therapeutic agents to test, *trans*-resveratrol is an interesting candidate as it has been reported to exhibit neuroprotective effects in some neurodegenerative diseases. This experimental study aimed to investigate a possible neuroprotection by resveratrol in rat nHI, when administered to the pregnant rat female, at a nutritional dose. Several groups of pregnant female rats were studied in which resveratrol was added to drinking water either during the last week of pregnancy, the first week of lactation, or both. Then, 7-day old pups underwent a hypoxic-ischemic event. Pups were followed longitudinally, using both MRI and behavioral testing. Finally, a last group was studied in which breastfeeding females were supplemented 1 week with resveratrol just after the hypoxic-ischemic event of the pups (to test the curative rather than the preventive effect). To decipher the molecular mechanisms of this neuroprotection, RT-qPCR and Western blots were also performed on pup brain samples. Data clearly indicated that when pregnant and/or breastfeeding females were supplemented with resveratrol, hypoxic-ischemic offspring brain lesions were significantly reduced. Moreover, maternal resveratrol supplementation allowed to reverse sensorimotor and cognitive deficits caused by the insult. The best recoveries were observed when resveratrol was administered during both gestation and lactation (2 weeks before the hypoxic-ischemic event in pups). Furthermore, neuroprotection was also observed in the curative group, but only at the latest stages examined. Our hypothesis is that resveratrol, in addition to the well-known neuroprotective benefits *via* the sirtuin's pathway (antioxidant properties, inhibition of apoptosis), has an impact on brain metabolism, and more specifically on the astrocyte-neuron lactate shuttle (ANLS) as suggested by RT-qPCR and Western blot data, that contributes to the neuroprotective effects.

Keywords: polyphenol, resveratrol, neonatal hypoxia-ischemia, brain metabolism, MRI

INTRODUCTION

Neonatal hypoxia-ischemia (nHI) is the most common cause of perinatal brain injury, which may lead to neonatal death or irreversible damages like permanent physical disabilities, cerebral palsy and cognitive dysfunctions (Shankaran, 2012). It has a high global incidence of 1–8 per 1,000 live births, and remains a major cause of infantile mortality (Kurinczuk et al., 2010). It is caused by a massive reduction in cerebral blood flow and, therefore, oxygen and glucose supply to the brain. Today, the only applied treatment is moderate hypothermia (Gluckman et al., 2005), which cools down newborns to 33–34°C and is used in a time window of 72 h after the hypoxic-ischemic event (Bona et al., 1998). However, this treatment is only partly efficient and is unsuccessful for nearly half of the patients (Wu and Gonzalez, 2015). Therefore, there is an urgent need to find a complementary therapy or preventive treatment to further reduce the rate and severity of neurodevelopmental disabilities resulting from nHI.

According to the literature, evidence exists about the neuroprotective properties of *trans*-resveratrol (Bastianetto et al., 2015). Resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) is a natural polyphenol present at relatively high concentrations in peanuts, grape skin and seeds. This polyphenol possesses interesting biological properties such as anti-inflammatory (Das and Das, 2007), antioxidant (Gao et al., 2018) and anti-apoptotic activities (Bian et al., 2017). These activities may have promising potential therapeutic applications, as shown *in vivo* (Baur and Sinclair, 2006). Increasing evidence indicates that resveratrol may also play a role in the prevention of neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's or Parkinson's disease (Sawda et al., 2017; Wicinski et al., 2020). Interestingly, blood-borne resveratrol can cross the blood–brain barrier (BBB) (Baur and Sinclair, 2006).

During the last decade, this polyphenol has shown a neuroprotective effect both as a *pre*- and *post*-treatment in the context of nHI (West et al., 2007; Karalis et al., 2011; Arteaga et al., 2015; Pan et al., 2016; Bian et al., 2017; Gao et al., 2018). Indeed, when administered just after the hypoxic-ischemic event [intraperitoneal injection (i.p.); 90 mg/kg], data indicated that resveratrol is neuroprotective as demonstrated by a strong reduction of the infarct volume and by the recovery of some behavioral functions (Karalis et al., 2011). This neuroprotection was also observed when resveratrol was administered before the hypoxic-ischemic event (Arteaga et al., 2015). When resveratrol was injected 10 min before the hypoxic-ischemic event (i.p.; 20 mg/kg; using the classical Rice-Vannucci postnatal day 7 (P7) pup model), a reduction in lesion volumes and an improvement of cognitive and motor functions (long-term assessment) were observed (Arteaga et al., 2015). The administration of resveratrol before the hypoxic-ischemic episode seems even more neuroprotective than when administered after.

Taking into account the fact that (i) maternal supplementation has an impact not only on pregnant women but also on the fetus (Nnam, 2015), (ii) resveratrol has neuroprotective properties and (iii) resveratrol and its metabolites can cross the placental barrier and the BBBs (Bourque et al., 2012; Shankaran, 2012), we aimed to evaluate the neuroprotective role of maternal resveratrol supplementation, at nutritional dose, in a context of

nHI. The originality of our approach lies in the combination of (i) a transgenerational and nutritional approach, (ii) a longitudinal study of brain lesion evolution using non-invasive MRI associated to several behavioral tests, and (iii) a study of some gene and protein expressions in the brain of pups to try to decipher the molecular mechanisms of this neuroprotection. For this purpose, expression of a sirtuin (SIRT1), superoxide dismutase (SOD) and an antiapoptotic protein (Bcl2) was measured in brain samples, as well as of different key partners in brain metabolism, in particular, genes and proteins linked to the astrocyte–neuron lactate shuttle (ANLS) (Pellerin and Magistretti, 1994) such as the astrocytic glutamate transporters (GLT-1 and GLAST), the monocarboxylate transporters (MCT1 and MCT2), the lactate dehydrogenase isoforms (LDHa and LDHb) and the glial Na⁺/K⁺ATPase α_2 isoform.

MATERIALS AND METHODS

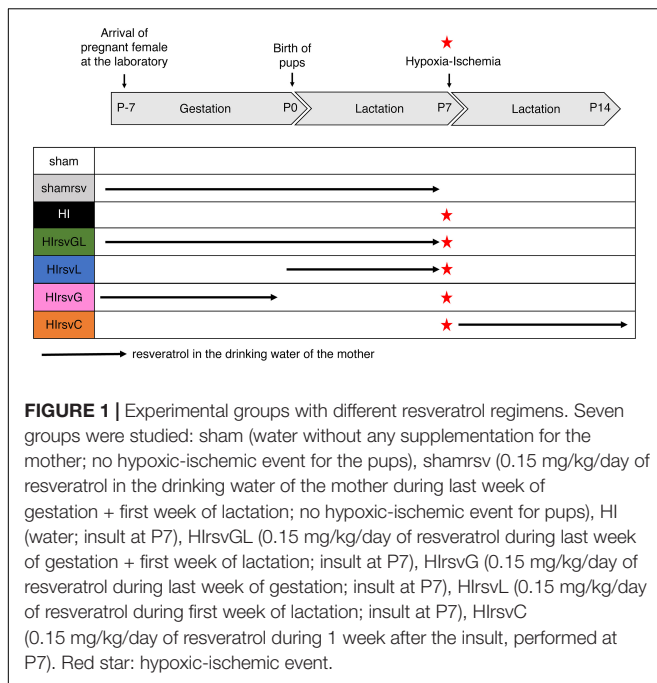
Drug Administration

All animal procedures were conducted in accordance with the Animal Experimentation Guidelines of the European Communities Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC). Protocols met the ethical guidelines of the French Ministry of Agriculture and Forests and were approved by the local ethics committee (CEEA50). Resveratrol was purchased from Sigma (Sigma-Aldrich, France). Resveratrol stock solution was prepared by dissolving 100 mg of resveratrol in 2 ml of absolute ethanol (Sigma-Aldrich, France). A pregnant Wistar female rat drinks on average 50 ml water/day. For resveratrol supplementation, 4 μ l of the resveratrol stock solution were added in 200 ml of drinking water, which results in a nutritional maternal consumption of 0.15 mg/kg/day. Resveratrol solutions in drinking bottles were prepared and changed every day. Because of resveratrol photosensitivity, drinking bottles were enwrapped in aluminum foil to avoid oxidation. 4 μ l of absolute ethanol were added in drinking water (200 ml) for all sham groups during 2 weeks (last week of gestation + first week of breastfeeding).

Experimental Groups

Pregnant Wistar female rats (Janvier Laboratories, France) were obtained at day 15 of gestation and kept on a 12 h/12 h light/dark cycle with A03 food (SAFE, Augy, France) and water *ad libitum*. Seven experimental groups were established according to the maternal supplementation plan (Figure 1).

Three control groups were first considered. The sham group for which there was no maternal resveratrol supplementation and in which pups did not undergo a hypoxic-ischemic episode but only carotid exposure ($n = 18$). The shamsv group, for which resveratrol was added to the mother's drinking water during the last week of gestation and the first week of lactation and in which pups did not undergo a hypoxic-ischemic episode (only carotid exposure). This control group was performed to ensure that resveratrol had no effect on healthy pups (see **Supplementary Figure 1**, $n = 6$). Finally, the HI group, without maternal resveratrol supplementation and in which pups underwent a



hypoxic-ischemic event at P7 ($n = 31$). One preliminary study was performed on this HI group to ensure the reproducibility of the model ($n = 11$).

In a second step, four supplementation groups in which pups underwent a hypoxic-ischemic event at P7 were considered: pups from a pregnant female that received resveratrol supplementation in drinking water (i) both during the last week of gestation and the first week of lactation (gestation + lactation group; HlrsvGL group; $n = 15$), (ii) only the last week of gestation (gestation group; HlrsvG group; $n = 15$), (iii) only the first week of lactation (lactation group; HlrsvL; $n = 15$), or (iv) only the second week of lactation (just after the hypoxic-ischemic event and during 1 week; curative group; HlrsvC group; $n = 15$).

Model of Neonatal Hypoxic-Ischemic Brain Injury

Cerebral hypoxia-ischemia was performed using the Rice-Vannucci model (Rice et al., 1981) as described previously (Dumont et al., 2019). Briefly, postnatal day 7 (P7) rat pups of both genders were used in the experiments (after checking the absence of statistical difference between males and females in our study, data from both genders were pooled). Pups weighing 15–19 g were anesthetized using isoflurane (4% for induction and 1.5% for maintenance). For ischemia, neck skin and muscles along an anterior midline were incised and the left common carotid artery was permanently ligated (surgery duration never exceeded 10 min per pup). After surgery, pups were placed in a heated atmosphere ($33 \pm 1^\circ\text{C}$) during 30 min in order to recover. Hypoxia was induced by placing animals during 2 h in a hypoxic chamber (Intensive Care Unit Warmer, Harvard Apparatus, Les Ulis, France, 8% O_2 , 92% N_2). The hypoxic chamber temperature was maintained at $33 \pm 1^\circ\text{C}$ to ensure a pup rectal temperature of

$35.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ (normothermia) and 80% humidity. For sham pups (sham and shamsv groups), the left common carotid artery was just exposed (under the same anesthetic procedure as described above) and after 30 min of recovery, pups were kept separated from the mother in a heated atmosphere ($33 \pm 1^\circ\text{C}$, 2 h).

Longitudinal Frame Acquisition of *in vivo* MRI

MRI acquisitions were performed 2 h 1/2 after the carotid artery ligation (P7), then 48 h after (P9) and 23 days later (P30), on a horizontal 4.7 T Biospec 47/50 system (Bruker, Ettlingen, Germany) equipped with a 6 cm BG6 gradient system (1000 mT/m, $\Delta = 20$ ms, $\delta = 4$ ms). Pups were anesthetized with isoflurane (4% for induction and 1.5% for maintenance). Breathing was monitored by a ventral pressure sensor and body temperature was maintained at $35.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ during acquisition with a water-heated MRI bed. Anatomical T2-weighted images of the brain were obtained using a Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement (RARE) sequence with 20 axial slices (0.7 mm thick), echo time (TE) = 50 ms, repetition time (TR) = 3000 ms and a total duration of 4 min 48 s. Brain lesion volumes were assessed by Diffusion Weighted Imaging (DWI): 20 axial slices (0.7 mm thick), 30 directions, b -value 1000 s/mm^2 , TE = 24 ms, TR = 2 s, $\Delta = 8.11$ ms, $\delta = 2.5$ ms, total duration = 17 min 04 s. At P7, DWI was systematically performed 3 h after carotid ligation. MR-angiography was performed to image the cerebral arterial blood flow using a Time-of-Flight (TOF)-3D-Fast low angle shot (FLASH) sequence (axial slice, 20 mm thick, TE = 2.2 ms, TR = 13 ms, flip angle = 15° , total duration = 10 min 59 s) on pups presenting no lesion at P7 to ensure that the ligation was present (see **Supplementary Figure 2**). In two cases, pups presented no ligation and were excluded from the study.

MRI Analysis

Measurements were performed with Paravision 6.0.1 software (Bruker BioSpin, Karlsruhe, Germany). Lesion volumes were measured at P7, P9 and P30 on the diffusion-weighted images. For each rat, for each slice and on the 20 adjacent slices per rat, two region-of-interests (ROI) were manually delineated to encompass the global brain area and injured area, respectively. Volume was then obtained by considering each slice thickness (0.7 mm). Lesion volumes were therefore expressed as a percentage of the total brain volume. In order to be free from any artifacts and to standardize the analyses, the threshold for detecting a lesion was set at 1% of the total volume of the brain. For this reason, only lesions larger than 1% of total brain volume were included in the study. The apparent diffusion coefficient (ADC) values (mm^2/s) at P7 were obtained directly from the ADC maps produced by the software (Paravision 6.0.1) after DWI acquisition. ROIs were manually drawn on these maps such as delineating the brain lesion inside the cortex and hippocampus on the same slice, and the striatum on another appropriate slice as previously described (Dumont et al., 2019).

Behavioral Tests

The classical Rice-Vannucci model induces large ipsilateral cortical, hippocampal and striatal injuries (Ashwal et al., 2007), leading to sensorimotor (involving the cortex and striatum) and cognitive (involving the hippocampus) deficits (Lebedev et al., 2003). Cortical and striatal neuroprotection was assessed at short term with the righting reflex and later with the mNSS. Hippocampal neuroprotection was assessed using the novel object recognition test, allowing the evaluation of hippocampal-dependent long-term memory. Behavioral tests were performed on pups from P8 to P45 (**Figure 2**).

Righting Reflex (P8, P10, and P12)

Righting reflex was conducted on HI pups and on pups in groups that had completed their supplementation window (HIRsvGL, HIRsvG, and HIRsvL). Pups were turned on their back. The time required to turn over on all four paws was measured. Each pup was given three attempts and the meantime of the three trials was calculated.

Modified Neurological Severity Score (mNSS) (P24)

The mNSS test is a neurological scale widely used in the study of stroke in various models (Morris et al., 2010). The assessment of neurological disorders is based on a scale ranging from 0 to 18. This exam is composed of a series of motor (muscle condition, abnormal movement), sensory (visual, tactile or proprioceptive), reflex and balance tests (18 tests). One point is awarded if the animal fails to perform the task while no point is given if successful. Each rat was graded on the mNSS scale: the higher the score, the more impaired the sensorimotor functions (0–1: no impairment; 2–6: moderate impairments; 7–12: impairments; 13–18: severe impairments).

Novel Object Recognition Test (P42–P45)

The novel object recognition test is based on the natural tendency of rodents to explore novelty (Ennaceur and Delacour, 1988). Long-term memory was assessed in our task (Roumes et al.,

2020). After a 10-min habituation period in the open field on day 1 (P42), pups were further allowed to freely explore two identical objects placed in opposite corners of the arena for 10 min on the next 2 days. On the last day (P45), one of the old objects was replaced by a new and different one, then pups were allowed to freely explore objects for 10 min. Durations of each object exploration were measured. The discrimination index (score between −1 and +1) was defined as the parameter for long-term memory evaluation:

$$I = \frac{(\text{time spent on new object} - \text{time spent on familiar object})}{(\text{time spent on new object} + \text{time spent on familiar object})}$$

A positive score indicates more time spent with the new object. Closer to +1 the score, lesser is memory alteration.

Brain Sample Processing

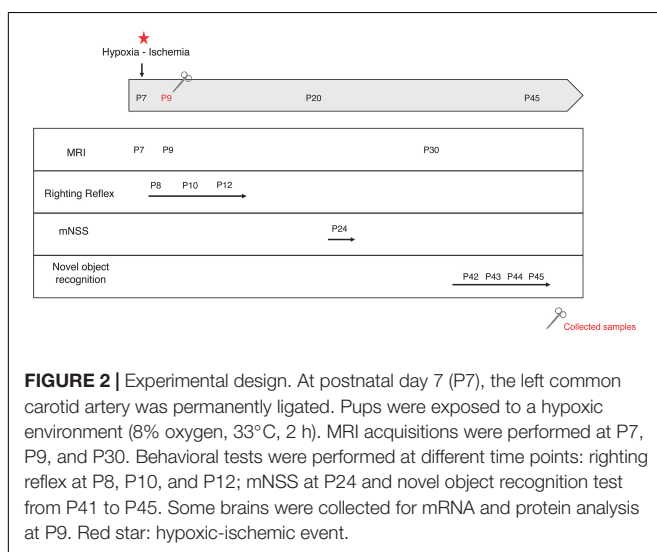
Brains were collected at P9 from some pups in the supplementation group with the strongest neuroprotective effects (HIRsvGL group), as well as from some pups in the control and sham groups for further analysis by RT-qPCR, Western blots and histology. Cortical and striatal structures were collected from both hemispheres in all three groups. Hippocampi were collected from both hemispheres in sham and HIRsvGL groups, and only in the contralateral hemisphere in the HI group since this brain region was completely degenerated in the ipsilateral hemisphere.

RNA and Protein Extractions

P9 pups were lethally anesthetized with an intraperitoneal injection of Ketamine (100 mg/kg of Imalgene, Merial Boehringer, Centravet Lapalisse) and Xylazine (20 mg/kg of Paxman, Virbac France, Centravet Lapalisse) then quickly decapitated. Brains were rapidly removed and placed on ice under RNase free conditions. Each structure (cortex, hippocampus and striatum) of both ipsilateral (left) (when possible) and contralateral (right) hemispheres was quickly dissected. For RT-qPCR, each brain structure sample was stored in RNAlater and for Western blots it was stored in RIPA solution (Tampon Pierce™ RIPA lysis buffer 1× + inhibitor proteases cocktail 10×, Thermo Fisher). Then, all samples were stored at −80°C. For the most injured brains (mainly in the HI group), the tissue loss caused by the infarct did not allow to collect all structures from the injured side especially the hippocampus in the HI group (data for hippocampus and striatum are shown in **Supplementary Figures 3, 4**).

Brain Removal for Nissl Staining

Postnatal day 9 pups ($n = 3$ per group) were deeply anesthetized with isoflurane. Intra-cardiac perfusion with PBS 1× was performed during 10 min (18 ml/min), followed by perfusion of a paraformaldehyde solution (PFA 4%, in PBS 1×) during 10 min (18 ml/min). Then, brains were quickly sampled and post-fixed in PFA 4% overnight (4°C), followed by cryoprotection in PBS 1×–Sucrose 20% (24 h, 4°C) and PBS 1×–Sucrose 30% (24 h, 4°C). Brains were frozen with nitrogen vapors and kept at −80°C until they were cut into sections (16 μm) with a cryostat.



Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction Analysis (RT-qPCR)

Total RNA was extracted and purified from each brain structure using RNeasy Protect Mini Kit (#74106, Qiagen, Hombrechtikon, Switzerland). For cDNA synthesis, 200 ng of total RNA were reverse transcribed using the Multiscribe Reverse protocol: 50 μ M Random Hexamers and RT Buffer 10 $\times$ were added to 200 ng of samples. Samples were incubated in a thermocycler (Biometa®, Thermocycler) 10 min at 65°C. Then, 10 mM of dNTP, MgCl₂, RNase inhibitor and Multiscribe Reverse were added to the reaction mix and incubated in a thermocycler 10 min at 25°C, 45 min at 48°C, and 5 min at 95°C. Then, 1 μ l of synthesized cDNA was subjected to RT-qPCR using the suitable primers (reverse and forward: 0.3 μ M; **Table 1**) and SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Luzern, Switzerland) to perform the PCR reaction in a total reaction volume of 10 μ l. Each sample was measured in triplicates. The RT-qPCR protocol was as follows: 2 ng of cDNA samples were incubated at 95°C for 3 min then 40 cycles of 3 s at 95°C and 20 s at 60°C. mRNA expression levels were determined with the StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Luzern, Switzerland) with RPS29 (Ribosomal Protein S29, Microsynth, Balgach, Switzerland) mRNA used as endogenous control for normalization purposes (van de Looij et al., 2014). For data analysis, differences were calculated using the $\Delta\Delta$ Ct method using the RPS29 gene as housekeeping gene.

Western Blotting

Protein concentrations from cell lysates were determined with a Micro BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific Pierce BCA Protein Assay), according to the manufacturer's recommendations. Protein concentration was adjusted in order to obtain the same concentration for each sample, using Laemmli Buffer 4 $\times$. Samples and molecular standards (PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermo Fisher) were loaded on a SDS-PAGE 10% polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), and

then proteins were transferred onto a nitrocellulose membrane. Transfer (gel to membrane) was performed by semi-dry transfer (Trans Blot Turbo transfer System Bio Rad). At the end of the transfer, membranes were blocked for 1 h, under agitation, at room temperature with TBS-T 1X (TBT-0.1% Triton x-100), 10% Milk and 1% BSA. Then, membranes were incubated for 12 h at 4°C under agitation with the appropriate primary antibody described in **Table 2** (MCT1, MCT2, LDHa, and LDHb, 1:1000 and GLAST, 1:500). Memcode Reversible Protein Stain (Pierce) served as loading control. Blots were revealed by chemiluminescence (WesternBright ECL; Witec AG, Luzern, Switzerland) and imaged with a detection system (Chemidoc XRS+, Bio-Rad, Switzerland). Densitometric analysis of chemiluminescent signals was performed with the Image lab software using the total protein (Memcode) normalization procedure as recommended (Taylor et al., 2013).

Nissl Staining

Nissl staining was performed to estimate and compare cell death between the different conditions (Zhu et al., 2015), as previously described (Dumont et al., 2019). Briefly, 16 μ m thick brain sections at P9 were stained with cresyl violet (0.5%, Sigma-Aldrich, France) for 10 min and washed in distilled water for 10 s. Sections were dehydrated in 95 and 100% ethanol (2 min each), defatted in xylene and mounted on coverslips in Depex mounting solution (Sigma Aldrich, Germany). Brain sections were observed using an optical microscope (Leica STP6000). Image J software (National institutes of Health, Bethesda, MD, United States)¹ was used to count nuclei. In the software, the 8 bit image contrast was enhanced by 2%. The threshold was adjusted and the analyze particle tool was used to automatically count cell nuclei. For each condition, three different brains were analyzed. For each brain, two images were taken in the penumbra area, at the level of the cortex or the striatum.

Statistical Analysis

MRI quantifications were blindly performed by two separate experimenters (intra-experimenter variability <1%; inter-experimenter variability <5%). Statistical analysis and graphs were performed using GraphPad Prism 7.00 software. All data were expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (s.e.m). Number of pups is stated for each experiment within figure legends. Statistical significance of the differences between multiple groups was determined using One-Way ANOVA and Fischer's LSD *post hoc* test (distribution of the data sets was tested

¹ <https://imagej.nih.gov/ij/download.html>

TABLE 1 | Forward and reverse oligonucleotide sequences of target gene primers for RPS 29, SIRT1, Bcl2, SOD2, MCT1, MCT2, GLT1, GLAST, Na⁺/K⁺ATPase, LDHa, and LDHb.

Genes	Forward 5'-3'	Reverse 5'-3'
RPS29	GGCTTTTAGGATGGAAGGGAC	TGAAGGTGACAGCAGTCGGTTG
SIRT1	CATACTCGCCACCTAACCTAT	AACCTCTGCCTCATCTACATTT
Bcl2	GAGTACCTGAACCGGCATCT	GAAATCAAACAGAGGTCGCA
SOD2	GAGCAAGGTCGCTTACAGA	CTCCCCAGTTGATTACATTC
MCT1	CTTGTGGCGTGATCCT	GTTTCGGATGTCTCGGG
MCT2	GCTCCGTATGCTAAGGAC	CGATAGTGACGAGCCC
GLT1	GAGCATTGGTGCAGCCAGTATT	GTTCTCATTCTATCCAGCAGCCAG
GLAST	CATCCAGGCCAACGAAACA	GAGTCTCCATGGCCTCTGACA
Na ⁺ /K ⁺ ATPase	TGTGATTCTGGCTGAGAACG	CAAGTCAGCCCACTGCACTA
LDHa	TGGCCTCTCCGTGGCAGACT	CCCCCAGACCACCTCAACACAA
LDHb	AGACTGCCGTCCCGAACAA	ATCCACCAGGGCAAGCTCA

The specificity of oligonucleotide primers was verified using the program BLAST (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, United States).

TABLE 2 | List of antibodies for Western blotting.

Anticorps	Sources	Identifier
Rabbit anti-MCT1	Homemade	Pierre et al., 2000
Rabbit anti-MCT2	Homemade	Pierre et al., 2000
Rabbit anti-LDHa	Cell signaling	2012S
Rabbit anti-LDHb	Sigma-Aldrich	AV48210
Rabbit anti-GLAST	Abcam	ab416

using both Bartlett's and Brown and Forsythe's tests). Statistical significance was defined as $p < 0.05$ (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, and **** $p < 0.0001$).

RESULTS

Maternal Resveratrol Supplementation Reduces Hypoxia-Ischemia-Induced Brain Damages

At P7, all pups which underwent a hypoxic-ischemic event without treatment (Rice-Vannucci model; HI group) and all pups from the gestation (HIrsvG) and curative (HIrsvC) groups exhibited brain lesions (**Figure 3A**, first, third, and fifth pie charts). These lesions affected particularly the ipsilateral cortex, the hippocampus and the striatum. When resveratrol was administered to the mother either during the gestation (last week) + lactation period (first week) (HIrsvGL) or during the first week of lactation (HIrsvL), 20 and 13% of the pups had no MRI detectable brain lesion, respectively (**Figure 3A**; second and fourth pie charts). Only MRI data from P7 pups with MRI detectable brain damages were quantified in **Figures 3C,D**.

Diffusion- (P7) and T2- (P30) weighted images of pup brains from all groups are presented in **Figure 3B**. Brain lesions appear as a hyposignal at P7 (edema) whereas they appear as a hypersignal at P30 (necrotic zone). Brain lesion volumes (expressed as%, normalized to total brain volume) were measured for different time points and values are presented in **Figure 3C**. At P7, no significant difference was found between pups from the HI, HIrsvG, and HIrsvC groups ($42 \pm 2\%$, $42 \pm 1\%$, and $41 \pm 3\%$, respectively). Pups from the HIrsvGL and HIrsvL groups had significantly smaller lesions compared to those in the other hypoxic-ischemic groups ($33 \pm 2\%$ and $31 \pm 3\%$, respectively). At P9, pups from the HIrsvGL group showed the smallest brain lesion volumes compared to the other hypoxic-ischemic groups ($9 \pm 2\%$ vs. $21 \pm 2\%$, $22 \pm 3\%$, $19 \pm 3\%$, and $16 \pm 3\%$ for HI, HIrsvG, HIrsvL, and HIrsvC groups, respectively). At P30, no significant difference was detected in brain lesion volumes between the HI, HIrsvG, and HIrsvL groups ($25 \pm 4\%$, $17 \pm 4\%$, and $25 \pm 5\%$, respectively). The smallest brain lesion volumes were measured in the HIrsvGL and HIrsvC groups ($9 \pm 3\%$ and $9 \pm 3\%$, respectively). A decrease in brain lesion volume was detected in all groups within the first 48 h post-insult due to the spontaneous recovery of part of the damaged tissue (penumbra without cell death). The most extensive recovery was observed for the HIrsvGL group (mother with the longest resveratrol supplementation, before the hypoxic-ischemic event). In all groups, no statistical difference was found between P9 and P30.

Apparent diffusion coefficient values were measured in the cortex, hippocampus and striatum of all groups (**Figure 3D**). Independently of the considered structure, a significant drop in ADC values was detected in all hypoxic-ischemic groups compared to the sham group. Such a drop reflects the edema severity due to the water diffusion restriction induced by

cell swelling. There was no significant difference between ADC values measured in hypoxic-ischemic groups in the cortex, while in the hippocampus, the HIrsvL group presented significantly higher ADC values compared to other hypoxic-ischemic groups, reflecting a less severe cytotoxic edema. The same increase in ADC values can be measured in the striatum of the HIrsvGL and HIrsvL groups compared to the HI and HIrsvG groups.

Maternal Resveratrol Supplementation Preserves Cognitive and Sensorimotor Functions of Pups

Behavioral evaluations of pups in each group are shown in **Figure 4**. Righting reflex was performed from P8 to P12 (**Figure 4A**). At P8 and P12 the HI group presented a significantly longer time to turn back on their four paws compared to pups from the other groups. At P10 except from the HIrsvG group, all supplemented groups and the sham group performed significantly better than the HI group. Moreover, HIrsvG and HIrsvL groups presented a delay to reverse compared to the sham group. At P12, the sham group presented the best performances and the HI group, the worst, compared to the other hypoxic-ischemic groups.

Sensorimotor deficits were also assessed using the mNSS test (**Figure 4B**). The sham group showed no impairment (score < 1 ; 0.6 ± 0.2) while the HI group had the highest neurological deficits (3.8 ± 0.4). Maternal resveratrol supplementation significantly decreased the neurological deficits, compared to the HI group (1.6 ± 0.1 , 2.7 ± 0.3 , 1.7 ± 0.3 , and 2.5 ± 0.3 for the HIrsvGL, HIrsvG, HIrsvL, and HIrsvC groups, respectively). In the supplemented groups, pups from the HIrsvGL and HIrsvL groups presented the best scores.

Long-term memory was evaluated with the novel object recognition test at P45 (**Figure 4C**). The HI and HIrsvG groups showed a significantly lower discrimination index than sham pups (0.47 ± 0.06 and 0.48 ± 0.04 , respectively vs. 0.76 ± 0.02 for sham group). No significant difference was detected between the sham, HIrsvGL, and HIrsvL groups. The HIrsvC group exhibited an intermediate discrimination index (0.61 ± 0.09) but with heterogeneous results.

Maternal Resveratrol Supplementation Induces Changes in the Expression Pattern of Genes Involved in Sirtuin Signaling and Intercellular Metabolic Interactions

Mechanisms involved in short-term neuroprotection by resveratrol were further evaluated using RT-qPCR on P9 cortical, hippocampal and striatal samples of pups from the HIrsvGL group (**Figure 5** and **Supplementary Figures 3, 4**). For the HI group, no hippocampal tissue could be collected in the ipsilateral hemisphere (necrotic area), therefore no data was obtained for this structure on the injured side. Putative anti-apoptotic and antioxidant effects of resveratrol supplementation were assessed by quantification of SIRT1, Bcl2, and SOD2 mRNA expression

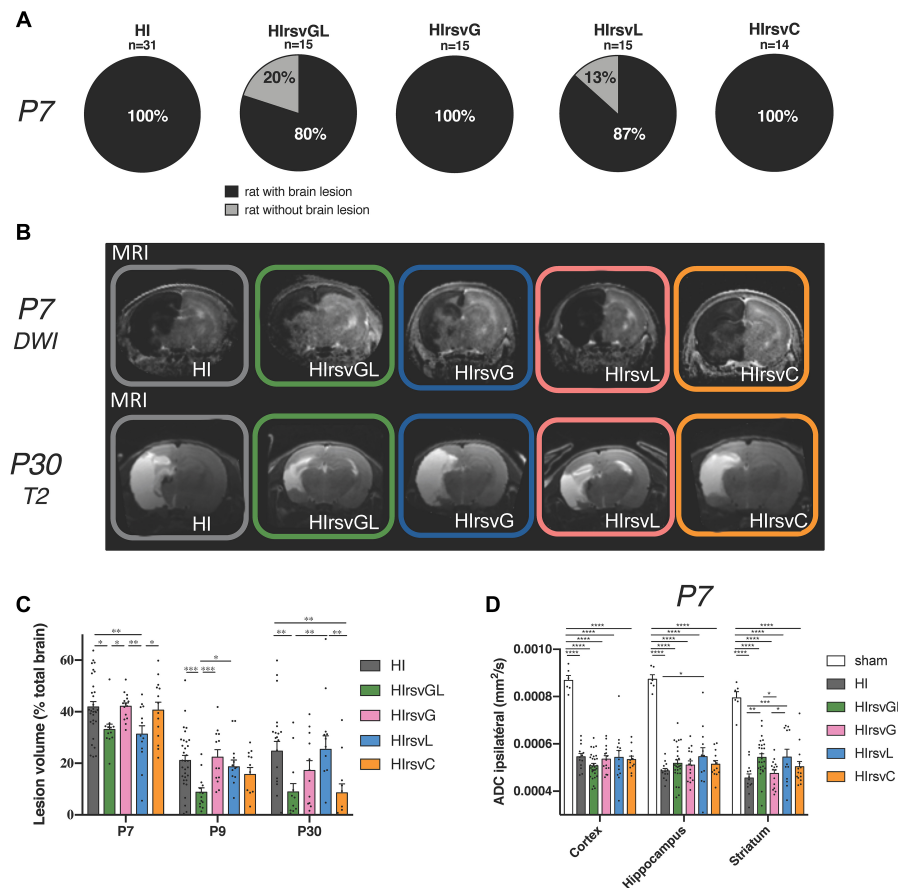


FIGURE 3 | Visualization and quantification of brain lesion volume with or without resveratrol treatment after a hypoxic-ischemic event. **(A)** Percentage of P7 pups with brain lesion for HI, HlrsvGL, HlrsvG, HlrsvL, and HlrsvC groups, 3 h after injury. Pups with brain lesion volume <1% of the total brain volume were considered without brain lesion. **(B)** ADC maps obtained after DWI at P7 (top) and T2-weighted images at P30 (bottom) of pup brains for HI, HlrsvGL, HlrsvG, HlrsvL, and HlrsvC groups, acquired on a 4.7 T magnet. DWI was systematically performed 3 h after the common carotid artery ligation. Damage appeared as a hyposignal at P7 (decrease in ADC values due to the edema and cell swelling) and as a hypersignal at P30 (necrotic zone, water and cell death). **(C)** Lesion volumes (% total brain volume) at P7 (3 h after the common carotid artery ligation; $n = 31$, $n = 12$, $n = 15$, $n = 13$, and $n = 15$ for HI, HlrsvGL, HlrsvG, HlrsvL, and HlrsvC groups, respectively), at P9 (48 h after the hypoxic-ischemic event; $n = 25$, $n = 14$, $n = 13$, $n = 14$, and $n = 12$ for HI, HlrsvGL, HlrsvG, HlrsvL, and HlrsvC groups, respectively), and P30 (23 days after the hypoxic-ischemic event; $n = 22$, $n = 13$, $n = 12$, $n = 13$, and $n = 12$ for HI, HlrsvGL, HlrsvG, HlrsvL, and HlrsvC groups, respectively). **(D)** ADC values (mm^2/s) in cortical, hippocampal and striatal lesions at P7. Results are mean values $\pm$ SEM. **(C,D)**: one-way analysis of variance (ANOVA) with Fisher's LSD *post hoc* test. *: Significant difference between two groups (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, and ****: $p < 0.0001$).

in both contralateral (right) and ipsilateral (left) structures (cortex: **Figure 5A**, hippocampus and striatum: **Supplementary Figures 3A, 4A**, respectively). A possible impact of maternal supplementation on glutamate uptake and astrocyte-neuron lactate shuttling was explored by quantification of MCT1, MCT2, LDHa, LDHb, GLAST, GLT1, and Na^+/K^+ ATPase α_2 subunit mRNA expression in both undamaged and damaged structures (cortex: **Figure 5B**, hippocampus and striatum: **Supplementary Figures 3B, 4B**, respectively). Independently of the considered structure, maternal resveratrol supplementation significantly enhanced SIRT1 mRNA expression in all structures of the undamaged hemisphere compared to sham and HI groups (increases of $53 \pm 13\%$, $45 \pm 7\%$, and $36 \pm 4\%$, compared to the sham group for cortical, hippocampal and striatal mRNA expressions, respectively) and only in the cortex of the ipsilateral hemisphere compared to the HI group. Whatever the considered

structure, no significant difference in SIRT1 mRNA expression was measured between the sham and HI groups, neither in the ipsilateral nor in the contralateral hemisphere. Bcl-2 mRNA expression was increased by RSV maternal supplementation, in the cortex and the hippocampus of the contralateral hemisphere and in the ipsilateral cortex (relative Bcl-2 expression increase compared to the sham group: $+67 \pm 15\%$, $+45 \pm 10\%$, and $+28 \pm 12\%$ in the contralateral cortex and hippocampus and ipsilateral cortex, respectively). The hypoxic-ischemic event *per se* did not modulate Bcl2 mRNA expression. In addition, SOD2 mRNA content was higher in the undamaged cortex of the HlrsvGL group (relative SOD2 expression increase compared to the sham group: $+31 \pm 6\%$). While its expression was not altered in the uninjured hippocampus, it was reduced in the striatum on the uninjured side by maternal RSV supplementation compared to the other groups. In the damaged

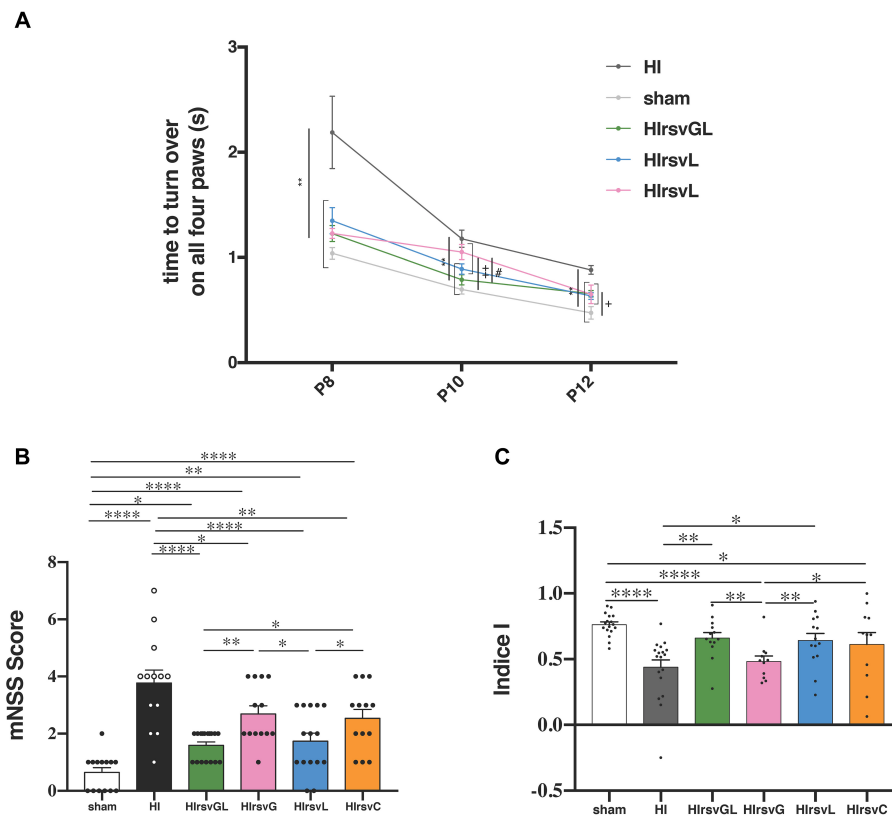


FIGURE 4 | Behavioral investigations. (A) Righting reflex for sham, HI, HlrsvGL, HlrsvG, and HlrsvL groups ($n = 23$, $n = 20$, $n = 17$, $n = 12$, and $n = 15$, respectively) at P8, P10, and P12. **(B)** mNSS score at P24 for sham, HI, HlrsvGL, HlrsvG, HlrsvL, and HlrsvC groups ($n = 14$, $n = 13$, $n = 17$, $n = 13$, $n = 15$, and $n = 13$, respectively). Scoring between 0 and 18 points with: <1, no impairment; 1–6, moderate impairment; 7–12, impairment and 13–18, severe impairment. *: different from the HI group (**: $p < 0.01$), +: different from the sham group (+: $p < 0.05$, ++: $p < 0.01$) and #: different from the HlrsvGL ($p < 0.05$). **(C)** Discrimination index of the novel object recognition test (performed at P45) for sham, HI, HlrsvGL, HlrsvG, HlrsvL, and HlrsvC groups ($n = 17$, $n = 17$, $n = 13$, $n = 10$, $n = 14$, and $n = 11$, respectively). Results are mean values $\pm$ SEM; one-way analysis of variance (ANOVA) with Fisher's LSD *post hoc* test. *: Significant difference between two groups (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, and ****: $p < 0.0001$).

hemisphere, hypoxia-ischemia induced a decrease of SOD2 mRNA expression, which was reversed by maternal resveratrol supplementation, in the cortex as well as in the striatum.

Concerning genes linked to glutamate transport and lactate shuttling, the resveratrol supplementation enhanced the astrocytic transporter MCT1 mRNA expression in the undamaged cortex (relative MCT expression increase compared to the sham group: $+31 \pm 11\%$). In all hypoxic-ischemic groups, the expression of MCT2 mRNA was not modified in the uninjured structures. In the damaged cortex, the maternal supplementation with resveratrol partly counteracted the decrease in MCT2 mRNA expression induced by hypoxia-ischemia. The decrease in MCT2 expression was entirely counteracted in the striatum of the damaged hemisphere. The LDHa mRNA expression was enhanced by resveratrol supplementation in the cortex and hippocampus of the contralateral hemisphere, compared to the sham group (relative LDHa expression increase compared to the sham group: $+45$ and $+53\%$ in cortex and hippocampus, respectively). In the cortex of the damaged hemisphere, maternal supplementation counteracted the decrease in LDHa mRNA expression induced

by hypoxia-ischemia. Concerning the LDHb gene, its mRNA expression in the contralateral hemisphere was increased in the cortex (relative LDHb expression increase compared to the sham and HI groups: $+31\%$) and was restored in the striatum, while maternal resveratrol supplementation had no effect in the hippocampus. In the injured hemisphere, the decrease in LDHb mRNA induced by hypoxia-ischemia was counteracted only in the cortex. Concerning glutamate transporters, GLAST mRNA expression was only increased by maternal resveratrol supplementation in the cortex of both hemispheres. GLT1 mRNA expression was increased by maternal resveratrol supplementation in the cortex and the hippocampus of the contralateral hemisphere (relative GLT1 expression increase compared to the sham group: $+30$ and $+32\%$, in the cortex and in the hippocampus, respectively). In the ipsilateral hemisphere, the decrease of its mRNA expression, induced by hypoxia-ischemia, was partially counteracted in the cortex by maternal resveratrol supplementation. Finally, concerning the expression of the Na^+/K^+ ATPase α_2 subunit mRNA, it was increased by maternal supplementation in the contralateral cortex and hippocampus ($+29$ and $+31\%$, respectively, compared to the

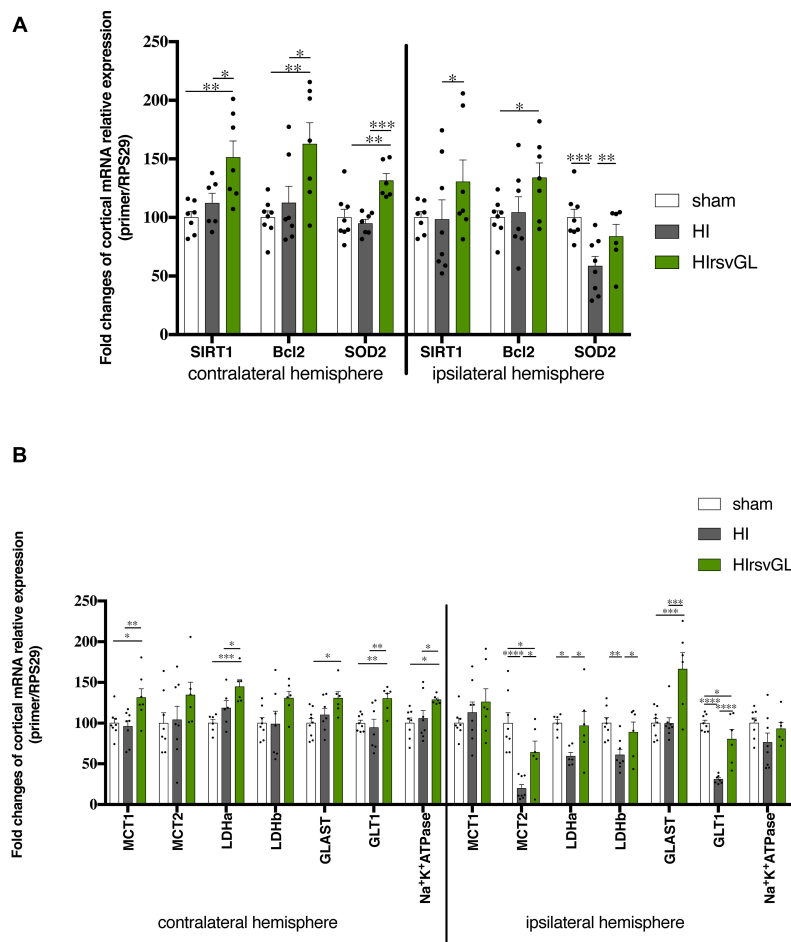


FIGURE 5 | Impact of maternal resveratrol supplementation on cortical mRNA expression of some genes linked to signaling or metabolism. RT-qPCR performed at P9 on cortical samples from contralateral and ipsilateral hemispheres of sham, HIrsvGL, and HI groups ($n = 6$ for each group, hippocampus and striatum data, see **Supplementary Figures 3, 4**). **(A)** Signaling pathway: SIRT1, Bcl2, and SOD2 mRNA levels were quantified using appropriate primer sequences (see **Table 1**). **(B)** Metabolic pathway: MCT1, MCT2, LDHa, LDHb, GLAST, GLT1, and Na⁺/K⁺-ATPase α_2 subunit mRNA levels were quantified using appropriate primer sequences (see **Table 1**). Results are mean values $\pm$ SEM and one-way analysis of variance (ANOVA) with Fisher's LSD *post hoc* test. *: Significant difference between two groups (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, ****: $p < 0.0001$).

sham group). No statistical difference was detected in the ipsilateral hemisphere.

Maternal Resveratrol Supplementation Increases Cortical Expression of Key Proteins Linked to the Astrocyte-Neuron Lactate Shuttle (ANLS)

Results at the mRNA level prompted us to further investigate if protein expression of key elements of the ANLS was modified. MCT1 protein expression showed no statistically significant change in both cortices independently of the condition whereas maternal resveratrol supplementation partially restored MCT2 protein expression altered by the hypoxic-ischemic event only in the ipsilateral hemisphere (**Figure 6**). This was not the case for LDHa, which exhibited a drop in protein expression after hypoxia-ischemia for both damaged and undamaged cortices that

was unaffected by the resveratrol treatment. However, maternal resveratrol supplementation increased LDHb protein levels in both cortices ($+99 \pm 30\%$ and $+146 \pm 53\%$ for contralateral and ipsilateral cortices compared to sham, respectively) although the hypoxic-ischemic event had no effect *per se*. Finally, for the astrocytic glutamate transporter GLAST, hypoxia-ischemia induced an up-regulation in the contralateral cortex ($+96 \pm 38\%$, compared to sham), which was unaffected by resveratrol supplementation. In the ipsilateral cortex, only a non-significant reduction in GLAST protein expression was observed after hypoxia-ischemia with a tendency to prevent this drop after the resveratrol treatment.

Maternal Resveratrol Supplementation Reduces Cell Loss

Typical Nissl staining of cortical brain sections at P9 from the sham, HI and HIrsvGL groups are shown in **Figure 7**, top panels

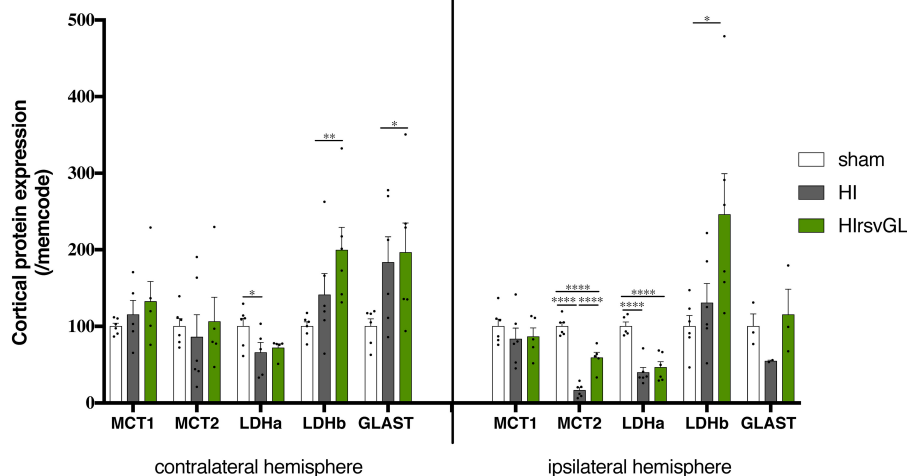


FIGURE 6 | Impact of maternal resveratrol supplementation on expression of key ANLS proteins. Cortical expression levels of MCT1, MCT2, LDHa, LDHb, GLAST, GLT1, and the Na⁺/K⁺-ATPase α_2 subunit proteins were quantified by Western blots ($n = 6$ for each group). Quantifications were normalized to Memcode staining. Results are mean values $\pm$ SEM and one-way analysis of variance (ANOVA) with Fisher's LSD *post hoc* test. *: Significant difference between two groups (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, and ****: $p < 0.0001$).

(striatum shown in **Supplementary Figure 5**, top panels). In the cortex and striatum, cell nuclei in the sham group displayed typical and homogenous morphologies. In the contralateral hemisphere, hypoxia-ischemia did not lead to significant cortical modification of Nissl staining but was responsible for a significant decrease in Nissl substance in the striatum (**Figure 7** for cortex and **Supplementary Figure 5** for striatum). In the ipsilateral hemisphere, several neuro-morphological changes were observed after the hypoxic-ischemic event in the HI group, with an increased number of pyknotic cells and a strong decrease in Nissl body content. Moreover, the number of Nissl stained nuclei was reduced in the HI group, in the injured cortex as well as in the injured striatum ($-81 \pm 4\%$ and $-42 \pm 2\%$, in the damaged cortex and striatum, respectively, compared to sham group, **Figure 7** bottom graph for cortex and **Supplementary Figure 5** bottom graph for striatum). Such a decrease in Nissl stained nuclei was not observed in the uninjured and injured cortices of the HIrsvGL group as well as in the undamaged striatum of the HIrsvGL group. However, the number of Nissl stained nuclei could not be totally preserved in the striatum of HIrsvGL group ($-31 \pm 1\%$, compared to sham group).

DISCUSSION

Neonatal cerebral hypoxia-ischemia is an important cause of neonatal death and brain disorders with lasting deficiencies. Brain hypoxia-ischemia during the neonatal period leads to well-documented damages of the affected brain regions due to complex biochemical cascades (Kohlhauser et al., 1999). These activated processes lead to excitotoxicity, oxidative stress, deficiency in ATP-dependent pumps and cell death. In this study, we focused on maternal resveratrol supplementation, using a nutritional dose of resveratrol (0.15 mg/kg/d), which

corresponds to the consumption of about 22 g of grapes (about thirty grape berries) per day for a pregnant woman (Dumont et al., 2020) and we followed brain lesions in P7-pups related to a hypoxic-ischemic event. In the HI group, the hypoxic-ischemic event induced severe lesions, since their volume represented around 40% of the total brain volume, as already characterized in this Rice-Vannucci model (Ashwal et al., 2007). Maternal resveratrol supplementation was tested during various time windows [the last week of gestation or/and the first week of lactation (preventive treatment) or the second week of lactation (curative treatment)]. Results indicated that the best neuroprotective effect was observed with the longest preventive supplementation period (HIrsvGL group), as already observed with piceatannol, an analog of resveratrol (Dumont et al., 2019). Indeed, MRI measurements at P7, 3 h post common carotid artery ligation, revealed a 21% decrease of brain lesion volume in the HIrsvGL group compared to the HI group. When resveratrol was administered during only 1 week (last week of gestation or first week of lactation), neuroprotection was not as strong as when it was administered during both weeks (HIrsvGL group). Concerning the incidence, 20% of the pups that underwent a hypoxic-ischemic insult in the HIrsvGL group had no brain lesion detected by DWI, whereas only 13% were without MRI detectable brain lesion in the HIrsvL group and 100% of the pups had brain lesions in the other groups. When looking at brain lesion volumes measured at short term, they were the smallest in the HIrsvGL group, and no statistical difference was found between the HI group (control) and the other groups treated during only 1 week. At long term, brain lesion volumes were the smallest in the HIrsvGL and HIrsvC groups, pointing out the long term effect of the curative treatment. Surprisingly, while a reduction in brain lesion volume was measured at short term between HIrsvL and HI groups, no difference was measured at long term. Finally, the mNSS test indicates that the smallest

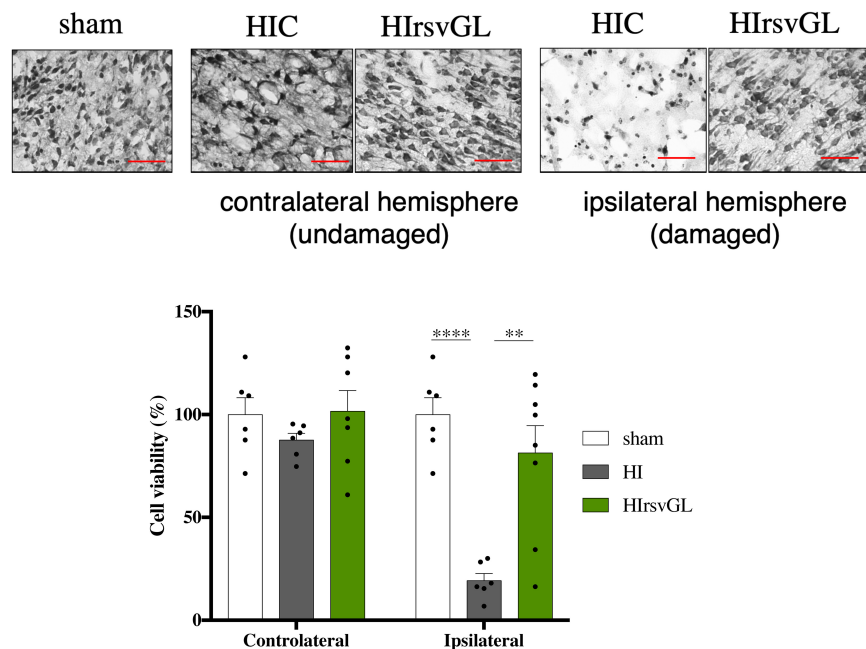


FIGURE 7 | Evaluation of cell loss with or without resveratrol treatment after a hypoxic-ischemic event. Top panels: Nissl staining of 16 μm -thick cortical brain sections. Several neuro-morphological changes are observed in the pups from the HI group, with increased numbers of pyknotic cells and less Nissl stained nuclei. Maternal resveratrol supplementation preserved the number of Nissl stained nuclei (i.e., viable cells). Magnification $\times 20$; scale bar: 100 μm . Bottom graph: Percentage of cell loss, based on the density of Nissl stained nuclei, for sham, HI, and HIRsvGL groups in either contralateral or ipsilateral cortex ($n = 6$). Results are mean values $\pm$ SEM, one-way analysis of variance (ANOVA) with Fisher's LSD *post hoc* test. *: Significant difference between two groups (**: $p < 0.01$ and ****: $p < 0.0001$).

neurological deficits were observed in the HIRsvGL and HIRsvL groups while in the NOR test, pups in the HIRsvGL, HIRsvL, and HIRsvC groups showed the best memory performances and no difference was observed between pups in the HI and HIRsvG groups. When resveratrol supplementation lasted only 1 week before the hypoxic-ischemic event, the best results were obtained in the HIRsvL group compared to the HIRsvG group suggesting that the neuroprotection is more efficient when the breastfeeding female is under supplementation when the hypoxic-ischemic event occurs in the pups. Taken altogether, our data clearly indicate that the best neuroprotection was obtained in the HIRsvGL group, therefore when resveratrol was administered for a longer period prior to the hypoxic-ischemic insult. Therefore, to maximize the probability to observe significant modifications, mRNA and protein expression were analyzed only in this group.

Nutritional Approach vs. Direct Treatment

Several publications have already reported that a direct pretreatment with resveratrol prevents neuronal injury in a similar context of nHI. In particular Arteaga et al. (2015) injected resveratrol (20 mg/kg; i.p.) in P7-pups just before hypoxia-ischemia (same Rice and Vannucci model) and they observed a 80% decrease in lesion volume 7 days after the insult ($30 \pm 2\%$ for hypoxic-ischemic group compared to $5 \pm 1\%$ for resveratrol-treated group 7 days after the insult). Moreover, Gao et al. (2018) showed that a daily dose of resveratrol to pups (low dose

20 mg/kg or high dose 40 mg/kg; i.p.) for 1 week before hypoxia-ischemia could reduce the lesion size and cerebral edema in pups. They observed at P14, when resveratrol was administered 3 h post hypoxic-ischemic insult, a 40%-reduction of the lesion size for a "low" dose of resveratrol and a 50%-reduction for a high dose of resveratrol. Resveratrol had neuroprotective effects leading to functional benefits since, in addition to reduce the number of pups with lesion and decrease the infarct area, it improved behavioral deficits caused by hypoxia-ischemia. Indeed, our results showed a better motricity, as well as memory with resveratrol treatment, similarly to the results reported by Karalis et al. (2011) This study showed that direct administration of resveratrol to pups (90 mg/kg; i.p.) immediately after the hypoxic-ischemic insult (at P7) significantly reduced brain injuries as well as short- and long-term behavioral impairments. Strikingly, 24 h after the hypoxic-ischemic insult, resveratrol-treated pups exhibited better performance in righting reflex in this latter study, similarly to our observations.

Our study demonstrates a significant neuroprotection that is comparable to the one reported in the literature in a similar neonatal hypoxic-ischemic model but after a direct treatment of pups. However, our approach is certainly more likely to be acceptable for a transfer to the clinic since the mode of administration of the treatment (in pregnant and/or breastfeeding female's drinking water compared to i.p. injection) is less invasive and the dose (our daily dose of 0.15 mg/kg compared to 20–100 mg/kg) is within a reasonable

nutritional range. An important point raised by the comparison between the literature and our results, is that the best results are observed when resveratrol is present at the time of the hypoxic-ischemic event. Indeed, in the HlrsvG group (resveratrol treatment was stopped 7 days before the hypoxic-ischemic insult), the neuroprotection was not as efficient as the one observed for HlrsvGL or HlrsvL groups, suggesting that the closest to the hypoxic-ischemic event the supplementation, the more neuroprotective.

Correlation Between Lesion Size and Behavioral Performance

MRI is a powerful technique that allows a longitudinal follow-up of animals. Such a non-invasive technique could thus be coupled with behavioral tests at different ages to correlate with cognitive performance. Indeed, images alone are not necessarily predictive of brain functions, since rat pups have a high neuronal plasticity, which allows them to spontaneously recover some brain capacities (Wittmann et al., 2004). Moreover, MRI does not allow to always detect brain lesions, especially when they are too small or diffused. Therefore, performing behavioral tests become mandatory. Pups from the HlrsvGL group exhibited the smallest lesion volumes and the best performances in all tests compared to the other groups. These results are in accordance with a previous study showing a greater reduction in brain damages and a better preservation of behavioral abilities after maternal piceatannol supplementation during gestation and breastfeeding than during breastfeeding alone (Dumont et al., 2019). Interestingly, pups from the HlrsvL group showed the same performance level than sham pups and pups from the HlrsvGL pups in behavioral tests, while their brain lesion volumes were bigger than the one measured in pups from the HlrsvGL group (at any time point), and not statistically different from the brain lesion volumes of pups from the HI group. These results clearly indicate that (i) MRI alone just after the insult may not be accurately predictive of eventual brain function impairments and (ii) behavioral tests are necessary to evaluate the potential neuroprotection of a tested treatment. Concerning the time window for maternal resveratrol supplementation, data (MRI and behavior) indicated that when the resveratrol supplementation was stopped 1 week before the neonatal hypoxic-ischemic event, the neuroprotective effect was the lowest. When resveratrol was present only during the last week of gestation (HlrsvG), pups displayed a significant decrease in lesion size only at P30 and minimal recovery of short-term behavioral performances (righting reflex and mNSS scores). However, this neuroprotection was not sufficient to protect the hippocampus since long-term memory was not preserved. These data could be explained by the fact that the CA1 area of the hippocampus is usually the most vulnerable structure, followed by the neocortex and then by the striatum (Smith et al., 1984).

Striatum-Specific Neuroprotective Effect

A hypoxic-ischemic insult leads to a deficiency in oxygen and glucose, inducing a decrease in ATP production and an alteration of all energetically dependent mechanisms. ATP-dependent

pumps are no longer efficient, which leads to an ionic imbalance and a cellular water influx responsible for cell swelling and, at a larger scale, to cytotoxic edema (Badaut et al., 2011). ADC values, which decrease during the first hours after the insult due to water movement restriction linked to the edema, were measured by DWI, in the three most affected structures (cortex, hippocampus and striatum). A decrease in ADC values was measured, as observed in previous studies (Miyasaka et al., 2000; McKinstry et al., 2002). However, this decrease was slightly lower in the striatum of pups from the HlrsvGL and HlrsvL groups, indicating that cytotoxic edema was less severe. This slight neuroprotective effect in pups has already been shown in another study, using the same model of nHI, with lactate as a neuroprotective agent (Roumes et al., 2020). This striatal-specific neuroprotective effect was also observed after a middle cerebral artery occlusion in the mouse, in which lactate injection led to a significant reduction of the lesion size, which was more pronounced in the striatum (Berthet et al., 2009). Indeed, Berthet et al. (2009) in order to understand why lactate protected mainly the striatum, measured lactate concentrations in each structure after lactate injection in healthy mice by MR spectroscopy; they showed that the lactate concentration was higher in the striatum. In addition, another study indicated that resveratrol decreased anoxia-induced dopamine release and appeared as a promising agent to improve the alterations occurring under anoxic-ischemic conditions in striatal sections by protecting dopaminergic neurons (Gursoy and Buyukuysal, 2008). Since dopamine is implicated in the development of an ischemic lesion in the striatum, a reduction of dopamine release may protect this structure against ischemic lesions (Globus et al., 1987).

Curative Treatment

Although maternal resveratrol supplementation administered before the hypoxic-ischemic event in pups was neuroprotective, we also wanted to test its potential curative effect. Therefore, a HlrsvC group was created, in which resveratrol was present in the drinking water of the breastfeeding female just after the neonatal hypoxic-ischemic event. Interestingly, even if administered after the insult, pups from the HlrsvC group had better mNSS scores and performed better in the novel object recognition test than pups from the HI group. Such a curative effect of resveratrol was also observed in the same context (and same model) but with a direct treatment (Pan et al., 2016). Indeed, 3 doses of resveratrol (100 mg/kg; i.p.) injected at 0, 8, and 18 h reduced the lesion sizes as well as the expression levels of key inflammatory factors and pro-apoptotic molecules. These data confirm that (i) MRI alone just after the insult is not a predictive technique of the sensory-cognitive-motor functions and (ii) it is necessary to evaluate the effectiveness of a therapeutic approach using a long-term evaluation.

Involvement of the “Classical” Sirtuin Pathway

To further understand the basis of these effects, we aimed at deciphering the molecular mechanisms involved in resveratrol

neuroprotection. It was shown that resveratrol could enter the cell by endocytosis *via* lipid rafts (Delmas et al., 2013; Neves et al., 2016), which are present on the plasma membranes of both neurons (Tsui-Pierchala et al., 2002) and astrocytes (Miller et al., 2020). However, once inside the cell, its mode of action is far from being fully understood. For this purpose, only pup's brains from the most effective supplementation regimen (HlrsvGL group) were analyzed in parallel with brains from sham and HI groups. As a first step, we focused on some targets from a signaling pathway, which is known to be regulated by resveratrol [SIRT1 (Lagouge et al., 2006), SOD (Toader et al., 2013), Bcl2 (Pan et al., 2016)]. Hypoxia-ischemia is characterized by two consecutive traumatic events: hypoxia-ischemia itself and the reperfusion period, which induces oxidative stress and ROS production (Ten and Starkov, 2012). This increase in oxidative stress leads to a dysfunction of the Na^+/K^+ -ATPase, brain edema and BBB disruption (Himadri et al., 2010). The Na^+/K^+ -ATPase plays a major role in the maintenance of intracellular electrolyte homeostasis and has been shown to be particularly sensitive to ROS-induced damages (Lima et al., 2009). In response to this insult, SOD, by stimulating the conversion of superoxide to hydrogen peroxide, is one of the main antioxidant defense systems to scavenge ROS (Wang et al., 2018). Studies have described that the expression of SOD is regulated by SIRT1 through deacetylation of the transcription factor FoxO3a and the transcriptional coactivator peroxisome proliferator-activated receptor γ -coactivator 1 α (PGC-1 α) (Olmos et al., 2013). In our model, the neonatal insult induced a decrease in SOD expression, which was partially counteracted by maternal resveratrol supplementation, which also enhanced SIRT1 levels. Our results agree with previous data reported by Shin et al. who showed that resveratrol protected from ischemic stroke by upregulating the SIRT1-PGC-1 α signaling pathway leading to an antioxidant effect under ischemic stress (Shin et al., 2012). In another study, using a P14-neonatal rat hypoxic-ischemic model, direct pre-treatment with resveratrol (20 or 40 mg/kg, for 7 consecutive days before hypoxic-ischemic induction) was shown to alleviate oxidative stress, in part by increasing SOD expression just after the hypoxic-ischemic event (Gao et al., 2018). Likewise, in an adult rat model of transient global cerebral ischemia, it has been reported that resveratrol (30 mg/kg; i.p. injections 7 days prior to ischemia) is neuroprotective and restores Na^+/K^+ -ATPase activity in the cortex and hippocampus back to normal levels (Simao et al., 2011). Activation of SIRT1 signaling during nHI by resveratrol was paralleled by an increased expression of Bcl2. A SIRT1-dependent increase in Bcl2 has also been reported in a stroke context after curcumin pretreatment and has been linked to anti-inflammatory properties (Miao et al., 2016). Similarly, in oxygen-glucose deprivation (OGD) injury models (primary cortical neurons), an upregulation of SIRT1 caused an increase in the anti-apoptotic Bcl2 expression and a decrease in the pro-apoptotic cleaved caspase-3 expression (Yan et al., 2013). In our study, the increase of SIRT1, Bcl2, and SOD2 expression was confirmed, as shown in previous studies, which explored the direct impact of resveratrol. These data confirm that our transgenerational and nutritional approach is as efficient as a

direct treatment and that similar upregulations of SIRT1, Bcl2, and SOD2 are observed in pup's brains when low doses of resveratrol were administered to the mother compared to a direct administration of much higher doses.

Impact of Maternal Resveratrol Supplementation on Neonatal Brain Metabolism

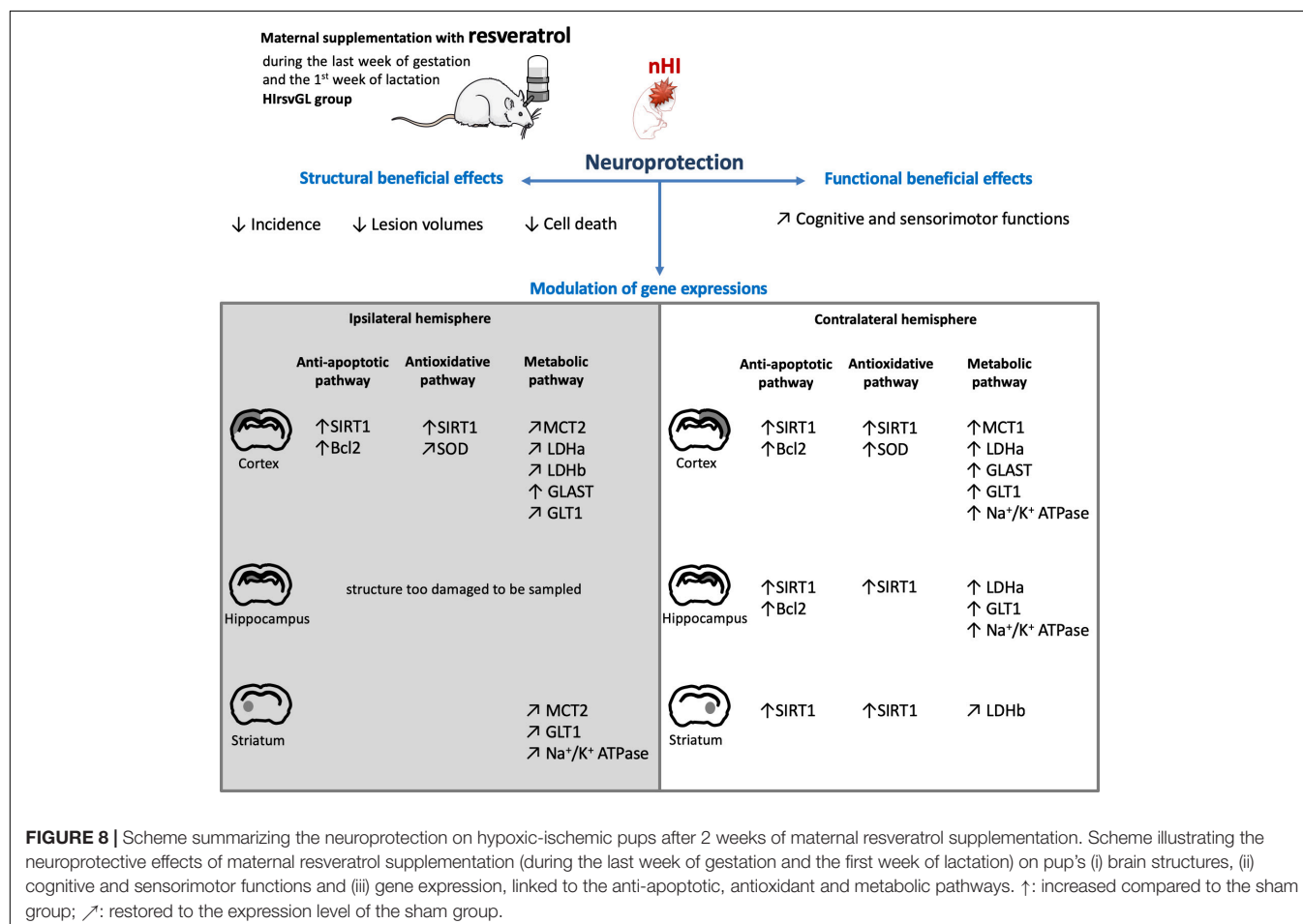
In a second step, we looked at the potential impact of maternal resveratrol supplementation on neonatal brain metabolism. Indeed, only a few studies have investigated the effect of resveratrol on cerebral metabolism under physiological or pathological conditions, and none looked at it in a transgenerational context. In a previous study, it was observed that transient forebrain ischemia in adult rat led to a decrease in GLT1 expression (Girbovan and Plamondon, 2015), the major astrocytic glutamate transporter. The decrease in astrocytic glutamate uptake induced by hypoxia-ischemia is responsible for glutamatergic excitotoxicity, which is a major cause of neuronal death. This decrease was reversed by resveratrol pretreatment (1 or 10 mg/kg dose; i.p.) (Girbovan and Plamondon, 2015). In our model, hypoxia-ischemia also induced a decrease in astrocytic GLT1 mRNA content in the damaged hemisphere, which was counteracted by maternal resveratrol supplementation. GLAST mRNA content was not downregulated by the neonatal hypoxic-ischemic event, but was upregulated by maternal resveratrol treatment (in both hemispheres). This upregulation of glutamate transporter mRNA expression by resveratrol may lead to a decrease in glutamatergic excitotoxicity promoting neuronal survival, as supported by the Nissl staining. Astrocytic glutamate uptake is also implicated in astrocyte-neuron metabolic interactions. Indeed, astrocytic glutamate reuptake (3 $\text{Na}^+/\text{glutamate}$ co-transport) after neuronal activity has been shown to activate astrocytic glycolysis (through the Na^+/K^+ -ATPase activation) and lactate production, which is transferred to neurons and used as a neuronal oxidative fuel (Pellerin and Magistretti, 1994). This lactate shuttling process is named ANLS for astrocyte-neuron lactate shuttle. Lactate is shuttled from astrocytes to neurons *via* monocarboxylate transporters (MCTs), with different isoforms exhibiting a preferential cellular localization (MCT2 on neurons, MCT1 on astrocytes and endothelial cells). In previous studies, we have shown that (i) resveratrol can activate glycolysis (*ex vivo* NMR spectroscopy study on perfused liver) (Beauvieux et al., 2013) and, more recently, (ii) that lactate is neuroprotective after a neonatal hypoxic-ischemic event (Roumes et al., 2020). Taken altogether, our results lead us to hypothesize that resveratrol supplementation, in addition to act through classical signaling pathways, may impact other metabolic pathways, and more particularly can modulate the expression of key partners involved in ANLS. Yet, our hypothesis is supported by the increase in mRNA levels of several key elements involved in the ANLS: the MCTs, the lactate dehydrogenase (LDH) isoforms (that converts pyruvate into lactate and *vice versa*), the astrocytic glutamate transporters (GLAST and GLT1) and the α_2 subunit of the Na^+/K^+ -ATPase. In the context of hypoxia-ischemia,

during the latent phase, lactate may act as an alternative fuel to counteract the energy deficit that occurred during the hypoxic-ischemic event. This is consistent with the increased expression of the LDHb isoform (which favors the conversion of lactate into pyruvate and therefore favors lactate consumption) at the protein level, and not the LDHa isoform (which favors pyruvate into lactate conversion, and therefore favors lactate production). There is a selective distribution of these two subunits of LDH, the isoenzyme LDH-5 (4 LDHa subunits) is more present in glycolytic tissues while the isoenzyme LDH-1 (4 LDHb subunits) is more predominant in oxidative tissues (Markert et al., 1975). Another study has shown that neurons have a strong content in LDHb-enriched isoenzymes while astrocytes have more LDHa-enriched isoenzymes (Bittar et al., 1996). The metabolic use of lactate as an energetic substrate for neurons would then allow to spare glucose for other important cellular repair mechanisms, such as the pentose phosphate pathway (PPP), which activity is crucial for the production of reduced glutathione, a ROS scavenger (Morken et al., 2014). PPP has a critical role in neuronal survival during cerebral ischemia/reperfusion as it produces crucial antioxidant molecules in order to reduce the oxidative stress and inflammation (Cao et al., 2017). Finally, lactate may have a neuroprotective effect through reducing excitotoxicity. Indeed,

it was recently shown on hippocampal slices that lactate in the medium can reduce neurotransmitter content at both excitatory and inhibitory synapses, thus limiting excitotoxicity, which is present during hypoxia-ischemia (Hollnagel et al., 2020). To conclude, we can hypothesize that resveratrol, in addition to its antioxidant, anti-apoptotic and anti-inflammatory properties, may also be neuroprotective by targeting key partners of the ANLS. However, a direct or indirect effect of resveratrol on brain metabolism and excitotoxicity still need to be further explored. In addition, we can not exclude a direct effect of resveratrol on the activities of some of these proteins [such as GLAST and GLT1, which are redox sensitive (Volterra et al., 1994; Hansel et al., 2014)].

Limitations of the Study

Although this study is the first one that shows a regulation by resveratrol of genes linked to brain metabolism in pups after maternal supplementation, it presents limitations since our interpretation was based mainly on cortical mRNA levels and ANLS-linked protein expression levels (but not activities) at only one time point. For some proteins, the expression levels did not vary completely in accordance with their mRNA levels. However, since the impact of a hypoxia-ischemia episode and the effect of resveratrol on mRNA and protein levels might not follow the



same time course, a more detailed study involving several time points (and in the different brain areas) would be necessary to clarify these issues.

CONCLUSION

The originality of our study was to combine different techniques (MRI, behavioral investigations, histology, gene and protein expression analyses) to characterize brain lesions and their functional consequences, and to decipher the molecular mechanisms behind this neuroprotection. Based on behavioral data, we can rank the different supplementation time-windows as followed: gestation + lactation > lactation $\cong$ curative > gestation. A scheme that summarizes the impact of the most effective supplementation on hypoxic-ischemic pups is presented in **Figure 8**. This 2 weeks-maternal supplementation allows to decrease the incidence and the volumes of brain lesions detected by MRI, the extent of cell loss and, more importantly, to preserve motor and cognitive abilities. Furthermore, in addition to the classical sirtuin pathway, this study shows for the first time, that resveratrol may modulate brain metabolism by upregulating some key components of the ANLS. Such a modulation could participate to the beneficial effect of resveratrol. Of note, our proposed nutritional and transgenerational approach to administer resveratrol could be of great interest in the search for a realistic and easily implementable neuroprotective strategy against the deleterious effects induced by nHI.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

REFERENCES

- Arteaga, O., Revuelta, M., Uriguen, L., Alvarez, A., Montalvo, H., and Hilario, E. (2015). Pretreatment with resveratrol prevents neuronal injury and cognitive deficits induced by perinatal hypoxia-ischemia in rats. *PLoS One* 10:e0142424. doi: 10.1371/journal.pone.0142424
- Ashwal, S., Tone, B., Tian, H. R., Chong, S., and Obenaus, A. (2007). Comparison of two neonatal ischemic injury models using magnetic resonance imaging. *Pediatr. Res.* 61, 9–14. doi: 10.1203/01.pdr.0000251612.16069.4b
- Badaut, J., Ashwal, S., and Obenaus, A. (2011). Aquaporins in cerebrovascular disease: a target for treatment of brain edema? *Cerebrovasc. Dis.* 31, 521–531. doi: 10.1159/000324328
- Bastianetto, S., Menard, C., and Quirion, R. (2015). Neuroprotective action of resveratrol. *Biochim. Biophys. Acta* 1852, 1195–1201. doi: 10.1016/j.bbdis.2014.09.011
- Baur, J. A., and Sinclair, D. A. (2006). Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 493–506. doi: 10.1038/nrd2060
- Beauvieux, M. C., Stephant, A., Gin, H., Serhan, N., Couzigou, P., and Gallis, J. L. (2013). Resveratrol mainly stimulates the glycolytic ATP synthesis flux and not the mitochondrial one: a saturation transfer NMR study in perfused and isolated rat liver. *Pharmacol. Res.* 78, 11–17. doi: 10.1016/j.phrs.2013.09.007

ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by Bordeaux Ethic Committee.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

UD acquired and analyzed the data and contributed to the final drafting of the manuscript. SS produced the hypoxic-ischemic neonate model. CR participated to Western blot and RTqPCR experiments. M-CB and J-FC contributed to the final drafting of the manuscript. LP contributed to the design of the experiments and wrote the manuscript. A-KB-S and HR conceived, designed, acquired, and analyzed the data and wrote the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This work was supported by grants (2018/01) from the Fondation de Recherche en Alcoologie (FRA), from the French State in the context of the “Investments for the Future” Programme IdEx (ANR-10-IDEX), the LabEx Translational Research and Advanced Imaging Laboratory (TRAIL) cluster of excellence of Bordeaux University (ANR-10-LABX-57), and the Department of Physiology, University of Lausanne. LP received financial support from the program IdEx Bordeaux ANR-10-IDEX-03-02.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2020.616824/full#supplementary-material>

- Berthet, C., Lei, H., Thevenet, J., Gruetter, R., Magistretti, P. J., and Hirt, L. (2009). Neuroprotective role of lactate after cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 29, 1780–1789. doi: 10.1038/jcbfm.2009.97
- Bian, H., Shan, H., and Chen, T. (2017). Resveratrol ameliorates hypoxia/ischemia-induced brain injury in the neonatal rat via the miR-96/Bax axis. *Childs. Nerv. Syst.* 33, 1937–1945. doi: 10.1007/s00381-017-3509-8
- Bittar, P. G., Charnay, Y., Pellerin, L., Bouras, C., and Magistretti, P. J. (1996). Selective distribution of lactate dehydrogenase isoenzymes in neurons and astrocytes of human brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 16, 1079–1089. doi: 10.1097/00004647-199611000-00001
- Bona, E., Hagberg, H., Loberg, E. M., Bagenholm, R., and Thoresen, M. (1998). Protective effects of moderate hypothermia after neonatal hypoxia-ischemia: short- and long-term outcome. *Pediatr. Res.* 43, 738–745. doi: 10.1203/00006450-199806000-00005
- Bourque, S. L., Dolinsky, V. W., Dyck, J. R., and Davidge, S. T. (2012). Maternal resveratrol treatment during pregnancy improves adverse fetal outcomes in a rat model of severe hypoxia. *Placenta* 33, 449–452. doi: 10.1016/j.placenta.2012.01.012
- Cao, L., Zhang, D., Chen, J., Qin, Y. Y., Sheng, R., Feng, X., et al. (2017). G6PD plays a neuroprotective role in brain ischemia through promoting pentose phosphate pathway. *Free Radic. Biol. Med.* 112, 433–444. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.08.011

- Das, S., and Das, D. K. (2007). Anti-inflammatory responses of resveratrol. *Inflamm Allergy Drug Targets* 6, 168–173. doi: 10.2174/187152807781696464
- Delmas, D., Aires, V., Colin, D. J., Limagne, E., Scagliarini, A., Cotte, A. K., et al. (2013). Importance of lipid microdomains, rafts, in absorption, delivery, and biological effects of resveratrol. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1290, 90–97. doi: 10.1111/nyas.12177
- Dumont, U., Sanchez, S., Olivier, B., Chateil, J. F., Deffieux, D., Quideau, S., et al. (2020). Maternal alcoholism and neonatal hypoxia-ischemia: neuroprotection by stilbenoid polyphenols. *Brain Res.* 1738:146798. doi: 10.1016/j.brainres.2020.146798
- Dumont, U., Sanchez, S., Olivier, B., Chateil, J. F., Pellerin, L., Beauvieux, M. C., et al. (2019). Maternal consumption of piceatannol: a nutritional neuroprotective strategy against hypoxia-ischemia in rat neonates. *Brain Res.* 1717, 86–94. doi: 10.1016/j.brainres.2019.04.012
- Ennaceur, A., and Delacour, J. (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: behavioral data. *Behav. Brain Res.* 31, 47–59. doi: 10.1016/0166-4328(88)90157-x
- Gao, Y., Fu, R., Wang, J., Yang, X., Wen, L., and Feng, J. (2018). Resveratrol mitigates the oxidative stress mediated by hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats via Nrf2/HO-1 pathway. *Pharm. Biol.* 56, 440–449. doi: 10.1080/13880209.2018.1502326
- Girbovan, C., and Plamondon, H. (2015). Resveratrol downregulates type-1 glutamate transporter expression and microglia activation in the hippocampus following cerebral ischemia reperfusion in rats. *Brain Res.* 1608, 203–214. doi: 10.1016/j.brainres.2015.02.038
- Globus, M. Y., Ginsberg, M. D., Dietrich, W. D., Busto, R., and Scheinberg, P. (1987). Substantia nigra lesion protects against ischemic damage in the striatum. *Neurosci. Lett.* 80, 251–256. doi: 10.1016/0304-3940(87)90463-0
- Gluckman, P. D., Wyatt, J. S., Azzopardi, D., Ballard, R., Edwards, A. D., Ferriero, D. M., et al. (2005). Selective head cooling with mild systemic hypothermia after neonatal encephalopathy: multicentre randomised trial. *Lancet* 365, 663–670. doi: 10.1016/s0140-6736(05)70932-6
- Gursoy, M., and Buyukuyal, R. L. (2008). Resveratrol protects rat striatal slices against anoxia-induced dopamine release. *Neurochem. Res.* 33, 1838–1844. doi: 10.1007/s11064-008-9645-5
- Hansel, G., Ramos, D. B., Delgado, C. A., Souza, D. G., Almeida, R. F., Portela, L. V., et al. (2014). The potential therapeutic effect of guanosine after cortical focal ischemia in rats. *PLoS One* 9:e90693. doi: 10.1371/journal.pone.0090693
- Himadri, P., Kumari, S. S., Chitharanjan, M., and Dhananjay, S. (2010). Role of oxidative stress and inflammation in hypoxia-induced cerebral edema: a molecular approach. *High Alt. Med. Biol.* 11, 231–244. doi: 10.1089/ham.2009.1057
- Hollnagel, J. O., Cesetti, T., Schneider, J., Vazetdinova, A., Valiullina-Rakhmatullina, F., Lewen, A., et al. (2020). Lactate attenuates synaptic transmission and affects brain rhythms featuring high energy expenditure. *iScience* 23:101316. doi: 10.1016/j.isci.2020.101316
- Karalis, F., Soubasi, V., Georgiou, T., Nakas, C. T., Simeonidou, C., Guiba-Tziampiri, O., et al. (2011). Resveratrol ameliorates hypoxia/ischemia-induced behavioral deficits and brain injury in the neonatal rat brain. *Brain Res.* 1425, 98–110. doi: 10.1016/j.brainres.2011.09.044
- Kohlhauser, C., Kaehler, S., Mosgoeller, W., Singewald, N., Kovelas, D., Prast, H., et al. (1999). Histological changes and neurotransmitter levels three months following perinatal asphyxia in the rat. *Life Sci.* 64, 2109–2124. doi: 10.1016/s0024-3205(99)00160-5
- Kurinczuk, J. J., White-Koning, M., and Badawi, N. (2010). Epidemiology of neonatal encephalopathy and hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Early. Hum. Dev.* 86, 329–338. doi: 10.1016/j.earlhumdev.2010.05.010
- Lagouge, M., Argmann, C., Gerhart-Hines, Z., Meziane, H., Lerin, C., Daussin, F., et al. (2006). Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 α . *Cell* 127, 1109–1122. doi: 10.1016/j.cell.2006.11.013
- Lebedev, S. V., Volodin, N. N., Blinov, D. V., Lazarenko, I. P., Rogatkin, S. O., and Chekhonin, V. P. (2003). Neurological deficit and disturbances in higher nervous activity during modeling of perinatal hypoxic-ischemic damage to the central nervous system in rat pups. *Bull. Exp. Biol. Med.* 136, 242–245. doi: 10.1023/b:bebm.000008973.15597.58
- Lima, F. D., Oliveira, M. S., Furian, A. F., Souza, M. A., Rambo, L. M., Ribeiro, L. R., et al. (2009). Adaptation to oxidative challenge induced by chronic physical exercise prevents Na⁺,K⁺-ATPase activity inhibition after traumatic brain injury. *Brain Res.* 1279, 147–155. doi: 10.1016/j.brainres.2009.04.052
- Markert, C. L., Shaklee, J. B., and Whitt, G. S. (1975). Evolution of a gene. Multiple genes for LDH isozymes provide a model of the evolution of gene structure, function and regulation. *Science* 189, 102–114. doi: 10.1126/science.1138367
- McKinstry, R. C., Miller, J. H., Snyder, A. Z., Mathur, A., Schefft, G. L., Almli, C. R., et al. (2002). A prospective, longitudinal diffusion tensor imaging study of brain injury in newborns. *Neurology* 59, 824–833. doi: 10.1212/wnl.59.6.824
- Miao, Y., Zhao, S., Gao, Y., Wang, R., Wu, Q., Wu, H., et al. (2016). Curcumin pretreatment attenuates inflammation and mitochondrial dysfunction in experimental stroke: the possible role of Sirt1 signaling. *Brain Res. Bull.* 121, 9–15. doi: 10.1016/j.brainresbull.2015.11.019
- Miller, Y. I., Navia-Pelaez, J. M., Corr, M., and Yaksh, T. L. (2020). Lipid rafts in glial cells: role in neuroinflammation and pain processing. *J. Lipid Res.* 61, 655–666. doi: 10.1194/jlr.tr119000468
- Miyasaka, N., Nagaoka, T., Kuroiwa, T., Akimoto, H., Haku, T., Kubota, T., et al. (2000). Histopathologic correlates of temporal diffusion changes in a rat model of cerebral hypoxia/ischemia. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* 21, 60–66.
- Morken, T. S., Brekke, E., Haberg, A., Wideroe, M., Brubakk, A. M., and Sonnewald, U. (2014). Neuron-astrocyte interactions, pyruvate carboxylation and the pentose phosphate pathway in the neonatal rat brain. *Neurochem. Res.* 39, 556–569. doi: 10.1007/s11064-013-1014-3
- Morris, D. C., Chopp, M., Zhang, L., Lu, M., and Zhang, Z. G. (2010). Thymosin β 4 improves functional neurological outcome in a rat model of embolic stroke. *Neuroscience* 169, 674–682. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.05.017
- Neves, A. R., Nunes, C., and Reis, S. (2016). Resveratrol induces ordered domains formation in biomembranes: implication for its pleiotropic action. *Biochim. Biophys. Acta* 1858, 12–18. doi: 10.1016/j.bbame.2015.10.005
- Nnam, N. M. (2015). Improving maternal nutrition for better pregnancy outcomes. *Proc. Nutr. Soc.* 74, 454–459. doi: 10.1017/s0029665115002396
- Olmos, Y., Sanchez-Gomez, F. J., Wild, B., Garcia-Quintans, N., Cabezudo, S., Lamas, S., et al. (2013). Sirt1 regulation of antioxidant genes is dependent on the formation of a FoxO3a/PGC-1 α complex. *Antioxid. Redox. Signal.* 19, 1507–1521. doi: 10.1089/ars.2012.4713
- Pan, S., Li, S., Hu, Y., Zhang, H., Liu, Y., Jiang, H., et al. (2016). Resveratrol post-treatment protects against neonatal brain injury after hypoxia-ischemia. *Oncotarget* 7, 79247–79261. doi: 10.18632/oncotarget.13018
- Pellerin, L., and Magistretti, P. J. (1994). Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 10625–10629. doi: 10.1073/pnas.91.22.10625
- Pierre, K., Pellerin, L., Debernardi, R., Riederer, B. M., and Magistretti, P. J. (2000). Cell-specific localization of monocarboxylate transporters, MCT1 and MCT2, in the adult mouse brain revealed by double immunohistochemical labeling and confocal microscopy. *Neuroscience* 100, 617–627. doi: 10.1016/s0306-4522(00)00294-3
- Rice, J. E. III, Vannucci, R. C., and Brierley, J. B. (1981). The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann. Neurol.* 9, 131–141. doi: 10.1002/ana.410090206
- Roumes, H., Dumont, U., Sanchez, S., Mazuel, L., Blanc, J., Raffard, G., et al. (2020). Neuroprotective role of lactate in rat neonatal hypoxia-ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1–17. doi: 10.1177/0271678X20908355
- Sawda, C., Moussa, C., and Turner, R. S. (2017). Resveratrol for Alzheimer's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1403, 142–149.
- Shankaran, S. (2012). Hypoxic-ischemic encephalopathy and novel strategies for neuroprotection. *Clin. Perinatol.* 39, 919–929. doi: 10.1016/j.clp.2012.09.008
- Shin, J. A., Lee, K. E., Kim, H. S., and Park, E. M. (2012). Acute resveratrol treatment modulates multiple signaling pathways in the ischemic brain. *Neurochem. Res.* 37, 2686–2696. doi: 10.1007/s11064-012-0858-2
- Simao, F., Matte, A., Soares, F. M., Wyse, A. T., Netto, C. A., et al. (2011). Resveratrol prevents oxidative stress and inhibition of Na⁺(K)⁺-ATPase activity induced by transient global cerebral ischemia in rats. *J. Nutr. Biochem.* 22, 921–928. doi: 10.1016/j.jnutbio.2010.07.013
- Smith, M. L., Auer, R. N., and Siesjö, B. K. (1984). The density and distribution of ischemic brain injury in the rat following 2–10 min of forebrain ischemia. *Acta Neuropathol.* 64, 319–332. doi: 10.1007/bf00690397

- Taylor, S. C., Berkelman, T., Yadav, G., and Hammond, M. (2013). A defined methodology for reliable quantification of Western blot data. *Mol. Biotechnol.* 55, 217–226. doi: 10.1007/s12033-013-9672-6
- Ten, V. S., and Starkov, A. (2012). Hypoxic-ischemic injury in the developing brain: the role of reactive oxygen species originating in mitochondria. *Neurol. Res. Int.* 2012:542976.
- Toader, A. M., Filip, A., Decea, N., and Muresan, A. (2013). Neuroprotective strategy in an experimental newborn rat model of brain ischemia and hypoxia: effects of Resveratrol and hypothermia. *Clujul. Med.* 86, 203–207.
- Tsui-Pierchala, B. A., Encinas, M., Milbrandt, J., and Johnson, E. M. Jr. (2002). Lipid rafts in neuronal signaling and function. *Trends Neurosci.* 25, 412–417. doi: 10.1016/s0166-2236(02)02215-4
- van de Looij, Y., Ginet, V., Chatagner, A., Toulotte, A., Somm, E., Huppi, P. S., et al. (2014). Lactoferrin during lactation protects the immature hypoxic-ischemic rat brain. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* 1, 955–967. doi: 10.1002/acn3.138
- Volterra, A., Trotti, D., Tromba, C., Floridi, S., and Racagni, G. (1994). Glutamate uptake inhibition by oxygen free radicals in rat cortical astrocytes. *J. Neurosci.* 14, 2924–2932. doi: 10.1523/jneurosci.14-05-02924.1994
- Wang, Y., Branicky, R., Noe, A., and Hekimi, S. (2018). Superoxide dismutases: dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *J. Cell Biol.* 217, 1915–1928. doi: 10.1083/jcb.201708007
- West, T., Atzeva, M., and Holtzman, D. M. (2007). Pomegranate polyphenols and resveratrol protect the neonatal brain against hypoxic-ischemic injury. *Dev. Neurosci.* 29, 363–372. doi: 10.1159/000105477
- Wicinski, M., Domanowska, A., Wodkiewicz, E., and Malinowski, B. (2020). Neuroprotective properties of resveratrol and its derivatives-influence on potential mechanisms leading to the development of Alzheimer's Disease. *Int. J. Mol. Sci.* 21:2749. doi: 10.3390/ijms21082749
- Wittmann, M., Burtcher, A., Fries, W., and von Steinbüchel, N. (2004). Effects of brain-lesion size and location on temporal-order judgment. *Neuroreport* 15, 2401–2405. doi: 10.1097/00001756-200410250-00020
- Wu, Y. W., and Gonzalez, F. F. (2015). Erythropoietin: a novel therapy for hypoxic-ischaemic encephalopathy? *Dev. Med. Child Neurol.* 57(Suppl. 3), 34–39. doi: 10.1111/dmcn.12730
- Yan, W., Fang, Z., Yang, Q., Dong, H., Lu, Y., Lei, C., et al. (2013). SirT1 mediates hyperbaric oxygen preconditioning-induced ischemic tolerance in rat brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 33, 396–406. doi: 10.1038/jcbfm.2012.179
- Zhu, Y., Liu, F., Zou, X., and Torbey, M. (2015). Comparison of unbiased estimation of neuronal number in the rat hippocampus with different staining methods. *J. Neurosci. Methods* 254, 73–79. doi: 10.1016/j.jneumeth.2015.07.022

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Dumont, Sanchez, Repond, Beauvieux, Chateil, Pellerin, Bouzier-Sore and Roumes. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

CHAPITRE IV : Effet neuroprotecteur d'une supplémentation maternelle en picéatannol dans le cadre de l'hypoxie-ischémie néonatale

Ce chapitre résume la publication « *Maternal consumption of piceatannol: A nutritional neuroprotective strategy against hypoxia-ischemia in rat neonates* » montrant les points clés et les principaux résultats obtenus.

1. Introduction

Dans le chapitre III présentant la publication « *Neuroprotective effect of resveratrol maternal supplementation in neonatal hypoxia-ischemia* », les effets neuroprotecteurs d'une supplémentation maternelle en RSV ont été démontrés dans le cadre de l'HI néonatale. Cependant, le RSV est très rapidement métabolisé dans l'organisme (glucuronisé, sulfaté et éliminé rapidement dans les urines), il présente donc une faible biodisponibilité [1]. La biodisponibilité est la fraction de RSV disponible pour l'organisme sous forme active et non-métabolisée. La question qui s'est posée est : Existe-t-il un polyphénol avec une biodisponibilité plus élevée, permettant une meilleure neuroprotection ?

Le PIC (3,3',4',5-trans-tétrahydroxystilbène) est un composé phénolique analogue du RSV avec un groupe hydroxyle supplémentaire en position 3' (figure 33).

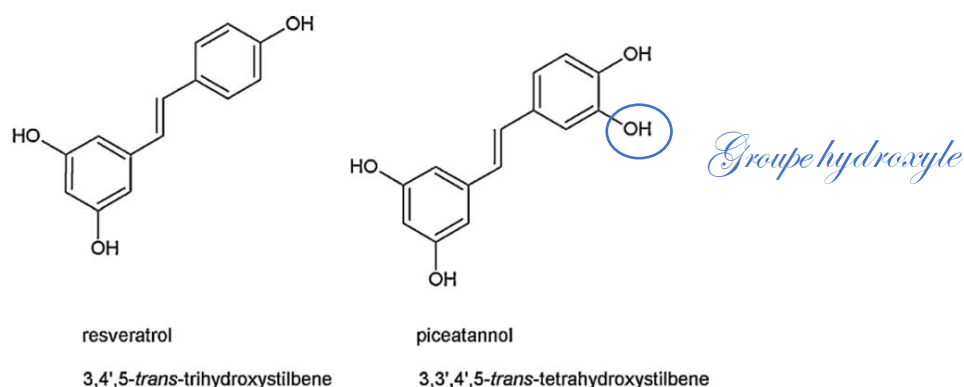


Figure 33: Structures chimiques du RSV et du PIC [2]

La présence d'un groupement hydroxyle supplémentaire au niveau 3' donne au PIC des propriétés antioxydantes plus importantes par rapport au RSV car il est moins métabolisé par les enzymes de détoxification [2, 3]. Le PIC est principalement présent dans le raisin, les fruits de la passion, la rhubarbe, les arachides, les baies et certaines espèces de champignons [4, 5]. Les effets neuroprotecteurs du PIC, présentant une meilleure biodisponibilité, ont donc été évalués au travers d'une étude nutritionnelle et transgénérationnelle. Comme pour l'étude sur le RSV, les volumes lésionnels ont été mesurés par IRM, la sévérité de l'œdème a été caractérisée par imagerie de diffusion et enfin les fonctions motrices et cognitives ont été évaluées au travers de divers tests de comportement.

Objectifs de la publication :

Les objectifs ici sont (i) de montrer un effet neuroprotecteur du PIC dans le cadre d'une HI néonatale *via* une supplémentation maternelle et (ii) de prouver que le PIC est un polyphénol avec des propriétés neuroprotectrices plus importantes que le RSV.

2. Méthodes

Le modèle de Rice et Vannucci utilisé pour caractériser l'accident d'HI est détaillé dans le chapitre II -1-1-2. Le PIC (0,15 mg/kg/jour) a été ajouté à l'eau de boisson des rates pendant différentes fenêtres temporelles.

Quatre groupes de rats ont été considérés et répartis en fonction de l'accident d'HI et de la supplémentation de la rate (figure 34).

- ◆ **sham** : aucune supplémentation maternelle en PIC et pas d'HI pour les rats.
- ◆ **Ct** : aucune supplémentation maternelle en PIC et HI pour les rats à P7.
- ◆ **picGL** : PIC dans l'eau de boisson pendant la dernière semaine de gestation (G) + la première semaine de lactation (L) (P-7 à P7) et HI pour les rats à P7.
- ◆ **picL** : PIC présent dans l'eau de boisson pendant la première semaine de lactation (L) (P0 à P7) et HI pour les rats à P7.

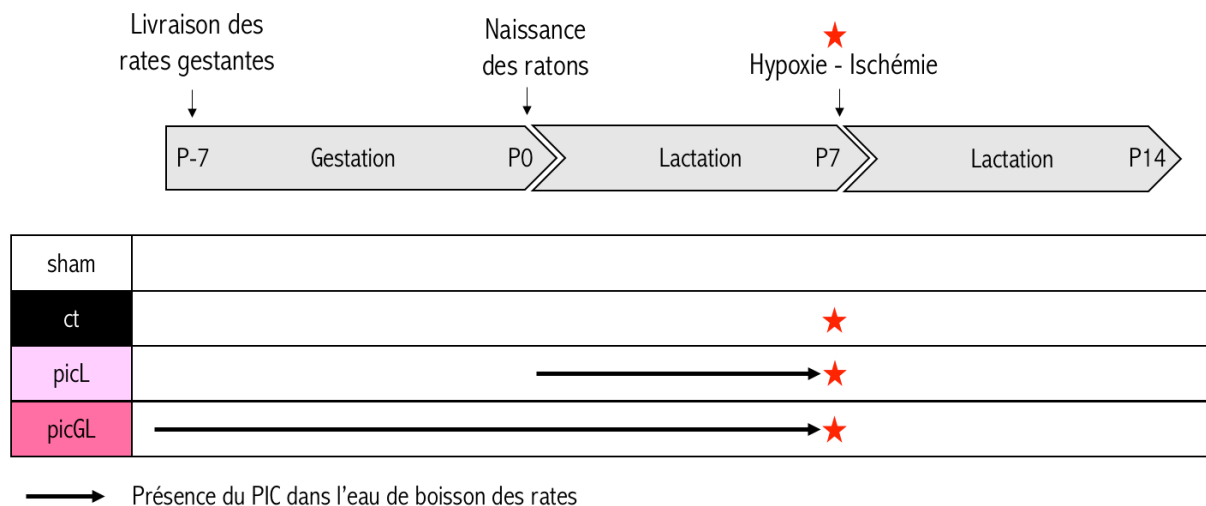


Figure 34: Récapitulatif des groupes expérimentaux répartis en fonction des fenêtres de supplémentation en PIC.

Le schéma expérimental résumant l'ensemble des méthodes utilisées sur les différents groupes de rats est présenté dans le chapitre II- 4- figure 23.

L'IRM, méthode non-invasive, permet (i) à court terme de mesurer le volume lésionnel cérébral et de déterminer la sévérité de l'œdème dans les structures du cerveau (*via* la mesure de l'ADC) et d'évaluer l'intégrité des fibres neuronales (*via* la mesure de la fraction d'anisotropie, FA) et (ii) de faire un suivi longitudinal de l'évolution des volumes lésionnels cérébraux des rats (P7, P9 et P30). Les fonctions cognitives et motrices ont été évaluées en parallèle par différents tests de comportement, sensorimoteurs et de mémoire, de P8 jusqu'à P45 (test du redressement, test de la locomotion (P8, P10, P12), le test du mNSS (P24) et test de la reconnaissance du nouvel objet (P45)). L'intégralité des tests est décrite dans le chapitre II-4.

Afin d'estimer la mort neuronale, des analyses histologiques *via* une coloration au crésyl violet ont été réalisées, à P9.

3. Résultats

Le nombre de rats présentant des lésions 3h après la ligature était de 100 % pour le groupe Ct, de 75 % pour le groupe picL et de 55 % pour le groupe picGL. De plus, parmi les rats présentant des lésions, les volumes lésionnels étaient plus petits pour les groupes supplémentés en PIC par rapport au groupe Ct (15 ± 6 % et 21 ± 6 % pour picL et picGL, respectivement vs 41 ± 3 % pour le groupe Ct) (figure 35 A/C). Tous les groupes ayant subi une HI ont présenté une chute de l'ADC dans la zone lésée, 3h post-ligature. Cette diminution d'ADC était cependant plus faible dans le cortex et le striatum pour le groupe picGL. De manière intéressante, 48h après l'accident d'HI, aucune différence significative n'a été observée entre les valeurs d'ADC du groupe sham et celles des groupes supplémentés (picL et picGL). De même, 48h-post HI, les volumes lésionnels des groupes supplémentés étaient significativement plus petits que ceux du groupe Ct et les volumes lésionnels ont diminué plus rapidement pour les deux groupes supplémentés (diminution des volumes lésionnels entre P7 et P9 : -50 %, -82 % et -63 % pour les groupes Ct, picL et picGL, respectivement) (figure 35 E).

Pour confirmer ces résultats au niveau cellulaire, une coloration de Nissl a été réalisée à P9 afin d'évaluer l'étendue de la mort neuronale dans la zone de pénombre. Au niveau du cortex, le niveau de mort neuronale était plus élevé pour le groupe Ct par rapport aux autres groupes (mort neuronale à P9 : 50 % pour le groupe Ct, 15 % pour les groupes picG et picGL). Au niveau du striatum, la mort neuronale n'a été mise en évidence que pour le groupe Ct (25 %) et aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les groupes picL, picGL et sham.

À long terme, 67 % des rats du groupe Ct présentaient encore des dommages cérébraux 23 jours post-HI, détectables à l'IRM en hypersignal (figure 35 B). Seulement 37 % des rats du groupe picL et 29 % des rats du groupe picGL présentaient encore des dommages lésionnels détectables à l'IRM (figure 35 D). En plus d'un taux d'incidence

plus élevé, le groupe Ct présentait aussi les volumes lésionnels les plus importants par rapport aux groupes supplémentés ($28 \pm 8 \%$, $3 \pm 2 \%$ et $2 \pm 2 \%$ pour les groupes Ct, picL et picGL, respectivement ; Figure 35 E). Quelle que soit la structure considérée, cortex, hippocampe ou striatum, le groupe Ct présentait des valeurs de FA significativement inférieures aux groupes picL et picGL (cortex : $0,30 \pm 0,02$ vs $0,42 \pm 0,05$, hippocampe : $0,29 \pm 0,01$ vs $0,44 \pm 0,06$ et striatum : $0,30 \pm 0,01$ vs $0,5 \pm 0,04$ pour Ct et picL/GL, respectivement).

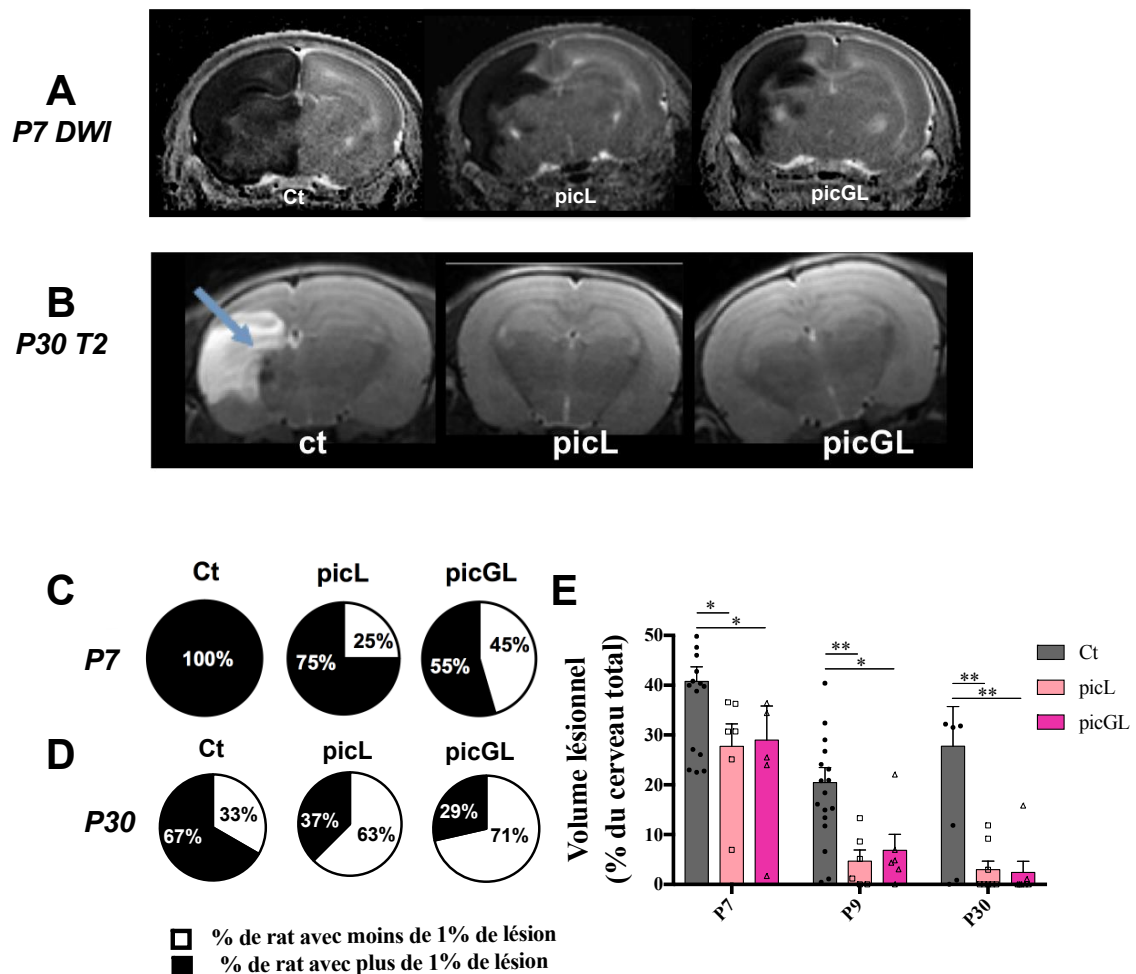


Figure 35: Effet neuroprotecteur à court et long terme d'une supplémentation maternelle en PIC après un accident d'HI à P7.

(A) IRM de diffusion (image de trace inversée) à P7 pour les rats 3h après la ligature de l'ACC gauche. La lésion apparaît en hyposignal pour chacun des groupes (HIC, picL et picGL). (B) IRM (T2) des lésions 23 jours après l'accident d'HI montrant la lésion en hypersignal (flèche bleue). (C) Pourcentage de rats ayant une lésion supérieure à 1 % du volume du cerveau (en noir) ou inférieure à 1 % (en blanc) à P7. (D) Pourcentage de rats ayant une lésion supérieure à 1 % (en noir) ou inférieure à 1 % (en blanc) à P30. À P7, seuls les rats ayant une lésion supérieure à 1 % sont comptabilisés dans les tailles de lésion. (E) Quantification des tailles de lésions pour chaque groupe en fonction du temps (P7, P9 et P30) calculées en % du volume total du cerveau. Les différences statistiques ont été définies comme $p < 0,05$ (* $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$).

Nos données d'imagerie ont mis en évidence un effet neuroprotecteur du PIC, *via* (i) une diminution de l'incidence des lésions, (ii) une réduction des volumes lésionnels, (iii) une diminution de la sévérité de l'œdème et (iv) une préservation de l'architecture neuronale.

→ Mais qu'en est-il de la fonctionnalité des structures ? Est-ce que cette neuroprotection mesurée par IRM est effective aussi au niveau fonctionnel ?

À court terme, aucune différence significative n'a été mesurée entre les groupes supplémentés et le groupe sham pour le test du redressement (figure 36 A), alors que les animaux du groupe Ct ont mis plus de temps à se remettre sur leurs quatre pattes. Les mêmes résultats ont été obtenus pour le test de la locomotion, seuls les rats du groupe Ct ont mis plus de temps que les autres pour dépasser le cercle de 25 cm. De plus, les groupes supplémentés ont même présenté de meilleurs résultats que le groupe sham (P10 : 60 ± 0 s, 48 ± 4 s, 35 ± 6 s et 24 ± 6 s et P12 : 40 ± 8 s, 22 ± 3 s, 23 ± 4 s et 12 ± 2 s pour les groupes HIC, sham, picGL et picL, respectivement).

À plus long terme, aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les groupes supplémentés (picL et picGL) et le groupe sham (figure 36 B). Concernant le mNSS, seul le groupe Ct a présenté un score plus élevé que les autres, reflétant une atteinte neurologique plus importante induite par l'HI ($3,5 \pm 0,7$ pour le groupe Ct contre $0,8 \pm 0,3$ et $0,7 \pm 0,4$ pour les groupes picL et picGL, respectivement). Le test de reconnaissance du nouvel objet n'a quant à lui montré aucune différence significative entre les groupes supplémentés et le groupe sham (figure 36 C). Les rats Ct ont par contre montré un indice de discrimination (I) significativement plus faible que les autres groupes (I : $0,77 \pm 0,04$, $0,47 \pm 0,01$, $0,68 \pm 0,01$ et $0,83 \pm 0,01$ pour les groupes sham, Ct, picL, et picGL, respectivement).

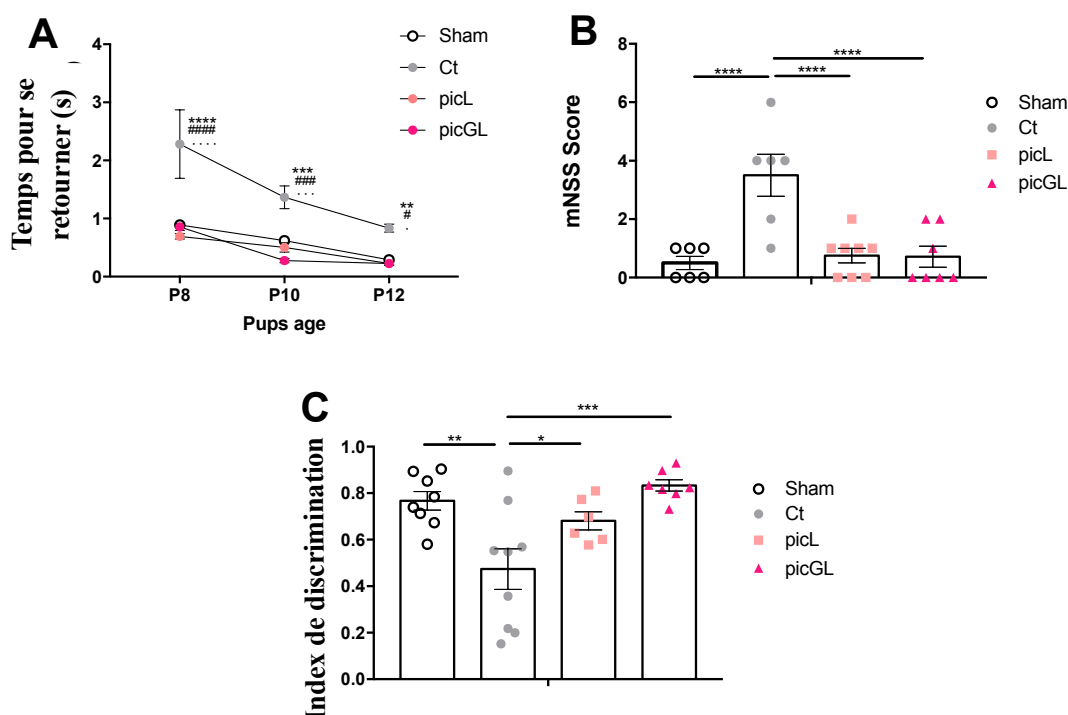


Figure 36 : Effet neuroprotecteur du PIC sur les fonctions motrices et cognitives à court et à long terme.

(A) Test du redressement à P8, P10 et P12 pour les groupes sham, Ct, picL et picGL. (B) Score du mNSS à P24 permettant d'évaluer les déficits neurologiques : plus le score est élevé plus les fonctions motrices et cognitives sont altérées (0-1: pas de déficits; 2-6: déficits modérés; 7-12: déficits; 13-18: déficits importants). (C) Test de reconnaissance du nouvel objet évaluant la mémoire à long terme à P42, P43, P44 et P45. Représenté par l'indice de discrimination (I). Les différences statistiques ont été définies comme $p < 0,05$ (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ et **** $p < 0,0001$).

4. Discussion

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés au PIC, un analogue du RSV. Jusqu'à présent, ce composé polyphénolique n'avait jamais été testé dans le cadre de l'HI néonatale. De surcroît, l'approche nutritionnelle et transgénérationnelle de l'étude marque son originalité. La neuroprotection *via* la supplémentation maternelle en PIC a été mise en évidence aussi bien à court terme (incidence des lésions, volumes lésionnels, ADC et réflexes précoces de P7 jusqu'à P12) qu'à long terme (volumes lésionnels, FA et fonctions cognitives et motrices de P30 à P45). Tous nos résultats démontrent que le PIC donné en supplémentation maternelle a induit (i) une réduction de l'incidence des lésions, (ii) une diminution des volumes lésionnels, (iii) un amoindrissement de la sévérité de l'œdème et (iv) une préservation des fonctions cognitivo-motrices.

Les effets neuroprotecteurs de cette supplémentation en PIC pourraient être dus à ses propriétés antioxydantes. Bien que les propriétés antioxydantes du RSV soient bien documentées dans la littérature, la mécanistique de l'action du PIC est nettement moins décrite. Son groupement hydroxyle additionnel lui confère une activité antioxydante plus élevée que celle du RSV [6, 7]. Il interagit donc de manière plus efficace avec les EROs, responsables de la mort neuronale.

Du fait de son homologie structurelle avec le RSV, le PIC pourrait, en parallèle, exercer son effet neuroprotecteur *via* une modulation du métabolisme cérébral (chapitre III). En effet, le PIC pourrait augmenter la recapture du glutamate *via* l'induction de l'expression de GLT1 et ainsi (i) diminuer l'excitotoxicité et (ii) stimuler la glycolyse astrocytaire. La production de lactate astrocytaire pourrait alors être utilisée comme source énergétique par les neurones. Le glucose pourrait alors emprunter préférentiellement la voie des pentoses phosphates (PPP) dans le neurone et exercer un effet antioxydant *via* le maintien d'un pool de glutathion réduit. Une étude *in vitro* a montré que la présence de RSV (1 à 30 μM) a permis de diminuer la concentration de EROs au niveau intracellulaire induit par un stress à l' H_2O_2 [8]. Il a également été montré que la stimulation de la glycolyse neuronale (et donc la diminution du métabolisme du glucose *via* la voie des PPP) augmentait la mort neuronale [9]. Cette hypothèse métabolique, pourrait être validée par l'analyse de l'expression génique et protéique des molécules clefs.

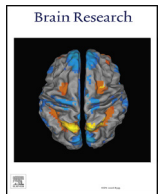
En résumé, le PIC présente des propriétés neuroprotectrices supérieures à celle du RSV puisque (i) l'incidence des lésions cérébrales était moindre, (ii) les volumes lésionnels étaient réduits et (iii) contrairement à la supplémentation en RSV qui ne confère une neuroprotection qu'à court terme pour le groupe rsvL, la neuroprotection obtenue par la supplémentation en PIC uniquement durant la lactation présente des effets aussi à long terme.

Ce qu'il faut retenir :

- ◆ La supplémentation maternelle en PIC montre des effets neuroprotecteurs supérieurs à ceux du RSV.
- ◆ Le groupement hydroxyle supplémentaire localisé en 3' est responsable de cette meilleure neuroprotection.
- ◆ La neuroprotection du PIC pourrait impliquer une régulation du métabolisme cérébral, comme cela a été démontré pour le RSV dans le chapitre III, mais ceci reste encore à être démontré.

5. Bibliographie et publication

1. Walle, T., et al., *High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans*. Drug Metab Dispos, 2004. **32**(12): p. 1377-82.
2. Piotrowska, H., M. Kucinska, and M. Murias, *Biological activity of piceatannol: leaving the shadow of resveratrol*. Mutat Res, 2012. **750**(1): p. 60-82.
3. Aayush Kukreja, N.W.a.A.T., *Therapeutic Role of Resveratrol and Piceatannol in Disease Prevention*. Journal of Blood Disorders and Transfusion, 2014. **5**(9).
4. L. Bavaresco, M.F., M. Trevisan, F. Mattivi, U. Vrhovsek and R. Falchetti, *The occurrence of the stilbene piceatannol in grapes*. Vitis- Geilweilerhof, 2002. **41**: p. 133 - 136.
5. Matsui, Y., et al., *Extract of passion fruit (Passiflora edulis) seed containing high amounts of piceatannol inhibits melanogenesis and promotes collagen synthesis*. J Agric Food Chem, 2010. **58**(20): p. 11112-8.
6. Cai, Y.J., et al., *The 3,4-dihydroxyl groups are important for trans-resveratrol analogs to exhibit enhanced antioxidant and apoptotic activities*. Anticancer Res, 2004. **24**(2B): p. 999-1002.
7. Rossi, M., et al., *Crystal and molecular structure of piceatannol; scavenging features of resveratrol and piceatannol on hydroxyl and peroxy radicals and docking with transthyretin*. J Agric Food Chem, 2008. **56**(22): p. 10557-66.
8. Daverey, A. and S.K. Agrawal, *Pre and post treatment with curcumin and resveratrol protects astrocytes after oxidative stress*. Brain Res, 2018. **1692**: p. 45-55.
9. Herrero-Mendez, A., et al., *The bioenergetic and antioxidant status of neurons is controlled by continuous degradation of a key glycolytic enzyme by APC/C-Cdh1*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(6): p. 747-52.



Research report

Maternal consumption of piceatannol: A nutritional neuroprotective strategy against hypoxia-ischemia in rat neonates

Ursule Dumont^a, Stéphane Sanchez^a, Benjamin Olivier^a, Jean-François Chateil^a, Luc Pellerin^{a,b}, Marie-Christine Beauvieux^a, Anne-Karine Bouzier-Sore^{a,1}, Hélène Roumes^{a,*,1}

^a CRMSB, UMR 5536, CNRS/University of Bordeaux, 146 Rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex, France

^b Department of Physiology, 7 Rue du Bugnon, CH1005 Lausanne, Switzerland



HIGHLIGHTS

- Piceatannol ingestion decreases incidence of neonatal hypoxia-ischemia brain damage.
- Piceatannol maternal supplementation decreases severity of brain damage in pups.
- Piceatannol preserves motor and cognitive functions after neonatal hypoxia-ischemia.
- Maternal supplementation with piceatannol is neuroprotective in neonatal hypoxia-ischemia.

ARTICLE INFO

Keywords:

Neuroprotection
Neonatal hypoxia-ischemia
Maternal supplementation
Piceatannol
Magnetic resonance imaging
Behavior

ABSTRACT

Hypoxia-ischemia (HI) remains a major cause of perinatal mortality and chronic disability in newborns worldwide (1–6 for 1000 births) with a high risk of future motor, behavioral and neurological deficits. Keeping newborns under moderate hypothermia is the unique therapeutic approach but is not sufficiently successful as nearly 50% of infants do not respond to it. In a 7-day post-natal rat model of HI, we used pregnant and breastfeeding female nutritional supplementation with piceatannol (PIC), a polyphenol naturally found in berries, grapes and passion fruit, as a neuroprotective strategy. Maternal supplementation led to neuroprotection against neonate brain damage and reversed their sensorimotor deficits as well as cognitive impairments. Neuroprotection of per os maternal supplementation with PIC is a preventive strategy to counteract brain damage in pups induced by HI. This nutritional approach could easily be adopted as a preventive strategy in humans.

1. Introduction

Hypoxia-ischemia (HI) remains a major cause of perinatal mortality and chronic disability in newborns worldwide (1–6/1000 births) with a high risk of future motor, behavioral and neurological deficits (Kurinczuk et al., 2010; Davidson et al., 2015). Despite this alarming socio-sanitary problem that affects both full-term and premature human neonates, the only commonly used therapy is based on controlled and moderate hypothermia. This unique therapeutic approach is not sufficiently successful as nearly 50% of infants do not respond to it (Wu and Gonzalez, 2015). Therefore, it is imperative to develop new therapeutic

strategies to reverse/prevent the sequelae of neonatal HI.

Accruing evidence indicates that polyphenols could play a neuroprotective role of in the context of HI, especially resveratrol (RSV) (Loren et al., 2005; West et al., 2007; Karalis et al., 2011; Arteaga et al., 2015), but very little is known about its catecholic analog, piceatannol (PIC – 3,3',4,5'-*trans*-tetrahydroxystilbene), which occurs naturally in berries, grapes and passion fruit. PIC has greater bioavailability than RSV and its biological activity is much more effective (Kukreja et al., 2014;5.).

HI induces brain deprivation of oxygen and the supply of the energetic substrate. In turn, this reduces ATP content and leads to a

* Corresponding author.

E-mail addresses: ursule.dumont@rmsb.u-bordeaux.fr (U. Dumont), stephane.sanchez@rmsb.u-bordeaux.fr (S. Sanchez), benjamin.olivier@rmsb.u-bordeaux.fr (B. Olivier), jean-francois.chateil@chu-bordeaux.fr (J.-F. Chateil), Luc.Pellerin@unil.ch (L. Pellerin), marie-christine.beauvieux@chu-bordeaux.fr (M.-C. Beauvieux), anne-karine.bouzier-sore@rmsb.u-bordeaux.fr (A.-K. Bouzier-Sore), helene.roumes@rmsb.u-bordeaux.fr (H. Roumes).

¹ Same contribution.

<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.04.012>

Received 18 January 2019; Received in revised form 11 April 2019; Accepted 13 April 2019

Available online 13 April 2019

0006-8993/© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

deficiency in ATP-dependent pumps and to cytotoxic edema. This cascade impacts the cerebral metabolism and causes neuronal death. While blood glucose is known to be the preferential substrate for the brain, lactate is increasingly thought to provide substantial brain energy fuel. This novel metabolic concept was first proposed by Pellerin and Magistretti (1994). As part of the astrocyte-neuron lactate shuttle (ANLS) as it is known, glucose taken from the circulation is first metabolized to lactate in the astrocytes, which are more glycolytic cells (Bouzier-Sore and Pellerin, 2013). Astrocytic lactate is then shuttled to the neurons, which are more oxidative cells, where it is converted into pyruvate and used as an energetic oxidative substrate. Interestingly, RSV has been shown to increase glycolysis (and therefore lactate production) in the brain, leading to a neuroprotective effect in a mouse model of middle cerebral artery occlusion (Koronowski et al., 2017).

The aim of the present work was to study the effect of a maternal supplementation with PIC on HI encephalopathy in rat neonates. For this purpose, we supplemented pregnant and breastfeeding females with PIC during the last week of gestation or during the last week of gestation and the first week of lactation. We used the classical Rice-Vannucci rat model (Rice et al., 1981) to induce HI brain injury in seven-day-old pups (P7). We evaluated neonatal brain damage and its evolution *in vivo* with magnetic resonance imaging (MRI). Brain lesions were characterized using diffusion-weighted imaging (DWI), a non-invasive technique. We evaluated the effects of PIC maternal supplementation on brain function in the same pups using motor and behavioral studies. No study has yet explored the possible neuroprotective role of PIC in the context of neonatal HI, especially with this original nutritional and transgenerational approach.

2. Results

2.1. Cerebral lesions induced by HI

DWI of P7-pup brains for sham and control (Ct) groups 3 h post-ligation is presented in Fig. 1A. No brain injury was visible in the sham group. In the Ct group, HI induced brain damage (white arrow). In the Ct group, HI lesions involved $41 \pm 3\%$ of the total brain (Fig. 1B). The severity of the HI edema was evaluated by ADC measurements (Fig. 1C). In all structures, ADC was significantly reduced in the Ct group compared to the sham group.

2.2. Early neuroprotection with maternal PIC supplementation

DWI of P7-pup brains is presented Fig. 2A. At P7 and P9, the volume of damaged brain (% normalized to total brain volume) was measured (Fig. 2B). Pups in the Ct group had the largest lesions compared to those in the picL and picGL groups (P7: $40.8 \pm 2.9\%$, $20.8 \pm 5.6\%$, and $15.9 \pm 5.8\%$, for Ct, picL, and picGL groups, respectively; and P9: $20.3 \pm 2.9\%$, $3.5 \pm 1.8\%$, and $5.9 \pm 2.9\%$, for Ct, picL, and picGL groups, respectively). The percentage of rats that had brain damage in each group is shown in Fig. 2C. In the Ct group, all pups had brain lesions (100%) whereas only 75% and 55% had HI damage in the picL and picGL groups, respectively. Considering only the pups that underwent the initial brain lesion, we were still able to detect a statistical difference between the control and PIC groups (Fig. 2D). ADC maps (Fig. 2E) were acquired by DWI and ADC values (Fig. 2F) were measured in the cortex, hippocampus and striatum at P7 and P9 to characterize the brain edema induced by HI. ADC measures the speed of water molecule diffusion in the extracellular environment in mm^2/s ; the lower the value, the more severe the edema. At P9, ADC values in the Ct group were still much lower in all structures than those in the sham group. In the picL and picGL groups, ADC values returned to those of the sham group. To confirm our data at the cellular level, we performed Nissl staining to evaluate neuronal death at P9 in the penumbra region (Table 1). In the cortical region, there was a 50% drop in the number of neurons in the Ct group compared to the sham group, and

only a 15% drop in the picL and picGL groups. In the striatum, while there was a 25% drop in the number of neurons in the Ct group compared to the sham group, picL and picGL groups had the same number of neurons than the sham group.

2.3. Long-term neuroprotective effect of maternal PIC supplementation

Angiography performed at P7 confirmed carotid ligation, while at P30 it revealed vascular recovery and rearrangement in the PIC groups (Fig. 3A). At P30, a blood vessel gap in the ipsilateral hemisphere was observed (Fig. 3A, white arrow) due to brain necrosis (blue arrow on the corresponding T2-weighted image). At P30, 67% of Ct rats still had brain damage, compared to 37% and 29% in the picL and picGL groups, respectively (Fig. 3B). The Ct group still had the highest lesion sizes compared to the PIC groups (P30 lesion sizes: $27.8 \pm 7.9\%$, $3.0 \pm 1.7\%$ and $2.4 \pm 2.2\%$ for Ct, picL and picGL groups, respectively, Fig. 3C). To assess the white matter reorganization, fractional anisotropy (FA) was measured at P30 (Fig. 3D). FA values range from 0 (isotropic diffusion) to 1 (anisotropic diffusion) and allow white fiber arrangements to be assessed. A decrease in FA is generally attributed to a loss of neuronal fibers. For all brain structures considered, the Ct group had lower FA than the PIC groups. Since not enough lesions were detected at P30 in the picL and picGL groups, and because no significant difference was found between these two groups, data from the picL and picGL groups were pooled.

2.4. Restoration of motor abilities and recovery of cognitive functions with maternal PIC supplementation

Early reflex tests were performed from P8 to P12 (Fig. 4A and B). The Ct group had significantly the worst performances on the righting reflex test, compared to the sham, picL and picGL groups (Fig. 4A). No difference was found between the sham group and the PIC groups. Similarly, the Ct group took the longest to leave a 25-cm diameter circle during the locomotion test, whereas the PIC groups were the fastest (Fig. 4B).

Sensorimotor deficits were also assessed at P24 using the mNSS (Fig. 4C). This test allows the evaluation of sensory, motor and reflex performances. Scoring ranges between 0 (no impairment) to 18 (most severe impairment). The mNSS values of the Ct group were significantly higher compared to the picL and picGL groups (3.5 ± 0.7 ; 0.8 ± 0.3 ; 0.7 ± 0.4 for Ct, picL, and picGL groups, respectively). No difference was found between the sham and PIC groups.

The novel object recognition test was performed at P45 and a discrimination index was calculated (Fig. 4D). No difference was found between the sham and PIC groups whereas pups in the Ct group clearly showed impairment in their long-term memory (discrimination index: 0.77 ± 0.04 ; 0.47 ± 0.01 ; 0.68 ± 0.01 ; 0.83 ± 0.01 , for sham, Ct, picL, and picGL, respectively).

3. Discussion

In this study, we focused on PIC, a less well known and studied hydroxylated analog of RSV. Its bioavailability (Kukreja et al., 2014; Rossi et al., 2008; Piotrowska et al., 2012; Murias et al., 2005) is greater than that of RSV, but it has not been tested to date in the context of neonatal HI nor by a nutritional and transgenerational approach. Neuroprotection by maternal PIC supplementation was observed in HI pups as early as 3 h post-injury, thus demonstrating its short-term effect. Although MRI values in brain lesions (lesion size, ADC, FA) did not allow the picL and picGL groups to be discriminated, fewer pups in the picGL group developed cerebral damage, suggesting that the longer the PIC is administered, the better is the neuroprotection. While a spontaneous 50% decrease in lesion size was observed in the Ct group during the 48 h after the injury, the recovery was much higher in the PIC groups (90% and 85% reduction of brain lesions in picL and picGL

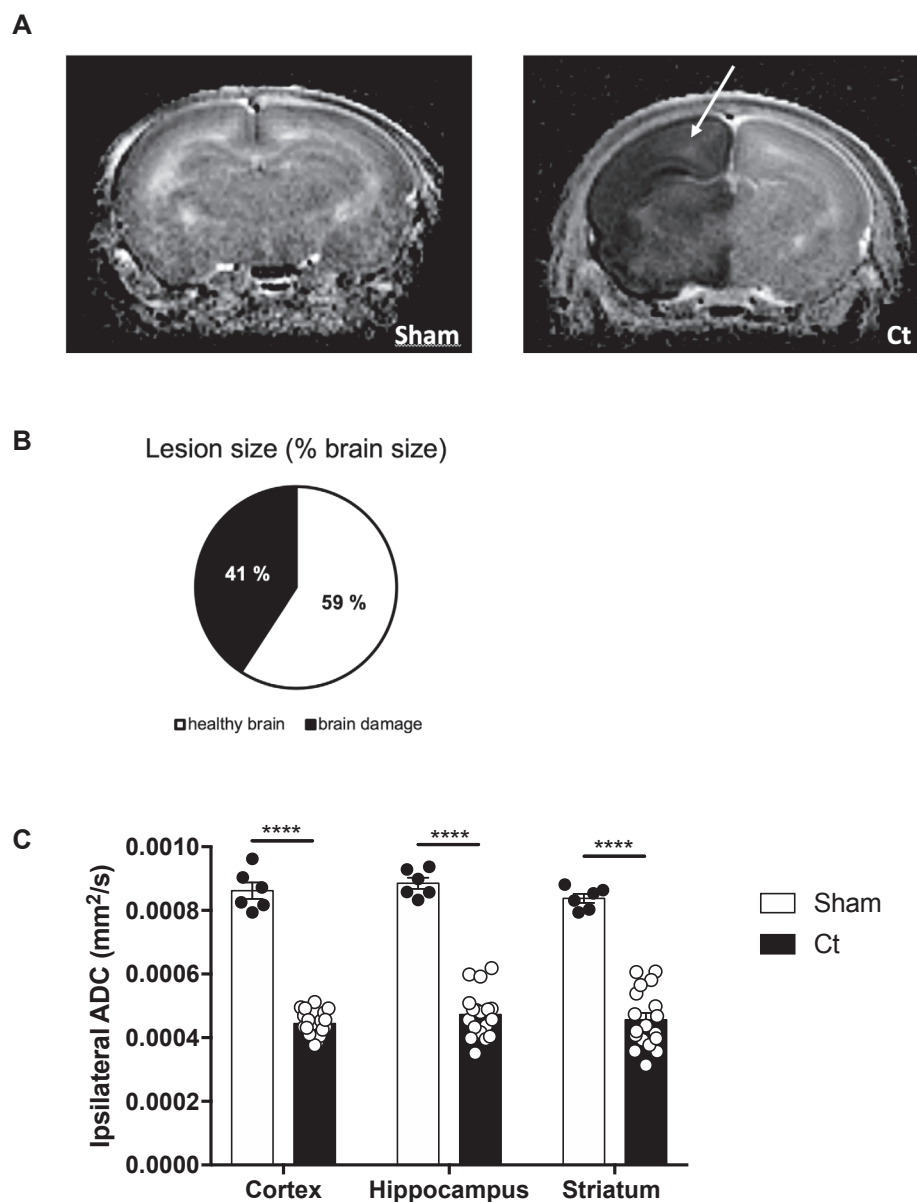


Fig. 1. Anatomical characterization of neonate brain injuries following HI episode. (A) Typical diffusion-weighted images of P7 pup brains of sham and Ct groups. Images were obtained at 4.7 T, 3 h after injury. Damage appeared as a hyposignal (white arrow). (B) Quantification of lesion volumes for Ct group (%), normalized to total brain volume). (C) Ipsilateral ADC values in mm^2/s for sham and Ct groups in cortex, hippocampus and striatum. Results are mean values $\pm$ SEM. * Significant difference between two groups (**** $p < 0.0001$), one-way analysis of variance (ANOVA) with Fisher's LSD post-hoc test; $n = 6$ sham pups, $n = 18$ Ct pups).

groups, respectively).

In addition to measurements of brain lesion size, DWI provides insights into physical parameters that reflect edema severity (the lower the ADC, the greater the edema) and neuronal fiber integrity (the higher the FA, the more neuronal fibers are preserved). Indeed, the deficit in oxygen and nutrients occurring during HI induces a decrease in metabolism and thus in ATP content. ATP-dependent pumps are no longer efficient, which leads to an ionic disequilibrium and water influx. This cellular swelling is called cytotoxic edema and occurs very early after stroke. It is characterized by swelling of both astrocytes and neuronal dendrites (Badaut et al., 2011; Zador et al., 2009). Typically, ADC values decrease within minutes of brain injury due to water movement restriction in this cytotoxic edema, a phenomenon that was observed in our study as soon as 3 h after ligation in all groups. During the 48 h after HI, ADC values follow a dynamic process and tend to recover, a phenomenon called pseudonormalization (Lodygensky et al., 2008). In our study, we found a statistically significant increase in ADC

values between P7 and P9 in all HI groups. However, the recovery was complete only in the PIC groups. Finally, neuronal death, which was evaluated at P9 by histology, confirmed our MRI results at the cellular level. Taken together, all these data demonstrate that maternal PIC supplementation leads to the following (i) a reduction in the number of pups with brain lesions; (ii) a reduction in brain lesion size when brain lesions are present in PIC groups; (iii) less severe edema inside brain lesions.

The neuroprotective effects of PIC were still present at P30. While two thirds of control pups still had brain lesions, only one third of those in the PIC groups had brain damage. Moreover, in brain-damaged pups, FA were higher in all structures in the PIC groups compared to the Ct group, reflecting a higher density of neural fibers. Therefore, maternal PIC supplementation significantly improved the spatial distribution or rearrangement of white matter fiber bundles.

In behavioral terms, PIC supplementation restored motor functions. When sensorimotor functions were assessed in juvenile rats (P24) using

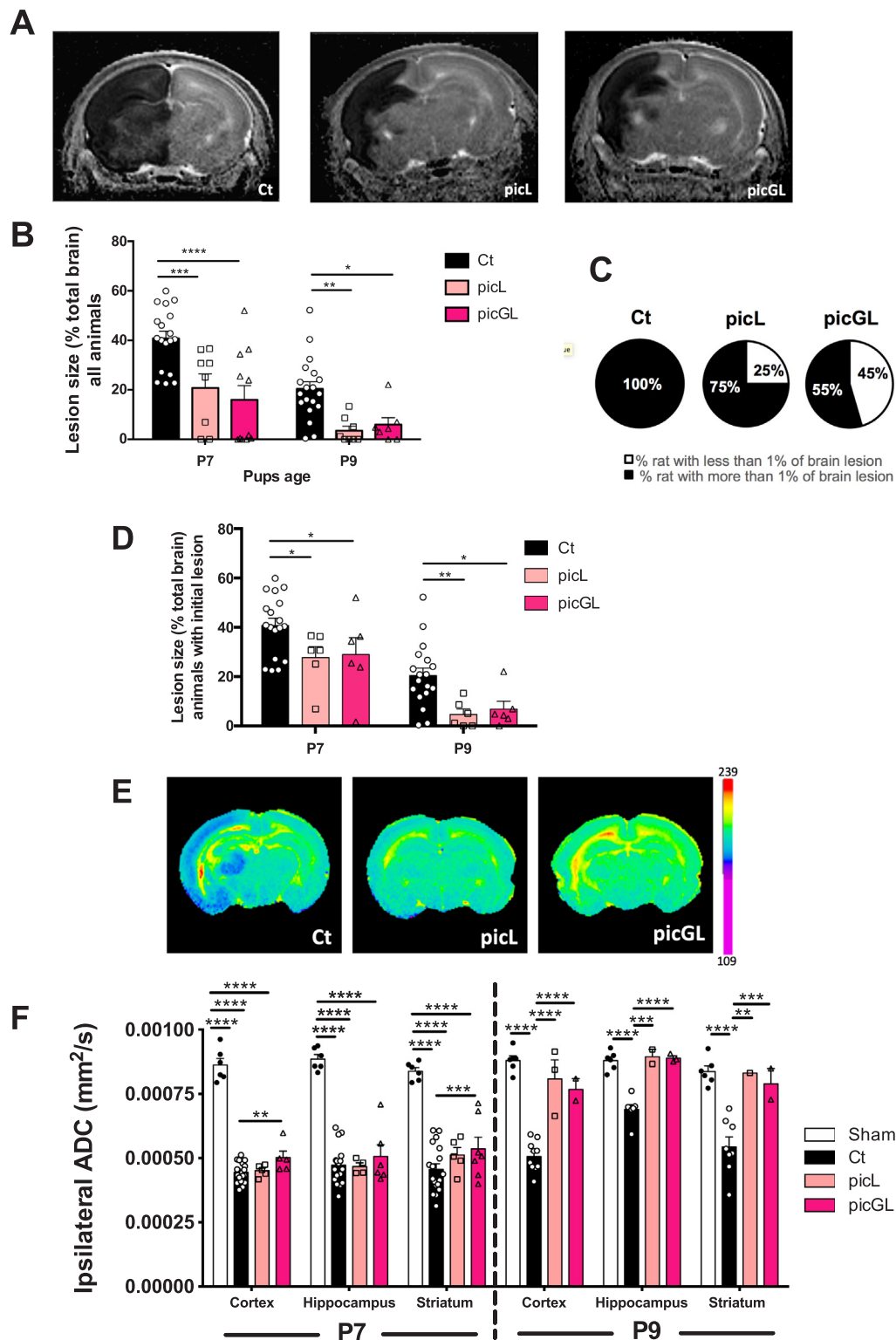


Fig. 2. Short-term effect of PIC maternal supplementation on pup brain damage induced by HI. (A) Typical diffusion-weighted images of P7-pup brain of Ct, picL and picGL groups. Images were obtained at 4.7 T, 3 h after injury. (B) Lesion sizes (% total brain) for all pups at P7 and P9. (C) Percentage of P7 pups with more than 1% of brain lesion for Ct, picL and picGL groups, 3 h after injury. (D) Lesion sizes only for pups that had initial lesions in Ct, picL and picGL groups at P7 and P9. (E) ADC maps for Ct, picL and picGL P7 pups, presented on a color scale from purple (ADC = 0) to red (highest ADC values). (F) Ipsilateral ADC values for sham, Ct, picL and picGL groups, at P7 and P9. Results are mean values $\pm$ SEM. * Significant difference between two groups (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$), one-way analysis of variance (ANOVA) with Fisher's LSD post-hoc tests; (A) and (B) P7: Ct, $n = 18$; picL, $n = 8$; picGL, $n = 11$; P9: Ct, $n = 19$; picL, $n = 8$; picGL, $n = 7$ and P7: picL, $n = 6$; picGL, $n = 6$; P9: picL, $n = 6$; picGL, $n = 6$ for lesion size.

Table 1

Neuronal death was evaluated in the penumbra region (both cortical and striatal regions) on histological cryosections from P9 pups after Nissl staining. Data are presented as percentage of the number of neurons found in the sham group. * Significant difference from sham, picL and picGL, # Significant difference from Ct, picL and picGL, $p \leq 0.0002$, one-way analysis of variance (ANOVA) with Fisher's LSD post-hoc test, $n = 3$ per group).

	Sham	Ct	picL	picGL
Cortex	100.0 $\pm$ 2.4#	49.2 $\pm$ 3.8*	85.1 $\pm$ 2.1	85.9 $\pm$ 2.2
Striatum	100.0 $\pm$ 3.4	74.2 $\pm$ 1.6*	96.4 $\pm$ 3.9	101.0 $\pm$ 4.1

the mNSS, the PIC groups had the best performances, reaching those of the sham group.

Among the deleterious effects induced by HI, cognitive impairment due to neuronal and white matter damage is often a consequence in injured neonates (Sanches et al., 2013). HI rodent models also display

memory deficits (Arteaga et al., 2015; Balduino et al., 2000; Ikeda et al., 2001; Wagner et al., 2002). In addition to showing anatomical improvements, our data revealed a neuroprotective role of maternal PIC supplementation on the hippocampal-dependent long-term memory of pups, which was completely restored. These results could be compared with those of Arteaga et al., which demonstrated that RSV improves the long-lasting cognitive deficits induced by HI (Arteaga et al., 2015).

This neuroprotective effect of maternal PIC supplementation could be due to its antioxidant properties. Although the antioxidant properties of RSV are well documented, the additional hydroxyl group in the stilbene ring B of PIC significantly increases its free radical scavenging activity as well as its bioavailability (Rossi et al., 2008; Piotrowska et al., 2012; Murias et al., 2005). However, the neuroprotective effect of PIC may be linked to modulation of the brain metabolism. Although no study has addressed the role of PIC in the regulation of cerebral metabolism under physiological or pathological conditions, a few have examined the role of RSV on this parameter (Fig. 5). Under

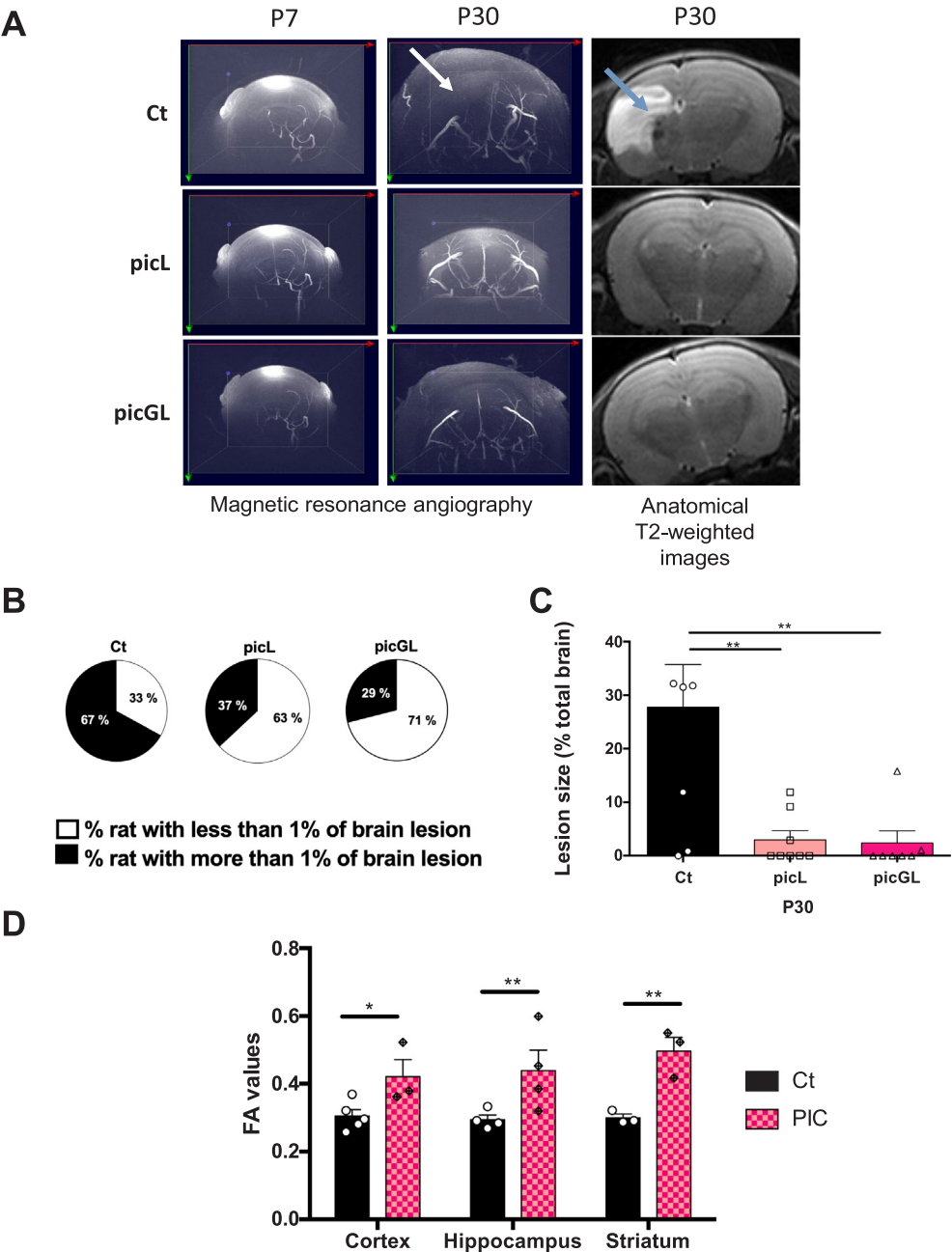


Fig. 3. Long-term effect of PIC maternal supplementation on pup brain damage induced by HI. (A) Typical angiographic images of P7- and P30-pup brains and typical anatomical T2-weighted images of P30-pup brains for Ct, picL and picGL groups. White arrow: blood vessel gap in the ipsilateral hemisphere due to brain necrosis (blue arrow on the corresponding T2-weighted image). (B) Representation of the percentage of pups with more than 1% of brain lesion for Ct, picL and picGL groups at P30. (C) Lesion sizes for Ct, picL and picGL groups at P30. (D) FA measurement at P30 in ipsilateral white matter in cortex, hippocampus and striatum in Ct and PIC groups (picL and picGL data pooled). *Significant difference between two groups (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$) one-way analysis of variance (ANOVA) with Fisher's LSD post-hoc test; Ct, $n = 6$; picL, $n = 8$; picGL, $n = 7$ (for FA measurements, value was obtained only if lesion was present in the brain area).

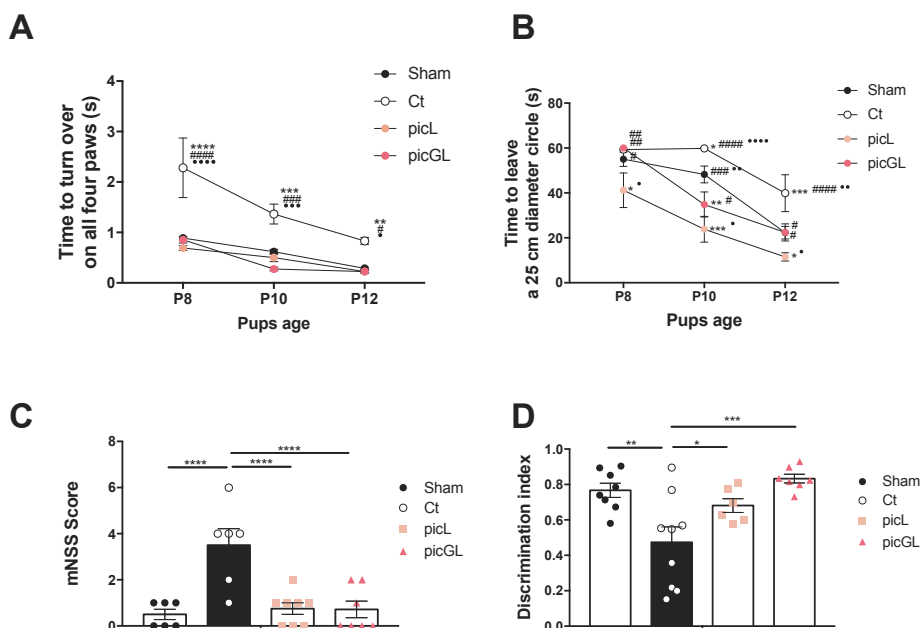


Fig. 4. Sensorimotor behavioral tests and long-term memory. Performances for the righting reflex (A) and locomotion test (B), between P8 and P12, for sham, Ct, picL and picGL groups. * Significantly different from sham group (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$); # significantly different from picL group (# $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, #### $p < 0.0001$); • significantly different from Ct group (• $p < 0.05$, •• $p < 0.01$, ••• $p < 0.001$, •••• $p < 0.0001$). (C) mNSS score at P24 for sham, Ct, picL and picGL groups. * Significant difference between two groups (*** $p < 0.001$). (D) Performances for the novel object recognition test were assessed at P45 for sham, Ct, picL and picGL groups. The discrimination index was calculated using the following equation: [time in new object – time in familiar object]/[time in new object + time in familiar object]. * Significant difference between two groups (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). Results are mean values $\pm$ SEM. One-way analysis of variance (ANOVA) with Fisher's LSD post-hoc test; $n \geq 6$ pups.

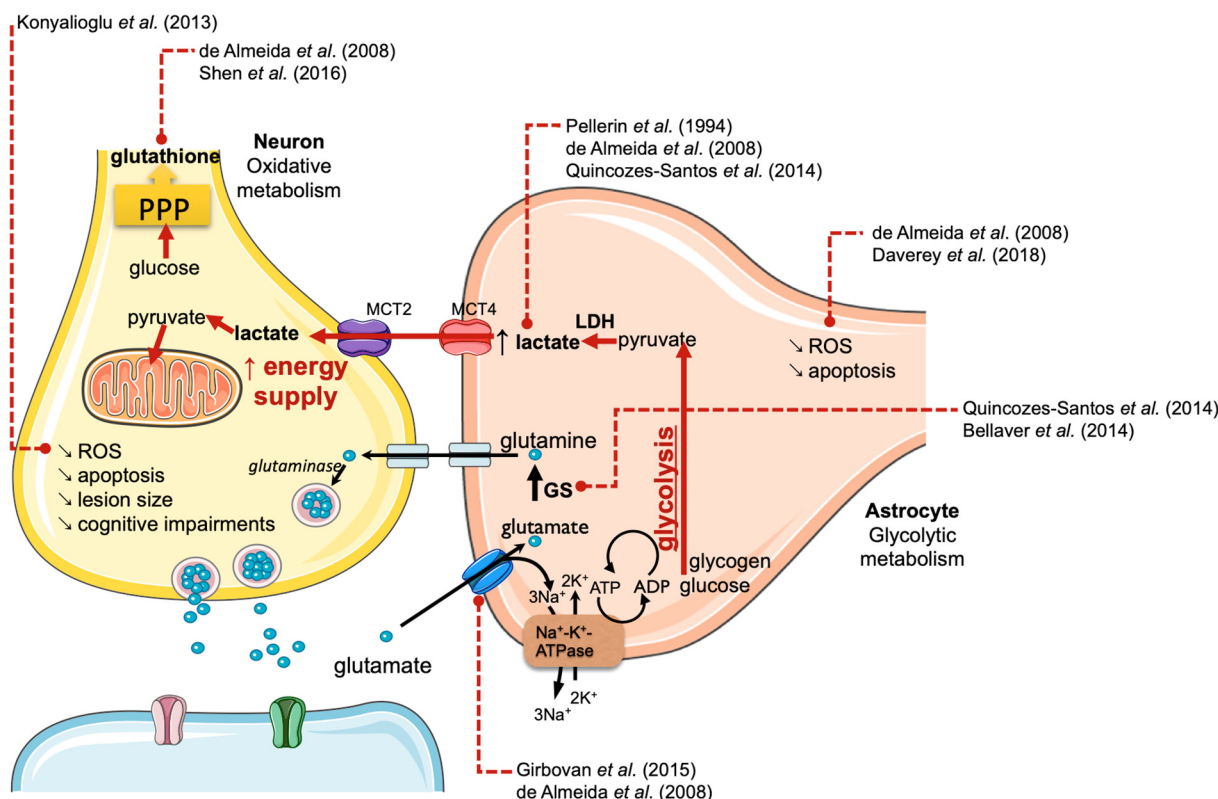


Fig. 5. Schematic representation of effects of resveratrol on brain metabolism. Red dashed arrows connect discussed point with the respective published work. Briefly, PIC is thought to act like RSV, which reverses the decrease in glutamate transporter type-1 (GLT-1) induced by HI (Girbovan and Plamondon, 2015) and increases the astrocytic uptake of glutamate (de Almeida et al., 2008). This stimulation of glutamate uptake is associated with an increase in glutamine synthetase (GS) activity to facilitate the recycling of glutamate into glutamine (Quincozes-Santos et al., 2014; Bellaver et al., 2014). In parallel, glutamate uptake increases astrocytic glycolysis and then the astrocytic production of lactate (Pellerin and Magistretti, 1994). This astrocytic lactate is shuttled to neurons where it is used as energy fuel. RSV also leads to an increase in glutathione production (de Almeida et al., 2008; Shen et al., 2016) and a decrease in ROS (Konyalioglu et al., 2013).

physiological conditions, neuronal glutamate is released in the synaptic cleft and is recaptured and recycled by astrocytes into glutamine via the glutamine synthetase (GS) enzyme. The astrocytic uptake of glutamate is predominantly (~90%) mediated by the glutamate transporter type-1 (GLT-1) (Danbolt, 2001). Rat transient forebrain ischemia led to a

decrease in GLT-1 expression that was reversed by RSV pre-HI i.p. injections for 3 weeks (Girbovan and Plamondon, 2015). After HI, decrease in glutamate uptake by astrocytes was observed (Morken et al., 2014), leading to overstimulation of N-methyl-D-aspartate glutamate receptors and a disruption of ionic homeostasis, especially of Na⁺ and

Ca^{2+} . Glutamatergic excitotoxicity is a major cause of neuronal death in HI (Johnston et al., 2011). In rat hippocampal slices, RSV (50 μM) treatment increased astrocytic glutamate uptake during oxidative injury induced by H_2O_2 (de Almeida et al., 2008). This stimulation of glutamate uptake is associated with an RSV (100 μM)-dependent increase in GS expression to facilitate the recycling of glutamate to glutamine (Quincozes-Santos et al., 2014). An increase in GS activity was also found in primary astrocyte cultures of P1 Wistar rats in the presence of RSV (10 μM) (Bellaver et al., 2014). In parallel, glutamate uptake was shown to increase astrocytic glycolysis and then the astrocytic production of lactate in primary cultures of mouse cortical astrocytes (Pellerin and Magistretti, 1994). As proposed in the ANLS model, astrocytic lactate is shuttled to neurons *via* monocarboxylate transporters and is used as a neuronal energy fuel. In the context of PIC treatment, the use of lactate by neurons might counteract the energy deficit induced by HI. Moreover, it might allow the reallocation of spared glucose to go through the phosphate pentose pathway, leading to the production of glutathione. Such a glutathione increase has been shown in the presence of RSV (100 μM), after an oxidative injury induced by H_2O_2 in rat hippocampal slices (Quincozes-Santos et al., 2014). Similarly, RSV (5 μM) pretreatment of neural stem cells undergoing oxygen-glucose deprivation/reoxygenation led to an increase in neuronal glutathione levels (Shen et al., 2016). Similarly, a decrease in reactive oxygen species (ROS) was measured in astrocyte cultures exposed to H_2O_2 oxidative stress in the presence of RSV (1 μM) (Daverey and Agrawal, 2018), and in neural stem cell cultures (Konyalioglu et al., 2013). Since PIC is a homolog of RSV but with greater bioavailability, its neuroprotective effect found here could involve regulation of the brain metabolism, as with RSV.

This is the first demonstration of the neuroprotective role of PIC in HI. At P30, only one third of the pups whose mother had been supplemented with PIC still had lesions. However, the lesions represented < 3% of the total brain volume and motor and cognitive functions had been completely recovered. Furthermore, PIC was not administered intraperitoneally to the pups but was given to their mother *via* drinking water in the nutritional range. Since 50% of infants do not respond to hypothermia therapy (Wu and Gonzalez, 2015), these preliminary results are extremely promising and may be of relevance for the clinical management of neonates suffering from HI.

4. Experimental procedures

4.1. Study design

The experimental design is presented in Fig. 6. All animal procedures were conducted in accordance with the Animal Experimentation Guidelines of the European Communities Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC). Protocols met the ethical guidelines of the French Ministry of Agriculture and Forests and were approved by the local ethics committees (9476). Sample size was determined based on a previous study (Brissaud et al., 2010). Only rats with no perfusion defect in the left hemisphere (confirmed by perfusion and angiographic MRI) were excluded from the study. Analyses were blindly performed by two separate experimenters (intra-experimenter variability < 1%; inter-experimenter variability < 5%).

4.2. Animals

Pregnant Wistar RJ-HAN females (Janvier Laboratories, France) were received at day 15 of gestation and were kept on a 12:12 h light:dark cycle with food (A03) and water *ad libitum*.

4.3. Model of hypoxic-ischemic brain injury

Cerebral HI was performed as described previously (Rice et al., 1981; Brissaud et al., 2010). Briefly, P7 pups were anesthetized with

isoflurane (4% for induction and 1.5% for maintenance) and a midline neck incision was made under local anesthesia (lidocaine 0.5%). The left common carotid artery was permanently ligated with a 7–0 silk thread. After recovery (30 min), pups were then placed for 2 h in a humidified hypoxic chamber (8% oxygen, 92% nitrogen – 33 °C) (Intensive Care Unit Warmer, Harvard Apparatus, France). During hypoxia, sham-operated pups were kept separated from the dam in a heated atmosphere (33 °C). After HI, pups were returned to their heated pad until the first imaging, performed 30 min later (3 h after the end of the ligation) then at P9, and P30.

4.4. Experimental groups and drug administration

Four experimental groups were established according to the maternal supplementation. Maternal drinking water alone for sham ($n = 15$) and control groups (Ct group, $n = 18$) was supplemented with a realistic nutritional amount of PIC (corresponding to one passion fruit/day for a pregnant woman) during the first week of lactation for the picL group ($n = 8$) or during the last week of gestation plus the first week of lactation for the picGL group ($n = 11$) (Tokyo Chemical Industry Co, France). PIC stock solution was prepared by dissolving 100 mg of PIC in 2 ml absolute ethanol. Four μl of the PIC stock solution were added in 200 ml of drinking water, an amount equivalent to 0.15 mg/kg/day since a pregnant Wistar rat female is drinking 50 ml/day. Each final PIC solution was prepared and changed everyday. Drinking bottles were wrapped in aluminum foil to avoid PIC oxidation.

4.5. Nissl staining

P9 pups ($n = 3$ per group) were perfused transcardially with PBS followed by 4% paraformaldehyde (PFA) in 0.1 M PBS (pH 7.2–7.4), for 10 min, under isoflurane (4.5%). Brains were removed and post-fixed for 24 h, at 4 °C, in PFA. Fixed brains were cryoprotected by sucrose immersion (48 h in a 20% sucrose solution, followed by 24 h in a 30% solution, 4 °C) and then frozen in liquid N_2 vapor. The 16 μm -thick brain sections were stained with 0.5% cresyl violet (Sigma-Aldrich, France) for 5 min and washed in distilled water for 10 s. Sections were dehydrated in 95 and 100% ethanol (2 min), defatted in xylene and mounted on coverslips in Depex mounting medium (Sigma Aldrich, Germany). Brain sections were observed using an optical microscope (Leica STP6000). ImageJ was used to count nuclei.

4.6. Acquisition of *in vivo* longitudinal MRI

Pup *in vivo* MRI was performed on a horizontal 4.7 T Biospec 47/50 system (Bruker, Ettlingen, Germany) equipped with a 6-cm BG6 gradient system (1000 mT/m, $\Delta = 20$ ms, $\delta = 4$ ms). For MRI, pups were anesthetized with isoflurane (4% induction, 1.5% maintenance), and respiration was monitored by a ventral pressure sensor. Warmed water circulating in the gradient coil system was used to maintain body temperature. Measurements were performed with Paravision 6.0.1 (Bruker BioSpin, Karlsruhe, Germany). Anatomical T2-weighted images of the brain were obtained using a Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement (RARE) sequence (20 axial slices, 0.7 mm thick, echo time (TE) 50 ms, repeating time (TR) 3000 ms, total duration 4 min 48 s). Brain lesions were assessed by magnetic resonance diffusion tensor imaging (DTI: 20 axial slices of 0.7 mm, b-value 1347 s/mm², TE 24 ms, TR 2 s, 30 directions, total duration 17 min 04 s). Magnetic resonance angiography was used to image the cerebral blood system (Time-of-Flight (TOF)-3D-Fast low angle shot (FLASH): axial slice, 20 mm thick, TE 2.2 ms, TR 13 ms, Flip angle 15°, total duration 10 min 59 s).

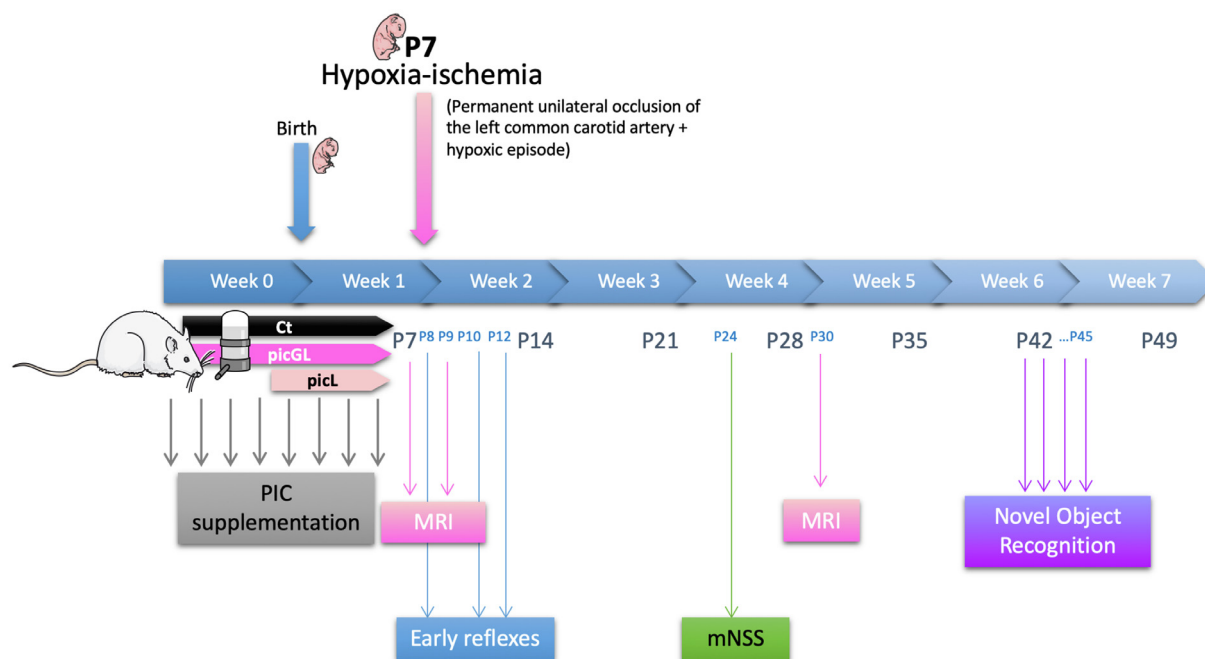


Fig. 6. Scheme of experimental design. Four groups were studied: sham group, Ct group, picL group: pups whose mother was supplemented with PIC (0.15 mg/kg/day) during the first week of lactation and a picGL group whose mother was supplemented with PIC during the last week of gestation and the first week of lactation. Ct, picL, picGL groups were exposed to HI procedure. HI brain damage was monitored by MRI (at P7, P9 and P30). Effect of maternal supplementation on HI pup sensorimotor functions was assessed with early reflexes test (from P8 to P12) and mNSS (P24). Long-term memory of pups was assessed with the novel object recognition test (P45).

4.7. MRI analysis

The extent of the lesion was determined from the signal of the apparent diffusion coefficient (ADC) maps of DWI. Only lesion sizes higher than 1% were considered. ADC maps and fractional anisotropy (FA) maps were computed using the Paravision 6.0.1 diffusion tensor calculation module. For each rat, a region of interest (ROI) was manually drawn on each section to encompass the injured area and determine the global brain area to quantify the lesion size (relative to the entire brain size). ROIs were manually determined in the lesion area (cortex, hippocampus, striatum) to evaluate the variations in ADC at P7 and P9. FA was determined at P30 in the ipsilateral cortex, hippocampus and striatum.

4.8. Behavioral tests

4.8.1. Early reflexes

Righting reflex (P8, P10, P12)

Pups were placed in a supine position and the time required to turn over on all four paws and touch the surface was recorded. Each pup was given three trials and the mean time to perform the reflex was calculated.

Locomotion aptitude (P8, P10, P12)

Pups were placed in the middle of a 25-cm diameter circle. Time to leave the circle was measured.

4.8.2. Modified neurological severity score (mNSS) (P24)

Neurological functions were assessed using the mNSS (Chen et al., 2001), which is composed of motor (muscle status), sensory (tactile and proprioceptive), beam balance, reflexes (pinna, corneal and startle) tests. Each rat was graded on the mNSS scale (0: no impairment – 1-6:

middle impairment – 7-12: moderate impairment – 13-18: severe impairment).

4.8.3. Novel object recognition (P45)

Pup long-term memory was assessed using the novel object recognition test. After a habituation period in the open field on day 1, pups were further allowed to freely explore two identical objects placed in opposite corners of the arena for 10 min on the next two days. On the last day (day 4), one of the old objects was replaced by a different one and pups were allowed to freely explore the objects for 10 min. Duration of object exploration was measured. The discrimination index $([\text{time with new object} - \text{time with familiar object}] / [\text{time with new object} + \text{time with familiar object}])$ was defined as the parameter for evaluation.

4.9. Statistical analysis

Statistical analysis and graphs were performed using GraphPad Prism 7.00 software. All data were expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (s.e.m). Number of pups is stated for each experiment within figure legends. The statistical significance of the differences between multiple groups was determined using One-Way ANOVA and Fisher's LSD post-hoc test. Statistical significance was defined as $P < 0.05$.

Sources of funding

This work was supported by grants (2018/01) from the Fondation de Recherche en Alcoologie (FRA) from the French State in the context of the "Investments for the future" Programme IdEx (ANR-10-IDEX) and the LabEx TRAIL (ANR-10-LABX-57) and a Franco-Swiss ANR-FNS grant (ANR-15-CE37-0012 and FNS n°310030E-164271). LP received financial support from the program IdEx Bordeaux ANR-10-IDEX-03-02.

Conflict of interest

Authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Arteaga, O., Revuelta, M., Uriguen, L., Alvarez, A., Montalvo, H., Hilario, E., 2015. Pretreatment with resveratrol prevents neuronal injury and cognitive deficits induced by perinatal hypoxia-ischemia in rats. *PLoS One* 10, e0142424.
- Badaut, J., Ashwal, S., Obenaus, A., 2011. Aquaporins in cerebrovascular disease: a target for treatment of brain edema? *Cerebrovasc. Dis.* 31, 521–531.
- Balduini, W., De Angelis, V., Mazzoni, E., Cimino, M., 2000. Long-lasting behavioral alterations following a hypoxic/ischemic brain injury in neonatal rats. *Brain Res.* 859, 318–325.
- Bellaver, B., Souza, D.G., Souza, D.O., Quincozes-Santos, A., 2014. Resveratrol increases antioxidant defenses and decreases proinflammatory cytokines in hippocampal astrocyte cultures from newborn, adult and aged wistar rats. *Toxicol. In Vitro* 28, 479–484.
- Bouzier-Sore, A.K., Pellerin, L., 2013. Unraveling the complex metabolic nature of astrocytes. *Front. Cell. Neurosci.* 7, 179.
- Brissaud, O., Villega, F., Pieter Kongsman, J., Sanchez, S., Raffard, G., Franconi, J.M., et al., 2010. Short-term effect of erythropoietin on brain lesions and aquaporin-4 expression in a hypoxic-ischemic neonatal rat model assessed by magnetic resonance diffusion weighted imaging and immunohistochemistry. *Pediatr. Res.* 68, 123–127.
- Chen, J., Li, Y., Wang, L., Zhang, Z., Lu, D., Lu, M., et al., 2001. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Stroke* 32, 1005–1011.
- Danbolt, N.C., 2001. Glutamate uptake. *Prog. Neurobiol.* 65, 1–105.
- Daveray, A., Agrawal, S.K., 2018. Pre and post treatment with curcumin and resveratrol protects astrocytes after oxidative stress. *Brain Res.* 1692, 45–55.
- Davidson, J.O., Wassink, G., van den Heuvel, L.G., Bennet, L., Gunn, A.J., 2015. Therapeutic hypothermia for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy – where to from here? *Front. Neurol.* 6, 198.
- de Almeida, L.M., Leite, M.C., Thomazi, A.P., Battu, C., Nardin, P., Tortorelli, L.S., et al., 2008. Resveratrol protects against oxidative injury induced by h2o2 in acute hippocampal slice preparations from wistar rats. *Arch. Biochem. Biophys.* 480, 27–32.
- Girbovan, C., Plamondon, H., 2015. Resveratrol downregulates type-1 glutamate transporter expression and microglia activation in the hippocampus following cerebral ischemia reperfusion in rats. *Brain Res.* 1608, 203–214.
- Ikeda, T., Mishima, K., Yoshikawa, T., Iwasaki, K., Fujiwara, M., Xia, Y.X., et al., 2001. Selective and long-term learning impairment following neonatal hypoxic-ischemic brain insult in rats. *Behav. Brain Res.* 118, 17–25.
- Johnston, M.V., Fatemi, A., Wilson, M.A., Northington, F., 2011. Treatment advances in neonatal neuroprotection and neurointensive care. *Lancet Neurol.* 10, 372–382.
- Karalis, F., Soubasi, V., Georgiou, T., Nakas, C.T., Simeonidou, C., Guiba-Tziampiri, O., et al., 2011. Resveratrol ameliorates hypoxia/ischemia-induced behavioral deficits and brain injury in the neonatal rat brain. *Brain Res.* 1425, 98–110.
- Konyalioglu, S., Armagan, G., Yalcin, A., Atalayin, C., Dagci, T., 2013. Effects of resveratrol on hydrogen peroxide-induced oxidative stress in embryonic neural stem cells. *Neural. Regen. Res.* 8, 485–495.
- Koronowski, K.B., Khoury, N., Saul, I., Loris, Z.B., Cohan, C.H., Stradecki-Cohan, H.M., et al., 2017. Neuronal sirt1 (silent information regulator 2 homologue 1) regulates glycolysis and mediates resveratrol-induced ischemic tolerance. *Stroke* 48, 3117–3125.
- Kukreja, A., Wadhwa, N., Tiwari, A., 2014. Therapeutic role of resveratrol and piceatannol in disease prevention. *J. Blood Disorders Transf.* 5.
- Kurinczuk, J.J., White-Koning, M., Badawi, N., 2010. Epidemiology of neonatal encephalopathy and hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Early Hum. Dev.* 86, 329–338.
- Lodygensky, G.A., Inder, T.E., Neil, J.J., 2008. Application of magnetic resonance imaging in animal models of perinatal hypoxic-ischemic cerebral injury. *Int. J. Dev. Neurosci.* 26, 13–25.
- Loren, D.J., Seeram, N.P., Schulman, R.N., Holtzman, D.M., 2005. Maternal dietary supplementation with pomegranate juice is neuroprotective in an animal model of neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Pediatr. Res.* 57, 858–864.
- Morken, T.S., Brekke, E., Haberg, A., Wideroe, M., Brubakk, A.M., Sonnewald, U., 2014. Altered astrocyte-neuronal interactions after hypoxia-ischemia in the neonatal brain in female and male rats. *Stroke* 45, 2777–2785.
- Murias, M., Jager, W., Handler, N., Erker, T., Horvath, Z., Szekeres, T., et al., 2005. Antioxidant, prooxidant and cytotoxic activity of hydroxylated resveratrol analogues: Structure-activity relationship. *Biochem. Pharmacol.* 69, 903–912.
- Pellerin, L., Magistretti, P.J., 1994. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 10625–10629.
- Piotrowska, H., Kucinska, M., Murias, M., 2012. Biological activity of piceatannol: leaving the shadow of resveratrol. *Mutat. Res.* 750, 60–82.
- Quincozes-Santos, A., Bobermin, L.D., Tramontina, A.C., Wartchow, K.M., Tagliari, B., Souza, D.O., et al., 2014. Oxidative stress mediated by nmda, ampa/ka channels in acute hippocampal slices: neuroprotective effect of resveratrol. *Toxicol. In Vitro* 28, 544–551.
- Rice 3rd, J.E., Vannucci, R.C., Brierley, J.B., 1981. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann. Neurol.* 9, 131–141.
- Rossi, M., Caruso, F., Opazo, C., Saliccioli, J., 2008. Crystal and molecular structure of piceatannol; scavenging features of resveratrol and piceatannol on hydroxyl and peroxy radicals and docking with transthyretin. *J. Agric. Food Chem.* 56, 10557–10566.
- Sanchez, E.F., Arteni, N.S., Nicola, F., Boisserand, L., Willborn, S., Netto, C.A., 2013. Early hypoxia-ischemia causes hemisphere and sex-dependent cognitive impairment and histological damage. *Neuroscience* 237, 208–215.
- Shen, C., Cheng, W., Yu, P., Wang, L., Zhou, L., Zeng, L., et al., 2016. Resveratrol pretreatment attenuates injury and promotes proliferation of neural stem cells following oxygen-glucose deprivation/reoxygenation by upregulating the expression of nrf2, ho-1 and nqo1 in vitro. *Mol. Med. Rep.* 14, 3646–3654.
- Wagner, B.P., Nedelcu, J., Martin, E., 2002. Delayed postischemic hypothermia improves long-term behavioral outcome after cerebral hypoxia-ischemia in neonatal rats. *Pediatr. Res.* 51, 354–360.
- West, T., Atzeva, M., Holtzman, D.M., 2007. Pomegranate polyphenols and resveratrol protect the neonatal brain against hypoxic-ischemic injury. *Dev. Neurosci.* 29, 363–372.
- Wu, Y.W., Gonzalez, F.F., 2015. Erythropoietin: a novel therapy for hypoxic-ischaemic encephalopathy? *Dev. Med. Child Neurol.* 57 (Suppl 3), 34–39.
- Zador, Z., Stiver, S., Wang, V., Manley, G.T., 2009. Role of aquaporin-4 in cerebral edema and stroke. *Handb. Exp. Pharmacol.* 159–70.

**CHAPITRE V : Effet
neuroprotecteur d'une
supplémentation
maternelle en
polyphénols dans le
cadre de l'hypoxie-
ischémie néonatale
couplée à un syndrome
d'alcoolisme foetal**

Ce chapitre résume la publication « *Maternal alcoholism and neonatal hypoxia-ischemia: Neuroprotection by stilbenoid polyphenols* » montrant les points clés et les principaux résultats obtenus.

1. Introduction

Les polyphénols sont depuis des années des molécules phares dans la recherche de nouveaux agents bioactifs pouvant avoir des effets bénéfiques sur l'organisme. En effet, ils possèdent des propriétés thérapeutiques importantes. Ils sont l'un des piliers du paradoxe français, plus connu sous le nom de « French Paradox ». Ce concept repose sur des analyses épidémiologiques mettant en évidence une corrélation inattendue entre la consommation d'aliments riches en matières grasses (cuisine du Sud-Ouest et régime Méditerranéen), la consommation de vins et la bonne santé des autochtones en matière de maladies cardio-vasculaires (MCVs) ou de cancers [1, 2]. De manière contrastée, d'autres pays plus exposés aux produits de l'industrie agroalimentaire qualifiée de « malbouffe » (comme les USA ou l'Angleterre) présentent des pourcentages de MCVs et cancers nettement plus élevés qu'en Europe méditerranéenne. En 1960, les Français fumaient autant que les Britanniques, mangeaient plus de graisses animales (beurre, crème, fromages censés augmenter leur cholestérol) et autant de sel. Pourtant le différentiel de mortalité entre les deux populations avoisinait les 40-50 % avec un taux inférieur côté Français. Le facteur de risque des MCVs est quatre fois plus important à Belfast qu'à Toulouse [3]. Les huiles végétales, les oméga-3, les fruits et légumes de saison et la consommation de vin pendant les repas seraient responsables de cette différence. En effet, ils contiennent du bon cholestérol et de nombreux antioxydants dont les polyphénols. Les bienfaits de l'alcool font encore débat dans le monde scientifique, l'association inverse entre une consommation modérée en alcool et les MCVs est cependant bien documentée depuis quelques années. Une méta-analyse résumant 16 études a montré que la consommation de vin pouvait diminuer par exemple jusqu'à 34 % le risque de mortalité pour des doses modérés de 1 à 2,5 verres/ jours [4]. Une autre étude faite sur des Lausannois a permis de montrer qu'une consommation hebdomadaire allant jusqu'à 13 unités (soit 2 verres /jour) est associée à un moindre risque de maladie coronarienne [5]. Ces effets bénéfiques sont majoritairement dus à la consommation de vin et de bière. En effet, ces deux boissons contiennent de nombreux composant non alcoolisés ayant des propriétés antioxydantes, particulièrement dans le vin. Cependant, une consommation supérieure semble augmenter ce risque, ce qui nécessite d'être confirmé par des études prospectives incluant suffisamment de gros buveurs. Il n'est donc pas recommandé de prescrire une consommation de boissons alcoolisés car les bénéfices cardiovasculaires peuvent être contre balancés avec le risque de cancers.

L'alcool, en consommation excessive, reste une addiction engendrant des problèmes majeurs sur la santé des consommateurs [6]. Les enquêtes périnatales réalisées au cours des dix dernières années rapportent qu'une consommation d'alcool durant la grossesse et l'allaitement reste, hélas, relativement fréquente et ne diminue pas malgré les campagnes d'information sur les risques encourus [7]. En effet, 10 % des femmes enceintes dans le monde consomment de l'alcool durant leur grossesse [8]. Cette consommation d'alcool durant la grossesse est responsable du syndrome d'alcoolisme fœtal (SAF) qui cause un retard de croissance, des problèmes neurocomportementaux et des malformations faciales.

L'alcool ingéré par la mère est métabolisé et traverse librement le placenta, qui ne joue pas son rôle de barrière protectrice, de telle sorte qu'il se retrouve rapidement en concentration élevée dans le sang du fœtus [9]. L'alcool agit directement sur l'organisme du fœtus entraînant des modifications cellulaires irréversibles. Au niveau cérébral, il peut induire des retards de myélinisation ou des troubles dans la migration neuronale [10, 11]. De plus, dans un contexte d'HI néonatale, la consommation d'alcool aggrave les effets délétères au niveau cérébral. En effet, une étude *in vitro* sur des cultures primaires de neurones a montré que les dommages lésionnels induits par l'HI sont aggravés en présence d'alcool en augmentant la mort neuronale (éthanol absolu de 0,0001 % à 1 %) [12]. Effectivement, l'expression de la caspase 3, principal marqueur de la mort apoptotique, détectée à des niveaux faibles dans chacune des conditions seules (HI ou alcool), augmentait significativement lorsque les deux conditions (2h d'hypoxie et 0,1 % d'éthanol) étaient associées [12].

Nous avons montré dans les deux chapitres précédents que le RSV et le PIC avaient des effets neuroprotecteurs dans le cadre de l'HI néonatale.

→ Cette neuroprotection serait-elle toujours effective dans un contexte d'HI néonatale couplée à un SAF ?

Objectifs de l'étude :

Les objectifs ici sont (i) de mesurer l'étendue des dommages cérébraux induits par une HI néonatale, dans un contexte de SAF (consommation modérée d'alcool) et (ii) d'évaluer la capacité d'une supplémentation maternelle en polyphénols (RSV ou PIC) à contrecarrer les effets délétères au niveau du cerveau dans ces conditions.

2. Méthodes

Le modèle de Rice et Vannucci, utilisé pour caractériser l'accident d'HI, est détaillé dans le chapitre II -1-1-2. Les polyphénols (RSV ou PIC ; 0,15mg/kg/jour) ont été administrés *via* une supplémentation maternelle dans l'eau de boisson de la dernière semaine de gestation au 2^{ème} jour post-HI. Les biberons des rates ont été changés quotidiennement et protégés de la lumière à l'aide de papier d'aluminium. La supplémentation en alcool correspondait à une consommation modérée, la dose utilisée de 0,5 g/kg/jour correspond à la consommation de 35 g/jour d'alcool pour une femme enceinte, ce qui équivaut à la consommation de 2 verres de vin (14 cl et 12,5°).

Cinq groupes de rats ont été considérés et répartis en fonction de l'accident d'HI et de la supplémentation maternelle (figure 37).

- ◆ **sham** : aucune supplémentation maternelle et les rats ne subissent pas d'HI.
- ◆ **HIC** : aucune supplémentation maternelle et HI pour les rats à P7.
- ◆ **Eth** : 0,5 g/kg/jour d'éthanol dans l'eau de boisson pendant la dernière semaine de gestation + la première semaine de lactation + 48h après l'HI (P-7 à P9) et HI pour les rats à P7.
- ◆ **RSV/Eth** : RSV et 0,5 g/kg/jour d'éthanol dans l'eau de boisson pendant la dernière semaine de gestation + la première semaine de lactation + 48h après l'HI (P-7 à P9) et HI pour les rats à P7.
- ◆ **PIC/Eth** : PIC et 0,5 g/kg/jour d'éthanol dans l'eau de boisson pendant la dernière semaine de gestation + la première semaine de lactation + 48h après l'HI (P-7 à P9) et HI pour les rats à P7.

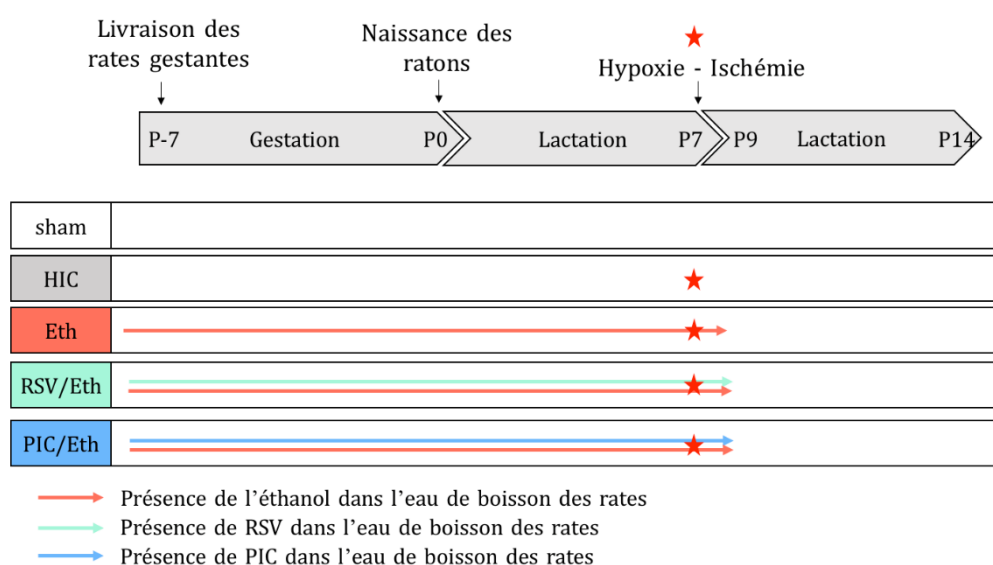


Figure 37: Récapitulatif des groupes expérimentaux répartis en fonction des fenêtres de supplémentation en polyphénols et en alcool.

L'IRM, méthode non-invasive, a permis (i) à court terme de mesurer le volume de la lésion et d'évaluer la sévérité de l'œdème dans les structures du cerveau (*via* la mesure de l'ADC) (ii) de faire un suivi longitudinal de l'évolution des volumes lésionnels cérébraux des rats (P7, P9 et P30). Les fonctions cognitives et motrices ont été évaluées en parallèle par différents tests de comportement, sensorimoteurs et de mémoire, de P8 jusqu'à P45 (test du redressement et test de la locomotion (P8, P10, P12), test du retrait adhésif (P20, P21, P22, P23 et P24), test du mNSS (P24) et test de la reconnaissance du nouvel objet (P45)). L'intégralité des tests est expliquée dans le chapitre II-4. À P9, des cerveaux de rats ($n = 3$) ont été prélevés, dans chaque groupe, afin de réaliser une coloration au crésyl violet, pour évaluer le degré de mort neuronale.

Explication du test du retrait adhésif

Le test du retrait adhésif, permet de mettre en évidence les déficits moteurs asymétriques et somatosensoriels [13]. Cependant, ce test n'était pas discriminant avec une HI seule. Or, dans les conditions d'une supplémentation maternelle en éthanol combinée à une HI, il s'est avéré discriminant, c'est pour cela qu'il est présent uniquement dans cette étude.

Un morceau d'adhésif de 1cm X 1cm a été collé sur la paume des pattes avant et l'animal a été placé dans une boîte transparente. Le temps de latence pour retirer le ruban adhésif du côté droit (membre controlatéral à l'hémisphère lésé) a été enregistré. Ce test, qui permet de mesurer à la fois la sensibilité des pattes (temps de contact) et la dextérité des animaux (temps d'enlèvement), a été réalisé quatre jours de suite (de P18 à P21) pour évaluer les déficits asymétriques.

3. Résultats

À court terme (P7), les volumes lésionnels étaient identiques quel que soit le groupe considéré (figure 38 -A et B). Aucune différence significative n'a été observée entre les groupes (volumes lésionnels : $40 \pm 3 \%$, $45 \pm 3 \%$, $42 \pm 6 \%$ et $43 \pm 6 \%$ du volume du cerveau total pour les groupes HIC, Eth, RSV/Eth et PIC/Eth, respectivement). Cependant, 48h après l'HI, une diminution du volume des lésions a été observée pour l'ensemble des groupes, avec une diminution plus marquée pour le groupe PIC/Eth par rapport aux groupes HIC et Eth (-81% , -53% et -60% , respectivement) donnant des volumes lésionnels équivalents à $8 \pm 1 \%$, $19 \pm 4 \%$ et $18 \pm 2 \%$ pour les groupes PIC/Eth, HIC et Eth, respectivement à P9. Le groupe RSV/Eth a présenté des volumes de lésion intermédiaires (figure 38 -B).

L'HI a induit une chute de plus de 50 % de l'ADC dans chaque structure où la lésion était présente (-57% pour le cortex, -55% pour l'hippocampe et -54% pour le striatum, pour le groupe HIC). Cependant la diminution était significativement moins importante dans le cortex pour les groupes Eth et PIC/Eth (-48% pour Eth et -47% pour PIC/Eth par

rapport au groupe HIC) ainsi que dans le striatum pour les groupes Eth et PIC/Eth par rapport au groupe HIC (-45 % pour le groupe Eth et -44 % pour le groupe PIC/Eth) (figure 38 -C).

Le niveau de mort neuronale a été quantifié dans les lésions au niveau du cortex et du striatum. L'incidence de la mort neuronale était significativement moindre dans le groupe PIC/Eth pour les deux structures analysées par rapport aux autres groupes HI. En effet, dans le cortex, on a observé une augmentation de la mort cellulaire pour les groupes HIC, Eth et RSV/Eth par rapport au groupe PIC/Eth ($51 \pm 4 \%$, $18 \pm 3 \%$, $21 \pm 4 \%$ et $7 \pm 6 \%$, respectivement). Dans le striatum, en présence d'alcool, la mort cellulaire était moins élevée pour le groupe HIC ($46 \pm 3 \%$, $40 \pm 2 \%$ et $26 \pm 2 \%$ de mortalité cellulaire mesurée dans les groupes Eth, RSV/Eth et HIC, respectivement). Concernant le groupe PIC/Eth, la mortalité cellulaire était de $16 \pm 5 \%$.

Les tests de réflexes précoces ont montré que les rats du groupe Eth présentaient des déficits plus importants par rapport aux autres groupes. En effet, lors du test de redressement, contrairement aux autres groupes, les rats du groupe Eth n'ont pas amélioré leurs performances au cours du temps. Aucune différence significative n'a été observée entre les groupes HIC et RSV/Eth ni entre les groupes sham et PIC/Eth (figure 38 -D).

À plus long terme (P21), lors du mNSS, aucune différence significative n'a été mise évidence entre les groupes HIC, Eth et RSV/Eth ($4,86 \pm 0,88$; $5,0 \pm 0,47$ et $4,83 \pm 1,24$, respectivement) (figure 39 -A). Seul le groupe PIC/Eth a obtenu des résultats similaires au groupe sham ($0,38 \pm 0,18$; $0,83 \pm 0,31$, respectivement).

Le test du retrait adhésif a été utilisé pour mesurer l'ampleur des déficits de latéralisation. Lors du test du retrait adhésif, le temps mis par les rats pour enlever le papier adhésif de la patte controlatérale a diminué au cours du temps. Cette diminution se retrouve pour tous les groupes sauf pour le groupe Eth, traduisant une absence d'habituation et d'apprentissage pour ce groupe. Les rats du groupe RSV/Eth ont présenté des résultats intermédiaires alors que les groupes HIC et PIC/Eth ont présenté des résultats similaires au groupe sham (figure 39 -B).

À P30, des lésions cérébrales ont été détectées par IRM chez tous les rats dans les groupes HIC et Eth. Alors que pour les groupes supplémentés, certains rats ne présentaient plus de lésions (20 % pour le groupe RSV/Eth et 50 % pour le groupe PIC/Eth). Les volumes des lésions étaient plus importants pour les groupes HIC, Eth et RSV/Eth par rapport au groupe PIC/Eth (figure 39 -C). Contrairement à la supplémentation maternelle en PIC, la supplémentation en RSV n'a pas permis de réduire les volumes lésionnels ($12 \pm 6 \%$ du volume lésionnel pour le groupe PIC/Eth par rapport à $31 \pm 5 \%$; $27 \pm 3 \%$; $24 \pm 7 \%$ pour les groupes HIC, Eth et RSV/Eth, respectivement) (figure 39 -D).

À P45, le test de reconnaissance du nouvel objet a été utilisé pour évaluer la mémoire à long terme des rats par la mesure d'un indice de discrimination (I). Les rats des groupes HIC et Eth ont présenté un déficit de mémoire à long terme, alors qu'aucune différence n'a été constatée entre les groupes sham et PIC/Eth. Les rats du groupe RSV/Eth ont présenté des résultats intermédiaires ($I = 0,77 \pm 0,04$; $0,47 \pm 0,09$;

0,41 ± 0,04 ; 0,58 ± 0,09 et 0,66 ± 0,02 pour les groupes sham, HIC, Eth, RSV/Eth et PIC/Eth, respectivement).

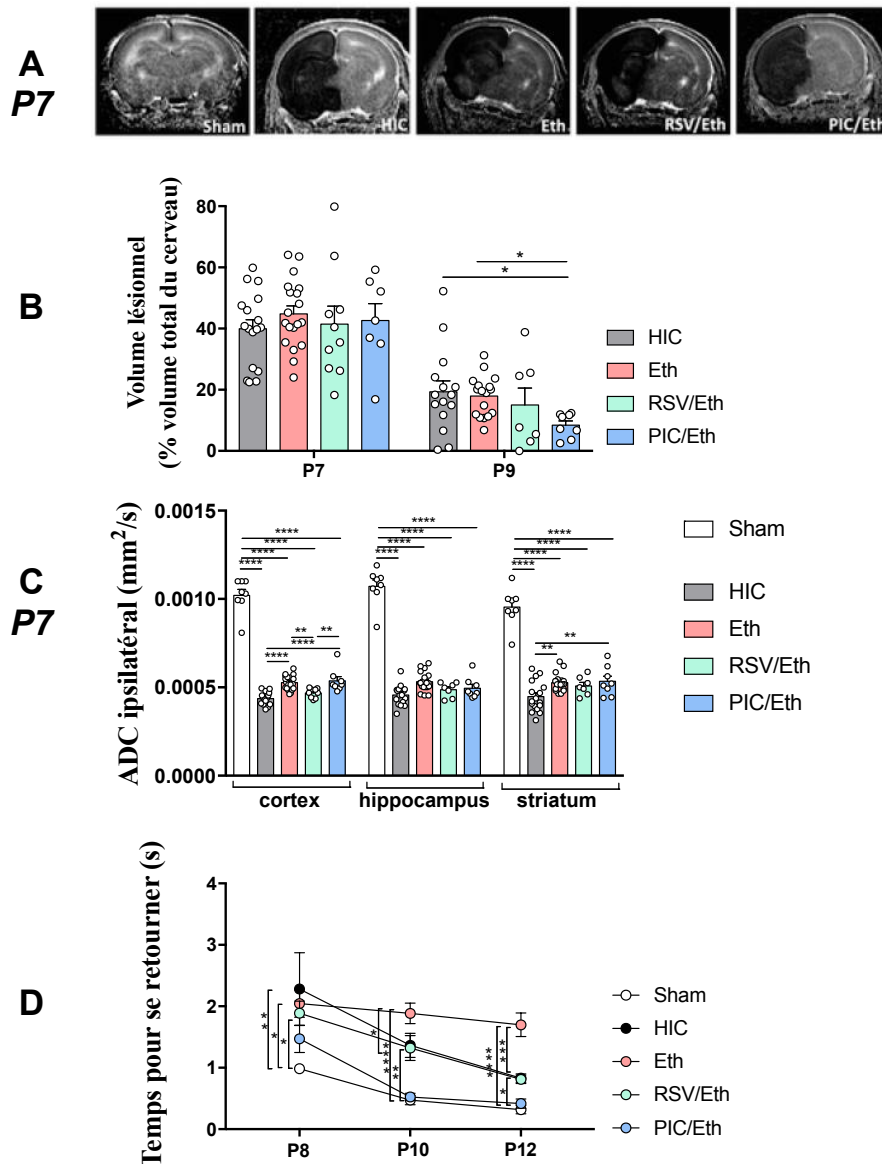


Figure 38: Impact à court terme d'une supplémentation nutritionnelle maternelle en polyphénols, sur les effets délétères de l'HI néonatale couplée à la prise modérée d'alcool.

(A) IRM de diffusion (image de trace inversée) à P7 pour les rats, 3h après la ligature de l'artère carotide commune gauche. La lésion apparaît en hyposignal pour chacun des groupes (HIC, Eth, RSV/Eth et PIC/Eth). (B) Quantification des volumes lésionnels pour chacun des groupes en fonction du temps (P7, P9 et P30), calculés en % du volume total du cerveau. (C) Mesure des ADC, 3h après la ligature dans le cortex, l'hippocampe et le striatum pour tous les groupes. (D) Test du redressement à P8, P10 et P12 pour les groupes sham, HIC, Eth, RSV/Eth et PIC/Eth. Les différences statistiques ont été définies comme $p < 0,05$ (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ et **** $p < 0,0001$).

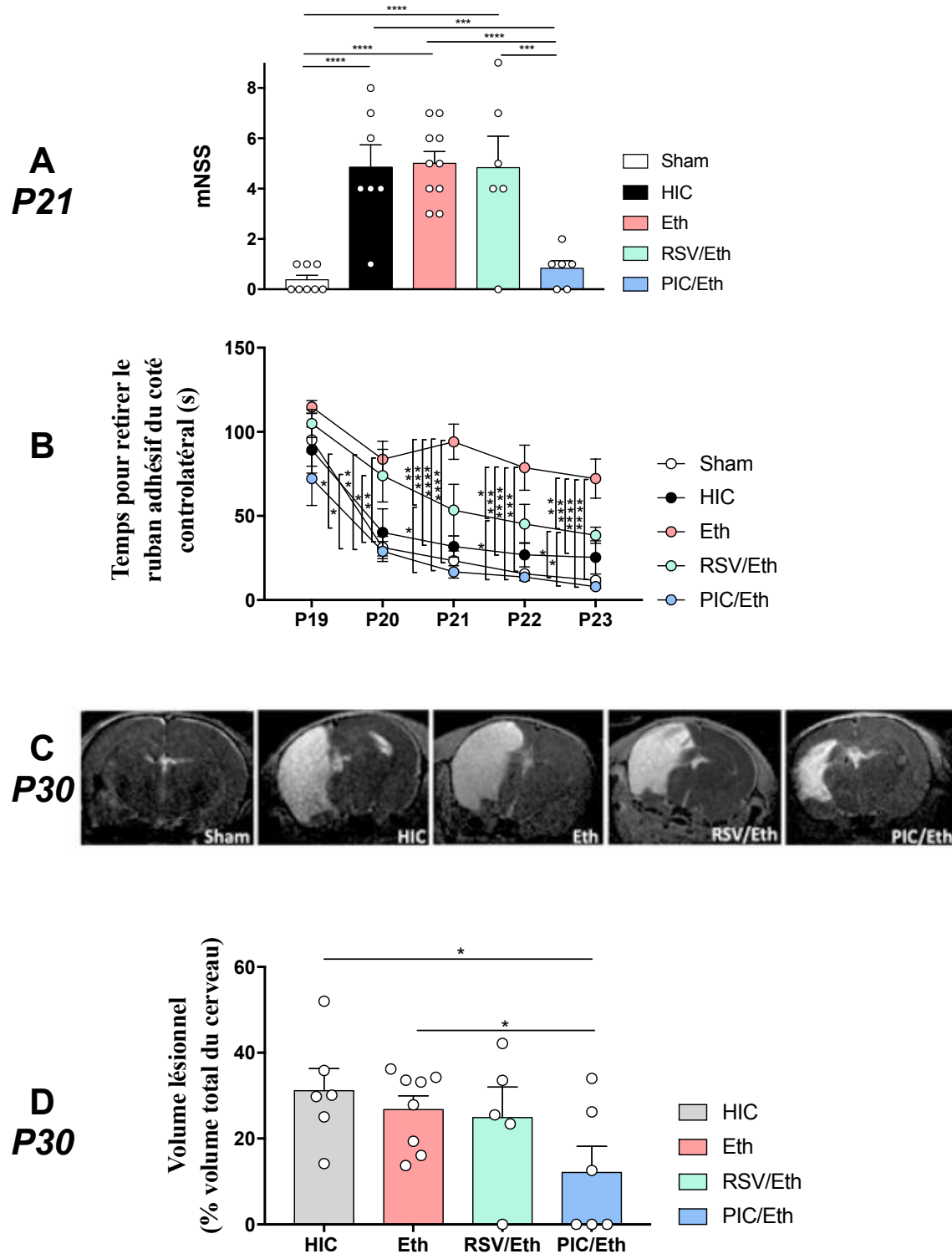


Figure 39: Impact à long terme d'une supplémentation nutritionnelle maternelle en RSV ou PIC, sur les effets délétères cérébraux de l'HI néonatale couplée à la prise modérée d'alcool.

(A) Score du mNSS permettant d'évaluer les séquelles neurologiques; plus le score est élevé plus les fonctions motrices et cognitives sont altérées (0-1: pas de déficit; 2-6: déficits modérés; 7-12: déficits; 13-18: déficits importants). (B) Test du retrait adhésif mettant en évidence les déficits de latéralisation; test réalisé de P19 à P23. (C) IRM (T2) des lésions 23 jours après l'accident d'HI montrant la lésion en hypersignal. (D) Quantification des volumes lésionnels pour chaque groupe à P30 calculés en % du volume total du cerveau. Les différences statistiques ont été définies comme $p < 0,05$ (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ et **** $p < 0,0001$).

4. Discussion

L'originalité de cette étude était de comparer les effets bénéfiques des polyphénols dans un contexte encore plus délétère que l'HI néonatale seule. Le cerveau en développement étant particulièrement vulnérable à une exposition à l'alcool [14], nous avons combiné l'accident d'HI néonatale avec une exposition maternelle modérée à l'éthanol.

Si de plus en plus de travaux montrent des effets bénéfiques des polyphénols, pour la majorité, les effets neuroprotecteurs sont mesurés lors d'une administration intrapéritonéale (risque d'inflammation), avec des doses pharmacologiques élevées (20 – 150 mg/kg). Dans notre étude, les doses de polyphénols utilisées étaient des doses nutritionnelles. Effectivement, la dose de RSV administrée correspondait à l'équivalent de 22 g de raisins (peau et grains compris). La dose de PIC correspondait à un fruit de la passion par jour pour une femme enceinte (Cf. chapitre II -2-2). Enfin, la dose d'alcool utilisée a été choisie pour correspondre à une consommation modérée en alcool, sachant que 10 % des femmes ingèrent encore des boissons alcoolisées pendant leur grossesse [8].

Les résultats IRM obtenus dans notre étude ont montré que la combinaison de l'HI et l'exposition à une dose modérée d'éthanol n'aggravaient pas le volume des lésions ni la sévérité de l'œdème. Au contraire, et de façon surprenante, chez les petits dont la mère a consommé de l'éthanol, une diminution plus faible des valeurs d'ADC a été mesurée (œdème moins sévère). Cependant, ceci n'a pas été corrélé à une diminution du volume lésionnel à P9. Ces données soulignent le fait que les valeurs d'ADC seules ne sont pas suffisantes pour être prédictives de la récupération lésionnelle. La présence du PIC lors d'une consommation maternelle alcoolique a permis d'augmenter de manière significative les valeurs d'ADC dans le cortex et dans le striatum, diminuant ainsi la sévérité de l'œdème cytotoxique. De même, au niveau cellulaire, la proportion de mort neuronale a été moins importante dans la lésion au niveau du cortex et du striatum pour le groupe PIC/Eth. Au niveau des volumes lésionnels, à P7 aucune différence significative n'a été observée. Il est important de se rappeler que dans les chapitres III et IV, la présence d'un polyphénol seul permettait d'observer des diminutions des volumes lésionnels (comparaison avec le groupe contrôle à P7 : diminution de 30 % du volume lésionnel pour PIC (chapitre IV) et 20 % pour RSV (chapitre III) par rapport au groupe HIC). Ici, on note que la présence d'alcool empêche l'action neuroprotectrice à court terme (P7) des polyphénols. De manière générale, les deux polyphénols ont permis une diminution des volumes lésionnels 23 jours après l'HI, mais présentent une neuroprotection différente. En effet, sans le SAF, le PIC a permis de réduire de 92 % la taille des lésions entre P7 et P30, et le RSV de 72 %. Lorsque l'HI est combinée au SAF, le PIC permet une diminution de 72 %, contre 42 % uniquement avec le RSV. Le PIC a donc une meilleure neuroprotection que le RSV que ce soit avec l'HI seule ou l'HI combinée au SAF.

La synergie des deux pathologies ne semble pas augmenter pas les volumes lésionnels détectées à l'IRM, il est donc d'autant plus important de regarder les déficits moteurs et cognitifs évalués lors des tests de comportement. Un effet délétère de la supplémentation maternel en alcool par rapport à l'HI a bien été mis en évidence lors des différents tests de comportement. La supplémentation maternelle en RSV a permis de contrecarrer certains effets délétères de l'HI et d'améliorer partiellement les déficits mnésiques. Une étude avait démontré que le RSV diminuait les effets négatifs de l'éthanol sur la neurogénèse dans l'hippocampe chez des souris âgées de 7 jours [15]. Cependant, la supplémentation en RSV dans le cadre de l'HI néonatale couplée à une prise modérée d'alcool ne s'est pas montrée aussi efficace que la supplémentation en PIC dans ce même contexte. En effet, le groupe PIC/ Eth a montré des résultats équivalents au groupe sham, malgré la présence d'alcool combinée à l'accident d'HI. La supplémentation en PIC permet de restaurer totalement les déficits mnésiques. Cependant, il est important de noter qu'en présence d'éthanol, on ne retrouve pas un niveau de neuroprotection similaire à celui observé dans le chapitre IV. En effet, à P7, le PIC ne présente pas de neuroprotection au niveau des volumes lésionnels. De plus, dans le cas d'une HI combinée au SAF, le pourcentage de diminution des tailles de lésions au court du temps n'est pas aussi importante que lors d'une HI seule (92 % de diminution entre P7 et P30 lors d'une HI seule et 72 % lors d'un SAF et d'une HI).

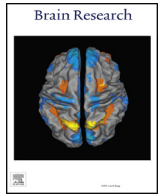
Au stade juvénile, d'autres fonctions sensorimotrices ont été analysées à l'aide du test de retrait adhésif et du mNSS. Le test du retrait adhésif a été adapté pour évaluer les déficits somatosensoriels et les dysfonctionnements asymétriques après un accident d'HI néonatale [13]. Une déficience motrice et sensorielle a été observée dans un contexte de traumatisme cérébral léger associé à une exposition à l'alcool [16]. Lors de ce test, tous nos groupes ont présenté une amélioration quotidienne sauf le groupe Eth. Comme pour les autres tests, le groupe PIC/Eth a présenté des performances identiques à celles du groupe sham. Ces résultats indiquent que la supplémentation maternelle en PIC permet de contrecarrer les effets délétères concernant les asymétries somatosensorielles juvéniles dans un contexte d'alcoolisme maternel modéré combiné à une HI néonatale. Il est à noter que la supplémentation alcoolique maternelle était indispensable pour rendre ce test discriminant. En effet, l'HI seule n'a pas permis de provoquer un déficit de latéralisation détectable. Sachant que les données IRM ne montrent pas de différences significatives au niveau des volumes lésionnels, il était **indispensable de combiner l'IRM avec des analyses comportementales afin d'évaluer les atteintes fonctionnelles**. Ces données ont été renforcées par les résultats de l'étude mNSS et le test de la reconnaissance du nouvel objet.

Ce qu'il faut retenir :

- ◆ L'IRM seule, ici, ne permet pas de prédire les atteintes neurologiques ni les récupérations fonctionnelles provoquées par l'HI, et cela particulièrement dans un contexte du SAF.
- ◆ Le RSV n'est pas en mesure de contrecarrer complètement les dommages engendrés par l'HI néonatale et l'éthanol.
- ◆ Le PIC permet de réduire l'incidence des lésions, les volumes lésionnels et de préserver les fonctions sensorimotrices et cognitives après un accident d'HI néonatale et ce malgré la présence d'éthanol.
- ◆ Le PIC est plus neuroprotecteur que le RSV. Cette propriété pourrait être attribuée à une meilleure biodisponibilité.

5. Bibliographie et publication

1. Evans, A., *The French paradox and other ecological fallacies*. Int J Epidemiol, 2011. **40**(6): p. 1486-9.
2. Renaud, S. and M. de Lorgeril, *Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease*. Lancet, 1992. **339**(8808): p. 1523-6.
3. Evans, A.E., et al., *Autres pays, autres coeurs? Dietary patterns, risk factors and ischaemic heart disease in Belfast and Toulouse*. QJM, 1995. **88**(7): p. 469-77.
4. Costanzo, S., et al., *Wine, beer or spirit drinking in relation to fatal and non-fatal cardiovascular events: a meta-analysis*. Eur J Epidemiol, 2011. **26**(11): p. 833-50.
5. Maryline Foerster, P.M.-V., Gérard Waeber, Peter Vollenweider, Nicolas Rodondi, *Association entre consommation d'alcool et facteurs de risque cardiovasculaire : une étude sur la population lausannoise*. Rev Med Suisse, 2010. **6**: p. 505-509.
6. Guo, R. and J. Ren, *Alcohol and acetaldehyde in public health: from marvel to menace*. Int J Environ Res Public Health, 2010. **7**(4): p. 1285-301.
7. Corrao, G., et al., *A meta-analysis of alcohol consumption and the risk of 15 diseases*. Prev Med, 2004. **38**(5): p. 613-9.
8. Popova, S., et al., *Estimation of national, regional, and global prevalence of alcohol use during pregnancy and fetal alcohol syndrome: a systematic review and meta-analysis*. Lancet Glob Health, 2017. **5**(3): p. e290-e299.
9. Heller, M. and L. Burd, *Review of ethanol dispersion, distribution, and elimination from the fetal compartment*. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, 2014. **100**(4): p. 277-83.
10. Wright, J.T., et al., *Alcohol consumption, pregnancy, and low birthweight*. Lancet, 1983. **1**(8326 Pt 1): p. 663-5.
11. Affairs, C.o.S., *Fetal Effects of Maternal Alcohol Use*. The Journal of the American Medical Association, 1983. **249**(18).
12. Genetta, T., B.H. Lee, and A. Sola, *Low doses of ethanol and hypoxia administered together act synergistically to promote the death of cortical neurons*. J Neurosci Res, 2007. **85**(1): p. 131-8.
13. Bouet, V., et al., *Predicting sensorimotor and memory deficits after neonatal ischemic stroke with reperfusion in the rat*. Behav Brain Res, 2010. **212**(1): p. 56-63.
14. Rice, D. and S. Barone, Jr., *Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models*. Environ Health Perspect, 2000. **108 Suppl 3**: p. 511-33.
15. Xu, L., et al., *Protective effects of resveratrol on the inhibition of hippocampal neurogenesis induced by ethanol during early postnatal life*. Biochim Biophys Acta, 2015. **1852**(7): p. 1298-310.
16. Teng, S.X., et al., *Alcohol exposure after mild focal traumatic brain injury impairs neurological recovery and exacerbates localized neuroinflammation*. Brain Behav Immun, 2015. **45**: p. 145-56.
17. Aayush Kukreja, N.W.a.A.T., *Therapeutic Role of Resveratrol and Piceatannol in Disease Prevention*. Journal of Blood Disorders and Transfusion, 2014. **5**(9).



Research report

Maternal alcoholism and neonatal hypoxia-ischemia: Neuroprotection by stilbenoid polyphenols



Ursule Dumont^a, Stéphane Sanchez^a, Benjamin Olivier^a, Jean-François Chateil^a, Denis Deffieux^b, Stéphane Quideau^b, Luc Pellerin^{a,c}, Marie-Christine Beauvieux^a, Anne-Karine Bouzier-Sore^{a,1}, Hélène Roumes^{a,*,1}

^a CRMSB, UMR 5536, CNRS/University of Bordeaux, 146 Rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex, France

^b Univ. Bordeaux, ISM (CNRS-UMR 5255), Talence, France

^c Department of Physiology, 7 Rue du Bugnon, CH1005 Lausanne, Switzerland

HIGHLIGHTS

- Maternal alcoholism increases deficits induced by neonatal hypoxia-ischemia (HI).
- These impairments are counteracted by maternal supplementation with piceatannol.
- Doses used are equivalent to the piceatannol content of a single passion fruit.
- Piceatannol is neuroprotective in neonatal HI in a context of maternal alcoholism.
- Originality of the study: nutritional and transgenerational therapeutic approach.

ARTICLE INFO

Keywords:

Neonatal hypoxia-ischemia
Neuroprotection
Polyphenols
Magnetic resonance imaging
Maternal supplementation
Maternal alcoholism

ABSTRACT

The impact of maternal nutrition on neurodevelopment and neonatal neuroprotection is a research topic with increasing interest. Maternal diet can also have deleterious effects on fetal brain development. Fetal exposure to alcohol is responsible for poor neonatal global development, and may increase brain vulnerability to hypoxic-ischemic encephalopathy, one of the major causes of acute mortality and chronic neurological disability in newborns. Despite frequent prevention campaigns, about 10% of women in the general population drinks alcohol during pregnancy and breastfeeding. This study was inspired by this alarming fact. Its aim was to evaluate the beneficial effects of maternal supplementation with two polyphenols during pregnancy and breastfeeding, on hypoxic-ischemic neonate rat brain damages, sensorimotor and cognitive impairments, in a context of moderate maternal alcoholism. Both stilbenoid polyphenols, *trans*-resveratrol (RSV – 0.15 mg/kg/day), and its hydroxylated analog, *trans*-piceatannol (PIC – 0.15 mg/kg/day), were administered in the drinking water, containing or not alcohol (0.5 g/kg/day). In a 7-day post-natal rat model of hypoxia-ischemia (HI), our data showed that moderate maternal alcoholism does not increase brain lesion volumes measured by MRI but leads to higher motor impairments. RSV supplementation could not reverse the deleterious effects of HI coupled with maternal alcoholism. However, PIC supplementation led to a recovery of all sensorimotor and cognitive functions. This neuroprotection was obtained with a dose of PIC corresponding to the consumption of a single passion fruit per day for a pregnant woman.

* Corresponding author.

E-mail addresses: ursule.dumont@rmsb.u-bordeaux.fr (U. Dumont), stephane.sanchez@rmsb.u-bordeaux.fr (S. Sanchez), benjamin.olivier@rmsb.u-bordeaux.fr (B. Olivier), jean-francois.chateil@chu-bordeaux.fr (J.-F. Chateil), denis.deffieux@u-bordeaux.fr (D. Deffieux), stephane.quideau@u-bordeaux.fr (S. Quideau), Luc.Pellerin@unil.ch (L. Pellerin), marie-christine.beauvieux@chu-bordeaux.fr (M.-C. Beauvieux), anne-karine.bouzier-sore@rmsb.u-bordeaux.fr (A.-K. Bouzier-Sore), helene.roumes@rmsb.u-bordeaux.fr (H. Roumes).

¹ Same contribution.

<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2020.146798>

Received 30 September 2019; Received in revised form 21 February 2020; Accepted 14 March 2020

Available online 27 March 2020

0006-8993/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Neonatal hypoxia-ischemia (HI) is an important socio-sanitary problem as a major cause of morbidity and mortality in human newborns (1–6/1,000 births) with a high risk of chronic motor, behavioral and neurological deficits (Robertson et al., 1989; Shankaran et al., 1991). HI is characterized by a cerebral deprivation of oxygen and glucose leading to cell death, the most affected being neurons (Northington et al., 2001; Hilario et al., 2005), which leads to sensorimotor deficits and mental retardation associated to learning abnormalities (Robertson and Finer, 1993; Aridas et al., 2014). Despite this major public health problem, the only current clinical treatment is hypothermia, which is thought to slow down neuronal cell death processes by reducing brain metabolism (Hashimoto et al., 2003; Gluckman et al., 2005; Shankaran et al., 2005). This unique therapeutic solution does not appear sufficiently successful (44–53% of infants die or suffer moderate to severe neurological disability after hypothermia treatment (Wu and Gonzalez, 2015)) and new therapeutic approaches must be developed to possibly reverse neonatal HI sequelae. In parallel to this neonatal public health problem, despite better communication about the risks, alcohol consumption in Western countries of pregnant women has not decreased (Corrao et al., 2004). In the USA, 1 out of 12 pregnant women drink alcohol (Li et al., 2012). Maternal alcohol consumption during pregnancy and breastfeeding is well known to lead to deleterious effects on neurodevelopment. It represents the major cause of intellectual disability in neonates (Abel and Sokol, 1986), a phenomenon called fetal alcohol syndrome, which incidence is 1/500 births (Dan et al., 1992). In HI context, it has been shown *in vitro*, on primary neuronal cultures, that combination of ethanol, even at moderate doses, and hypoxia (0.01% ethanol during 24 h plus 0.1% O₂ during 30 min) promote synergistically neuronal death (Genetta et al., 2007). Therefore, neonatal HI in a maternal alcohol exposure context needs better investigations.

We used the classical Rice-Vannucci rat HI model (Rice et al., 1981), which briefly consists of a permanent unilateral occlusion of the common carotid artery, followed by a hypoxic episode, in post natal 7-day old (P7) pups, an age that corresponds to a full-term newborn. This HI model induces large ipsilateral striatal, hippocampal and cortical injuries (Ashwal et al., 2007), leading to sensorimotor and cognitive deficits (Lebedev et al., 2003).

The impact of maternal nutrition on neonatal neurodevelopment and on neonatal neuroprotection is a research topic with increasing interest (Loren et al., 2005; Black et al., 2015). Maternal dietary supplementation with ingestion of pomegranate juice (32, 16 or 8 µmol of polyphenols/day), which contains important quantities of polyphenols, was shown to lead to significant neuroprotection (Loren et al., 2005). In another study, in a dam supplemented with a pomegranate polyphenol extract (4.8 mg polyphenols per day, orally administered during pregnancy and after delivery), a neuroprotective effect on neonatal brain injury after HI was also observed (West et al., 2007). These authors also tested direct intraperitoneal *trans*-resveratrol (RSV) administration on pups. RSV injection (200 µg/kg or greater) reduced caspase-3 and calpain activation and could protect neonatal brain against HI injuries. RSV, notably found in grape skins and several types of nuts or roots is one of the most extensively studied polyphenols. It can cross the placenta (Bourque et al., 2012) and its maternal consumption during pregnancy is safe (Williams et al., 2009). Although the therapeutic properties of RSV are well documented, its bioavailability is low (< 1%). Its hydroxylated analogue, *trans*-piceatannol (PIC), found in large quantities in the seeds of passion fruit, has a two-fold higher bioavailability (Kukreja et al., 2014). However, very few studies have been carried out with this compound and only one study has been conducted on neonatal HI (Dumont et al. (2019)).

In this study, we showed that PIC maternal supplementation (0.15 mg/kg/d) was neuroprotective since brain lesion volumes were reduced and sensorimotor and cognitive abilities were preserved.

Moreover, for half of the pups, no brain lesion could be detected by MRI at long term, confirming the strong neuroprotective effect of this polyphenol.

The aim of the present work was to study the effect of a maternal supplementation with RSV or PIC on HI-pup brain damage in a context of maternal alcoholism. Pregnant and nursing dams were supplemented with RSV or PIC and/or ethanol and the Rice-Vannucci rat model was used to induce HI brain injury in their P7 pups. We evaluated *in vivo* neonate brain damages and their evolution with noninvasive magnetic resonance imaging (MRI). Cell death and brain edema were quantified in young rats for each maternal nutritional condition. Finally, motor and behavioral studies were carried out to evaluate the effect of polyphenols on cognitive functions altered by HI event and maternal alcoholism.

2. Results

2.1. Piceatannol but not resveratrol reduces neonatal brain injuries after a HI episode, in a moderate maternal alcoholism context

Typical apparent diffusion coefficient (ADC) maps of Diffusion Weighted Image (DWI) of P7-pup brains (3 h post-ligation) are presented in Fig. 1A. As expected, the sham group did not show any lesion. In all other groups, HI induced brain damages (Fig. 1A, hypointensity). HI injury affected more particularly the cortex, the hippocampus and the striatum. At P7, no difference in lesion volumes was detected between the different HI groups (Fig. 1B). At P9, pups that underwent a HI episode and whose dam was supplemented with both PIC and a moderate dose of ethanol (PIC/Eth group) had significantly lower lesion volumes than control HI pups (HIC group; pups with HI and coming from dam without any supplementation) and HI pups from dam supplemented with ethanol (Eth group) ($8\% \pm 1\%$ for PIC group vs $19\% \pm 4\%$ and $18\% \pm 2\%$ for HIC and Eth groups, respectively).

DWI allows the basic measure of ADC. This value reflects the degree of diffusion of extracellular water molecules; the smaller, the more severe the cytotoxic edema. Typically, ADC values decrease within minutes in the brain injury area, due to cell swelling, which occurs during this cytotoxic edema. The change in ADC value after HI is a dynamic process and tends to return to higher values 24 to 48 h after the insult, a phenomenon called “pseudonormalization” (Lodygensky et al., 2008). ADC values at P7 were quantified in cortex, hippocampus and striatum (Fig. 1C). ADC significantly decreased in all HI groups. The severity of edema in the cortex and the hippocampus was significantly lower in the Eth and PIC/Eth groups compared to the other HI groups.

Neuronal death was evaluated in the penumbra region (cortex and striatum) by Nissl staining on P9-pups (Fig. 1D). For the cortical region, the HIC group presented the highest level of neuronal death compared to other HI groups (Fig. 1E). No significant difference was measured between Eth and RSV/Eth groups. However, less neuronal death was measured in the PIC/Eth group compared to the RSV/Eth group ($7\% \pm 6\%$ vs $21\% \pm 4\%$, respectively). In the striatal region, the PIC/Eth group presented the lowest level of neuronal death compared to other HI groups and both Eth and RSV/Eth groups presented the highest level of neuronal death.

2.2. Maternal polyphenol supplementation allows recovery of neonatal HI brain lesions detected by MRI despite moderate maternal alcoholism

At P30 (Fig. 2A), 23 days after the HI insult, brain lesions were still observed by MRI in all pups in the HIC and Eth groups, whereas no more lesion was detected for 20% and 50% of pups in the RSV/Eth and the PIC/Eth groups, respectively (Fig. 2B). Pups in the HIC, Eth and RSV/Eth groups had larger lesion volumes compared to pups in the PIC/Eth group (Fig. 2C). Even if the incidence of brain damage was decreased by maternal RSV supplementation, RSV administration did

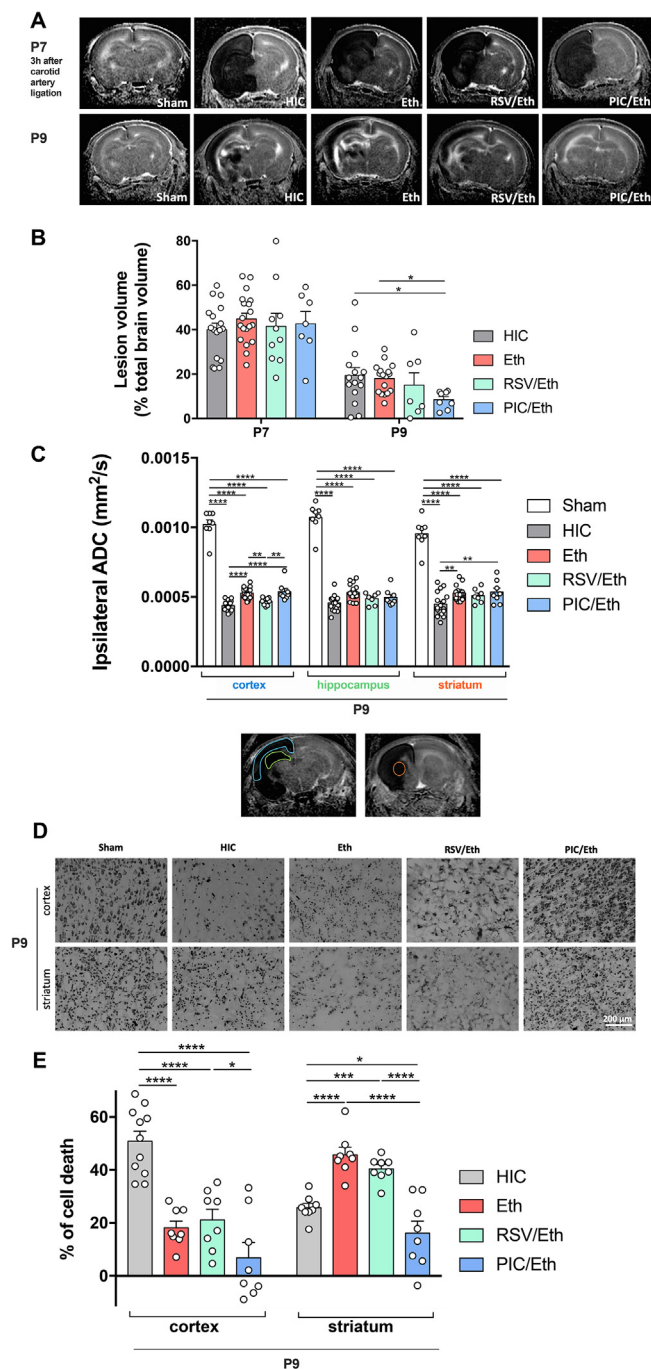


Fig. 1. Early impact of maternal nutritional supplementation on neonate brain injuries induced by HI. (A) Typical DWI of P7 and P9 pup brains of sham, HIC, Eth, RSV/Eth, and PIC/Eth groups. Images were obtained at 4.7 T, 3 h and 48 h after carotid artery ligation (P7 and P9, respectively). Damages appeared as a hypointensity. (B) Quantification of lesion volumes for the different groups between P7 and P9 (% normalized to total brain). (C) Ipsilateral ADC values for sham, HIC, Eth, RSV/Eth and PIC/Eth groups. Typical ROIs for ADC measurements are shown below the histogram (cortex: blue; hippocampus: green and striatum: orange). (D) Nissl staining in the penumbra region from P9-pups for the different groups. (E) Neuronal cell death evaluated in the penumbra region after Nissl staining. Results are mean values $\pm$ SEM. *Significant difference between two groups (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$), one-way analysis of variance (ANOVA) with Fisher's LSD post hoc tests; $n = 8$ sham pups, $n = 17$ HIC pups, $n = 19$ Eth pups, $n = 10$ RSV/Eth pups, $n = 7$ PIC/Eth pups.

not reduce lesion volumes (Fig. 2C, $31\% \pm 5\%$; $27\% \pm 3\%$; $24\% \pm 7\%$; $12\% \pm 6\%$, in HIC, Eth, RSV/Eth and PIC/Eth groups, respectively).

2.3. Piceatannol counteracts the deleterious sensorimotor and cognitive effects induced by neonatal HI, despite moderate maternal consumption of ethanol

Cortex and striatum, two structures involved in automatic motricity, were damaged in our HI model.

The righting test was performed at P8, P10 and P12 to evaluate the impact of the different maternal supplementations on sensorimotor abilities and neurological reflexes after HI (Fig. 3A). Pup performances improved with time in all groups, except in the Eth group. This could reflect either a process of learning and habituation or an improvement of the sensorimotor functions linked to pup development with age, or a combination of both processes. Best performances were measured for sham pups and pups from the PIC/Eth group (no significant difference between these two groups). Pups in the HIC and RSV/Eth groups showed intermediate performances between sham or PIC/Eth groups and Eth group, in which pups had the poorest performances.

The same pattern was observed in the negative geotaxis test. Pups from the Eth group showed the worst performances compared to the other HI groups and pups from the PIC/Eth group had identical abilities than the sham group (no significant difference between sham and PIC/Eth, whatever the considered test day) (Fig. 3B).

Since the HI model (unilateral carotid artery ligation) induces ipsilateral lesions, sensorimotor asymmetries were assessed using the adhesive removal test (Fig. 3C). This test allowed to discriminate between pups from the Eth group and all other pups since they had the poorest performances. The time to remove the adhesive decreased with days, indicating habituation and learning in combination with an improvement of the sensorimotor functions for all pups except the ones in the Eth group. Pups in the RSV/Eth group presented intermediate abilities while HIC and PIC/Eth groups performed as well as the sham group (no significant difference between sham, HIC and PIC/Eth groups).

Sensorimotor deficits were also assessed using the modified neurological severity score (mNSS) (Fig. 3D). Animals were evaluated at P24 (17 days post-HI). The mNSS scores in sham and PIC/Eth groups were significantly lower than the one measured in HIC, Eth and RSV/Eth groups (0.38 ± 0.18 ; 0.83 ± 0.31 ; 4.86 ± 0.88 ; 5.0 ± 0.47 and 4.83 ± 1.24 for sham, PIC/Eth, HIC, Eth and RSV/Eth groups, respectively).

In our HI model, hippocampi were frequently injured. For this reason, the novel object recognition test was used to evaluate hippocampal-dependent long-term memory of pups at a later stage (Fig. 3E). Animals were tested at P45, using a retention interval of 24 h to assess long-term memory (Lueptow, 2017). Juvenile rats in the HIC and Eth groups presented a long-term memory deficit, whereas no difference was found between animals in the sham and PIC/Eth groups. Rats in the RSV/Eth group presented an intermediate ability to discriminate the novel object (discrimination index: 0.77 ± 0.04 ; 0.47 ± 0.09 ; 0.41 ± 0.04 ; 0.58 ± 0.09 ; 0.66 ± 0.02 for sham, HIC, Eth, RSV/Eth and PIC/Eth, respectively).

3. Discussion

Neonatal HI caused by oxygen and glucose deprivation induces an energetic failure and a decrease in ATP, which in turn leads to a reduced sodium–potassium ATP pump activity and membrane depolarisation. The loss of membrane polarity leads to glutamate efflux and calcium influx (Salter and Fern, 2005; Karadottir and Attwell, 2007). Calcium is responsible for the activation of several enzymes such as proteases, endonucleases and nitric oxide synthase (Mitani et al., 1995). Therefore, the initial oxygen and glucose deficits lead to excitotoxicity, disruption of ion homeostasis and calcium dysregulation that affect

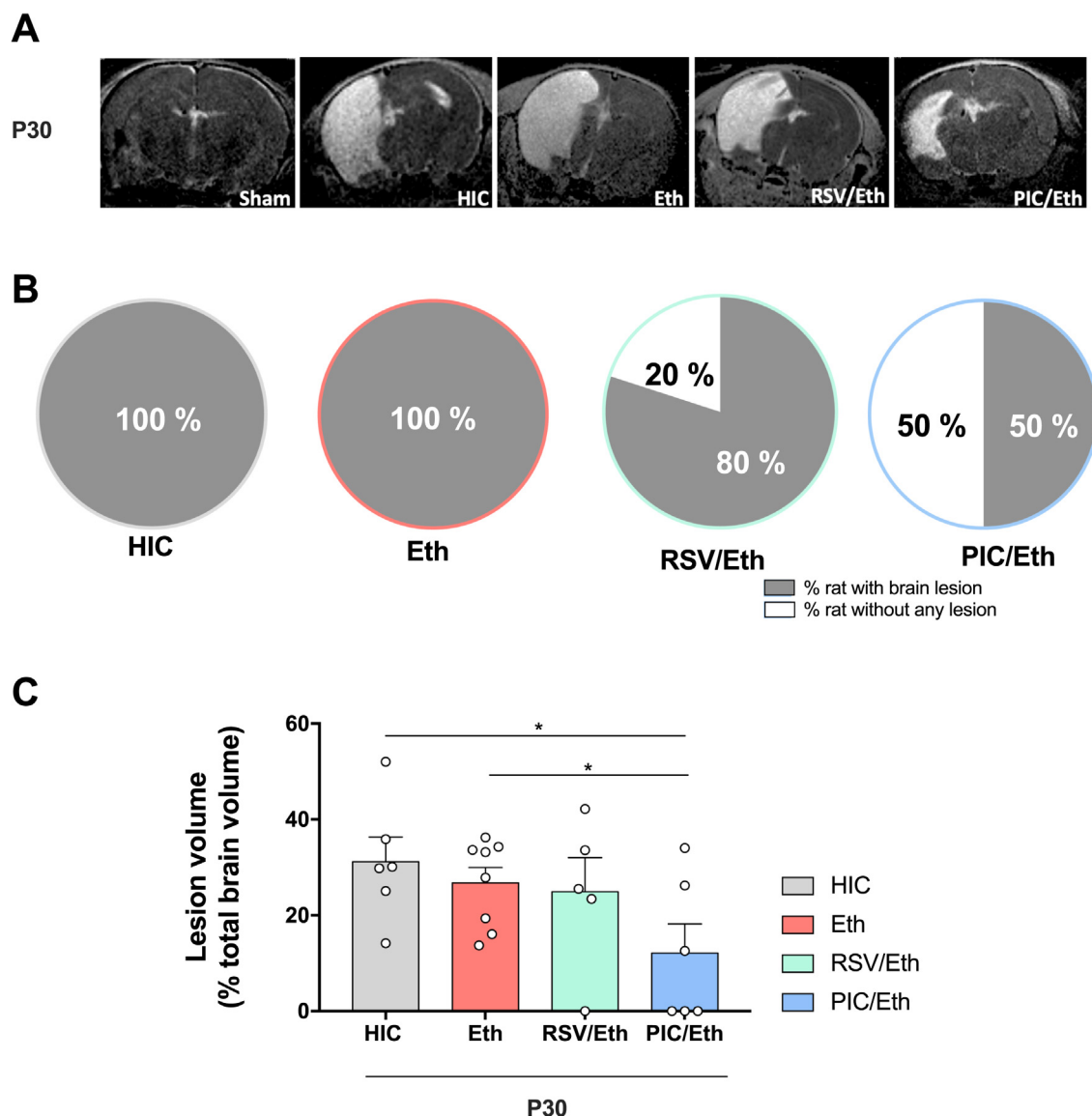


Fig. 2. Long term impact of maternal nutritional supplementation on neonate brain injuries induced by HI. (A) Typical DWI of pup brains from sham, HIC, Eth, RSV/Eth, and PIC/Eth groups. Images were obtained at 4.7 T at P30. At this time point, damages appeared as a hypersignal. (B) Representation of the percentage of pups still presenting brain lesions for HIC, Eth, RSV/Eth and PIC/Eth groups, at P30. Results are mean values $\pm$ SEM. * Significant difference between two groups (* $p < 0.05$), one-way analysis of variance (ANOVA) with Fisher's LSD post hoc tests; $n = 6$ HIC pups, $n = 8$ Eth pups, $n = 5$ RSV/Eth pups, $n = 6$ PIC/Eth pups.

mitochondria. In a second step, during reperfusion, due to this first energetic failure and the increase in free radicals and reactive oxygen species (ROS) production, cellular swelling takes place and neuronal apoptosis occurs. Indeed, neurons are the most affected by oxygen and glucose deprivation (Northington et al., 2001; Hilario et al., 2005). Their death results in sensorimotor deficits, mental retardation and learning abnormalities (Robertson and Finer, 1993; Aridas et al., 2014). The modest response to the unique therapeutic strategy proposed up to now (hypothermia) emphasizes the necessity to find new treatments.

A growing number of studies have shown a neuroprotective role of RSV in a context of neonatal HI. This polyphenol was found to be a potent protective agent after a HI event by reducing infarct volume, neuronal loss and, consequently, by preventing cognitive deficits (West et al., 2007; Karalis et al., 2011; Arteaga et al., 2015). However, the neuroprotective effect of RSV was observed after direct intraperitoneal injection in pups that underwent HI, a pro-inflammatory mode of administration. Moreover, in previous studies, RSV was administrated at high pharmacological doses (20–100 mg/kg). In this study, we used, for

the first time, a low (nutritional) dose of RSV (0.15 mg/kg/day) and explored the impact of maternal supplementation. This corresponds to an ingested doses of 10.5 mg of RSV or PIC per day for a pregnant woman (weighting 70 kg). RSV is present in various edible plants such as rhubarb, fresh peanuts, cacao beans and in large quantities in grapes, which contain up to 486 mg/kg of RSV (Zhao and Hall, 2008) (depending on the specie). Therefore, the doses of RSV administered during our maternal supplementation protocol correspond to the consumption of about 22 g of grapes (about thirty grape berries) per day for a pregnant woman. Similarly, taking into account the PIC content of passion fruit (2.2 mg of PIC per g of raw passion fruit seeds (Matsui et al., 2010)) and the weight of the seeds (between 5 and 10 g/fruit), a passion fruit contains about 10 to 20 mg of PIC. Therefore, the doses of PIC tested in maternal supplementation in the rat correspond to the consumption of a single passion fruit per day for a pregnant woman. Concerning ethanol, the doses used to mimic maternal alcoholism are moderate. Since dams were supplemented with ethanol at a dose of 0.5 g/kg/d, this corresponds to 35 g/d for a pregnant woman, which is

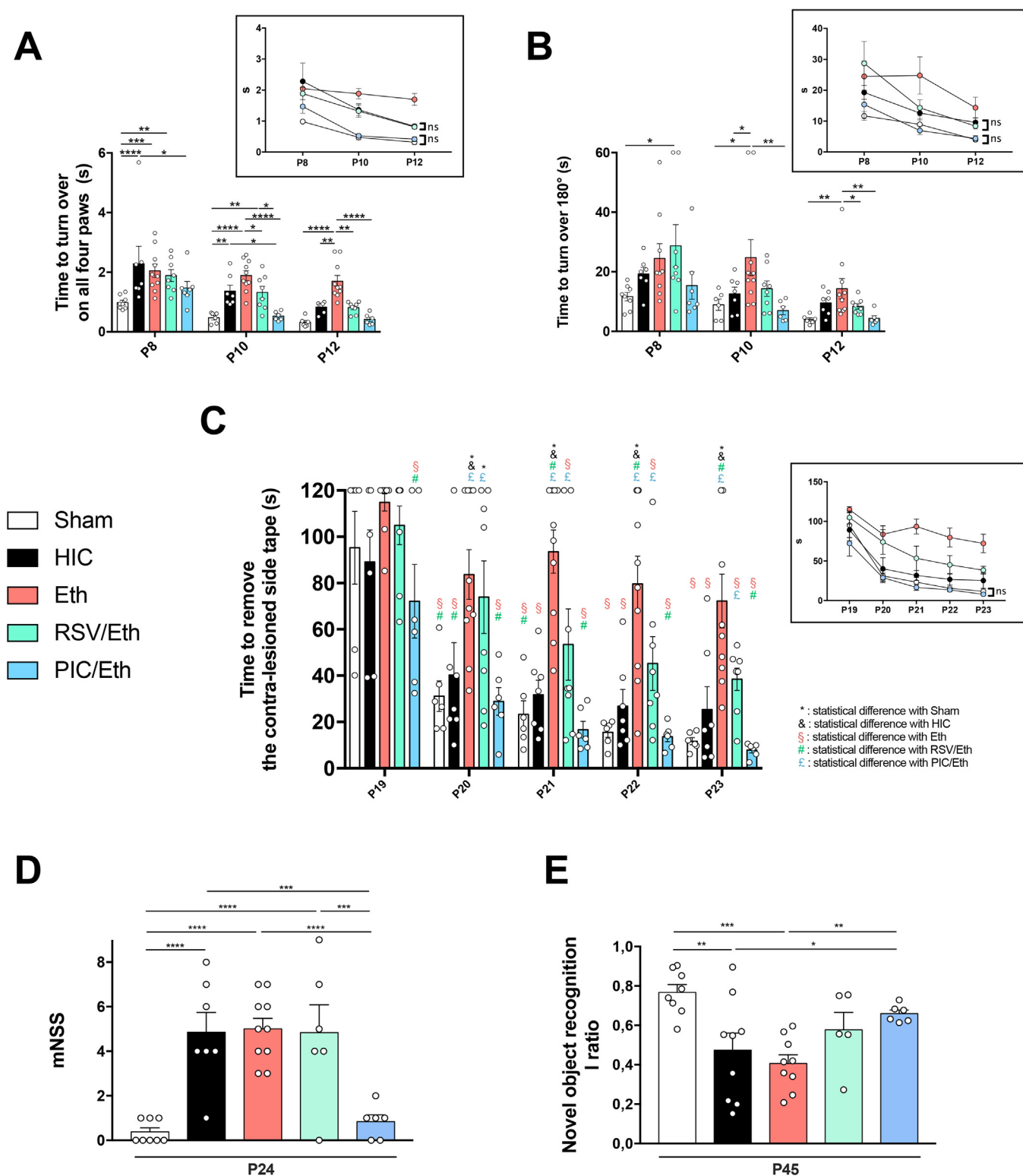


Fig. 3. Early and long-term effect of maternal supplementation on sensorimotor and cognitive functions of HI pups. (A) Performance for righting reflex for sham, HIC, Eth, RSV/Eth and PIC/Eth groups, from P8 to P12. Insert: Evolution of performances with time; AUC analyses indicate no statistical difference between sham and PIC/Eth groups, and no difference between HIC and RSV/Eth groups. (B) Performance for negative geotaxis for sham, HIC, Eth, RSV/Eth and PIC/Eth groups, from P8 to P12. Insert: Evolution of performances with time; AUC analyses indicate no statistical difference between sham and PIC/Eth groups, and no difference between HIC and RSV/Eth groups. (C) Performance for adhesive removal test between P19 and P23, for sham, HIC, Eth, RSV/Eth and PIC/Eth. *, &, §, # and £ represent significant difference ($p \leq 0.05$) with sham, HIC, Eth, RSV/Eth or PIC/Eth group, respectively. Insert: Evolution of performances with time; AUC analyses indicate no statistical difference between sham and PIC/Eth groups. (D) mNSS scores at P24 for each group. (E) Performances for the novel object recognition test, assessed at P45 for sham, HIC, Eth, RSV/Eth and PIC/Eth groups. The discrimination index was calculated as: [time in new object – time in familiar object]/[time in new object + time in familiar object]. Results are mean values $\pm$ SEM. * significant difference between two groups (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$), one-way analysis of variance (ANOVA) with Fisher's LSD post hoc tests.

equivalent to the consumption of 2 glasses of wine (14 cl, 12.5°). This dose was chosen to correspond to a moderate alcohol consumption and our model reflects the fact that 10% of women still drink alcohol during pregnancy (Popova et al., 2017). If the prevalence of alcohol use during pregnancy was estimated by several studies, it is more difficult to get epidemiological data on doses of alcohol intake during this period. However, it has been estimated that among pregnant women drinking a glass of wine daily, 10% will have a child with fetal alcohol syndrome (Rendle-Short, 1985). Therefore, the main aim of the present original nutritional and transgenerational study was to evaluate the effect of a maternal supplementation with RSV or PIC on HI-pup brain damages in a context of moderate maternal alcoholism.

Besides the quantification of lesion volume, the early measurements of ADC reflected cytotoxic edema severity. Indeed, in this case, tissue edema is due to cellular swelling and leads to a decrease in extracellular water movement speed and then, therefore, to a decrease in ADC values. Three major types of cerebral edema have been described: cytotoxic, ionic and vasogenic (Berezowski et al., 2012). A smaller decrease in ADC values in the cortex and in the striatum was measured in the PIC/Eth group indicating that, in addition to have smaller lesions, pups that underwent HI in this group presented a less severe cytotoxic edema. These data underlined a neuroprotective role of PIC maternal supplementation. This neuroprotective effect of PIC supplementation was also observed at the cellular level by histochemistry since less neuronal death was measured in both cortical and striatal penumbra regions. Surprisingly, maternal Eth consumption also led to a smaller decrease in ADC values but was, however, not linked to smaller lesion volumes 48 h post-HI and not associated with a stronger Nissl staining. This underline the fact that ADC values alone, measured just after the insult, are not sufficient to predict the recovery of the penumbra zone.

Regarding sensorimotor performances, hypoxic-ischemic pups (HIC) performed less well than pups in the sham group for the righting reflex and the negative geotaxis tests. These results are in agreement with previous studies on mice or rats subjected to HI (Ten et al., 2003; Lubics et al., 2005; Kiss et al., 2009) showing that this event affects the short-term outcome of early reflexes. The deleterious effect of maternal alcoholism could be highlighted by these tests since Eth group pups were not able to improve their performance with time, which was the case for pups in the other HI groups. If maternal supplementation with RSV allowed to partially counteract some deleterious effects of HI, this supplementation was not as neuroprotective as PIC. Indeed, pups in the PIC/Eth group were able to reach the same level of performance as sham pups for these tests, meaning that maternal oral PIC supply improves early deficits after HI injury, even in a context of maternal alcoholism. Pups subjected to neonatal HI show a high capacity of recovery, as it has been suggested by previous studies (Lubics et al., 2005; Kiss et al., 2009) and RSV has been shown to decrease the deleterious effects of Eth in hippocampal neurogenesis, in 7-day-old mice (Xu et al., 2015). Sensorimotor functions were also assessed later in juvenile rats (P20–24) using the adhesive removal test. This test is usually used to detect long-term deficit after stroke in adult rodents (Zhang et al., 2002; Freret et al., 2006; Bouet et al., 2010) and was adapted to juvenile rats by Bouet et al. for assessing somatosensory deficits and asymmetric dysfunctions after neonatal ischemic stroke (Bouet et al., 2010). In this test, all groups, except the Eth group, significantly improved their performance over time. HI groups performed less well than the sham group. While the RSV/Eth group performed slightly better than the ethanol group, remarkably, the PIC/Eth group was indistinguishable from the sham group. These results indicate that maternal PIC supplementation counteracted the deleterious effect of the HI event on juvenile somatosensory asymmetries even in a maternal alcoholism context. These data were reinforced by the mNSS results.

It had been reported in a cohort of 40 children that HI can lead to hippocampal damage and, later to an impairment in cognitive memory (Cooper et al., 2015). HI rodents also display short- and long-term memory deficits (Balduini et al., 2000; Ikeda et al., 2001; Wagner et al.,

2002; Arteaga et al., 2015). Long-term memory was assessed by the novel object recognition test, in which maternal PIC supplementation was able to revert the deleterious effect of HI and maternal alcoholism (same discrimination index for PIC/Eth and sham groups). These data show a neuroprotective role of maternal PIC supplementation on hippocampal-dependent long-term memory of pups. These results are in agreement with the study of Arteaga et al. (2015), which demonstrated that intraperitoneal injection of RSV improves the long-lasting cognitive deficits induced by HI (a study not in the context of alcoholism however). They proposed that the RSV protective effect could be due to the protection and preservation of neocortical and subcortical brain areas (sensorimotor cortex, hippocampus and striatum) and in particular, of neuronal networks responsible for learning and memory (Arteaga et al., 2015). The authors postulated that the neuroprotective role of RSV could be due to its antioxidant effect. Pups in the Eth group presented the lowest discrimination index, indicating that long-term memory was impaired, even in a context of moderate maternal alcohol consumption. Such an impairment was also observed in a context of mild focal traumatic brain injury coupled with alcohol exposition (sub-chronic intermittent alcohol vapor, 95% ethanol 14 h on/10 h off, Teng et al., 2015). It could be also noted that pups in the RSV/Eth group tended to present intermediate discrimination index values, suggesting that RSV could prevent, but only partially, hippocampal-dependant long-term memory deficits induced by ethanol consumption.

Many studies have focused on the antioxidant properties of RSV. However, these properties are observed only at high doses. In the context of HI, RSV neuroprotection could be multimodal. In addition to SIRT1 activation (Yang et al., 2013), RSV could also modulate metabolism (Fig. 4). For example, HI leads to a decrease in astrocytic glutamate uptake (Morken et al., 2014), which results in glutamate excitotoxicity that could be reversed by RSV (Girbovan and Plamondon, 2015; Bellaver et al., 2014). Moreover, in primary cultures of mouse cortical astrocytes, it has been shown that the uptake of glutamate induces an increase in astrocytic production of lactate via the stimulation of glycolysis (Pellerin and Magistretti, 1994). Interestingly, RSV has been shown to increase glycolysis in the liver (Beauvieux et al., 2013), but also in the brain, leading to a neuroprotective effect in a mouse model of middle cerebral artery occlusion (Koronowski et al., 2017). In parallel, in rat hippocampal slices, RSV (100 μ M) led to an increase in lactate release (Quincozes-Santos et al., 2014). Although lactate has long been considered as a metabolic waste product, it is now more and more considered as a substantial brain energetic fuel. In 1994, Pellerin and Magistretti proposed a metabolic exchange between astrocytes and neurons in which blood glucose enters first the astrocytes, which are more glycolytic cells (Bouzier-Sore and Pellerin, 2013), where it is converted into lactate. This lactate is then transferred to neurons where it is converted back to pyruvate for its oxidative use (Bouzier-Sore et al., 2003), an intercellular exchange called the astrocyte-neuron lactate shuttle (ANLS) (Pellerin and Magistretti, 1994). In the context of HI, providing lactate as an energetic substrate for neurons has been recently shown to be neuroprotective (Roumes et al., 2020) as it could spare glucose for its metabolic use through the pentose phosphate pathway (PPP). Indeed, this pathway is mandatory to maintain high levels of reduced glutathione, a metabolite necessary to fight against ROS. Glutathione levels were measured in neuronal stem cells treated with RSV (5 μ M) following oxygen-glucose deprivation/reoxygenation (Shen et al., 2016) as well as in rat hippocampal slices treated with RSV (100 μ M), in a context of H₂O₂ oxidative stress injury (de Almeida et al., 2008). The content of glutathione was increased by 20% and 80%, respectively. In astrocytes, RSV (10 mM) was able to decrease intracellular ROS levels induced by H₂O₂ oxidative stress (Daverey and Agrawal, 2018). By increasing glycolysis, and therefore lactate, in astrocytes (which could then promote glucose use via PPP in neurons and enhanced their reduced glutathione levels), RSV may prevent neuronal death and reduce brain damages leading to motor and cognitive impairments.

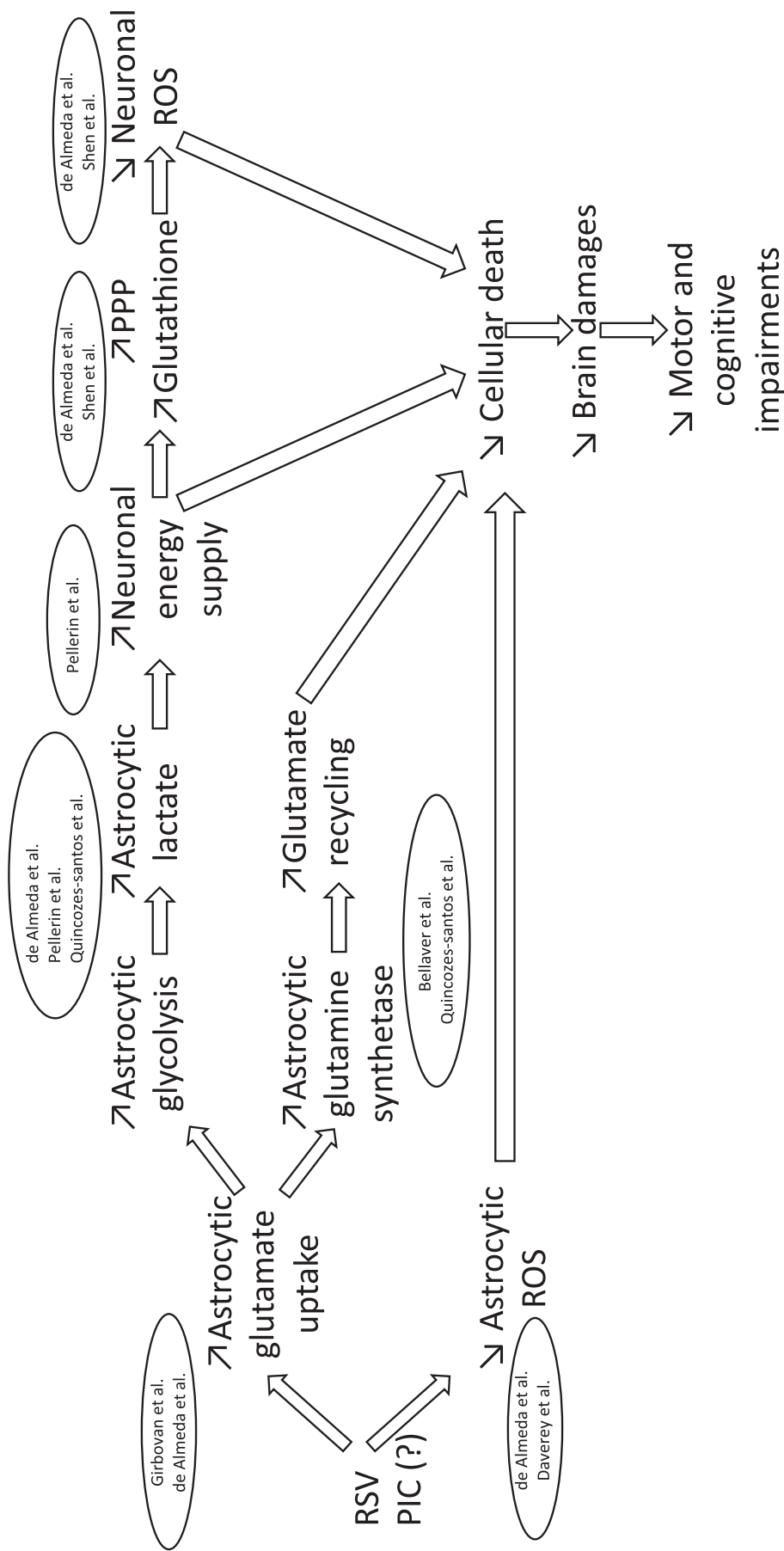


Fig. 4. Schematic representation of RSV effects on brain metabolism.

There may be some limitations in our study. First, we did not perform a dose–response study. However, since we used low and nutritionally realistic doses, one may assume that it is not critical for the demonstration and that our study is relevant in a plausible context. Second, we tested the neuroprotective effect of stilbenoid polyphenols in the context of moderate alcoholism. However, the proportion of young people who engage in binge drinking (drinkers tend to consume higher quantities of alcohol per occasion but drink less frequently) remains high. Taking into account that this behavior may occur in the context of unknown pregnancy, further experiments should be conducted to explore the impact of such alcoholic episodes on the outcome of neonatal HI encephalopathy.

In the context of moderate alcohol maternal intake, we found that RSV was not able to fully protect against HI lesions. However, PIC supplementation, even combined with a moderate dose of ethanol, allowed pups to recover their sensorimotor and cognitive functions after a HI event. PIC differs from its analogue RSV by only one hydroxyl group. This confers to PIC a higher bioavailability compared to RSV (Kukreja et al., 2014), which could explain the higher neuroprotective effect of PIC compared to RSV. Contrary to a comprehensive literature on RSV, few publications report on the effects of PIC; our results argue in favor of the need to continue studies on this molecule.

Taken altogether, our results support that in a context of neonatal HI and moderate maternal alcohol consumption, PIC, at a dose equivalent in humans to 1 passion fruit / day, could partially reverse the anatomical brain lesions and, more importantly, could totally counteract the sensorimotor and long-term memory impairments. Based on these results, maternal supplementation with PIC may be considered as a preventive nutritional approach in the context of maternal alcoholism to limit further possible brain damages if a neonatal HI event might occur.

4. Experimental procedures

4.1. Study design

The aim of the present work was to study the effect of maternal nutritional supplementation with polyphenols on offspring brain damages induced by HI, in a moderate maternal alcoholism context. Scheme of the experimental design is presented in Fig. 5. All animal procedures were conducted in accordance with the Animal Experimentation Guidelines of the European Communities Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC). Protocols met the ethical guidelines of the French Ministry of Agriculture and Forests, and were approved by the ethical committees (N° authorization 9476). Sample size was determined based on previous studies.

4.2. Animals

Pregnant Wistar RJ-HAN females (Janvier Laboratories, Le Genest Saint Isle, France) were received one week before delivery and were kept on a 12:12 h light:dark cycle with water and food (A03) *ad libitum*.

4.3. Model of hypoxic-ischemic brain injury

Cerebral HI was performed as described previously (Rice et al., 1981; Brissaud et al., 2010; Dumont et al., 2019). Briefly, P7-pups of either sex, weighing 14–20 g, were anaesthetized with isoflurane (induction: 4%; maintenance: 1.5%) and a midline neck incision was made under local anesthesia (lidocaine 0.5%). The left common carotid artery was exposed and permanently ligated (7–0 silk thread). After surgery, animals were allowed to recover (30 min) on a heated mattress to maintain body temperature at 36 ± 1 °C. Pups were then placed for 2 h in a humidified hypoxic chamber (8% oxygen, 92% nitrogen – 33 °C) (Intensive Care Unit Warmer, Harvard Apparatus, Les Ulis, France) to maintain a constant thermal environment (rectal

temperature: 36 ± 1 °C). During hypoxia, sham-operated pups were kept separated from the dam in a heated atmosphere (33 °C). The first diffusion MRI was performed 3 h after carotid artery ligation, then after 48 h (P9) and 23 days (P30).

4.4. Experimental groups

Five experimental groups were considered. The different nutritional supplementations were added in the maternal drinking water 7th day before delivery until the 9th day post-delivery.

Maternal drinking water was supplemented with Eth (Sigma-Aldrich, France; 0.5 g/kg/d - equivalent to the consumption of 2 glasses of wine (14 cl, 12.5°) for a pregnant woman) for Eth group (n = 19), Eth (0.5 g/kg/d) and RSV (Sigma-Aldrich, France; 0.15 mg/kg/d) for RSV/Eth group (n = 10) and Eth (0.5 g/kg/d) and PIC (Tokyo Chemical Industry Co, France; 0.15 mg/kg/d) for PIC/Eth group (n = 8). For sham (n = 8) and control groups (HIC group, n = 17), 4 µl of absolute Eth were added into the rat water bottle (corresponding to the Eth volume added during polyphenols supplementation (final Eth concentration: 0.002%) since polyphenol solutions were prepared in absolute ethanol).

Additional controls were also performed to ensure that maternal RSV or PIC supplementation alone was not deleterious for pups (MRI and behavioural parameters, data not shown). For these two supplementary groups, dams were supplemented with RSV (n = 8) or PIC (n = 8) (0.15 mg/kg/d), respectively, during the same period.

4.5. Acquisition of in vivo longitudinal MRI

In vivo MRI was performed at P7 (3 h after carotid artery ligation), P9 and P30 on a horizontal 4.7 T Biospec 47/50 system (Bruker, Ettlingen, Germany) equipped with a 6-cm BG6 gradient system (1000 mT/m, $\Delta = 20$ ms, $\delta = 4$ ms). For MRI, pups were anesthetized with isoflurane 4% for induction and $1.5 \pm 1\%$ for maintenance. Respiration was monitored by a ventral pressure sensor. Pup body temperature was maintained at 36 ± 1 °C during acquisitions with a water-heated MRI bed. Anatomical T2-weighted images of the brain were obtained using a Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement (RARE) sequence with 20 axial slices, 0.7 mm thick, echo time (TE) = 50 ms, repetition time (TR) = 3000 ms (total duration 4 min 48 s). Brain lesions were assessed by Diffusion Weighted Imaging (DWI: 20 axial slices of 0.7 mm, 30 directions, b-value 1347 s/mm², TE 24 ms, TR 2 s, total duration 17 min 04 s). Measurements were performed with Paravision 6.0.1 software (Bruker BioSpin, Karlsruhe, Germany).

4.6. MRI analysis

The lesion volumes were measured on the ADC maps on 20 successive slices at P7, P9 and on T2 weighted images at P30 and are presented as a % of the total brain volume. For each rat, two region-of-interest (ROI) were manually drawn, on each slice (n = 20), the first one that encompasses the injured area and the second one to determine the global brain area. Edema severity was evaluated by the measurement of ADC values at P7. ADC maps were computed using the Paravision 6.0.1 software diffusion tensor calculation module. ADC values were measured inside the lesion area. ROIs were manually drawn such as delineating the brain lesion inside the cortex and the hippocampus. For the striatum, located on another section, a circular ROI was placed in the middle of the lesion inside the structure. Analyses were performed blind by 2 separate operators (intra-operator variability < 1%; inter-operator variability < 5%).

4.7. Behavioral study

4.7.1. Righting reflex (P8, P10, P12)

Pups were placed on their back and the time they took to turn over

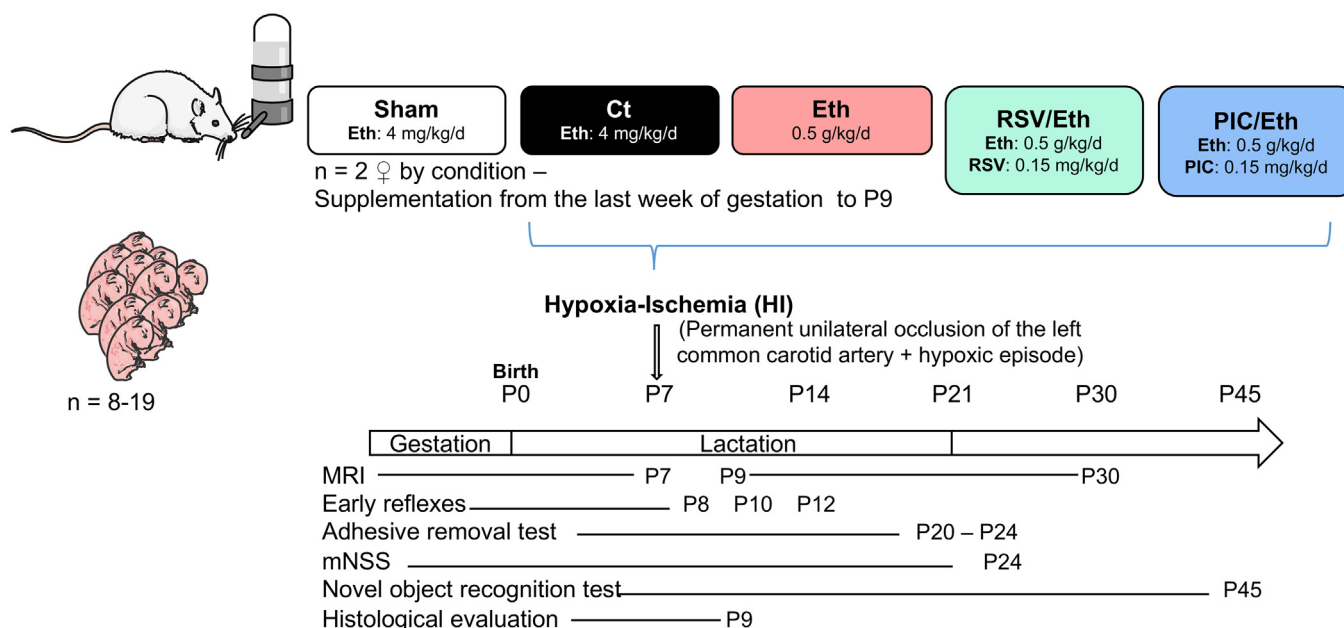


Fig. 5. Scheme of experimental design. Five different groups were included in the study: sham group that only suffered the exposition of the left common carotid artery (no HI), HIC group that was exposed to HI procedure, Eth group whose dams were supplemented with Eth (0.5 g/kg/d), RSV/Eth group whose dams were supplemented with RSV (0.15 mg/kg/d) plus Eth (0.5 g/kg/d), and PIC/Eth group whose dams were supplemented with PIC (0.15 mg/kg/d) plus Eth (0.5 g/kg/d). HI brain lesions were followed-up by MRI. Effects of maternal supplementation on HI brain damages were assessed by histological analysis as well as a sensorimotor and behavioral approach.

their four paws was recorded. Each pup was given three trials a day and the mean time to perform the test was calculated.

4.7.2. Adhesive removal test (from P20 to P24)

Somatosensory deficits and asymmetric dysfunctions were evaluated using the adhesive removal test (Chen et al., 2001; Bouet et al., 2010). After an habituation period (60 s) in the open field (20 cm × 30 cm), two adhesive tapes (0.5 cm × 0.5 cm) were used as bilateral tactile stimuli occupying the distal-radial region on the wrist of each forelimb. Time to contact (control, no significant difference between groups, data not shown) and to remove the adhesive were measured during one trial per day (120 s maximum).

4.7.3. Modified neurological severity score (mNSS) (P24)

Neurological functions were assessed using the mNSS (Chen et al., 2001), which is composed of motor (muscle status), sensory (tactile and proprioceptive), beam balance and reflexes (pinna, corneal and startle) tests. Each rat was graded on the mNSS scale (< 1: no impairment – 1–6: middle impairment – 7–12: moderate impairment – 13–18: severe impairment).

4.7.4. Novel object recognition (P45) (Arteaga et al., 2015)

Hippocampal-dependent long-term memory of pups was assessed using the novel object recognition test, as described previously (Dumont et al., 2019). Briefly, after an habituation period (10 min) in the open field (50 cm × 50 cm) on day 1, pups were further allowed to freely explore two identical objects placed in opposite corners of the arena for 10 min during the following two days. On the day after (day 4), one of the previous object was replaced by a different one and pups were allowed to freely explore the objects for 10 min. Duration of object exploration was measured. The discrimination index was calculated as followed: [(time spent on new object - time spent on familiar object) / (time spent on new object + time spent on familiar object)].

4.7.5. Nissl staining

In addition to MRI and behavioral tests, Nissl staining was performed on P9-pups brain sections, as described previously (Dumont

et al., 2019), to highlight neuronal death in the penumbra region. Briefly, pups were anesthetized (isoflurane 4.5%) and were perfused transcardially first with PBS (1X) then with paraformaldehyde (PFA 4%) for 10 min. Removed brain were post-fixed in PFA overnight, cryoprotected by sucrose immersion and then frozen in liquid N₂ vapor. The 16 µm-thick brain sections were stained with 0.5% cresyl violet (Sigma Aldrich, France) for 5 min and washed in distilled water for 10 s. For Nissl staining analyses, ImageJ software was used. A minimum of 8 images of at least three different brains were used. For each image, the entire picture (8 bits) was fully analyzed, using the “particle analysis” tool and a threshold of 500 pixels.

4.8. Statistical analysis

Statistical analysis and graphs were performed using GraphPad Prism 7.00 software. Data were expressed as means ± standard error of the means (SEM). Statistical significance of the differences between multiple groups was determined using One-Way ANOVA followed by a Fisher's LSD post hoc test, except for the righting reflex, novel object recognition and adhesive removal tests, for which two-way ANOVA where performed (analyses between groups and between time points), followed by a Fisher's LSD post hoc test and for which an AUC (area under the curve) analysis was additionally performed. Statistical significance was defined as $p < 0.05$. Number of pups was stated with each result along with the statistical test used.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgment

We are grateful to Macha Nikolski, head of Bordeaux Bioinformatics Center, for helpful discussion and biostatistical analyses.

Sources of Funding

This work was supported by grants (n°2016/01 and 2018/01) from the Fondation de Recherche en Alcoolologie (FRA) from the French State in the context of the “Investments for the future” Programme IdEx (ANR-10-IDEX) and the LabEx TRAIL (ANR-10-LABX-57) and a French-Swiss ANR-FNS grant (ANR-15-CE37-0012).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2020.146798>.

References

- Abel, E.L., Sokol, R.J., 1986. Fetal alcohol syndrome is now leading cause of mental retardation. *Lancet* 2, 1222.
- Aridas, J.D., Yawno, T., Sutherland, A.E., Nitsos, I., Ditchfield, M., Wong, F.Y., Fahey, M.C., Malhotra, A., Wallace, E.M., Jenkin, G., Miller, S.L., 2014. Detecting brain injury in neonatal hypoxic ischemic encephalopathy: closing the gap between experimental and clinical research. *Exp. Neurol.* 261, 281–290.
- Arteaga, O., Revuelta, M., Uriguen, L., Alvarez, A., Montalvo, H., Hilario, E., 2015. Pretreatment with resveratrol prevents neuronal injury and cognitive deficits induced by perinatal hypoxia-ischemia in rats. *PLoS ONE* 10, e0142424.
- Ashwal, S., Tone, B., Tian, H.R., Chong, S., Obenaus, A., 2007. Comparison of two neonatal ischemic injury models using magnetic resonance imaging. *Pediatr. Res.* 61, 9–14.
- Balduini, W., De Angelis, V., Mazzoni, E., Cimino, M., 2000. Long-lasting behavioral alterations following a hypoxic/ischemic brain injury in neonatal rats. *Brain Res.* 859, 318–325.
- Beauvieux, M.C., Stephant, A., Gin, H., Serhan, N., Couzigou, P., Gallis, J.L., 2013. Resveratrol mainly stimulates the glycolytic ATP synthesis flux and not the mitochondrial one: a saturation transfer NMR study in perfused and isolated rat liver. *Pharmacol. Res.* 78, 11–17.
- Bellaver, B., Souza, D.G., Souza, D.O., Quincozes-Santos, A., 2014. Resveratrol increases antioxidant defenses and decreases proinflammatory cytokines in hippocampal astrocyte cultures from newborn, adult and aged Wistar rats. *Toxicol. In Vitro* 28, 479–484.
- Berezowski, V., Fukuda, A.M., Cecchelli, R., Badaut, J., 2012. Endothelial cells and astrocytes: a concerto en duo in ischemic pathophysiology. *Int. J. Cell Biol.* 2012, 176287.
- Black, A.M., Armstrong, E.A., Scott, O., Juurlink, B.J.H., Yager, J.Y., 2015. Broccoli sprout supplementation during pregnancy prevents brain injury in the newborn rat following placental insufficiency. *Behav. Brain Res.* 291, 289–298.
- Bouet, V., Freret, T., Ankri, S., Bezault, M., Renolleau, S., Boulouard, M., Jacotot, E., Chauvier, D., Schumann-Bard, P., 2010. Predicting sensorimotor and memory deficits after neonatal ischemic stroke with reperfusion in the rat. *Behav. Brain Res.* 212, 56–63.
- Bourque, S.L., Dolinsky, V.W., Dyck, J.R., Davidge, S.T., 2012. Maternal resveratrol treatment during pregnancy improves adverse fetal outcomes in a rat model of severe hypoxia. *Placenta* 33, 449–452.
- Bouzier-Sore, A.K., Pellerin, L., 2013. Unraveling the complex metabolic nature of astrocytes. *Front. Cell. Neurosci.* 7, 179.
- Bouzier-Sore, A.K., Voisin, P., Canioni, P., Magistretti, P.J., Pellerin, L., 2003. Lactate is a preferential oxidative energy substrate over glucose for neurons in culture. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 23, 1298–1306.
- Brissaud, O., Villega, F., Pieter Konsman, J., Sanchez, S., Raffard, G., Franconi, J.M., Chateil, J.F., Bouzier-Sore, A.K., 2010. Short-term effect of erythropoietin on brain lesions and aquaporin-4 expression in a hypoxic-ischemic neonatal rat model assessed by magnetic resonance diffusion weighted imaging and immunohistochemistry. *Pediatr. Res.* 68, 123–127.
- Chen, J., Li, Y., Wang, L., Zhang, Z., Lu, D., Lu, M., Chopp, M., 2001. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Stroke* 32, 1005–1011.
- Cooper, J.M., Gadian, D.G., Jentschke, S., Goldman, A., Munoz, M., Pitts, G., Banks, T., Chong, W.K., Hoskote, A., Deanfield, J., Baldeweg, T., de Haan, M., Mishkin, M., Vargha-Khadem, F., 2015. Neonatal hypoxia, hippocampal atrophy, and memory impairment: evidence of a causal sequence. *Cereb. Cortex* 25, 1469–1476.
- Corrao, G., Bagnardi, V., Zamboni, A., La Vecchia, C., 2004. A meta-analysis of alcohol consumption and the risk of 15 diseases. *Prev. Med.* 38, 613–619.
- Dan, B., Kornreich, C., Verbanck, P., Toppet, M., 1992. Fetal alcohol syndrome. *Rev. Med. Brux.* 13, 249–253.
- Daverey, A., Agrawal, S.K., 2018. Pre and post treatment with curcumin and resveratrol protects astrocytes after oxidative stress. *Brain Res.* 1692, 45–55.
- de Almeida, L.M., Leite, M.C., Thomazi, A.P., Battu, C., Nardin, P., Tortorelli, L.S., Zanutto, C., Posser, T., Wofchuk, S.T., Leal, R.B., Goncalves, C.A., Gottfried, C., 2008. Resveratrol protects against oxidative injury induced by H2O2 in acute hippocampal slice preparations from Wistar rats. *Arch. Biochem. Biophys.* 480, 27–32.
- Dumont, U., Sanchez, S., Olivier, B., Chateil, J.F., Pellerin, L., Beauvieux, M.C., Bouzier-Sore, A.K., Roumes, H., 2019. Maternal consumption of piceatannol: A nutritional neuroprotective strategy against hypoxia-ischemia in rat neonates. *Brain Res.* 1717, 86–94.
- Freret, T., Chazalviel, L., Roussel, S., Bernaudin, M., Schumann-Bard, P., Boulouard, M., 2006. Long-term functional outcome following transient middle cerebral artery occlusion in the rat: correlation between brain damage and behavioral impairment. *Behav. Neurosci.* 120, 1285–1298.
- Genetta, T., Lee, B.H., Sola, A., 2007. Low doses of ethanol and hypoxia administered together act synergistically to promote the death of cortical neurons. *J. Neurosci. Res.* 85, 131–138.
- Girbovan, C., Plamondon, H., 2015. Resveratrol downregulates type-1 glutamate transporter expression and microglia activation in the hippocampus following cerebral ischemia reperfusion in rats. *Brain Res.* 1608, 203–214.
- Gluckman, P.D., Wyatt, J.S., Azzopardi, D., Ballard, R., Edwards, A.D., Ferriero, D.M., Polin, R.A., Robertson, C.M., Thoresen, M., Whitelaw, A., Gunn, A.J., 2005. Selective head cooling with mild systemic hypothermia after neonatal encephalopathy: multicentre randomised trial. *Lancet* 365, 663–670.
- Hashimoto, T., Yonetani, M., Nakamura, H., 2003. Selective brain hypothermia protects against hypoxic-ischemic injury in newborn rats by reducing hydroxyl radical production. *Kobe J. Med. Sci.* 49, 83–91.
- Hilario, E., Rey-Santano, M.C., Goni-de-Cerio, F., Alvarez, F.J., Gastiasoro, E., Mielgo, V.E., Caballero, A., Valls-i-Soler, A., Gomez-Urquijo, S., Alvarez, A., 2005. Cerebral blood flow and morphological changes after hypoxic-ischaemic injury in preterm lambs. *Acta Paediatr.* 94, 903–911.
- Ikeda, T., Mishima, K., Yoshikawa, T., Iwasaki, K., Fujiwara, M., Xia, Y.X., Ikenoue, T., 2001. Selective and long-term learning impairment following neonatal hypoxic-ischemic brain insult in rats. *Behav. Brain Res.* 118, 17–25.
- Karadottir, R., Attwell, D., 2007. Neurotransmitter receptors in the life and death of oligodendrocytes. *Neuroscience* 145, 1426–1438.
- Karalis, F., Soubasi, V., Georgiou, T., Nakas, C.T., Simeonidou, C., Guiba-Tziampiri, O., Spandou, E., 2011. Resveratrol ameliorates hypoxia/ischemia-induced behavioral deficits and brain injury in the neonatal rat brain. *Brain Res.* 1425, 98–110.
- Kiss, P., Szogyi, D., Reglodi, D., Horvath, G., Farkas, J., Lubics, A., Tamas, A., Atlasz, T., Szabadfi, K., Babai, N., Gabriel, R., Koppa, M., 2009. Effects of perinatal asphyxia on the neurobehavioral and retinal development of newborn rats. *Brain Res.* 1255, 42–50.
- Koronowski, K.B., Khoury, N., Saul, I., Loris, Z.B., Cohan, C.H., Stradecki-Cohan, H.M., Dave, K.R., Young, J.I., Perez-Pinzon, M.A., 2017. Neuronal SIRT1 (silent information regulator 2 homologue 1) regulates glycolysis and mediates resveratrol-induced ischemic tolerance. *Stroke* 48, 3117–3125.
- Kukreja, A., Wadhwa, N., Tiwari, A., 2014. Therapeutic role of resveratrol and piceatannol in disease prevention. *J. Blood Disorders Transf.* 5.
- Lebedev, S.V., Volodin, N.N., Blinov, D.V., Lazarenko, I.P., Rogatkin, S.O., Chekhonin, V.P., 2003. Neurological deficit and disturbances in higher nervous activity during modeling of perinatal hypoxic-ischemic damage to the central nervous system in rat pups. *Bull. Exp. Biol. Med.* 136, 242–245.
- Li, Y., Gonzalez, P., Zhang, L., 2012. Fetal stress and programming of hypoxic/ischemic-sensitive phenotype in the neonatal brain: mechanisms and possible interventions. *Prog. Neurobiol.* 98, 145–165.
- Lodygensky, G.A., Inder, T.E., Neil, J.J., 2008. Application of magnetic resonance imaging in animal models of perinatal hypoxic-ischemic cerebral injury. *Int. J. Dev. Neurosci.* 26, 13–25.
- Loren, D.J., Seeram, N.P., Schulman, R.N., Holtzman, D.M., 2005. Maternal dietary supplementation with pomegranate juice is neuroprotective in an animal model of neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Pediatr. Res.* 57, 858–864.
- Lubics, A., Reglodi, D., Tamas, A., Kiss, P., Szalai, M., Szalontay, L., Lengvari, I., 2005. Neurological reflexes and early motor behavior in rats subjected to neonatal hypoxic-ischemic injury. *Behav. Brain Res.* 157, 157–165.
- Lueptow, L.M., 2017. Novel object recognition test for the investigation of learning and memory in mice. *J. Vis. Exp.*
- Matsui, Y., Sugiyama, K., Kamei, M., Takahashi, T., Suzuki, T., Katagata, Y., Ito, T., 2010. Extract of passion fruit (*Passiflora edulis*) seed containing high amounts of piceatannol inhibits melanogenesis and promotes collagen synthesis. *J. Agric. Food Chem.* 58, 11112–11118.
- Mitani, Y., Behrooz, A., Dubyak, G.R., Ismail-Beigi, F., 1995. Stimulation of GLUT-1 glucose transporter expression in response to exposure to calcium ionophore A-23187. *Am. J. Physiol.* 269, C1228–1234.
- Morken, T.S., Brekke, E., Haberg, A., Wideroe, M., Brubakk, A.M., Sonnewald, U., 2014. Altered astrocyte-neuronal interactions after hypoxia-ischemia in the neonatal brain in female and male rats. *Stroke* 45, 2777–2785.
- Northington, F.J., Ferriero, D.M., Graham, E.M., Traystman, R.J., Martin, L.J., 2001. Early neurodegeneration after hypoxia-ischemia in neonatal rat is necrosis while delayed neuronal death is apoptosis. *Neurobiol. Dis.* 8, 207–219.
- Pellerin, L., Magistretti, P.J., 1994. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 10625–10629.
- Popova, S., Lange, S., Probst, C., Gmel, G., Rehm, J., 2017. Estimation of national, regional, and global prevalence of alcohol use during pregnancy and fetal alcohol syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Health* 5, e290–e299.
- Quincozes-Santos, A., Bobermin, L.D., Tramontina, A.C., Wartchow, K.M., Tagliari, B., Souza, D.O., Wyse, A.T., Goncalves, C.A., 2014. Oxidative stress mediated by NMDA, AMPA/KA channels in acute hippocampal slices: neuroprotective effect of resveratrol. *Toxicol. In Vitro* 28, 544–551.
- Rendle-Sort J, G. O. P., Dodge J A (1985) A Synopsis of Children's Diseases.
- Rice 3rd, J.E., Vannucci, R.C., Brierley, J.B., 1981. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann. Neurol.* 9, 131–141.
- Robertson, C.M., Finer, N.N., 1993. Long-term follow-up of term neonates with perinatal asphyxia. *Clin. Perinatol.* 20, 483–500.

- Robertson, C.M., Finer, N.N., Grace, M.G., 1989. School performance of survivors of neonatal encephalopathy associated with birth asphyxia at term. *J. Pediatr.* 114, 753–760.
- Roumes, H., Dumont, U., Sanchez, S., Mazuel, L., Blanc, J., Raffard, G., Chateil, J.-F., Pellerin, L., Bouzier-Sore, A.-K., 2020. Neuroprotective role of lactate in rat neonatal hypoxia-ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* March 24th <https://doi.org/10.1177/0271678X20908355>. (In press).
- Salter, M.G., Fern, R., 2005. NMDA receptors are expressed in developing oligodendrocyte processes and mediate injury. *Nature* 438, 1167–1171.
- Shankaran, S., Laptook, A. R., Ehrenkranz, R. A., Tyson, J. E., McDonald, S. A., Donovan, E. F., Fanaroff, A. A., Poole, W. K., Wright, L. L., Higgins, R. D., Finer, N. N., Carlo, W. A., Duara, S., Oh, W., Cotten, C. M., Stevenson, D. K., Stoll, B. J., Lemons, J. A., Guillet, R., Jobe, A. H., National Institute of Child, H., and Human Development Neonatal Research, N., 2005. Whole-body hypothermia for neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy. *N. Engl. J. Med.* 353, 1574–1584.
- Shankaran, S., Woldt, E., Koepke, T., Bedard, M.P., Nandyal, R., 1991. Acute neonatal morbidity and long-term central nervous system sequelae of perinatal asphyxia in term infants. *Early Hum. Dev.* 25, 135–148.
- Shen, C., Cheng, W., Yu, P., Wang, L., Zhou, L., Zeng, L., Yang, Q., 2016. Resveratrol pretreatment attenuates injury and promotes proliferation of neural stem cells following oxygen-glucose deprivation/reoxygenation by upregulating the expression of Nrf2, HO-1 and NQO1 in vitro. *Mol. Med. Rep.* 14, 3646–3654.
- Ten, V.S., Bradley-Moore, M., Gingrich, J.A., Stark, R.I., Pinsky, D.J., 2003. Brain injury and neurofunctional deficit in neonatal mice with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Behav. Brain Res.* 145, 209–219.
- Teng, S.X., Katz, P.S., Maxi, J.K., Mayeux, J.P., Gilpin, N.W., Molina, P.E., 2015. Alcohol exposure after mild focal traumatic brain injury impairs neurological recovery and exacerbates localized neuroinflammation. *Brain Behav. Immun.* 45, 145–156.
- Wagner, B.P., Nedelcu, J., Martin, E., 2002. Delayed postischemic hypothermia improves long-term behavioral outcome after cerebral hypoxia-ischemia in neonatal rats. *Pediatr. Res.* 51, 354–360.
- West, T., Atzeva, M., Holtzman, D.M., 2007. Pomegranate polyphenols and resveratrol protect the neonatal brain against hypoxic-ischemic injury. *Dev. Neurosci.* 29, 363–372.
- Williams, L.D., Burdock, G.A., Edwards, J.A., Beck, M., Bausch, J., 2009. Safety studies conducted on high-purity trans-resveratrol in experimental animals. *Food Chem. Toxicol.* 47, 2170–2182.
- Wu, Y.W., Gonzalez, F.F., 2015. Erythropoietin: a novel therapy for hypoxic-ischaemic encephalopathy? *Dev. Med. Child Neurol.* 57 (Suppl 3), 34–39.
- Xu, L., Yang, Y., Gao, L., Zhao, J., Cai, Y., Huang, J., Jing, S., Bao, X., Wang, Y., Gao, J., Xu, H., Fan, X., 2015. Protective effects of resveratrol on the inhibition of hippocampal neurogenesis induced by ethanol during early postnatal life. *BBA* 1852, 1298–1310.
- Yang, Y., Duan, W., Li, Y., Yan, J., Yi, W., Liang, Z., Wang, N., Yi, D., Jin, Z., 2013. New role of silent information regulator 1 in cerebral ischemia. *Neurobiol. Aging* 34, 2879–2888.
- Zhang, L., Schallert, T., Zhang, Z.G., Jiang, Q., Arniego, P., Li, Q., Lu, M., Chopp, M., 2002. A test for detecting long-term sensorimotor dysfunction in the mouse after focal cerebral ischemia. *J. Neurosci. Methods* 117, 207–214.
- Zhao, B., Hall 3rd, C.A., 2008. Composition and antioxidant activity of raisin extracts obtained from various solvents. *Food Chem.* 108, 511–518.

CHAPITRE VI :

Conclusion et perspectives

1. Conclusion

L'HI néonatale est une pathologie qui touche de nombreux nourrissons (1-8 ‰). Elle est caractérisée par une diminution du flux sanguin au moment de la naissance. Cette diminution engendre une carence en substrats énergétiques et entraîne une excitotoxicité, un stress oxydatif, une déficience des pompes dépendantes de l'ATP et, au final, la mort cellulaire. Malgré les progrès de diagnostics précoces et du traitement depuis les 30 dernières années, l'incidence de l'HI ne diminue malheureusement pas. Actuellement, la seule thérapeutique utilisée en clinique est l'hypothermie, mais entre 44 – 53 % des nouveau-nés n'y répondent pas favorablement [1]. Il est donc primordial de trouver de nouvelles thérapies pour se combiner avec et renforcer celle existante. Les polyphénols font preuve, depuis les 20 dernières années, de propriétés neuroprotectrices enthousiasmantes. Le RSV, qui fait partie de la famille des stilbénoides et que l'on trouve majoritairement dans les fruits rouges, le chocolat et le raisin, tout particulièrement dans les graines et la peau de celui-ci, est le polyphénol le plus étudié. Dans la littérature, ce fameux polyphénol a déjà été étudié dans le cadre de l'HI néonatale. La fenêtre d'administration et les doses n'étaient cependant jamais les mêmes. En effet, certaines études ont administré le RSV en i.p. avant l'accident d'HI [2-4] et d'autres après l'accident d'HI [5-7], avec des doses allant de 20 mg/kg à 100 mg/kg. De plus, aucune d'entre elles n'ont combiné IRM, tests comportementaux, histologie, et analyses de gènes et de protéines. Elles présentent pourtant un résultat commun: le RSV montre une neuroprotection car son administration permet de diminuer la taille des lésions, de réduire l'apoptose et/ou l'inflammation et de prévenir les altérations des fonctions motrices et cognitives. Cependant, le mode d'administration (i.p.) et les doses utilisées sont difficilement transposables chez l'homme.

Nous avons donc étudié l'effet neuroprotecteur du RSV lors d'une HI néonatale. L'originalité principale de cette étude était le mode d'administration qui est transgénérationnel et nutritionnel. C'est-à-dire que l'on traite les rates gestantes et/ou allaitantes et on regarde les effets sur les rats ayant subi une HI néonatale. De plus, les doses utilisées étaient des doses très faibles, correspondant à des doses nutritionnelles (0,15 mg/kg/j). Nous avons de plus combiné différentes techniques pour effectuer un suivi longitudinal.

Le modèle « gold standard » de Rice et Vannucci a été utilisé pour mimer l'HI néonatale en préclinique. Il consiste à ligaturer l'artère carotide commune gauche des rats puis à les placer durant 2h dans une chambre hypoxique (8 % O₂) [8]. C'est un modèle fiable et reproductible réalisé sur des rats P7, stade correspondant au stade de développement d'un cerveau de nouveau-né humain né à terme. Les volumes lésionnels ont été mesurés à P7, P9 et P30 et la sévérité de l'œdème a été évaluée à P7. Des tests comportementaux ont complété les études d'imagerie afin d'analyser les fonctions motrices et cognitives de ces rats de P8 à P45. Enfin, des analyses par RT-qPCR, WB et histologie ont amélioré la compréhension des voies impliquées dans la neuroprotection.

Dans la première étude « ***Neuroprotective effect of maternal resveratrol supplementation in a rat model of neonatal hypoxia-ischemia*** », nous nous sommes concentrés sur les effets d'une supplémentation maternelle en RSV, en utilisant une dose nutritionnelle de 0,15 mg/kg/jour, correspondant à la consommation de 22 mg à 1,1 kg de raisins par jour (pour une femme enceinte, poids estimé : 70 kg). La quantité de RSV dans les fruits est en effet influencée par la variété de raisin, le sol et le climat (également par les techniques de vinifications dans le cas du vin). L'HI seule induit des lésions importantes avec des déficits moteurs et cognitifs conséquents. La supplémentation maternelle en RSV a été testée pendant différentes périodes, soit en traitement préventif (dernière semaine de gestation et/ou première semaine de lactation), soit en traitement curatif (deuxième semaine de lactation). Les meilleurs résultats ont été observés pour la fenêtre de supplémentation la plus grande (rsvGL). En effet, l'incidence des lésions était plus faible, les volumes lésionnels étaient plus petits (pour les rats qui en avaient), l'œdème était moins sévère et ces rats ont présenté les meilleures performances au niveau des fonctions motrices et cognitives. Pour comprendre les bases moléculaires de cette neuroprotection, nous avons cherché à déchiffrer la mécanistique de l'action du RSV. Pour cela, seuls les cerveaux des rats du groupe ayant eu la meilleure fenêtre thérapeutique (rsvGL), ceux du groupe contrôle (HIC) et ceux du groupe sham ont été analysés. Concernant les voies connues, nos résultats ont été en accord avec les données de la littérature : le RSV a régulé à la hausse les voies de signalisation de SIRT1, SOD et Bcl2, conduisant à un effet antioxydant et anti-apoptotique. Ces données confirment que notre approche transgénérationnelle et nutritionnelle est aussi efficace qu'un traitement direct invasif et surdosé. Concernant l'impact du RSV maternel sur le métabolisme cérébral, c'était une hypothèse posée, basée sur des travaux antérieurs au sein de l'équipe qui avaient montré, sur un modèle de foie de rat isolé et perfusé, que le RSV induisait une activation de la glycolyse. L'équipe, qui travaille depuis des années sur le métabolisme cérébral, a pu montrer que la glycolyse était principalement astrocytaire dans le cerveau (avec une production de lactate) alors que les neurones avaient plutôt un métabolisme oxydatif, une navette lactate couplant les deux. Une autre donnée présente dans la littérature nous a permis de poser comme hypothèse que le RSV pouvait moduler le métabolisme cérébral, et en particulier la navette lactate : une étude chez le rat a montré que l'HI diminue l'expression de GLT1 mais que le RSV permet de contrecarrer cette chute [9] (GLT1 est le transporteur astrocytaire pour la recapture du glutamate (voir Chapitre 1) impliqué dans l'ANLS). Les résultats obtenus dans la première partie de cette thèse ont pu mettre en évidence, et ce pour la première fois, que le RSV modulait bien l'expression des partenaires clés de l'ANLS : les MCTs, les LDHs, GLAST, GLT1 et la sous-unité $\alpha 2$ de la pompe Na^+/K^+ ATPase.

Dans la deuxième étude « ***Maternal consumption of piceatannol: A nutritional neuroprotective strategy against hypoxia-ischemia in rat neonates*** », nous avons étudié l'impact du PIC dans un contexte d'HI néonatale avec un mode d'administration nutritionnel et transgénérationnel. Le PIC, analogue du RSV, est connu pour avoir une

biodisponibilité plus importante que le RSV [10]. La même dose de PIC a été utilisée que lors de l'étude précédente pour le RSV soit 0,15 mg/kg/jour ; ce qui équivaut à la consommation d'un fruit de la passion par jour (graines comprises) pour une femme enceinte. La neuroprotection du PIC s'est avérée plus efficace que celle du RSV. Le groupe dont la mère avait été supplémentée en PIC a présenté une incidence des lésions plus faible, des plus petits volumes lésionnels (pour ceux qui en avaient) ainsi que des œdèmes moins sévères. Enfin, les fonctions motrices et cognitives étaient entièrement préservées pour ce groupe. Tout comme dans l'étude précédente sur le RSV, le groupe ayant reçu la plus grande fenêtre de supplémentation a présenté les meilleurs résultats. Cependant, toutes les analyses d'expression et d'histologie ont été faites sur l'étude utilisant le RSV car il a été beaucoup plus étudié dans la littérature jusqu'à maintenant par rapport au PIC. Il serait maintenant intéressant de faire les mêmes analyses d'expression de gènes/protéines et histologiques sur les ratons dont les mères ont été supplémentées avec le PIC.

Dans la dernière étude « ***Maternal alcoholism and neonatal hypoxia-ischemia : Neuroprotection by stilbenoid polyphenols*** », nous nous sommes concentrés sur l'HI couplée au syndrome d'alcoolisme fœtal (SAF). L'objectif de ces travaux était d'étudier les effets d'une supplémentation maternelle en RSV ou en PIC et de voir si ces molécules conservaient leurs effets neuroprotecteurs malgré une situation délétère maximale pour le cerveau. De plus, malgré les nombreuses campagnes des pouvoirs publics, la consommation d'alcool chez les femmes enceintes reste encore trop élevée. Nos résultats ont montré que si la combinaison de l'HI et du SAF n'augmentait pas les volumes lésionnels mesurés par IRM, elle augmentait cependant les déficits comportementaux. Cela met en évidence l'importance de faire des études longitudinales et de coupler les études comportementales aux analyses IRM, utilisées seules trop souvent encore dans de nombreuses études pour valider des effets neuroprotecteurs. La supplémentation en PIC, mais pas celle en RSV, a permis de contrecarrer les effets délétères de la combinaison de l'HI et du SAF (i) en réduisant l'incidence des lésions, (ii) en diminuant les volumes lésionnels et (iii) en préservant les fonctions motrices et cognitives. Cette différence de neuroprotection entre les deux polyphénols pourrait être due à une meilleure biodisponibilité du PIC.

L'originalité de nos études est la complémentarité des techniques. En effet, l'utilisation conjointe de l'IRM, de tests de comportement et l'analyse en parallèle des expressions de gènes et de protéiques est peu fréquente dans la littérature. Cette approche multimodale est capitale car les images seules ne sont pas nécessairement prédictives des fonctions cérébrales, comme indiqué plus haut. En effet, les ratons ont une plasticité neuronale élevée ce qui leur permet de récupérer spontanément certaines capacités cérébrales. Un exemple concret est illustré dans l'étude avec le SAF : l'IRM n'a pas montré de lésions plus importantes en présence de SAF, cependant, les différentes analyses comportementales ont mis en évidence des déficits cognitivo-sensori-moteurs plus sévères pour les ratons ayant subi une HI couplée à une alcoolisation maternelle. Nous

avons également pu mettre en évidence par IRM fonctionnelle (IRM BOLD pour Blood Oxygen Level Dependent) lors d'une tâche d'activation des vibrisses que les fonctions cérébrales avaient été récupérées dans l'autre hémisphère (transfert et développement des fonctions dans l'hémisphère non lésé). Ces résultats indiquent clairement que (i) l'IRM anatomique ou de diffusion seule ne prédit pas nécessairement avec précision les altérations fonctionnelles cérébrales ; l'IRM reste cependant la meilleure technique d'imagerie non invasive et (ii) des tests comportementaux longitudinaux sont nécessaires pour évaluer la neuroprotection potentielle d'un traitement présumé.

Pour conclure, le RSV et le PIC ont des effets neuroprotecteurs importants lorsqu'ils sont administrés en prévention d'un accident d'HI néonatale. Sachant que de nombreuses pathologies de la femme enceinte prédisposent à un accident d'HI chez le nouveau-né (hypertension, souffrance cardiovasculaire), cette approche nutritionnelle et transgénérationnelle a un réel potentiel de transfert vers la clinique. Notons que le RSV et le PIC administrés en curatif ont également montré des effets neuroprotecteurs intéressants même s'ils n'étaient mis en évidence que sur le long terme. En plus des voies connues (diminution du stress oxydatif, de l'inflammation et de l'apoptose), un mode d'action de ces stilbénoides serait dû à une stimulation du métabolisme cérébral, et plus particulièrement une activation de l'ANLS.

2. Perspectives

Nos études proposent une stratégie de neuroprotection enthousiasmante dans le cadre de l'HI néonatale par une supplémentation maternelle en polyphénols à dose nutritionnelle. Bien que la neuroprotection du RSV avait déjà été rapportée dans la littérature, son efficacité à faible dose et par administration à la mère n'avait jamais été montré. Ce traitement et ce mode d'administration sont non invasifs (ajout dans l'eau de boisson de la mère ici par rapport à des injections i.p. dans la littérature) et compatible avec une dose apportée par complément alimentaire (0,15 mg/kg/jour ici contre 20-100 mg/kg dans la littérature). La dose utilisée dans notre étude, et qui a montré toute son efficacité, se situe dans une fourchette nutritionnelle et non pharmacologique. Il serait donc intéressant de franchir le pas vers une étude clinique, à la fois préventive et curative. En effet, bien qu'il soit fréquent qu'un accident d'HI se passe au moment de la naissance sans qu'aucun signe annonciateur n'ait été détecté, il existe cependant différents signes cliniques connus qui indiquent qu'une femme pourrait potentiellement avoir des complications lors de l'accouchement (hypertension, complication de croissance, obésité), d'où l'intérêt des deux approches. Pour une étude clinique impliquant le RSV, l'étape sur les gros animaux ne sera pas nécessaire puisque le RSV est déjà vendu en complément alimentaire et utilisé dans des études cliniques. Une étude clinique a même déjà été réalisée pour tester l'effet du jus de grenade lors d'un retard de croissance intra utérin (RCIU) [11]. La RCIU correspond à une taille insuffisante du fœtus par rapport à son âge gestationnel, elle est l'une des causes connues de l'HI néonatale. Dans cette étude,

77 mamans volontaires avec RCIU connu ont été réparties en deux groupes bien distincts : (i) mamans consommant du jus de grenade avec polyphénol (8 oz /jours soit 226 g/jour) et (ii) mamans consommant du jus de grenade sans polyphénol (placebo). Cette supplémentation a été administrée de 24 - 34 semaines de gestation jusqu'à l'accouchement (pendant environ 20 - 27 jours). Bien que cette étude n'ait montrée aucune différence dans la macrostructure du cerveau (pas de différence au niveau du volume du cerveau et de la taille des lésions), ils ont observé des différences régionales dans la microstructure de la substance blanche et de la connectivité fonctionnelle ce qui suggère des effets potentiels *in utéro* liés aux polyphénols. Notons que la consommation de polyphénol n'a en aucun cas altéré la santé des mères ni celles des nourrissons [11].

Parmi les études cliniques qui ont déjà montré un effet bénéfique d'une supplémentation en RSV, on peut citer des travaux portant sur la neuroprotection, les propriétés anti-diabétiques, ainsi que la prévention et le traitement du cancer. Le RSV a été testé sur 11 hommes obèses en bonne santé randomisés en double aveugle entre un groupe supplémenté avec 150 mg/jour de RSV et un deuxième groupe supplémenté avec un placebo. Après 30 jours de supplémentation, le RSV a induit des changements métaboliques chez les hommes obèses en imitant les effets de la restriction calorique [12]. Une autre étude faite sur des femmes post-ménopausées qui ont reçu 75 mg de RSV deux fois par jour, pendant 14 semaines, a montré que l'apport en RSV avait augmenté leurs performances cognitives et de mémorisation [13].

Un transfert de nos données vers la clinique est donc réaliste.

Il reste cependant un obstacle à contourner. En effet, bien que certains effets bénéfiques du RSV mis en évidence par la recherche préclinique aient été par la suite validés dans des essais cliniques, de nombreux effets rapportés sur le RSV dans les études *in vitro* n'ont pas été retrouvés *in vivo*, ni chez l'animal, ni chez l'homme. Quelles en sont les raisons? La raison principale est la pharmacocinétique du RSV. Si chez l'homme, le RSV est fortement absorbé (70 %), sa biodisponibilité reste faible (1 %) car il est rapidement métabolisé et majoritairement éliminé. D'autre part, il semblerait qu'il y ait une grande variation des réponses inter-individus/espèces au RSV : le microbiote intestinal et le fond génétique en seraient les deux causes principales. Il serait donc intéressant de continuer les recherches avec des analogues ayant une biodisponibilité plus importante, comme le PIC, mais aussi le **ptérostilbène** ou la **trans-ε-viniférine** (figure 40). Le ptérostilbène est un phénol apparenté au RSV que l'on retrouve dans les myrtilles, le raisin et diverses plantes. Il est structuellement différent du RSV car il ne possède qu'un seul groupement hydroxyle, les autres groupements étant remplacés par des groupes méthyles qui augmentent la lipophilie de la molécule et donc sa biodisponibilité par rapport au RSV [14]. La *trans-ε-viniférine*, qui est un stilbène formé par deux unités de RSV, est aujourd'hui considérée comme une molécule bioactive ayant des activités antioxydantes et anti-inflammatoires prometteuses avec des propriétés cardioprotectrices et également neuroprotectrices [15, 16].

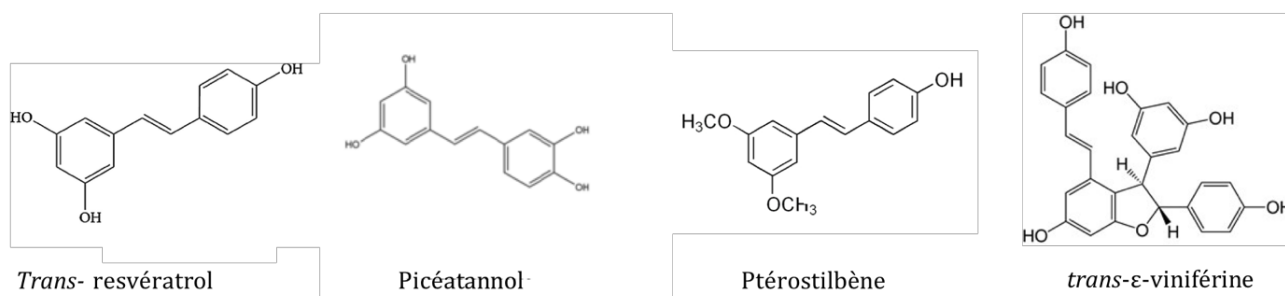


Figure 40 : La structure du resvératrol et ses analogues

Pour poursuivre cette étude *in vivo*, il serait intéressant de sélectionner **LE** polyphénol le plus efficace dans notre modèle d'HI néonatale. Tout d'abord, pour être le plus efficace il faudrait qu'il réponde à un certains nombres de critères :

- Qu'il soit le plus neuroprotecteur possible : avec une diminution de l'incidence des lésions provoquées par l'HI à P7, une diminution du volume de lésions et une amélioration des performances motrices et cognitives sur le court, long (jeune adulte) et très long terme (adulte). Les études futures pourraient utiliser des doses de polyphénols plus importantes et/ou sur une fenêtre plus longue permettant d'apprécier les effets neuroprotecteurs jusqu'à l'âge adulte.
- Qu'il augmente les gènes impliqués dans les voies de signalisation *via* SIRT1 (anti-apoptotique, anti-inflammation et antioxydant), comme ceux observés avec le RSV mais en ciblant plus de gènes notamment ceux de l'inflammation aussi.
- Qu'il booste le métabolisme cérébral et principalement l'ANLS avec tous ses partenaires clefs (MCTs, LDHs, GLT1, GLAST...)
- Que son utilisation soit compatible avec l'hypothermie thérapeutique, qui est actuellement déjà utilisée en clinique, et qu'il améliore le niveau de neuroprotection observé avec l'hypothermie seule. Une étude préclinique sur l'HI a déjà combiné l'EPO avec l'hypothermie (HI à P7). Les rats ont été répartis en quatre groupes : aucun traitement, EPO, HT et EPO/HT. Bien que l'EPO ait montré un effet neuroprotecteur, la thérapie combinée EPO + hypothermie n'a montré aucun bénéfice significatif supplémentaire [17].

Afin d'aller plus loin et de décrypter l'impact du RSV sur le métabolisme cérébral, des études *in vitro* sur des cultures primaires d'astrocytes et/ou de neurones de rat (cortex, hippocampe, striatum) pourraient être réalisées afin d'analyser de façon plus fine l'impact du RSV (ou un autre polyphénol) sur l'expression des gènes astrocytaires ou neuronaux [18]. En condition de déprivation en oxygène et glucose (OGD/R mimant ainsi l'hypoxie), l'ajout de RSV dans le milieu de culture permettrait de réaliser différentes mesures métaboliques plus approfondies comme la consommation du glucose, la

production de lactate et la recapture du glutamate. Des analyses d'expressions de gènes et de protéines pourraient être réalisées en parallèle pour voir l'effet potentiel du polyphénol sur l'expression des partenaires clés de l'ANLS.

3. Bibliographie

1. Wu, Y.W. and F.F. Gonzalez, *Erythropoietin: a novel therapy for hypoxic-ischaemic encephalopathy?* Dev Med Child Neurol, 2015. **57 Suppl3**: p. 34-9.
2. Toader, A.M., et al., *Neuroprotective strategy in an experimental newborn rat model of brain ischemia and hypoxia: effects of Resveratrol and hypothermia.* Clujul Med, 2013. **86**(3): p. 203-7.
3. Arteaga, O., et al., *Pretreatment with Resveratrol Prevents Neuronal Injury and Cognitive Deficits Induced by Perinatal Hypoxia-Ischemia in Rats.* PLoS One, 2015. **10**(11): p. e0142424.
4. Gao, Y., et al., *Resveratrol mitigates the oxidative stress mediated by hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats via Nrf2/HO-1 pathway.* Pharm Biol, 2018. **56**(1): p. 440-449.
5. Karalis, F., et al., *Resveratrol ameliorates hypoxia/ischemia-induced behavioral deficits and brain injury in the neonatal rat brain.* Brain Res, 2011. **1425**: p. 98-110.
6. Pan, S., et al., *Resveratrol post-treatment protects against neonatal brain injury after hypoxia-ischemia.* Oncotarget, 2016. **7**(48): p. 79247-79261.
7. Bian, H., H. Shan, and T. Chen, *Resveratrol ameliorates hypoxia/ischemia-induced brain injury in the neonatal rat via the miR-96/Bax axis.* Childs Nerv Syst, 2017. **33**(11): p. 1937-1945.
8. Rice, J.E., 3rd, R.C. Vannucci, and J.B. Brierley, *The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat.* Ann Neurol, 1981. **9**(2): p. 131-41.
9. Girbovan, C. and H. Plamondon, *Resveratrol downregulates type-1 glutamate transporter expression and microglia activation in the hippocampus following cerebral ischemia reperfusion in rats.* Brain Res, 2015. **1608**: p. 203-14.
10. Piotrowska, H., M. Kucinska, and M. Murias, *Biological activity of piceatannol: leaving the shadow of resveratrol.* Mutat Res, 2012. **750**(1): p. 60-82.
11. Matthews, L.G., et al., *Maternal pomegranate juice intake and brain structure and function in infants with intrauterine growth restriction: A randomized controlled pilot study.* PLoS One, 2019. **14**(8): p. e0219596.
12. Timmers, S., et al., *Calorie restriction-like effects of 30 days of resveratrol supplementation on energy metabolism and metabolic profile in obese humans.* Cell Metab, 2011. **14**(5): p. 612-22.
13. Evans, H.M., P.R. Howe, and R.H. Wong, *Effects of Resveratrol on Cognitive Performance, Mood and Cerebrovascular Function in Post-Menopausal Women; A 14-Week Randomised Placebo-Controlled Intervention Trial.* Nutrients, 2017. **9**(1).
14. Lin, H.S., B.D. Yue, and P.C. Ho, *Determination of pterostilbene in rat plasma by a simple HPLC-UV method and its application in pre-clinical pharmacokinetic study.* Biomed Chromatogr, 2009. **23**(12): p. 1308-15.
15. Zghonda, N., et al., *epsilon-Viniferin is more effective than its monomer resveratrol in improving the functions of vascular endothelial cells and the heart.* Biosci Biotechnol Biochem, 2012. **76**(5): p. 954-60.
16. Barros, L.F. and B. Weber, *CrossTalk proposal: an important astrocyte-to-neuron lactate shuttle couples neuronal activity to glucose utilisation in the brain.* J Physiol, 2018. **596**(3): p. 347-350.
17. Fang, A.Y., et al., *Effects of combination therapy using hypothermia and erythropoietin in a rat model of neonatal hypoxia-ischemia.* Pediatr Res, 2013. **73**(1): p. 12-7.
18. Souza, D.G., et al., *Characterization of adult rat astrocyte cultures.* PLoS One, 2013. **8**(3): p. e60282.