

Etude de la réponse différenciée à l'hypoxie-ischémie au cours du développement cérébral périnatal chez la souris

Nicolas Dupré

▶ **To cite this version:**

Nicolas Dupré. Etude de la réponse différenciée à l'hypoxie-ischémie au cours du développement cérébral périnatal chez la souris. Neurosciences [q-bio.NC]. Normandie Université, 2019. Français. ⟨NNT : 2019NORMR013⟩. ⟨tel-03175373⟩

HAL Id: tel-03175373

https://theses.hal.science/tel-03175373v1

Submitted on 20 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.



HAL Authorization

Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Discipline NEUROSCIENCES

Spécialité ASPECTS MOLECULAIRES ET CELLULAIRES DE LA BIOLOGIE

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

Étude de la réponse différenciée à l'hypoxie-ischémie au cours du développement cérébral périnatal chez la Souris

Présentée et soutenue par

Nicolas DUPRÉ

Thèse soutenue publiquement le 19 mars 2019 à 14h dans la salle des thèses du Bâtiment Stewart (6ème étage) devant le jury composé de		
Mme Nathalie BEDNAREK WEIRAUCH	Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, Chef de service de Pédiatrie B, CHU de Reims	Rapporteur
M. Vincent BEREZOWSKI	Professeur des Universités – INSERM U1171, Université de Lille	Rapporteur
Mme Valérie BESSON	Maître de Conférences – EA4475, Université Paris Descartes	Examinateur
Mme Carine ALI	Professeur des Universités – INSERM U1237, Université de Caen Normandie	Examinateur
M. Philippe LEROUX	Chargé de Recherche INSERM, Université de Rouen Normandie	Codirecteur de thèse
M. Bruno GONZALEZ	Directeur de Recherche INSERM, Université de Rouen Normandie	Codirecteur de thèse
M. Stéphane MARRET	Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, Chef du Service de Pédiatrie Néonatale et Réanimation, CHU de Rouen, Université de Rouen Normandie	Membre invité

Thèse dirigée par les Drs Philippe LEROUX et Bruno GONZALEZ,

Laboratoire U1245 – Équipe 4

UNIVERSITÉ DE ROUEN NORMANDIE

ED 497 NBISE
Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement

U1245 -Team 4 Inserm

À mon Papa,

Parti trop tôt, j'espère que tu serais fier.

Je commence naturellement ces remerciements par mes directeurs de thèse, à commencer par le **Dr Philippe Leroux**. Bientôt huit ans que je suis arrivé au laboratoire. Dès le début, tu m'as intégré aux travaux de recherche. Dès le début, tu m'as transmis ton intérêt, ta passion. Tu as joué un rôle déterminant dans ma reprise d'études. Tu m'as encadré pendant mes années de Master et nous avons naturellement continué ensemble pour la thèse. Je pense pouvoir dire que j'ai été un doctorant très présent -en particulier sur la chaise à côté de ton bureau-, parfois impatient, et tu t'es constamment montré disponible. Toujours prêt à partager ta culture bibliographique, scientifique et générale, j'ai beaucoup appris à tes côtés. Pour tout cela, et plus encore, je te dis un immense merci.

Je tiens également à remercier le **Dr Bruno Gonzalez**, dît le « datavore », pour ton enthousiasme à toute épreuve et ta soif de nouveaux résultats. Ton soutien et tes conseils lors des étapes critiques ont toujours fait mouche. Je pense qu'on peut te remercier si je pose autant de questions ; ça désinhibe, c'est bien ! Merci pour ton encadrement, caractérisé par un calme serein et un humour décapant.

Au **Pr Nathalie Bednarek**, Professeur des Université-Praticien Hospitalier, votre expertise clinique sur nos travaux nous apparait indispensable. Merci d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail.

Au **Pr Vincent Berezowski**, Professeur des Universités, un grand merci d'avoir accepté de juger ce travail et d'en être rapporteur.

Au **Dr Valérie Besson**, Maître de Conférences des Universités, merci d'avoir accepté d'être membre de mon CSI et de poursuivre le suivi jusqu'à examiner ces travaux de thèse.

Au **Pr Carine Ali**, Professeur des Universités, un grand merci d'avoir accepté de siéger dans ce jury et d'examiner ces travaux. Un grand merci également pour ton accueil à Caen lors de mes déplacements.

Merci au **Pr Stéphane Marret**, pour votre implication bienveillante dans les travaux du laboratoire, pour votre regard clinique indispensable à nos recherches ainsi que pour les échanges bibliographiques.

Parce que la Recherche, c'est avant tout des personnes, je tiens à remercier toute l'équipe 4 de l'unité INSERM 1245. Si notre laboratoire est un lieu propice à ce que nous faisons, c'est avant tout grâce à vous :

Merci au **Pr Isabelle Leroux-Nicollet**, aux **Drs Carine Cleren** et **Nathalie Dourmap**, pour votre implication dans ces travaux et vos remarques toujours constructives. Votre dévouement à l'enseignement est remarquable. Merci au **Dr Sylvie Jegou** pour ton dynamisme et ta joie de vivre, ton départ s'est fait ressentir et nous sommes toujours heureux quand tu reviens partager tes aventures bretonnes et de bateaux autour d'un café. Enfin, merci à **François Janin** pour ta présence toujours discrète et bienveillante.

Le bureau du troisième est un endroit très particulier, c'est un lieu de passage, imprimante oblige, mais ce n'est pas ce qui le rend si singulier ! Un immense merci à **Céline Lesueur** ; il y a 8 ans, tu me faisais visiter le labo, tu participais à mon entretien, je n'oublie pas que sans toi, je ne serais sûrement pas sur le point de soutenir ma thèse. Merci pour ton *black market*, on ne trouve pas meilleur ailleurs. Garde ton caractère et surtout sauvegarde un peu d'énergie pour toi ! Comment parler du bureau du troisième sans parler de **Mich*elle* Hauchecorne** ; on est arrivé presque en même temps au laboratoire et tout de suite tu m'as pris sous ton aile, nous avons partagé un bureau, voire deux et surtout beaucoup de discussions et de manips ! Je me souviendrai longtemps de nos séances de reniflements -ou devrais-je dire concours ? -, et de nos dosages parfaits, comme toujours. Merci pour ton soutien et ton amitié. Merci au **Dr Carole Brasse-Lagnel**, dernière habitante, mais pas des moindres, du bureau du troisième étage. Nous avons partagé une partie de tennis sous le cagnard -qu'il faudra renouveler- ainsi que de nombreux échanges « déco ». Merci pour tes conseils statistiques et surtout, profite de ton 100% recherche.

Un grand merci à mes collègues de bureau, les expatriés du 4ème, sans qui la vie au laboratoire n'aurait pas été la même. Merci au **Dr Maryline Lecointre**, sous tes airs parfois sévères, tu caches un gros cœur, tu ne peux plus leurrer personne maintenant ! Merci pour cette franchise et cette rigueur scientifique qui te caractérisent. Nous avons partagé ensemble de nombreuses manips, un été complet de semi-solitude, des discussions, des rigolades et tu as

même supporté nos décorations de Noël kitschissimes, ce qui n'est pas rien. J'espère que tu trouveras la stabilité professionnelle que tu mérites.
Je remercie tout particulièrement le **Dr Cécile Léger**. Merci pour tes cours si gracieusement prêtés, sans toi, la licence et le Master auraient été bien plus compliqués. Toujours de bonne humeur, nous avons beaucoup travaillé ensemble, ce fut toujours avec plaisir. Nous avons également beaucoup discuté, de tout, de rien, de choses importantes, moins importantes, de n'importe quoi même parfois, et c'est bien plus inestimable que le reste. J'espère que tu trouveras ton bonheur à la recherche de ton futur métier, l'important est de faire ce que l'on aime.

Que serait un laboratoire de recherche sans ses étudiants, au sens large du terme ? C'est pourquoi je souhaite une bonne suite de thèse à : **Camille Sautreuil**, nous avons dans un premier temps mis du temps à communiquer, j'ai ensuite découvert un humour piquant et une autodérision que j'apprécie énormément, je suis content de te voir t'ouvrir ; **Bérénice Le Dieu-Lugon**, merci d'avoir enrichi mon catalogue d'expressions cauchoises. Le plus gros du travail est passé, maintenant il ne te reste plus qu'à te « dépouiller les cuisses » pour la rédaction ! Tu vois, je m'améliore ; **Marion Dumanoir**, arrivée en Master 2 avec l'idée de ne pas poursuivre, tu as finalement prolongé pour la thèse, pour notre plus grand plaisir. Je vous souhaite plein de bonheur à trois et de la motivation pour la reprise, les yeux n'attendent plus que toi ! ; **Mélanie Brosolo**, dernière arrivée des thésardes, tu me forces à manger de la raclette contre mon gré, c'est terrible ! Ne t'en fais pas pour les Western, c'est pour tout le monde pareil, la recette c'est : à la pleine lune, tous les mois impairs, il n'y a que ça de vrai ! ; **Lou Legouez *aka* Loupette**, étudiante de Master 2, la relève semble bel et bien arrivée !
Merci à vous toutes pour votre humour et votre *punch* ! Une belle équipe, ça fait du beau boulot, y a qu'à voir les dosages à 8 mains, ou 12, je ne sais plus !

Il y a les étudiants actuels et ceux qui sont partis vers de nouvelles aventures. Leur présence aura marqué mon aventure au laboratoire. Merci aux **Drs Caroline Aligny, Christian Roux** et **Vincent Henry**, vous formiez un trio détonnant !
Au **Dr Ismael Daher**, un grand merci pour ton énergie débordante et ton enthousiasme inaltérable, nos parties de badminton et de squash me manquent. Je te souhaite tout le meilleur pour la suite, et comme on dit en « libanien » : Yallah Bye !

Merci à **Maelle Fabre** pour ton entrain, ta joie de vivre et ton absence de filtre. On a bien rigolé et on rigole encore. J'espère que tu t'épanouiras dans ta nouvelle voie.

Je tiens également à remercier les médecins qui sont passés ou qui sont encore dans l'équipe, les **Drs Lénaïg Abily-Donval, Caroline Voisin, Emmanuelle Bertrand, Vianney Gilard**, **Ronan de Quelen**, **Fabien Tourrel**, **Clément Chollat** et **Florent Marguet**. Votre regard sur les problématiques cliniques et votre investissement dans la recherche compte énormément et donne du sens à ce que nous faisons.

Merci également aux stagiaires de Master qui m'ont accompagné au cours de ces années. Je pense notamment à **Victor Ferment**, **Boubacar Mohamed** et **Quentin Lemercier**, vous encadrer m'a toujours beaucoup apporté et j'espère que vous en aurez également retiré de bonnes choses pour la suite de vos aventures.

Au cours de ma thèse, j'ai eu l'occasion de travailler avec de nombreuses personnes, sans qui ces travaux ne seraient pas les mêmes :

Merci tout d'abord aux Caennais, et notamment au **Pr Denis Vivien**, pour m'avoir permis d'utiliser l'IRM du centre de recherche Cycéron. Merci ensuite au **Dr Cyrille Orset** pour l'initiation à l'utilisation de l'IRM, ainsi que pour le comique de répétition de la guérite. Merci encore à **Céline Leroy**, du CURB, pour la logistique concernant les animaux, tout était parfait ! Enfin, merci à toutes les personnes avec qui j'ai interagi sur place, étudiants et titulaires, trop nombreux pour être cités.

Merci au service de comportement du CURIB de Mont Saint Aignan, représenté par les **Drs Arnaud Arabo** et **Julie Maucotel,** pour leur expertise du comportement animal et les réunions toujours productives que nous avons eues. Merci à **Yannick Detroussel** pour le temps consacré à l'ACP sur ton temps personnel.

Merci au **Dr Céline Derambure** pour m'avoir initié à la transcriptomique. Ta collaboration avec le laboratoire date de plusieurs années maintenant et les projets ne manquent pas pour les années à venir. Merci pour ton enthousiasme et ton volontariat.

Enfin, je tiens à remercier la plateforme de protéomique PISSARO, et notamment les **Drs Pascal Cosette**, **Julie Ardouin**, **Clément Guillou** ainsi que **Marie-Laure Balieu** pour leur collaboration sur le projet PREMATRICE.

Merci au directoire de l'école doctorale nBISE composé des **Prs François Dauphin, Pierrick Gandolfo, Vincent Richard, Frank Le Foll, Alain Rincé** et de **Mme Émilie Despois,** pour la confiance qu'ils m'ont accordée lors de ma mission d'un an en tant que représentant des doctorants. Cette expérience a été très variée et enrichissante, j'en retire beaucoup. Merci également à mes commissionnaires doctorantes, le **Dr Elisa Grimoin**, **Appoline Chabenat** et **Maud Charles**, avec lesquelles nous avons œuvré du mieux possible. Il est dommage que l'éparpillement sur les différents sites normands ne favorise pas plus ces interactions qui se montrent pourtant fructueuses.

Je tiens à remercier les **Drs Marie Picot**, **Christophe Dubessy**, **Fabrice Morin** et **Anthony Falluel** qui m'ont formé à l'enseignement. J'admire votre engagement dans la formation des étudiants. Cela demande du temps, de la patience et de l'abnégation pour faire et refaire les mêmes TP, mais toujours avec le sourire et avec bienveillance.

Un immense merci aux personnes ayant participé à l'aventure NORMADOC, aux membres du premier et deuxième bureau : **Bérénice**, **Marc**, **Thomas**, **Marie**, **François**, **Auriane**, **Camille**, **Édouard**, **Hugo**, **Sarah** et **Laetitia**. Je n'oublie pas **Benji** qui a été mon représentant doctorant lors de mes CSI. Sans vous, il aurait été facile d'oublier qu'il existe des personnes en dehors du labo, en dehors de la thèse. Passer ces deux dernières années avec vous, à organiser des évènements, des soirées, à essayer de faire vivre la communauté rouennaise des doctorants, aura été un énorme plaisir. Si notre mission a manqué de succès, j'en retire de nombreuses amitiés. Nous prendrons forcément des chemins divergents, l'après thèse oblige, mais je ne serai jamais bien loin en cas de besoin.
Les prénoms vont commencer à se répéter dans cette partie, mais comment ne pas parler de la team Lille ! Merci à **Bérénice**, **Hugo**, **Sarah** et **Alexandre**, grâce à vous je connais une bonne part des estaminets lillois, ainsi que la rue Massena. On en parle de temps en temps mais une

nouvelle virée Lilloise est à envisager, il me semble qu'il reste quelques découvertes culinaires à faire et des bouteilles de Chablis à ouvrir !

Merci aux gars du tennis, **Benoît**, **Ludovic** et **Guillaume**. Toutes ces séances du mardi soir et du samedi matin on fait un bien fou.

Un merci tout particulier au **Dr Baptiste Porte,** fondateur de la guilde des Labssassins, scientifique dans l'âme pour qui tout est sujet à débat, juste pour le plaisir de la pratique. Nous avons travaillé ensemble, établi la tradition des kebabs de labo, écumé le salon du whisky live et tellement plus encore. Nous sommes tellement différents et pourtant, d'un collègue tu es devenu un ami indispensable, un frère. Il paraît inconcevable de parler de Baptiste sans parler du **Dr Elsa Billaud-Porte** et toutes ces soirées passées ensemble à jouer à *Mice and Mystics*, à discuter de tout, de la vie. Vous avez toujours été d'un énorme soutien, et pour cela je ne vous remercierai jamais assez.

Je finirai ces remerciements, sans trop m'épancher, par ma **famille**, soutien discret mais constant. Je pense particulièrement à ma **Maman**, tu nous as toujours poussés, encouragés à faire un métier que l'on aime. Serais-je là sans cette idée sous-jacente, cet état d'esprit ? Certainement pas. Alors au-delà de l'évidence frappante de cette phrase, je peux dire que je ne serais pas là sans toi, merci pour tout.

Mon dernier remerciement est pour **Claire**, mon soutien, ma compagne de la vie de tous les jours. Je ne saurais exprimer avec des mots simples ce que je te dois, alors je m'abstiendrai. Ce que je peux dire, c'est qu'avec l'après-thèse commence une nouvelle aventure et que j'ai vraiment hâte de la vivre à tes côtés. Merci d'être là, merci d'être toi.

PUBLICATIONS

- **Dupré N**, Arabo A, Orset C, Maucotel J, Detroussel Y, Hauchecorne M, Gonzalez BJ, Marret S, Vivien D, Leroux P.
  "*Neonatal cerebral hypoxia-ischemia in mice triggers age-dependent vascular effects and disabilities in adults: impact of tPA.*" Soumis dans Experimental Neurology.

- **Dupré N**, Hauchecorne M, Derambure C, Léger C, Marret S, Gonzalez BJ, Leroux P.
  "*Analysis of hypoxia-ischemia induced gene induction and/or repression in neonate mouse brain at two stages of perinatal development: micro-arrays transcriptomic analysis and biological validation.*" Article en préparation**.**

- Léger C, **Dupré N**, Aligny C, Bénard M, Lebon A, Henry V, Hauchecorne M, Galas L, Frebourg T, Leroux P, Vivien D, Marret S, Gonzalez BJ.
  "*Glutamate controls migration of GABA interneurons in the pial migratory route via NMDA receptors and vascular proteases.*" En révision dans Cellular and Molecular Life Science.

- Léger C, **Dupré N**, Hauchecorne M, Aligny C, Vivien D, Leroux P, Marret S, Gonzalez BJ.
  "Prenatal ethanol exposure impacts long term integration of GABAergic interneurons via the endothelial NMDA receptor." Article en préparation.

- Daher I, Le Dieu-Lugon B, Lecointre M, **Dupré N**, Voisin C, Leroux P, Dourmap N, Gonzalez BJ, Marret S, Leroux-Nicollet I, Cleren C.
  "*Time- and sex-dependent efficacy of magnesium sulfate to prevent behavioral impairments and cerebral damage in a mouse model of cerebral palsy.*" Neurobiol Dis. 2018 Sep 7. PMID: 30201311

- Porte B, Chatelain C, Hardouin J, Derambure C, Zerdoumi Y, Hauchecorne M, **Dupré N**, Bekri S, Gonzalez B, Marret S, Cosette P, Leroux P.
  "*Proteomic and transcriptomic study of brain microvessels in neonatal and adult mice.*" PLoS One. 2017 Jan 31. PMID: 28141873

- Porte B, Hardouin J, Zerdoumi Y, Derambure C, Hauchecorne M, **Dupré N**, Obry A, Lequerre T, Bekri S, Gonzalez B, Flaman JM, Marret S, Cosette P, Leroux P.
  "*Major remodeling of brain microvessels during neonatal period in the mouse: A proteomic and transcriptomic study.*" J Cereb Blood Flow Metab. 2017 Feb. PMID: 26873886

- Lecointre M, Vézier C, Bénard M, Ramdani Y, **Dupré N**, Brasse-Lagnel C, Henry VJ, Roy V, Marret S, Gonzalez BJ, Jégou S, Leroux-Nicollet I.
  "*Age-dependent alterations of the NMDA receptor developmental profile and adult behavior in postnatally ketamine-treated mice.*" Dev Neurobiol. 2015 Mar. PMID: 25220981

- Omouendze PL, Henry VJ, Porte B, **Dupré N**, Carmeliet P, Gonzalez BJ, Marret S, Leroux P.
  "*Hypoxia-ischemia or excitotoxin-induced tissue plasminogen activator- dependent gelatinase activation in mice neonate brain microvessels.*" PLoS One. 2013 Aug 6. PMID: 23940734

COMMUNICATIONS ORALES

- **Dupré N**, Léger C.
  « *Implication de l'activateur tissulaire du plasminogène t-PA dans des processus physiologiques et pathologiques en période néonatale.* » Conférence invité lors du congrès de l'Union des professeurs de Physiologie, Biochimie et Microbiologie (UPBM). Lycée Galilée ; Franqueville-Saint-Pierre 2018.

- **Dupré N,** Arabo A, Orset C, Gonzalez BJ, Marret S, Vivien D, Leroux P.
  « L'Hypoxie-Ischémie Néonatale Induit des Effets Vasculaires et des Séquelles Comportementales Distincts en Fonction de l'Age. » Journée Francophone de Recherche en Néonatologie. Paris 2018

- **Dupré N,** Orset C, Hauchecorne M, Vivien D, Gonzalez BJ, Marret S, Leroux P.
  "*Tissue-type plasminogen activator (tPA) participates in brain edema, protease activities and lasting lesions in adult mice after neonate hypoxia-ischemia (H**I**)*." Journée Normande de Recherche Biomédicale. Caen 2017.

- **Dupré N,** Hauchecorne M, Gonzalez BJ, Marret S, Leroux P.
  "*Plasminogen activators and matrix metalloproteinases (MMP) in excitotoxic and hypoxia-ischemia induced brain edema in neonate mice.*" Congrès LARC Neurosciences. Rennes 2016.

COMMUNICATIONS AFFICHÉES (comme présentateur)

- **Dupré N**, Hauchecorne M, Derambure C, Leroux P.
  "*Short-term age-dependent transcriptomic response to hypoxia-ischemia in neonate mice*." Congrès LARC Neurosciences. Rouen 2018.

- **Dupré N**, Hauchecorne M, Derambure C, Leroux P.
  "*Effects of cerebral hypoxia-ischemia at two stages of neonatal development in mice at transcriptional level.*" Journée Normande de Recherche Biomédicale. Rouen 2018.

- **Dupré N,** Orset C, Hauchecorne M, Vivien D, Gonzalez BJ, Marret S, Leroux P.
  "*Does tPA participate in brain edema in neonates and lasting lesions in adult mice after P5 or P10 hypoxia-ischemia?*" Congrès LARC Neurosciences. Lille 2017.

- **Dupré N,** Hauchecorne M, Gonzalez BJ, Marret S, Leroux P.
  "Plasminogen activator and gelatinase (MMP-2/9) activities in excitotoxic and hypoxia-ischemia induced brain edema in neonate mice." **Communication primée**. European Stroke Conference. Berlin 2017.

- **Dupré N,** Gonzalez BJ, Marret S, Leroux P.
  "*Excitotoxic or hypoxo-ischemic insults induce different plasminogen activator dependent brain edema in neonatal mice.*" Journée Normande de Recherche Biomédicale. Rouen 2016.

- **Dupré N,** Gonzalez BJ, Marret S, Leroux P.
  "*Proteases involvement in edema formation and blood brain barrier breakdown after neonatal hypoxia-ischemia induced brain lesions in mice.*" Journées de l'École Doctorale. Caen 2016.

- **Dupré N,** Gonzalez BJ, Marret S, Leroux P.
  "*Plasminogen activators (t-PA and uPA) exhibit different involvement in mice neonatal brain edema after excitotoxic or hypoxo-ischemic insults.*" **Communication primée**. Congrès LARC Neurosciences. Amiens 2015.

- **Dupré N,** Gonzalez BJ, Marret S, Leroux P.
  "Differential implication of t-PA on brain edema in two neonate brain lesion models." Journée scientifique de l'Institut de la Recherche et de l'Innovation Biomédicale. Rouen 2015.

ENSEIGNEMENTS

Mission d'enseignement 2017/2018 (64h) – Université des Sciences et Techniques de Rouen.

- Niveau Licence 3 et 1ère année ESITech : TP de physiologie animale
- Niveau Master 1 : TD de biostatistiques

ENCADREMENT DE STAGIAIRES

Encadrement de 7 stagiaires dont :

- 1 en 3ème année de Licence
- 1 en 2ème année de Pharmacie
- 2 en 1ère année ESITech
- 1 en 1ère année de Master
- 2 en 2ème année de Master

FORMATIONS

- Formation « Pilotage de la qualité » (2018)
- Formation « Visite des institutions Européennes à Bruxelles » (2018)
- Formation « Spectrométrie de masse et approches omiques » (2018)
- Formation « Approches complémentaires en imagerie cellulaire » (2018)
- Formation à la « Mission Enseignement » (2017)
- Formation « Chirurgie Expérimentale » (2017)
- Formation « Expérimentation Animale Niveau I » (2017)
- Formation « Maitriser sa communication professionnelle auprès des acteurs du monde socio-économique » (2017)
- Formation « Manager une équipe projet » (2017)
- Formation « Biostatistiques – niveau 1 » (2016)
- Formation « Expérimentation Animale Niveau II » (2015)

ACTIVITÉS CONNEXES

- Représentant des doctorants de l'ED 497 nBISE (mars 2017/ avril 2018)
- Vice-trésorier de l'association NORMADOC (2017/2018)
- Vice-président de l'association NORMADOC (2016/2017)

Introduction. L'hypoxie-ischémie (HI) et l'inflammation sont les principaux facteurs de risques d'apparition de paralysies cérébrales (PC) chez le nouveau-né prématuré ou à terme. La PC est un ensemble de troubles moteurs et cognitifs nécessitant une prise en charge à vie. Sa prévalence en Europe est de 1,7‰ naissances vivantes, ce qui constitue un problème de santé publique. Les nouveau-nés prématurés et nés à terme montrent des atteintes structurales et des déficits à long terme différents aux plans quantitatif et qualitatif. À ces âges, les interventions thérapeutiques et de prévention sont limitées du fait des interférences probables avec le développement. Afin d'appréhender les mécanismes de ces lésions périnatales et de trouver de potentielles pistes d'intervention précoce, nous avons utilisé un modèle murin d'HI chez la souris de 5 et 10 jours (P5 et P10). À ces stades, le développement cortical chez la Souris mime celui d'enfants prématurés (vers 30 SG) ou à terme.

Méthode. Afin d'étudier la réponse différenciée à l'HI entre ces deux stades, nous avons, dans un premier temps, réalisé une étude longitudinale par imagerie IRM suivie d'une étude comportementale des animaux à l'âge adulte, ainsi que des études enzymatiques ciblées en période périnatale. Dans un second temps, nous avons réalisé une étude globale et sans apriori des modifications précoces du transcriptome.

Résultats I. Nos résultats renforcent la validité de ce modèle murin pour l'étude des lésions spécifiques correspondant aux lésions : soit de nouveau-nés prématurés soit d'enfants à terme. En effet, nous montrons une atteinte spécifique de la substance blanche (SB) chez les souris à P5, mimant les leucomalacies périventriculaires du grand prématuré. Nous montrons que l'atteinte de la SB est associée à une vulnérabilité vasculaire dépendante de l'âge. L'atteinte vasculaire passe par l'activité de la MMP-9, sous dépendance du tPA. À long terme, nous montrons des atteintes cognitivo-comportementales dépendantes de l'âge, permettant d'associer les lésions de la SB aux déficits d'interaction sociale et à l'hyperactivité, alors que les déficits d'apprentissage sont plus amples chez la souris exposée à l'HI à P10 et sont associés à des lésions de l'hippocampe et du cortex rétrosplénial.

Résultats II. L'étude du transcriptome a permis de constituer une base de données utilisable pour des études ultérieures. Elle montre des différences importantes de la réponse induite par l'HI, en fonction de l'âge. Cinq faits parmi les plus marquants sont à retenir : ***i)*** si les

processus affectés aux deux âges sont les mêmes, soit principalement la régulation de la transcription, l'inflammation, la mort cellulaire et l'angiogenèse, les gènes mis en jeu sont sensiblement différents, ***ii)*** une réponse à P10 qui, pour une grande partie, s'oppose à l'évolution ontogénique des niveaux de transcrits, peut être le signe d'un arrêt dans le processus de développement, ***iii)*** des cinétiques d'induction et de répression différentes à P5 et P10, la réponse étant retardée à P10 en termes de délai d'induction et de maximum d'amplitude, ***iv)*** la réponse transcriptomique à l'HI à P5 semble en voie d'extinction après 24h, alors qu'à ce même délai post-HI, la réponse montre une forte amplification chez les animaux lésés à P10, ***v)*** une répression coordonnée, à P5 seulement, de gènes codant des protéines impliquées dans les fonctions synaptiques 12h après l'HI, potentiellement responsable de l'extinction de la réponse à 24h.

Conclusion. Ces études, complémentaires, permettent une meilleure compréhension de la pathogenèse des lésions cérébrales néonatales. Elles ouvrent notamment différentes pistes de recherche pour les années à venir, orientées vers : ***i)*** la spécificité vasculaire, dépendante de la structure et du stade de développement, ***ii)*** la prise en compte du stade de développement pour l'expérimentation et la mise au point de stratégies de neuroprotection spécifiques de l'âge.

Introduction. Hypoxia-ischemia and inflammation are the major triggers of cerebral palsy (CP) in preterm and term new-born. CP is defined as a group of nonprogressive disorders of movement and posture, associated with cognitive and behavioural disorders. CP prevalence is about 1.7‰ living birth and leads to life-long medical care which altogether makes CP a healthcare issue. Preterm and term new-born exhibit specific structural damages and long-term outcomes. In the perinatal period, therapeutic or preventive strategies are limited due to the risk of interference with the ongoing development. To further explore lesion mechanisms, we used the well described "Rice-Vannucci" model of HI adapted in mice aged 5 or 10 days (P5/P10). At these developmental stages, mouse cortical development mimics those of human preterm and term new-born respectively.

Methods. To explore the differentiated response to HI between P5 and P10 mice, we first performed a longitudinal MRI study associated with learning and social behaviour testing at adulthood. We also used targeted enzymatic approaches in perinatal period. In a second time, we performed a global, non-targeted assessment of early HI-induced transcriptome modifications during the first 24h after HI.

Results I. Our results validated the HI model for the study of age-dependent lesions corresponding to preterm or term new-born lesions. We confirmed the P5-specific white matter lesions mimicking periventricular leukomalacia of preterm infants (30GW). We showed that these white matter lesions originate from age-dependent vascular vulnerability. This vascular vulnerability involved P5 restricted vascular MMP-9 activity which also depends on tPA activity. We showed age-dependent long-term cognitivo-behavioural outcomes, allowing us to associate white matter damages to social behaviour and hyperactivity, whereas learning deficits were more pronounced in P10 mice and associated with hippocampal and retrosplenial cortex damages.

Results II. The transcriptome study has generated a useful database for further research. It also showed very important differences in HI-induced transcriptomic responses. Five highlights emerged: ***i)*** **i**dentical processes (pathways, GO terms) were affected by HI in both P5 and P10 mice: *i.e.* regulation of transcription, inflammation, cell death/apoptosis and angiogenesis, but the genes induced or repressed associated to these processes were highly

different at the two stages, ***ii)*** the HI-induced transcription response at P10 mainly counteracted the development-induced transcription changes, ***iii)*** the kinetics of induction/repression were different between P5 and P10 mice; P10 mice exhibiting a global delayed response to HI compared to P5 in terms of delay of induction/repression and maximum amplitude, ***iv)*** twenty-four hours after HI, the response at P5 was slowing down, apparently returning to basal state, whereas in P10 mice the changes appeared uncontrolled, ***v)*** a P5 specific coordinated repression of genes coding proteins involved in synaptic function was observed 12h post-HI, perhaps at the origin of the global slowing-down of transcription alterations observed 24h post-HI.

Conclusion. These complementary studies provide a better understanding of the pathogenesis of neonatal brain injury. They also open routes towards new research areas such as: ***i)*** the specific vascular vulnerability, depending on brain structures and developmental stage, ***ii)*** the consideration of the maturation stage in the further development and experimentation of new neuroprotective strategies.

AMPA : *α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*
AQP(s) : aquaporine(s)
ATP : adénosine triphosphate
AVC : accident vasculaire céeréebral
BDNF : *brain derived neurotrophic factor*
BHE : barrière hémato-encéphalique
CCL(x) : *C-C motif chemokine (x)*
CEVC : cellule endothéliale vasculaire cérébrale
CXCL(x) : chimiokine CXCL(x)
E(x) : jour embryonnaire (x)
EAAT(x) : *excitatory amino acid transporter (x)*
EG : éminences ganglionaires
EGF : *epidermal growth factor*
EN : encéphalopathie néonatale
eNOS : *endothelial nitric oxide synthase*
FGF : *fibroblast growth factor*
FSC : flux sanguin cérébral
GABA : acide γ-aminobutyrique
GFAP : *Glial Fibrillary Acidic Protein*
GluN(x) : sous unité GluN(x) du récepteur NMDA
GLUT-1 : *glucose transporter 1*
GR : glie radiaire
GST : *glutathion s-transferase*
HI : hypoxie-ischémie
HiC : hémorragie(s) intracérébrale(s)
HIE : *hypoxia ischemia encephalopathy*
HIF : *Hypoxia-inducible factor*
HiV : hémorragie(s) intraventriculaire(s)
ICAM : *intercellular adhesion molecule*
IL1-β : interleukine 1 bêta
IL-6 : interleukine-6
iNOS : *inducible nitric oxide synthase*
IRM : imagerie par résonance magnétique
JAM : *junctional adhesion molecules*
LAM : *leucocyte adhesion molecules*
LB : lame basale
LCPP : lésions cérébrales acquises en période périnatale
LCR : liquide céphalo-rachidien
LMGP : lésion de la matière grise profonde
LPS : lipopolysaccharide
LPV : leucomalacie périventriculaire
MCT-1 : *monocarboxylate transporter 1*
MEC : matrice extracellulaire
MG : matrice germinative
$MgSO_4$: sulfate de magnesium
MMP(s) : *matrix metalloproteinases*
MRP : *multidrug resistance-associated protein*
NFkB : *nuclear factor-kappa B*
NGF *: nerve growth factor*
NMDA : *N-methyl-D-aspartate*
nNOS : *neuronal nitric oxide synthase*
NO : *nitric oxide*
NOS : *nitric oxide synthase*
NT3/4 : *neurotrophin ¾*
OAP : *orthogonal array of particles*
P(x) : jour postnatal (x)
PAI-1 : *plasminogen activator inhibitor 1*
PAI-$1^{-/-}$: souris invalidée pour le PAI-1
PAMPs: *pathogen associated molecular pattern*
PC : paralysie cérébrale
PDGF : *platelet derived growth factor*
Pgp : glycoprotéine P
PlGF : *placental growth factor*
Recepteur LRP : *low density lipoprotein receptor-related protein*
rNMDA : récepteur du NMDA
ROS : *reactive oxygen species*
SG : semaines de gestation
SLC : *solute carriers transporter*
SNC : système nerveux central
TGF-β : *Transforming Growth Factor Beta*
TIMP(s) : *tissue inhibitor(s) of metalloproteinases*
TJ : *tight junctions*
TLR(x) : *toll-like receptor (x)*
TNF-α : *tumor necrosis factor alpha*
tPA : *tissue type plasminogen activator*
Transporteurs ABC : *ATP binding cassette*
UGT : *UDP-glucuronosyltransferase*
UNV : unité neurovasculaire
uPA : *urokinase-type plasminogen activator*
VCAM : *vascular cell adhesion molecule*
VE-cadherin : *vascular endothelial cadherin*
VEGF : *vascular endothelial growth factor*
VEGFR-1 : *vascular endothelial growth factor receptor 1*
ZM : zone marginale
ZO-1 : *zonula occludens-1*
ZSV : zone sous-ventriculaire
ZV : zone ventriculaire

Figure 1 : Évolution des types de lésions cérébrales acquises en période périnatale selon le stade de développement et/ou l'âge gestationnel à la naissance. 5
Figure 2 : Principaux processus à l'origine des lésions cérébrales acquises en période périnatale. 9
Figure 3 : Mécanismes moléculaires mis en jeu lors d'une cascade excitotoxique 11
Figure 4 : Localisations principales des hémorragies intra-cérébrales (HiC) et intra-ventriculaires (HiV) avec ou sans hémorragie périventriculaire (HPV) du nouveau-né grand/extrême prématuré. 12
Figure 5 : Distribution des leucomalacies périventriculaires (LPV) du nouveau-né prématuré. 15
Figure 6 : Visualisation par IRM des atteintes des ganglions de la base. 17
Figure 7 : Mise en parallèle des grandes étapes du développement cérébral et de la modélisation des types de lésions chez l'Homme et la Souris. 26
Figure 8 : Chronologie des séquences majeures du développement neural chez l'Homme. 30
Figure 9 : Modes de division cellulaire lors du développement cortical. 31
Figure 10 : Origine des différents types de cellules neurales télencéphaliques dans la matrice germinative. 32
Figure 11 : Mise en place de la lamination corticale. 33
Figure 12 : Localisation des éminences ganglionnaires et des voies de migration des interneurones GABAergiques vers le cortex. 35
Figure 13 : Mise en place du réseau vasculaire cérébral par envahissement du cerveau vers les ventricules. 40
Figure 14 : Formation du polygone de Willis aux stades embryonnaires. 41
Figure 15 : Schématisation des deux modes d'angiogenèse. 42
Figure 16 : L'angiogenèse par bourgeonnement. 43
Figure 17 : Etapes morphogéniques de l'intussusception. 45
Figure 18 : Mise en parallèle du développement neural et du développement vasculaire. 46
Figure 19 : Structure de l'unité neurovasculaire entre artérioles et capillaires cérébraux. . 48
Figure 20 : Propriétés de barrière hémato-encéphalique des cellules endothéliales vasculaires cérébrales. 52
Figure 21 : Schéma de la lame basale dans l'unité neurovasculaire. 54

Figure 22 : Comparaison du transcriptome des micro-vaisseaux cérébraux au cours du développement chez la Souris. 56
Figure 23 : Conséquences de phénomènes d'hypoxie et/ou d'ischémie sur les composants de l'unité neurovasculaire..... 62
Figure 24 : Structure des gélatinases. 65
Figure 25 : Métalloprotéinases de la matrice extracellulaire et inflammation. 67
Figure 26 : Domaines fonctionnels du tPA représenté sous forme simple chaîne. 70

NB : Les figures : 1, 2, 3, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 17, 18 et 21 ont été adaptées de thèses précédemment soutenues dans le laboratoire.

Tableau 1 : Prévalence de la paralysie cérébrale en fonction du terme de naissance. 19

NB : Le tableau 1 à été adapté d'une thèse précédemment soutenue au laboratoire

Table des matières

INTRODUCTION 1

I. L'ENCÉPHALOPATHIE NÉONATALE 3

1. Description générale 3

2. Les facteurs de risque associés à l'apparition des lésions cérébrales acquises en période périnatale 5

a. La prématurité 5

b. Les phénomènes inflammatoires 6

c. Les phénomènes d'hypoxie-ischémie 6

d. L'exposition *in utero* à des composés toxiques 7

e. Les accidents traumatiques 7

f. Synthèse 8

3. Lésions cérébrales acquises en période périnatale et handicaps associés 9

a. Hémorragies intracérébrales / hémorragies intraventriculaires 10

b. Leucomalacies périventriculaires 14

c. Lésions cérébrales de l'enfant né à terme 16

d. Handicaps associés aux lésions cérébrales acquises en période périnatale 18

4. Prise en charge clinique et thérapies actuelles 19

a. L'hypothermie 20

b. Le sulfate de magnésium 21

c. Les corticostéroïdes 22

d. Autres 22

II. MODÉLISATION ANIMALE DES LÉSIONS PÉRINATALES 24

1. Généralités 24

2. Parallèle développemental Homme-Souris 25

3. Les modèles murins de lésions cérébrales néonatales 26

a. Modèles de lésions hémorragiques 26
b. Modèles inflammatoires de lésions cérébrales néonatales 27
c. Modèle de lésions excitotoxiques 27
d. Modèle de lésions hypoxo-ischémiques 28
III. DÉVELOPPEMENT CÉRÉBRAL : ASPECTS NEURAL ET VASCULAIRE 30
1. Généralités 30
2. Développement du cortex cérébral 30
a. Prolifération neuronale 31
b. Migration neuronale 32
c. Migration des interneurones GABAergiques 34
d. Synaptogenèse, myélinisation et apoptose 36
e. Développement des astrocytes et de la microglie 37
3. Le réseau vasculaire cérébral 38
a. Mise en place du réseau vasculaire cérébral 38
b. L'angiogenèse cérébrale 42
4. Interactions entre cellules neurales et réseau vasculaire 46
IV. INTERFACE NEUROVASCULAIRE 48
1. L'unité neurovasculaire 48
2. La barrière hémato-encéphalique 50
a. Rappel historique 50
b. Support de la barrière hémato-encéphalique, la cellule endothéliale 51
c. La lame basale 54
d. Cellules associées à la barrière hémato-encéphalique 56
3. La barrière hémato-encéphalique en condition pathologique en période néonatale . 60
a. L'inflammation 60
b. Les phénomènes d'hypoxie-ischémie 61

c. L'œdème cérébral 62

V. LES PROTÉASES ET LA BARRIÈRE HÉMATO-ENCÉPHALIQUE 64

1. Généralités 64

2. Les métalloprotéinases de la matrice extracellulaire (MMPs) 64

a. Rôles physiologiques et pathologiques des gélatinases 66

3. L'activateur du plasminogène d'origine tissulaire 68

a. Généralités 68

b. Structure de l'activateur tissulaire du plasminogène 69

c. Inhibiteurs de l'activateur tissulaire du plasminogène 70

d. Activateur tissulaire du plasminogène pendant le développement du système nerveux central 71

e. Activateur tissulaire du plasminogène et barrière hémato-encéphalique en conditions pathologiques 72

HYPOTHÈSES DE TRAVAIL & OBJECTIFS 75

RÉSULTATS - PARTIE 1 : Neonatal cerebral hypoxia-ischemia in mice triggers age-dependent vascular effects and disabilities in adults: impact of tPA. 81

RÉSULTATS - PARTIE 2 : Analysis of hypoxia-ischemia induced gene induction and/or repression in neonate mouse brain at two stages of perinatal development: micro-arrays transcriptomic analysis and biological validation 123

DISCUSSION & PERSPECTIVES 175

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 195

ANNEXE I : Glutamate controls vessel-associated migration of GABA interneurons from the pial migratory route *via* NMDA receptors and endothelial protease activation 225

INTRODUCTION

I. L'ENCÉPHALOPATHIE NÉONATALE

1. Description générale

L'encéphalopathie néonatale (EN) est décrite comme un ensemble complexe de perturbations des fonctions cérébrales chez le nouveau-né, responsable de troubles ultérieurs liés au développement. Les dysfonctionnements et/ou handicaps les plus sévères associés à l'EN sont décrits sous l'appellation générale de paralysie cérébrale (PC), qui désigne des troubles permanents du développement, du mouvement et de la posture. Ces handicaps sont causés par des atteintes survenues lors du développement du cerveau chez le fœtus ou le nourrisson et peuvent résulter de nombreux facteurs interférant avec le développement cérébral, tels que : ***i)*** la privation de facteurs trophiques materno-placentaires chez le prématuré ; ***ii)*** une mortalité et/ou dysmaturation cellulaire ; ***iii)*** une dysconnectivité du réseau neural. Les troubles moteurs de la PC sont souvent accompagnés d'atteintes sensorielles, cognitives, de la communication et du comportement (Rosenbaum et al., 2007). Malgré une diminution de la prévalence de la PC au cours des dernières années en Europe, celle-ci est encore de 1,7‰ naissances. Son incidence est inversement proportionnelle au terme et au poids de naissance (Sellier et al., 2016).

La durée de gestation peut être calculée en semaines d'aménorrhée ou en semaines de grossesse (SG), dans ce manuscrit nous utiliserons la SG dont le t0 considéré est le jour de fécondation. Ainsi, la norme pour une grossesse menée à terme décrit une naissance entre 39 et 41 SG. Une naissance survenant avant le terme est dite prématurée. La définition de la prématurité donnée par l'organisation mondiale de la santé (OMS) concerne une naissance survenant avant 37 SG. Une naissance à 38 SG étant considérée comme une naissance pré-terme mais non prématurée. L'OMS définit également différents stades de prématurité. L'extrême prématurité décrit une naissance survenant avant 28 SG, la grande prématurité une naissance survenant entre 28 et 32 SG et enfin, la prématurité « modérée » ou « tardive » concerne les naissances survenant entre 32 et 37 SG (Althabe et al., 2012; Ream and Lehwald, 2018). Cette classification temporelle des naissances est rapportée aux principales phases de développement et à la typologie des pathologies qui y sont associées (Figure 1).

En plus du stade de la grossesse, le poids à la naissance est un autre paramètre influant sur le risque de survenue des PC. Le poids de naissance n'est pas toujours dépendant du terme

et, de la même façon que ce dernier, les nouveau-nés peuvent être classés en plusieurs groupes en fonction de ce poids de naissance. Ainsi, si l'on se réfère à une courbe représentant l'indice de masse corporelle en fonction de l'âge gestationnel, un enfant est considéré d'un poids normal à la naissance s'il est compris entre le 10ème et le 90ème percentile, un enfant est considéré hypotrophe s'il possède un poids à la naissance inférieur au 10ème percentile et est considéré comme macrosome s'il possède un poids à la naissance supérieur au 90ème percentile (Olsen et al., 2015). Une autre classification est couramment utilisée dans laquelle quatre classes de poids ont été identifiées : un poids à la naissance supérieur à 2500 g est considéré comme la norme (*normal birthweight*), un poids entre 1500 et 2499 g est considéré comme un petit poids de naissance (*moderately low birthweight*), un poids entre 1000 et 1499 g est considéré comme un très petit poids de naissance (*very low birthweight*) et finalement un poids inférieur à 1000 g est considéré comme un poids de naissance extrêmement bas (*extremely low birthweight*). La prévalence des PC dans ces différentes classes est respectivement de 0,1 %; 0,6 %; 3,6% et 4,2 % naissances vivantes (Sellier et al., 2016).

Les déficits associés à la PC sont durables et ont une incidence négative sur le devenir à long terme des patients, se traduisant notamment par un taux élevé d'échec scolaire ainsi que des difficultés importantes d'insertion sociale (Doyle et al., 2015). Le coût de la prise en charge tout au long de la vie de l'individu, additionné au coût entrainé par les déficits d'insertion ont été estimés, au Danemark, entre 800 000 et 860 000 euros par patient (Kruse et al., 2009). Des données similaires sont données pour les États-Unis avec un coût total de plus de 900 000 dollars par individu (Shih et al., 2018). Ces chiffres impressionnants, montrent que la recherche de stratégies de neuroprotection en période périnatale ainsi que l'amélioration de la prise en charge précoce mettant à profit la plasticité cérébrale, constituent des enjeux majeurs de santé publique.

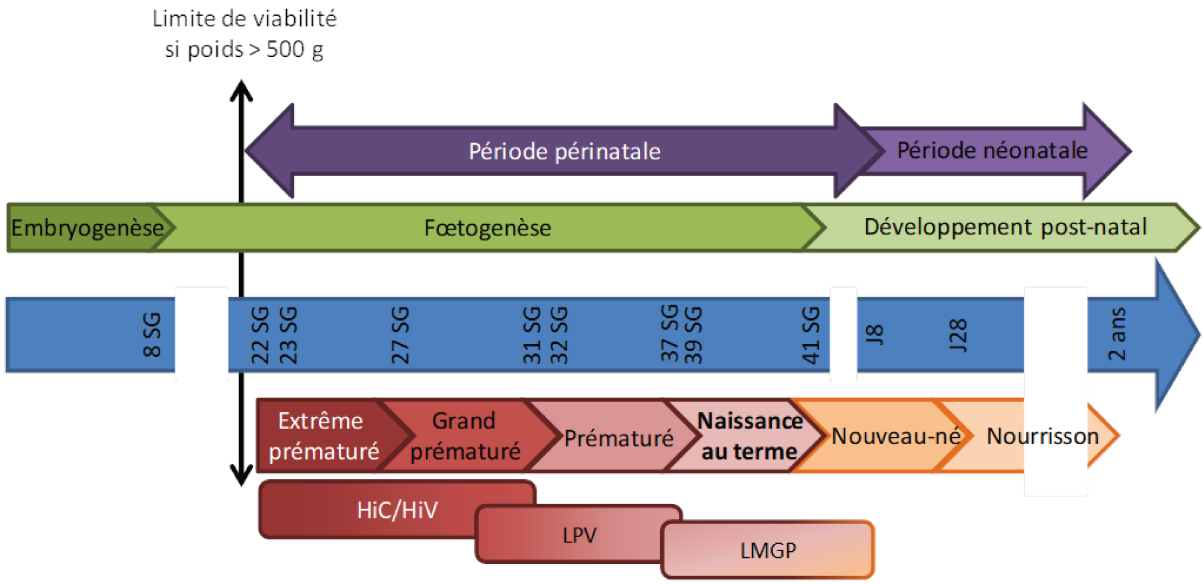


Figure 1 : Évolution des types de lésions cérébrales acquises en période périnatale selon le stade de développement et/ou l'âge gestationnel à la naissance.
Mise en parallèle du développement péri et post-natal, des degrés de prématurité et de l'apparition des lésions cérébrales acquises en périodes périnatales ; HiC/HiV : hémorragies intracérébrales/hémorragies intraventriculaires ; J : jour post-natal ; LMGP : lésions de la matière grise profonde ; LPV : leucomalacie périventriculaire ; SG : semaines de gestation.

2. Les facteurs de risque associés à l'apparition des lésions cérébrales acquises en période périnatale

a. La prématurité

Le facteur de risque prépondérant associé à l'apparition des lésions cérébrales acquises en période périnatale (LCPP) et des PC est la prématurité. La naissance prématurée entraîne une rupture brutale du fœtus avec son environnement maternel. Cette séparation entraîne des problèmes de régulation du flux sanguin cérébral (FSC) dus à l'immaturité du système cardio-respiratoire ainsi qu'à une autorégulation peu efficace, une sensibilité accrue de certaines populations neuronales à des déficits énergétiques et/ou en nutriments (les populations immatures d'oligodendrocytes semblent principalement concernées) mais également à un sevrage précoce des facteurs maternels indispensables à la croissance du fœtus (facteurs de croissance, anticorps …). Dans la population des prématurés, le taux de PC est 10 fois plus élevé que dans la population des enfants nés à terme (Moster et al., 2008).

Le risque de naissance prématurée et/ou avec un petit poids de naissance est accru pour les grossesses multiples, qui font généralement l'objet d'un suivi attentif dans les services de pédiatrie néonatale. L'extraction prématurée du fœtus de son environnement

maternel (césarienne), nécessaire dans un contexte de retard de croissance *in-utero,* est une autre cause de prématurité, à laquelle s'ajoute les circonstances d'une souffrance fœtale due au dysfonctionnement placentaire, à un problème maternel (nutritionnel, toxique) ou à des problèmes spécifiques liés à la grossesse gémellaire (syndrome transfuseur-transfusé).

b. Les phénomènes inflammatoires

Les phénomènes inflammatoires, souvent représentés par des infections materno-fœtales, sont à l'origine d'accouchements prématurés spontanés ou provoqués. Les inflammations intra-utérines, et notamment la chorioamniotite, sont des facteurs de risque associés au développement de PC, de leucomalacie périventriculaire (LPV), d'hémorragie intracérébrale / intraventriculaire (HiC/HiV) ainsi que d'entérocolite nécrotique (Ancel et al., 2005; Been et al., 2013; Wu and Colford, 2000). Les infections materno-fœtales peuvent également être dues à des virus (Cytomégalovirus, Herpès) ou des parasites (Toxoplasmose). Les bactéries ou les médiateurs de l'inflammation peuvent passer la barrière du placenta et atteindre la circulation et le cerveau fœtal, provoquant des lésions. Ces lésions peuvent aussi bien être pulmonaires que cérébrales avec notamment des lésions de type LPV (Adams Waldorf and McAdams, 2013; Boyle et al., 2017). Dans un contexte inflammatoire, les lésions sont majoritairement dues à une atteinte spécifique des oligodendrocytes immatures ainsi qu'à une activation de la microglie (Li et al., 2008; Mallard et al., 2003; Rousset et al., 2006), pouvant entraîner la mort neuronale par une induction des phénomènes excitotoxiques et de stress oxydant.

c. Les phénomènes d'hypoxie-ischémie

Les phénomènes d'hypoxie-ischémie (HI) en période néonatale sont largement décrits comme inducteurs de LCPP (Khwaja and Volpe, 2008; Novak et al., 2018a). Il en a découlé la nomenclature d'encéphalopathie hypoxo-ischémique, largement utilisée mais qui est cependant sujette à débat (Dammann et al., 2011; Gilles et al., 2018). En effet, malgré les nombreuses études cliniques menées, la preuve que les phénomènes hypoxo-ischémiques (séparés ou combinés) sont à l'origine des LCPP n'est pas unanimement admise et la nomenclature doit rester autant que possible descriptive des symptômes et non pas des causes. Certains auteurs plaident donc pour que la nomenclature HIE (*hypoxia-ischemia*

encephalophathie) soit remplacée par le terme plus général d'encéphalopathie du nouveau-né (Gilles et al., 2018).

Chez le nouveau-né à terme, l'évènement hypoxo-ischémique principal lié à l'apparition des encéphalopathies est l'asphyxie périnatale. Chez le prématuré, cette cascade peut être la conséquence d'un syndrome de détresse respiratoire ou d'une infection ce qui pourrait expliquer le manque de lien univoque entre asphyxie périnatale et PC (Kułak et al., 2010).

Si les facteurs inducteurs d'hypoxie-ischémie globale ne sont pas toujours faciles à identifier, de nombreux liens sont cependant établis entre des phénomènes inflammatoires, de fluctuations du FSC et des évènements focaux d'hypoxie, d'ischémie au niveau tissulaire (Khwaja and Volpe, 2008).

d. L'exposition *in utero* à des composés toxiques

L'exposition du fœtus à des facteurs chimiques exogènes est fortement associée à l'apparition de LCPP. Ces expositions surviennent principalement *via* une exposition maternelle. Des composés toxiques ingérés par la femme enceinte peuvent passer la barrière placentaire et agir ainsi directement sur le fœtus, voire passer la barrière hémato-encéphalique (BHE) du cerveau du fœtus et y exercer des effets délétères. Outre les effets directs de molécules accédant au cerveau du fœtus, l'exposition de la mère à des toxines retentit indirectement sur l'enfant *via* des altérations du métabolisme maternel et en particulier des dysfonctionnements placentaires. Les composés délétères les plus répandus sont notamment l'alcool et la nicotine (en association avec d'autres facteurs délétères comme le monoxyde de carbone *via* le tabagisme maternel) (Baldacci et al., 2018; Gupta et al., 2016). Dans certains pays la consommation de cocaïne, largement répandue, représente un problème de santé publique plus que l'alcool ou le tabagisme (Concheiro et al., 2017; Oliveira et al., 2016). L'exposition à ces toxines a fait l'objet de nombreux protocoles de recherche clinique et préclinique qui ne seront cependant pas développés plus avant dans ce manuscrit.

e. Les accidents traumatiques

L'accident traumatique cérébral en période périnatale, ou syndrome du « bébé secoué », et un autre facteur de risque lié à l'apparition de LCPP et des handicaps associés, et cela majoritairement chez les enfants de moins de 1 an/5 ans en fonction des descriptions

(Joyce and Huecker, 2018; Vitale et al., 2012). Le traumatisme conduit principalement à des phénomènes d'HI ainsi qu'à un œdème cérébral. Les phénomènes d'HI résultent d'une hypertension, avec une chute de la pression de perfusion et/ou une apnée pouvant provenir d'une lésion de la moëlle épinière mais peuvent également être la conséquence de thromboses primaires (Vinchon, 2017). Ces différents évènements peuvent intervenir de façon isolée ou bien simultanée, potentialisant leurs effets délétères. Les accidents traumatiques sont souvent accompagnés de nombreux sous-types d'hémorragies et principalement d'hémorragies rétiniennes ou sous-durales (Nadarasa et al., 2014; Squier, 2011).

f. Synthèse

Par commodité les différents facteurs de risque décrits ont été séparés, il est cependant à noter que les phénomènes inflammatoires et d'HI sont rarement des phénomènes isolés et qu'ils agissent souvent en synergie, se potentialisant l'un l'autre et favorisant ainsi l'apparition des LCPP (Volpe et al., 2011). De plus, si deux facteurs de risque tels que l'inflammation et l'HI, pris séparément ou ensemble, sont délétères, ils le sont majoritairement *via* des mécanismes communs que sont l'excitotoxicité et le stress oxydant (Novak et al., 2018a);(Figure 2). Une description des mécanismes moléculaires mis en jeu lors de la cascade excitotoxique liée au glutamate est présentée en Figure 3. Au niveau neuronal, la libération massive et incontrôlée du glutamate, associée à l'inactivation par manque d'ATP de ses systèmes de recapture, provoquent une accumulation du neurotransmetteur dans le milieu extracellulaire. La suractivation des récepteurs ionotropiques et métabotropiques entraîne une augmentation de la concentration calcique intracellulaire à l'origine des dommages cellulaires, pouvant conduire à une mort cellulaire de type nécrotique (mort immédiate) ou apoptotique (mort programmée, retardée).

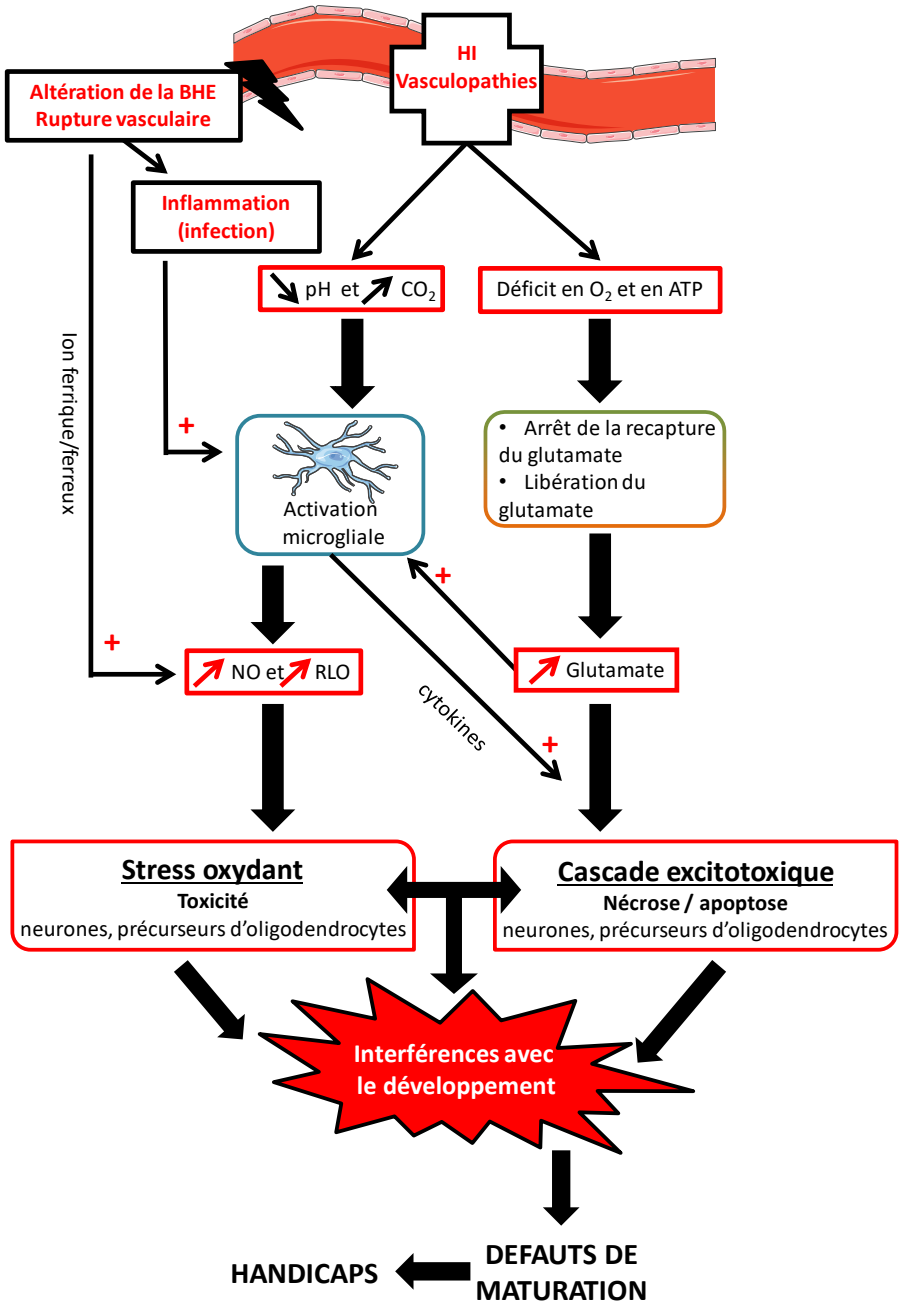


Figure 2 : Principaux processus à l'origine des lésions cérébrales acquises en période périnatale.
BHE : barrière hémato-encéphalique, HI : hypoxie-ischémie, NO : nitric oxyde ou oxyde d'azote, RLO : radicaux libres oxygénés, + : amplification/effet synergique.

3. Lésions cérébrales acquises en période périnatale et handicaps associés

L'EN résulte de lésions cérébrales acquises durant la période périnatale (LCPP). En effet, de nombreux types d'évènements survenant au cours de la gestation peuvent induire l'apparition des LCPP. La nature de ces évènements mais également l'âge gestationnel lors de leur survenue, déterminent le type de lésion en interférant avec des processus

neurodéveloppementaux différents en fonction de l'âge. Les lésions tissulaires ont deux types d'impacts ; un impact aigu correspondant aux altérations structurales et/ou fonctionnelles des cellules cérébrales, pouvant mener à leur mort et conduisant à l'apparition de cicatrices ; un impact retardé correspondant aux conséquences observées à plus long terme et qui résultent ; de l'absence, d'anomalies de positionnement, d'anomalies de différenciation et/ou de connexion de populations cellulaires atteintes en phase aiguë ou générées ultérieurement, donnant corps au concept de « dysmaturation » (Back and Miller, 2014). Volpe avait ainsi défini les lésions cérébrales périnatales comme un amalgame complexe de perturbations destructrices et de perturbations du neurodéveloppement (Volpe, 2009).

Dans le spectre continu des lésions et séquelles dépendant de l'âge de survenue on peut distinguer trois grandes classes de lésions : ***i)*** les hémorragies qui affectent principalement les extrêmes prématurés ; ***ii)*** les leucomalacies périventriculaires (LPV) qui affectent principalement les nouveau-nés avant 37 SG et ; ***iii)*** les lésions de la matière grise profonde (LMGP) qui affectent principalement les nouveau-nés à terme. Ainsi, la nature des séquelles résulte de la combinaison des effets précoces et de leur(s) interaction(s) avec le développement.

a. Hémorragies intracérébrales / hémorragies intraventriculaires

Les HiC/HiV font partie des évènements délétères responsables des LCPP. Ces hémorragies sont observées essentiellement chez les extrêmes/grands prématurés avec un terme de naissance <27 SG et/ou un poids de naissance <750g (Ballabh, 2010). La mortalité des enfants avec HiC/HiV se situe entre 30 et 60% (Tsai et al., 2014) et les survivants présentent un risque élevé de développer des déficits cognitifs et/ou moteurs avec notamment un risque de PC de plus de 30% (Bolisetty et al., 2014; Brouwer et al., 2008).

Les HiC / HiV sont observées principalement dans le cervelet et au niveau de la matrice germinative (MG);(Figure 4) sous ventriculaire, une région cérébrale richement vascularisée dans laquelle sont générés les précurseurs des populations neuronales et gliales. L'étiologie des HiC/HiV est multifactorielle, complexe et hétérogène. Trois grands axes pathogéniques se dégagent ***i)*** la fragilité structurale des vaisseaux sanguins de la MG, ***ii)*** les fluctuations du FSC fréquentes chez les enfants de moins de 30 SG, ***iii)*** les pathologies de la coagulation chez la mère ou l'enfant (Ballabh, 2014).

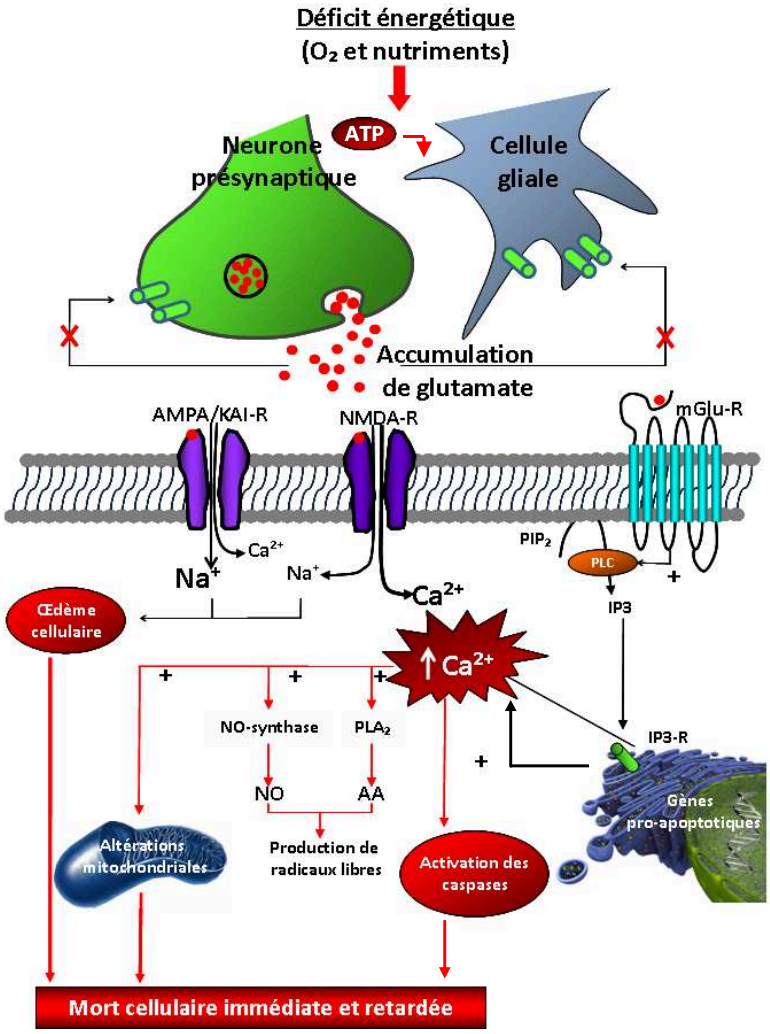


Figure 3 : Mécanismes moléculaires mis en jeu lors d'une cascade excitotoxique

.• : Glutamate ; X : inhibition ; + : effet stimulateur ; AA : acide arachidonique ; AMPA/KAI-R : récepteur α-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole-propionate/kaïnate du glutamate ; ATP : adénosine triphosphate ; Ca^{2+} : calcium; IP3 : inositol triphosphate ; IP3-R : récepteur de l'inositol triphosphate ; Na^{+} : sodium ; NMDA-R : récepteur N-méthyl-D-aspartate du glutamate ; NO : monoxyde d'azote ; mGlu-R : récepteur métabotropique du glutamate ; PIP_2 : phosphatidylinositol biphosphate ; PLA_2 : phospholipase A_2 ; PLC : phospholipase C. Les flèches noires reflètent les voies classiquement associées à la transmission glutamatergique et dont la dérégulation aboutira à l'induction d'un processus excitotoxique (flèches rouges).

Les populations de précurseurs neuronaux et gliaux ont une forte demande énergétique pour assurer leur prolifération, leur migration ou leur maturation. Cette demande est soutenue par une vascularisation très dense et en constante évolution au niveau de la MG, montrant une angiogenèse intense sous contrôle du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) et de l'angiopoïétine-2 (Ballabh et al., 2007). De ce fait, le réseau vasculaire de la MG est bien plus dense qu'au niveau du cortex cérébral ou de la substance blanche (Ballabh et al., 2004a). Il possède des caractéristiques particulières, parmi lesquelles: des taux bas de fibronectine dans la lame basale (LB) comparés aux vaisseaux du cortex ou la substance blanche, une couverture péricytaire moindre (Braun et al., 2007) et une faible expression de

la *Glial Fibrilary Acidic Protein* (GFAP) par les astrocytes. Ces deux derniers éléments cellulaires, qui contribuent à l'établissement de la BHE, sont aussi responsables de la cohésion des cellules des vaisseaux par leur action sur l'expression des protéines de jonction intercellulaire et d'adhésion ainsi que sur la sécrétion des éléments de la LB. Ces spécificités contribuent à la fragilité spécifique du réseau vasculaire de la MG face à des fluctuations du FSC, en particulier.

Les fluctuations hémodynamiques sont fréquentes chez l'extrême prématuré et de nombreux évènements sont à leur origine. Parmi eux : le syndrome de détresse respiratoire (Perlman et al., 1983, 1985), les phénomènes d'hypoxie, l'inflammation et les infections materno-fœtales, la déshydratation ou encore un travail prolongé lors de l'accouchement (Ballabh, 2010).

Concernant les pathologies de la coagulation, il est depuis longtemps démontré que la thrombocytopénie est un facteur de risque lié à l'apparition d'HiC/HiV, tout comme des mutations du facteur V de Leiden, du PAI-1 (*plasminogen activator inhibitor 1*) ou de la prothrombine. D'autres mutations, notamment sur des facteurs liés à l'inflammation tels que TNFα (*tumor necrosis factor alpha*), IL-6 (interleukine 6), eNOS, IL1β, ou des facteurs constituant la LB endothéliale, comme le collagène IV, ont été identifiés comme variants de susceptibilité potentielle aux HiC/HiV (Gould et al., 2005; Harding et al., 2005, 2004; Heineking et al., 2003; Szpecht et al., 2017).

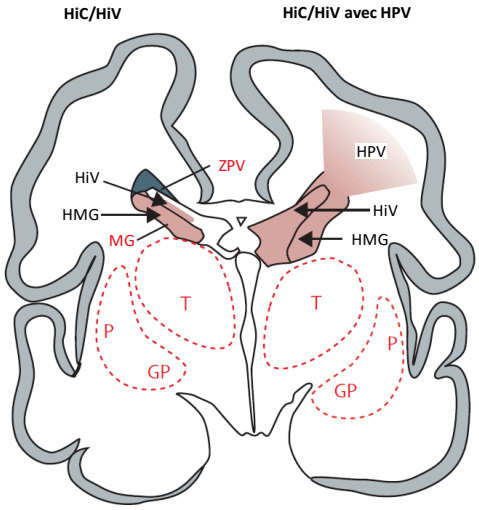


Figure 4 : Localisations principales des hémorragies intra-cérébrales (HiC) et intra-ventriculaires (HiV) avec ou sans hémorragie périventriculaire (HPV) du nouveau-né grand/extrême prématuré.
Illustration d'une coupe coronale d'un cerveau d'enfant à 28 SG. HMG : hémorragie de la matrice germinale ; ZPV : zone périventriculaire ; MG : matrice germinative ; T : thalamus ; P : putamen ; GP : globus palidus. D'après Volpe., 2009.

L'hémorragie passe par une rupture vasculaire. Celle-ci a pour conséquence ***i)*** une ischémie par arrêt de la perfusion ou par compression tissulaire, responsable de l'activation des processus de mort cellulaire et d'inflammation médiée par la microglie, ***ii)*** un épanchement sanguin dans le parenchyme cérébral, inducteur de toxicité et d'inflammation par extravasation de facteurs sanguins tels que les ions ferreux, des protéines et des métabolites sériques ainsi que des cellules circulantes (Figure 2). Cet épanchement peut s'étendre aux ventricules cérébraux. Les phénomènes de mort cellulaire et d'inflammation sont des facteurs importants de l'apparition des lésions. Cependant, l'épanchement sanguin dans le parenchyme joue un rôle prépondérant dans l'apparition des lésions dues aux HiC/HiV. Cela est principalement dû au stress oxydant induit par les ions fer non liés à l'hémoglobine ainsi qu'à la faible capacité du cerveau immature à lutter contre ce stress oxydant (Miller et al., 2012).

La conséquence principale des HiC/HiV est la dilatation ventriculaire consécutive à l'hémorragie pouvant mener à l'hydrocéphalie, cette dernière étant de mauvais pronostic. La dilatation des ventricules cérébraux est due à une accumulation de liquide céphalo-rachidien (LCR). Le LCR est majoritairement produit par les plexus choroïdes des ventricules latéraux ainsi que par les plexus choroïdes du toit du quatrième ventricule. Son accumulation à souvent pour origine un défaut de réabsorption induit par un feutrage des parois ventriculaires et/ou la présence de microthrombi dans les canaux de réabsorption du LCR (Whitelaw, 2012). L'hydrocéphalie entraîne une augmentation de la pression intracrânienne pouvant mener à une ischémie (par compression du réseau vasculaire) ainsi qu'à une rupture vasculaire secondaire par mort des cellules endothéliales. En cas d'ischémie par surpression, la substance blanche est principalement atteinte avec une perte de précurseurs oligodendrocytaires (conduisant à des déficits ultérieurs de myélinisation) et des interruptions de connexions thalamo-corticales (Kostović et al., 2014; Sheikh et al., 2019). D'autres effets de l'hémorragie semblent passer par des altérations de la prolifération et de la migration des interneurones GABAergiques tardifs, destinés à coloniser les couches superficielles du cortex cérébral et le thalamus depuis la zone sous ventriculaire (ZSV) et les éminences ganglionnaires (EG) (Volpe, 2009). Ces altérations corticales et de la substance blanche sont comparables à celles qui sont observées lors de leucomalacies périventriculaires (LPV ; cf. chapitre suivant). En effet, plusieurs études cliniques montrent que les HiC/HiV sont rarement des anomalies

isolées dans le cerveau de l'enfant prématuré. Elles sont souvent la cause de LPV, d'hydrocéphalie ainsi que de nécroses corticales ou du cervelet (Armstrong et al., 1987; Dammann and Leviton, 1997; Larroque et al., 2003). Ces LPV consécutives aux HiC/HiV semblent découler de la présence d'hémoglobine extracellulaire dans la substance blanche périventriculaire (Ley et al., 2016). En effet, une fois que les érythrocytes passés dans le parenchyme sont lysés, l'hémoglobine est libérée et est rapidement oxydée d'hémoglobine ferreuse ($Fe2^{+}$) en hémoglobine ferrique ($Fe3^{+}$), ce qui permet la libération du groupement hème de l'hémoglobine (Bunn and Jandl, 1968; Gram et al., 2013; Umbreit, 2007). L'hème fait partie des ROS et peut entraîner des dommages lipidiques, protéiques ou encore de l'ADN par son activité oxydative. Il est également lipophile et peut s'intercaler dans les membranes cellulaires pour y exercer des effets toxiques de cytolyse dus au moins à ses propriétés oxydantes (Kumar and Bandyopadhyay, 2005; Wagener et al., 2001).

b. Leucomalacies périventriculaires

Les LPV touchent majoritairement les enfants nés prématurés plutôt que les enfants nés à terme (Bax et al., 2006; Van den Broeck et al., 2008).

La LPV est décrite comme une atteinte de la substance blanche classiquement séparée en deux classes principales : les lésions focales et les lésions diffuses (Figure 5);(Volpe, 2009).

- Les lésions focales se situent majoritairement au niveau de la substance blanche profonde dite périventriculaire et consistent en des zones de nécrose visibles lors de l'échographie transfontanellaire (zones macroscopiques de nécrose ; LPV kystique). Les lésions peuvent également être invisibles ou diffuses lors de l'échographie (zones microscopiques de nécrose ; LPV non-kystique). Les lésions kystiques ont cependant quasiment disparues en France depuis l'usage prophylactique systématique de corticoïdes.
- Les lésions diffuses sont caractérisées par une astrogliose et une microgliose consécutives à une perte de précurseurs oligodendrocytaires (Haynes et al., 2003).

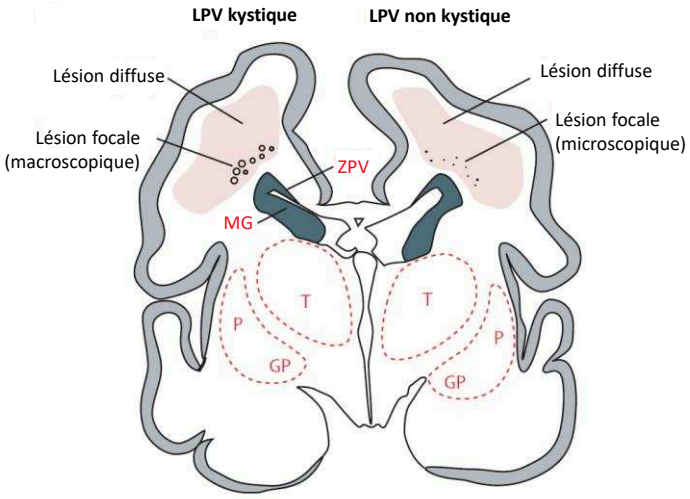


Figure 5 : Distribution des leucomalacies périventriculaires (LPV) du nouveau-né prématuré.
Coupe coronale d'un cerveau d'enfant à 28 SG. ZPV : zone périventriculaire ; MG : matrice germinative ; T : thalamus ; P : putamen ; GP : globus palidus. D'après Volpe., 2009.

La population cellulaire majoritairement atteinte lors des LPV est la population oligodendrocytaire (Back et al., 2002, 2005). Les oligodendrocytes sont les cellules myélinisantes du système nerveux central (SNC) et leur développement passe par quatre stades de maturation : ***i)*** progéniteurs, ***ii)*** pré-oligodendrocytes, ***iii)*** oligodendrocytes pré-myélinisants et ***iv)*** oligodendrocytes matures. Entre 32 et 37 SG, les oligodendrocytes sont majoritairement aux stades de pré-oligodendrocytes et oligodendrocytes pré-myélinisant (Back et al., 2001), c'est aussi la période critique de survenue des LPV. L'atteinte de ces populations oligodendrocytaires immatures se traduit soit par la mort cellulaire, soit par une perte des prolongements sans mort cellulaire et par un arrêt de la différenciation au stade d'oligodendrocyte pré-myélinisant (Billiards et al., 2008; Segovia et al., 2008). Ces atteintes sont dues à l'activation spécifique de récepteurs du glutamate de type *α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid* (AMPA) et *N-methyl-D-aspartate* (NMDA) dans un contexte d'excitotoxicité avec accumulation du glutamate extracellulaire (Figure 2). De plus, une activation de la réponse inflammatoire survient, avec la production de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNFα, l'IL-6, l'IL-1ß ou l'interferon gamma par les cellules microgliales activées (Kaur and Ling, 2009). Ces cellules microgliales activées, expriment également la forme inductible de la NO *(Nitric Oxide)* synthase et produisent des radicaux libres oxygénés (ROS). L'action des ROS entraîne la formation de produits toxiques pour les pré-oligodendrocytes (Haynes et al., 2003, 2005; Li et al., 2005).

Une autre population cellulaire spécifiquement touchée par la LPV est la population des neurones GABAergiques. Ces neurones migrent tardivement à travers la substance blanche, la plaque sous corticale et la voie de migration piale lors du 3ème trimestre (Anderson et al., 1997, 2001b). Robinson et ses collaborateurs ont montré une diminution du nombre de ces neurones GABAergiques dans la substance blanche, dans la plaque sous corticale ainsi que dans le cortex de fœtus porteurs de lésions cérébrales périnatales de la substance blanche (Robinson et al., 2006). De fait, la perturbation expérimentale de la mise en place de neurones GABAergiques chez la Souris entraîne des déficits similaires à ceux observés chez les enfants ayant souffert de lésions périnatales, avec notamment des épilepsies spontanées (Powell et al., 2003).

De nombreuses revues mettent en évidence que les causes principales d'apparition de LPV sont les phénomènes ischémiques et les infections/inflammations périnatales d'origine maternelle ou de l'enfant (Volpe, 2009; Deng, 2010; Lee, 2017; Novak et al., 2018b). Ces deux phénomènes, intervenant séparément ou bien de façon synergique, sont responsables d'une activation de la microglie, productrice de cytokines pro-inflammatoires, de radicaux libres oxygénés ainsi que de NO (Figure 2) pouvant affecter la population oligodendrocytaire immature particulièrement sensible (Haynes et al., 2009; Pleasure et al., 2006; Wang et al., 2010). Malgré cette sensibilité élevée des oligodendrocytes, d'autres structures cérébrales sont impactées par la LPV telles que plusieurs aires corticales (frontale, occipitale, temporale) et l'hippocampe (Isaacs et al., 2000; Kesler et al., 2004, 2004; Robinson et al., 2006; Thompson et al., 2008). Cependant, il est difficile de déterminer si ces altérations non oligodendrocytaires des cerveaux de fœtus sont secondaires aux atteintes primaires des oligodendrocytes, ou sont des phénomènes indépendants.

c. Lésions cérébrales de l'enfant né à terme

Chez les enfants nés à terme, les atteintes cérébrales concernent préférentiellement les ganglions de la base et le thalamus (Figure 6). Dans ces structures, 18 à 39% des lésions observées résultent de phénomènes d'HI (Roland et al., 1998; Van den Broeck et al., 2008). Les ganglions de la base sont un ensemble de structures sous corticales comprenant notamment le striatum (noyau caudé / putamen), le globus pallidus, la substance noire ainsi que les noyaux sous thalamiques. Cet ensemble de structures participe au contrôle et à la régulation des mouvements volontaires, aux processus d'apprentissage procédural et

également à la cognition et aux émotions. D'un point de vue fonctionnel, les ganglions de la base reçoivent et établissent des connexions avec le cortex cérébral, le thalamus et la moëlle épinière. Ces caractéristiques font aussi des ganglions de la base une région richement vascularisée, à forte dépendance énergétique et donc hautement sensible à tous processus restreignant l'apport énergétique.

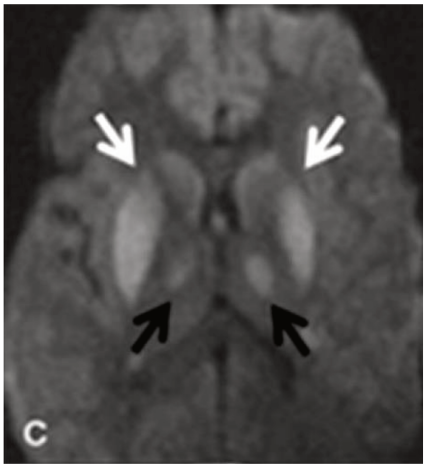


Figure 6 : Visualisation par IRM des atteintes des ganglions de la base.
Coupe axiale d'un cerveau d'enfant né à terme. Illustration en imagerie par résonance magnétique (IRM) par séquence T2-W d'un hypersignal bilatéral localisé au niveau du striatum (noyau caudé / putamen);(flèches blanches) et du noyau ventrolatéral du thalamus (flèches noires). D'après Quattrochi et al., 2013.

Du fait de cette dépendance énergétique des ganglions de la base, la survenue d'hypoxie aiguë ou d'ischémie est le facteur de risque majoritairement associé à l'apparition de lésions cérébrales chez l'enfant né à terme (McQuillen and Ferriero, 2004; Van den Broeck et al., 2008; Zuccoli et al., 2015). Les évènements hypoxo-ischémiques sont les moments où la demande aérobique et énergétique des neurones du parenchyme cérébral n'est pas satisfaite. Si cette situation perdure, cela entraîne une mort cellulaire : les populations neuronales sont particulièrement vulnérables du fait de leur forte consommation énergétique, de leur dépendance au glucose et de leur absence de réserve de glycogène. Cependant, d'autres types cellulaires peuvent être atteints ; les oligodendrocytes (cf. LPV) et les cellules des vaisseaux sanguins. Plusieurs contextes cliniques peuvent entraîner l'apparition de ces déficits, tels que l'arrêt cardiaque ou respiratoire, l'asphyxie à la naissance, l'accident vasculaire cérébral, l'hypoglycémie, l'hyponatrémie, l'hyperbilirubinémie ou encore les infections de type entérocolite (pour revue Shepherd et al., 2018).

Lors d'un épisode hypoxo-ischémique périnatal au niveau central, la déplétion énergétique provoque une cascade d'évènements incluant un relargage massif de glutamate extracellulaire, une activation du récepteur NMDA, la production de NO par la nNOS. Cet ensemble entrainant un stress oxydant et une mort neuronale (Vexler and Ferriero, 2001). Cet ensemble d'évènements décrit comme l'excitotoxicité (Figure 3) a été conceptualisé chez l'adulte et dépend notamment de la recapture du glutamate en excès, principalement assurée par les astrocytes (Lipton and Rosenberg, 1994; Olney, 1986). Or, les populations astrocytaires sont mises en place de façon retardée par rapport aux populations neuronales, privant ainsi le tissu cérébral immature d'un moyen d'homéostasie glutamatergique comparé à l'adulte.

d. Handicaps associés aux lésions cérébrales acquises en période périnatale

La PC est le plus souvent renseignée dans les études cliniques concernant la prématurité du fait qu'elle représente la plus commune des invalidités motrices chez l'enfant. Les récentes méta-analyses publiées sur l'épidémiologie des PC permettent de faire une synthèse convergent vers quelques points phares : ***i)*** les progrès en réanimation néonatale ont permis une diminution de la mortalité pour les enfants nés avant 32 SG et/ou avec un poids de naissance inférieur à 1500 g, ***ii)*** l'augmentation de ces naissances viables entraîne paradoxalement une augmentation du nombre de PC pour cette catégorie, ce qui empêche une diminution franche de la fréquence globale des PC, malgré une tendance à la diminution sur ces dernières années, ***iii)*** la prévalence des PC est inversement proportionnelle au terme de naissance (Tableau 1) et au poids de naissance (Oskoui et al., 2013; Pascal et al., 2018; Sellier et al., 2016; Shepherd et al., 2018; Smithers-Sheedy, 2016).

Les premières définitions de la PC ne prenaient en compte que les déficits moteurs. Les définitions plus récentes (début des années 2000) ont été élargies par l'ajout de déficits sensoriels, cognitifs, de la communication et du comportement (Bax et al., 2005; Morris, 2007; Rosenbaum et al., 2007; Richards and Malouin, 2013). En effet, 31% des enfants avec une PC présentent des déficits intellectuels sévères et 11% ont des déficits visuels sévères. Enfin, 21% sont sujets à des épilepsies (O'Shea, 2008).

Ces déficits non moteurs ne sont cependant pas spécifiquement associés à la PC. En effet, la prématurité en elle-même, est associée à une baisse du quotient intellectuel (Madzwamuse et al., 2015). De même, l'extrême prématurité (<28 SG) entraîne des déficits cognitifs chez 25% de ces enfants alors que « seulement » 11% sont atteint de PC

(Hirschberger et al., 2018). Le terme d'encéphalopathie néonatale intègre l'ensemble des déficits qui peuvent être induits mais ne classifie pas les tableaux cliniques à elle seule.

Etudes / Pays	Années de naissance	Prévalence de la paralysie cérébrale selon le terme de naissance (pour 1000 enfants nés vivants)				
		Total	Extrêmes Prématurés	Grands Prématurés	Prématurés	Nés à terme
Hagberg et al. 1996 / Suède	1987-1990	**2,3‰**	80‰	54‰	8‰	1,4‰
Hagberg et al. 2001 / Suède	1991-1994	**2,1‰**	78,5‰	60,4‰	6,2‰	1,2‰
Himmelmann et al. 2005 / Suède	1995-1998	**1,9‰**	76,5‰	40,4‰	6,6‰	1,1‰
Himmelmann et al. 2010 / Suède	1999-2002	**2,2‰**	55,6‰	43,7‰	6,1‰	1,4‰
Himmelmann et al. 2014 / Suède	2003-2006	**2,2‰**	71,4‰	39,6‰	6,4‰	1,4 ‰
Ravn et al. 2010 / Danemark	1983-1986	**2,2‰**	112,4‰	14‰	29,1‰	1,5‰
	1987-1990		79,8‰	8,7‰	19,5‰	1,5‰
	1991-1994		56,7‰	7,9‰	15,6‰	1,1‰
	1995-1998		47,9‰	6,2‰	13‰	1,4‰
Smith et al. 2008 / Canada	1991-1995	**2,7‰**	52,3‰	67,5‰	10,8‰	1,8‰
Petrini et al. 2009 / USA	2000-2004	**2,5‰**	/	17,7‰	7,3‰	2‰

Tableau 1 : Prévalence de la paralysie cérébrale en fonction du terme de naissance.
Valeurs pour 1000 naissances vivantes ; adapté de Oskoui et al., 2013

4. Prise en charge clinique et thérapies actuelles

A l'heure actuelle, il n'existe malheureusement pas de stratégie neuroprotectrice curative et seulement peu de stratégies préventives des PC faisant consensus. Plusieurs stratégies préventives de neuroprotection ont été développées et sont en cours d'évaluation. Elles concernent la prise en charge différenciée des enfants nés prématurés ou nés à terme présentant un tableau clinique de LCPP ou à risque. Elles ont pour but de prévenir et/ou de limiter la gravité des handicaps (Marret et al., 2008).

En effet, nous savons que les phénomènes délétères inducteurs de lésions et/ou de handicaps durables interviennent précocément pendant le développement fœtal et néonatal. Le fait qu'une part souvent importante de leurs effets passe par des interactions avec les

processus normaux de neurodéveloppement, rend primordial une action précoce : en prévention dans des groupes à risque, en traitement lors d'évènements potentiellement délétères avérés. Cependant, dans les traitements préventifs apportés à des patients à risque, il faut éviter d'interférer avec le neurodéveloppement, en particulier dans des groupes ou le risque est très inférieur à 100%. Dans les cas de phénomènes pathologiques avérés mais non systématiquement délétères, il faudra éviter d'ajouter des effets indésirables. L'art consiste donc à évaluer la balance bénéfices/risques de ces situations.

a. L'hypothermie

L'hypothermie modérée, qu'elle soit du corps entier ou sélective de la tête, est devenue un standard de la prise en charge des nouveau-nés suite à une atteinte de type hypoxo-ischémique chez l'enfant à terme ou proche du terme (Gonzalez and Ferriero, 2009). La neuroprotection semble la plus efficace pour des températures d'hypothermie situées entre 33 et 34 °C avec un début de prise en charge dans les six premières heures de vie et une durée maximum de 72h (Shankaran et al., 2002). Une méta-analyse de 2017 incluant plus de 1800 enfants atteints d'encéphalophie hypoxo-ischémique (HIE) montre que l'hypothermie permet de diminuer de façon significative, à un délai de 12 à 24 mois : ***i)*** la mortalité, ***ii)*** les déficits développementaux majeurs, ***iii)*** le taux de PC, ***iv)*** les déficits neuromoteurs ainsi que, ***v)*** les déficits auditifs et visuels (Zhang et al., 2017). De plus, les bénéfices de l'hypothermie néonatale observés à 2 ans semblent perdurer à 6-7 ans (Azzopardi et al., 2014). Il a cependant été montré qu'il y a un risque augmenté de thrombocytopénie et d'arythmie cardiaque au cours de l'hypothermie (Zhang et al., 2017).

Les mécanismes neuroprotecteurs supposément mis en jeu par l'hypothermie sont nombreux. En effet, l'hypothermie permet de diminuer en premier lieu le métabolisme énergétique et la libération de glutamate (Wassink et al., 2014). Cet effet global entraîne secondairement une diminution de l'activation de la caspase 3 (effecteur de la mort apoptotique) ainsi qu'une diminution de l'activation microgliale, de la libération de NO et donc, plus globalement des phénomènes inflammatoires induits par les phénomènes d'HI, fortement corrélés à l'apparition des lésions cérébrales chez le nouveau-né (Barrett et al., 2007; Orrock et al., 2016; Webster et al., 2009). La prévention de ces différents évènements (notamment la sécrétion de NO) permet de préserver la BHE et de limiter l'œdème cérébral.

b. Le sulfate de magnésium

Le sulfate de magnésium ($MgSO_4$) est utilisé depuis de nombreuses années en obstétrique. Il est administré à la femme enceinte atteinte de prééclampsie ou d'éclampsie. Il a ensuite été utilisé pour ses propriétés tocolytiques supposées, bien que son utilisation dans cette indication ne soit depuis plus recommandée. Des études rétrospectives de cohortes d'enfants nés de femmes exposées au $MgSO_4$ ont ensuite permis de mettre en évidence un effet bénéfique de l'exposition intra-utérine au $MgSO_4$ sur le devenir neurologique de ces enfants prématurés. Les études montrent des effets bénéfiques à court et moyen terme, avec notamment un taux de PC qui diminue dans la population traitée (Chollat et al., 2014, 2017; Crowther et al., 2017; Doyle et al., 2015). De nombreux autres phénomènes sont induits par le $MgSO_4$. Notons par exemple la stabilisation de la pression artérielle et la stabilisation du débit sanguin cérébral chez le prématuré (Rantone et al., 2002). De plus, le $MgSO_4$ semble aussi participer à la diminution de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Sugimoto et al., 2012).

Au niveau du SNC, l'ion magnésium bloque le canal du récepteur NMDA au potentiel membranaire de repos des neurones, canal perméable au calcium (récepteur du glutamate dont la suractivation participe au phénomène excitotoxique). Une première dépolarisation induit la dissociation de l'ion magnésium du canal, ce qui permet l'activation du récepteur NMDA par le glutamate et son/ses coagonistes. Ce blocage non compétitif du récepteur NMDA par l'ion magnésium est l'une des hypothèses principales du mode de neuroprotection par le $MgSO_4$ en condition d'HI (Kang et al., 2011). Cette hypothèse est soutenue par la neuroprotection induite par l'administration de $MgSO_4$ dans un modèle de lésion périnatale excitotoxique par injection intracérébrale d'acide iboténique, un agoniste du récepteur NMDA (Daher et al., 2017; Marret et al., 1995a).

Malgré les nombreuses études menées et à cause du nombre important de processus auxquels participe l'ion magnésium, il est difficile d'élucider tous les mécanismes impliqués dans la neuroprotection par le $MgSO_4$. C'est ainsi que des études cliniques et pré-cliniques continuent d'évaluer les effets bénéfiques de son administration, ses modes d'action ainsi que l'absence d'effet délétère à long terme.

c. Les corticostéroïdes

L'administration de corticostéroïdes est recommandée pour les grossesses à risque de naissance prématurée entre 24 et 34 SG. En effet, l'utilisation de corticostéroïdes diminue les syndromes de détresse respiratoire ainsi que les comorbidités associées chez les prématurés. Ainsi, notons une diminution de la mortalité en période post-natale ainsi qu'une diminution des HiC/HiV (Roberts et al., 2017). L'effet bénéfique d'une administration de corticostéroïdes est maximal quand ils sont administrés entre 1 et 7 jours avant la naissance. Les effets protecteurs des corticoïdes passent par une amélioration des mécanismes pulmonaires fœtaux et notamment des échanges gazeux en accélérant le développement des pneumocytes de type I et II. Les corticoïdes entraînent également une augmentation de la production des protéines liant le surfactant et des enzymes antioxydantes pulmonaires (Haram et al., 2017). Chez l'animal cependant, les corticoïdes fluorés sont directement neuroprotecteurs dans un modèle d'excitotoxicité glutamatergique (Arquié et al., 2002).

La posologie est actuellement débattue quant aux potentiels effets délétères d'une administration sur les enfants naissant finalement à terme, et qui ne bénéficient pas des effets sur la maturation pulmonaire. Ces enfants ont, en effet, 4 fois plus de risque de développer des déficits neurosensoriels (Asztalos et al., 2013; Harding and Dalziel, 2016; Vidaeff et al., 2016a, 2016b) et neurologiques (O'shea and Doyle, 2001).

d. Autres

D'autres molécules à visée neuroprotectrice sont actuellement en cours d'évaluation en clinique pédiatrique. Parmi ces molécules sont principalement développées : ***i)*** la mélatonine, candidate pour ses propriétés antioxydantes, sa capacité à traverser la barrière hémato-encéphalique, la protection de la substance blanche observée dans différents modèles expérimentaux mais également pour ses effets secondaires très limités (Biran et al., 2014; Husson et al., 2002), ***ii)*** l'oxyde nitrique (NO) qui, inhalé, joue un rôle vasodilatateur sur les artérioles pulmonaires et pourrait aider à compenser un syndrome de détresse respiratoire du nouveau-né. Cependant, la recommandation de son utilisation n'est pas encore justifiée car toutes les études ne sont pas concordantes. En effet, l'exposition au NO en période post-natale n'entraîne pas d'amélioration significative des problèmes respiratoires ou neuro-développementaux à 24 mois, et ce malgré l'absence d'effet délétère (Hasan et al., 2017), ***iii)***

l'érythropoïétine, qui semble également un bon candidat pour la neuroprotection des nouveau-nés, une méta-analyse de 2017 incluant plus de 1000 enfants extrêmes prématurés montre une amélioration significative du développement cognitif des enfants exposés, sans incidence sur les autres paramètres évalués (exemple du taux de PC);(Fischer et al., 2017). Cependant, là encore, les études ne convergent pas toutes. En effet, une étude de 2016 publiée dans la revue JAMA ne montre pas d'effet neuroprotecteur à 2 ans, d'une exposition prophylactique à l'érythropoïétine chez des nouveau-nés extrêmes prématurés (Natalucci et al., 2016). Cette énumération n'est pas exhaustive, d'autres stratégies sont en effet à l'étude (telle que l'utilisation de cellules souches), mais sont encore loin de leur application clinique et ne seront pas développées dans ce manuscrit.

II. MODÉLISATION ANIMALE DES LÉSIONS PÉRINATALES

1. Généralités

Afin d'étudier les mécanismes d'apparition des lésions cérébrales et d'explorer de nouvelles cibles thérapeutiques, il est possible de mimer les lésions cérébrales néonatales pédiatriques dans différentes espèces de mammifères (George et al., 2004; Mallard et al., 1998). Des études chez le Babouin montrent que la prématurité seule, sans évènement délétère supplémentaire entraîne l'apparition de PC (Inder et al., 2005; Loeliger et al., 2006) ce qui permet d'être au plus proche de la clinique humaine. Cependant, et pour des raisons évidentes, le primate n'est pas la famille de mammifères la plus utilisée pour explorer les mécanismes de lésions et/ou de neuroprotections. Plusieurs modèles ont été développés chez le Lapin, permettant notamment de mimer des lésions de type LPV, au moyen d'une ischémie intra-utérine (Derrick et al., 2004) ou des hémorragies cérébrales, au moyen d'injections intrapéritonéales de glycérol chez des lapereaux nés par césarienne (Dohare et al., 2016). Néanmoins, la famille de mammifères la plus utilisée pour étudier les lésions cérébrales reste celle des rongeurs. Plusieurs arguments soutiennent l'utilisation des rongeurs, Rats ou Souris. Les plus importants étant le coût modéré d'élevage et la possibilité de réaliser des animaux génétiquement modifiés. S'ajoute la possibilité de superposition chronologique des séquences développementales entre le cerveau humain et murin, ce qui n'est cependant pas spécifique des rongeurs. Une autre caractéristique des rongeurs s'avère un avantage et constitue également une limitation ; le fait que la naissance intervienne à un stade de maturité cérébrale équivalent à 24 SG, permettant de travailler très tôt sur l'animal. La comparaison avec l'Homme s'arrête lorsqu'il s'agit de considérer l'impact de la naissance prématurée puisque ces animaux ont une maturité cardiorespiratoire et digestive d'enfant à terme. Il faut donc garder à l'esprit qu'un modèle ne recouvre jamais tous les aspects physiopathologiques de la clinique (Gilles et al., 2018). C'est l'étude de plusieurs modèles, dans différentes espèces, avec chacun leurs avantages et leurs inconvénients, qui permettra d'obtenir une vision des mécanismes les plus conservés permettant alors d'aboutir à une compréhension globale de la problématique clinique (Mallard and Vexler, 2015).

2. Parallèle développemental Homme-Souris

La gestation chez la Souris dure vingt et un jours. Le jour de naissance est noté P1 (jour post natal 1), la Souris est sevrée à P21 et est capable de se reproduire à P50.

Il est connu depuis longtemps que les étapes de développement cérébral précoce et tardif sont chronologiquement très conservées chez les mammifères et particulièrement chez les mammifères euthériens pour lesquels le développement embryonnaire se déroule entièrement dans le corps de la mère ce qui permet une supplémentation et une protection de l'embryon puis du fœtus *via* le biais d'un placenta (Clancy et al., 2001; Darlington et al., 1999).

Un outil en ligne est aujourd'hui disponible afin d'aligner les séquences développementales entre espèces (http://translatingtime.org/; (Clancy et al., 2007; Workman et al., 2013)). De plus, de nombreuses études ayant pour but d'analyser les mécanismes mis en jeu lors de la formation des LCPP, ou des différentes stratégies de neuroprotection et utilisant des rongeurs ont permis, du moins en partie, de mettre en parallèle les lésions observées chez le rongeur et les aspects principaux de la physiopathologie humaine. Ainsi, il est possible de modéliser chronologiquement : ***i)*** des HiC/HiV chez la souris de P1 jusqu'à P5, ce qui correspond au stade de développement jusqu'à 30 SG chez l'Homme (Leroux et al., 2014) ; ***ii)*** des lésions de la substance blanche chez les souris de P5 qui se produisent majoritairement en clinique entre 28 et 32 SG et ***iii)*** des lésions de la substance grise corticale chez la Souris à P10 mimant les lésions préférentiellement observées chez les enfants nés autour du terme à 39 SG (Adén et al., 2010; Marret et al., 1995b).

Ces différentes études chez le rongeur, couplées aux études descriptives chez l'homme, nous permettent de mettre en relation les aspects temporels des types de lésions avec des aspects neuro-développementaux précis (Figure 7) avec notamment ***i)*** une vulnérabilité vasculaire avant P10 (Leroux et al., 2014; Porte et al., 2017a, 2017b) et ***ii)*** une fenêtre de vulnérabilité des pré-oligodendrocytes juste au début des étapes de myélinisation autour de P5 chez la Souris et mimant le développement à 30 SG chez l'Homme (Marret et al., 1995b; Semple et al., 2013; Tau and Peterson, 2010).

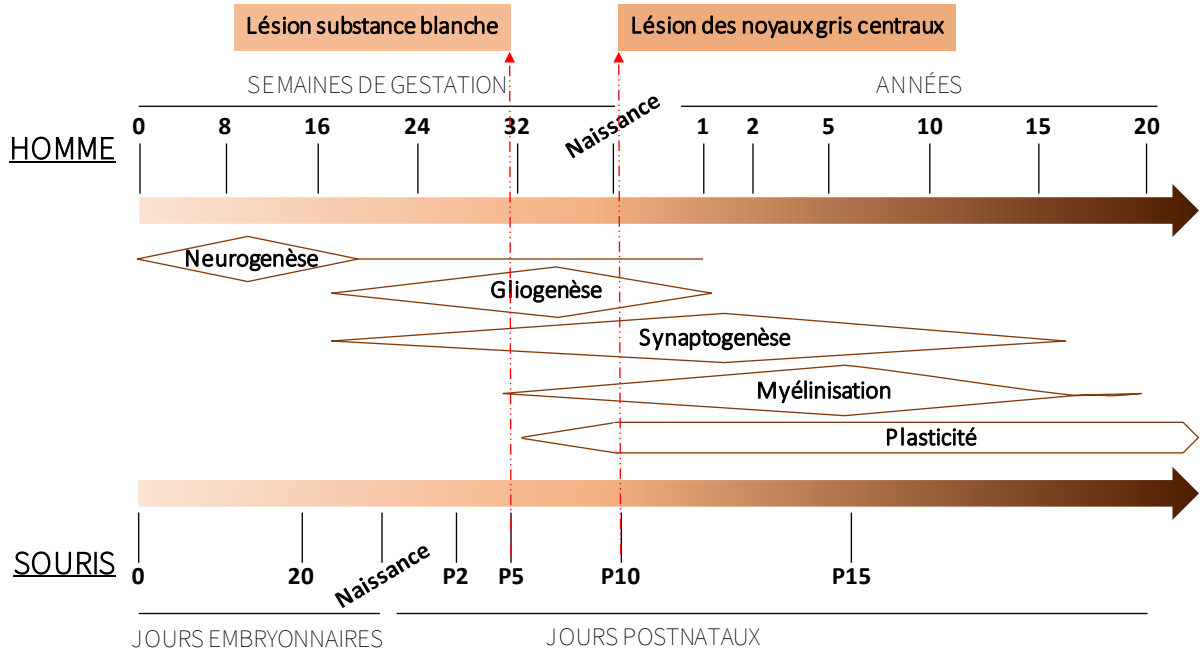


Figure 7 : Mise en parallèle des grandes étapes du développement cérébral et de la modélisation des types de lésions chez l'Homme et la Souris.
Synchronisation du développement cérébral chez l'Homme et la Souris en fonction de grandes étapes neuro-développementales et des corrélations de types de lésions similaires. Adapté de Marret et al., 1995b ; Tau and Peterson, 2010 ; Semple et al., 2013.

Du fait que les rongeurs ne naissent pas prématurés, il faut induire les lésions de façon expérimentale. Plusieurs méthodes ont été développées pour induire des lésions cérébrales néonatales.

3. Les modèles murins de lésions cérébrales néonatales

a. Modèles de lésions hémorragiques

Les lésions hémorragiques peuvent être modélisées dans différentes espèces de mammifères allant des primates aux rongeurs en passant par le porc et le lapin (pour revue voir Lekic et al., 2015). Les modèles les plus utilisés sont ceux réalisés chez le rongeur et chez le lapin. Chez les rongeurs, les techniques utilisées consistent en une injection stéréotaxique de sang autologue ou de collagénase directement dans la matrice germinative (Balasubramaniam et al., 2006; Lekic et al., 2012). Chez le lapin, l'hémorragie est induite par une injection intrapéritonéale de glycérol chez des lapereaux extraits prématurément par césarienne. L'injection de glycérol entraîne une hypotension à l'origine de l'apparition des

hémorragies dans la matrice germinative de ces animaux (Conner et al., 1983; Georgiadis et al., 2008). D'autre part, un modèle de lésions hémorragiques chez la Souris nouveau-né a été mis au point dans notre laboratoire (Leroux et al., 2014). Ce modèle est d'origine génétique et traumatique, pratiqué chez des souris invalidées pour le gène codant pour le PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor 1 ; souris PAI-$1^{-/-}$), inhibiteur physiologique principal de l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA), acteur principal de la fibrinolyse. L'hémorragie est déclenchée par un traumatisme cérébral réalisé par une injection intra-corticale de solution saline, laquelle est sans effet chez des animaux de type sauvage.

Ces modèles mimant différents aspects de la physiopathologie observée en clinique tels que la formation de lésions kystiques de la substance blanche, la dilatation ventriculaire et les atteintes comportementales subséquentes consécutives à l'hémorragie, permettent l'étude des mécanismes impliqués dans leur développement et des conséquences induites par les hémorragies cérébrales du nouveau-né extrême prématuré (Larroque et al., 2003).

b. Modèles inflammatoires de lésions cérébrales néonatales

L'inflammation en période périnatale, due à une infection materno-fœtale ou une infection post-natale, est fortement associée à l'apparition des LCPP, ce qui en fait un mécanisme central de l'apparition des lésions cérébrales néonatales. Pour mimer une inflammation en période néonatale, les chercheurs ont soit administré l'endotoxine (LPS), soit la cytokine pro-inflammatoire IL-1β, médiateur identifié de l'inflammation. L'inflammation induite affecte le développement de la substance blanche, induisant des déficits cognitifs (Favrais et al., 2011). L'inflammation a également un effet potentiateur dans des modèles d'HI (Eklind et al., 2005; Fleiss et al., 2012; Hagberg et al., 2002) ou dans un modèle excitotoxique (Adén et al., 2010; Favrais et al., 2007).

c. Modèle de lésions excitotoxiques

L'excitotoxicité est une cascade d'évènements déclenchée par l'accumulation de glutamate extracellulaire (Figure 3). C'est l'une des principales cascades délétères impliquées dans l'apparition des lésions cérébrales, entrainant une mort neuronale de type nécrotique ou apoptotique (Lipton and Rosenberg, 1994; Lynch and Guttmann, 2002). L'acide iboténique, un agoniste irréversible des récepteurs NMDA, est utilisé pour ses propriétés neurotoxiques. Son administration entraîne une activation de la cascade excitotoxique en mimant une

accumulation de glutamate extracellulaire. Ainsi, l'injection intracérébrale d'acide iboténique chez la Souris nouveau-née entraîne l'apparition de lésions cérébrales mimant les LCPP du nouveau-né. La corrélation entre ce modèle et la clinique est forte aussi bien au regard des types de lésions observées, qu'au regard de leur chronologie, avec des lésions de la substance blanche chez la souris à P5 et des lésions de la substance grise chez la souris à P10 (Johnston, 2005; Marret et al., 1995b; Mesplès et al., 2005).

d. Modèle de lésions hypoxo-ischémiques

Le modèle d'HI néonatale le plus couramment utilisé chez le rongeur est le modèle dit de « Rice-Vannucci » décrit en 1981 chez le raton de 7 jours (Rice et al., 1981). La procédure appliquée consiste en une ligature unilatérale de l'artère carotide suivie d'une hypoxie entre 6 et 8% d'oxygène d'une durée allant de trente minutes à trois heures trente. Ces paramètres varient en fonction des études réalisées (Hagberg et al., 2002). Dans ce modèle, le polygone de Willis permet de compenser l'ischémie unilatérale induite par la ligature carotidienne. Il est donc nécessaire d'associer une hypoxie à la ligature pour obtenir une diminution effective du FSC, qui provoque des lésions par différents mécanismes (déficit énergétique, stress oxydant, excitotoxicité, inflammation);(Vannucci and Vannucci, 2005). La durée d'hypoxie permet ainsi de moduler la sévérité des lésions (Albertsson et al., 2014). Les lésions obtenues à la suite de cette procédure sont localisées au niveau du noyau caudé, du putamen, de l'hippocampe, du cortex et de la substance blanche (Rice et al., 1981; Segovia et al., 2008). Il est démontré depuis longtemps chez le rat que la sévérité et la fréquence des lésions augmentent avec l'âge post natal, ainsi que la susceptibilité de l'hippocampe à l'HI (Towfighi et al., 1997). Cependant, l'impact de l'âge sur les atteintes de la substance blanche n'a pas été renseigné dans cette étude, ni depuis.

Les études cherchant à explorer les déficits à long terme à la suite d'une HI expérimentale en période périnatale ne sont pas nombreuses. Cependant, il a été rapporté des déficits d'interaction sociale (Driscoll et al., 2018) et d'apprentissage en piscine de Morris (Ikeda et al., 2001; Lin et al., 2014). Les déficits moteurs sont quant à eux plus difficiles à détecter car les rongeurs montrent une plasticité cérébrale qui leur permet de récupérer rapidement les fonctions motrices (Wahl, 2018). Cependant, ces déficits restent observables sur des tests de retournement et/ou de force musculaire ainsi que sur des tests de motricité fine et de coordination motrice (Daher et al., 2018; Ordyan et al., 2017; Zaghloul et al., 2017).

La difficulté à mesurer les déficits moteurs dans un modèle de lésion devant mimer la PC est une limite des modèles chez le rongeur.

A notre connaissance, seulement deux études ont directement cherché à évaluer les déficits comportementaux à long terme en fonction de l'âge de survenue du phénomène hypoxo-ischémique (Alexander et al., 2014; Sanches et al., 2015). Ces études ont été réalisées chez le rat à P3 et P7, mais n'ont pas cherché à corréler les déficits observés aux lésions périnatales mais plutôt aux lésions à l'âge adulte, après analyses comportementales.

III. DÉVELOPPEMENT CÉRÉBRAL : ASPECTS NEURAL ET VASCULAIRE

1. Généralités

Le développement du SNC et du réseau vasculaire ne sont pas des évènements disjoints. Ils se déroulent en parallèle, d'un point de vue temporel et fonctionnel par des interactions entre les deux systèmes. Le réseau vasculaire cérébral assure l'apport en oxygène et en nutriments aux cellules neurales. Les cellules neurales influencent la mise en place du réseau vasculaire, notamment au niveau des régions à forte demande énergétique. Le développement du SNC n'est pas restreint à la période de développement embryonnaire *in-utero*. Il se poursuit jusqu'à deux ans après la naissance et peut reprendre dans certains contexte de plasticité, jusqu'à l'âge adulte (Figure 8);(Tau and Peterson, 2010). Les différentes séquences développementales ne sont pas strictement successives mais se superposent pendant certaines périodes.

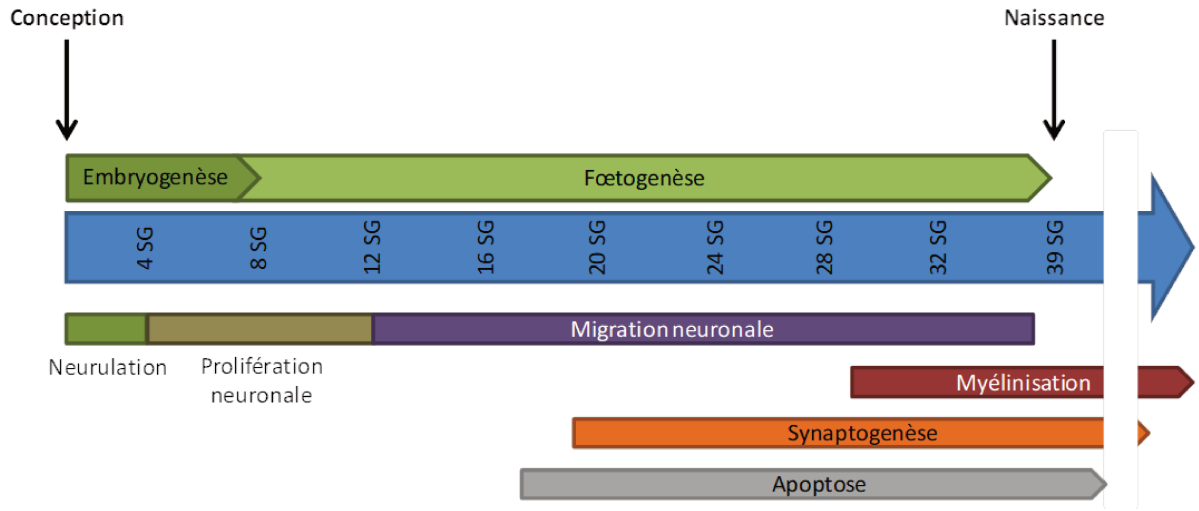


Figure 8 : Chronologie des séquences majeures du développement neural chez l'Homme.
L'échelle temporelle représente la chronologie des séquences développementales majeures de formation du cerveau. La neurulation, dès les premiers stades embryonnaires, est suivi de la prolifération et de la migration neuronale et se termine par la synaptogenèse et la myélinisation. À ces trois dernières séquences se superpose une séquence d'apoptose. D'après Tau and Peterson, 2010.

2. Développement du cortex cérébral

Le cortex cérébral est l'une des structures du cerveau qui assure les fonctions sensorimotrices et cognitives hautement intégrées. C'est également une structure d'intérêt dans notre contexte de lésions cérébrales néonatales. En effet, le cortex et la substance

blanche sous-jacente sont des structures affectées par les évènements délétères dus à l'environnement dans la période périnatale.

a. Prolifération neuronale

La formation du cortex cérébral commence par une séquence de forte multiplication cellulaire, entre la 4ème et la 12ème SG. Les cellules neuroépithéliales (cellules progénitrices) localisées en bordure du tube neural se divisent massivement pour former la zone ventriculaire (ZV). Cette étape de prolifération s'effectue selon deux modes de division cellulaire, dans un premier temps une division symétrique et dans un deuxième temps une division asymétrique. Ces modes de division se distinguent par la polarité et l'orientation du plan de clivage spécifique des cellules (Figure 9A). La division cellulaire symétrique s'effectue par des mouvements nucléaires le long des prolongements cellulaires, aboutissant à deux cellules filles identiques à la cellule mère, augmentant ainsi la réserve de cellules progénitrices (Figure 9B). Par la suite, les cellules entrent dans un mode de division asymétrique (mode de division neurogénique ; Figure 9C).

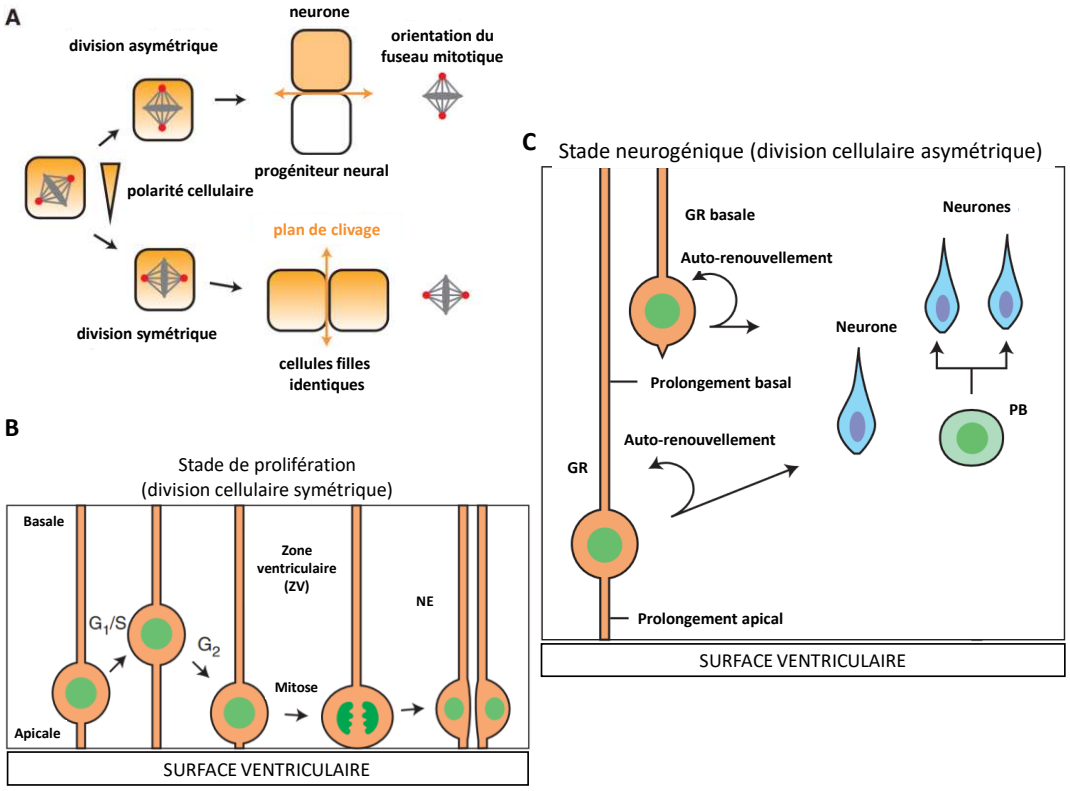


Figure 9 : Modes de division cellulaire lors du développement cortical.
***A** : Une différence de polarité cellulaire est à l'origine des deux types de division ; **B** : division symétrique qui permet l'épaississement de la zone ventriculaire ; **C** : division asymétrique qui entraîne la formation de la zone sous-ventriculaire peuplée de précurseurs neuronaux et de cellules de glie radiaire ; ZV : zone ventriculaire ; NE : cellules neuroépithéliales (précurseur) ; GR : cellules de glie radiaire ; PB : précurseur basal. D'après Matsuki and Shitamukai, 2015.*

Ce mode de division permet d'obtenir deux cellules filles différentes ; un précurseur neural intermédiaire aussi appelé cellule de glie radiaire et un neurone. Ce mode de division asymétrique permet de générer un nouvel ensemble de cellules neuronales et de garder intacte la réserve de cellules progénitrices qui continuent de se diviser jusqu'à ce que l'ensemble des neurones du néocortex soient générés, vers 20 SG. Ces nouvelles cellules forment, la zone sous-ventriculaire (ZSV), superposée à la ZV. La ZV et la ZSV forment ensemble la matrice germinative. C'est à partir de cette matrice germinative et des cellules de glie radiaire que vont débuter : ***i)*** la génération des précurseurs neuronaux spécifiques des cellules excitatrices (glutamatergiques) et inhibiteurs (GABAergiques) ***ii)*** la génération des précurseurs gliaux (astrocytes et oligodendrocytes), ainsi que leurs migrations. Le type cellulaire généré dépend de la localisation de son précurseur dans la matrice germinative, de la plus dorsale à la plus ventrale : i) les neurones corticaux (glutamatergiques pyramidaux principalement) et les astrocytes ii) les interneurones GABAergiques et les neurones allant peupler les ganglions de la base, iii) les oligodendrocytes (Figure 10);(Matsuzaki and Shitamukai, 2015).

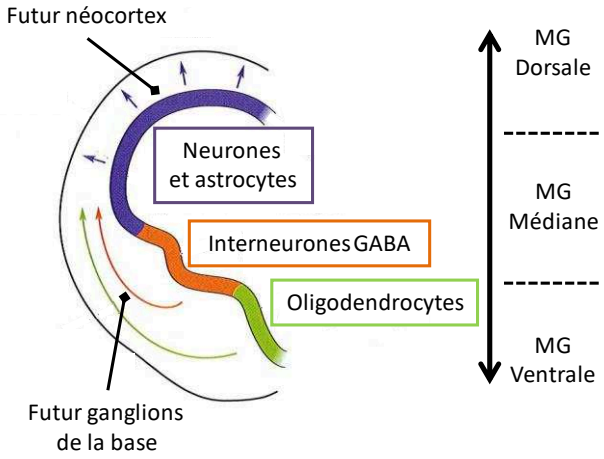


Figure 10 : Origine des différents types de cellules neurales télencéphaliques dans la matrice germinative.
GABA : acide gamma aminobutirique, MG : matrice germinative. D'après Bear, 2007

b. Migration neuronale

A la suite de la phase de multiplication cellulaire commence une phase de migration neuronale, qui se déroule de 12 à 28 SG et pendant laquelle les neuroblastes doivent migrer pour atteindre leur position finale au sein du cortex. C'est l'étape de corticalisation qui chez

les mammifères, consiste dans le néocortex en la mise en place de 6 couches cellulaires, générées dans un sens ventriculofuge (inside-out), par des phases successives de migration radiale pour les neurones glutamatergiques (70 à 80%) et/ou tangentielle pour les neurones GABAergiques (20 à 30%). Les progéniteurs glutamatergiques forment le cortex *via* une migration radiale dépendante des prolongements de la glie radiaire (Ohtaka-Maruyama and Okado, 2015). Concernant les progéniteurs GABAergiques, seulement deux tiers migrent radialement et le tiers restant de façon tangentielle (indépendamment des cellules de glie radiaire) pour aller coloniser le cortex (Narboux-Nême and Wassef, 2003).

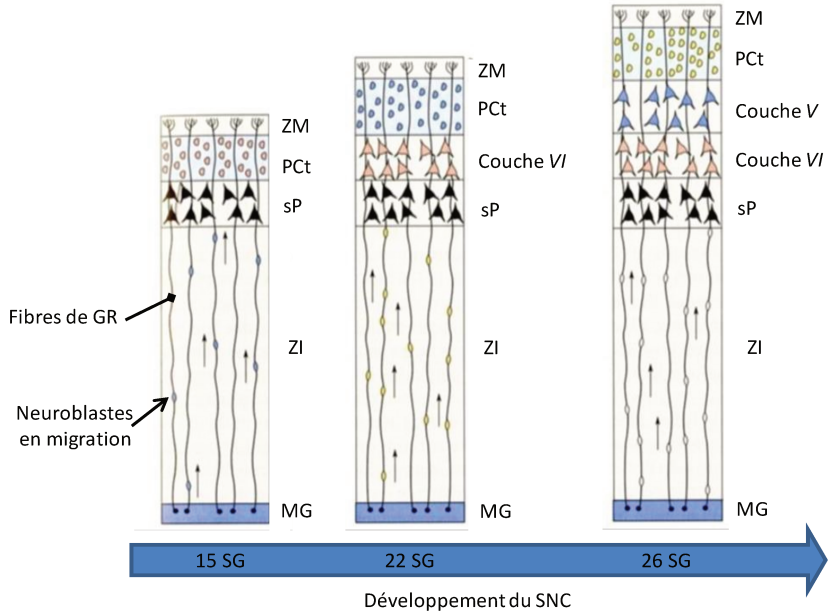


Figure 11 : Mise en place de la lamination corticale.
MG : matrice germinative ; ZI : zone intermédiaire ; sP : sous-plaque corticale ; PCt : plaque corticale ; ZM : zone marginale ; GR : cellules de glie radiaire. D'après Bear, 2007.

Les premiers neuroblastes générés migrent le long des prolongements des cellules de glie radiaire, vers la zone marginale située au-dessus de la ZSV par rapport au ventricule. Ils forment la plaque corticale, zone d'arrêt de la migration neurale et la sous-plaque corticale, une zone d'attente pour l'établissement des connections synaptiques ascendantes sous corticales qui détermineront en particulier les spécificités fonctionnelles des aires corticales (Shatz and Rakic, 1981). La zone intermédiaire, qui se situe entre la MG et la sous-plaque corticale, contient majoritairement les fibres des cellules de glie radiaire, les neurones précoces de Cajal-Retzius et les prolongements axonaux des neurones glutamatergiques croissant en sens inverse de leur migration. Les neuroblastes suivants traversent la zone

intermédiaire et la sous-plaque corticale pour s'arrêter sous la zone marginale, formant ainsi une première couche de la plaque corticale, qui deviendra la couche VI (la plus profonde du cortex). Les vagues suivantes de neuroblastes traversent les couches déjà formées, créant ainsi des couches corticales supérieures (de V à II). Ce mécanisme de migration radiale par vagues successives est à l'origine de la lamination néocorticale en 6 couches spécifiques des mammifères, les couches les plus profondes contenant les neuroblastes ayant migrés le plus précocement (Bear et al., 2007; Ohtaka-Maruyama and Okado, 2015);(Figure 11). Une fois la migration neuronale terminée, la zone intermédiaire deviendra la substance blanche par une apoptose majeure des cellules de Cajal-Retzius laissant place aux axones des connections corticales à distance et aux oligodendrocytes qui assureront leur myélinisation. Le même type de mort cellulaire programmée affecte les neurones de Cajal-Retzius de la zone marginale (couche I du néocortex).

c. Migration des interneurones GABAergiques

Chez l'Homme, 65% des interneurones GABAergiques provient de la ZV et de la ZSV et migrent de façon radiale pour coloniser le cortex à partir de la 10ème SG. Les 35% restant proviennent des éminences ganglionnaires du télencéphale ventral (EG) et sont générés par vagues successives à partir de la 14ème SG. Ces précurseurs rejoignent majoritairement le cortex, le striatum, l'hippocampe et les bulbes olfactifs *via* une migration tangentielle puis dans le cortex par une migration radiale permettant d'envahir les différentes couches préalablement établies (Ang et al., 2003; Letinic et al., 2002; Narboux-Nême and Wassef, 2003).

Chez la Souris, la quasi-totalité des interneurones GABAergiques du cortex provient des EG du télencéphale ventral (Figure 10), ce qui fait de la Souris un bon modèle d'étude pour la migration tangentielle de ces neurones. Les EG proviennent d'un épaississement de la ZSV du subpallium. Elles sont divisées en 4 parties, l'EG latérale, médiane, caudale et enfin l'aire pré-optique, l'EG caudale étant considérée comme le prolongement des EG latérale et médiane (Figure 12) (Laclef and Métin, 2017). La mise en place des interneurones GABAergiques débute à E12,5 et se termine après la naissance (Tanaka and Nakajima, 2012). Deux voies de migration tangentielle principales partent des EG médianes et caudales pour coloniser le cortex : une voie de migration superficielle dite « piale » et une voie de migration profonde dite « périventriculaire » (Figure 12). Il a été démontré que les EG médianes et

caudales produisent respectivement 70% et 30% de la population corticale d'interneurones GABAergiques (Miyoshi et al., 2010). De plus, 75% des interneurones GABAergiques générés tardivement dans les EG médianes (à partir de E15,5) chez la Souris, vont peupler les couches superficielles du cortex cérébral (Miyoshi and Fishell, 2011). La migration tangentielle de ces interneurones GABAergiques est un phénomène hautement régulé, notamment par les molécules chémoattractives ou chémorépulsives telles que les éphrines, les sémaphorines, le BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor) ainsi que des neurotransmetteurs comme le glutamate ou le GABA (Peyre et al., 2015).

Il a récemment été démontré que les réseaux vasculaires pial et périventriculaire jouent un rôle de support dans la migration des interneurones GABAergiques (Won et al., 2013). En effet, il existe une forte interaction entre ces réseaux vasculaires et les voies de migration respectives des interneurones GABAergiques. Le rôle de ces cellules endothéliales n'est pas restreint à un support physique de migration mais réside également dans une activité de signalisation. Elles sécrètent notamment du GABA à différentes concentrations en fonction de leur localisation piale ou périventriculaire, ce qui a pour effet de guider les précurseurs GABAergiques vers l'une ou l'autre voie de migration (Won et al., 2013). À ce jour, le rôle des cellules endothéliales dans la migration des interneurones GABAergiques reste encore largement inexploré.

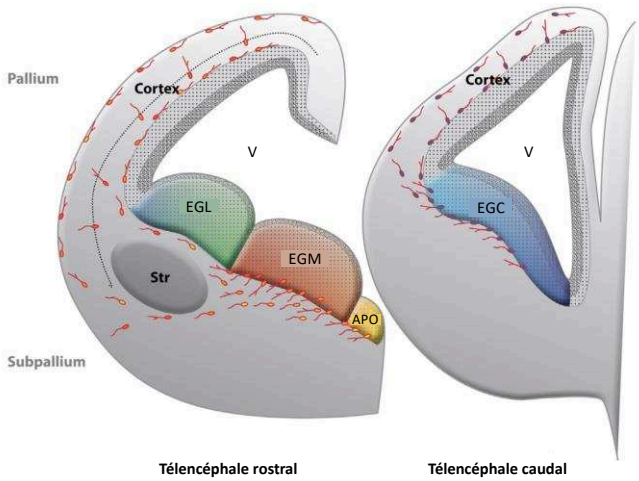


Figure 12 : Localisation des éminences ganglionnaires et des voies de migration des interneurones GABAergiques vers le cortex.
Les voies de migration ainsi que les lieux de départ des interneurones GABAergiques (en rouge) sont représentés ci-dessus. EGL : éminence ganglionnaire latérale ; EGM : éminence ganglionnaire médiane ; EGC : éminence ganglionnaire caudale ; APO : aire pré-optique ; Str : Striatum ; V : ventricule ; Zone hachurée en gris foncé : zone ventriculaire ; Zone hachurée en gris clair : zone sous-ventriculaire. D'après Laclef et Métin, 2017.

Cette description de la migration des interneurones GABAergiques a été développée car, au cours de ma thèse, j'ai contribué à une étude des mécanismes impliqués dans leur migration tangentielle vasculo-dépendante. Cette étude fait l'objet d'un article intitulé « *Glutamate controls vascular migration of GABA interneurons in the pial migratory route via endothelial proteases and NMDA receptors* », actuellement en révision pour publication et présenté en ANNEXE I.

d. Synaptogenèse, myélinisation et apoptose

Les étapes de synaptogenèse, de myélinisation et d'apoptose se déroulent en parallèle des migrations cellulaires neuronales et gliales (Figure 8). Ces étapes débutent durant le développement fœtal, autour de 17 SG et perdurent bien après la naissance jusqu'à l'adolescence voir jusqu'à l'âge adulte (Tau and Peterson, 2010).

Première étape indispensable à la bonne connectivité neuronale, la synaptogenèse nécessite la mise en place de projections axonales et dendritiques des neurones, souvent contemporaines de la migration. Durant cette migration puis arrivés à leur position définitive au sein du cortex, les neurones établissent leur(s) connexion(s) fonctionnelle(s) (synapses) avec leur cible. Lors de cette étape de migration les neurones excitateurs corticaux projettent leurs prolongements axonaux vers des structures aussi variées que le striatum, le thalamus, la moëlle épinière, mais aussi d'un hémisphère à l'autre ainsi qu'en direction antéro-postérieure (Molyneaux et al., 2007). Les interneurones GABAergiques établissent leurs synapses localement dans le tissu. Les mécanismes impliqués dans la croissance axonale sont nombreux et complexes mais ne seront pas décrits dans ce manuscrit (pour revue, voir Jiang and Nardelli, 2016).

L'étape de myélinisation débute lorsque les premières synapses sont stabilisées. Chez l'Homme, les oligodendrocytes, qui représentent 20% des cellules neurales, apparaissent à partir 22 SG (Thomas et al., 2000). Ils proviennent de la différenciation des glioblastes tardifs provenant de la ZSV au niveau de la MG ventrale. Une fois à leur destination finale au sein des faisceaux de fibres corticales, les préoligodendrocytes subissent une maturation tardive en oligodendrocytes myélinisants et ils commencent la production de la gaine de myéline autour des fibres. La myélinisation est un phénomène qui persiste jusqu'à l'âge adulte avec un pic d'activité entre 6 mois et 2 ans (Jiang and Nardelli, 2016).

Enfin, une des étapes cruciales du développement cortical consiste en une longue séquence d'apoptose ou mort cellulaire programmée. Il est largement admis que près de la moitié des neurones générés lors de la neurogenèse seront éliminés par apoptose avant la fin de maturation du SNC (Tau and Peterson, 2010). Cette vague d'élimination de neurones corticaux montre un pic d'activité entre 19 et 23 SG et se poursuit en parallèle des étapes de migration, synaptogenèse et myélinisation. La stabilisation des synapses efficaces et l'élimination des synapses inutilisées ou inefficaces se fait jusqu'à l'adolescence tardive (autour de 15 ans). Durant cette période, près de la moitié des synapses sera éliminée (Jiang and Nardelli, 2016). Il est à noter que la microglie joue un rôle important dans cette sélection synaptique (Paolicelli et al., 2011).

Chez le rat, la séquence d'apoptose se déroule entre 5 et 10 jours (Bandeira et al., 2009). La séquence d'apoptose est régulée par des activités synaptiques et par différents facteurs neurotrophiques (NGF, BDNF, NT3, NT4) produits par des cellules gliales ou par d'autres neurones (Blanquie et al., 2017; Lossi and Merighi, 2003). Cette vague d'apoptose affecte les neurones générés en excès et/ou n'ayant pas acquis suffisamment de synapses fonctionnelles (neurones les moins connectés);(Dekkers et al., 2013). La perte neuronale due à la séquence d'apoptose ne se traduit pas par une perte du volume cortical car elle est compensée par la gliogenèse (oligodendrocytes, astrocytes et microglie).

e. Développement des astrocytes et de la microglie

Les astrocytes, qui représentent 40% des cellules neurales, apparaissent tardivement de même que les précurseurs d'oligodendrocytes, à partir de 22 SG. Ils sont issus des mêmes précurseurs que ceux qui génèrent les neurones (Miller and Gauthier, 2007) au niveau de la MG dorsale (Figure 10). À l'âge adulte, les astrocytes assurent de nombreuses fonctions au sein du SNC. Ils font partie intégrante de l'unité neurovasculaire (UNV) et jouent un rôle de maintien de la BHE, ils participent à la modulation de la transmission synaptique par recapture de neurotransmetteurs ou relargage de gliotransmetteurs ou neuromodulateurs ainsi que par le maintien de l'homéostasie potassique. Ils assurent une réserve énergétique pour les neurones et participent également au phénomène de régulation du FSC (Jiang and Nardelli, 2016). Au cours du développement, ils sont également essentiels à la maturation synaptique, à la survie des précurseurs neuronaux ainsi qu'au guidage axonal (Farhy-Tselnicker and Allen, 2018). Enfin, ils ont la capacité de contrôler le développement des synapses aussi bien

excitatrices qu'inhibitrices, jouant probablement ainsi un rôle majeur dans l'établissement de la balance excitation / inhibition (Clarke and Barres, 2013; Jiang and Nardelli, 2016).

En pathologie, les astrocytes sont associés à la gliose réactionnelle qui concourt à la cicatrisation d'une nécrose. À ce titre, ils peuvent avoir un impact sur le développement et les conséquences fonctionnelles d'une lésion acquise tôt pendant le développement, par l'inhibition subséquente de la migration cellulaire et/ou le passage des neurites (Evrard et al., 1997). Au cours des processus de lésion, l'arrêt des activités de tampon potassique et des processus énergétiques dépendant de l'homéostasie (recapture de neurotransmetteurs par exemple) participe aux phénomènes délétères. Le remodelage post-lésionnel porte aussi sur les populations neuronales mais semble peu affecter le réseau vasculaire (Marín-Padilla, 1997).

Les cellules microgliales, qui représentent 10% des cellules neurales, sont les cellules de l'immunité innée du SNC (Barger et al., 2018). Elles proviennent majoritairement de la lignée de précurseurs myéloïdes dans le sac vitellin (Alliot et al., 1999; Ginhoux et al., 2010) et migrent dans le cortex cérébral à un stade très précoce du développement, à partir de la sixième SG chez l'Homme et de E11,5 chez la Souris (Barger et al., 2018). Dans le cerveau mature, la microglie joue un rôle dans la plasticité synaptique ainsi que dans le contrôle immunitaire. Mais la microglie joue également un rôle très important lors du développement du cortex cérébral et notamment dans les phénomènes de croissance axonale, d'établissement des synapses, de lamination corticale et d'élimination post-apoptotique des cellules mortes (Paolicelli et al., 2011; Squarzoni et al., 2014; Ueno et al., 2013).

3. Le réseau vasculaire cérébral

a. Mise en place du réseau vasculaire cérébral

Il est un peu artificiel de traiter le développement du réseau vasculaire séparément du développement des cellules neurales du parenchyme tant les évidences récentes qui indiquent la convergence de ces processus sont maintenant nombreuses (Errede et al., 2014; Stolp et al., 2016);(voir chapitre IV).

Le réseau vasculaire est cependant le premier organe mis en place chez l'embryon et représente le plus grand réseau de notre corps. Sa mise en place débute lors des premières SG, pendant la neurulation. C'est une étape critique du développement. En effet, quand la

formation de nouveaux vaisseaux est dérégulée, elle contribue à de nombreuses malformations, voire à une létalité (Carmeliet, 2003).

Le réseau vasculaire se forme à partir de progéniteurs communs de cellules endothéliales et de cellules hématopoïétiques, les hémangioblastes, provenant principalement du mésoderme (Ferguson, 2005). Deux mécanismes principaux soutiennent la formation du réseau vasculaire cérébral. Il s'agit des phénomènes de vasculogenèse et d'angiogenèse.

La vasculogenèse consiste en la formation *de novo* de vaisseaux sanguins par différenciation des hémangioblastes en cellules endothéliales alors que l'angiogenèse consiste en la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants (Risau, 1991). La vasculogenèse est un processus spécifique du développement embryonnaire alors que l'angiogenèse est un phénomène qui perdure jusqu'à l'âge adulte dans des contextes physiologiques ou pathologiques (Carmeliet, 2003; Risau, 1997; Risau and Flamme, 1995).

Les hémangioblastes se regroupent pour former les îlots sanguins qui comprennent les cellules périphériques à l'origine de la lignée vasculaire (angioblastes) aussi bien que les cellules centrales donnant les cellules sanguines (hémocytoblastes). Les îlots sanguins fusionnent ensuite pour créer les plexus vasculaires primitifs à partir desquels les premiers vaisseaux de la pie-mère envahissent le parenchyme cérébral vers les ventricules, par une croissance ventripète (vaisseaux ventripètes). Une fois que ces vaisseaux ont atteint le ventricule, ils le contournent puis remontent par une croissance ventrifuge (vaisseaux ventrifuges). Ce processus laisse des zones peu vascularisées entre les deux types de vaisseaux qui ne possèdent pas encore de collatérales. Ces zones sont particulièrement vulnérables lors d'une ischémie en période périnatale (Figure 13) (Feeney and Watterson, 1946; Greenberg and Jin, 2005; Strong, 1964).

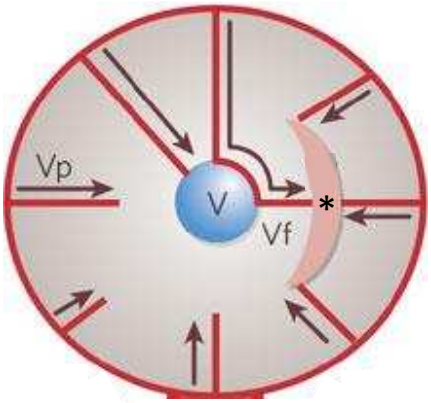


Figure 13 : Mise en place du réseau vasculaire cérébral par envahissement du cerveau vers les ventricules.
*Vp : vaisseaux ventripètes ; Vf : vaisseaux ventrifuges ; V : ventricule ; * : zone moins irriguée sensible à l'ischémie. D'après Greenberg et Jin, 2005.*

Chez l'Homme, le réseau vasculaire cérébral est alimenté par deux systèmes vasculaires. Un système vasculaire antérieur provenant des artères carotides internes et un système vasculaire postérieur issu des artères vertébrales. Ces quatre artères établissent une série d'anastomoses donnant lieu à la formation du polygone de Willis (Figure 14). Cette structure située au niveau ventral du mésencéphale et du diencéphale est définitivement formée à partir de 8 SG. Sa structuration lui permet de réguler le FSC et de le redistribuer de façon homogène entre les différentes structures du cerveau *via* les artères collatérales radiales (Figure 14). Ces artères collatérales issues du polygone de Willis sont des artères terminales et ne vont plus former d'anastomose. Ceci contribue à la vulnérabilité des régions corticales qu'elles irriguent en cas d'interruption ou de perturbation locale du FSC.

Cette particularité est mise à profit dans la modélisation des AVC chez l'animal par l'interruption temporaire ou permanente du flux dans l'artère cérébrale moyenne. En revanche, dans le modèle d'hypoxie-ischémie néonatale dit de Rice-Vannucci, la ligature de l'artère carotide, en amont du polygone de Willis, n'entraine qu'une diminution du flux ipsilatéral à la ligature. Ceci est dû à la redistribution du flux artériel contralatéral et basilaire par les artères communicantes. Chez le rongeur, le développement du polygone de Willis présente de nombreuses similitudes avec le développement chez l'Homme et se déroule entre E11,5 et E17,5.

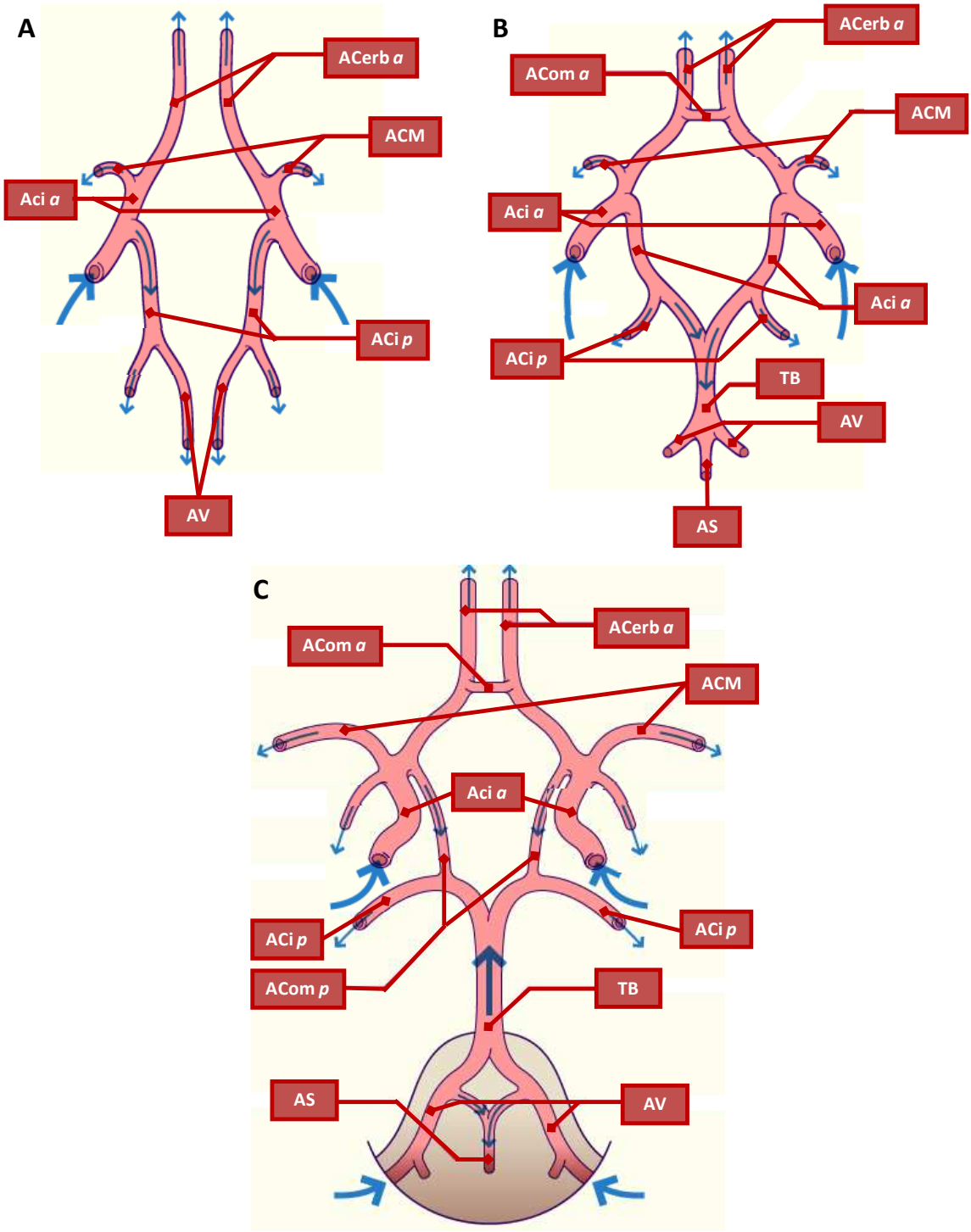


Figure 14 : Formation du polygone de Willis aux stades embryonnaires.
***A** : entre 3 et 5 SG les systèmes vasculaires antérieurs et postérieurs se développent ; **B** : entre 5 et 6 SG les artères vertébrales s'anastomosent et fusionnent avec l'artère spinale formant ainsi le tronc basilaire. Celui-ci est relié aux artères carotides internes et aux artères cérébrales moyennes par le biais des artères communicantes postérieures. Du côté antérieur les artères cérébrales s'anastomosent par le biais de l'artère communicante antérieure ; **C** : entre 6 et 8 SG l'artère communicante antérieure et la réunion des artères cérébrales postérieures forment un hexagone artériel, le polygone de Willis ; ACerb a : artères cérébrales antérieures ; ACi a : artères carotides internes antérieures ; ACi p : artères carotides internes postérieures ; ACM : artères cérébrales moyennes ; ACom a : artère communicante antérieure ; ACom p : artères communicantes postérieures ; AS : artère spinale ; AV : artères vertébrales ; TB : tronc basilaire.*

b. L'angiogenèse cérébrale

L'angiogenèse est un processus permettant la production de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants. Il existe deux modes d'angiogenèse, un mode par bourgeonnement et un mode par intussusception (Heinke et al., 2012) (Figure 15).

L'hypoxie est l'un des plus importants stimuli inducteurs de l'expansion vasculaire. En effet, les cellules sont initialement oxygénées par diffusion passive de l'oxygène à travers le tissu. Quand le tissu se développe au-delà des possibilités de diffusion de l'oxygène, l'hypoxie qui en découle entraîne la stimulation de l'angiogenèse par l'induction du facteur de transcription HIF (hypoxia-inducible factor) (Pugh and Ratcliffe, 2003). HIF régule de nombreux gènes de l'angiogenèse, principalement le VEGF (Vascular endothelial growth factor).

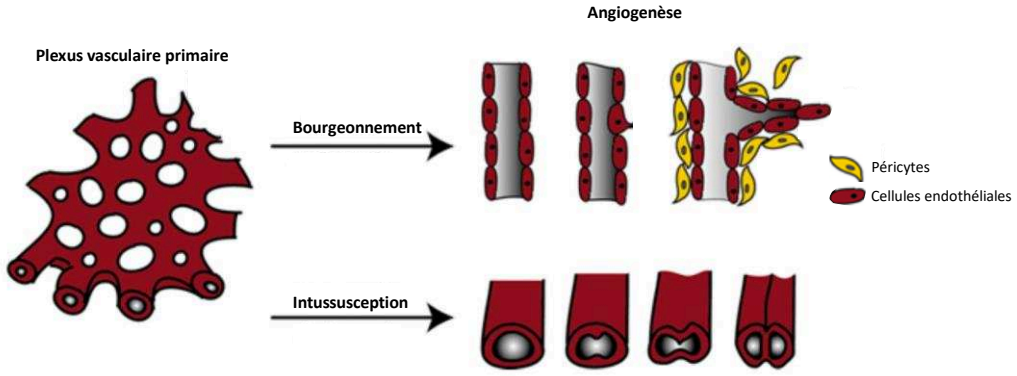


Figure 15 : Schématisation des deux modes d'angiogenèse.
Le réseau vasculaire envahit le parenchyme cérébral à partir du plexus vasculaire primaire à l'aide de deux processus d'angiogenèse : le bourgeonnement et l'intussusception. Le bourgeonnement permet le branchement entre deux vaisseaux existant par création d'une collatérale. L'intussusception permet la division d'un vaisseau existant par la formation de cloisons. Les cellules rouges représentent les cellules endothéliales et les cellules jaunes représentent les péricytes. D'après Heinke et al., 2012

Le bourgeonnement, qui permet la jonction entre deux vaisseaux, est donc principalement initié par une cascade de signaux paracrines induits par l'hypoxie. Cette cascade entraîne une réponse séquentielle et coordonnée qui comprend la dégradation de la matrice extracellulaire (MEC), la migration et la prolifération des cellules endothéliales suivis de la stabilisation et la maturation des nouvelles collatérales. Ainsi, 3 phases du bourgeonnement ont été décrites : ***i)*** l'activation ou l'initiation , ***ii)*** la transition ou élongation et ***iii)*** la maturation (Carmeliet and Jain, 2011; Daniel and Abrahamson, 2000).

Le vaisseau cérébral quiescent est entouré de péricytes eux même enchâssés dans la LB qui sert de support aux cellules endothéliales. L'étape d'activation est déclenchée lorsqu'une cellule endothéliale répond à un signal pro-angiogénique (notamment le VEGF) provenant de cellules progénitrices neurales environnantes. La cellule endothéliale répondant à ce signal sera la cellule initiatrice ou *tip cell*. Parallèlement, en réponse au signal pro-angiogénique, les péricytes se détachent de la LB par la libération de protéases qui provoquent sa dégradation. Les protéases impliquées dans la dégradation et le renouvellement de la LB et de la MEC sont ; ***i)*** les activateurs du plasminogène, tPA et/ou uPA (*urokinase-type plasminogen activator*) ainsi que ***ii)*** les métalloprotéinases de la matrice extracellulaire (MMPs). La dégradation de la MEC entraîne la libération par clivage d'autres facteurs pro-angiogéniques stockés dans la MEC, par exemple le FGF (*fibroblast growth factor*). Dans cet état, la cellule endothéliale perd également ses jonctions de type VE-cadhérine (*Vascular Endothelial*) ou ZO-1 (*zonula occludens-1*). Ces éléments coordonnés permettent à la *tip cell* de s'extraire du vaisseau quiescent et d'initier le bourgeonnement. La *tip cell* est guidée dans le tissu par des facteurs pro-angiogéniques environnants produits par les cellules neurales et sa migration est permise par la dégradation de la MEC (Figure 16A) (Carmeliet and Jain, 2011).

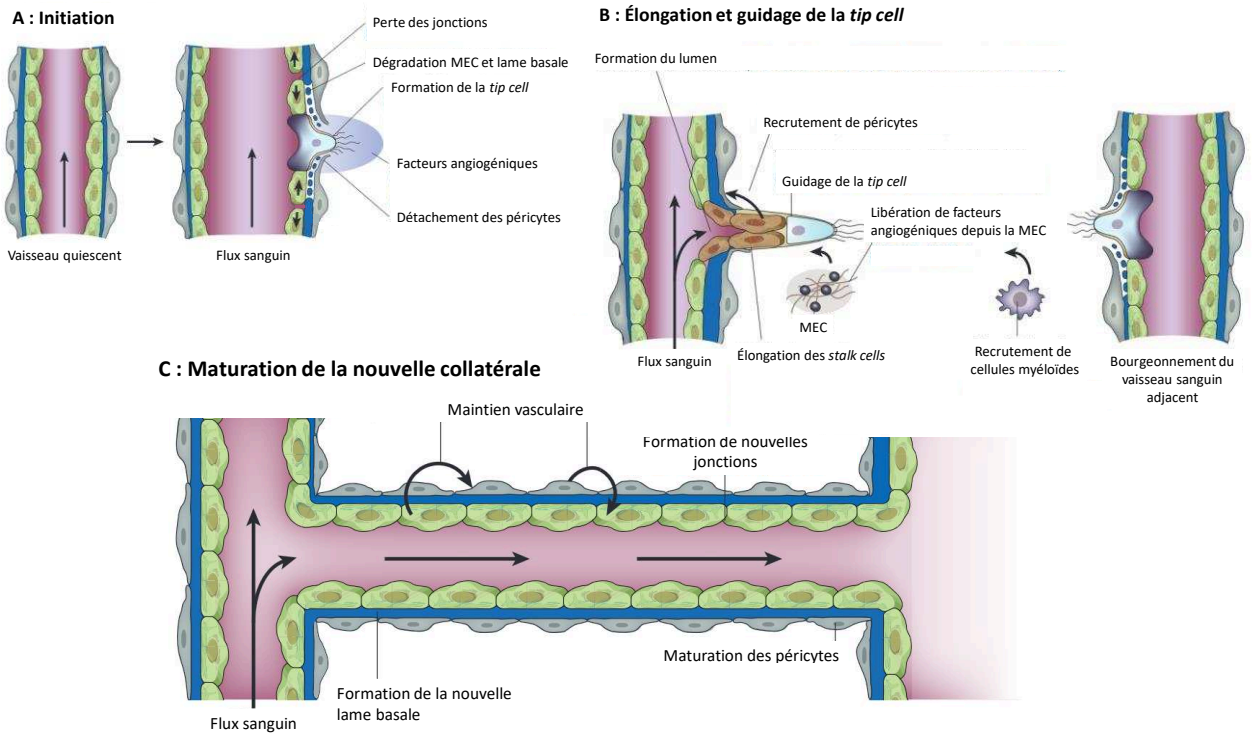


Figure 16 : L'angiogenèse par bourgeonnement.
*Représentation des trois grandes étapes de l'angiogenèse par bourgeonnement : l'initiation (**A**), l'élongation (**B**) et la maturation (**C**). MEC : matrice extracellulaire. D'après Carmeliet et Jain, 2011.*

L'étape d'élongation du néovaisseau résulte de la division des cellules adjacentes à la *tip cell,* des cellules de support ou *stalk cells* (Figure 16B). Leur division cellulaire est stimulée par des facteurs tels que le FGF, le PlGF (*placental growth factor*), ou des ligands stimulant les voies Notch ou Wnt (Carmeliet and Jain, 2011).

L'étape de maturation a lieu après la fusion du bourgeon avec une autre branche vasculaire (Daniel and Abrahamson, 2000). Le vaisseau mature et se stabilise sous l'action de facteurs comme le TGF-β (*transforming growth factor beta*) ou le PDGF (*platelet derived growth factor*) sécrétés par les cellules endothéliales, qui attirent localement des péricytes, lesquels colonisent l'espace périvasculaire puis se différencient. La formation d'une nouvelle LB est ensuite permise par la mise en jeu d'inhibiteurs de protéases comme le PAI-1 ou les TIMPs (tissu inhibitors of metalloproteinases) et enfin les cellules endothéliales reforment leurs jonctions (Figure 16C) (Carmeliet and Jain, 2011). Si le vaisseau sanguin nouvellement formé n'est pas perfusé, il va progressivement régresser (Carmeliet, 2003).

Le deuxième mode d'angiogenèse est l'intussusception. L'angiogenèse par intussusception a été décrite en premier lieu chez le rat au cours du développement du poumon qui voit une augmentation massive (de 35 fois) du volume capillaire durant les 4 premiers mois de vie (Burri et al., 1973; Gianni-Barrera et al., 2014). Le processus d'intussusception est caractérisé par la formation d'un pilier tissulaire central dans la lumière vasculaire, entrainant la séparation longitudinale du vaisseau préexistant en deux vaisseaux fils, le plus souvent de façon symétrique. Les étapes de l'intussusception sont présentées dans la Figure 17. L'intussusception est impliquée dans le développement, le remodelage et la maturation du plexus vasculaire primaire. En effet, l'apparition initiale et de façon répétée de piliers au sein des capillaires mène à l'expansion rapide du plexus vasculaire (croissance microvasculaire par intussusception). La division longitudinale et symétrique des vaisseaux mène à l'apparition de vaisseaux parallèles devenant par la suite de petites artères et des veines dans l'arbre vasculaire (arborisation par intussusception). Enfin, la formation de piliers au sein des points de jonctions entre petites artères ou veines peut entraîner l'optimisation géométrique des jonctions en favorisant la croissance de branches vasculaires (croissance par intussusception) (Djonov et al., 2002; Gianni-Barrera et al., 2014; Styp-Rekowska et al., 2011).

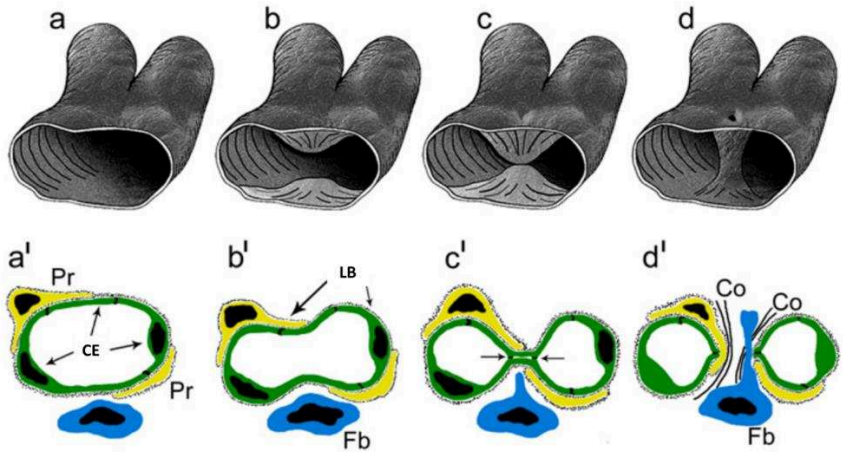


Figure 17 : Etapes morphogéniques de l'intussusception.
*Représentation schématique en 3D (**a, b, c, d**) de la formation du pilier intraluminal, étape spécifique de l'intussusception. Représentation 2D (**a', b', c', d'**) des évènements lors de la formation du pilier intraluminal. Protrusion des cellules endothéliales (CE) opposées dans le capillaire jusqu'à établissement d'un contact entrainant la formation d'une bicouche. Ce contact est maintenu par la formation de jonctions inter-endothéliales et la bicouche réorganisée de telle sorte qu'elle se trouve perforée au centre. Le pilier, creux, s'élargit après avoir été envahi par les péricytes (Pr) et les fibroblastes (Fb) qui déposent les fibres de collagène (Co), reconstituant ainsi la lame basale (LB). D'après Gianni-Barrera et al., 2013.*

Les mécanismes impliqués dans l'intussusception ont été moins explorés que ceux du bourgeonnement et l'ont été principalement dans les tissus périphériques. Cependant, il est établi que le facteur régulateur principal de l'intussusception est une réponse vasculaire aux changements hémodynamiques, et notamment au stress de cisaillement ou « *shear stress* ». En effet, l'apparition des piliers au sein de la lumière vasculaire est causée par une augmentation du flux sanguin et se produit dans des régions ou le *shear stress* est faible, entouré de régions où le *shear stress* est fort, ces conditions étant la cause de flux turbulents (Gianni-Barrera et al., 2014; Lee et al., 2010). En plus de la réponse au flux sanguin, l'intussusception est régulée par différents facteurs de croissance, les plus importants semblant être le VEGF et le FGF. En effet, alors que le bourgeonnement semble activé par de fortes concentrations de VEGF, l'intussusception semble être plutôt induite par de plus faibles concentrations de VEGF et une augmentation de FGF (Makanya et al., 2005). Le VEGF semble initiateur du processus, mais non essentiel au déroulement de la suite du processus, assurée par le FGF (Gianni-Barrera et al., 2013, 2014).

Le mode d'angiogenèse par intussusception est plus rapide que le mode par bourgeonnement et parait également plus économique en terme énergétique (Styp-Rekowska et al., 2011). En effet, contrairement au bourgeonnement, l'intussusception ne nécessite ni une forte prolifération cellulaire, ni la dégradation de la MEC ou de la LB, ni l'envahissement des tissus environnants.

4. Interactions entre cellules neurales et réseau vasculaire

Il y a 476 ans, l'anatomiste Andreas Vesalius remarquait déjà des similarités entre les réseaux vasculaires et nerveux périphériques (Vesalius, 1543). En effet, le développement des réseaux vasculaires et nerveux semble étroitement lié. On parle de congruence neurovasculaire au niveau périphérique, avec de façon quasiment systématique un nerf entouré d'une artère et d'une veine (Carmeliet and Tessier-Lavigne, 2005; Larrivée et al., 2009).

Le développement de ces deux réseaux au sein du SNC est également inter-régulé et hautement coordonné, les deux réseaux nécessitant une croissance et un guidage précis pour atteindre leurs cibles. Cependant, les mécanismes impliqués semblent plus complexes que pour la congruence neurovasculaire périphérique (Andreone et al., 2015). La chronologie du développement vasculaire et neural du SNC est schématisée dans la Figure 18.

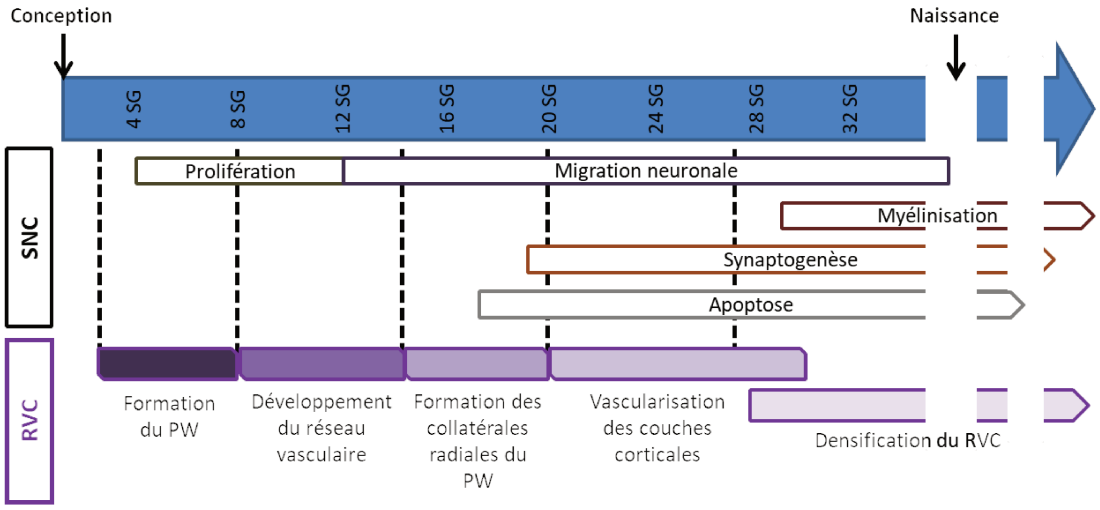


Figure 18 : Mise en parallèle du développement neural et du développement vasculaire.
PW : polygone de Willis ; RVC : réseau vasculaire cérébral ; SG : semaine de gestation, SNC : système nerveux central.

Dans le parenchyme cérébral, l'hypoxie relative est le déclencheur prédominant de l'expansion vasculaire. Les cellules neurales activées par l'hypoxie répondent par une sécrétion massive de VEGF, induisant l'angiogenèse. Une fois la normoxie rétablie, les taux de VEGF diminuent et stoppent les processus angiogéniques (Pugh and Ratcliffe, 2003). De plus, de nombreuses cellules telles que les cellules microgliales et les cellules de glie radiaire sont associées au réseau vasculaire et influencent sa densité et/ou son arborisation et/ou sa maturation. Les mécanismes d'action proposés mettent en jeu notamment la sécrétion de

VEGF, CXCL12 et la modulation de la voie Wnt-βcaténine (Errede et al., 2014; Lee and McCarty, 2014; Ma et al., 2013). La sécrétion microgliale des ligands Wnt5a et Wnt11 de cette voie inhibe l'angiogenèse par le *pathway* Wnt-Flt1 (Flt1 : VEGFR-1) en induisant l'expression de la forme soluble, inhibitrice de l'angiogenèse, du recepteur du VEGF (sFlt1);(Arnold and Betsholtz, 2013). Au contraire la sécrétion par les neuroblastes des ligands Wnt7a/7b/3a est impliquée dans le bourgeonnement vasculaire (Engelhardt and Liebner, 2014).

Réciproquement, par leur sécrétion de VEGF, les vaisseaux cérébraux agissent sur la neurogenèse, sur la multiplication et la migration des cellules microgliales (Forstreuter et al., 2002). Plus récemment, Park et ses collaborateurs en 2003, ont illustré une coordination systémique de la régulation de l'angiogenèse et de la neurogenèse en lien avec le VEGF et le BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*). Ils ont également passé en revue les rôles réciproques de plusieurs facteurs trophiques sur les cellules neurales et endothéliales, démontrant des interactions fortes, notamment par des facteurs tels que l'angiopoiétine 1 ou le NGF (pour revue Park et al., 2003).

Le réseau vasculaire a récemment été décrit comme support de la migration de plusieurs types de cellules neurales incluant les interneurones GABAergiques (Won et al., 2013) et les précurseurs d'oligodendrocytes (Tsai et al., 2016) en période périnatale. Les précurseurs d'interneurones des bulbes olfactifs migrent aussi le long des vaisseaux chez l'adulte et il a également été montré que les neuroblastes peuvent migrer avec le support des vaisseaux après une lésion cérébrale chez l'adulte (Saghatelyan, 2009).

IV. INTERFACE NEUROVASCULAIRE

Au sein du SNC, l'interface vasculaire est organisée autour de l'endothélium en étroite interaction avec plusieurs autres types cellulaires, formant ainsi un complexe cellulaire appelé l'unité neurovasculaire (UNV).

1. L'unité neurovasculaire

L'UNV est composée de plusieurs types cellulaires ; ***i)*** les cellules vasculaires incluant les cellules endothéliales vasculaires cérébrales (CEVC), des cellules vasculaires musculaires lisses et/ou de péricytes et ***ii)*** des cellules neurales, les astrocytes avec notamment les pieds astrocytaires, les neurones avec leurs terminaisons synaptiques et la microglie. La composition en types cellulaires est légèrement différente entre les artérioles ou les capillaires (Figure 19). Les artérioles sont entourées par des cellules musculaires lisses organisées en couches musculaires autour de la LB, alors que les péricytes des capillaires sont enchâssés dans la LB (Andreone et al., 2015).

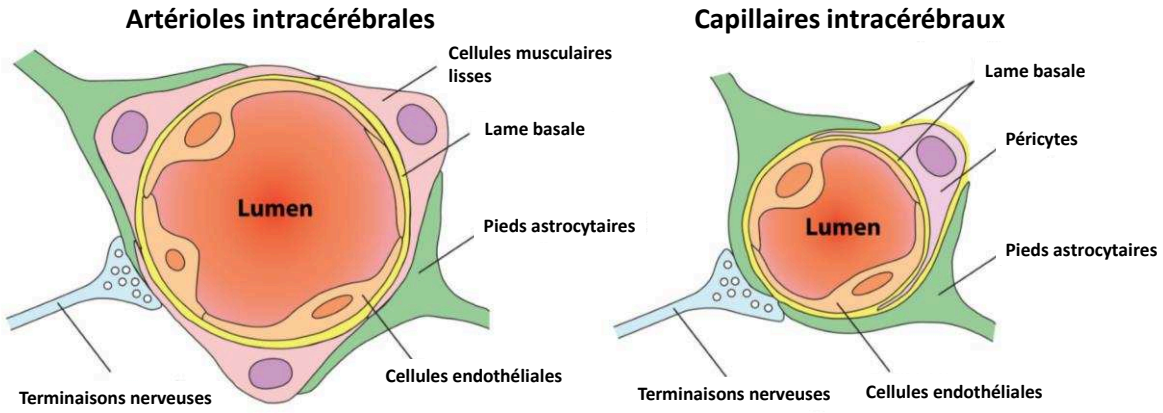


Figure 19 : Structure de l'unité neurovasculaire entre artérioles et capillaires cérébraux.
L'unité neurovasculaire est toujours constituée de cellules endothéliales, de pieds astrocytaires et de terminaisons nerveuses. La différence entre l'unité neurovasculaire des artérioles (gauche) et des capillaires (droite) porte sur le type de cellules contractiles : les cellules vasculaires musculaires lisses jouent ce rôle autour des artérioles alors que le sont les péricytes qui assurent cette fonction autour des capillaires intracérébraux. D'après Andreone et al., 2015

L'UNV assure trois grandes fonctions : l'apport en oxygène et en nutriment du cerveau, le drainage lymphatique du parenchyme et la fonction de niche neuro-vasculaire pour les cellules souches. Les vaisseaux cérébraux permettent d'alimenter le cerveau en nutriments et en oxygène. Les pieds astrocytaires, autour de la LB, délimitent un espace séparé du milieu extracellulaire neural, connu sous l'appellation d'espace de Virchow-Robin (Schoefl, 1963).

Plus récemment, cet espace a été proposé comme le support d'un drainage lymphatique spécifique du SNC : le système glymphatique (Iliff et al., 2012). Cet espace est présent très tôt dans le développement mais semble montrer une fonctionnalité réduite. En effet, le drainage glymphatique ne semble pas totalement fonctionnel en période périnatale (Palma et al., 2018). Les niches vasculaires sont caractérisées par une forte densité vasculaire et dans de nombreux cas par une interaction avec le liquide céphalo-rachidien (LCR);(pour revue Stolp and Molnár, 2015). Elles sont la source de cellules souches participant au développement cérébral ainsi qu'à la plasticité et à la récupération fonctionnelle chez l'adulte. Durant le développement, les niches vasculaires sont localisées dans les zones ventriculaires et sous-ventriculaires, lieu de forte prolifération neurale. Chez l'adulte, ces niches vasculaires sont plus restreintes et localisées principalement dans la zone sous-épendymère et dans la zone granulaire de l'hippocampe (Fuentealba et al., 2012; Licht and Keshet, 2015).

Durant le développement (stades embryonnaires tardifs et période post-natale précoce chez le rat), l'UNV subit une maturation et acquière ses caractéristiques de BHE (Lee et al., 2006b). Cependant, les étapes de maturation, leur chronologie et les éléments inducteurs associés sont encore sujet à débat. Sur la base d'observations en microscopie électronique, il apparaît que tous les vaisseaux et capillaires du SNC sont, dès leur émergence, associés à des pieds astrocytaires et montrent des caractéristiques de type BHE (Marín-Padilla, 2012). D'autre part, en conditions pathologiques, la BHE est parfois décrite comme sensible, parfois plus robuste en période périnatale (Fernandez-Lopez et al., 2012; Mallard et al., 2018).

Quelques régions cérébrales gardent toutefois une vascularisation sans les caractéristiques de BHE. Il s'agit des plexus choroïdes qui produisent le liquide céphalo-rachidien et des organes circumventriculaires qui constituent des interfaces sensibles aux hormones circulantes et les espaces neurosécréteurs (éminence médiane de l'hypothalamus, neurohypophyse).

Les fonctions de la BHE sont multiples. En effet, tout en l'isolant du compartiment sanguin et en régulant l'homéostasie cérébrale, elle permet un apport en nutriments au parenchyme. Toutes ces fonctions sont assurées de façon dynamique à l'aide d'interactions complexes entre les différents composants de l'UNV.

2. La barrière hémato-encéphalique

a. Rappel historique

Les premiers travaux ayant mis en évidence l'existence de la BHE remontent à la fin du XIXème, début du XXème siècle, lorsque Paul Ehrlich a démontré que l'injection d'un colorant vital dans le système circulatoire des mammifères entraînait le marquage de tous les organes excepté le cerveau et la moëlle épinière (Ehrlich, 1885, 1906). Quelques années plus tard, Goldmann montra un effet réciproque en injectant du bleu trypan directement dans le liquide céphalo-rachidien, marquant alors tout le SNC mais aucun organe périphérique (Goldmann, 1913), suggérant ainsi l'existence d'une barrière entre le sang périphérique et le SNC. Des études supplémentaires ont permis de mettre en évidence que les CEVC étaient le support majeur de la fonction de BHE par des approches comparant la diffusion de la peroxydase de raifort entre des lignées de cellules endothéliales périphériques et du SNC (Reese and Karnovsky, 1967). Au niveau histologique, les vaisseaux cérébraux ne sont pas fenestrés contrairement aux vaisseaux des organes circumventriculaires (Engelhardt, 2003; Fenstermacher et al., 1988). Au niveau moléculaire, un marqueur de vaisseaux non fenestrés est identifié dans les cellules endothéliales cérébrales (AHNAK);(Gentil et al., 2005). De plus, des études récentes ont permis de mettre en évidence des différences entre le transcriptome des cellules endothéliales cérébrales comparées à celui de cellules endothéliales issues de foie ou de poumon. Ainsi, les cellules endothéliales issues de cerveau montrent des expressions spécifiques concernant notamment les transporteurs de la famille SLC (*solute carriers transporter*) et les protéines de jonctions serrées dénotant une forte spécialisation de ces cellules (Daneman et al., 2010a).

La BHE est aujourd'hui considérée comme la fonction complexe de l'endothélium vasculaire cérébral reposant sur ; ***i)*** une barrière physique s'opposant à l'extravasation et à la diffusion passive de molécules ***ii)*** des systèmes de transports sélectifs qui pallient cette quasi-imperméabilité ***iii)*** une barrière métabolique (pour revue Goasdoué et al., 2017)

b. Support de la barrière hémato-encéphalique, la cellule endothéliale

Il est maintenant admis que les cellules endothéliales cérébrales constituent la base anatomique et fonctionnelle de la BHE (Hawkins and Egleton, 2006). Les CEVC forment une barrière physique mais également une zone d'échanges contrôlés entre le sang et le parenchyme (Figure 20).

Cette fonction de barrière physique est assurée par la présence de jonctions serrées (TJ), qui permettent aux CEVC des capillaires de restreindre de façon drastique le passage paracellulaire passif d'ions, de nutriments et de bloquer le passage des protéines sériques (Hawkins and Davis, 2005; Reese and Karnovsky, 1967). Les protéines des TJ sont les claudines et l'occludine (Figure 20). Les jonctions adhérentes ; cadhérines, caténines et les JAM (*junctional adhesion molecules*), ainsi que les protéines jonctionnelles accessoires ZO (*zonula occludens*) renforcent les TJ en les associant avec le cytosquelette et notamment les fibres d'actine, formant une ceinture hermétique proche du pôle apical des cellules endothéliales (Cardoso et al., 2010). En plus de la restriction du passage paracellulaire des molécules, les CEVC ont la particularité, comparées aux cellules endothéliales périphériques, d'avoir un taux remarquablement bas d'activité pinocytotique (la pinocytose correspondant à l'endocytose non spécifique par invagination de la membrane plasmique) (Reese and Karnovsky, 1967; Siegenthaler et al., 2013). Enfin, les cellules endothéliales cérébrales expriment de nombreuses enzymes spécifiques de détoxification (enzymes de type GST, UGT) qui dégradent les composés exogènes ou endogènes lipophiles, en composés hydrophiles pour lesquels la BHE est imperméable (el-Bacha and Minn, 1999; Ouzzine et al., 2014). Ces différentes caractéristiques restreignent les transports passifs et non spécifiques, bloquant ainsi le passage de toxines ou de pathogènes potentiels au sein du SNC et constituant la barrière physique formée par les CEVC.

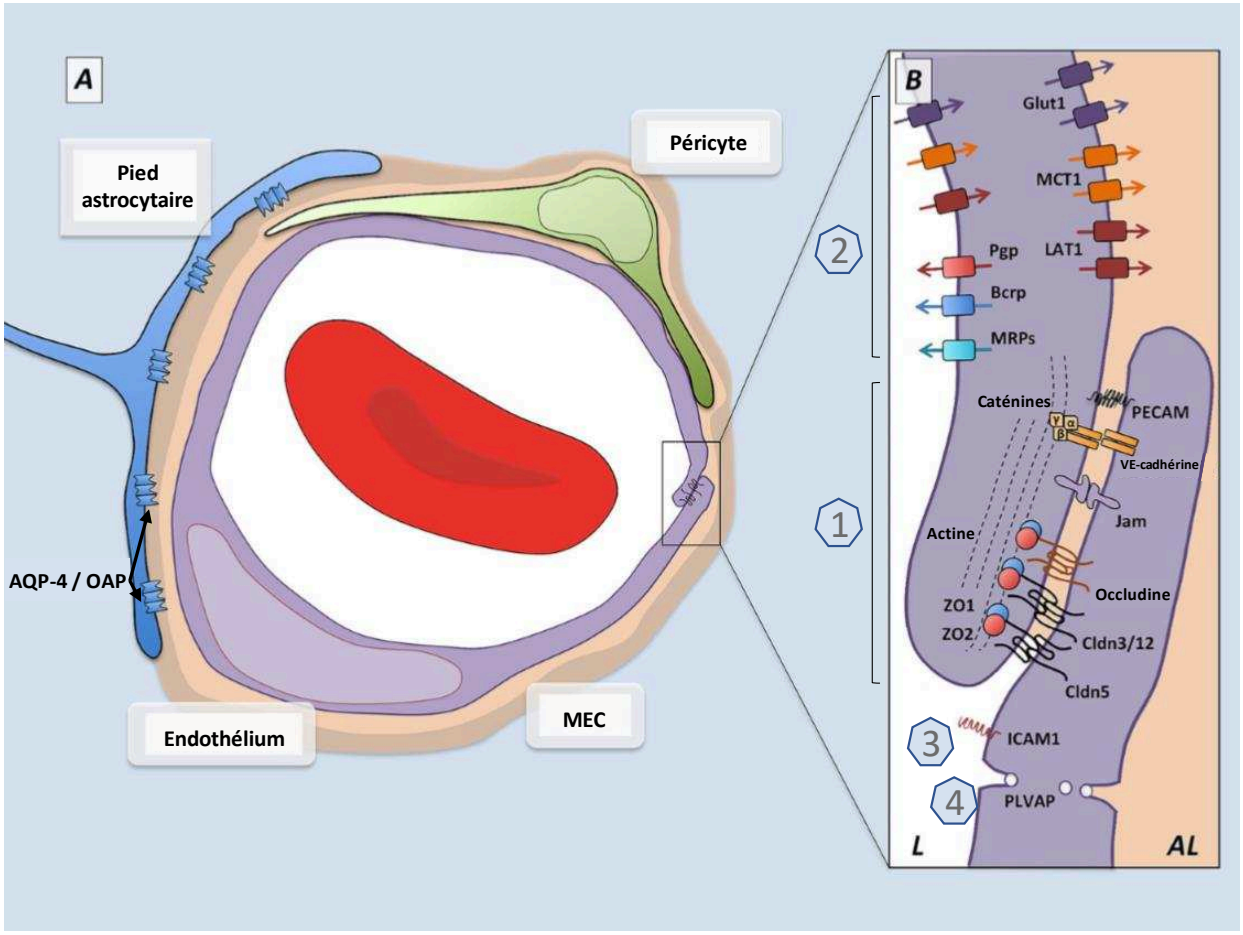


Figure 20 : Propriétés de barrière hémato-encéphalique des cellules endothéliales vasculaires cérébrales.
A : élément de la barrière hémato-encéphalqiue. B : Vue schématique des éléments spécifiques des cellules endothéliales qui caractérisent la fonction de barrière hémato-encéphalique (BHE) et définissent un pôle luminal (L) et un pôle abluminal (AL) des cellules endothéliales. Cette polarisation fait partie des caractéristiques de la BHE. Les cellules endothéliales vasculaires cérébrales sont le support de la BHE par : (1) l'expression de nombreuses jonctions serrées et adhérentes ; (2) la présence de transporteurs spécifiques d'influx, d'efflux et de détoxification ; (3) un faible taux d'expression de LAM (leukocyte adhesion molecules) limitant l'adhésion et donc le passage de cellules immunitaires et préservant ainsi le statut immuno- privilégié du système nerveux central ; (4) un faible taux de pinocytose. AQP-4 / OAP (aquaporine-4 / orthogonal array of particles); Glut1 (Glutamate transporter-1) ; MCT1 (Monocarboxylate transporter-1) ; LAT1 (L-type amino-acid transporter-1) ; Pgp (P-glycoprotein) ; Bcrp (Breast cancer resistance protein) ; MRPs (multi drug resistance associated proteins) ; Jam (junctional adhesion molecules) ; ZO (Zonula occludens) ; Cldn (Claudine) ; ICAM1 (Inter-cellular adhesion molecule 1) ; PLVAP (Plasmalemma vesicle-assiociated protein). D'après Siegenthaler et al., 2013.

Pour compenser cette imperméabilité, ces cellules sont pourvues de nombreux transporteurs spécifiques permettant : ***i)*** l'apport en nutriments et ions essentiels aux cellules du parenchyme ; ***ii)*** le maintien de l'équilibre ionique notamment nécessaire au bon fonctionnement des systèmes de transport et à l'homéostasie cellulaire ; ***iii)*** la neutralisation et l'évacuation des substances exogènes (xénobiotiques, métabolites, protéines sériques…) potentiellement neurotoxiques (el-Bacha and Minn, 1999; Saunders et al., 2013) (Figure 20). La sélectivité et la saturabilité des systèmes de transport permettent de limiter la nature et la quantité des entrants.

L'apport en nutriments et ions essentiels est assuré par la famille des SLC qui regroupe plus de 300 protéines. GLUT-1 (*glucose transporter 1* ; Slc2a1) est le principal transporteur du glucose exprimé par les CEVC. Au cours du développement, il est présent très tôt mais il est minoritaire par rapport à MCT-1 (*monocarboxylate transporter 1* ; Slc16a1) qui permet les apports en sucres courts, lesquels constituent le substrat préférentiel des populations neuronales immatures (Baud et al., 2003; Legros et al., 2009). Le transport de molécules (immunoglobulines, hormones) à travers la BHE est également assuré par des mécanismes d'endocytose spécifiques (en opposition à la pinocytose, non spécifique) médiés par des récepteurs (Smith and Gumbleton, 2006).

Les transports d'ions essentiels (Fe^{2+}, Cu^{2+} et Mg^{+}) et l'équilibre ionique est également assuré par des protéines de la famille SLC (Slc48a1, Slc31a1, Slc41a1 …). Cette famille comprend des échangeurs d'ions ainsi que des co-transporteurs (antiports et symports) qui permettent de maintenir les gradients ioniques de façon dépendante de l'ATP. Les transports trans-endothéliaux au niveau de la BHE sont très consommateurs en énergie. Ainsi, la déplétion en ATP lors d'une ischémie, peut produire des déséquilibres des gradients ioniques et conduire à l'apparition d'œdèmes cérébraux, de types cytogénique et/ou vasogénique.

La neutralisation et/ou l'évacuation des composés potentiellement toxiques se font par des systèmes enzymatiques de détoxification ainsi que des systèmes d'efflux (Golden and Pollack, 2003; Kusuhara and Sugiyama, 2005). Les systèmes d'efflux empêchent le passage des composés exogènes depuis le compartiment sanguin vers le parenchyme et participent également à l'extraction des métabolites potentiellement toxiques produits dans le parenchyme, vers le compartiment sanguin. Les systèmes d'efflux reposent notamment sur des transporteurs de la famille ABC (*ATP binding cassette*), qui nécessitent la dégradation d'ATP (transporteurs Pgp, MRP…), ainsi que sur des transporteurs de neurotransmetteurs. Ainsi, on peut noter la présence de transporteurs du glutamate (EAAT pour *excitatory amino acid transporter)* au niveau des cellules endothéliales de la BHE indiquant que celles-ci participent également à la capture du glutamate extracellulaire (Lecointre et al., 2014; Saunders et al., 2013).

D'autre part, les cellules endothéliales de la BHE : ***i)*** expriment peu de protéines d'adhésion des leucocytes ou LAM (*leukocyte adhesion molecules*), ce qui conduit à ce que le SNC est un environnement immuno-privilégié (Rössler et al., 1992) ; ***ii)*** possèdent une charge

de surface négative qui permet la répulsion des composés chargés négativement (de Boer and Gaillard, 2006) et ***iii)*** sont plus riches en mitochondries que les cellules endothéliales d'autres organes. Ces mitochondries subviennent aux besoins en ATP des CEVC, leur permettant ainsi d'assurer les fonctions de transport spécifique particulièrement énergivores (de Boer and Gaillard, 2006; Cardoso et al., 2010; Persidsky et al., 2006).

Les spécificités des CEVC qui leur confèrent les propriétés de la BHE résultent de l'induction de leur différenciation par d'autres composants cellulaires de l'UNV, aussi bien vasculaires (LB et péricytes) que neuraux (terminaisons neuronales, microglie et pieds astrocytaires).

c. La lame basale

La lame basale est un élément essentiel de l'UNV et de la BHE. Elle est le support physique des CEVC, elle contient les péricytes et elle permet la connexion avec les cellules neurales environnantes (Carvey et al., 2009). Les cellules endothéliales, les péricytes et les astrocytes contribuent à sa formation. Elle contient des protéines structurelles (les collagènes et l'élastine), des protéines d'adhésion (les laminines, la fibronectine et les intégrines), des protéoglycanes ainsi que des protéines de signalisation (Baeten and Akassoglou, 2011; Carvey et al., 2009) (Figure 21).

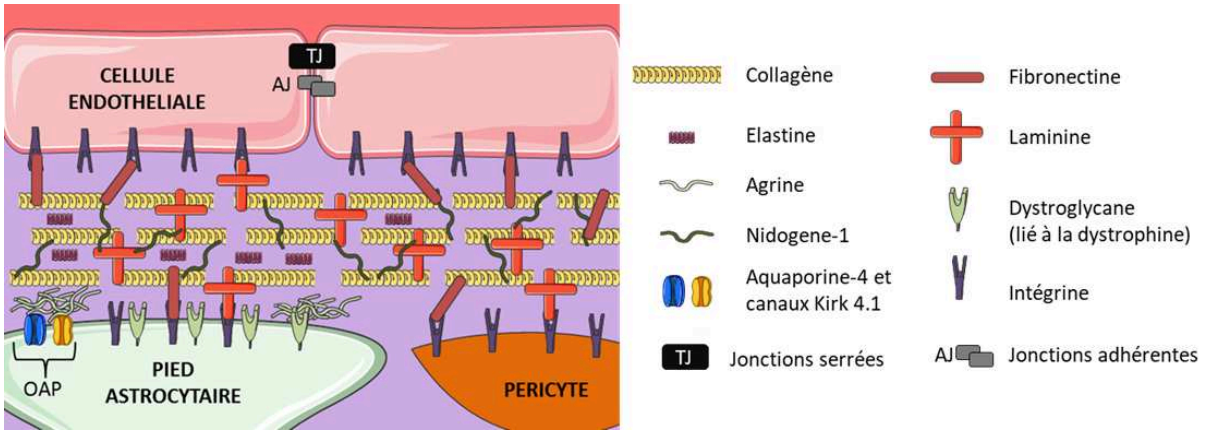


Figure 21 : Schéma de la lame basale dans l'unité neurovasculaire.
OAP : orthogonal array of particles. D'après Baeten and Akassoglou, 2011

La dégradation de la LB mène à une altération du cytosquelette des CEVC, ce qui entraîne leur mort par anoïkis, affecte le maintien des jonctions serrées et à terme l'intégrité

de la BHE. Plusieurs classes de protéases peuvent être à l'origine d'une dégradation de la LB, les MMPs et les activateurs du plasminogène étant parmi les plus décrites (Fredriksson et al., 2017). Le rôle de ces protéases est essentiel lors du développement, par exemple lors des processus d'angiogenèse et de migrations cellulaires (Carmeliet and Jain, 2011; Seeds et al., 1999). Leur activité dérégulée est également associée à de nombreuses pathologies (l'accident vasculaire cérébral, les maladies neurodégénératives de type Alzheimer, Parkinson…) chez l'adulte et chez le jeune (Adibhatla and Hatcher, 2008; Rempe et al., 2016; Vandooren et al., 2013).

Pendant longtemps, la BHE a été considérée comme étant moins « étanche » à la diffusion paracellulaire, moins fonctionnelle, plus fragile ou, dans tous les cas, immature au cours du développement fœtal puis en période périnatale comparée à la BHE du cerveau adulte (pour revue Stolp et al., 2016). Cette idée était soutenue par le fait que les astrocytes, présentés comme les cellules inductrices des propriétés de barrière des cellules endothéliales, maturaient tardivement au cours du développement (Daneman et al., 2010b; Janzer and Raff, 1987). Des données plus récentes remettent en cause cette idée de BHE non fonctionnelle au cours du développement. Il semble acquis que les péricytes, en place plus tôt que les astrocytes, sont indispensables au développement des caractéristiques de BHE des cellules endothéliales (pour revue Sweeney et al., 2016);(voir chapitre suivant). Il est maintenant établi que les cellules endothéliales de la BHE expriment les TJ fonctionnelles très tôt au cours du développement embryonnaire, à partir de E13 chez la Souris et dès la 8ème SG chez l'Homme (Ek et al., 2006, 2012). Néanmoins, il existe des différences, au minimum structurales, entre les microvaisseaux néonataux et d'adultes (Fernandez-Lopez et al., 2012). L'étude détaillée des contenus protéiques et des niveaux d'expression en ARN des microvaisseaux montre des évolutions marquées entre 5 et 10 jours chez la souris, quantitativement et qualitativement plus amples qu'entre 10 jours et l'âge adulte (figure 22). Ces différences portent notamment sur la composition de la MEC et de la LB, les taux de protéases, de leurs inhibiteurs et des jonctions inter-cellulaires (Porte et al., 2017a). Les protéines de TJ sont présentes très tôt au cours du développement mais la composition à P5 de ces espaces extracellulaires (diversité des collagènes, pauvreté en collagène IV et en laminines) pourrait sous tendre à une cohésion vasculaire limitée à ce stade. À cela s'ajoutent une plus grande diversité d'expression de protéases à P5 qu'à P10 et réciproquement, une apparition tardive de nombreux inhibiteurs de protéases, exprimés seulement à partir de P10

(Porte et al., 2017a). Une autre grande différence entre les micro-vaisseaux à P5 et à P10 concerne le métabolisme énergétique. En effet, les micro-vaisseaux à P5 utilisent majoritairement le glucose par la glycolyse alors que les micro-vaisseaux à P10 ou à l'âge adulte expriment préférentiellement les enzymes de la chaîne respiratoire (Porte et al., 2017b). Enfin, chez l'adulte les éléments de le BHE peuvent varier le long de l'arbre vasculaire (entre capillaires et veinules), il est probable qu'il en soit de même pendant le développement (Macdonald et al., 2009).

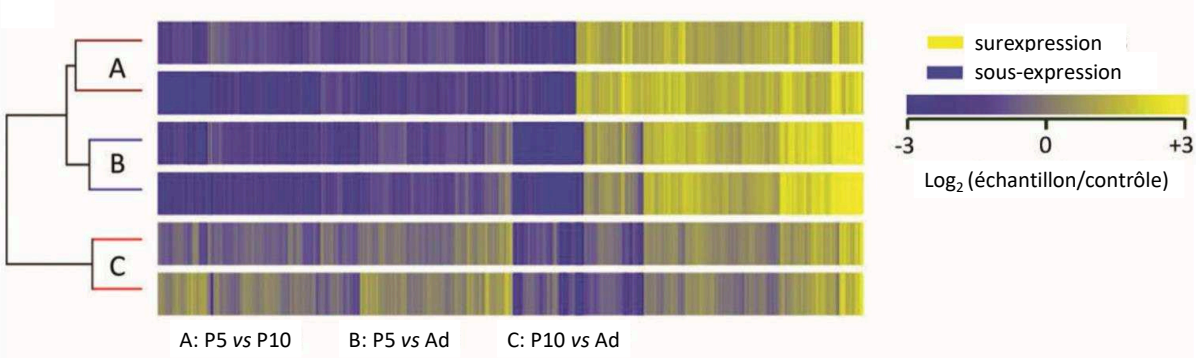


Figure 22 : Comparaison du transcriptome des micro-vaisseaux cérébraux au cours du développement chez la Souris. *Dendrogramme représentant deux réplicats techniques de trois expériences visant à comparer l'expression des transcrits des micro-vaisseaux au cours du développement. Chaque bande représente une analyse comparée des transcrits à deux stades développementaux.* ***A*** *: comparaison entre les transcrits de micro-vaisseaux extraits chez la souris de 5 et 10 jours ;* ***B*** *: comparaison entre les transcrits de micro-vaisseaux extraits chez la souris de 5 jours et de souris adultes (Ad) ;* ***C*** *: comparaison entre les transcrits de micro-vaisseaux extraits chez la souris de 10 jours et de souris adultes. Chaque raie représente un gène parmi les 6018 évoluant d'un facteur > 2 entre deux stades. En jaune sont représentés les surexpressions et en bleu les sous-expressions. D'après Porte et al., 2017a.*

d. Cellules associées à la barrière hémato-encéphalique

Les péricytes sont les cellules contractiles des capillaires (pour revue voir Sweeney et al., 2016). Leur activité contractile, soutenue par la présence de fibres d'α-actine (codée par le gène Acta2) et de différents isotypes de myosines des muscles lisses, participe à la régulation du FSC (Hamilton et al., 2010; Peppiatt et al., 2006). Les péricytes sont enchâssés dans la LB, en étroite interaction avec les cellules endothéliales (Figure 19). Durant le développement, les cellules endothéliales recrutent les péricytes par chemotactisme au moyen de la sécrétion de PDGF-β qui se lie aux récepteurs β du PDGF exprimés à la membrane des péricytes (Hellström et al., 1999). Les péricytes participent au développement de la vascularisation, à l'induction et au maintien de l'intégrité de la BHE par la voie de signalisation du PDGF- β, primordiale dans la communication avec les CEVC (Winkler et al., 2011). Des souris

déficientes en PDGF-β ou en son récepteur ne sont pas viables et meurent au stade embryonnaire par des instabilités vasculaires causant des hémorragies. En utilisant des souris partiellement déficientes en péricytes (invalidées pour des gènes de la voie de signalisation du PDGF-β), Daneman et collaborateurs ont montré que si les péricytes n'induisent pas l'expression de gènes codant les protéines de jonctions tels que l'occludine ou la claudine 5, ils répriment l'expression de gènes codant des protéines responsables de la perméabilité vasculaire (Angiopoiétine 1) et de l'infiltration des cellules immunitaires (LAMs) dès la période embryonnaire (Daneman et al., 2010b). De même, Armulik et collaborateurs ont démontré à l'aide de souris adultes viables, mais déficientes en péricytes, une corrélation entre la perte de couverture péricytaire et l'augmentation de la perméabilité de la BHE chez ces souris (Armulik et al., 2010). Les mécanismes d'interaction entre les péricytes et les CEVC impliquent notamment des actions paracrines par la sécrétion de TGF-β, de PAI-1, de VEGF et de MMP-9 (Bell et al., 2012; Dohgu et al., 2011; Li et al., 2011; Thanabalasundaram et al., 2010). Des dérégulations des voies de signalisation du TGF-β, du VEGF-A ou de l'angiopoiétine 2, sont associées aux dysfonctions endothéliales observées à la suite d'un phénomène hypoxo-ischémique ou dans l'apparition d'hémorragies (Sweeney et al., 2016).

Les astrocytes participent à l'induction des propriétés de BHE des CEVC et recouvrent de leurs prolongements (pieds astrocytaires) 99% de l'endothélium cérébral à son pôle abluminal (Alvarez et al., 2013; Hawkins and Davis, 2005; Yamagata et al., 1997). Des cellules endothéliales mises en coculture avec des astrocytes ou avec des milieux conditionnés d'astrocytes développent des propriétés de barrière telles qu'une forte expression de TJ, de la protéine AHNAK (associée à ZO-1 à la membrane des cellules endothéliales) et du transporteur Pgp (Berezowski et al., 2004; Boveri et al., 2005; Gentil et al., 2005). Cela se traduit par une plus grande résistance électrique trans-endothéliale. D'autres expériences de cocultures montrent également un rôle majeur des astrocytes dans la synthèse des protéoglycanes se retrouvant à terme à la membrane apicale des cellules endothéliales (Bernoud et al., 1998).

Les pieds astrocytaires sont le site des échanges hydriques entre le plasma et le milieu extracellulaire du parenchyme via l'aquaporine 4 (AQP-4), une protéine transmembranaire intégrale dont l'arrangement en OAP (*orthogonal array of particles*) forme des pores perméants à l'eau et aux ions. L'AQP-4 est l'AQP majoritaire au niveau du SNC, elle est

exprimée de façon spécifique au niveau des pieds astrocytaires, au niveau de la BHE (Figure 20) et de la barrière cerveau-fluide cérébrospinal. L'étude de souris invalidées pour l'AQP-4 démontre son rôle : ***i)*** dans la migration *in vitro* et *in vivo* des cellules microgliales, ***ii)*** dans la transduction du signal neural probablement secondaire à un déficit de passage de l'ion K^+ chez ces souris et ***iii)*** dans l'apparition et la résorption de l'œdème cérébral (Verkman et al., 2006). Les astrocytes communiquent avec les CEVC par la sécrétion de différents facteurs. Cette signalisation module l'angiogenèse et participe à l'induction et au maintien des propriétés de BHE *via* des acteurs communs tels que sonic Hedgehog, les angiopoiétines 1 et 2, le VEGF, le TGF-β ou le FGF (pour revue Alvarez et al., 2013). Elle participe également à la régulation du couplage neurovasculaire par d'autres acteurs tels que l'acide arachidonique, le NO, les prostaglandines et le K^+ (Attwell et al., 2010).

À côté de leur fonction de barrière, les vaisseaux cérébraux participent activement au maintien de l'activité cérébrale par l'adaptation du flux au niveau de l'UNV. Le couplage neuro-vasculaire, qui assure cette adéquation du flux avec la demande énergétique liée à l'activité neuronale nécessite que les neurones communiquent directement avec les composantes cellulaires de l'UNV. Cette action s'effectue par des projections directes sur les cellules endothéliales ou par des projections sur les pieds astrocytaires permettant la communication avec les péricytes et les cellules endothéliales (Hawkins and Davis, 2005). La régulation du FSC par les pieds astrocytaires et les péricytes en réponse à l'activité neurale est également décrite dans de nombreux travaux (Hamilton et al., 2010; Itoh and Suzuki, 2012; Peppiatt et al., 2006). Elle semble régulée par différents facteurs vasoconstricteurs tels que le NO, l'endothéline 1 ainsi que par la stimulation de récepteurs purinergiques sensibles à l'ATP. Les récepteurs purinergiques exprimés entre les pieds astrocytaires sont associés à des jonctions communicantes (essentiellement formées de tubulines et de connexines) qui permettent la synchronisation des astrocytes par la propagation des vagues calciques (Simard et al., 2003). Cette synchronisation permet de moduler des réponses calciques entre neurones, astrocytes, péricytes et cellules endothéliales nécessaires au couplage neuro-vasculaire qui sous-tend l'adaptation du FSC en fonction de la demande énergétique (Gu et al., 2018; Simard et al., 2003).

Contrairement à la BHE qui semble établie précocement, le couplage neurovasculaire ne semble fonctionnel qu'à partir de quelques semaines post-natales aussi bien chez l'Homme

que chez le rongeur (Andreone et al., 2015). En effet, lors d'une stimulation sensorielle (des vibrisses chez le rat) on observe une augmentation de la consommation d'oxygène (signal BOLD pour *Blood Oxygen Level Dependent signal* en imagerie fonctionnelle) correspondant à une augmentation locale du FSC dans les régions correspondantes (Chow et al., 2017). Ce n'est pas le cas chez l'enfant nouveau-né (stimulations auditives) ou chez le raton, chez lesquels les signaux BOLD sont négatifs (Anderson et al., 2001a; Kozberg et al., 2013). Ces signaux négatifs sont interprétés comme une diminution de la perfusion ou comme une augmentation de la consommation d'oxygène. Chez le prématuré, des hypo- hyperperfusions sont observées selon les régions cérébrales et l'hémodynamique, même en l'absence de lésion (Bouyssi-Kobar et al., 2018).

En l'absence de couplage neurovasculaire, le cerveau du nouveau-né doit utiliser des moyens alternatifs afin de coordonner sa demande énergétique et ses apports. Un des mécanismes proposés est l'induction de l'angiogenèse directement par l'activité neuronale. En effet, il a été démontré qu'une stimulation sensorielle pendant le développement post-natal chez la souris, promeut la formation du réseau vasculaire (Lacoste et al., 2014). Cependant, cette adaptation ne s'effectue pas dans les mêmes délais qu'une adaptation de la perfusion et peut donc être trop lente pour pallier une insuffisance aiguë.

Les cellules microgliales sont les cellules immunitaires du SNC, elles envahissent le parenchyme cérébral tôt dans le développement depuis le sac vitellin entre E8 et E12, avant même le début du développement vasculaire (Barger et al., 2018; Ginhoux et al., 2010; Reemst et al., 2016). En contexte pathologique, une autre source de cellules microgliales peut provenir des monocytes circulants qui s'infiltrent dans le parenchyme et peuvent acquérir un phénotype de type microglial activé (Zlokovic, 2008). L'hypothèse a été faite, du fait de leur arrivée précoce et de leur localisation périvasculaire, d'un rôle possible de la microglie dans l'angiogenèse. Plusieurs travaux montrent qu'une déplétion génétique en microglie durant le développement conduit *in vivo* à une vascularisation plus éparse de la rétine (Checchin et al., 2006; Fantin et al., 2010; Rymo et al., 2011). Une étude récente montre que la microglie activée par le LPS serait plus particulièrement activatrice de l'angiogenèse rétinienne (Ding et al., 2018). En revanche, la microglie ne semble pas participer aux phénomènes d'induction, ni de maintien de propriété de BHE par les CEVC (Dudvarski Stankovic et al., 2016). Leur rôle consisterait donc essentiellement à la surveillance et au maintien de l'homéostasie cérébrale.

3. La barrière hémato-encéphalique en condition pathologique en période néonatale

a. L'inflammation

En conditions physiologiques, la BHE limite les transferts et régule aussi la circulation des cellules immunitaires circulantes. Il est admis qu'en conditions pathologiques, tous les types de cellules du SNC libèrent/sécrètent de nombreux médiateurs, incluant des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF-α, l'IL1-β, le NO, l'endothéline-1 et le glutamate qui peuvent augmenter la perméabilité de la BHE (Ballabh et al., 2004b; Didier et al., 2003). L'inflammation entraîne la surexpression de molécules d'adhésion cellulaire (ICAM-1 et VCAM-1) au niveau de la lumière vasculaire, favorisant ainsi l'infiltration de lymphocytes circulants (Engelhardt et al., 1994; Park et al., 2009; Stolp et al., 2013). Ces phénomènes inflammatoires inducteurs d'une perméabilisation de la BHE participent activement à l'apparition de lésions périnatales, notamment de la substance blanche (Favrais et al., 2011; Moretti et al., 2015; Stolp et al., 2005). La fuite de protéines plasmatiques consécutive à la perméabilisation de la BHE au niveau de la substance blanche pourrait être à l'origine d'un processus inflammatoire local et donc, de dommages cellulaires (Back et al., 2002; Stolp and Dziegielewska, 2009; Wagner et al., 2005). En période périnatale, l'inflammation systémique participe aussi à l'aggravation des phénomènes excitotoxiques dus à l'accumulation de glutamate extracellulaire (Adén et al., 2010; Favrais et al., 2007, 2011). L'acteur principal de l'inflammation du SNC reste cependant la microglie, à court et à long terme (Fleiss et al., 2012; Tahraoui et al., 2001). La microglie activée soit par une infection périphérique, soit par la présence de facteurs sériques ou de débris cellulaires suite à une nécrose, affecte le cerveau en développement par : ***i)*** la sécrétion d'un large panel de cytokines/chemokines pro-inflammatoires (IL1-β, TNF-α, CCL3,7,12, CXCL12…);(Kaur et al., 2017) ; ***ii)*** la production de ROS et de NO via une augmentation microgliale de iNOS (NOS inductible) engendrant un stress oxydant (Kaur et al., 2006; Murugan et al., 2011). Ces sécrétions affectent potentiellement toutes les cellules du SNC. L'impact de la microglie sur les CEVC étudié *in-vitro* montre une réorganisation des TJ, une diminution de la résistance trans-endothéliale et une augmentation du transport paracellulaire de sodium-fluorescéine, signe d'une dysfonction de la BHE (Nishioku et al., 2010; Sumi et al., 2010).

L'activation des cellules microgliales peut aussi résulter de l'activation des récepteurs TLR (*toll-like receptor*), TLR-4 et TLR-3 sensibles au PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Pattern,* comme le LPS ou de l'ARN viral). Les TLR entraînent une activation des voies intracellulaires telles que NF-κB, JAK/STAT, IRF3, Notch-1, JNK et p38 MAPK (Kaur et al., 2017; Nishioku et al., 2010; Stridh et al., 2013; Yao et al., 2013)

De plus, certaines cytokines pro-inflammatoires entraînent l'activation de protéases de la MEC et notamment de la MMP-9 et en retour celle-ci augmente, en un cercle vicieux, l'expression de cytokines pro-inflammatoires et de la iNOS dans la microglie. Ces actions de la MMP-9 semblent passer par une activation des voies intracellulaires NFkB, AP-1 et MAPK dans les cellules microgliales (McColl et al., 2008; Woo et al., 2008). Ces protéases, notamment d'origine vasculaire sont décrites comme les effectrices finales de la perméabilisation de la BHE par la dégradation de la LB, de la MEC et des protéines de jonctions serrées (Candelario-Jalil et al., 2009).

b. Les phénomènes d'hypoxie-ischémie

Les phénomènes d'HI en période périnatale sont également des facteurs inducteurs d'inflammation (Albertsson et al., 2014) et en conséquence d'altérations de la BHE (pour revue Baburamani et al., 2012; Kratzer et al., 2014). Les différents éléments de l'UNV sont mis en cause dans ces atteintes (Figure 23).

La surexpression de facteurs pro-angiogéniques (HIF, VEGF) et de leur récepteur (VEGFR-1) par les cellules endothéliales, les astrocytes ou les péricytes, peut entraîner une augmentation de la perméabilité vasculaire (Carmeliet and Storkebaum, 2002; Sköld and Kanje, 2008). D'autre part, un élément clef de la fragilisation vasculaire à la suite d'une HI est l'activation des protéases dégradant la LB ainsi que la MEC (pour revue Rempe et al., 2016). Ces aspects seront développés dans le chapitre V.

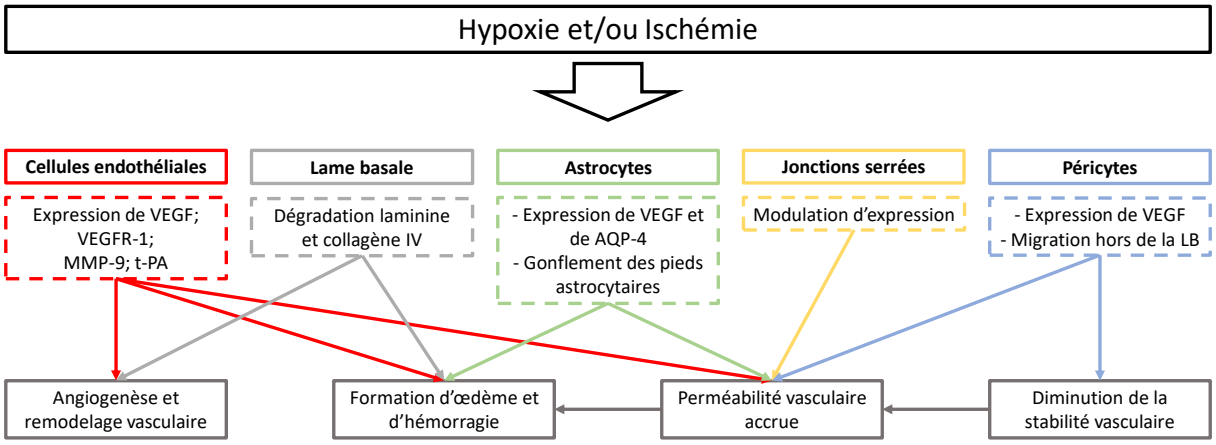


Figure 23 : Conséquences de phénomènes d'hypoxie et/ou d'ischémie sur les composants de l'unité neurovasculaire.
À la suite d'une hypoxie et/ou ischémie, les cellules endothéliales expriment un large spectre de molécules comme des protéases et des facteurs angiogéniques, la lame basale est dégradée, un gonflement des pieds astrocytaires survient, l'expression des jonctions serrées est modulée et les péricytes peuvent migrer hors de la lame basale. Ces réponses cellulaires participent aussi bien aux phénomènes d'angiogenèse et de remodelage vasculaire, qu'à l'altération de la stabilité et de la perméabilité vasculaire pouvant mener à terme à la formation d'œdème et d'hémorragie cérébrale. VEGF/R : vascular endothelial growth factor/receptor ; AQP-4 : aquaporine-4 ; LB : lame basale ; MMP-9 : gélatinase B ; tPA : activateur tissulaire du plasminogène. Adapté de Baburamani et al., 2012.

c. L'œdème cérébral

La conséquence systématique d'une atteinte de l'UNV et de la BHE est l'œdème cérébral vasogénique. Les différentes formes d'œdème peuvent être classées en trois grandes catégories : ***i)*** l'œdème cytotoxique, ***ii)*** l'œdème ionique et ***iii)*** l'œdème vasogénique (pour revue Michinaga and Koyama, 2015). L'œdème cytotoxique se caractérise par un changement de compartiment de l'eau au sein même du parenchyme. Lors d'une ischémie par exemple, la déplétion en ATP entraîne un dysfonctionnement des pompes Na/K-ATPase responsables d'une accumulation de sodium intracellulaire, menant à un gonflement cellulaire par entrée d'eau. Dans le cerveau, les premières cellules atteintes sont les astrocytes et les neurones, on observe notamment un gonflement des pieds astrocytaires dans un délai très court après une HI. L'œdème ionique correspond à un état transitoire consécutif à l'œdème cytotoxique au cours duquel les cellules endothéliales relarguent beaucoup de sodium dans le parenchyme pour rétablir l'équilibre ionique perturbé (Kahle et al., 2009). Cet influx sodique est accompagné d'une entrée d'eau dans le parenchyme depuis le compartiment vasculaire, sans rupture de la BHE. Les œdèmes cytotoxique et ionique, s'ils ne sont pas résolus, peuvent mener à l'œdème vasogénique. Celui-ci est caractérisé par une rupture de la BHE entrainant une extravasation de protéines sériques accompagnée d'eau dans le parenchyme. Ainsi, la

mesure de l'œdème, accessible par imagerie IRM en particulier, est un bon critère d'évaluation de l'intégrité de la BHE. Cependant, l'imagerie IRM en séquence T2 ne permet pas de différencier l'œdème ionique de l'œdème vasogénique qui représentent pourtant des stades différents de l'atteinte de la BHE.

L'œdème est une conséquence de la plupart des atteintes cérébrales (traumatismes, évènements hypoxo-ischémiques, infections…) et peut entrainer une aggravation des séquelles par augmentation de la pression intracrânienne, entraînant une mort cellulaire supplémentaire. Cependant, il n'apparaît pas, à lui seul, comme facteur de risque de séquelles neurodéveloppementales (Volpe, 2009)

L'AQP-4, de par sa localisation sur les pieds astrocytaires et son rôle dans les échanges hydriques entre le plasma et le parenchyme, est un acteur principal de la formation et de la résorption de l'œdème cérébral (Badaut et al., 2011; Clément et al., 2018; Fukuda and Badaut, 2012).

V. LES PROTÉASES ET LA BARRIÈRE HÉMATO-ENCÉPHALIQUE

1. Généralités

L'étude de la sécrétion de protéases vasculaires dans des contextes pathologiques chez le nouveau-né montre un intérêt particulier du fait de leurs spécificités développementales. En effet, les cellules endothéliales néonatales expriment et sécrètent plus de tPA et de MMPs que celles d'adultes au niveau basal, et sous stimulation par le glutamate, mimant ainsi un contexte excitotoxique pathologique (Henry et al., 2013; Legros et al., 2009). Ces sécrétions induites sont inhibées par le MK-801, un inhibiteur du récepteur NMDA. Une moindre expression des transporteurs de recapture du glutamate, les EAATs (EAAT1 à 3), est observée dans les cellules endothéliales de nouveau-né leur conférant une moindre efficacité de la recapture du glutamate extracellulaire (Lecointre et al., 2014). Ces éléments plaident pour une exposition exacerbée aux protéases (tPA, MMP-9) des cellules endothéliales néonatales dans un contexte excitotoxique, associé à l'apparition des lésions cérébrales néonatales.

De plus, l'invalidation/inhibition du tPA ou sa suractivité (par invalidation du PAI-1) se montrent respectivement bénéfique ou délétère dans différents modèles de lésions, chez l'adulte (Sashindranath et al., 2012; Yip et al., 2016) ou chez le nouveau-né (Hennebert et al., 2005; Leroux et al., 2014).

Ces protéases, qui participent aux processus délétères à l'origine de l'apparition des lésions cérébrales, assurent également de nombreuses fonctions physiologiques. Il convient d'explorer ces rôles physiologiques afin de mieux appréhender les risques de potentielles stratégies thérapeutiques qui viseraient à moduler l'activité de ces protéases, notamment en période néonatale.

2. Les métalloprotéinases de la matrice extracellulaire (MMPs)

Les métalloprotéinases de la matrice extracellulaire (MMPs) font partie d'une famille d'endopeptidases qui regroupe plus de 24 enzymes qui ont la spécificité de dégrader au moins un des composants de la MEC, d'où leur nom (Nagase et al., 2006; Rosenberg, 2002). Une autre caractéristique des MMPs est structurelle, mais non spécifique de ces dernières. Elles possèdent un site catalytique conservé basé sur la présence d'un ion zinc, ce qui les classe dans la grande famille des protéases à zinc. Les MMPs sont synthétisées en tant que zymogène inactif et nécessitent le clivage d'un pro-domaine afin de dévoiler leur activité protéolytique

(Figure 24). Enfin, les MMPs sont inhibées par des chélateurs de métaux, par l'α-2 antiplasmine dans la circulation ainsi que par les inhibiteurs tissulaires des MMPs : les TIMPs, au nombre de quatre. Le clivage du pro-domaine est induit par d'autres protéases comme des sérine-protéases, notamment la plasmine, ou encore d'autres MMPs (Van Wart and Birkedal-Hansen, 1990; Yong et al., 2001). Ainsi, la MMP-9 peut notamment être activée par la MMP-3 et la MMP-2 (Yong et al., 2001).

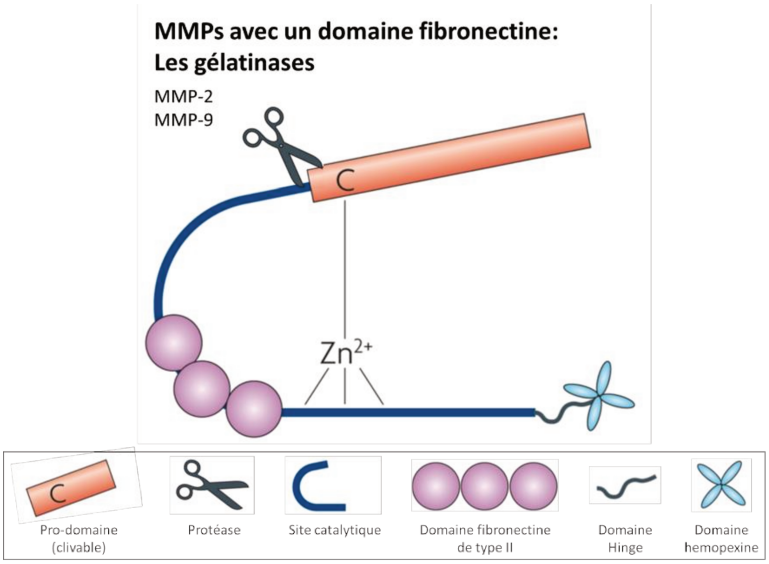


Figure 24 : Structure des gélatinases.
Les gélatinases (MMP-2 et -9) partagent une structure commune à la plupart des métalloprotéinases de la matrice extracellulaire, c'est-à-dire un pro-domaine clivable relié au site catalytique, un site de fixation de l'ion zinc comprenant quatre cystéines, un domaine hemopexine relié à la partie C-terminale de la protéine par le domaine hinge, qui permet la reconnaissance du substrat. Le pro-domaine contient un résidu cystéine nécessaire à l'inhibition de l'activité catalytique par fixation à l'ion zinc. La particularité des gélatinases est qu'elles possèdent un domaine fibronectine de type II permettant leur interaction avec le collagène de type IV. D'après Page-McCaw et al., 2007.

Les MMPs interviennent dans de nombreux processus biologiques *via* des modes d'actions très différents. En effet, les MMPs peuvent dégrader directement la MEC permettant le passage de cellules lors de leur migration, elles peuvent dégrader les jonctions intercellulaires ou des protéines de la LB, ce qui initie les processus de migration dans l'angiogenèse par exemple. Elles peuvent également cliver des substrats enchâssés dans la MEC, les rendant ainsi actifs (VEGF, proBDNF), ou inactiver des molécules actives. L'action des MMPs est régulée à de nombreux niveaux : transcription, synthèse, sécrétion, activation du zymogène et inhibition (pour revue Page-McCaw et al., 2007). L'activité des TIMPs est plus complexe que la seule inactivation de MMPs. Par le jeu croisé de leur multispécificité, de l'insertion de certaines MMPs à la membrane, les TIMPs participent aussi à la mise en relation

spatiale de différentes MMPs, permettant l'activation de cascades protéolytiques. Cet ensemble de phénomènes à la combinatoire complexe rend difficile la mise en évidence de la participation d'une MMP dans un processus physiologique ou pathologique, à moins de mesurer directement son activité.

Les gélatinases (MMP-2 et MMP-9) sont les MMPs qui jouent un rôle prépondérant dans l'AVC chez l'adulte (Jin et al., 2010; Yang and Rosenberg, 2015). Elles ont la particularité de posséder un domaine fibronectine de type II permettant leur liaison au collagène (Figure 24). Ces protéases ont une affinité particulière pour certains constituants de la LB ; le collagène de type IV, toutes les formes de collagène dénaturé mais également pour l'élastine, la fibronectine et les laminines (Chakraborti et al., 2003). Enfin, les gélatinases dégradent des protéines de TJ, notamment ZO-1, la claudin-5 et l'occludine (Adibhatla and Hatcher, 2008; Feng et al., 2011; Rempe et al., 2016).

a. Rôles physiologiques et pathologiques des gélatinases

Les gélatinases sont exprimées de façon ubiquitaire dans l'organisme des mammifères, ce qui leur confère de nombreux rôles physiologiques notamment dans le développement et le remodelage tissulaire, en particulier vasculaire périphérique ou du SNC (pour revue Vandooren et al., 2013).

Dans le SNC, les gélatinases participent notamment aux processus d'angiogenèse, de neurogenèse et de migration neuronale (Lee et al., 2006a; Rundhaug, 2005; Sîrbulescu et al., 2015; Wang et al., 2006). La MMP-9, en particulier, peut être sécrétée par de nombreuses cellules telles que les cellules endothéliales, les astrocytes, la microglie et les neurones. La sécrétion de la MMP-2 semble restreinte au niveau des pieds astrocytaires (Cunningham et al., 2005; Yang and Rosenberg, 2015). Les expressions de MMP-9, MMP-2 et TIMP-1 culminent durant le développement embryonnaire et la période postnatale précoce et décroissent ensuite (Bednarek et al., 2009). L'utilisation d'un inhibiteur à large spectre des MMPs (GM6001) ou l'utilisation de souris invalidées pour le gène codant la MMP-9 ont clairement montré le rôle de la MMP-9 dans la migration cellulaire, notamment au niveau du cervelet (Ayoub et al., 2005; Luo, 2005). L'activité MMP-9 impliquée dans ce processus de migration dépend d'une cascade d'activation impliquant la MMP-3 et la plasmine (Hahn-Dantona et al., 1999).

Outre leurs rôles physiologiques au sein du SNC, les gélatinases se révèlent être des enzymes clefs dans de nombreuses pathologies du SNC, telles que la maladie d'Alzheimer (Yoshiyama et al., 2000), la maladie de Parkinson (Lorenzl et al., 2002) ou la sclérose en plaque (Rempe et al., 2016; Waubant et al., 2003). Ces maladies ont une composante neuro-inflammatoire dans laquelle interviennent aussi les gélatinases (Figure 25).

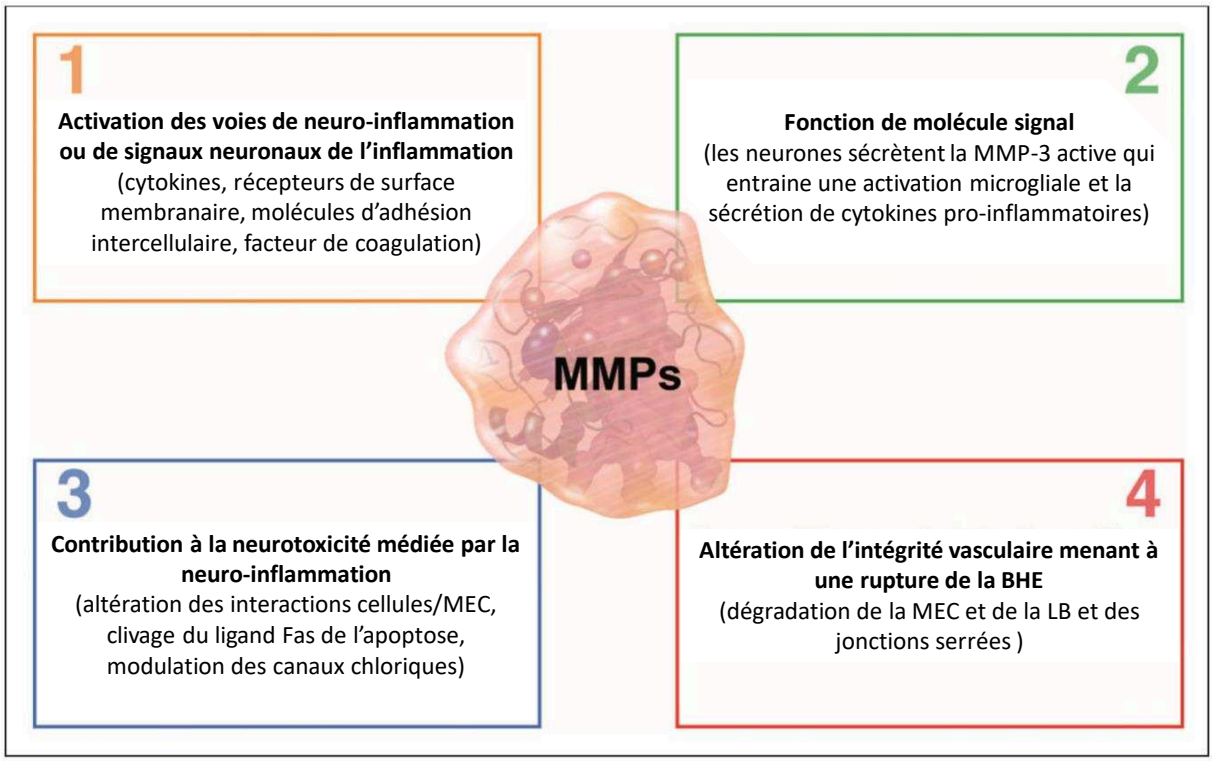


Figure 25 : Métalloprotéinases de la matrice extracellulaire et inflammation.
Les MMPs participent à la neuro-inflammation via quatre mécanismes. ***1*** *: les MMPs activent les voies de neuro-inflammation.* ***2*** *: les MMPs agissent elles même comme molécules signal de l'inflammation.* ***3*** *: les MMPs contribuent à la neurotoxicité médiée par l'inflammation.* ***4*** *: les MMPs altèrent l'intégrité vasculaire menant à une rupture de la BHE et une infiltration leucocytaire. D'après Rempe et al., 2016.*

Plus spécifiquement, les gélatinases sont impliquées dans les altérations et la rupture de la BHE. De nombreuses études montrent une augmentation de l'activité de la MMP-9 à la suite d'une ischémie chez l'adulte lors d'un AVC (Adibhatla and Hatcher, 2008; Fukuda, 2004; Liu et al., 2014; Rosenberg and Estrada, 2015) ou chez le nouveau-né (Adhami et al., 2008; Omouendze et al., 2013). Cependant, l'action des gélatinases en contexte pathologique n'est pas uniquement délétère. En effet, les gélatinases participent aussi à la revascularisation post-ischémique ainsi qu'à la migration de nouveaux progéniteurs neuraux (Cunningham et al., 2005; Wang et al., 2006).

Il est intéressant de noter qu'il existe une forte relation entre l'activation des MMP et l'activité d'une autre protéase, l'activateur du plasminogène d'origine tissulaire (tPA);(Adibhatla and Hatcher, 2008; Hahn-Dantona et al., 1999; Suzuki, 2010). En effet, dans de nombreuses situations physiopathologiques, le tPA et les MMPs forment une cascade d'activation dont l'effecteur final est la MMP-9, la gélatinase dont les substrats dans la LB sont les laminines et le collagène de type IV. La dégradation de la LB et de la MEC est responsable d'atteintes vasculaires pouvant mener, dans les cas extrêmes, à l'apparition d'hémorragies cérébrales (Veltkamp et al., 2006; del Zoppo and Mabuchi, 2003).

3. L'activateur du plasminogène d'origine tissulaire

a. Généralités

Le tPA est une protéase à sérine présente dans le sang où sa fonction primaire est la fibrinolyse. En effet, produit par les cellules endothéliales, son substrat principal dans le compartiment sanguin est le plasminogène. Pour exercer son activité d'activateur du plasminogène, le tPA doit être associé par ses domaines kringles à la surface de la fibrine et au plasminogène, qui est alors activé en plasmine et dégrade la fibrine, composant les thrombi (Carmeliet and Collen, 1995). C'est pour ces propriétés fibrinolytiques que le tPA est le traitement de référence lors d'un AVC thrombotique (pour revue Henderson et al., 2018). Cette utilisation comporte des risques, à commencer par un risque de transformation hémorragique par la dégradation directe ou induite par la MMP-9 de composants de la LB, entrainant une rupture vasculaire (Wang et al., 2003). Le tPA possède de nombreuses autres fonctions relayées par sa liaison à différents récepteurs. Il peut ainsi pénétrer dans le parenchyme cérébral par transcytose dépendante du récepteur LRP-1 (Benchenane et al., 2005). Le tPA est également sécrété directement dans le parenchyme par toutes les cellules de l'UNV et par les neurones (Cassé et al., 2012; Tsirka et al., 1997). Sécrété par les neurones, le tPA montre toutes les caractéristiques d'un neuromodulateur au niveau synaptique (stockage, libération voltage-dépendante, recapture, effet sur des récepteurs);(Louessard et al., 2016). À cet égard, il peut participer à des évènements délétères, notamment aux processus d'excitotoxicité (pour revue Yepes et al., 2009).

Les processus cérébraux dans lesquels le tPA est impliqué sont nombreux et divers (pour revue Fredriksson et al., 2017), tels que l'apprentissage et la mémoire (Baranes et al.,

1998; Obiang et al., 2012; Pang and Lu, 2004), la corticogenèse (Pasquet et al., 2018)(Leger et al., 2018/ANNEXE I), l'angiogenèse et le remodelage tissulaire (Seeds et al., 1997). Le tPA participe aussi à des processus délétères parmi lesquels ; la fragilisation vasculaire dans différents contextes pathologiques (Adibhatla and Hatcher, 2008; Labeyrie et al., 2017; Leroux et al., 2014; Yepes et al., 2009), la mort cellulaire programmée par apoptose et l'excitotoxicité (Baron et al., 2010; Hennebert et al., 2005; Henry et al., 2013).

b. Structure de l'activateur tissulaire du plasminogène

Le tPA est une glycoprotéine de 69kDa composée d'une chaîne de 527 acides aminés et d'une structure secondaire comprenant cinq domaines fonctionnels (Yepes et al., 2009);(Figure 26). Ces différents domaines permettent la diversité de fonctions du tPA et sont généralement distingués comme suit :

- Un domaine Finger en N-terminal possédant une homologie avec la fibronectine, ce qui permet la fixation à la fibrine et l'établissement d'un complexe avec le plasminogène. Ce domaine permet également la liaison du tPA à l'annexine II (participant ainsi à l'activation microgliale), au récepteur LRP (*low density lipoprotein receptor-related protein*), ainsi qu'à son inhibiteur PAI-1.
- Un domaine homologue à l'EGF (*Epidermal Growth Factor*) ou EGF-like, permettant l'interaction avec les récepteurs de l'EGF et du PDGF.
- Deux domaines Kringle (Kringle 1 et Kringle 2) permettant notamment la fixation au récepteur LRP, aux récepteurs NMDA ainsi qu'à la fibrine.
- Un domaine catalytique porté par la sérine 478 en C-terminal, qui confère au tPA ses propriétés protéolytiques.

Enfin, un clivage du lien peptidique entre les acides aminés Arg275 et Ile276 mène à une forme dite double-chaîne où le seul lien entre les deux chaînes peptidiques est le pont disulfure entre les cystéines 264 et 395 (Figure 26). Ce clivage peut être effectué par la plasmine, mais ne semble pas affecter l'activité protéolytique du tPA. Cependant, il change son affinité pour les récepteurs NMDA (rNMDA);(Bertrand et al., 2015; Wittwer and Howard, 1990).

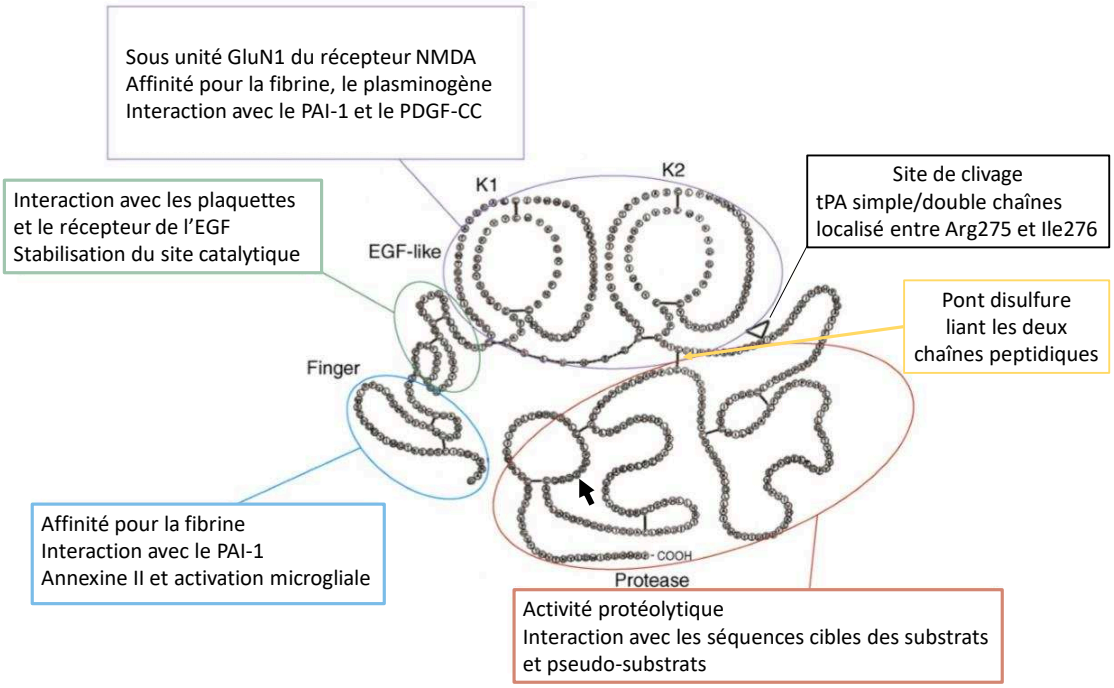


Figure 26 : Domaines fonctionnels du tPA représenté sous forme simple chaîne.
Le tPA est composé de cinq domaines (Finger, EGF-like, Kringle 1, kringle 2 et le domaine catalytique) impliqués différentiellement dans ses nombreuses fonctions. La flèche indique la position de la sérine 478 du site catalytique. D'après Yepes et al., 2009.

c. Inhibiteurs de l'activateur tissulaire du plasminogène

Le tPA sécrété dans la circulation sanguine par les cellules endothéliales à une demi-vie courte, d'environ 6 minutes chez l'Homme (Verstraete and Collen, 1985). Son activation est rapidement inhibée par le PAI-1, en excès dans le plasma. Le PAI-1 se fixe au niveau du site catalytique du tPA et empêche ainsi son activité enzymatique, mais le complexe tPA/PAI-1 conserve un potentiel activateur *via* les récepteurs LRP-1 (Sashindranath et al., 2012; Yepes et al., 2009). En effet, l'affinité du complexe tPA/PAI-1 pour le récepteur LRP-1 est bien supérieure à celle du tPA seul (Nykjaer et al., 1992). C'est d'ailleurs par le récepteur LRP-1 que s'effectue la clairance hépatique du complexe tPA/PAI-1.

Dans le parenchyme cérébral, le tPA peut être inhibé par le PAI-1, sécrété par les astrocytes ou par les neurones (Buisson et al., 1998; Docagne et al., 1999; Hino et al., 2001). Un autre inhibiteur du tPA, la neuroserpine, est exprimé au sein du SNC. C'est un membre de la famille des inhibiteurs de protéases à sérine et son affinité est forte pour le tPA. Son expression dans le cerveau se superpose aux zones d'expression du tPA, suggérant que la neuroserpine pourrait être l'inhibiteur central du tPA (Yepes and Lawrence, 2004).

d. Activateur tissulaire du plasminogène pendant le développement du système nerveux central

Au regard de la multiplicité des domaines fonctionnels du tPA, il n'est pas très surprenant de voir rapporter que ses effets dans les processus de migration cellulaire passent par différents mécanismes. Il a été démontré un retard de migration des cellules en grain dans le cervelet chez des souris invalidées pour le tPA (Seeds et al., 1999). Les mêmes auteurs ont montré que le tPA est sécrété et concentré au niveau des prolongements axoniques (cône de croissance) des neurones en culture (Seeds et al., 1997). De plus, les ARNm du plasminogène sont exprimés dans la couche granulaire externe du cervelet au cours de développement (Basham and Seeds, 2001), concluant à un effet dépendant de l'activité protéolytique du tPA. Plus récemment, il a été montré que le tPA participe à la migration des pré-oligodendrocytes au cours de développement et pendant la remyélinisation faisant suite à des lésions de la substance blanche chez l'adulte (Leonetti et al., 2017). Cet effet du tPA sur la migration des oligodendrocytes semble dans ce cas dépendre de son interaction avec le récepteur de l'EGF *via* le domaine Finger *EGF-like* du tPA, plutôt que de son activité enzymatique (Leonetti et al., 2017). Au contraire, la migration vasculo-dépendante des interneurones GABAergiques (Tsai et al., 2016) semble dépendre de la cascade d'activation tPA/MMP-9 par les cellules endothéliales. Nous avons démontré que ce phénomène met en jeu l'activation du récepteur NMDA sur les cellules endothéliales (Léger et al., 2019, ANNEXE I).

Il est bien établi que le tPA peut agir, par différents mécanismes, sur certaines sous-unités du récepteur NMDA. Par son action protéolytique directe, le tPA peut cliver l'exodomaine de la sous-unité GluN1 de ce récepteur, ce qui a pour conséquence de potentialiser la perméabilité calcique en réponse à une stimulation par le glutamate (Fernández-Monreal et al., 2004; Nicole et al., 2001). Ce mécanisme semble notamment nécessaire au processus de LTP (*Long Term Potentiation*);(Pang and Lu, 2004) qui participe au renforcement et à la stabilisation synaptique, notamment au cours du développement (Johnston, 2009). En revanche, le tPA se lie aux rNMDA contenant la sous-unité GluN2B, ce qui provoque un recrutement de ces récepteurs au niveau de la membrane (Pawlak et al., 2005). De plus, l'interaction du tPA avec la sous-unité GluN2D aggrave la neurotoxicité du glutamate (Baron et al., 2010; Jullienne et al., 2011). Enfin, l'interaction du tPA *via* son

domaine Kringle 2 avec les rNMDA, et son interaction avec la sous-unité GluN1 de ces derniers apparaissent également nécessaire à la corticogenèse (Pasquet et al., 2018).

e. Activateur tissulaire du plasminogène et barrière hémato-encéphalique en conditions pathologiques

En condition d'ischémie, le tPA peut altérer la BHE par différents mécanismes dépendants, ou non, de la conversion du plasminogène en plasmine (Yepes et al., 2003). Il peut activer des MMPs de façon enzymatique. Cela concerne majoritairement les MMP-2, -3 et -9 (Lijnen, 2001; Wang et al., 2003; Suzuki et al., 2007; Jin et al., 2010; Suzuki, 2010). En outre, le tPA exerce également un effet passant par sa liaison au récepteur LRP-1 sur l'induction de l'expression de la MMP-9 (Wang et al., 2003), cela est confirmé par des taux physiologiques de MMP-9 inférieurs chez des souris invalidées pour le gène codant le tPA (Omouendze et al., 2013). Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, la MMP-9 serait la MMP effectrice de la dégradation de la LB et de la MEC induisant la perméabilisation et la rupture de la BHE. De plus, le tPA peut activer la MMP-9 aussi bien dans la circulation sanguine que dans le tissu périvasculaire, participant ainsi doublement aux phénomènes de rupture de la BHE.

Un autre de ces modes d'action est relayé par la liaison au récepteur LRP-1. En effet, en plus de permettre la transcytose du tPA vers le parenchyme (Benchenane et al., 2005), la liaison du tPA à ce récepteur provoque le détachement des pieds astrocytaires des vaisseaux et l'ouverture de la BHE (Yepes et al., 2009). Le mécanisme proposé est la fixation du tPA au récepteur LRP-1 des pieds astrocytaires. Le clivage de son ectodomaine extracellulaire entraînant la libération de sa queue intracellulaire dans le cytoplasme, activant une signalisation intracellulaire (Polavarapu et al., 2007). Les voies de signalisation impliquent l'induction des voies NF-kB et de la iNOS (Zhang et al., 2007).

Un autre mode d'action du tPA, indépendant de la plasmine, est l'activation de la microglie par fixation au récepteur annexine-II (Siao and Tsirka, 2002). Dans un modèle excitotoxique chez l'adulte utilisant l'acide kainique, la sécrétion induite de tPA par les neurones entraîne une libération additionnelle de tPA par la microglie pouvant mener à l'hémorragie (Siao et al., 2003; Wang and Tsirka, 2005). Ces données sont renforcées par des études qui montrent que des souris invalidées pour le gène codant le tPA montrent une

moindre activation microgliale et des lésions moins étendues dans un modèle excitotoxique utilisant l'acide iboténique chez le jeune (Hennebert et al., 2005).

Il est à noter que l'administration d'annexine II améliore significativement l'efficacité protéolytique du tPA comme agent thrombotique lors d'un AVC chez l'adulte (Jiang et al., 2015). De plus, les cellules endothéliales cérébrales sont particulièrement enrichies en annexine II (Kwaan et al., 2004; Kimura et al., 2015), une caractéristique qui pourrait être associée au risque hémorragique lié à l'utilisation du tPA.

Enfin, de même que durant le développement, l'interaction tPA/rNMDA lorsqu'elle est exacerbée par une accumulation extracellulaire de glutamate après une HI, produit des effets hautement délétères notamment par une exacerbation du processus excitotoxique chez l'adulte (Goulay et al., 2018).

HYPOTHÈSES DE TRAVAIL & OBJECTIFS

Les lésions cérébrales acquises en période périnatale restent un enjeu majeur de santé publique. Elles sont à l'origine de handicaps et de séquelles durables qui nécessitent une prise en charge continue et coûteuse. Les progrès réalisés dans la prise en charge en pédiatrie et réanimation néonatale entraînent une augmentation du nombre de naissances vivantes/viables notamment dans les cas de grande prématurité et/ou de petit poids de naissance. Paradoxalement, cette augmentation du nombre de naissances à risque contribue à une stagnation de la prévalence des PC. Les phénomènes d'hypoxie-ischémie en période périnatale font partie des facteurs de risque principaux liés à la survenue des lésions cérébrales néonatales et des handicaps consécutifs associés, montrant l'importance que peut avoir une dysfonction vasculaire durant cette période.

Durant la période périnatale, le cerveau subit de grands changements dus au développement et à la plasticité. De ce fait, les types de lésions cérébrales qui surviennent pendant cette période dépendent grandement du stade de maturité cérébrale. Les cliniciens observent principalement des hémorragies chez les extrêmes prématurés, des lésions de la substance blanche chez les nouveau-nés prématurés et plus particulièrement des lésions des ganglions de la base chez les nouveau-nés à terme. Ces lésions sont modélisables respectivement chez la Souris âgée de 5 ou 10 jours.

Des études menées dans notre laboratoire ont montré une évolution importante du transcriptome et du protéome microvasculaire cérébral au cours de cette période (entre P5 et P10) et que les cellules endothéliales néonatales sécrètent plus de protéases que les cellules d'adultes de manière spontanée ou dans des conditions mimant la pathologie. Ces protéases, parmi lesquelles le tPA et les MMPs, sont des acteurs bien identifiés des processus délétères chez l'adulte, mais leur action reste relativement peu étudiée dans le contexte de l'immaturité cérébrovasculaire. Ainsi, une recherche sur pubmed avec les termes « *mmp 9* ou *plasminogen activator* ***adult*** *brain* » cumule plus de 3000 résultats, alors que la même recherche réalisée avec le terme « **neonate** » ne cumule que 61 résultats.

Les objectifs de mes travaux ont été de rechercher les différences liées à l'âge dans les réponses à un phénomène hypoxo-ischémique chez la Souris, et de tenter de les corréler à des déficits à long terme.

1) La première approche, longitudinale, a consisté à relier l'imagerie IRM périnatale, à des déficits cognitivo-comportementaux à l'âge adulte et d'isoler des éléments fonctionnels (enzymatiques) spécifiques de deux stades de maturité, (à P5 et P10) chez la Souris.

2) La deuxième approche a consisté à étudier l'impact du stade de développement sur la réponse transcriptionnelle globale durant les vingt-quatre premières heures suivant l'évènement hypoxo-ischémique et de rechercher d'éventuelles corrélations entre ces modifications transcriptionnelles et des altérations biochimiques et physiologiques spécifiques d'un stade developpemental.

La masse des variables intervenant dans les processus cellulaires et tissulaires déclenchés par l'HI, à savoir les sensibilités spatiales et temporelles spécifiques de chaque type cellulaire et la perturbation des interactions entre ces entités au cours du développement, rendent la translation à l'Homme très difficile, comme le montre l'échec de nombreux essais thérapeutiques. Ceci est certainement l'une des raisons du changement que l'on perçoit dans les approches méthodologiques, passant d'approches modélisatrices et réductionnistes à des approches rétrospectives globales et à long terme ainsi qu'à la génération de Big Data.

Afin d'obtenir une meilleure compréhension des problématiques, il y a donc nécessité à confronter les données de ces approches globales (animal entier, devenir à long terme et big data) aux données cliniques.

C'est pourquoi notre étude réductionniste (étude 1) et de Big Data (étude 2) s'inscrivent dans une stratégie plus globale de transposition de nos résultats à l'Homme. Cette transposition se poursuivra par l'étude PREMATRICE actuellement en cours et pour laquelle nous avons, en collaboration avec les services de pédiatrie néonatale et d'anatomopathologie du CHU de Rouen, effectué la collecte de cerveaux d'enfants décédés à différents stades de développement et amorcé une étude protéomique en collaboration avec la plateforme de spectrométrie de masse (PISSARO) de l'université de Rouen. Cette étude, trop préliminaire à ce jour, ne sera pas présentée dans le manuscrit.

RÉSULTATS - PARTIE 1

Neonatal cerebral hypoxia-ischemia in mice triggers age-dependent vascular effects and disabilities in adults: impact of tPA.

Nicolas Dupré[a], Arnaud Arabo[b], Cyrille Orset[C], Julie Maucotel[b], Yannick Detroussel[b], Michelle Hauchecorne[a], Bruno J. Gonzalez[a], Stéphane Marret[a,d], Denis Vivien[c,e], Philippe Leroux[a,f]

Submitted in *Experimental Neurobiology*

[a] INSERM-UMR1245, Team 4, Normandie Université, Rouen, France

[b] CURIB, Normandie Université, Mont-Saint-Aignan, France

[c] Normandie Université, UNICAEN, INSERM, UMR-S-U1237, Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders (PhIND), Caen, FRANCE

[d] Neonatal Pediatrics, Intensive Care Unit and Neuropediatrics, Rouen University hospital, Rouen, France

[e] Caen University Hospital, Department of Clinical Research, Caen, FRANCE

[f] Corresponding author

Corresponding author: Dr. Philippe Leroux, INSERM-UMR1245, Faculté de Médecine et de Pharmacie, 22 Boulevard Gambetta, 67183 Rouen cédex, France. Tel: (33)2 35 14 83 39, Mail: philippe.leroux@univ-rouen.fr, ORCID: 0000-0002-0183-5427

M. Nicolas Dupré: Nicolas.dupre@etu.univ-rouen.fr

Dr Arnaud Arabo : arnaud.arabo@univ-rouen.fr

Dr Cyrille Orset: orset@cyceron.fr

Ms Julie Maucotel: Julie.maucotel@univ-rouen.fr

M Yannick Detroussel : yannick.detroussel@univ-rouen.fr

Ms Michelle Hauchecorne : michele.hauchecorne@inserm.fr

Dr Bruno J. Gonzalez : bruno.gonzales@univ-rouen.fr

Pr Stéphane Marret : stephane.marret@chu-rouen.fr

Pr Denis Vivien : vivien@cyceron.fr

Dr Philippe Leroux : philippe.leroux@univ-rouen.fr

Abstract

Neonatal encephalopathy frequently results of hypoxia-ischemia (HI) or inflammation in preterm or term neonates. Neuropathology depends on cerebral development at insult time, but the poor correlation of neuromotor, cognitive and behavioral disabilities severity in infancy with initial imaging and clinical records precludes early prognostic. The Rice–Vannucci HI procedure was applied in wild type and tissue plasminogen activator (tPA)-knockout mice as surrogates of human preterm (5 days postnatal (P5)) or term (P10) neonates. Acute and delayed T2-MRI signal and cognitive deficits at adulthood (spatial memory and social interaction) were investigated in the same animals. Early vascular tPA and MMP-9 activities, blood-brain barrier permeability to water or IgG, and microglial activation were assessed separately.

HI at P5 or P10 induced early hemisphere swelling in T2-MRI scans, delayed cortex and hippocampus atrophy but affected white matter in P5 group only, whatever tPA genotype. Adults had no motor disabilities but HI-induced age-dependent deficits, preferentially social interaction/activity in P5- and spatial learning in P10-treated mice. tPA-KO prevented MMP-9 activation, IgG extravasation, microglial activation and behavior impairments in P5 treated mice. At P10, MMP-9 activation and inflammatory process remained in hippocampus of tPA-KO, as well as persistent spatial learning deficits.

Perinatal HI in mice mimicked human clinical outcome unpredictability from imaging. Delayed deficits appeared associated to vascular dysfunction-induced inflammation, strongly reminding our previous work showing major vascular maturation between P5 and P10. Using omics to explore neural, glial, or brain vessel markers in neonate blood appears a promising perspective to identify pertinent prognostic tools.

Highlights:

- Neonatal mice aged 5 or 10 days exposed to HI exhibit differences in T2-MRI imaging
- 5- and 10-day old mice show tPA and MMP-9 activities in cortical microvessels
- tPA-KO prevents BBB leakage & microglial activation depending on age and structures
- 5-day old mice had white matter T2-MRI hyper-signal and social interaction deficits
- 10-day old mice had coincident retrosplenial damage and spatial learning deficits

Keywords: Neonatal encephalopathy, Neonate, Brain ischemia, Blood brain barrier, Matrix metalloproteinases, MRI scans, Cognitive manifestations, Tissue plasminogen activator.

Abbreviations:

BWC	Brain water content
CP	cerebral palsy
Ctx	cerebral cortex
Hip	Hippocampus
MMP-9	Matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B)
MWM	Morris Water maze
NEP	neonatal encephalopathy
PCA	Principal component analysis
P5	Postnatal day 5
SI	Social interaction
tPA-KO	tissue plasminogen activator inactivated mice
T2-MRI	Magnetic resonance imaging in T2 sequence
WM	White matter

Funding sources:
This work was supported by Normandy University, Rouen University, Caen University, INSERM, Institute of Research and Innovation in Biomedicine(IRIB), Rouen University hospital, Région Haute-Normandie and the “Fonds Européen de Développement Régional” (FEDER). ND was recipient of a fellowship from the French Ministery of Research and Higher Education.

Introduction

Hypoxia-ischemia (HI) and inflammation are major triggers for neonatal encephalopathy (NEP), resulting in cortex and white matter developmental injuries, that could later be associated with impaired motor control and behavioral and cognitive deficits (Back and Miller 2014; Garfinkle et al. 2017).

Preterm infants exhibited neonatal white matter lesions and secondary developmental cortical dysmaturation, whereas at-term injured babies mostly show cortical and basal ganglia neuronal death and atrophy (Van den Broeck et al. 2008). Functional deficits recorded later in development also depend on gestational age at birth, cognitive and behavioral deficits being more severe after NEP occurring in at term than preterm born infants (Johnson et al. 2018; Moster et al. 2018). Different cell populations are affected, depending on age; pre-oligodendrocytes and subplate neurons in preterm but mature neurons in term infants (Back and Miller 2014; Ferriero 2004; Khwaja and Volpe 2008). Both develop microglial activation, and gliosis. Last but not least, acute effects have consequences through interferences with the development program and connectome development (Back and Miller 2014). However, whereas clinical and imaging records roughly coincide with subsequent disabilities at population level, they do not allow clinicians to predict accurately development evolution and sequels in individuals (Larroque et al. 2011).

In the rapidly growing brain during late gestation, the vasculature undergoes large development including elongation, branching, and basal lamina and blood—brain barrier (BBB) consolidation, improving its structural strength. Vasculature functions in brain development include O_2 and trophic factors supply, and cell signaling, such as sustaining the migration of pre-oligodendrocytes or neuron progenitors (Saghatelyan 2009; Tsai et al. 2016). Vessel injury in neonate brain not only induced vasogenic edema, but plasma solute extravasation and leucocyte diapedesis. Insulted vasculature also releases transmitters and proteases, altogether affecting blood flow, endothelial cell junctions, and inflammation even if the BBB is considered functional and resistant (Fernandez-Lopez et al. 2012; Mallard et al. 2018). In mouse neonatal brain vessels, two proteases show high basal and insult-induced activity (Bednarek et al. 2012; Henry et al. 2013); tissue plasminogen activator (tPA) and gelatinase B (MMP-9) also associated with BBB rupture in adults (Montaner et al. 2003; Xue et al. 2009). Whether differences in vascular maturity in the perinatal period could underlie the differences between preterm and term neonate fate appears worth investigating.

Neonatal brain insults in mice models in fact produced age-dependent lesions types, mimicking white matter lesions of preterm when performed in 5-days old (P5) pups, and sub-cortical and cortical grey matter necrosis of term infants when applied to P10 mice respectively (Kinney and Volpe 2012; Marret et al. 1995). We formerly reported that major changes occur between P5 and P10 mice microvessels, in terms of basal lamina constitution, energy metabolism or anti-oxidant capabilities (Porte et al. 2017a; Porte et al. 2017b). In the rodent HI model from Rice-Vannucci adapted to mice, grownups exhibited cognitive and fine motor deficits (Daher et al. 2018; Rice et al. 1981).

The present study was aimed at specifying age-dependency of HI effects to vessels on long-term behavioral fate. We have used the Rice-Vannucci model at P5 or P10, in a longitudinal MRI study completed by behavioral tests at adulthood, in wild type (WT) and in tPA knockout (tPA-KO) mice. Principal component analysis of T2-MRI scans at different delays after HI, spatial learning performances in the Morris water maze (MWM) and social interaction (SI) in grownups was performed to isolate age at insult, sex, genotype and behavior performances relationship with MRI scans. Acute vascular proteolytic tPA and MMP-9 activities, BBB rupture and microglial activation were studied in separate sets of animals.

Material and Methods

Ethics Statements

All procedures used were approved by the French "Ministère de l'Education Nationale de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche" (Agreement 016800.02 on 10/13/2014) in accordance with French law (R.214-87 and R.214-126), INSERM recommendations in respect with the EU directive 2010/63/EU for animal experiments.

Hypoxia-Ischemia procedure

The hypoxia-ischemia (HI) procedure derives from the procedure described in P7 rats (Rice et al. 1981) adapted to P5 or P10 mice in tPA-KO and WT littermates in a C57Bl/6J background. Animals were housed in controlled temperature, humidity and day/night 12/12 hour cycle, with water and food *ad libitum*.

Surgery was performed under Isoflurane anesthesia (4% induction and 2% maintenance; AbbVie, Arcueil, FRANCE). First, the right common carotid artery was ligated using 8-0 PROLENE^{TM} wire (ETHICON part of JOHNSON & JOHNSON MEDICAL SAS, Issy-les-Moulineaux, France), afterward animals were returned for 1h to their dam, and then submitted to 40 min hypoxia (O_2/N_2 ratio 8/92%). Temperature was maintained throughout surgery by a heating carpet and hypoxia was performed in a humidified and temperature controlled (36°C) device. Sham-operated animals were exposed to the same procedure except carotid ligation. For each genotype, 6-7 liters were used for the study.

MRI Analysis

Observations were performed on a Pharmascan 7T/12 cm system, using surface coils (Brüker) in anesthetized mice at day 1, day 5 and adult stage (P90) after HI realized at P5 or P10. A T2 sequence was used to detect brain edema by surfacing T2 hyper-signal. Area identification and measurements were performed blinded to group assignment of individuals.

SDS-PAGE and in situ zymography

The brains were quickly removed, and tissues were rapidly homogenized in ice-cold lysis buffer (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) for protein extraction. For gelatinase activity detection, 30 µg of proteins were loaded and separated by electrophoresis on polyacrylamide gel-containing gelatin (Invitrogen). Gelatinolytic activities were revealed after migration by incubation of gels for 5-7 days at 37 °C. MMP-9 activity was identified by lysis area at

respective molecular weight and quantified using the Explora Nova Mercator Software (La Rochelle, France) after staining with Simply blue®.

For plasminogen activator activity detection, 15 µg of proteins were separated by electrophoresis on polyacrylamide gel containing casein (1 mg/mL) and plasminogen (15 µg/mL). After migration, gels were incubated at 37 °C for 24h. Lysis areas revealed a two-step activation of plasminogen by tPA or uPA, followed by plasmin caseinolytic activity. Lysis area quantification was done as described above after Coomassie blue gel staining (Fernandez-Monreal et al. 2004).

In situ gelatinolytic zymographies were performed on 250 µm brain slices counterstained by isolectin-B4-TRITC in order to visualize vessels. Slices were incubated 30 min in artificial cerebrospinal fluid (aCSF containing (mM) NaCL, 125; KCL, 3; CaCl2, 2; NaH2PO4, 1.2; NaHCO3, 26; D-glucose, 10; pH 7.4) containing isolectin-B4-TRITC (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France, 1/50) at 37°C in a humidified incubator under a controlled 5% CO_2 atmosphere. After 2x10 min washes in aCSF, slices were incubated for 3h with the quenched gelatinase substrate DQ-Gelatin-FITC (Life technologies™, Eugene, OR, USA, 1/50). In-situ Caseinolytic zymographies were performed as described for gelatinolytic zymography but using casein-FITC substrate (Invitrogen, Cergy Pontoise, France 1/125) incubated with an urokinase inhibitor (amiloride, 200µM, Sigma-Aldrich) to visualize the tPA-specific signal. Photographs were obtained using a fluorescent video microscope system DMI 6000B (Leica, Reuil-Malmaison, France) coupled to Metamorph® software (Molecular Devices, Sunnyvale, USA).

Behavior tests

Behavior effects at adulthood of P5 or P10 HI were assessed in all animals studied by MRI. Visuospatial learning and memory were assessed using the Morris water maze test (MWM), and social behavior capabilities were recorded in a 2-compartments interaction device. Experimenter blinded to group assignment of individuals performed animal handling and video track analysis.

- ***Spatial abilities: The Morris water maze test***

The spatial learning task was conducted in a water maze task derived from that of Morris in 1984 (Morris 1984). The apparatus consisted of a cylindrical water pool, 120 cm in diameter and 30 cm in height, filled with opaque water (20 +/− 1°C). A white escape platform, hidden

0.5 cm below the water surface and located at a fixed position (North-West) was placed in the pool. The maze is surrounded by 2D patterns affixed to provide spatial cues. Both the pool and the distal visual cues were kept fixed during all experiments.

In order to encourage mice to swim out into the middle of the maze and to reduce thigmotaxic behavior, they were submitted to a pretraining phase one day before the first training. Each animal was put in the water maze without a platform for one trial of 60 s, during which the mouse could swim freely and therefore explore the pool. After this trial, the escape platform was placed in the tank (central position) and the animal was gently maintained on the platform by the tail for 20 s. Finally, mice had to learn to stay on it for 20 s.

To evaluate its spatial navigation abilities, each animal was submitted to 4 daily trials every 5 consecutive days with a 10 min inter-trial interval. The starting point varied (East, South, West, North) between each trial and also across the different sessions. For each trial, the mouse was allowed to search the platform for 60 s. Once the animal found it, it was allowed to remain there for 20 s; if it did not find the platform after 60 s, it was placed on it for 20 s.

Moreover, 2 days after the last trial of the fifth learning session was achieved, animals were subjected to the probe test. The platform was removed and the mice, starting at the maze center, were allowed to search for the platform for 60 s. The time spent in all four quadrants was measured.

Data acquisition was performed at a rate of 30 images per second by means of a video recording system and tracking software, ANY-Maze® (Stoelting Co, Wood Dale, IL).

In the following, the criteria path efficiency (PE), a composite index based on time to reach the platform and angle variation from direct trajectory, was used for analyses.

- ***Social interaction test***

Social interaction test (SI) was performed using a grid-separated 2-compartment device, a video recording system and the tracking software, ANY-Maze®. The test animal was inserted in the wide (42 × 12 cm) compartment for 3 minutes, then a naïve unknown congener of the same sex was inserted opposite to a grid in the small (12 × 12 cm) compartment for an additional 6 min. The first period was considered the habituation period in which the test animal was allowed to explore the new environment. The following 6-min period was considered the interaction period, in which the test animal was able to make nose contact with the congener. The test compartment was divided in 3 equal zones on the video-track: proximal, central and distal to the grid in which time, entries, rearing, immobility were

automatically recorded based on the animal's center of gravity. An additional thin (1 cm wide) zone included in the proximal zone was delimited adjacent to the grid, in which gravity center could not enter. Nose pokes were coded manually on video tracks by an expert experimenter (AA, JM) blinded to animal group assignment.

Eighteen parameters were recorded in the 2-box interaction device during the 3-min habituation period and during the 6-min interaction period proper.

***Gravimetric determination of* brain water content (BWC)**

In order to appreciate vasogenic edema in HI-exposed pups, wet weight at dissection time and dry weight after 24h at 100°C were assessed separately both sides 24h or 5 days post HI. Cerebral hemispheres were isolated after removal of olfactory bulb, frontal cut posterior to occipital cortex and medial plane vertical cut. Values are given as the percentage of water in wet weight.

Immunohistochemistry

Mice were anesthetized, perfused transcardially 3 days after P5 or P10 HI with cold saline followed by 20 mL of fixative solution. Brains were cryoprotected before freezing. Cryosections (40 µm) were collected on poly-Lysine slides and stored at -20°C before processing. Tissue sections were incubated overnight with a rat anti-F4-80 (MCA497; 1/200, Bio-rad, Marnes-la-Coquette, FRANCE) for the labeling of microglia or Alexa Fluor® 488 chicken anti-mouse IgG (A21200; 1/400, Life technologies) for the visualization of extravased immunoglobulins. Anti F4-80 antibody was revealed with Alexa Fluor® 594 donkey anti-rat immunoglobulin (A21209; 1/400, Life technologies). Images were digitally captured using a DMI 6000B Leica microscope, and then analyzed with Metamorph® and Image J 1.51j8 (NIH, USA) software.

Statistical Analysis

Two-way ANOVA associated with Bonferroni post-test, Fisher's Exact test, the Mann—Withney test and Student's t test were used to compare groups using GraphPad Prism6® software (La Jolla, CA, USA). Details are listed in Supplemental Table 1.

Principal component analysis (PCA) was performed on normalized data, by means of Rstudio software (Version 1.1.447 – © 2009-2018 Rstudio, Inc.) using the prcomp function. Two-dimensional plot of the variable correlation was realized using the factoextra package

and its fvizargument_pca_var function. A total of 20 indexes collected in the 66 mice from MRI analyses (at day 1, day 5 after HI and P90; adults), MWM and SI behavior tests were used to perform PCA. Due to the various nature of the indexes and the amplitude of values recorded, standardization of the data was necessary. Four identification criteria (age at insult, sex, genotype, HI/Sham status) were coded binary and sixteen numerical criteria were coded from 1 to 10 according to their rank in 10 deciles in the entire group (n = 66). Coded values are given in Supplemental Table 2.

RESULTS

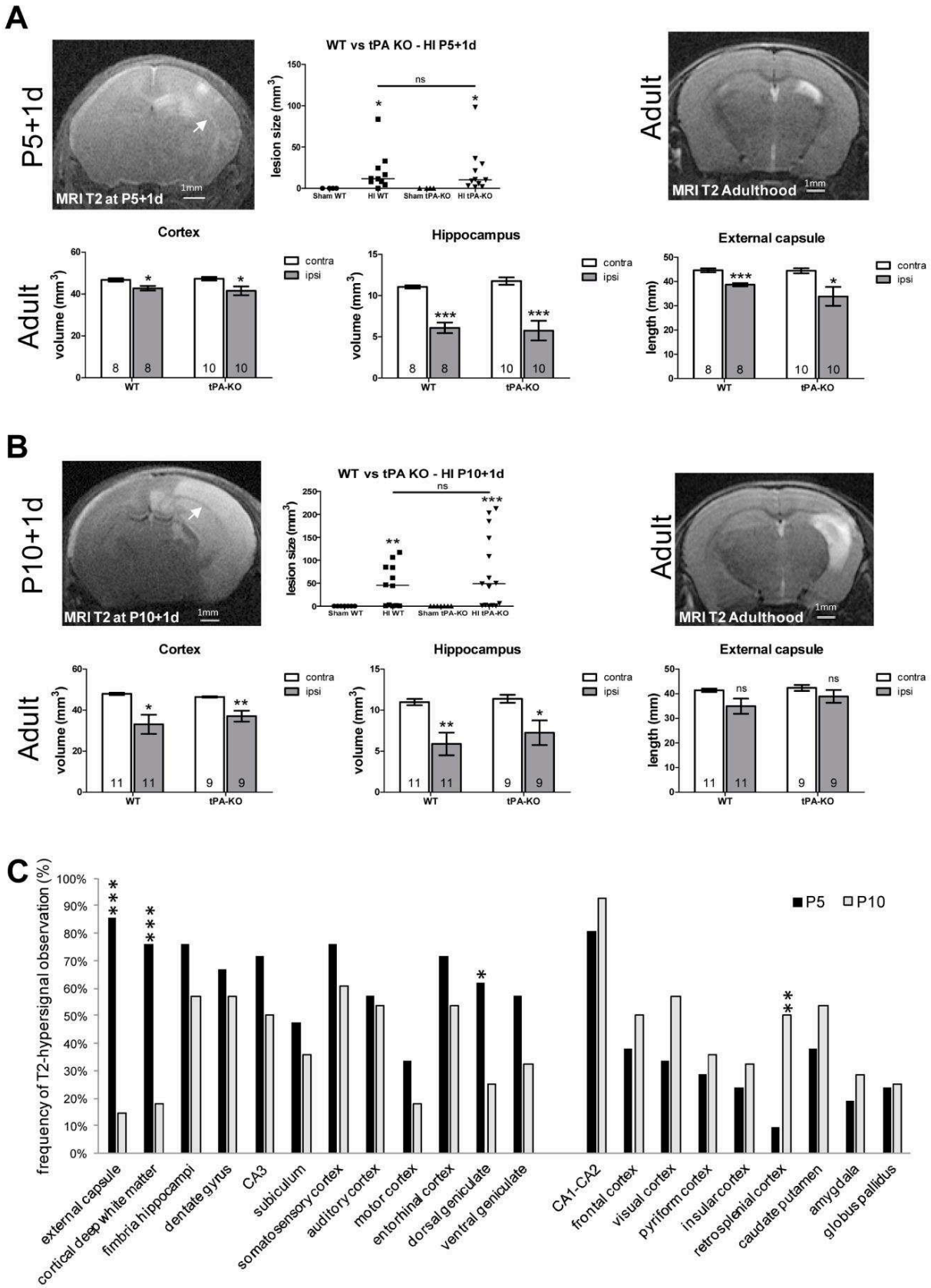


Fig. 1. MRI longitudinal study: White matter is especially affected after hypoxia-ischemia at P5, whatever the genotype. ***A,*** *Representative brain MRI scans of mice exposed to HI at P5, 1 day (1d) after insult and at adulthood showing global lesion size at 1d and cortex, hippocampus, and external capsule size at adulthood in WT and tPA-KO mice.* ***B,*** *Representative brain MRI scans of mice exposed to HI at P10, 1d after insult and at adulthood showing global lesion size at 1d and cortex, hippocampus and external capsule size at adulthood in WT and tPA-KO mice.* ***C,*** *Frequency of T2-MRI hyper-signal observation 1d post-insult in identified brain areas. * p<0.05; ** p<0.01; and *** p<0.001. Arrows indicate WM (external capsule).*

Results

MRI imaging study showed P5 specific white matter hypersignals, whatever the genotype.

MRI imaging did not reveal altered signal in sham operated animals. P5 exposed mice had hyper-signal detectable after 24h, although with a large variability (up to 98 mm^3)(Figure 1A). In P10 exposed mice, 67% of WT and 70% of tPA-KO mice only exhibited MRI hyper-signal. The remaining animals were considered non-lesioned. Thus, in these groups lesion size after 24 h varied from 0 to 117 mm^3 in WT and 213 mm^3 in tPA-KO mice (Figure 1B). A significant increase of hemisphere volume (right/left volumes) was recorded at P5 plus 24h in WT (+10.7%, p = 0.003) and in tPA-KO (+10.4%, p = 0.006). Due to the presence of non-lesioned pups after HI at P10, the ratios were more heterogeneous in WT (+7.2% p = 0.046) and even more in tPA-KO (+12.7%, p = 0.006)(Supplemental Figure 1A). Structures exhibiting MRI hyper-signal in more than 25% of brains 24h post HI were recorded. On the whole, P5 mice had slightly more structures impacted, especially in the white matter (WM; external capsule, deep cortical WM)(Figure 1C). In P10 mice, WM appeared especially preserved, often as a dark band between hyper-signals in the cortex and hippocampus (Figure 1B). The retrosplenial cortex was the only structure significantly more frequently altered in P10 mice compared to P5 mice (Figure 1C). The swelling observed 24h after HI was followed by atrophy 5 days post HI. In P5 pups, similar volume reduction was observed in WT (-9.8%, p = 0.0081) and in tPA-KO (-9.4%, p = 0.0055), while in P10 HI pups, the atrophy was significant in WT (-7.3%, p = 0.0005) but not significant in tPA-KO (-5.9%, p = 0.058), likely due to dispersion (supplemental Figure 1B). In adults, tissue losses remained at the T2-MRI level in the cerebral cortex, hippocampus (Figure 1A, B). Age comparison could not be done since about 30% of P10 mice did not show lesion at MRI and 37% of t-PA-KO mice died before 3 months (Supplemental Figure 1C). No genotype effect was observed on delayed mortality after P5 HI (Supplemental Figure 1D).

tPA knock-out does not prevent HI-induced edema whatever the developmental stage.

Gravimetric measurement of brain water content (BWC) corroborated the hypothesis of BBB leakage and water efflux from the plasmatic to the extracellular compartment. BWC was increased ipsilateral to the ligature in P5 and P10 brains of WT and tPA-KO mice, 24h after HI (Figure 2), but was no longer present 5 days post insult (not shown).

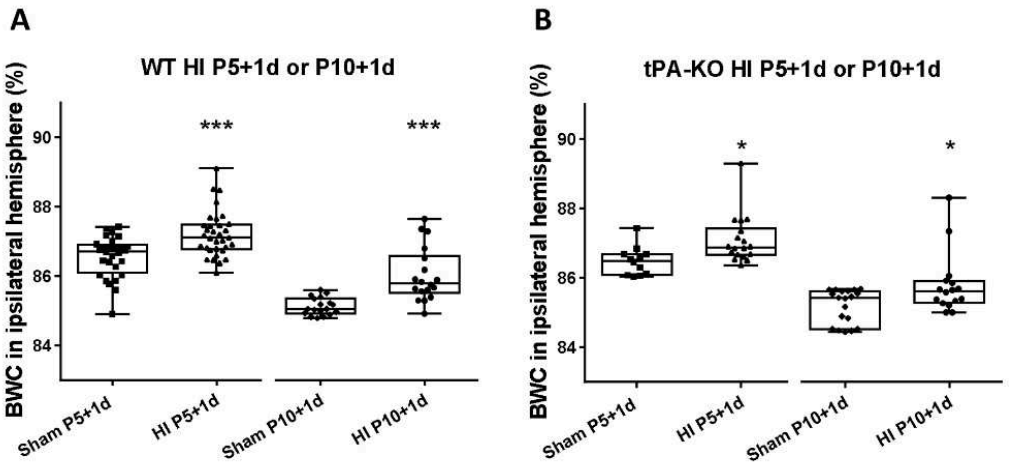


Fig 2. Brain Water Content analysis: Hypoxia-ischemia at P5 or P10 triggers brain edema 1 day after the insult, whatever the genotype.
A, *Brain Water Content (BWC) in hemispheres ipsilateral to ligature, 1 day after HI at P5 or P10 in WT mice. and tPA-KO pups.*
B, *BWC in hemispheres ipsilateral to ligature, 1 day after HI at P5 or P10 in tPA-KO mice. * p<0.05; *** p<0.001.*

Hypoxia-ischemia induced white matter BBB rupture specifically at P5. tPA knock-out prevented the BBB rupture in age- and structural-dependent manner.

In WT mice, IgG extravasation observed 3 days post-HI at P5 was located in areas corresponding to MRI-T2 hyper-signal in the cortex, hippocampus, and WM. At this stage, amoeboid microglia was superimposed to lesioned areas (Figure 3A). In tPA-KO mice, no IgG extravasation or microglial activation could be detected (Figure 3B). In P10 mice, IgG were detected in cortex and hippocampus, as well as microglial activation (Figure 3C). In tPA-KO, no IgG extravasation was detected in the cortex, except in sporadic foci together with activated microglia. Conversely, in the hippocampus high IgG extravasation occurred as well as in WT (Figure 3D). In P10 mice, WM appeared to be spared.

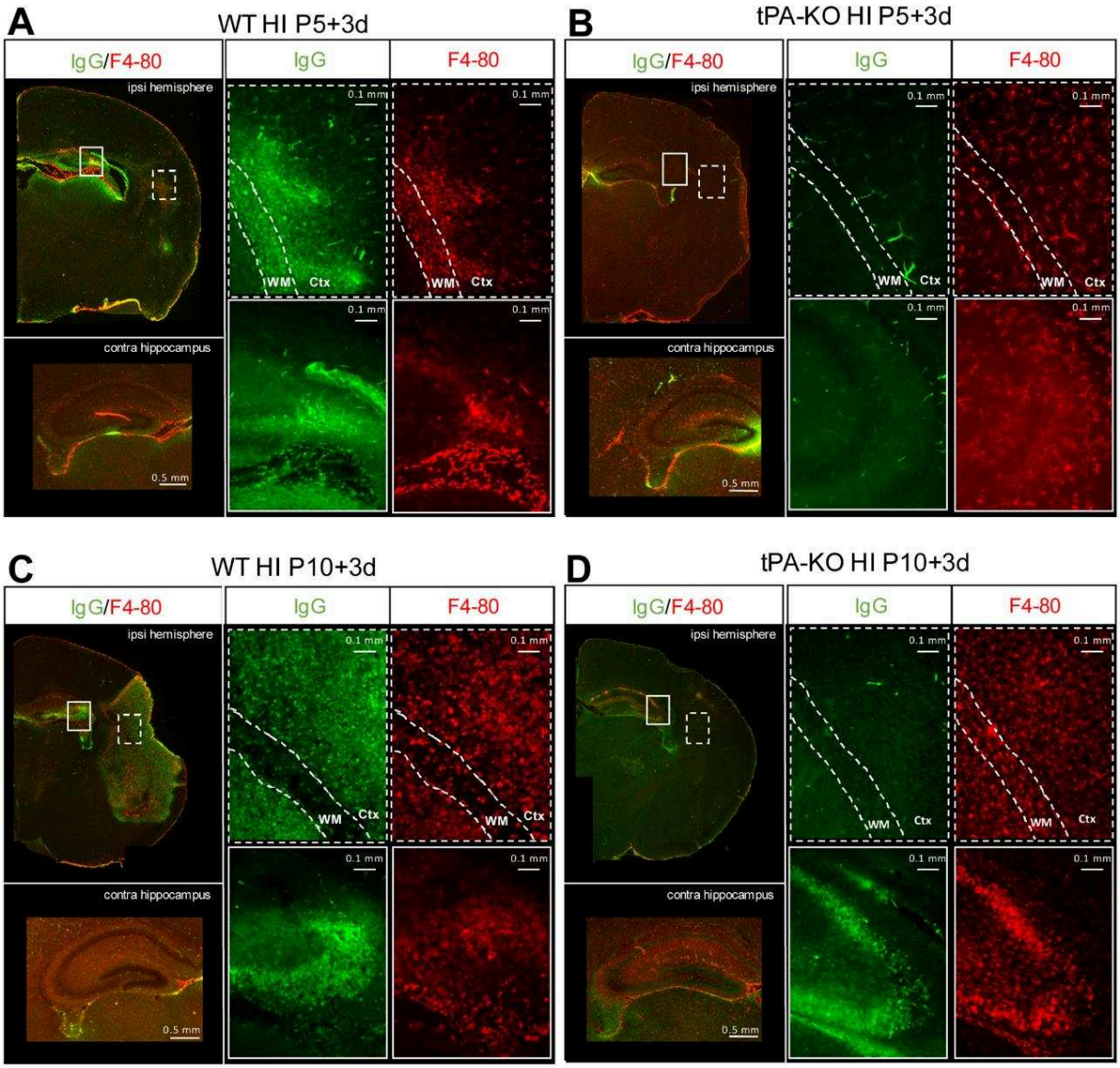


Fig 3. Immunohistochemical illustrations of blood-brain-barrier (BBB) leakage and brain inflammation: Hypoxia-ischemia triggers a specific BBB leakage and inflammation in the white matter at P5. The tPA knock-out is protective.

IgG extravasation was assessed by immunolabeling using an anti-mouse IgG antibody [IgG; Green] and microglia activation using an anti-F4-80 antibody [F4-80; red] 3 days after HI at ***A,*** *P5 in WT mice;* ***B,*** *P5 in tPA-KO;* ***C,*** *P10 in WT;* ***D,*** *P10 in tPA-KO mice. Full line-boxes indicate the localization of higher magnification illustrations in hippocampus area and dotted line- boxes indicate the localization of higher magnification illustrations in cortex / white matter area.*

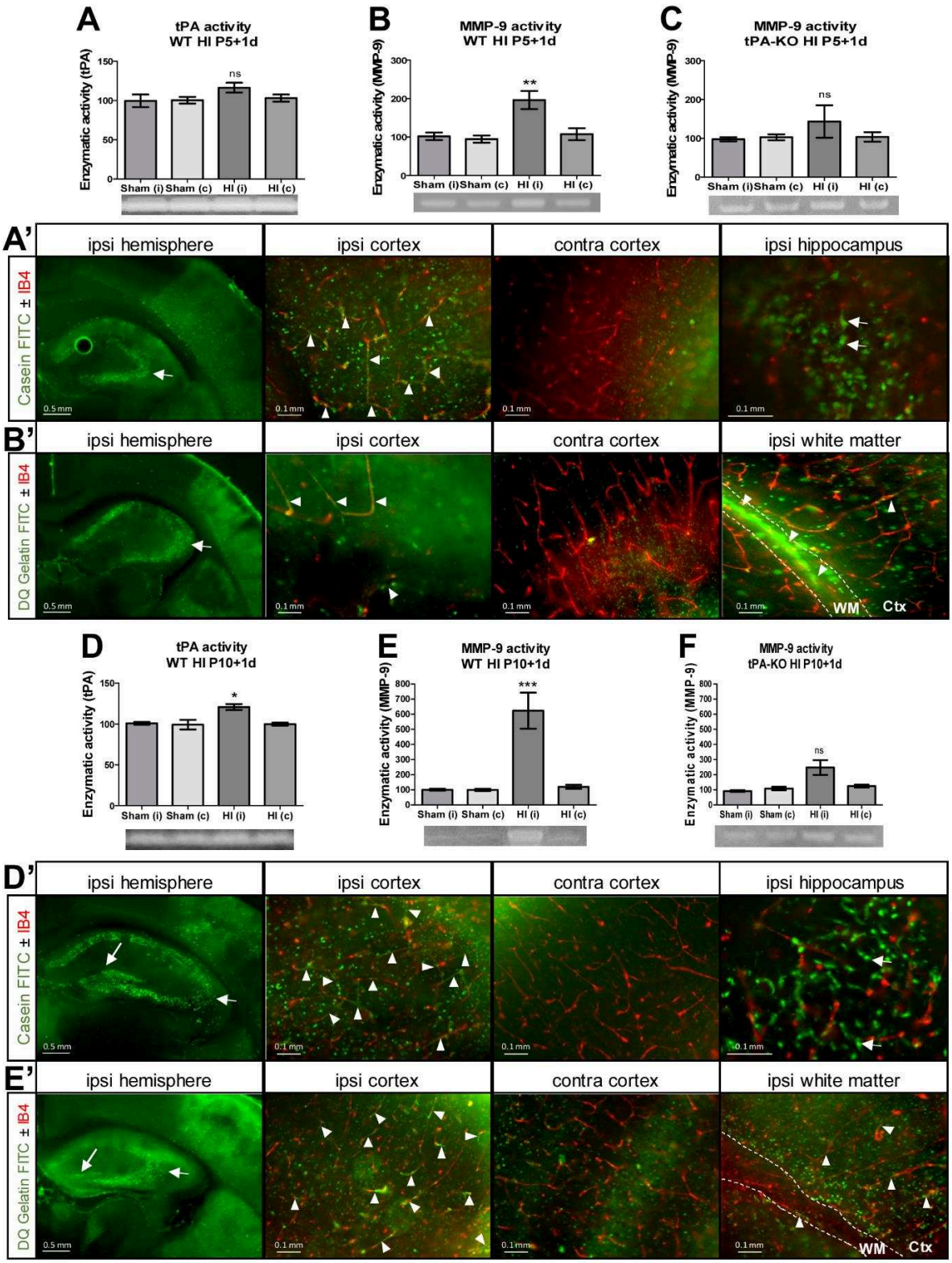


Figure 4. In-gel and in-situ zymographic studies of tPA and MMP-9. Hypoxia-ischemia at P5 led to white matter vessel-specific MMP-9 activity. tPA knock-out prevented HI-induced vascular MMP-9 activity.

*Quantification (**A**) and localization (**A'**) of tPA activity one day (1d) after insult at P5 in WT mice. Quantification (**B**) and localization (**B'**) of MMP-9 activity 1d after insult at P5 in WT mice. **C**, Quantification of MMP-9 activity 1d after insult at P5 in tPA-KO mice. Quantification (**D**) and localization (**D'**) of tPA activity one day (1d) after insult at P10 in WT mice. Quantification (**E**) and localization (**E'**) of MMP-9 activity 1d after insult at P10 in WT mice. **F**, Quantification of MMP-9 activity 1d after insult at P10 in tPA-KO mice. White matter (WM; right picture) was obtained 6h post-HI. * p<0.05; ** p<0.01; and *** p<0.001 vs contralateral activities, short arrows indicate neuronal activities in Ammon's horn, long arrows indicate neuronal activities in dentate gyrus, arrowheads indicate vascular activities.*

Hypoxia-ischemia at P5 led to white matter vessel-specific MMP-9 activity. tPA knock-out prevented HI-induced vascular MMP-9 activity.

In P5 mice, gel caseinolytic zymographies performed in WT mice 24h after HI showed a trend to increased t-PA activity (+13%; p = 0.31) in the lesioned hemisphere (Figure 4A). *In situ,* tPA activity was localized in the cortex and hippocampus. In the cortex, tPA activity was diffuse over the lesioned area and on microvessels (Figure 4A'). In the hippocampus, activity was observed in neuronal cell bodies (Figure 4A'). In-gel gelatinolytic zymographies showed increased MMP-9 activity ipsilateral to the ligature in WT mice 24h after HI (+83%, p = 0.006)(Figure 4B). *In situ* activities were associated with vessels in the cortex and with neurons in the hippocampus (Figure 4B'). At a shorter delay post HI (6h), transient MMP-9 high activity was observed within the WM (Figure 4B'). In tPA-KO mice, in-gel MMP-9 activity did not increase significantly (+38%, p = 0.8)(Figure 4C). *In situ* MMP-9 activity showed restricted localization in neurons in the hippocampus and no vascular activity was detected (Supplemental Figure 2A).

At P10, in-gel caseinolytic zymographies in WT mice 24h after HI showed an increased t-PA activity in the lesioned hemisphere (+21%, p = 0.029)(Figure 4D). Caseinolytic *in situ* zymography showed tPA activity in the ipsilateral cortex and hippocampus 24h after HI. A part of the t-PA activity in the cortex came from microvessels (Figure 4D'). No such activity was observed in the hippocampus (Figure 4D'). In-gel gelatinolytic zymographies showed increased MMP-9 activity (+423%, p ≤ 0.0001) ipsilateral to ligature in WT mice 24h after HI (Figure 4E). Activities in the cortex and hippocampus were associated to vessels in the cortex only (Figure 4E'). In tPA-KO mice, the increased MMP-9 activity in gel did not reach statistical significance (+99%, p = 0.056) (Figure 4F). *In situ* MMP-9 activity was observed in the tPA-KO hippocampus, in line with activation tendency detected in-gel (Figure 4F, Supplemental Figure 2B).

At P10, no MMP-9 activity was detected over WM 6 hours after HI (Figure 4E'). In P5 and P10 pups exposed to HI, tPA-KO abolished MMP-9 activation in cortical and WM vessels. In the hippocampus, activities were detected in neurons of P5 WT and tPA-KO pups. In P10 pups, Ammon's horn distribution of activities resembled those observed at P5 and overlapped with the dentate gyrus neurons (Figure 4D', E').

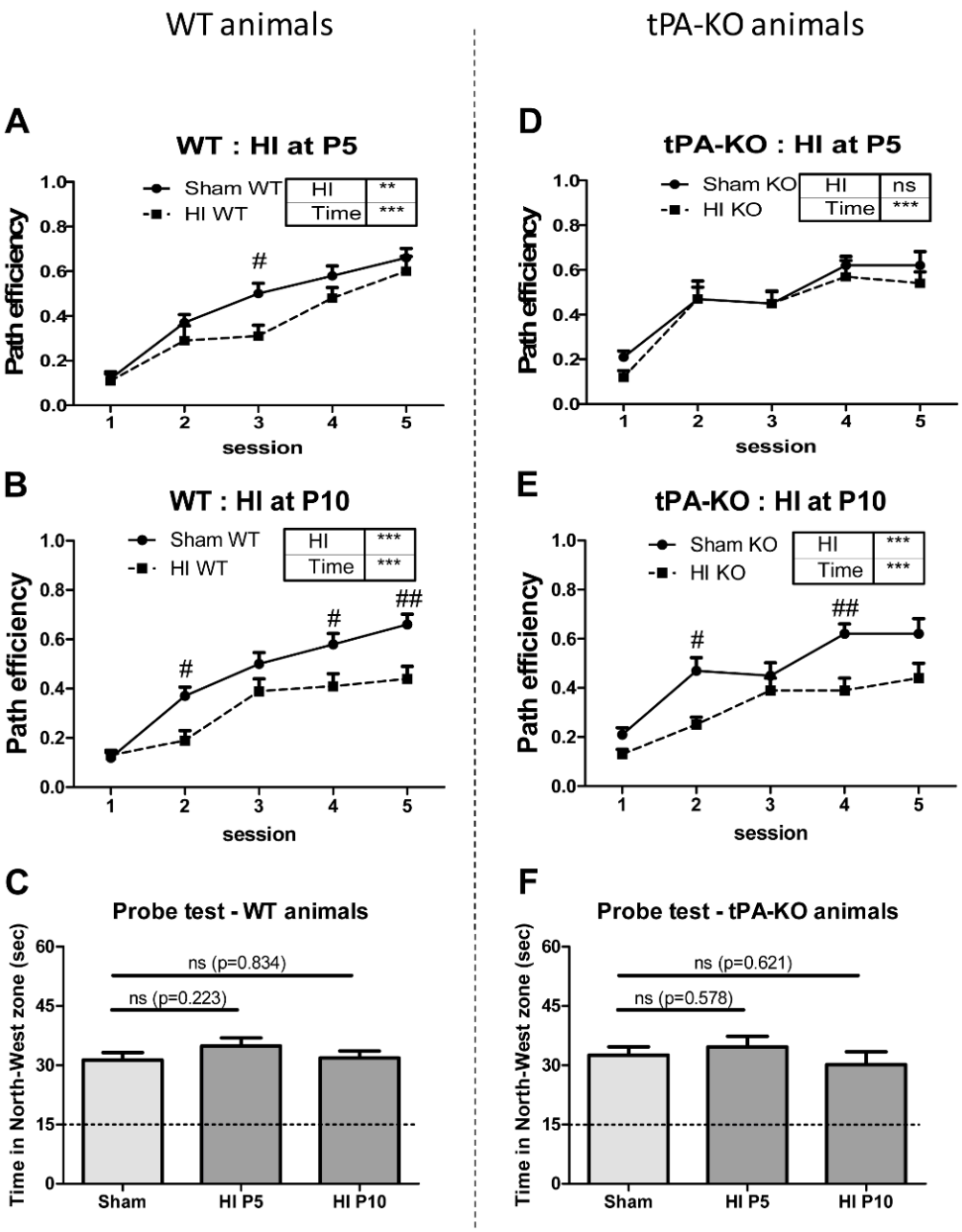


Fig 5. Spatial-learning test: The spatial-learning deficits are more severe in adulthood after hypoxia-ischemia at P10 than at P5. The tPA knock-out is protective only in P5 mice.

*Spatial-learning capabilities were assessed at adulthood using the Morris water maze device after: hypoxia-ischemia at P5 in WT (A) or tPA-KO mice (D) or after hypoxia-ischemia at P10 in WT (B) and tPA-KO mice (E). Memory retention assessed by the probe test was not significantly different between groups (C, F). Boxed data show two-way ANOVA comparisons: ** p<0.01; and *** p<0.001. Post-test comparisons of HI effects vs sham according to Bonferroni post-test: # p<0.05; and ## p<0.01.*

Behavior studies at adulthood showed that hypoxia-ischemia triggered age-specific outcome. tPA knock-out prevented deficits in an age- and behaviour test-dependent manner.

In the MWM test, swim speed, line crossing number, and absolute turn angle during the habituation session did not show alteration in animals of both genotypes exposed to HI at P5 or P10, indicating intact motor capabilities in water for these mice (not shown).

In the sham groups, no genotype differences were observed in MWM learning (Supplemental Figure 3). In sex-matched WT adults injured at P5, HI led to a significant delayed learning (Figure 5A), and tPA gene inactivation protected against this outcome as no learning deficit was detected (Figure 5D). We investigated separately the HI exposed animals of both genotypes at P10 depending on whether the MRI scan showed lesions or not, but we could not detect any difference between the two groups, indicating that an MRI does not permit outcome prediction. Thus, we did not separate the MRI groups in the following MWM and interaction tests. HI at P10 led to a significant decrease of learning capabilities in both WT and tPA-KO mice (Figure 5B, E).

A probe test 2 days after the 5-day learning period did not reveal any difference between groups, meaning HI did not trigger deficit of memory retention (Figure 5C, F).

In the social interaction test, tPA-KO mice had spontaneous higher activity than WT mice during the habituation and interaction periods as measured between sham groups (Supplemental Table 3). Neither rearing, grooming, nor interaction parameters (nose contact and time, entries and time in contact zone) were different in tPA-KO adults, indicating that tPA-KO did not interfere *per se* on interaction with an unknown congener (not shown).

HI at P5 altered adult interaction behavior in WT but not in tPA-KO mice. WT animals showed increased activity in terms of total distance (+47%, $p = 0.037$), rearing (+82%, $p = 0.058$) and reduced immobility (-28%, $p = 0.047$). In addition, they spent more time opposite from the congener in central zone (+154%, $p = 0.001$), to the detriment of congener's closest zones (-13%, $p = 0.049$ in the proximal zone) (Table 1).

All WT mice exposed to HI at P10 showed a significant reduction of entries in the contact zone (-32%, $p = 0.014$), an increased time spent in central zone of the device (+99%, $p = 0.020$) and tendencies to decreased time dedicated to nose pokes (-31%, $p = 0.072$). In tPA-KO mice, HI at P10 did not impact these features (Table 1).

Table 1. Social interaction (SI) test: Hypoxia-ischemia triggers specific hyperactivity after HI at P5 and moderate SI deficits after HI at P10. The tPA knock-out protects from all SI deficits at both ages.
*All times are in seconds. All distances are in meters. * p<0,05 and ** p<0,01 according to unpaired t test. Values out of mean ± 2SD were deleted.*

P5

criteria	**WT**			**tPA-KO**		
	mean ± SEM (n)		**p value**	**mean ± SEM (n)**		**p value**
	Sham	**HI**	**-**	**Sham**	**HI**	**-**
global activity						
total distance (m)	**7.4 ± 1.0 (11)**	**10.9 ± 1.2 (9)**	*** 0,0367**	10.9 ± 1.2 (8)	11.2 ± 1.2 (9)	0,839
rearing number	11.4 ± 2.4 (11)	20.7 ± 4.1 (9)	0,058	14.9 ± 1.8 (8)	17.9 ± 3.6 (9)	0,480
time immobile	**171.8 ± 16.9 (11)**	**124.3 ± 13.2 (9)**	*** 0,0467**	150.6 ± 11.6 (8)	145.2 ± 10.61 (9)	0,737
time repartition within the device						
distal zone: time	44.9 ± 8.6 (11)	66.1 ± 10.3 (9)	0,125	57.4 ± 6.9 (8)	54.8 ± 9.9 (9)	0,838
central zone: time	**14.0 ± 1.9 (9)**	**35.5 ± 5.1 (9)**	**** 0,0011**	29.1 ± 4.7 (8)	27.7 ± 3.1 (9)	0,799
proximal zone: time	**296.4 ± 11.7 (11)**	**258.4 ± 13.9 (9)**	*** 0,0495**	273.5 ± 9.1 (8)	277.5 ± 12.4 (9)	0,802
contact zone: time	99.6 ± 5.1 (11)	82.7 ± 11.5 (9)	0,1689	99.6 ± 7.6 (8)	97.2 ± 10.0 (9)	0,851
concrete interaction						
nose poke: number	9.9 ± 1.1 (11)	9.4 ± 1.5 (9)	0,804	8.9 ± 0.8 (7)	12.2 ± 2.2 (9)	0,214
nose poke: time	31.7 ± 4.3 (11)	28.3 ± 5.4 (9)	0,615	37.1 ± 6.8 (8)	35.3 ± 5.1 (9)	0,835

P10

Criteria	**WT**			**tPA-KO**		
	mean ± SEM (n)		**p value**	**mean ± SEM (n)**		**p value**
	Sham	**HI**	**-**	**Sham**	**HI**	**-**
global activity						
total distance (m)	7.4 ± 1.0 (11)	7.1 ± 0.6 (16)	0,815	10.9 ± 1.2 (8)	12.2 ± 1.9 (13)	0,600
rearing number	11.4 ± 2.4 (11)	12.1 ± 1.4 (16)	0,793	14.9 ± 1.8 (8)	14.2 ± 1.4 (12)	0,757
time immobile	171.8 ± 16.9 (11)	166.7 ± 10.3 (16)	0,784	150.6 ± 11.6 (8)	137.8 ± 14.1 (13)	0,537
time repartition within the device						
distal zone: time	44.9 ± 8.6 (11)	40.2 ± 4.6 (15)	0,610	57.4 ± 6.9 (8)	58.4 ± 7.8 (13)	0,928
central zone: time	**14.0 ± 1.9 (9)**	**27.8 ± 5.0 (16)**	*** 0,0200**	29.1 ± 4.7 (8)	26.0 ± 2.9 (13)	0,567
proximal zone: time	296.4 ± 11.7 (11)	286.8 ± 10.3 (16)	0,546	273.5 ± 9.1 (8)	275.5 ± 8.7 (13)	0,880
contact zone: time	99.6 ± 5.1 (11)	83.8 ± 8.0 (16)	0,110	99.6 ± 7.6 (8)	121.0 ± 9.1 (13)	0,120
concrete interaction						
nose poke: number	9.9 ± 1.1 (11)	8.3 ± 0.9 (16)	0,247	8.9 ± 0.7693 (7)	11.5 ± 1.3 (13)	0,111
nose poke: time	31.7 ± 4.3 (11)	21.9 ± 3.2 (16)	0,072	37.1 ± 6.788 (8)	40.1 ± 4.5 (13)	0,704
specific to P10 mice						
contact zone: entries	**135.5 ± 14.6 (11)**	**91.8 ± 9.4 (15)**	*** 0,0142**	115.8 ± 14.6 (8)	121.1 ± 11.1 (13)	0,772

Global analysis and Principal Component Analysis

A recapitulation of all MRI, histological, and behavioral data is provided in Table 2. Normalized data obtained in longitudinal MRI and behahioral study in 66 animals were used for PCA (Supplemental Table 2). PCA revealed several guiding vectors (Figure 6). The 2 dimensional plot included 55.3% of the variance on 4 identification parameters and 16 variables. SI performance indexes appeared aligned on a SW-NE direction with age and genotype, indicating a relationship between these criteria. MWM performances, cortical subdivisions, and hippocampus lesions appeared aligned in a near orthogonal WNW-ESE direction. The clear discrimination of the SI and MWM indexes shows that they evaluated unlinked capabilities and objectifies the relationship between cortex-hippocampus injuries and poor MWM performance. The association between WM T2 hyper-signal and SI deficits along with age at insult time and genotype, was less univocal and sex appeared poorly related to the overall variability (less than 2%).

Table 2. *Recapitulation of data.* ***+****: presence of MRI hypersignal, protease activation, IgG extravasation or microglial activation;* ***+/–****: moderate IgG extravasation or microglial activation;* ***0****: absent;* ***n****: neuronal localization;* ***p****: parenchymal localization;* ***v****: vascular localization;* ***↘****: lower index than sham;* ***↗****: higher index than sham;* ***=****: no difference from sham.*

Age		P5		P10	
Genotype		WT	tPA-KO	WT	tPA-KO
MRI hyper-signal	Isocortex	+	+	+	+
	Limbic cortex	+	+	+	+
	White matter	+	+	0	0
	Hippocampus	+	+	+	+
	Basal grey Nuclei	+	+	+	+
tPA activity	Cortex	+ (p, v)	0	+ (p, v)	0
	Hippocampus	+ (p, n)	0	+ (p, n)	0
MMP9	Cortex	+ (p, v)	0	+ (p, v)	+ (p)
	Hippocampus	+ (p, n)	+ (p, n)	+ (p, n)	+ (p, n)
	White matter	+ (p, v)	0	0	0
IgG Extravasation	Cortex	+	0	+	+/−
	Hippocampus	+	0	+	+
	White matter	+	0	0	0
Microglial activation	Cortex	+	0	+	+/−
	Hippocampus	+	0	+	+
	White matter	+	0	0	0
Morris water maze	Path efficiency	↘	=	↘	↘
Social interaction	Contact zone entries	=	=	↘	=
	Proximal zone time	↘	=	=	=
	Central zone time	↗	=	↗	=
	Total distance	↗	=	=	=
	Immobility	↘	=	=	=

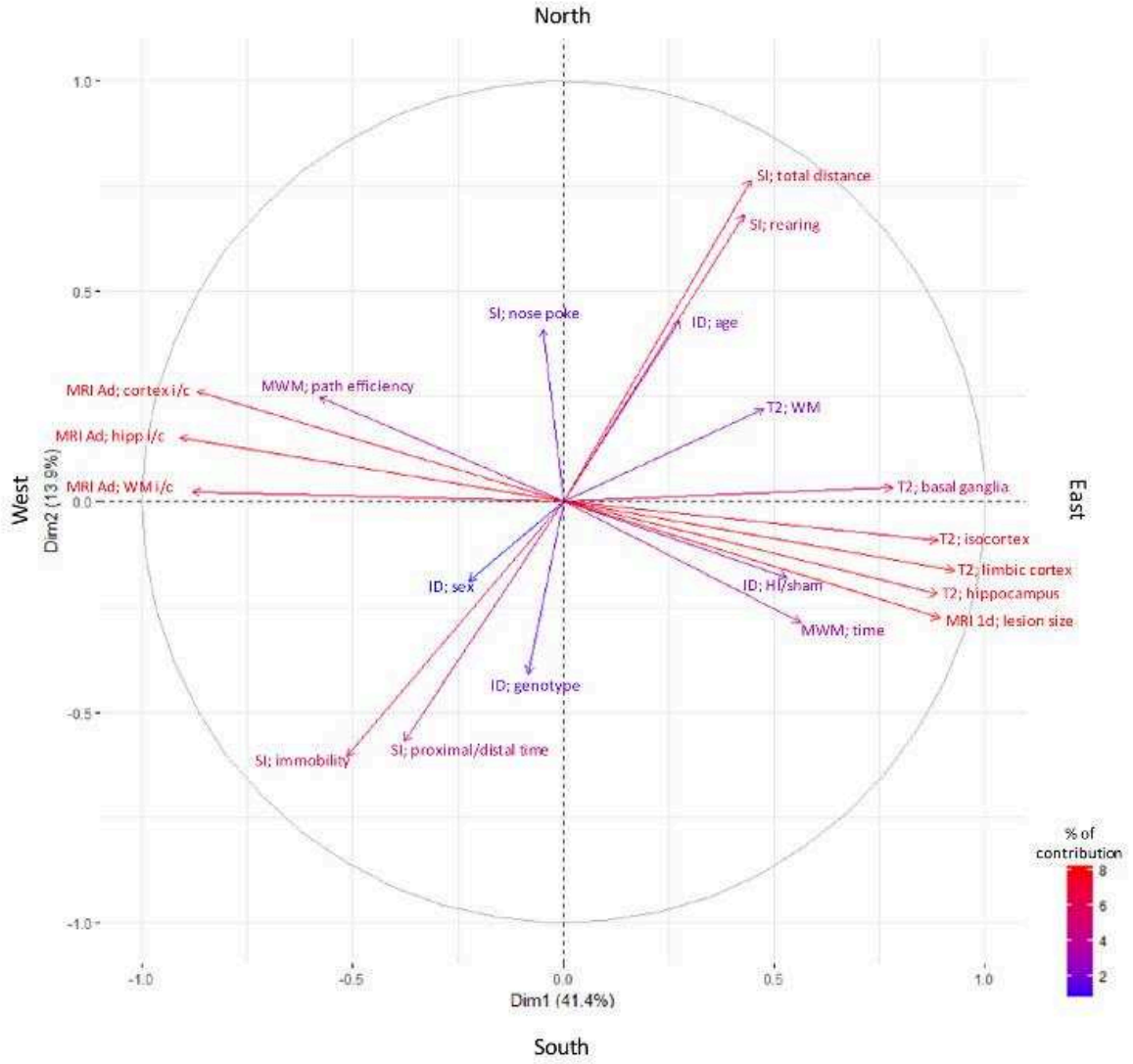


Fig 6. Illustration of Principal Component Analysis (PCA) by 2-dimensional projection plot of correlations. *The PCA shows that the tests we used have analyzed discriminating parameters as they are represented in two orthogonal axes. The parameters "**age**" at the hypoxia-ischemia and "**genotype**" are more related to social interaction results than to spatial-learning results. All the **MRI parameters** except "**T2; WM**" are exclusively related to spatial-learning results. Over all the parameters, "**sex**" is the one which impact less the results.*

*The PCA analysis was conducted using 4 identification (ID) parameters (Lesion, Genotype, Age at insult and Sex) and 16 variables including: **i)** T2-MRI lesion size and signals in definite structures one day (MRI 1d) post insult, **ii)** ipsi to contralateral (i/c) T2-MRI structure size ratios at adulthood (MRI Ad), **iii)** performances in Morris Water Maze (MWM) and Social Interaction (SI**)** tests. Arrow length and color scale indicate the relative contribution of parameter on global variation.*

Discussion

Differences between P5 and P10 injured animals appeared in the model in early MRI scans, at tissue level, and in adult behavior. HI systematically induced lesions at P5 but not in P10 animals. The inconstancy is paralleled by BWC below the first quartile in P10 HI pups in the same range as sham values. These MRI and BWC data in 2 separate groups of P10 animals therefore isolate a 25-30% sub-group of non-lesioned pups, independent of genotype. The major qualitative difference in sensitivity to HI between P5 and P10 mice at the MRI level was the impact of HI on the WM at P5 and its virtual absence at P10, in agreement with the well-known vulnerability of WM at earlier development stages. On this point, MRI imaging and *in situ* MMP-9 induction converged.

tPA and MMP-9 are functionally linked in vessels at gene expression level and activation (Lijnen et al. 1998; Wang et al. 2003). These links underlie deleterious cascade at the vascular site leading to bleeding after the use of thrombolytic tPA in embolic stroke (Montaner et al. 2003). Of note tPA-KO prevented IgG extravasation and, likely through this way, microglial invading and inflammation. But, tPA-KO did not affect water extravasation as showed by MRI hyper-signal and BWC compared to WT, indicating that HI induced a variety of consequences on BBB integrity, with graded severity. IgG extravasation was prevented in the cortex and WM in tPA-KO mice in line with prevention of vascular MMP-9 activation. But, in the hippocampus, tPA-KO did not prevent the neuronal MMP-9 activation, demonstrating the existence of a non vascular and tPA-independent MMP-9 activation pathway in this structure. Since this neuronal MMP-9 activation in the hippocampus occurred in both P5 and P10 tPA-KO mice, while BBB alteration only occurred at P10, one may consider that differences depend on vessel maturity in this structure. Furthermore, the data suggest an association between this essentially tPA-independent MMP-9 activity in hippocampus and impaired MWM performances. Indeed, at this age, MMP-9 activity in dentate gyrus neurons co-occurs with T2-MRI hyper-signal in the retrosplenial cortex, a structure associated to spatial learning (Czajkowski et al. 2014). As a matter of facts, PCA plot actually shows that the genotype vector was not aligned with MWM performance in our experiment.

While tPA-KO did not afford protection in the MWM of P10 injured pups, it conversely reversed SI alterations in adult animals regardless of age at HI insult. The mismatching between effects of tPA inactivation in the two different tests, corroborated by their

orthogonal vectorization in ACP, indicates that HI had different effects when performed at P5 or at P10 and secondarily sustained that tPA had separate implications for these effects.

Alterations in SI behavior, notably hyperactivity, occurred mostly in P5 when WM had special vulnerability to HI. WM in PCA vectorization appeared in the same quadrant as SI hyperactivity indicators. The protection observed in tPA-KO coincides with reduced protease activities, IgG leakage, and microglial activation in WM and cortex in agreement with the literature (Fredriksson et al. 2017). Since a highly integrated function such as social behavior involves many distant territories in relation with the frontal cortex, one could assume that WM injuries in P5 lesioned animals participated in the modifications observed in sociability by imbalance of the inputs at distance of lesioned area, and virtually not at all in P10 exposed animals in which WM was unaffected. The data further validated the involvement of MMP-9 in HI effects in the neonate brain and provided new insights on age-dependent and area-dependent deleterious mechanisms differently based on tPA-dependent vascular activation (Svedin et al. 2007).

The confrontation of BWC, MRI signal, vessel proteolytic activities, and protein extravasation in WT and in tPA-KO mice show that the sole acute T2-MRI hyper-signal extent cannot allow to anticipate either the nature or amplitude of sequels in P5 or P10 exposed grownups. Both pups with or without acute MRI hyper-signal showed behavior disturbances. No univocal correlation between definite structure and altered unique behavioral pattern could be drawn, although PCA, as it included many parameters, allowed to distinguish tendencies.

T2-MRI hyper-signal reflected actual vasogenic edema; tPA-KO did not reduce MRI signal or affect BWC after HI. The discrepancy of IgG extravasation in WT and tPA-KO provides a better discrimination than MRI on the functional trigger of tissue damage. The superimposable distribution of microglial activation makes the link between BBB opening to proteins and the inflammatory process that would induce tissue damage, while water extravasation alone would not, as assumed by paediatricians (Volpe 2008). The data indicate that water and plasma protein extravasation represent graded stages of BBB disruption. Protein leakage depends on MMP-9, while water movement does not. Microglial activation appears to depend on protein leakage, in a tPA-dependent way in the cortex and a tPA-independent way in the hippocampus. The actual leakage of IgG out of the vascular bed nonetheless reveals an injured

BBB, but whether the neuronal MMP-9 activity in the hippocampus is causal remains to be elucidated.

It can be assumed that the mismatching observed by pediatricians between neonatal clinical patterns and sequels result from the addition of early injury and the long-lasting period between the recordings, during which initial damage could interfere with the ongoing development program (Back and Miller 2014). Indeed, genetic background in mice could not account for heterogeneity in the consequences of neonatal HI contrary to humans. However, the data are coherent with clinical observation that neonates without objective lesions or clinical signs could develop CP or the reverse, even if, at a statistical level, the lesion extent is a significant risk factor of CP (Marret et al. 2013). Epidemiologic studies in cohorts of school-age children, and young adults reveal that the physiopathology of NEP is associated with multiple antenatal, perinatal and postnatal factors, even if HI and inflammatory factors are important triggers (Garfinkle et al. 2017; Larroque et al. 2011). NEP is usually considered a non-progressive disorder, although early events interfere with the development program (Back and Miller 2014; Garfinkle et al. 2017; Larroque et al. 2011; Moster et al. 2018). Indeed, very preterm compared to asphyxiated at-term neonates showed increased cerebral palsy (13% vs 6%), hyperactivity, and specific cognitive/behavioral developmental disorders (60% vs 30%), but less mental retardation (4% vs more than 13%) (Garfinkle et al. 2017; Johnson et al. 2018; Moster et al. 2018; Van den Broeck et al. 2008). The higher vulnerability of boys in the neonatal period is well-known, but very little has been reported about the post-pubertal evolution of sequels in adolescents or to long-term differential effects of neonatal therapeutic prevention or curative procedures (Baque et al. 2017). However, ACP indicates that sex had minor influence on animal performances in the present experimental paradigm. On this point the Rice—Vannucci model did not replicate clinical records.

HI in the perinatal period was recently questioned a risk factor for CP for the benefit of inflammatory processes (Gilles et al. 2018). This does not invalidate resorting to the Rice-Vannucci procedure in rodents, since inflammation is actually induced in this model (Rumajogee et al. 2016; Svedin et al. 2007). Among the numerous pathways recruited in the hypoxic-ischemic brain, IgG and likely other plasma protein extravasation trigger microglial activation. Vessels are affected by inflammatory cytokines, even if BBB is tough and functional in neonates (Mallard et al. 2018). However, the perinatal period must be considered in its

evolution during which vessels, as well as other cell populations, undergo major transformations. Angiogenesis and maturation of glial contacts are ongoing, resulting in significant differences between P5 and P10 microvessels in terms of basal lamina, proteases, transporters, signalization actors, and energy metabolism, the whole supporting the notion of weaker constitution at P5 (Porte et al. 2017a; Porte et al. 2017b). Superimposed on the potential vulnerability and functional specificity, it is not conceivable that HI does not affect vessels depending on age. tPA and MMP-9 are central in vascular, microglial, or neuronal biological responses to HI and resulting BBB injuries (Bednarek et al. 2012; Fredriksson et al. 2017; Svedin et al. 2007). The present data agree with this view, but also show that t-PA independent MMP-9 activity may be the trigger of insults in the hippocampus. The question of the respective contributions of proteases to the early lesion and delayed injury restoration make it difficult to conceive of as a therapeutic issue.

In front of the huge black box of environmental interference with brain development, it appears difficult to unravel the effects of neonatal HI-induced events using classical strategies. To our point of view, the Rice—Vannucci HI model remains a heuristic paradigm to describe NEP mechanisms, but this complexity must now be challenged using broader approaches, such as omics (Porte et al. 2017a; Porte et al. 2017b; Saunders et al. 2013). The present study show that MMP-9 dependent vascular injury and BBB opening participate in lesion-induced delayed deficits and sheds light on vasculature as a central actor in HI-induced disorders. The use of omics for identification in blood samples of vessel and/or parenchymal suffering markers in the circulation should provide pertinent tools to evaluate the lesions, anticipate functional impairments, and start prevention-rehabilitation (Graham et al. 2018).

Conclusion

The present study shows that age and area dependent effects of HI were associated with distinct deficits at adulthood, in relation with different vascular and non vascular protease activations. Proteolytic tPA and MMP-9 activities are better indexes of subsequent brain inflammation and remnant sequels than water extravasation. Vascular MMP-9 activity in the cortex and white matter depends on tPA while hippocampal activity does not. However, in all areas a MMP-9 dependent BBB leakage of plasma proteins and subsequent microglial

activation appeared a common trigger of parenchyme injury. The differences in behavior outcome depending on age of animals appeared due to differences in vessel susceptibility to produce MMP-9 and injury in white matter. Hippocampal vessels also appeared unable to produce MMP-9 activity, but such MMP-9 activation in neurons is responsible for age dependent vessel alteration. These observations put vessels as a central actor of neonatal brain injuries after HI and open therapeutic perspectives oriented to vessel protection.

References

Back SA, Miller SP. Brain injury in premature neonates: A primary cerebral dysmaturation disorder? Ann Neurol 2014; 75:469-86

Baque E, Barber L, Sakzewski L, Ware R, Boyd RN. Characteristics associated with physical activity capacity and performance in children and adolescents with an acquired brain injury. Brain Inj 2017; 31:667-73

Bednarek N, Svedin P, Garnotel R, Favrais G, Loron G, Schwendiman L et al. Increased MMP-9 and TIMP-1 in mouse neonatal brain and plasma and in human neonatal plasma after hypoxia-ischemia: a potential marker of neonatal encephalopathy. Pediatr Res 2012; 71:63-70

Czajkowski R, Jayaprakash B, Wiltgen B, Rogerson T, Guzman-Karlsson MC, Barth AL et al. Encoding and storage of spatial information in the retrosplenial cortex. Proc Natl Acad Sci U S A 2014; 111:8661-6

Daher I, Le Dieu-Lugon B, Lecointre M, Dupre N, Voisin C, Leroux P et al. Time- and sex-dependent efficacy of magnesium sulfate to prevent behavioral impairments and cerebral damage in a mouse model of cerebral palsy. Neurobiol Dis 2018; 120:151-64

Fernandez-Lopez D, Faustino J, Daneman R, Zhou L, Lee SY, Derugin N et al. Blood-brain barrier permeability is increased after acute adult stroke but not neonatal stroke in the rat. J Neurosci 2012; 32:9588-600

Fernandez-Monreal M, Lopez-Atalaya JP, Benchenane K, Cacquevel M, Dulin F, Le Caer JP et al. Arginine 260 of the amino-terminal domain of NR1 subunit is critical for tissue-type plasminogen activator-mediated enhancement of N-methyl-D-aspartate receptor signaling. J Biol Chem 2004; 279:50850-6

Ferriero DM. Neonatal brain injury. N Engl J Med 2004; 351:1985-95

Fredriksson L, Lawrence DA, Medcalf RL. tPA Modulation of the Blood-Brain Barrier: A Unifying Explanation for the Pleiotropic Effects of tPA in the CNS. Semin Thromb Hemost 2017; 43:154-68

Garfinkle J, Wintermark P, Shevell MI, Oskoui M. Children born at 32 to 35 weeks with birth asphyxia and later cerebral palsy are different from those born after 35 weeks. J Perinatol 2017; 37:963-68

Gilles F, Gressens P, Dammann O, Leviton A. Hypoxia-ischemia is not an antecedent of most preterm brain damage: the illusion of validity. Dev Med Child Neurol 2018; 60:120-25

Graham EM, Everett AD, Delpech JC, Northington FJ. Blood biomarkers for evaluation of perinatal encephalopathy: state of the art. Curr Opin Pediatr 2018; 30:199-203

Henry VJ, Lecointre M, Laudenbach V, Ali C, Macrez R, Jullienne A et al. High t-PA release by neonate brain microvascular endothelial cells under glutamate exposure affects neuronal fate. Neurobiol Dis 2013; 50:201-8

Johnson S, Waheed G, Manktelow BN, Field DJ, Marlow N, Draper ES et al. Differentiating the Preterm Phenotype: Distinct Profiles of Cognitive and Behavioral Development Following Late and Moderately Preterm Birth. J Pediatr 2018; 193:85-92 e1

Khwaja O, Volpe JJ. Pathogenesis of cerebral white matter injury of prematurity. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed 2008; 93:F153-61

Kinney HC, Volpe JJ. Modeling the encephalopathy of prematurity in animals: the important role of translational research. Neurol Res Int 2012; 2012:295389

Larroque B, Ancel PY, Marchand-Martin L, Cambonie G, Fresson J, Pierrat V et al. Special care and school difficulties in 8-year-old very preterm children: the Epipage cohort study. PLoS One 2011; 6:e21361

Lijnen HR, Silence J, Lemmens G, Frederix L, Collen D. Regulation of gelatinase activity in mice with targeted inactivation of components of the plasminogen/plasmin system. Thromb Haemost 1998; 79:1171-6

Mallard C, Ek CJ, Vexler ZS. The myth of the immature barrier systems in the developing brain: role in perinatal brain injury. J Physiol 2018;

Marret S, Gressens P, Gadisseux JF, Evrard P. Prevention by magnesium of excitotoxic neuronal death in the developing brain: an animal model for clinical intervention studies. Dev Med Child Neurol 1995; 37:473-84

Marret S, Marchand-Martin L, Picaud JC, Hascoët JM, Arnaud C, Rozé JC et al. Brain injury in very preterm children and neurosensory and cognitive disabilities during childhood: The EPIPAGE cohort study. PLos One 2013; 8:e62683

Montaner J, Molina CA, Monasterio J, Abilleira S, Arenillas JF, Ribo M et al. Matrix metalloproteinase-9 pretreatment level predicts intracranial hemorrhagic complications after thrombolysis in human stroke. Circulation 2003; 107:598-603

Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. J Neurosci Methods 1984; 11:47-60

Moster D, Lie RT, Markestad T. Long-term medical and social consequences of preterm birth. N Engl J Med 2018; 359:262-73

Porte B, Chatelain C, Hardouin J, Derambure C, Zerdoumi Y, Hauchecorne M et al. Proteomic and transcriptomic study of brain microvessels in neonatal and adult mice. PLoS One 2017a; 12:e0171048

Porte B, Hardouin J, Zerdoumi Y, Derambure C, Hauchecorne M, Dupre N et al. Major remodeling of brain microvessels during neonatal period in the mouse: A proteomic and transcriptomic study. J Cereb Blood Flow Metab 2017b; 37:495-513

Rice JE, 3rd, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. Ann Neurol 1981; 9:131-41

Rumajogee P, Bregman T, Miller SP, Yager JY, Fehlings MG. Rodent Hypoxia-Ischemia Models for Cerebral Palsy Research: A Systematic Review. Front Neurol 2016; 7:57

Saghatelyan A. Role of blood vessels in the neuronal migration. Semin Cell Dev Biol 2009; 20:744-50

Saunders NR, Daneman R, Dziegielewska KM, Liddelow SA. Transporters of the blood-brain and blood-CSF interfaces in development and in the adult. Mol Aspects Med 2013; 34:742-52

Svedin P, Hagberg H, Savman K, Zhu C, Mallard C. Matrix metalloproteinase-9 gene knock-out protects the immature brain after cerebral hypoxia-ischemia. J Neurosci 2007; 27:1511-8

Tsai HH, Niu J, Munji R, Davalos D, Chang J, Zhang H et al. Oligodendrocyte precursors migrate along vasculature in the developing nervous system. Science 2016; 351:379-84

Van den Broeck C, Himpens E, Vanhaesebrouck P, Calders P, Oostra A. Influence of gestational age on the type of brain injury and neuromotor outcome in high-risk neonates. Eur J Pediatr 2008; 167:1005-9

Volpe JJ. Hypoxic-ischemic encephalopathy: Neuropathology and pathogenesis. In: *Neurology of the newborn* (Volpe JJ, ed), Philadelphia: Saunders, 2008; p^pp 347-99

Wang X, Lee SR, Arai K, Lee SR, Tsuji K, Rebeck GW et al. Lipoprotein receptor-mediated induction of matrix metalloproteinase by tissue plasminogen activator. Nat Med 2003; 9:1313-7

Xue M, Fan Y, Liu S, Zygun DA, Demchuk A, Yong VW. Contributions of multiple proteases to neurotoxicity in a mouse model of intracerebral haemorrhage. Brain 2009; 132:26-36

SUPPLEMENT DATA

Supplemental Tables

Supplemental Table 1. Statistical analysis

Experiments	Test	n independents experiments	p value ns p>0.05; *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001
Figure 1A: MRI study after HI at P5			

Lesion size WT vs tPA-KO	Kruskal–Wallis test
	&
	Dunn's Multiple Comparison post-test
		n=4 (Sham WT);
		n=9 (HI WT);
		n=4 (Sham tPA-KO);
		n=11 (HI tPA-KO)
			Kruskal–Wallis test p=0.0013**
			&
			Dunn's
			Sham WT vs HI WT p=0.0124*
			Sham tPA-KO vs HI tPA-KO p=0.0339*
			HI WT vs HI tPA-KO ns

Cortex size ipsi vs contra WT	Unpaired t test	n=8	p=0.0106* [t_{14}=2.949]
Cortex size ipsi vs contra tPA-KO	Unpaired t test with Welch's correction	n=10	p=0.0271* [t_{11}=2.548]
Hippocampus size ipsi vs contra WT	Unpaired t test with Welch's correction	n=8	p<0.0001*** [t_{8}=7.393]
Hippocampus size ipsi vs contra tPA-KO	Unpaired t test with Welch's correction	n=10	p=0.0006*** [t_{11}=4.718]
External capsule length ipsi vs contra WT	Unpaired t test	n=8	p<0.0001*** [t_{14}=5.815]
External capsule length ipsi vs contra tPA-KO	Unpaired t test with Welch's correction	n=10	p=0.0253* [t_{10}=2.626]
Figure 1B: MRI study after HI at P10 (lesioned animals only)			

Lesion size WT vs tPA-KO	Kruskal–Wallis test
	&
	Dunn's Multiple Comparison post-test
		n=7 (Sham WT);
		n=12 (HI WT);
		n=7 (Sham tPA-KO);
		n=15 (HI tPA-KO)
			Kruskal-Wallis test p<0.0001***
			&
			Dunn's
			Sham WT vs HI WT p=0.0030**
			Sham tPA-KO vs HI tPA-KO p=0.0004***
			HI WT vs HI tPA-KO ns

Cortex size ipsi vs contra WT	Unpaired t test with Welch's correction	n=11	p=0.0101* [t_{10}=3.164]
Cortex size ipsi vs contra tPA-KO	Unpaired t test with Welch's correction	n=9	p=0.0081** [t_{8}=3.498]
Hippocampus size ipsi vs contra WT	Unpaired t test with Welch's correction	n=11	p=0.0043** [t_{11}=3.580]
Hippocampus size ipsi vs contra tPA-KO	Unpaired t test with Welch's correction	n=9	p=0.0276* [t_{9}=2.624]
External capsule length ipsi vs contra WT	Unpaired t test with Welch's correction	n=11	ns (p=0.0659) [t_{11}=2.042]
External capsule length ipsi vs contra tPA-KO	Unpaired t test with Welch's correction	n=9	ns (p=0.2555) [t_{11}=1.200]
Figure 1C: Frequency of T2-hypersignal observations per structure 24h after HI at P5 or P10 (lesioned animals only)			

External capsule P5 vs P10	Fisher's exact test	Frequency calculated from 20 MRI scans at P5 27 MRI scans at P10	P<0.0001***
Cortical deep white matter P5 vs P10	Fisher's exact test	Frequency calculated from 20 MRI scans at P5 27 MRI scans at P10	P<0.0001***
Dorsal geniculate P5 vs P10	Fisher's exact test	Frequency calculated from 20 MRI scans at P5 27 MRI scans at P10	p=0.0159*
Retrosplenial cortex P5 vs P10	Fisher's exact test	Frequency calculated from 20 MRI scans at P5 27 MRI scans at P10	p=0.0044**
Figure 2A Brain Water Content 1 day after HI at P5 or P10 in WT mice			
WT Sham P5+1d vs WT HI P5+1d	Unpaired t test	n=28 (Sham WT) n=32 (HI WT)	p<0.0001*** [t_{59}=4.067]
WT Sham P10+1d vs WT HI P10+1d	Unpaired t test with Welch's correction	n=18 (Sham WT) n=18 (HI WT)	p<0.0001*** [$t_{20.47}$=4.679]
Figure 2B: Brain Water Content 1 day after HI at P5 or P10 in tPA-KO mice			
tPA-KO Sham P5+1d vs tPA-KO HI P5+1d	Unpaired t test	n=12 (Sham tPA-KO) n=18 (HI tPA-KO)	p=0.0113* [t_{28}=2.714]
tPA-KO Sham P10+1d vs tPA-KO HI P10+1d	Unpaired t test with Welch's correction	n=19 (Sham tPA-KO) n=16 (HI tPA-KO)	p=0.0221* [$t_{22.83}$=2.455]
Figure 4A: Casein gel zymography 1 day after HI at P5 in WT mice (exact p value)			
tPA activity in WT mice HI(ipsi) vs HI(contra)	Mann–Whitney test	n=5	ns (p=0.3095)
Figure 4B: Gelatin gel zymography 1 day after HI at P5 in WT mice (exact p value)			
MMP-9 activity in WT mice HI(ipsi) vs HI(contra)	Mann–Whitney test	n=9	p=0.0056**
Figure 4C: Gelatin gel zymography 1 day after HI at P5 in tPA-KO mice (exact p value)			
MMP-9 activity in tPA-KO mice HI(ipsi) vs HI(contra)	Mann–Whitney test	n=8	ns (p=0.7984)
Figure 4D: Casein gel zymography 1 day after HI at P10 in WT mice (exact p value)			
tPA activity in WT mice HI(ipsi) vs HI(contra)	Mann–Whitney test	n=4	p=0.0286*
Figure 4E: Gelatin gel zymography 1 day after HI at P10 in WT mice (exact p value)			
MMP-9 activity in WT mice HI(ipsi) vs HI(contra)	Mann–Whitney test	n=9	p<0.0001***
Figure 4F: Gelatin gel zymography 1 day after HI at P10 in tPA-KO mice (exact p value)			
MMP-9 activity in tPA-KO mice HI(ipsi) vs HI(contra)	Mann–Whitney test	n=10	ns (p=0.0547)
Figure 5A: Morris Water Maze at adulthood after P5 HI in WT mice			
HI effect Sham WT vs HI WT	Two way ANOVA & Bonferroni post-test	n=11 (Sham WT) n=8 (HI WT)	ANOVA Interaction ns (p=0.3954) [F(4, 85)=1.032] HI effect p=0.0033** [F(1, 85)=9.47] Time effect p<0.0001*** [F(4, 85)=36.84] & Bonferroni Session 3 p=0.0224# [t_{18}=2.920]

Figure 5B: Morris Water Maze at adulthood after P10 HI in WT mice (lesioned + non-lesioned animals)			
HI effect Sham WT vs HI WT	Two-way ANOVA & Bonferroni post-test	n=11 (Sham WT) n=16 (HI WT)	ANOVA Interaction ns (p=0.0843) [F(4, 125)=2.103] HI effect p<0.0001*** [F(1, 125)=23.52] Time effect p<0.0001*** [F(4, 125)=31.79] & Bonferroni Session 2 p=0.0212$^{\#}$ [t_{26}=2.913] Session 4 p=0.0341$^{\#}$ [t_{26}=2.751] Session 5 p=0.0026$^{\#\#}$ [t_{26}=3.561]
Figure 5C: Morris Water Maze Probe test at adulthood after HI at P5 or P10 in WT mice			
HI effect at P5 Sham WT vs HI WT	Unpaired t test	n=11 (Sham WT) n=9 (HI WT)	ns (p=0.223)
HI effect at P10 Sham WT vs HI WT	Unpaired t test	n= 11 (Sham WT) n=16 (HIP10)	ns (p=0.834)
Figure 5D: Morris Water Maze at adulthood after P5 HI in tPA-KO mice			
HI effect Sham tPA-KO vs HI tPA-KO	Two-way ANOVA & Bonferroni post-test	n=7 (Sham tPA-KO) n=9 (HI tPA-KO)	ANOVA Interaction ns (p=0.8903) [F(4, 70)=0.2794] HI effect ns (p=0.2282) [F(1, 70)=1.478] Time effect p<0.0001*** [F(4, 70)=18.25]
Figure 5E: Morris Water Maze at adulthood after P10 HI in tPA-KO mice (lesioned + non-lesioned animals)			
HI effect Sham tPA-KO vs HI tPA-KO	Two-way ANOVA & Bonferroni post-test	n=7 (Sham tPA-KO) n=13 (HI tPA-KO)	ANOVA Interaction ns (p=0.2908) [F(4, 90)=1.262] HI effect p<0.0001*** [F(1, 90)=23.84] Time effect p<0.0001*** [F(4, 90)=16.64] & Bonferroni Session 2 p=0.0122$^{\#}$ [t_{19}=3.119] Session 4 p=0.0079$^{\#\#}$ [t_{19}=3.261]
Figure 5F: Morris Water Maze Probe test at adulthood after HI at P5 or P10 in tPA-KO mice			
HI effect at P5 Sham tPA-KO vs HI tPA-KO	Unpaired t test	n=7 (Sham tPA-KO) n=9 (HI tPA-KO)	ns (p=0.578)
HI effect at P10 Sham tPA-KO vs HI tPA-KO	Unpaired t test	n=7 (Sham tPA-KO) n=14 (HI tPA-KO)	ns (p=0.621)
Supplemental Figure 1A: Swelling of ipsilateral hemisphere 1 day after HI at P5 or P10 in WT and tPA-KO mice (exact p value)			
RH/LH ratio WT P5+1d Sham vs HI	Mann–Whitney test	n=4 (Sham WT) n=9 (HI WT)	p=0.0028**
RH/LH ratio tPA-KO P5+1d Sham vs HI	Mann–Whitney test	n=4 (Sham tPA-KO) n=11 (HI tPA-KO)	p=0.0029**
RH/LH ratio WT P10+1d Sham vs HI	Mann–Whitney test	n=7 (Sham WT) n=12 (HI WT)	p=0.0403*
RH/LH ratio tPA-KO P10+1d Sham vs HI	Mann–Whitney test	n=7 (Sham tPA-KO) n=15 (HI tPA-KO)	p=0.0035**
Supplemental Figure 1B: Atrophy of ipsilateral hemisphere 5 day after HI at P5 or P10 in WT and tPA-KO mice (exact p value)			
RH/LH ratio WT P5+5d Sham vs HI	Mann–Whitney test	n=4 (Sham WT) n=8 (HI WT)	p=0.0081**
RH/LH ratio tPA-KO P5+5d Sham vs HI	Mann–Whitney test	n=3 (Sham tPA-KO) n=11 (HI tPA-KO)	p=0.0055**
RH/LH ratio WT P10+5d Sham vs HI	Mann–Whitney test	n=7 (Sham WT) n=12 (HI WT)	p=0.0005***

RH/LH ratio tPA-KO P10+5d Sham vs HI	Mann–Whitney test	n=7 (Sham tPA-KO) n=14 (HI tPA-KO)	ns (p=0.0578)
Supplemental Figure 1C: Delayed mortality after HI at P10; genotype effect			
Delayed mortality after P10 HI WT vs tPA-KO	Fisher's exact test	2/16 (HI WT) 9/13 (HI tPA-KO)	ns (p=0.0727)
Supplemental Figure 1D: Delayed mortality after HI at P5; genotype effect			
Delayed mortality after P5 HI WT vs tPA-KO	Fisher's exact test	1/9 (HI WT) 1/9 (HI tPA-KO)	ns (p=1.0000)
Supplemental Figure 3: Morris Water Maze at adulthood, genotype effect in Sham population			
Genotype effect Sham WT vs Sham tPA-KO	Two-way ANOVA & Bonferroni post-test	n=11 (Sham WT) n=7 (Sham tPA-KO)	ANOVA Interaction ns (p=0.2830) [F(4, 80)=1.285] Genotype effect ns (p=0.3172) [F(1, 80)=1.013] Time effect p<0.0001*** [F(4, 80)=36.41]

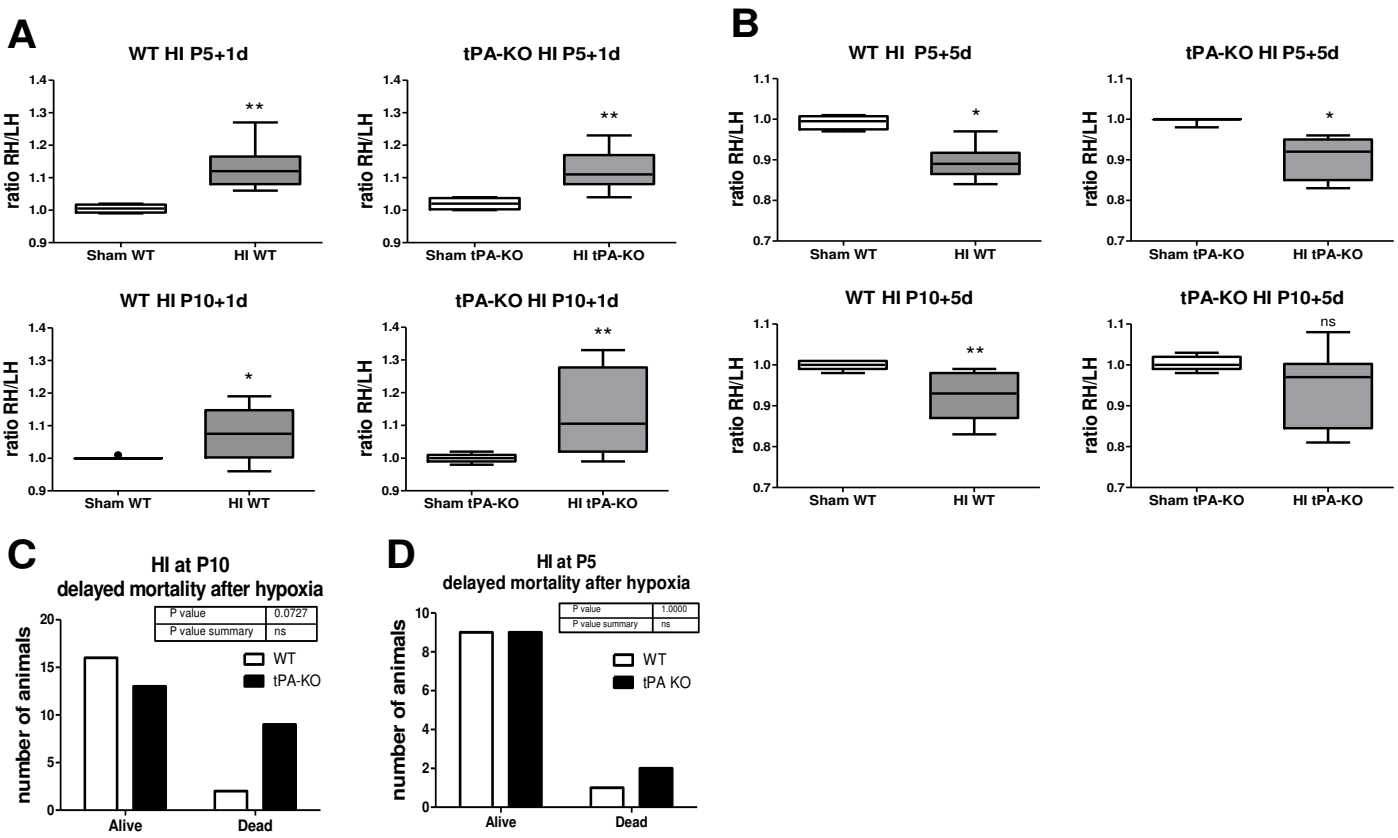
Supplemental Table 2. *Encoded data used for PCA analysis. Four identification parameters including; genotype, sex, age at insult and HI/Sham status. Nine MRI-related parameters including* ***i)*** *lesion size 1 day after HI* ***ii)*** *cortex, hippocampus and white matter R/L ratio at adulthood* ***iii)*** *T2-hypersignal frequency in isocortex-, limbic cortex-, WM-, hippocampus- and basal ganglia-related structures. Two parameters related to Morris water maze learning test: time to reach the platform and path efficiency. Five parameters of social interaction test including: total distance, rearing and nose poke number, proximal/(central + distal) time ratio and immobility time*.

	IDENTIFICATION				MRI				MWM test		Social Interaction test					T2-MRI Hypersignal localization				
	WT=1 ; KO=0	M=1 ; F=0	P5=1 ; P10=0	RV=1 ; Sh=0																
Animal n°	genotype	sex	age	HI/Sh	lesion 24h	ctx R/L ratio	hip R/L ratio	WM R/L ratio	time	path	total distance	rearing	nose poke	proximal/(central+distal) time	immobility	Isocortex	Limbic Ctx	WM	Hippocampus	Basal ganglia
L1C7S2	1	1	1	0	1	9	9	9	2	7	1	1	4	10	10	0	0	0	0	0
L4C6S1	1	1	1	0	1	8	8	8	7	5	4	5	8	3	5	0	0	0	0	0
L1C6S1	1	1	0	0	1	9	10	8	1	8	4	4	8	6	8	0	0	0	0	0
L2C5S1	1	1	0	0	1	9	10	8	1	9	4	2	9	6	4	0	0	0	0	0
L3C6S1	1	1	0	0	1	9	9	9	1	7	5	6	4	1	4	0	0	0	0	0
L5C6S3	1	1	0	0	1	9	9	8	3	8	1	1	2	10	6	0	0	0	0	0
L5C6S2	1	1	0	0	1	10	9	10	3	6	2	6	1	6	8	0	0	0	0	0
L3C1S1	1	0	0	0	1	10	9	9	3	10	1	1	7	10	10	0	0	0	0	0
L4C1S1	1	0	0	0	1	8	9	8	2	7	1	1	3	10	10	0	0	0	0	0
L2C1S2	1	0	1	0	1	8	10	8	3	7	7	8	8	2	2	0	0	0	0	0
L2C1S3	1	0	1	0	1	9	9	8	2	7	7	9	5	2	2	0	0	0	0	0
L1C4S1	0	1	1	0	1	9	10	8	1	10	3	4	10	3	10	0	0	0	0	0
L2C3S1	0	1	0	0	1	8	9	9	4	8	5	8	5	6	4	0	0	0	0	0
L2C3S2	0	1	0	0	1	9	9	10	3	9	10	5	5	2	2	0	0	0	0	0
L3C5S1	0	1	0	0	1	10	10	10	3	7	3	2	5	4	9	0	0	0	0	0
L5C2S1	0	0	0	0	1	10	9	8	3	6	10	5	5	3	3	0	0	0	0	0
L5C2S2	0	0	0	0	1	10	9	9	3	6	5	7	2	4	4	0	0	0	0	0
L1C3S1	0	0	1	0	1	9	9	8	2	8	5	6	2	2	7	0	0	0	0	0
L3C4S1	0	0	1	0	1	9	9	8	1	10	7	5	6	5	6	0	0	0	0	0
L1C2S1	1	0	1	1	5	8	7	6	5	3	5	2	9	6	6	2	0	3	2	0
L2C1S1	1	0	1	1	6	6	3	3	10	1	10	10	8	1	1	4	2	3	2	0
L5C1S1	1	0	1	1	3	7	6	5	4	4	7	6	4	1	1	1	1	3	3	0
L5C1S2	1	0	1	1	1	9	8	8	2	7	8	10	3	3	1	0	0	0	0	0
L1C7S1	1	1	1	1	8	4	5	3	1	10	4	6	4	2	4	3	3	4	4	5
L2C4S1	1	1	1	1	2	8	5	3	7	5	9	10	10	3	3	0	0	3	2	1
L4C6S2	1	1	1	1	3	8	6	6	3	5	5	10	3	3	2	3	1	4	3	1
L4C6S3	1	1	1	1	4	8	5	5	3	5	2	1	1	9	8	2	1	3	4	1
L4C6S4	1	1	1	1	4	8	2	4	5	8	2	4	2	2	7	3	2	3	4	2
L1C3S2	0	0	1	1	7	1	1	1	10	1	7	5	8	3	2	3	4	1	4	5
L1C3S3	0	0	1	1	3	5	3	6	4	6	3	1	4	4	9	2	2	2	1	3
L1C3S4	0	0	1	1	5	3	1	1	5	3	8	9	5	1	3	3	3	1	4	4
L4C2S1	0	0	1	1	8	4	1	1	3	6	9	10	5	2	1	3	4	4	3	5
L4C2S2	0	0	1	1	3	7	9	7	3	9	10	4	10	4	6	1	0	2	0	0
L4C3S1	0	1	1	1	3	6	2	2	3	8	4	6	3	10	5	1	1	3	3	4
L4C4S1	0	1	1	1	3	8	3	1	2	9	5	7	1	4	5	2	1	2	3	1
L4C5S1	0	1	1	1	2	9	7	8	1	10	2	2	9	5	9	1	1	3	3	0
L5C4S1	0	1	1	1	2	10	6	5	2	10	8	10	10	5	5	1	0	3	2	1
L1C1S2	1	0	0	1	10	1	2	6	6	2	6	7	7	1	5	4	3	0	5	2
L3C2S1	1	0	0	1	2	9	9	9	3	5	4	5	5	6	2	0	0	0	1	0
L3C2S2	1	0	0	1	2	8	8	8	3	8	2	2	6	10	7	0	0	0	1	0
L4C1S2	1	0	0	1	2	8	9	8	7	3	1	2	1	10	10	0	0	0	1	0
L4C1S3	1	0	0	1	10	1	5	5	6	3	3	5	4	9	6	3	3	0	2	0
L4C1S4	1	0	0	1	10	2	1	2	8	1	2	1	1	3	9	1	3	0	4	1
L2C5S2	1	1	0	1	2	8	9	10	4	8	2	2	4	6	9	0	0	0	1	0
L2C5S3	1	1	0	1	10	1	1	1	10	1	7	5	8	2	1	5	4	0	5	2
L5C5S2	1	1	0	1	2	8	7	9	6	4	3	5	5	5	10	0	0	0	1	0
L5C5S3	1	1	0	1	10	1	1	1	6	4	2	5	4	8	7	4	2	1	5	1
L1C1S1	1	0	0	1	1	8	7	8	2	7	5	8	8	4	6	0	0	0	0	0
L3C6S2	1	1	0	1	1	10	9	9	6	5	1	5	5	4	5	0	0	0	0	0
L3C6S3	1	1	0	1	1	9	9	8	9	3	5	5	3	4	6	0	0	0	0	0
L3C6S4	1	1	0	1	1	9	10	10	9	1	3	4	1	5	7	0	0	0	0	0
L5C5S1	1	1	0	1	1	9	9	10	5	7	3	7	1	1	6	0	0	0	0	0
L5C6S1	1	1	0	1	1	9	9	9	3	10	1	2	3	4	10	0	0	0	0	0
L2C2S2	0	0	0	1	2	8	7	8	4	5	6	7	8	3	7	0	0	0	2	0
L3C3S1	0	0	0	1	2	8	9	8	3	7	4	3	10	7	8	0	0	1	0	0
L5C2S3	0	0	0	1	10	1	1	1	10	1	10	10	1	2	1	3	3	0	4	2
L5C2S4	0	0	0	1	10	4	6	6	10	1	10	9	5	2	1	6	4	1	4	6
L1C5S1	0	1	0	1	9	1	3	4	10	2	7	5	5	3	3	1	3	0	4	2
L2C3S3	0	1	0	1	2	9	8	8	4	7	3	3	6	9	7	0	0	0	1	0
L3C5S2	0	1	0	1	2	9	9	9	4	6	4	4	10	6	5	0	0	0	1	0
L2C2S1	0	0	0	1	1	9	8	8	3	9	3	5	6	1	10	0	0	0	1	0
L2C2S3	0	0	0	1	1	7	8	8	3	5	6	7	10	3	5	0	0	0	0	0
L3C5S3	0	1	0	1	1	8	9	9	5	3	5	4	4	3	5	0	0	0	0	0
L3C5S4	0	1	0	1	1	8	8	9	10	2	3	4	7	4	6	0	0	0	0	0
L3C5S5	0	1	0	1	1	8	8	10	4	7	6	6	5	4	5	0	0	0	0	0
L5C3S1	0	1	0	1	1	9	10	8	4	4	10	5	8	5	2	0	0	0	0	0

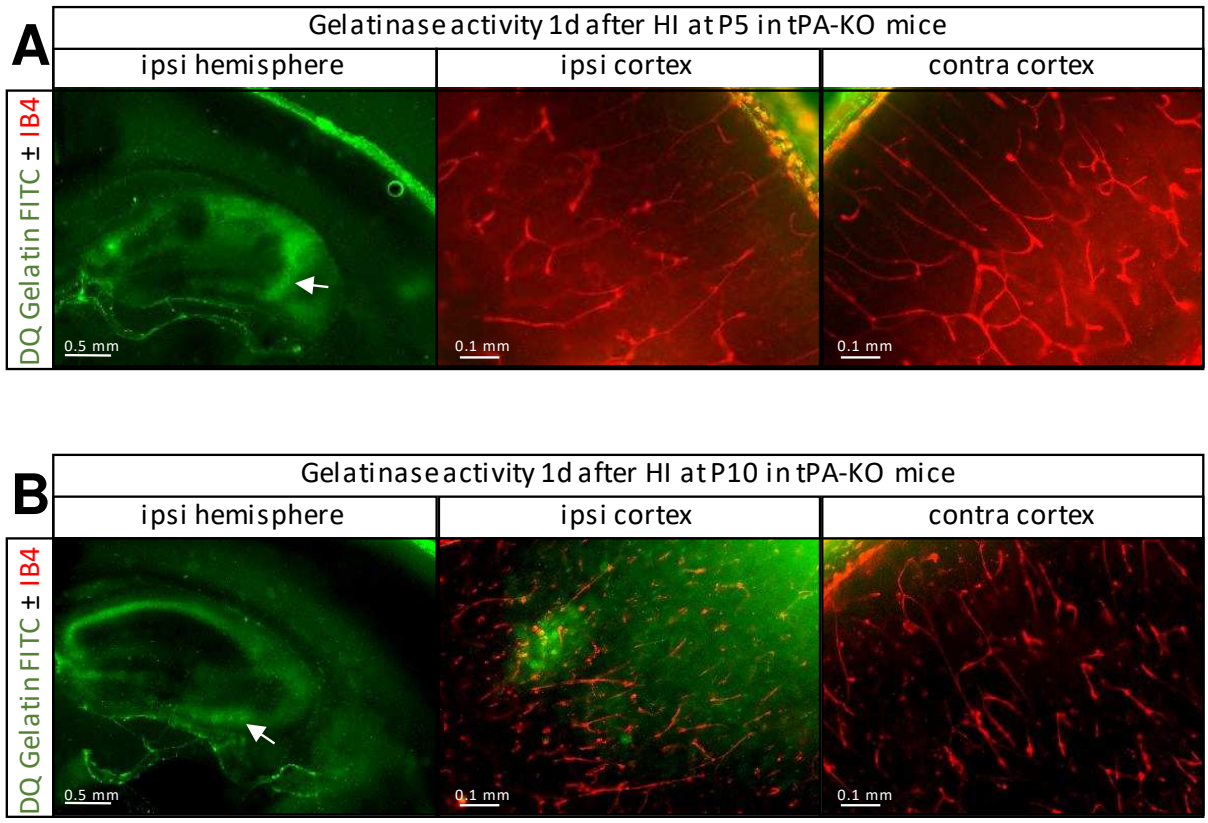
Supplemental Table 3. *Effect of tPA knock-out in Sham animals during habituation and interaction periods in the interaction test. All times are in seconds. All distances are in meters. *p < 0.05 and **p < 0.01 according to unpaired t test. Values out of mean ± 2SD were deleted.*

criteria	**mean ± SEM (n)**		**p value**
	Sham WT	**Sham tPA-KO**	**-**
Habituation period (3 min)			
distal zone: time	35.0 ± 2.2 (11)	53.1 ± 8.6 (8)	0.0799
distal zone: distance	**2.0 ± 0.3 (11)**	**3.1 ± 0.4 (8)**	*** 0.0220**
Test period (6 min)			
mean speed	**0.038 ± 0.002 (11)**	**0.051 ± 0.003 (8)**	**** 0.0037**
total distance	**7.4 ± 1 (11)**	**10.9 ± 1.1 (8)**	*** 0.0365**
central zone: time	**14.0 ± 1.9 (9)**	**29.1 ± 4.7 (8)**	*** 0.0156**

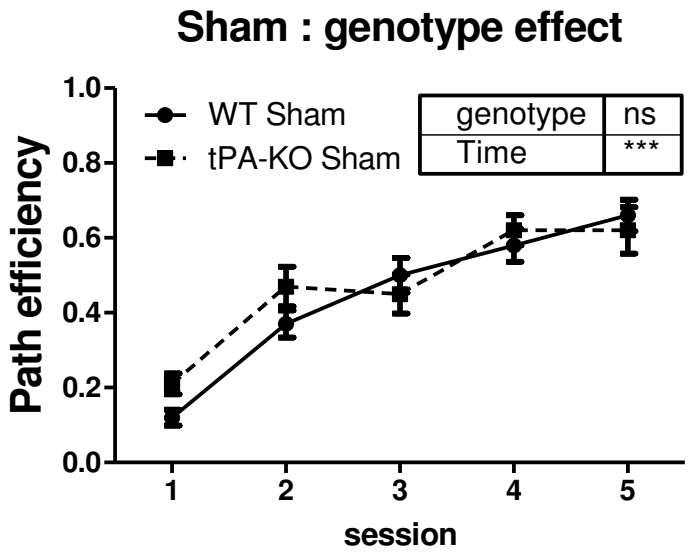
Supplemental Figures



Supplement Figure 1. *Longitudinal MRI study after HI at P5 or P10.* ***A****, HI at P5 or P10 led to significant ipsilateral hemisphere swelling 1 day after insult in WT and tPA-KO mice.* ***B****, HI at P5 or P10 led to ipsilateral hemisphere atrophy 5 days after insult in WT and tPA-KO mice.* ***C****, HI at P10 led to a specific (but not significant) increase of delayed mortality in tPA-KO compared to WT mice.* ***D,*** *HI at P5 did not led to different delayed mortality between the WT and tPA-KO animals.* ***** *p < 0.05;* ****** *p < 0.01;* ******* *p < 0.001; ns p > 0.05.*



Supplement Figure 2. *In situ gelatinolytic activity localization after HI at P5 or P10 in tPA-KO mice.* ***A,*** *Gelatinase activity [DQ Gelatin FITC; green] 1 day after insult at P5 in tPA-KO mice is especially localized in the hippocampus. No gelatinase activity was observed in cortical vessels [IB4; red]* ***B,*** *Gelatinase activity [DQ Gelatin FITC; green] 1 day after insult at P10 in tPA-KO mice is especially localized in the hippocampus. Moderate parenchymal gelatinase activity was observed in the cortex, but not in vessels [IB4; red]. Arrows indicate neuronal activity*.



Supplement Figure 3. *Path efficiency index of spatial learning at adulthood in the Morris water maze in WT and tPA-KO Sham-operated animals. Evaluation of genotype effect in sex-matched Sham population between WT and tPA-KO mice. Boxed data show two-way ANOVA comparisons; time index revealed significant learning; *** p < 0.001; ns p > 0.05*

.

RÉSULTATS - PARTIE 2

Analysis of hypoxia-ischemia induced gene induction and/or repression in neonate mouse brain at two stages of perinatal development: micro-arrays transcriptomic analysis and biological validation

Dupré N, Hauchecorne M, Derambure C, Léger C, Marret S, Gonzalez BJ, Leroux P.

Travail en cours d'analyse ; Article en préparation

Introduction

Cerebral palsy (CP) is the most severe motor disability in children most often accompanied by sensorial deficits, cognitive and behavioral impairments. It is a complex disease due to entangled antenatal, perinatal, and sometimes postnatal influences. Visible brain lesions at medical imagery sustaining these deficits detected in days after birth or in post-mortem tissues show clear relationship to post-conception (PC) age of infants, affecting cerebellum, periventricular germinative matrix cortical and sub cortical grey matter in older infants. The relationship between children disabilities and putative causal factors is less stringent, indicating that common causal factors, activated in diverse pathological situations, have distinct consequences depending on maturity stage of brain tissue (Van den Broeck et al., 2008). Cerebellum and periventricular germinative area are prone to hemorrhage in extreme preterm neonates (before 28 PC weeks). White matter has special vulnerability in preterms born at 28-34 PC weeks, clearly associated to oligodendrocyte at the pre-oligodendrocytes differentiation stage of at this time. Grey matter appeared more sensitive in the late gestation and later in postnatal period, when NMDA-type glutamate receptors are expressed in neurons. The common triggers recorded in antenatal or perinatal periods are ischemia, defined by blood flow decrease under 20mL/100g/min (Baron, 2001), oxidative stress and inflammation. Perfusion arrest and reperfusion resulted of brain hemodynamic regulation immaturity/perturbations in preterm, reperfusion leads to oxidative stress and inflammation. Hypoxia could either be primary (asphyxia) or consecutive to inflammation/blood flow arrest.

Animal models move towards description of pertinent procedures that mimic tissue lesions and/or secondary functional developmental impairments. Less than the trigger used to provoke brain insults, the accuracy of the model is verified when insults recapitulates physiopathology at tissue level, behavior and chronology of effects. The use of 5-day old (P5) and P10 mice to induce brain lesions mimicking those observed in preterm and term infants is admitted. The hypoxia/ischemia (HI) model proposed by Rice et al in P7 rats, successfully transferred in P5 and P10 mice, is broadly used, allowing the adjustment of severity after unilateral carotid ligation by the modulation of hypoxia duration (Rice et al., 1981). Between P5 and P10, mice brain continues to grow, undergoes intense angiogenesis for blood supply in growing territories, change in subplate neurons and cortical networks, while glial cells proliferate and invade the parenchyma. Microvessel vulnerability highly regressed between P5 to P8 in mice (Leroux et al., 2014), white matter is more sensitive to excitotoxicity or

ischemia at P5 than at P10 (Marret et al., 1995) (Dupré et al., submitted). Microglia undergoes multiplication and parenchymal invasion along development from perivascular amoeboid population to parenchymal stellate cell dense mesh (Kaur et al., 2001). But, although microglia is recognized a key factor of inflammatory and ischemia mediated effects in neonatal brain, the question of its changing responsiveness depending on age was rarely assessed compared to its long term changes post-injuries (Fleiss and Gressens, 2012). Finally, immune system in neonates exhibit a predominantly anti-inflammatory innate immune response in particular a delayed maturation of B cell differentiation and B cell receptor signaling (BCR) along with development (Basha et al., 2014).

In front of the huge complexity of the parallel development of the different cell types, of their relations to each other and to extracellular environment, omics approaches appear a heuristic approach to provide unbiased global description of substratum at different time points. In a previous study, we used proteomics and transcriptomic to evaluate brain microvessel development in mice at P5, P10 and in adults (Porte et al., 2017a; Porte et al., 2017b). Both provided valuable and complementary information. Mass spectrometry proteomics appeared more efficient to describe structural proteins, while transcriptomic microarrays co-hybridization provided wider spectrum information towards expression differences among genes coding regulatory proteins in too lower amounts to be detected at MS sensitivity.

The goal of this study is to understand better the relationship between development specific substratum on the differential response to HI in neonatal mice, and to expectedly identify putative targets for age-adjusted prevention/therapy. The age-dependent early biological responses to HI will obviously recruit many more rapid regulation systems than alter structural components. We choose transcriptomics analysis of basal and HI-induced mRNA levels in P5 and P10 mice brains in order to, i) described differences in background transcription depending to age, ii) to characterize common, and age-dependent regulated processes, at four short time intervals after insult (from 3h to 24h), iii) to extract putative interference of age with responses to HI. Indeed, functional correlates would be required, at least at protein expression level for those coded by HI regulated genes.

Material and Methods

Ethics Statements

All procedures used were approved by the French "Ministère de l'Education Nationale de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche" (Agreement 016800.02 on 10/13/2014) in accordance with French law (R.214-87 and R.214-126), INSERM recommendations in respect with the EU directive 2010/63/EU for animal experiments.

Hypoxia-Ischemia procedure

The hypoxia-ischemia (HI) procedure derives from the procedure described in P7 rats (Rice et al., 1981) adapted to P5 or P10 mice. NMRI mice (Naval Medical Research Institut) strain purchased from Janvier (Le Genest Saint Isle, France) were housed in controlled temperature, humidity and day/night 12/12 hour cycle, with water and food *ad libitum*.

Surgery was performed under Isoflurane anesthesia (AbbVie, Arcueil, FRANCE; 4% induction and 2% maintenance). First, the right common carotid artery was ligated using 8-0 PROLENE™ wire (ETHICON part of JOHNSON & JOHNSON MEDICAL SAS, Issy-les-Moulineaux, France). Afterward animals were returned for 1h to their dam, and then submitted to 40 min hypoxia (O_2/N_2 ratio 8/92%). Temperature was maintained throughout surgery by a heating carpet and hypoxia was performed in a humidified and temperature controlled (36°C) device. Naive animals were used as control.

RNA samples preparation

Total RNA test samples were extracted from injured brain hemispheres at 3h, 6h, 12h or 24h after HI procedure at P5 or P10. Total RNA control samples were extracted from brain hemispheres of age- and time-matched naive animals. Briefly, brains were quickly removed, ipsi- and contralateral hemispheres separated and immediately frozen in liquid nitrogen. Once all samples gathered, RNA extraction was performed using Nucleospin RNA plus kit purchased from Macherey-Nagel® with and extraction volume of 350µL. Pool samples for microarray study were made with 5 µg of RNA extracted from 6 ipsilateral hemispheres of injured or control mice at both ages and all time points. Mice pups were taken from at least two different litters at each time points and the two ages. Thus, we compare 12 independent arrays from lesions at P5 and similarly 12 arrays from brains of animals lesioned at P10 (Figure 1).

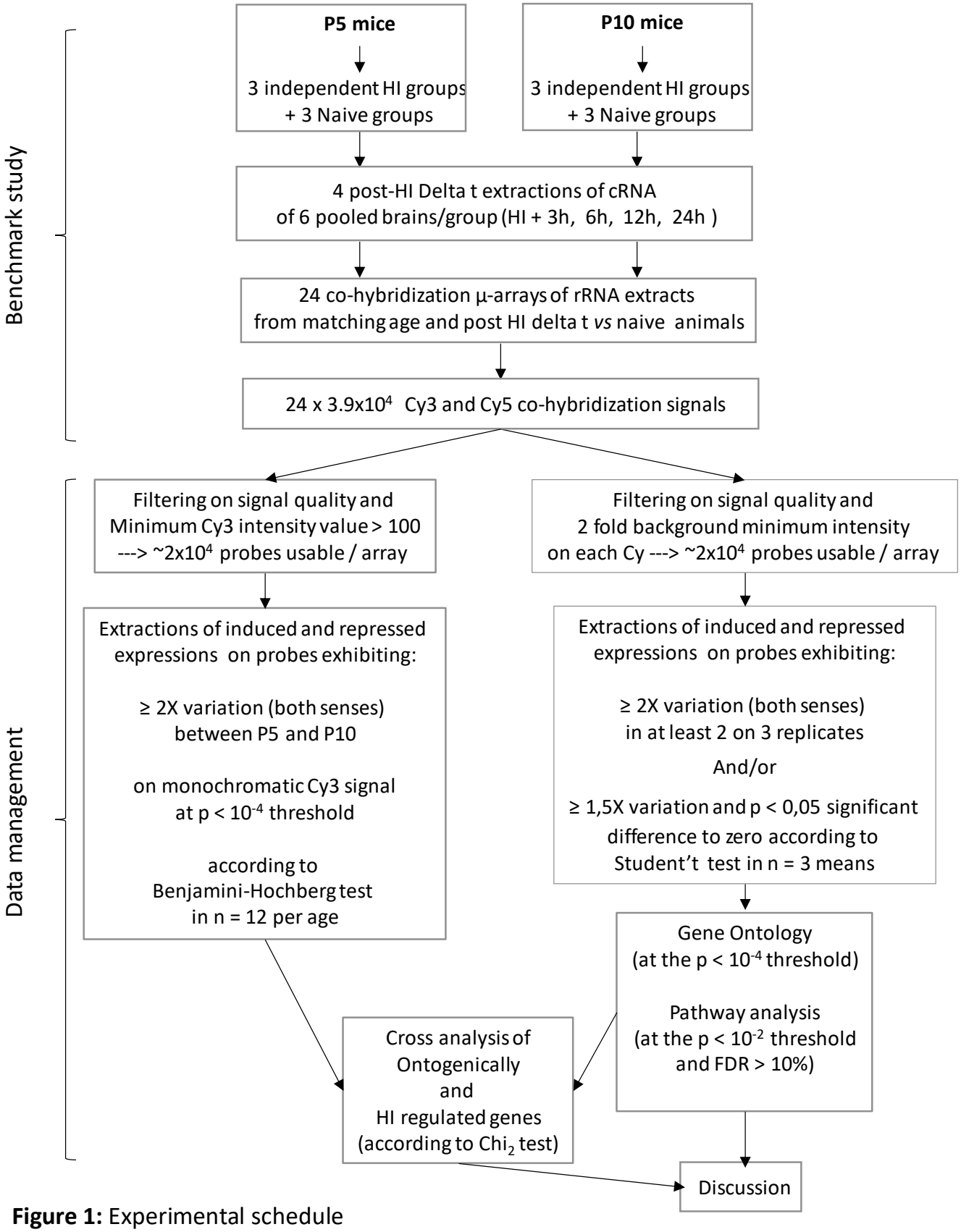


Figure 1: Experimental schedule

Transcriptome analyses

Two-color comparative hybridization was performed using Whole Mouse Genome Oligo 4_44K Microarray (G4845A, Agilent Technologies, Les Ulis, France) to compare gene expression profiling at each time point after HI in injured hemispheres from P5 or P10 mice with age- and time-matched naive animals. cRNA was synthesized from 100 ng total RNA and labeled using Quick Amp Labeling Kit (Agilent Technologies). A total of 825ng of cRNA was co-hybridized on microarrays for 17 h at 65°C. Raw hybridization data, evaluated on every probe 5 µm-sized array, using Agilent DNA microarray scanner G2565CA (Agilent Technologies), were extracted and normalized, then transferred to Genespring® (GX 12.6 software,Agilent Technologies) for data processing and data mining. All profiling of the four time points after HI at the two developmental ages were performed in three biological replicates.

In each array, outlier spots and those exhibiting heterogeneous signal on one color were discarded.

At first, all spot Cy3 raw signal (corresponding to naive mice brain cRNA hybridization signal) exhibiting signal quality and hybridization signal > 100 (roughly 2-fold background level) in at least 10 arrays (in a total of 12 per age) were recorded in P5 and P10 samples. In addition, probes detected only at P5 (n=1480 transcripts) or only at P10 (n=1498 transcripts) were recorded. Probes detected at both, P5 and P10 were compared using Benjamini Hochberg t test, and those exhibiting p-value < 0.01 and at least |2-fold| variation with age were collected for ontogenic study (n=5689 transcripts). Thus, a total of 8667 transcripts were considered for ontogenic study.

Transcriptomic effects of HI were recorded on probes exhibiting a Cy3/Cy5 fold change (FC) >2 in at least two of three replicates and probes exhibiting a both Cy3/Cy5 FC > 1.5 and p value < 0.05 using Benjamini Hochberg t test against 0, in the 3 replicates. Spots with hybridization level < 100 in the two mono-chromatic signals were excluded. Selected transcripts after filtering were called genes of interest in the following text.

Biostatistical analyses

The time course response to HI differed between P5 and P10 mice. By convention, we classified the regulated genes in 4 kinetics types, depending on the delays post-HI at which regulations reached statistical threshold. Constant kinetics describes genes exhibiting significant regulation from 3h to 24h post-HI according filtering rules described earlier. Early

kinetics refers to genes regulated 3h post-HI but that returned below selection threshold 24h post-HI, or before. Late kinetics includes genes regulated 24h but not earlier than 6h post-HI. Finally, transient kinetics included all genes with only regulations observed 6 and/or 12h post-HI.

Gene Ontology (GeneSpring)

After quality controls and extraction of genes reaching thresholds of induction/repression at each time point, genes were classified according to time course of HI evoked variations in 4 groups exhibiting different kinetics as follow; constant induction(repression) group include genes exhibiting significant changes at all 4 time point or at 3 time points including 3h and 24h. Early group included genes with modified expression at 3h after insult and maximum duration up to 12h. Transient group included genes regulated at 6 and or 12h time points only, and late group included genes with first variation observed at 6h or later after insult.

The gene ontology tool from GeneSpring® (Agilent technologies) allowed determination of significant statistical enrichment of biological processes based on computation p-values described by standard hypergeometric distribution at the 10^{-4} p value threshold and a minimum count number of 10 entities per GO term. Genes of interest were used for computational analysis to identify potential canonical and curated functional pathways using "DAVID Bioinformatics Resources 6.8, NIAID/NIH" online services by extracting significantly enriched KEGG Pathways at the 5.10-2 p value threshold according to Benjamini Hochberg corrected p valued and with a False Discovery Rate (FDR) < 10%. Up- and down-regulations were listed separately and statistically enriched GO terms (SeGO terms) were extracted from all lists at the 10^{-4} threshold, using the Genespring® software.

Data were in agreement with the Minimum Information on Microarray Experiment guidelines, to be very soon deposited in the NCBI Gene Expression Omnibus.

Pathway analysis (DAVID)

Significantly enriched KEGG pathways (seKPaths) were researched using the DAVID® on line version 8, at the 0.05 p value threshold including at least 5 genes. These criteria were willingly set low (high tolerance), not to be analyzed in a single age and period, but to be compared between different sets of age and period, to detect actual low variations that could accompany sporadic significant features, in the entire experiment. In P5 mice, seKeggPaths

were looked at on the basis of the 3-12h regulated entities and on the complete list of up regulated genes (3-24h). Only few genes had tardive inductions/repression. These SeKPaths were considered significant when corrected p value was below the 0.05 threshold, according to Benjamini, and the False Discovery Results below 10% in at least one of the four lists investigated. Indeed, low significance records in these conditions were excluded since gathering few entities largely shared with other pathways and that were not necessarily markers of specific paths.

Gene Index of regulation

Which genic entities should be major hubs, and which could reflect an age-period specificity in transcriptomic response to HI? In order to segregate amongst observations in all gene entities, genes in seKeggPath or seGO, we calculated an index integrating several features of each gene signature; Max amplitude induction (repression), duration of regulation (3 -24h post HI) and basal expression. Basal hybridization signal of Cy3 labeled mRNA from naïve brain extracts were affected a ranking value (1 to 6) depending on their position in the total distribution of Cy3 of genes included in the selection; Basal expression in the 10% maximum levels were affected the value 6, top 25% and below 10% maximum were affected the value 5, below 25% and higher than the median had the value 4. The same separation at 25% and 10% was performed for values below the median with decreasing values of basal Cy3 affected the ranking values of 3 to 1, respectively.

Index was therefore calculated according to the formula:

$Index_{(gene\ x\ at\ one\ age)} = (\sum \text{significant fold changes at the 4 time points}) * Cy3ranking.$

The values calculated were classified in 10 deciles, separately at P5 and at P10.

Protein samples preparation and Western Blot

Western Blot were realized with samples from naive, P5-HI and P10-HI brains. Briefly, the brains were quickly removed, and tissues from right hemisphere (ipsilateral from the ligation) were rapidly homogenized in ice-cold lysis buffer (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) for protein extraction. Protein concentrations were determined by the Bradford assay. 100 µg of proteins were denatured at 100°C for 5 min in 50 µL of Tris/HCl (pH 7.5) containing 20% glycerol, 0.7 M 2-mercaptoethanol, 0.004% (w/v) bromophenol blue, and 3% (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS), and then separated on 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

After separation, the proteins were electrically transferred to a polyvinyldifluoridine membrane (PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA). The membrane was incubated with blocking solution (5% BSA in Tris-buffered saline containing 0.05% Tween 20) at room temperature for 1 h and incubated overnight with primary antibodies against VEGF, HIF and β-actin. After incubation with corresponding secondary antibodies coupled to peroxidase (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), protein bands were visualized using an enhanced chemiluminescence immunoblotting detection system (ECL Plus; Bio-Rad Laboratories, Marne la Coquette, France). The intensity of the immunoreactive bands at expected molecular weight was quantified using a blot analysis system (Bio-Rad Laboratories). Whole protein detection was used as a loading control and reference for quantification. Commercial marker cocktail (Page Ruler^{TM} Prestained Protein Ladder; Thermo Scientific) was used as molecular weight standards.

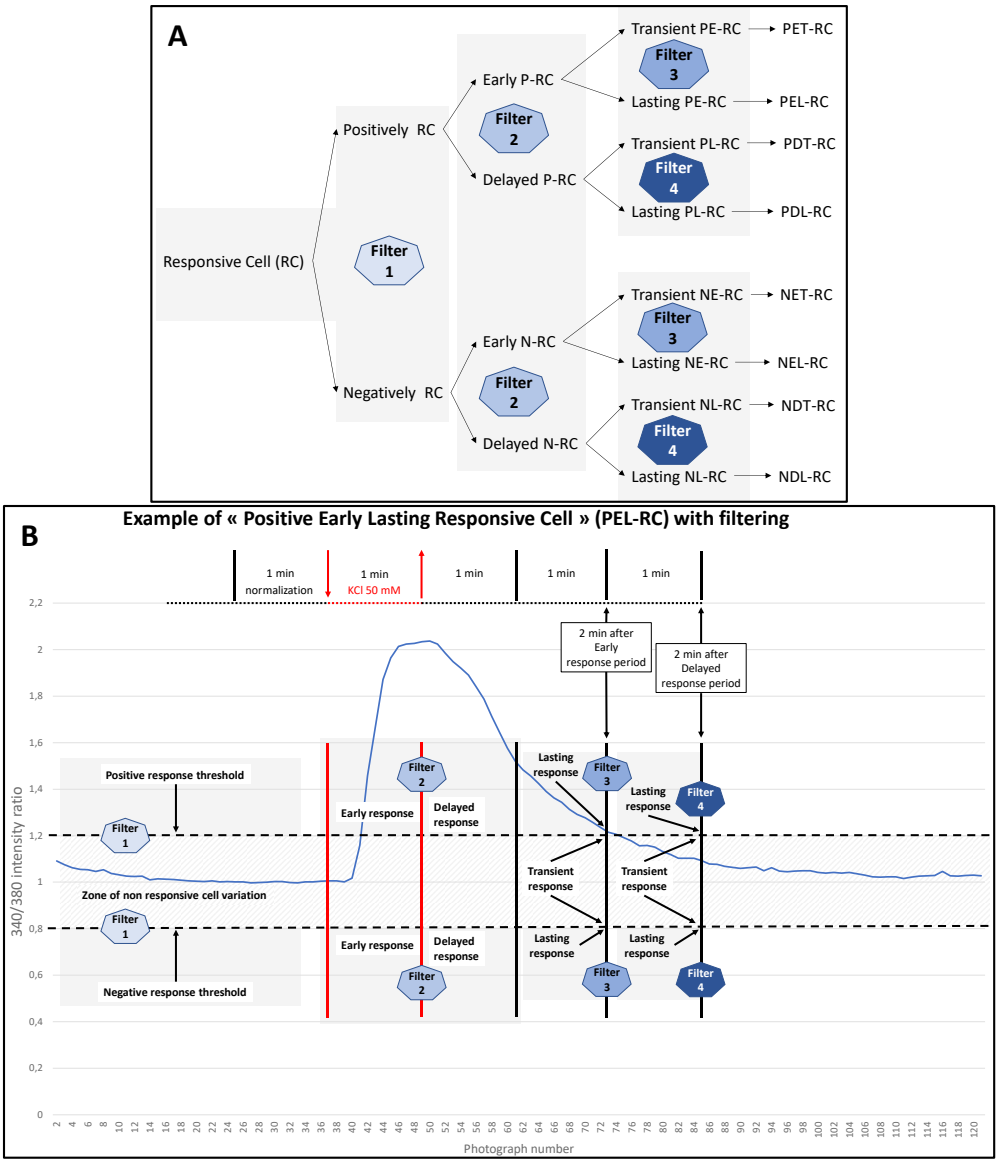
Intracellular calcium measurements in cortical slices

Fresh living brain slices (250µm) from naive or HI P5 mice were incubated 20 min at 37°C in artificial cerebrospinal fluid (aCSF containing in mM: NaCl, 125; KCl, 3; CaCl2, 2; NaH_2PO_4, 1.2; $NaHCO_3$, 26; and D-glucose, 10; at pH 7.4) supplemented with 10 µM Fura-2^{AM} and 0.03% pluronic® F-127. Slices were then washed twice for 5 min in fresh aCSF at 37°C, transferred in a 35 mm dish containing 250 µL aCSF and immobilized by using a nylon mesh. The slices were put under florescent microscope and continuously perfused (1mL/min) with temperature controlled (37°C) aCSF. Ten min activity recording started by for 3 min for stabilization, then KCl solution (50 mM in aCSF) was added on the slices for 1 min perfusion, then, returned to aCSF until the end of the experimentation (6 min). In experiments using MAP Kinase inhibitor U0126, the inhibitor (10 µM) was added in aCSF early perfusate and KCl solution. Calcium movement measurement was performed in medio-lateral frontal cortex excluding layer I, corresponding to lesion areas most current localization. The Fura-2 ratiometric probe discriminate cell types, and calcium movement was therefore recorded in various brain cell types. The fluorescent signals associated with calcium-free and calcium-bound Fura-2 probe were measured by alternative excitation of the slices at 340 and 380 nm using a fluorescent Leica DM microscope equipped with a rapid shutter wheel. The emitted fluorescence was collected at 510 nm and a ratio of signals resulting from the 2 excitations was calculated by the Metamorph software (Roper Scientific, Evry, France). 340/380 intensity ratio was

normalized at 1 for each cell, using records obtained during the minute prior to KCl stimulation. Cells were considered responsive to KCl when the intensity ratio reached 1.2 or declined to 0.8, indicative of positive or negative response respectively. The percentage of responding cells (RC) to KCl was calculated as follow: [RC% = (number of RCs / total number of Fura-2 loaded cells) * 100]. RC were assigned in 8 groups depending on 6 criteria: **Positively Responsive Cells (PRC)** when intensity ratio reached the 1.2 threshold; **Negatively Responsive Cells (NRC)** when intensity ration dropped below 0.8 threshold; **Early Responsive Cells (ERC)** when intensity ratio reached the 1.2/0.8 thresholds before the end of the 1 min of KCl stimulation; **Delayed Responsive Cells (DRC)** when intensity ratio reached the 1.2/0.8 threshold after KCl stimulation; **Transient Responsive Cell (TRC)** when intensity ratio got back under activation threshold less than two min after the end of stimulation and; **Lasting Responsive Cells (LRC)** when intensity ratio remained above activation thresholds two min after the end of the stimulation. Those 6 criteria allow to discriminate 8 groups of response responsive cells, presented in Supplement Figure 1. The number of RC showing each type types of responses in the different conditions were compared using Chi_2 square test. Areas under the curve was quantified for each type of response from K^+ onset to the end of 2nd min after K^+ removal and compared using Student' t test.

Statistical Analysis

Transcriptomic evaluation of statistically significant individual gene variation were performed using the Student t test against O. GO terms and pathways were selected according to Benjamini-Hochberg test. Ontogenic variation interferences with HI effects were according to Chi^2 test with Yates correction. Repartition of cell response types to KCl and proportion of responsive cells were compared using Chi^2 test, Calcium response curve areas, and Western blot intensities were compared using Student' t test, using GraphPad Prism6® software (La Jolla, CA, USA).



***Supplement Figure 1**: Characterization of cell response to KCl 50 mM*
A: Schematic decision-tree for cell response categorization by filtering. B: Illustration of filter positioning on KCl typical response curve. PET-RC: positive early transient responsive cells; PEL-RC: positive early lasting responsive cells; PDT-RC: positive delayed transient responsive cells; PDL-RC: positive delayed lasting responsive cells; NET-RC: negative early transient responsive cells; NEL-RC: negative early lasting responsive cells; NDT-RC: negative delayed transient responsive cells; NDL-RC: negative delayed lasting responsive cells.

Results

Ontogenic variation in basal gene expression between P5 and P10

Among the 25.000 genes of the entire mouse genome we detected 2682 genes exhibiting significant decrease in basal expression (minimum 2 fold decrease, $p < 0.01$ according to Benjamini-Hochberg corrected t-test), and 3007 genes with increased expression at P10 (same filter conditions). In addition we detected 1480 genes with significant Cy3 signal at P5 that did not pass detection filters at P10 and symmetrically, 1498 genes only detected at P10. Altogether, we identified 7169 genes affected by developpement in P5 brains and 7187 in the P10 brain, each representing about one third of mouse genome (Figure 2). The genes affected by HI at either P5 or P10 appeared a small proportion of ontogenically regulated entities. An even more restraint amount of genes (n = 209) showed altered expression after HI at both ages, less than the 311 and 784 genes affected only at P5 or P10, respectively (Figure 2).

Figure 2

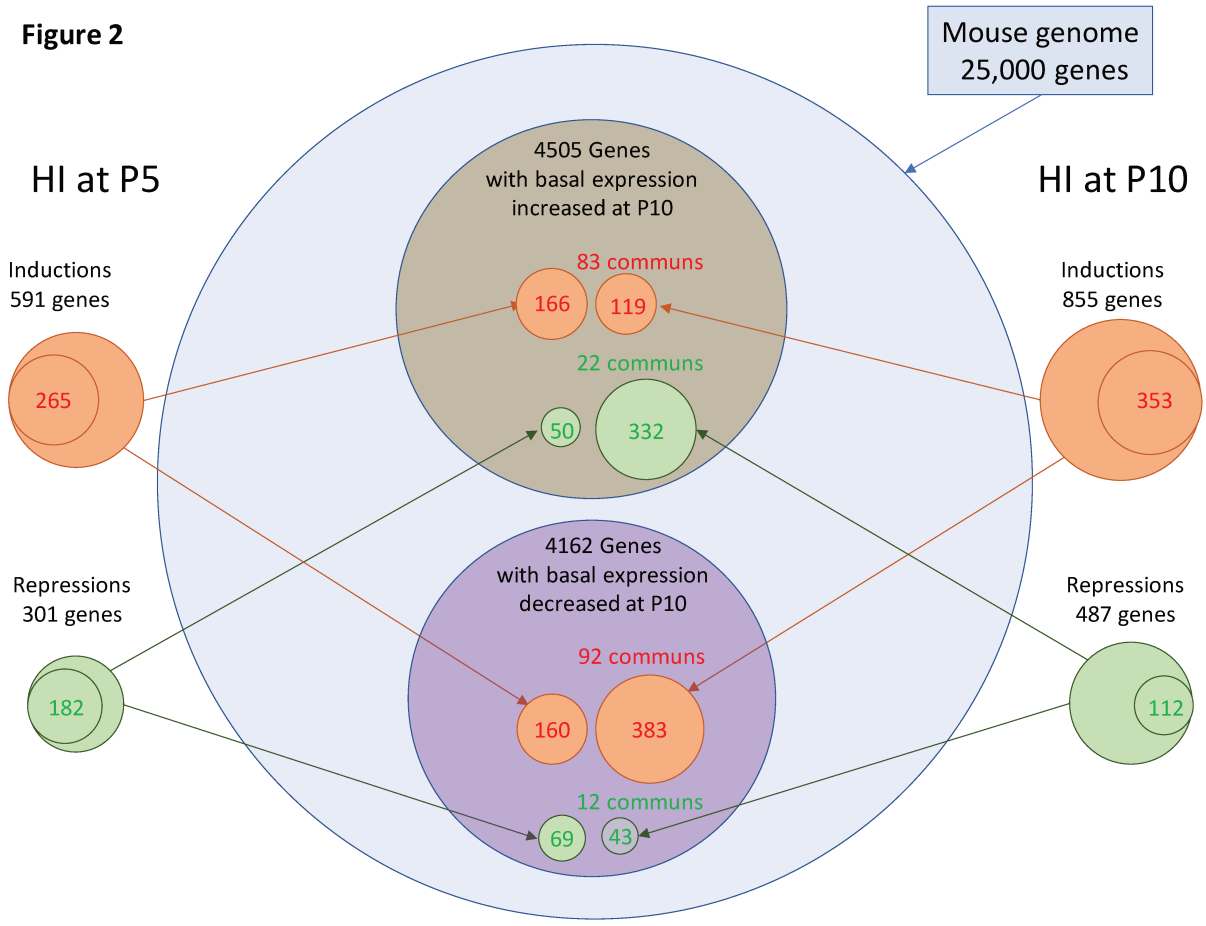


Figure 2: *Comparative proportions of total mouse genome, numbers of genes up- or down-regulated along development and numbers of genes induced or repressed after HI at P5 or at P10. Arrows indicate the sub part of HI induction (repression) number showing development evolution. Red number indicate up-regulations, green numbers indicate down-regulations. Circle surfaces are proportional to number of genes.*

Ontogenic interference with HI effects at P5 and P10

HI induce up-regulation of 591 and 845 genes and Down regulation of 301 and 462 genes expression in P5 and P10 brains, respectively (Figure 3A). The number of entities affected was higher in P10 than in P5 brains but the proportion between up- and down-regulation did not differed (Chi^2 0.53, df 1, p = 0.465).

Figure 3

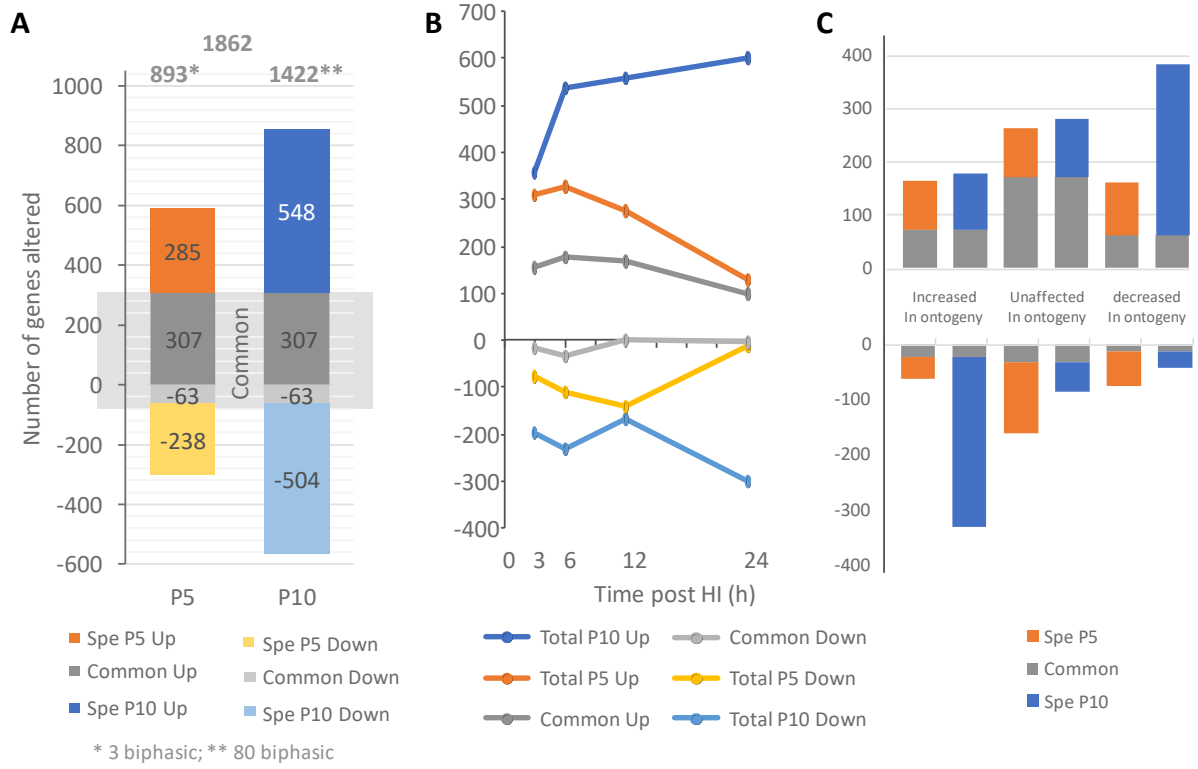


Figure 3: *Number of post-HI gene inductions/repressions in P5 and/or P10 mice (**A**). Kinetics of significant induction (repressions) at four time-point post HI in P5 and P10 mice (**B**). Differential effect of HI at P5 and P10 depending on ontogenic variation in gene expression (**C**). Negative values on plots refer to number of repressed genes.*

Whether ontogenic variation in basal expression interferes with HI-induced effects was assessed at the global level. Among the total HI-induced gene activation/repression, the proportion of genes developmentally regulated appeared higher in P10 (67%) than in P5 animals (50%). Proportions were different (Chi^2 81.08, df1, p<0.0001). Considering the distribution of HI regulation (both senses) affecting developmentally regulated (both sense) and non-regulated entities (6 values per age), Chi2 test indicated a highly significant difference of distribution depending on age (237.8, df 5, p < 0.0001) (Figure 3B). HI-Up regulations of developmentally down regulated entities was massive in P10 mice. Similarly, massive HI-repression affected developmentally up regulated genes at P10. These massive effects suggest

that HI effects in P10 brains act at counter sense of development for these gens (actually 715 different genes).

Interestingly, while all numbers of regulated entities were higher in P10 than in P5 mice, the particular groups of HI-repression in developmentally neutral or decreased entities were much higher in P5 than in P10 (Figure 3B).

Of note, the identity of genes induced or repressed after HI at P5 and P10 was far from overlapping (Figure 2, 3). Only 13 developmentally genes exhibiting P5 to P10 significant evolution in transcription showed, suspected developmentally driven at the 2 ages (supplement Table 1A). The detailed study of developmentally regulated genes has not been performed in this study focused on development interferences with HI effects.

Global analysis of effects of Hypoxia-ischemia at P5 or P10

Indeed, large numbers of genes underwent up- or down-regulation after HI at P5 and/or P10 mice, they also exhibited varieties of post-HI induction/repression kinetics and amplitude.

Under the conditions of variation imposed, 1862 genes fulfill the variation quality criteria; 890 and 1342 genes in P5 and P10 extracts, respectively. Three genes at P5 and 70 genes at P10 exhibited significant up and down-regulations at different times points after HI (biphasic responses) Of note, only 370 genes (19.8 % of the total) showed regulations in both P5 and P10 HI pup brains accounting for only 41,6% of entities regulated at P5 and 27,4% of entities regulated at P10 (Figure 3A). This indicates that a large proportion of regulations occurring at a given development stage is specific of this maturity stage. Regarding delay post-HI regulations, P5 and P10 brain showed clearly different induction/repression kinetics (Figure 3B). Only 192 genes (10.3% of total observations) had isochronous time course post-HI in P5 and P10 brains. A higher convergence was noted among up-regulated genes (n = 143), while down-regulations affected only 49 entities. Detailed lists of regulated genes, including kinetics of amplitudes and Index are given in Supplement Table 1B.

Time course and amplitude of transcriptional responses were different in P5 and P10 mice. Up- and down-regulations in P5 mice appeared monophasic peaking at 6 and 12 hours post-HI, respectively, then largely decreased 24h post-HI. In P10 mice, up regulations rapidly increased between 3 and 6 h post HI, then continued to increase at low rate until 24h post HI (Figure 3C). Down regulations appeared biphasic with a transient peak at 6h, and a second high 24h after HI.

Figure 4

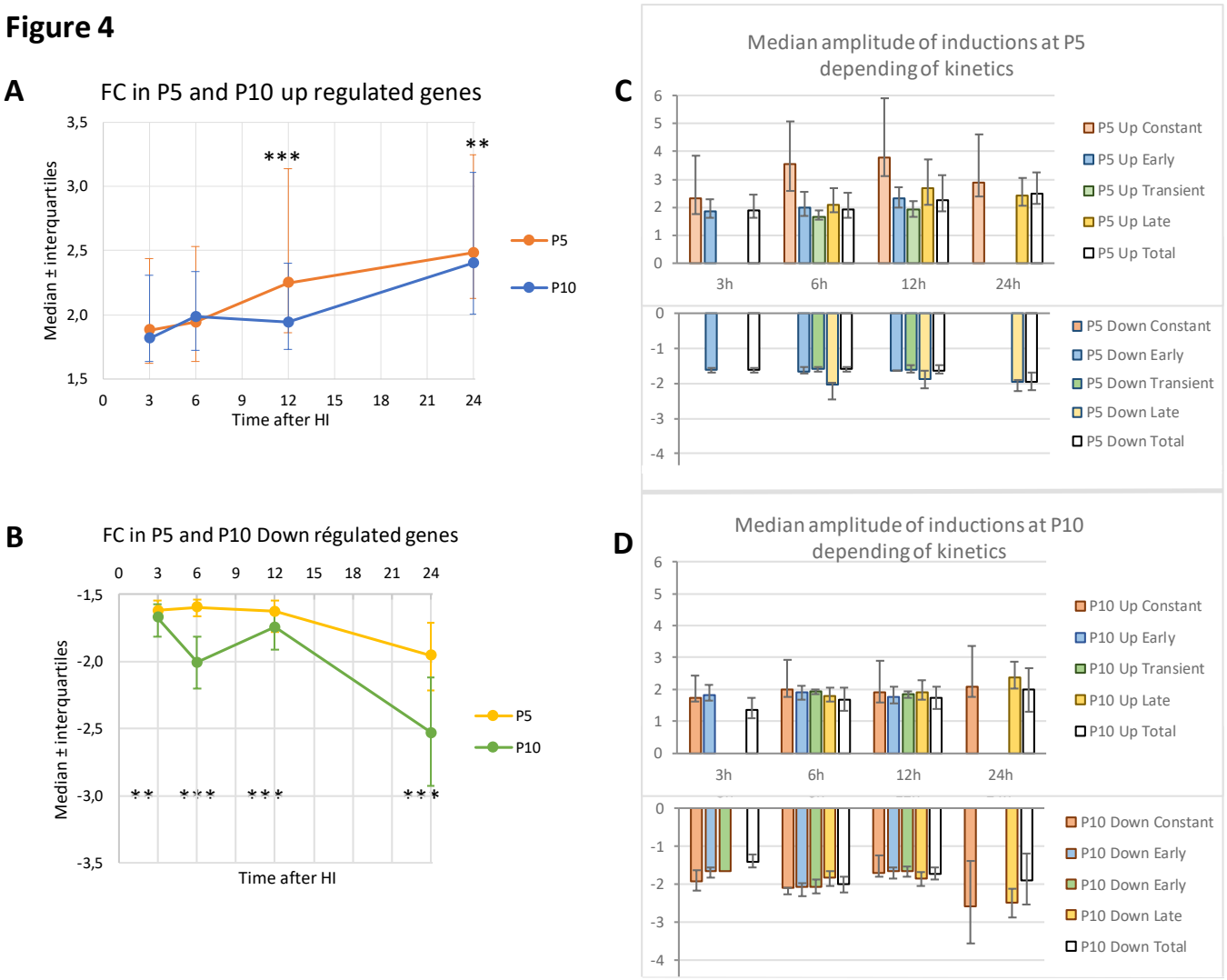


Figure 4: *Median amplitudes of gene inductions/repressions observed at all time points after HI in P5 and P10 mice brains.* ***A****; total up-regulations,* ***B****; total down regulations,* ***C****; Induction and repression at P5 depending of kinetics,* ***D****; Induction and repression at P10 depending of kinetics. Negative values on plots refer to number of repressed genes.*

The median amplitude of up- regulations in P5 mice was near |2-fold| up to 6 hours then rose progressively to |2.5| fold at 24h. In comparison, in P10 mice a 12h delay was observed in median induction and repression amplitudes that remained near |2-fold| up to 12h and hardly reach 2.5-fold at 24h (Figure 4). The amplitudes of inductions slightly higher induction medians in P5 than in P10 mice at the 4 delays post-HI, being significant at 12h ($p<0.001$) and 24h ($p = 0.0088$)(Figure 4A). Conversely down-regulations had higher median amplitudes in P10 than in P5 mice at 3h ($p = 0.0044$) and at the three other time points ($p < 0.0001$), according to Mann and Whitney test (Figure 4B). However, means and maximum amplitudes of up and down regulations were higher in P10 mice (not shown). This indicates that even if less genes were induced at P5 than at P10, their transcription was activated earlier and to a higher

degree. The highest inductions were noted in P10 mice, although in fewer entities. The same is true for transcription repression. Regarding kinetics of responses to HI, the amplitude of effect at P5 was higher on genes showing constant 3-24h induction than in other classes of responses (early, transient or late. This was not observed at P10 nor for repression effects at both ages (Figure 4C, D).

Regarding isochronous genes, up-regulation amplitudes appeared appeared higher than in total lists. The delayed response in P5 mice, at 12h post HI appeared less marked and regressed at 24h while the high amplitude 24h post-HI in P10 was exacerbated (not shown) Down regulated isochronous genes did not show distinct behavior compared to the overall down regulations (not shown). The so-called isochronous genes are the subset of responses the most common between P5 and P10 thus representing the core of HI induced transcription response to HI in neonatal brain. Nevertheless, they show distinct amplitude responses (Supplement Table 1C). DAVID® based identification of seKPaths, seGO and keywords from the 143 isochronously induced genes in P5 and P10 brains revealed at least three main classes of functions activated by HI, thus independent of age; Inflamation/immunity, regulation of transcription and cell to cell signaling (Supplement Table 1D). In addition, elements associated to extracellular space exhibited significant enrichment, including factors of cell to cell signaling and components of extracellular matrix. These tendencies are confirmed and extended in separate analysis at P5 or P10 revealing more convergences although with distinct kinetics and somehow stage specific responses (see below).

Comparison of P5 and P10 HI-induced transcription response kinetics

Transcription responses in P5 mice occurred early after HI; 388 entities (43.6% of total regulation in P5 mice) were affected 3h post HI, peaked at HI +6h and +12h (n = 435 and 417, respectively), then declined to only 144 entities (16.2% of total) at 24h post HI (Figure 5A). Among these 144 entities, two thirds were already detected at 12h, and with higher amplitude. This indicates that transcription responses to HI are already in the process of extinction in P5 mice as soon as 24h post-HI. This apparent monophasic kinetics of up- or down-regulations in P5 mice is misleading. Indeed, the proportion of genes exhibiting regulated expression over the entire 3-24h period post HI was low; only 38 genes (4,3% of total observation) exhibited lasting up regulation at P5. The same tendency is noted over shorter periods. Around 50% of entities only were detected at both 3h and 6h, or 6h and 12h,

and less than 25% were in common at 12h and 24h. No constant down regulation was detected (Figure 5A).

Two-fold more up regulations were observed than down regulations. In addition, the proportion of lasting down regulations over several time points was even lower than lasting up regulations. This observation indicates that up regulations are more lasting effects than down regulations. In P5 mice only 3 genes exhibited biphasic regulation (Apln and Egr4, inducted at 3h and repressed at 24h post-HI; Rtp4, repressed at 3h and inducted at 12h)(Details in supplement Table 1B).

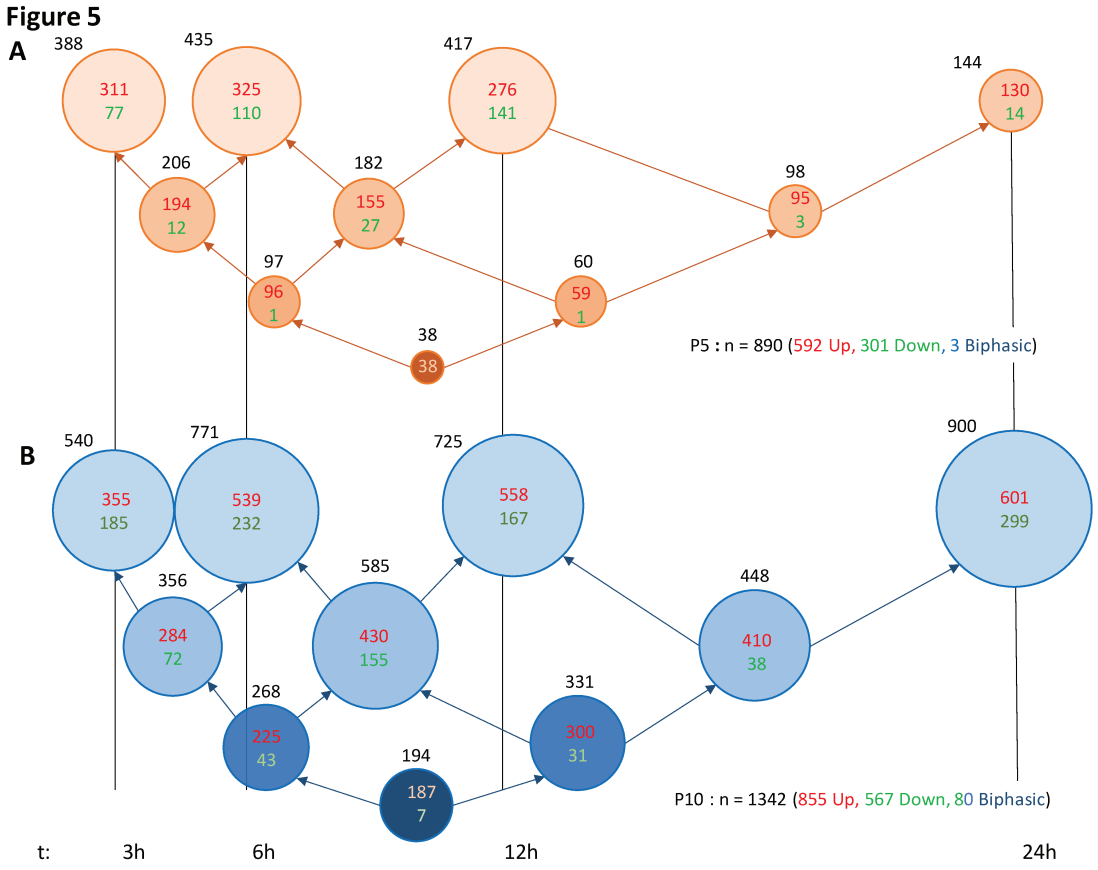


Figure 5: *Number of genes up and down regulated after HI at all time points, and in common at successive time points in P5 (**A**) and P10 (**B**) mice. Red number indicate up-regulations, green numbers indicate down-regulations. Circle surfaces are proportional to number of genes.*

The situation was different in P10 brains (Figure 5B). The number of genes affected at each time point were higher than in P5 mice (near 1.5-fold more from 3h to 12h, and 6.6-fold at 24h post-HI). Two separate waves of transcription should be separated. A first wave peaking 6-12h post-HI exhibited a majority of common entities (63.6%). A second wave starting after 12h and showing highest number of entities 24h post HI (n = 900), representing 72.5% of total

regulated entities in P10 mice. Of them 505 entities (40.7% of total observation in P10 mice) were only detected at this time point. Over time, the proportion of genes exhibiting altered expression at least at 2 time points after HI at P10 were notably higher than in P5 brains. The 187 genes exhibiting constant (3 to 24h) up-regulation represented 21.9% of total up regulation (to be compared to 6.4% in P5 mice). Only 7 down-regulations appeared constant, accounting for 1.2% of total down regulations, indicating that as well as at P5, up regulations predominated in number and in duration. The study in P10 mice showed an acceleration of transcription regulations 24h post-HI and contrary to P5 response to HI, does not allow to predict the extinction of HI induced effects. In addition, more biphasic regulations were observed in P10 mice (n = 70). Of them the majority were deep down regulations at 24h of 52 genes up regulated earlier. Only 16 genes exhibited late up regulation. 2 genes had more complex kinetics.

Since expression kinetics in response to HI were so different in P5 and P10 brains, it is not inconsistent that genes exhibiting transcription regulation in both P5 and P10 animals were a minority (near 20% from 3h to 12h and only 10% at 24h post-HI)(Figure 6). Amongst genes in common at the different delays post-HI in P5 and P10 brains, the up regulated entities largely predominated. They were also repeatedly detected at least up to 12h post-HI. Down regulations appeared largely divergent between 5- and 10-day old animals. It appears that the majority of the small population of isochronous genes affected by HI at P5 and P10 did not undergo development evolution over the P5-P10 period (Supplement Table 1C).

Identification of genes responding to HI preferentially at P5 or P10

The observation of a significant regulation for a particular gene at any delay post-HI, and one or two ages may indicate a physiological response to insult. Although its occurrence was statistically validated by inter assay reproducibility of detection, but it was a small part of information. Taking into account, basal expression, duration and amplitude of the responses allowed to exploit our data more deeply by means of the Index of induction (described above). In supplement table 1E, the color-coded permit to immediately visualize the relative position in deciles of any genes amongst the complete series of entities affected by HI at one age. Using this simple tool we extracted from parallel lists of inductions at P5 and P10, those entities with clearly discrepant index.

Figure 6

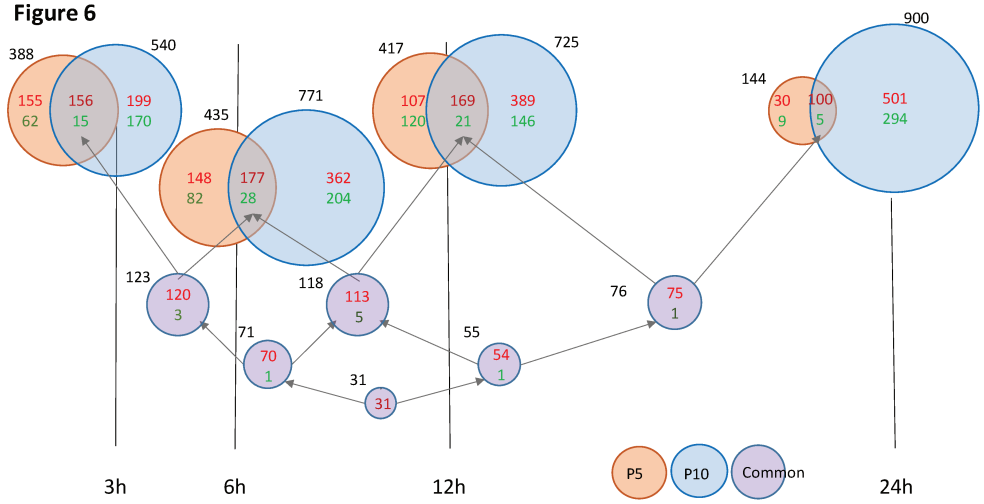


Figure 6: *Number of post-HI gene inductions/repressions in P5 and/or P10 mice. Superposed circle areas indicate genes altered at both ages. Red number indicate up-regulations, green numbers indicate down-regulations. Circle surfaces are proportional to number of genes.*

Contrary to subsequently described ontology approaches based on coordinated gene communities, this approach only provides a ranking of any individual gene in the panel of responses, independently to each other (Supplement Table 1E).

Genes recorded at one age and never at the other, and selected on high index were listed in Supplement Table 1G, together with those exhibiting HI responses at the two age but with opposite Index ranking. These series regroup somehow age dependent HI responsive genes. One could note that only a quarter of regulation specific to P5 are higher to median index. It was a bit more in P10 mice. Concerning down regulations, since very few genes were in common, the distribution profiles in deciles were more homogeneous over deciles.

The highest discrepancies were noted for instance for a growth differentiation factor; Gdf15, a NFκB trans activator; Bcl3, a heat shock protein; Hspa1a and a modulator of apoptosis Wdr92 for P5 specific HI effects. Among the more numerous P10 specifically activated genes, one could note the major acute phase reactant Saa3, the enzymes cathepsins B and d; Ctsb Ctsd and α-enolase, Eno1, the cytoskeleton associated protein coding genes of β-actin; Actb, Ddykb3 were effect (details in supplement Table 1G). This only represented a minor part of the hundreds of genes only recorded at P5 or P10. Amongst Down regulated genes specific to one age, both high and low regulation indexes were observed and needed further detailed investigation (Supplement Table 1G).

Bio-statistical analyses

Kegg Pathways

In P5 mice, seKPaths were investigated from 2 lists of up regulations; i) observed from 3h to 12h or ii) from 3 to 24h separately, in order to test whether responses were in fact ending at 24h after HI as suggested by overall kinetics (Figure 5). The hypothesis was mostly confirmed. In P10 mice, since a majority of entities were affected only 24h after HI, we examined separately early and late regulations on gene lists including i) all genes regulated as early as 3h post-HI, whatever further evolution, and ii) all entities that showed regulation at 24 h post HI whatever previous regulation. In addition, SeKPaths were looked-at from the list of genes significantly repressed over the whole 3-24h periods in P5 or P10 mice (Table 1)

HI induced different responses depending on age of animals, in term of timing, amplitude and nature of the majority of genes involved. Reminding that only ~20 % of the genes were detected in both P5 and P10 brains, the straight convergence of seKPaths appeared remarkable, although individual genes gathering in these paths were mostly distinct (only 24% in common) (Figure 8A, Supplement table 1F). 140 genes regulated at P5 were included in seKPath and 159 genes at P10. These genes only represented 15.7% and 9.8% of total gene numbers extracted at P5 or P10, respectively. The 79 genes in common to both ages only accounted for 8.9% and 5.6% of all entities detected at P5 and P10. Near half (n = 37) were also included in the isochronous series (Supplement Table 1C, F) These genes are involved in early and non-specific cellular stress responses. Significant enrichment appeared in 7 seKPaths common to P5 and P10 brains, 5 specific to P5 (including 4 from down regulations) and 10 Spécific to P10 (Table 1) (Details in Supplement Table 1F).

Common seKPaths at P5 and P10

Seven seKPaths were detected in P5 and P10 brains, five were only significant at P5, of which 4 derived from down-regulated genes, and 10 were only detected in P10 mice, none of them from down regulations (Table 1, Figure 7). The differences in nature and in kinetics of seKeggPaths observed in P5 and P10 pups confirmed the observation suggested from total gene kinetics; i.e., that P10 transcription response to HI undergo lasting progression involving the recruitment of novel entities, while late observations at P5 did mostly consisted in continuation of previous effects.

Table 1: Kegg pathways extracted from up or down regulated entities in P5 and P10 mice pup exposed to HI

Significantly enriched Kegg Pathways	P5 Early			P5 24h			P10 Early			P10 Late			Comments
Up regulated genes	N	p	FDR	N	p	FDR	N	p	FDR	N	p	FDR	
mmu04010 MAPK signaling pathway	23	3.79E-04	0,002%	26	1,35E-04	0,008%	21	5,36E-05	0,0005%	20	2,40E-02	2.76%	17 in common*
mmu05205 Proteoglycans in cancer	19	7,27E-03	0.018%	21	1,10E-03	0.0013%	16	8,22E-04	0.296%	23	2,79E-04	0.0061%	Delayed at P10 15 in common*
mmu04668 TNF signaling pathway	13	2,03E-03	0.063%	14	1,91E-03	0,068%	13	1,92E-04	0.0047%	14	3.04E-03	0.217%	11 in common*
mmu04066 HIF-1 signaling pathway	12	4,20E-03	0,157%	12	1.48E-02	0.0062%	14	5,36E-05	0,0003%	14	1,99E-03	0.109%	Same kinetics 10 in common*
mmu04060 Cytokine-cytokine receptor interaction	19	4,22E-03	0.185%	22	1,84E-03	0.055%	12	1,47E-01	18.5%	24	7,52E-04	0.0330%	Delayed at P10 17 in common*
mmu05202: Transcriptional misregulation in cancer	13	4.50E-02	2.83%	14	4,45E-02	3.75%	13	5,36E-03	0.0029%	15	2,86E-02	3.76%	10 in common*
mmu04151 PI3K-Akt signaling pathway	21	4,33E-02	2.46%	23	4.59E-02	3.32%	15	1,66E-01	22.6%	21	1,79E-01	35.9%	Delayed at P10 19 in common*
mmu04610 Complement and coagulation cascades	-	-	-	10	1,89E-02	1.02%	-	-	-	10	2,07E-02	2.27%	7 in common*
mmu04620: Toll-like receptor signaling pathway	8	2.00E-01	25.5%	10$	6.64E-02	7.15%	12	4,38E-04	0,0134%	15	5,28E-4	0.022%	10 in common#
mmu04115: p53 signaling pathway	7	1.30E-01	12.9%	7	1,62E-01	24,85%	7	4.93E-02	3.95%	9	2.78E-02	3.80%	7 in common
mmu04931: Insulin resistance	9	9.12E-01	14.1%	9	1.88E-01	30.32%	9	4,32E-02	3.24%	11μ	5.78E-02	8.74%	7 in common
mmu04145 Phagosome	-	-	-	-	-	-	10	1.28E-01	14.1%	17	8,90E-03	0.68%	7 in common*
mmu04662: B cell receptor signaling pathway	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14	9,70E-05	0.0016%	3 specific of pahway
mmu04064: NF-kappa B signaling pathway	-	-	-	9$	1.23E01	16.6%	-	-	-	14	1.30E-03	0.064%	6 in common#
mmu04142 Lysosome	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12	4,38E-02	6.43%	4 in common$
mmu04062 Chemokine signaling pathway	11	3.56E-01	46,8%	15	6.55E-02	6.29%	-	-	-	18	1,25E-02	1,10%	11 in common$
mmu04510 Focal adhesion	-	-	-	15	8.34E-02	9.91%	10	2.22E-01	37.05%	18	1,90E-02	1.98%	13 in common$
mmu04512: ECM-receptor interaction	-	-	-	-			-			10	4.30E-02	6.09%	
Down regulated genes	N	p	FDR	N	p	FDR	N	p	FDR	N	p	FDR	
mmu04080 Neuroactive ligand-receptor interaction	16	9.63E-04	0.0141%	17	9.45E-04	0,0069%	-	-	-	-	-	-	
mmu04724: Glutamatergic synapse	8	4.05E-02	1.503%	8	4.82E-2	2.144%	-	-	-	-	-	-	
mmu00100 Steroid biosynthesis	6	8,98E-04	0,0066%	6	6.09E-4	0,0001%	-	-	-	-	-	-	
mmu04723: Retrograde endocannabinoid signaling	7	7.92E-2	4.14%	8	3.06£-2	1.131%	-	-	-	-	-	-	

p values according to Benjamini adjusted statistics

**Indicates common genes induced (repressed) at P5 and P10*

indicates common genes over the two periods in P10 mice

£ indicates common genes over the two periods in P5 mice

$ indicated number of genes in seKPath at P10 recorded at P5, although not sufficiently to contribute to enriched pathway.

μ indicated number of genes in seKPath at P5 recorded at P10, although not sufficiently to contribute to enriched pathway.

Figure 7

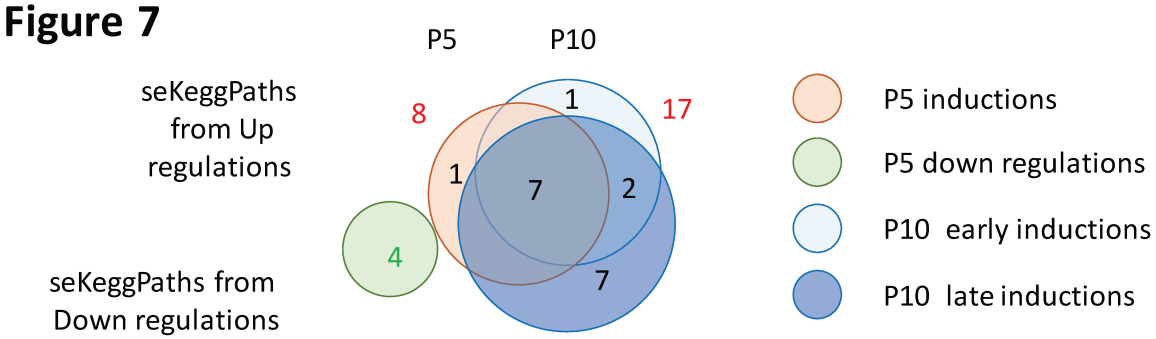


Figure 7: *Number of significantly enriched Kegg pathways extracted from induced or repressed genes after HI at P5 or P10. Circle surfaces are proportional to number of pathways.*

Among the 7 common seKPaths, 5 were observed from the early and late series of inductions; MAP kinase signaling pathway, TNF signaling pathway, HIF-1 signaling pathway, Proteoglycans in cancer and Transcriptional misregulation in cancer pathways. In these pathways, a high proportion of genes were commonly induced at P5 and P10. Although enrichment of HIF-1, TNF and MAP-kinases related pathways were not surprising, the pathways involved in cancer might appear out of purpose but the factors gathering in were essentially genes coding cell cycle and transcriptional activities, that indeed participated in brain responses to HI. The Cytokine-cytokine receptor interaction pathway was enriched at P5 and at P10 but appeared delayed at P10. Complement and coagulation cascade pathway also showed a late onset at both ages. The only significant observation specific to P5 upregulations was the PI3-Akt signaling pathway, although a major proportion of genes contributing to this enrichment (n = 19 on 21) were, in fact, also activated in P10, excluding to consider that the activation of PI3-Akt signaling is specific of P5 brain. Detailled discussion of genes in common and specific pathways is provided in Annexe A.

The 88 genes in seKPaths observed in both P5 and P10 HI brains represented only 29.5% of all genes contributing to seKPath enrichments. This proportions is in fact very low suggesting a somehow different coordinated transcription responses to HI at P5 or P10. Indeed, in most common seKPath, genes contributing to enrichment were largely distinct between P5 and P10 HI brains, a pattern similar to observations on total regulated genes and on gene subsets constituting seGO (see below), re-inforcing the notion that similar functions were activated at the two development stages although by means of largely distinct gene products.

Down regulated genes at P5 gathered to 4 pathways showed. Of note three of them related to specific neuronal activities; neuroactive ligand-receptor interaction pathway, glutamatergic

synapse and retrograde endocannabinoid signaling. This is particularly remarkable since no specifically nervous functions were identified amongst up-regulations. The last pathway enriched in P5 down regulations was steroid biosynthesis pathway that may also participate in cell communication by an action on cell membranes fluidity.

No pathway at all was enriched in P10 down regulated genes.

P5 specific regulations

In the 12 seKPaths in P5 brains, only two reach significant thresholds including genes still up regulated 24h after HI, indicating that most functions had early induction (PI3-Akt discussed above, and insulin resistance). Only pathways associated to down regulated genes were strictly specific to P5 since almost none of these genes appeared regulated at P10 (Supplement Table 1F).

P10 specific regulations

The seKPaths in common from P10 early and late regulations had only partial redundancy. Early pathways exhibited 9 genes specific to early regulation and 82 were common to the late phase of inductions. Reciprocally, genes defining seKPaths in late onset were 56 specific to late phase, indicating the late onset of many regulations.

Several pathways appeared enriched in P10 but not in P5 brains although large proportions of genes were also up-regulated at P5; Toll like receptor signaling pathway, P53 signaling pathway, Insulin resistance pathway and focal adhesion pathway. Chemokine signaling pathway also appeared significantly enriched at P10, but a high proportion of genes were induced with notable earlier onset in P5 brain. In P10 mice more than in P5 differences were observed between seKPaths obtained from early or late gene up regulations. All 8 seKPaths enriched from early genes list were also enriched in late induced genes. In addition, 8 seKPaths were specific to late genes and only one early path. Cytokine-cytokine receptor interaction pathway appeared delayed, compared to P5, but the most remarkable activation concerned B-Cell receptor signaling (p value = 9.70E-05, FDR= 0.0016%). Another P10 specific pathway with high significance was NFκB signaling pathway (p = 1.30E-03, FDR = 0.064%). Specific enrichment at P10 was also observed for Phagosome and Lysosome, NKκB signaling and ECM-receptor interaction pathways although less significantly (Table 1).

GO enrichment

Kinetics

Since GO annotations are available for the large majority of genes, it was possible to extract GO terms enriched at every time point after HI and to a high level of significance (p vale threshold set at 10^{-4}. Hundreds seGO terms were extracted from up-regulated genes in brains of HI exposed neonates (Table 2, Figure 8A). seGO terms from up-regulated genes detected in P5 brains were to 68.5% also detected in P10 brains. In P10 brains, seGO terms were only half in common with P5 and their number peaked 24h post-HI (Figure 6A). Interestingly, the number of genes associated to these seGO terms showed very different kinetics (Figure 8B). In P5 animals, most of the total up-regulated genes (74.4%) were annotated in seGO terms at the p< 1E-4 threshold (79.6% at 3h, 77.2.0% at 6h, 79.1% at 12h and 81.7% at 24h). In P10 mice, the proportions were lower, indicating less coordinated response to HI. Only 53.4% of the total up-regulated genes were associated to seGO (47.8% at 3h, 64.4% at 6h, 72.0% at 12h and 58.0% at 24h) (Table 2). It appears that the numbers of coordinated genes regulated at P5 or P10 and contributing to enrichment of seGO terms was less different than the total regulated entities (Figure 8B,C). A high convergence on seGO terms is noted at every time points at P5 and P10 (Figure 8D), but major discrepancies clearly appeared at examination of individual genes in these seGO at the two ages (Figure 8E).

Table 2: Number of GO terms exhibiting significant enrichment at every time point post-HI in P5 or P10 brain extracts. GO research was performed using GeneSpring® software on up-regulated and down-regulated genes separately.

		3h	6h	12h	24h
P5	Up	259*	234	339	233
		79.6%#	77.21%#	79.0%#	81.7%#
	Down	0	9	132	7
		3.7%α	1.7%#	71.6%#	6.9%#
P10	Up	165	222	234	290
		47.9%#	64.4%#	72.0%#	58.0%#
	Down	0	0	0	0
		0 α	1.6% α	0 α	2.5% α

*, *Number of GO features significantly enriched at the p< 0.0001 threshold.*

#, *% of regulated genes associated to at least one GO feature at the time point.*

α, *% of regulated genes associated to one GO feature at least once at the age.*

The nature of seGO terms also changed along the 24h post-HI and between the two ages . At P5, only 28.4% of seGO terms were extracted all along the 3-24h period, 51.6% appeared transiently (vanished at 24h or earlier) and the remaining 20% first appeared 12h or 24h post HI. In P10 mice the constant part was lower, representing 19% of the total. Transient seGO terms represented 25.7% of the total while the late onset seGO was the most abundant; 55.3% of the total (Figure 8D).

Down regulations only converge to seGO terms at P5, from 6h post HI onwards and exhibited a major enrichment at 12h (74.0% of down regulated genes in seGO terms), then regressed at 24h (Table 2). The few seGO terms extracted at 6h or 24h were also present at 12h and likely representing the initiation and the end of the processes peaking at 12h (Figure 8D). No seGO terms could be extracted from down-regulated genes in P10 brains.

The salient observation is that the high number of genes up-regulated at P5 and P10 brains showed so limited matched-identities, but converged to a lot of common seGO terms. Intriguingly, almost no seGO terms were related to nerve cell activity, while at P5 they were the major group at the 12h post P5 HI time point (see details below). Altogether, these data indicate a broader, early onset and highly coordinated transcription response to HI in P5 than in P10 pups.

Figure 8

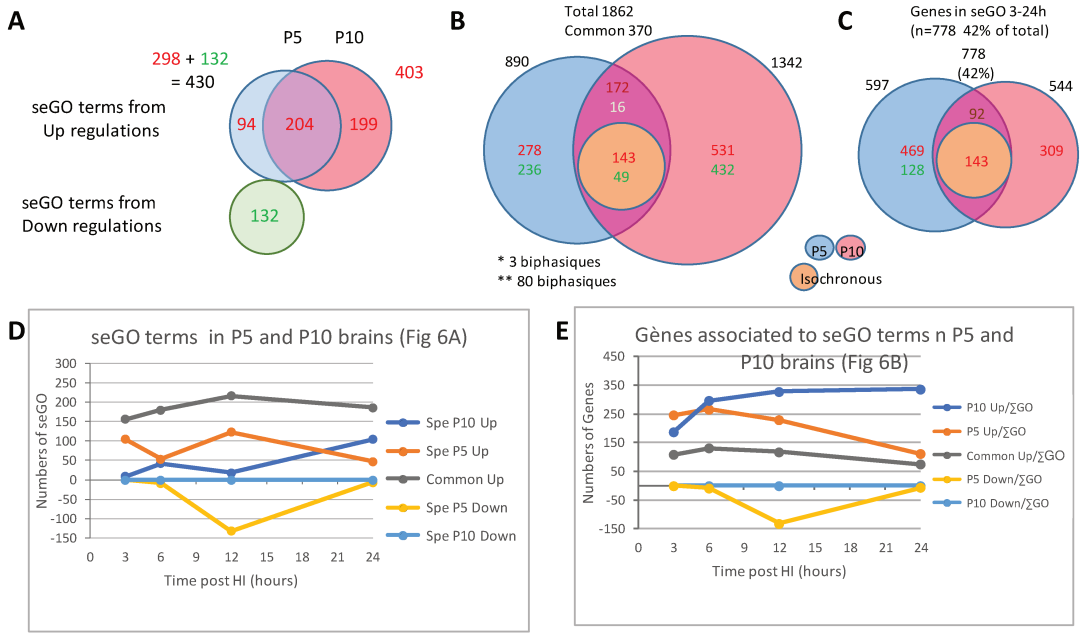


Figure 8: *Number of significantly enriched GO terms and gens included in it extracted from induced or repressed genes after HI at P5 or P10.* ***A****; total number of seGO terms,* ***B****; total number of post-HI gene inductions/repressions,* ***C****; number of post-HI gene inductions/repressions included in seGO terms,* ***D****; time course evolution of seGO terms extracted in P5, P10 and in common after HI ,* ***E****; time course evolution of genes included in seGO terms extracted in P5, P10 and in common after HI. Red number indicate up-regulations, green numbers indicate down-regulations. Circle surfaces are proportional to number of genes.*

Major functions identified from GO analyses

Enriched GO terms could be clustered in 8 functions/activities in both P5 and P10 mice; i.e. inflammation/ immunity, regulation of transcription, cell death/apoptosis, angiogenesis, development, signaling, kinases, protein metabolism (Figure 9). Keeping in mind that the common gene entities regulated at P5 and P10 represented less than 20 of the total, such a high convergence towards the same clusters is notable. They also clearly identify a core of HI effects on neonate brains at transcription level. The lists of genes in clustered seGO were compared at the different ages and delays. We could observe that mostly distinct genes were common at P5 and P10 in the seGO terms groups, with minor identities, as well as it was already noticed in whole gene series and partners of seKPaths (Figure 9).

Figure 9

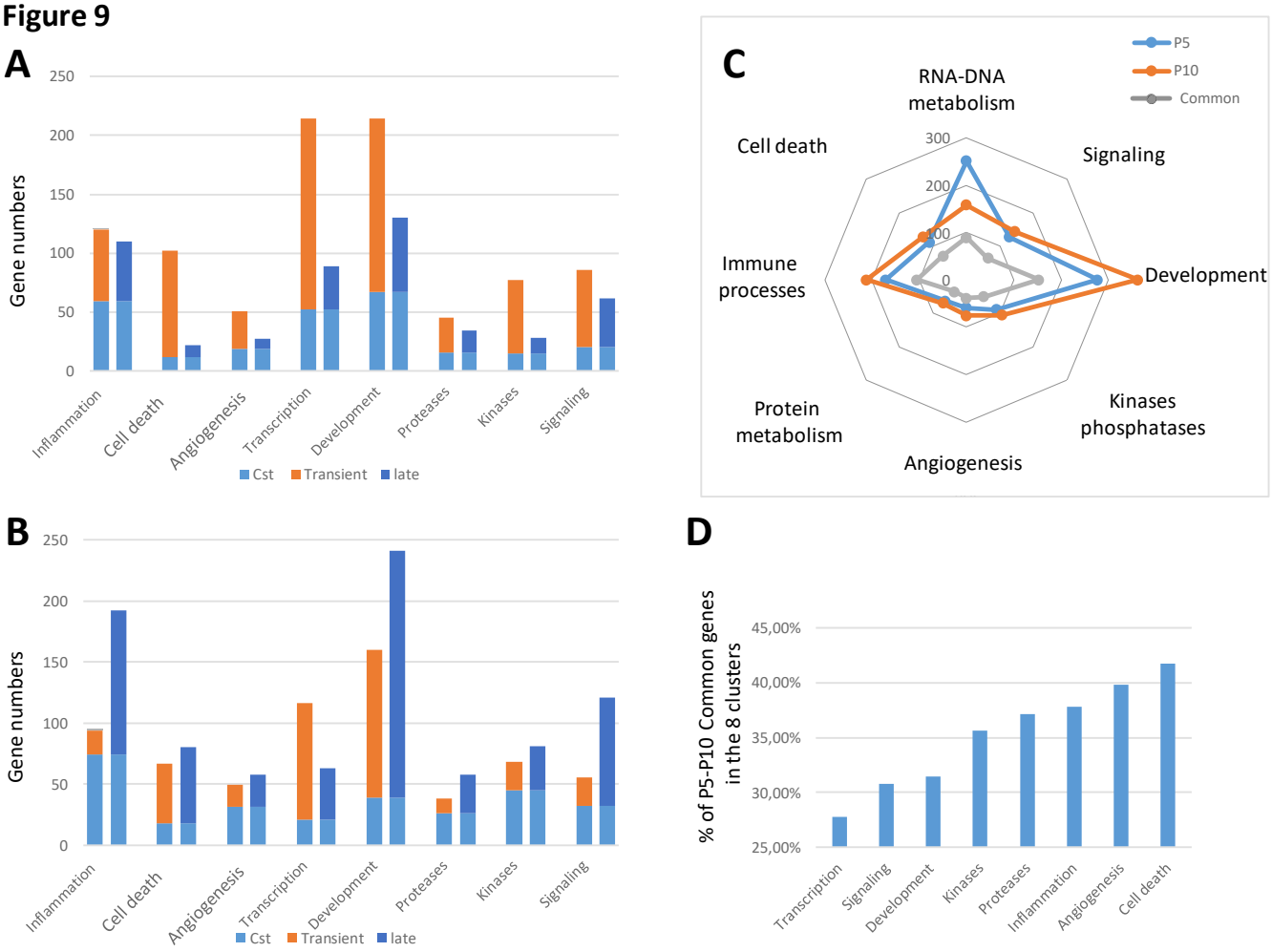


Figure 9: *Relative proportion of genes included in clusters of seGO terms in P5 (**A**) and P10 (**B**) brains after HI, according to their regulation kinetics; early, late and constant. **C**; Distribution of genes included in seGO in the 8 clusters of functions, **D**; relative part (in %) of genes in common affected after HI at P5 and P10 (vs total records) in 8 clusters.*

In P5 mice, early regulations were predominant in all seGO terms clusters (Figure 9A). The reverse was observed in P10 mice, in which late regulations were slightly predominant in 7 of 8 clusters, at the exception cluster of genes involved in regulation (Figure 9B). Distribution plots in the 8 clusters at the 4 time points revealed that in the number of genes activated in all directions predominates 3h after HI, being overtaken by values at P10 from 6h onwards (Figure 9C). The highest convergence amongst clusters was noted in inflammation and cell death seGO terms. Of note, only 27.5% to 42.1% of genes in each cluster were observed at P5 and P10 (Figure 9D). The lower convergence concerned transcription regulation. This cluster is also the only one in which more genes were activated at P5 than at P10 along the 24h pos-tHI (Figure 9D).

Figure 10

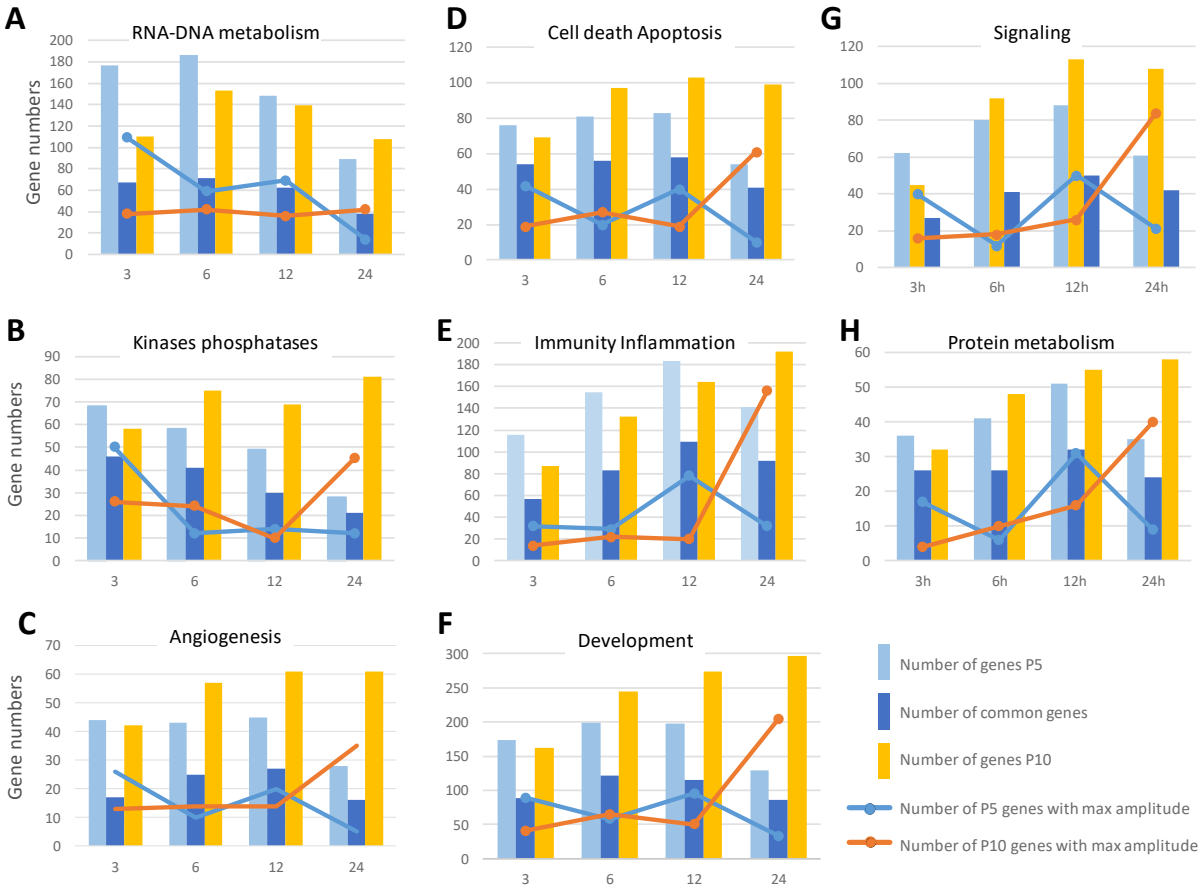


Figure 10: *Comparative kinetics of gene induction in the 8 clusters in P5 and P10 mice. Bars indicate number of genes in the cluster at the time point. Lines and symbols indicate the number of genes at their maximum amplitude at the time point.*

A detailed analysis of kinetics of seGO terms associated genes at every time post-HI in the 8 clusters is provided in Annexe B. Very different kinetics of time course inductions and time of maximum amplitude were observed in the 8 clusters between P5 and P10 mice (Figure 10). In

P5 mice, genes associated to transcription, angiogenesis, kinases/phosphatases and cell death had highest activation 3h after HI, with an eventual rebound at 12h. Genes in clusters related to inflammation/immunity, signaling, development and protease peaked at 12h post-HI and also exhibited their maximum amplitude mostly at this point. In all clusters, the number of genes activated at 24h regressed and very few had their maximum amplitude induction there. In P10 mice, numbers of genes in transcription cluster were the highest at 3-6h post HI, although maximum amplitudes appears evenly apportioned at all time points. Unless this exception, in all 7 other clusters the maximum number of genes included were observed late; at 12h for cell signaling and cell death, at 24h for the 5 remaining. In these 7 clusters, the maximum amplitudes were always gathered at the 24h time point.

Down regulations

It is very notable that, as well as in the research of pathways, no seGO terms emerged in P10 down regulated genes after HI brains, although 567 were significantly affected. Conversely, in P5 brains, significant enrichment of GO features was observed from 6 to 24h post HI, although showing a huge incidence 12h post HI (Figure 8D,E) Roughly 2 categories of GO could be separated. Gene showing repression 6 h post HI but no longer detected at 24 h gathered in seGO terms associated to membrane, exocytosis and more specifically neuronal synaptic membranes including a large series of ion channel; K+ channels in particular (9 GO enriched 6h post HI and 102 GO enriched 12h post HI). The second group of seGO terms includes genes associated to cholesterol and steroid metabolism. They first appeared repressed at 12h post HI (15 GO) and lasted, although to a lesser extent (6 GO in common but including fewer genes), up to 24h post HI. This is in agreement with pathway data, indicating that, in P5 ischemic brains, a coordinated down-regulation of many actors of synaptic activity were down regulated transiently from 6 hours but maximally at 12h post HI and had returned to basal expression level 24h post insult. A second wave of down-regulations might affect cholesterol metabolism from 12h post HI and was returning to basal level after 24h. In a total of 303 genes that fulfilled selection criteria for down-regulation at 12h, a vast majority (n = 229, 75.6%) were annotated in seGO terms at the 10^{-4} threshold. Details are presented in Annexe B.

Comparison of P5 and P10 responses to HI

It appears from these comparisons that the overall response in P10 animals was delayed. In all functions, the number of activated genes at P5 were higher than at P10 from 3 to 12h post-HI. Then although activations decreased 24h post-HI at P5 they increased in P10 animals.

Several salient observations could be noted from this study at the level of global survey. P5 and P10 mice show different transcription responses to the same insult. One may recapitulate 6 remarkable findings:

- Distinct set of genes exhibited induced transcription and even more distinct showed repression depending on age,
- Despite the preceding observation, high convergences were recorded amongst up regulations towards common pathways and GO terms, though each statistically enriched group was made of largely distinct entities between the 2 ages,
- Kinetics of up-regulations appeared very different as well on total gene series as in convergent pathways or seGO term. P5 animals respond early and tend to recover initial levels at the end of the records (24 h after HI), while P10 animals appeared to respond with a delay for most functions (except transcription regulatory genes) and instead of a return to initial levels showed a burst of inductions with high amplitude 24h post HI, questioning the future evolution,
- No convergence was noted between P5 and P10 repressed genes,
- Down regulations at P10 did not converge towards Kegg pathway or GO terms although it did not affect evenly genes showing P5 to P10 evolution of basal transcription, showing a preferential effect towards ontogenically increased entities
- Down regulations at P5 did not show such interference with development (at least regarded for an upcoming period), but remarkably converge, by the proportion of repressed entities involved in, and by a straight focus on few functions revealed by pathways and GO terms, and related to synaptic elements and steroid metabolism. The hypothesis of a reduced neuronal excitability was further tested at functional level (see below).

Protein correlation between gene regulation and functional changes.

In order to validate our transcriptional observations, we first assessed the protein expression level related to 3 genes: ***i)*** β-actin (Actb gene), ***ii)*** VEGFA (Vegfa gene) and ***iii)*** HIF-1α (Hif1a gene). These genes showed: ontogenic-RNA changes, differential HI-induced RNA induction at P5 and P10 and no RNA regulation at all, respectively. Actb gene coding β-actin protein showed a significant ontogenic downregulation between P5 and P10 (Figure 11A). Protein levels of β-actin assessed by western blot show also a downregulation between these two developmental stages (Figure 11B), validating the transcript observation although with less amplitude. β-actin expression was normalized on total protein signal (Figure 11C). The same was done for the normalization of VEGFA and HIF-1α.

VEGFA has been chosen for functional validation because of its strong implication in the vascular network regulation in numerous physio-pathological conditions. Vegfa gene showed a differential HI-induced upregulation at P5 and P10, with a maximum amplitude à 6h post-HI for both stages but a lasting upregulation at P10 compared to P5 (Figure 11 D). Quantification of protein levels showed an early (6h post-HI) increase of the monomer VEGFA form at P5 and only a delayed (24h post-HI) increase of both, monomer and homodimer VEGFA form at P10 (Figure 11E, F). If the timings of gene and protein expression of VEGFA are not totally superimposable, the notion of delayed response à P10, which is a hallmark of the transcriptomic study, seems to be found at the protein level as well.

HIF-1α is a key regulator of VEGF expression during development and in pathologies such as hypoxia-ischemia. Interestingly, the micro-array study did not show any modification of basal or HI-induced RNA expression at the chosen time points post-HI (not shown). The western blot analysis correlates to this observation and did not show any protein level variation (Figure 11G). These observations might be due to an early and transient HIF-1α induction after HI, before our first time point (3h post-HI).

Although, protein validation only concerned very few proteins, gene expression and western blot seem coherent.

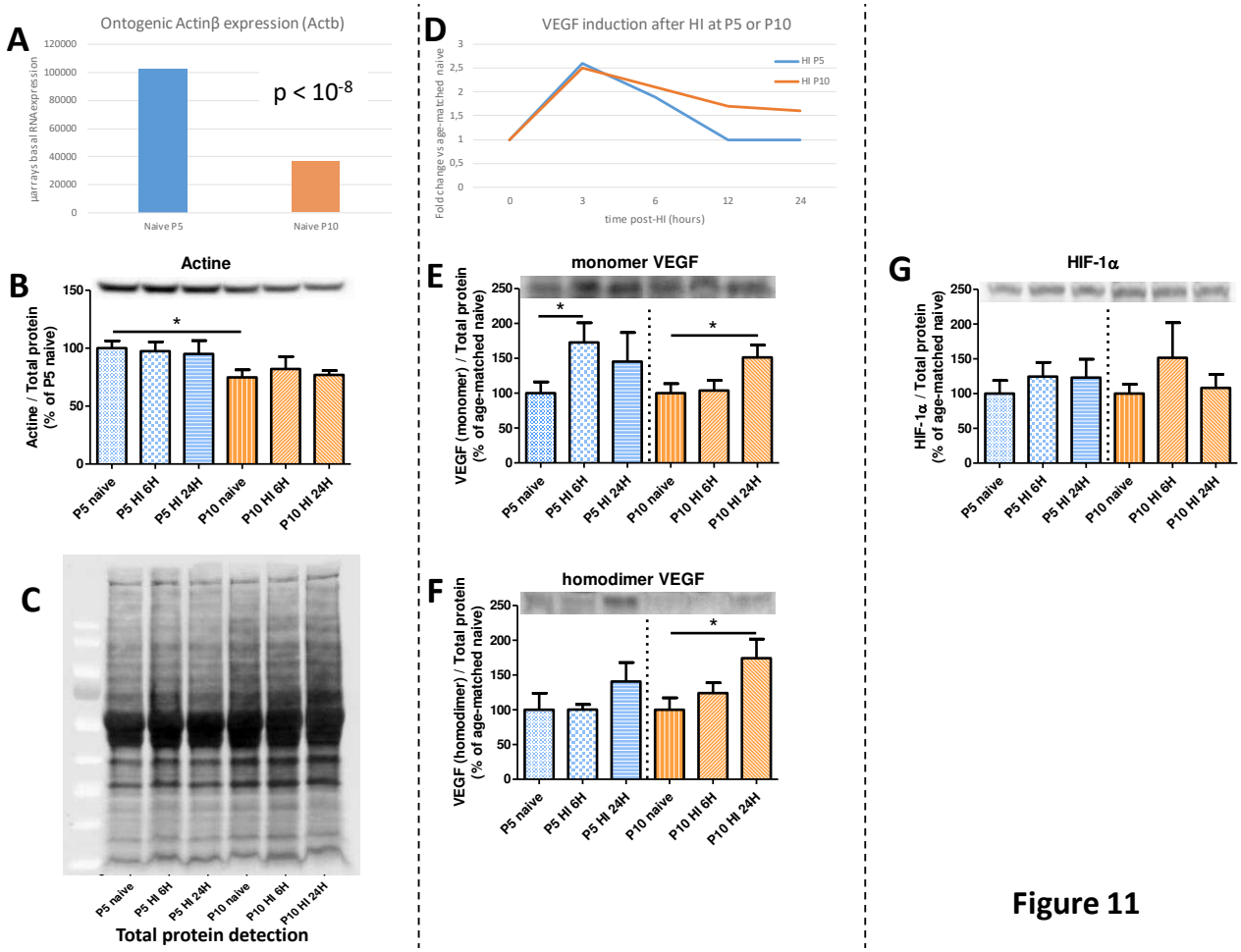


Figure 11

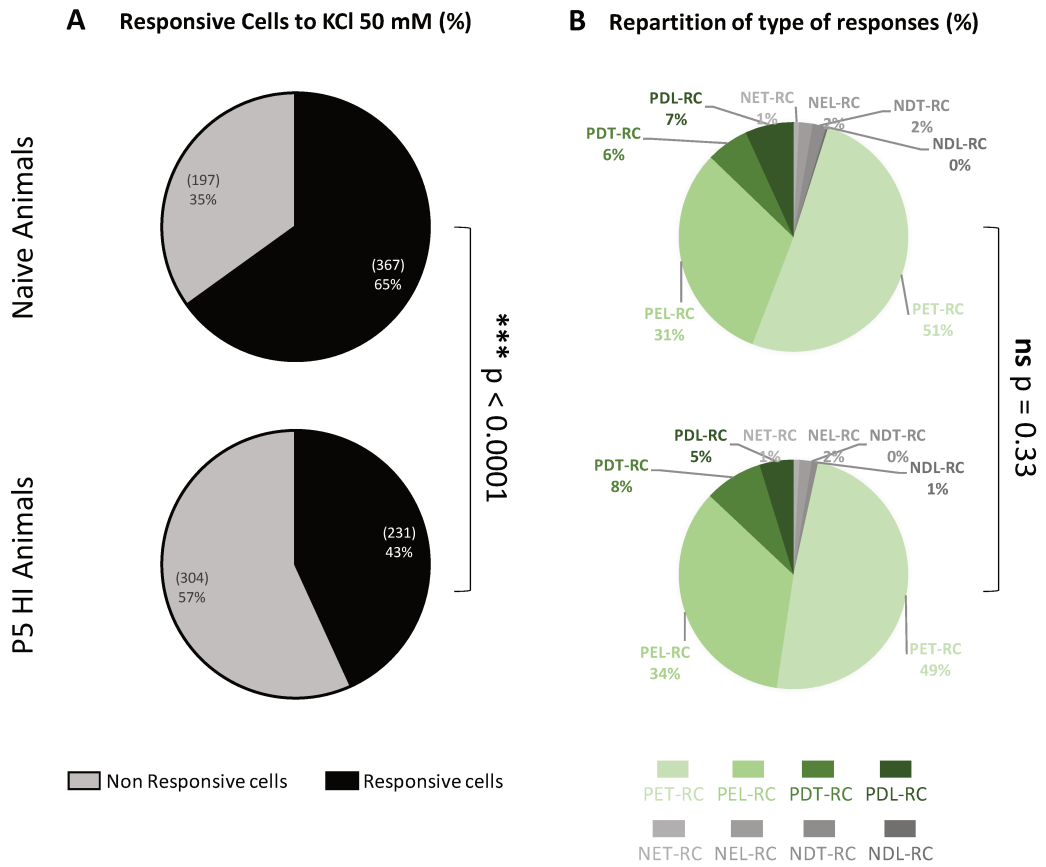
Figure 11: *Western blot validation at protein level of observations at mRNA level in arrays.* ***A****; Actb mRNA raw signal of hybridization in 12 arrays at P5 and P10,* ***B****; Western blot (top) and quantification from 6 biological replicates of β-actin in brain extracts from naïve or 6 or 24h delayed extracts of HI exposed P5 and P10 mice,* ***C****; Image of all protein detection used for calibration,* ***D****; Induction kinetics of VEGF-A transcription after HI in P5 and P10 brains,* ***E, F, G****; Western blots (top) and quantifications from 6 blots of immune-detection in extracts from naïve, 6 or 24h post-HI exposed P5 and P10 mice brains of VEGF-A monomer, VEGF-A homodimer and HIF-1α, respectively. *; p < 0.05 according to Student' t test*

Functionnal correlate of transient HI gene repression at P5

To go further in the validation process, we tried to characterize the P5 specific coordinated downregulations observed 12h post-HI, at a functional level. As the downregulation wave mainly concern synaptic proteins, including many K^+ channels, we hypothesized that a hypo-excitability could occur in P5 brains. To test the hypothesis, we performed calcimetric activity experiments on living brain slices from P5 mice at 15h to 18h post-HI and time matched naive animals. The stimulation was obtained using KCl (50mM). We first show a significant decreased proportion of responsive cells in HI P5 compared to naive animals ($p < 0.0001$, according to Chi_2 test)(Figure 12A), which seems coherent with a decreased in K+ channels. Various kinetics were classified in 8 groups (as described in supplement Figure 1), based on: ***i)***

excitation/silencing response, ***ii)*** delay of response and ***iii)*** durability of the response. The Chi_2 square test did not show any difference in the repartition of types of responses between naive and HI brain slices (Figure 12B). Finally, we have quantified the area under the curve for the four groups described as excitation (positive) responses (silencing responses representing less than 5% of cases), showing a bigger response amplitude of transient responses in HI P5 compared to naive mice (Figure 12C). In lesioned and naive mice, transient responses are the major types of responses, cumulating 57% of the responsive cells. No difference was observed for the lasting responses (Figure 12C).

These results showed than even if the number of responsive cells is effectively diminished in P5 HI animals, which seems consistent with the transcript observations concerning K+ channels, the amplitude of transient responses is bigger than in control animals. Further experimentations in HI P10 animals are needed prior to manuscript submission in order to determine either the results are specific of P5 lesioned mice or not.



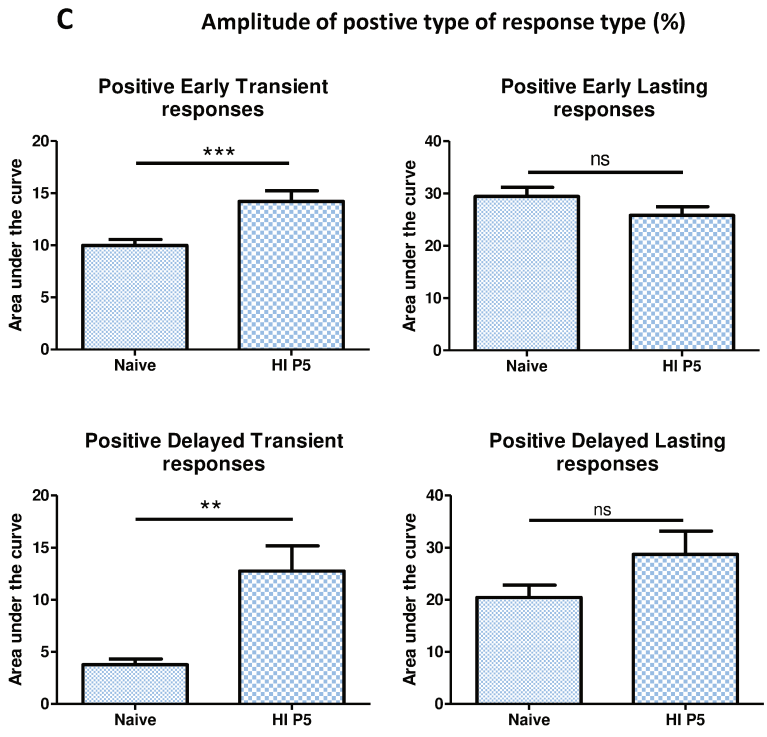


Figure 12

Figure 12: *Intracellular Calcium mobilization upon KCl (50 mM) exposure in fresh brain slices from naive and P5 mice exposed to HI collected 15-18h after the end of hypoxia.* ***A****; Proportion of KCl responsive cells,* ***B****; Distribution of response types in naive and HI exposed mice,* ***C****; Comparisons of KCl-induced calcium mobilization in the 4 types of positively responsive cells. Statistics in A, B according to contingency tests of* Chi_2*. In* ***C****, ** p < 0.01, *** p < 0.001 according to Student' t test.*

Discussion

Omics approaches begin to be used for development studies and developmental pathology.

It allowed us to demonstrate at a global level that neonate microvessels undergo a major maturation in the P5 to P10 perinatal period in mice, and that the nature of differences may contribute to distinct sensitivity/vulnerability to environmental disturbances (Porte 2017a,b). In a previous study (part 1 of data in this manuscript), we have investigated the differences of vulnerability and of upcoming sequels that could occur after HI in this period and in fact, we observed regional disparities and quasi exclusive behavior alteration in grownups after early or late lesions. Facing the enormous possibilities for brain tissue to adapt metabolism and resistance activity at the 2 development stages, we have decided a full tissue transcriptomic analysis against entire mouse genome. At first, we had to evaluate how spontaneous brain development continuing from P5 to P10 affected basal gene expression, then to analyze potential cross effects of ontogenesis and response to HI.

The present data give some valuable information on brain development, effects of HI at the transcription level and their global interferences. The fine observation for any gene undergoing HI-induced regulation at one or two ages, taking into account amplitude and kinetics responses to HI, basal expression and differences in developmental expression would be require to fully describe the phenomenon produced. Indeed, there are many steps between gene induction and function of the neo-synthetized protein and gaps are frequently reported. But the meaningfulness of broad transcriptomic study, based on statistical comparison to random and/or to previously recorded lists of genes/proteins under the permanent curating and approval of the community of users. Its first aim is to detect global changes in the tissue, sustaining definite molecular and cellular functions. We have in fact isolated several genic entities exhibiting age-dependent or conversely similar response to HI in P5 and P10 brain. The aforementioned discordances that possibly preclude univocal link between transcription and function led us to rather consider the clusters of entities showing coordinate variations (GO terms, Pathways) as it seems less at risk to misinterpretation than elaborating hypotheses on single genes. Indeed gene identities had interest in a second time in the analysis. The few western blot labeling of Actin, VEGF, HIF-1, IL1β indeed showed co-evolution of protein amounts and corresponding gene transcription level, although it does not

allow us to extrapolate at the whole mRNA observations. Such confirmations were indeed not be done extensively. Incidentally, the western blot detection of beta-actin, often used as internal calibration reference, revealed coordinated rise at mRNA level (Actb) from P5 to P10. This observation must be keep in mind in developmental studies in which a lot of protein species undergo variation in abundance (Porte et al., 2017b). The reference to global protein deposit or in gel evaluation is to be preferred.

Transcriptome ontogenic evolution

As a matter of fact, development advances between P5 and P10 in mouse brain and mRNA analyses provided valuable information. Our purpose was not to describe brain transcription ontogeny in this restricted time window, but to evaluate whether these changes interfere with the effect of HI.

Near 1/3 of all mouse genes in fact showed development progression in the brain over the period, in both senses for approximatively equivalent numbers. In comparison, all entities affected by HI at P5 and/or P10 (less than 2000) only represented 8% of the total genome. This proportion appears rather low, but the fact that only 40% of them showed down regulation (around 3% of the genome) clearly indicate that HI, at least in the first 24h, was not a cataclysm that turned off the biological activity. In fact, it enhanced transcription for another thousands of genes. The differences in responses to HI with age are clear at a global level although a very few number of entities had opposite sense of variation. More featuring was the fact that the majority of records involved genes only regulated at one age, more than the number of genes regulated at the two ages. This is the first remarkable observation of age dependence of brain responses to HI. In particular, only very few genes were repressed in both P5 and P10 brains. In addition, while HI-induced down-regulations essentially affected developmentally up-regulated genes at P10, it was the reverse at P5. This indicates that down regulations did not result from randomly recruited entities but rather result from distinct age dependent strategies of brain tissue adaptation to noxious conditions.

Convergences were more frequent in HI-induced gene expressions, but again in P10 brain, specific up regulations mainly affected genes undergoing developmental opposite variation; i.e. developmental decrease. Thus, it appears that the essential specific activation and repression in the P10 brain (more than 700 genes) trend to oppose development spontaneous evolution. The meaning, if it exists, of this observation might be interpreted as anstopping by

HI, even a regression, of the developmental process. As the effects of HI at this age did not show slow down after 24h and that the kinetics of response allow to envisage lasting phenomenon, it is likely that interference of HI with development processes would have much longer effects at P10 than at P5. Indeed lesion area observed at MRI-T2 level showed us larger infarct at P10 (Dupré et al, submitted). At this stage, a prominent development feature for HI to interfere with is the establishment of connectivity. (Refs baisse de volume, amincissement CC, reduction prot synaptiques….). Lesion size in the brain is not all in functional consequences, and HI at P5 even if it has short lasting transcription effect has serious influence on future functions, as it durably affect specifically the population of pre-oligodendrocytes and perturb overall myelination. Ontology investigation however did not show special trends in this function.

Convergent responses to HI in 5- and 10-day old mice

The investigation by Gene Ontology and Pathway enrichment are two complementary approaches. GO based on annotation of genes under cell location and functions in hierarchic classes benefits of the fact that the vast majority of genes are annotated, thus allowing a complete surveys of observations and allowing statistical evaluation of enrichment indicating convergences towards common cell location and/or functions. The procedure of identification of Pathways is reverse, as it requires that a specific function had been described and approved in its whole, as a list of factors. In mice only 183 pathways are described somehow limiting the functions possible to identify. Our research using the two approaches, of seGO-terms and seKPath and two distinct bio-statistical tools (GeneSpring® and DAVID®) were in fact complementary.

Unexpectedly, while the series of genes affected by HI at P5 and P10 were so different, seGO-terms and seKPaths exhibited high convergences, when applied on HI-induced up regulations. Biological functions emerging were; regulation of gene transcription, inflammation, cell death, angiogenesis.

In addition, the use of the response index taking into account induction amplitude duration and basal expression show a high ranking of the majority of the populations of so-called isochronous genes. These entities indeed represent the core of HI-induced transcription response, although they represent only a low proportion of observations at each age. Indeed early genes were in this list of up-regulated genes (Fos, Ier3), cytokines (Ccl2, 3, 4, 9), innate

immunity related genes (Tlr2, Csf1), and proteolysis activities (Plaur, MT1, MT2, TIMP-1). Among down regulation one may mention genes coding potassium channels (Kcne2, Kcns3), the central AMPA receptor subunit 2 (Gria2), the adhesion molecule (Cdh7) or the GABA recptor subunit (Gabra4), (details in supplement Table 1C).

Age-dependent differential responses to HI

As aforementioned, the major biological functions sustained by the changes detected at transcription level were similar in P5 and P10 mice, mainly affecting genes coding proteins involved in the regulations of mRNA transcription, inflammation, cell death or angiogenesis. But, at least four major differences clearly appear, at global and individual genes levels; ***i)*** the nature of actors in each function is largely discordant, ***ii)*** the number and median amplitude of regulated entities showed different evolution timing along the 24h post-HI, ***iii)*** the activation kinetics of most genes in common were delayed in P10 brains, either for initiation of response or peak amplitude; the latter being particularly obvious in inflammatory response, ***iv)*** the down regulations were at almost completely divergent (92% of entities only recorded at one age). Whatever sense of regulation, the kinetics of HI-induced transcriptomic responses in P5 mice clearly appeared as an extinguishing phenomenon, while in P10 animals, one must conclude to exploding effects. The comparisons, at the level individual genes, of induction (repression) amplitudes at 12h and 24h post-HI showed the opposite sense of variation, decreasing at P5 and increasing at P10, for the majority of them.

Age-dependent specific responses

Down regulations showed major age-dependent differences. In P5 mice, the discrete analysis at different time after HI revealed a peak of coordinated down regulations centered on the 12h post-HI time point, barely detectable at the 6 and 24h delays. In addition to be only observed in P5 mice, this sharp effect involved specifically a series of genes coding proteins involved at cell membrane, at synaptic differentiation loci and in synaptic functions. Such coordination appears far from randomly extracted event but rather indicates a transient and intense lowering of nervous transmission, at least at transcription level. The point is also remarkable in that among the large variety of seGO and seKPaths extracted from up-regulations, almost none involved strictly nervous functions. We have postulated that a consequence of these decreased transcription, particularly those coding several potassium

channels would reduce neuronal cell excitabililty. The study of intracellular calcium mobilization upon K^+-induced depolarization in fact show the reduction in the proportion of K^+ responding cells in P5 slices 15-18h after HI. Pharmacological study of the responses and control in P10 brain sections is under progress.

The HI-induced down regulations at P10 were very different. Not only the 63 genes repressed in common at P5 were so few accounting for 11% of P10 down-regulations, but no seGO term and seKPaths showed significant enrichment, as if these decreases in expression were at random. The observation that it affected predominantly developmentally up regulated genes would temper the random hypothesis. As HI induces energy supply reduction, together with energy demand for actually observed up regulations, a dispersed at random energy sparing might have been easy to understand. But the apparent nonrandom anti-maturating effect let an open question certainly worth investigating.

Previous studies at vascular level already demonstrated differences at the transcriptomic level between neonate and adult vessels or differences in transcript in neonatally insulted brain microglia at early and adult time. But to our knowledge, there has not been global comparison of sensitivity to insult at distinct maturation stages.

Indeed primate models should be the most pertinent although hard to develop for various reasons (ethical concerns, cost, infrastructures). Rodent models overtake these difficulties also enabling the resort of genetically engineered animals. In fact, mouse birth occurred after 21 days gestation and pups show forebrain development allowing comparison with human preterm at 24 PC weeks, even if it did not suffer preterm birth burden (maternal factor deprivation, respiratory insufficiency, intensive care environment). Notwithstanding these limitations, the present work confirm that major differences in HI sensitivity occur in mice at human preterm-like and full term-like cerebral development stages. In addition the study provide several tracks to be further explored. At first the coordinated down regulation of many genes coding for proteins involved in synaptic transmission and or membrane fluidity for a very short stop might be related to the upcoming evolutions in the tissue, since neither the down regulation at 12h nor return to basal level were observed at P10. How far is it related to the return to basal levels at 24h in P5 mice would be worst determining since inducing the down regulation or mimicking them in P10 should shorten P10 response, e.g. inflammation. In keeping with the idea that P5 down regulations were responsible for a global reduction of transmission activity enabling harmful reaction arrest, one should remind that it is somehow

the goal of pediatrician using hypothermia in at risk term infants, e.g. in inflammatory state, after asphyxia. Another track should be inflammation immunity targets that obviously maturate between P5 and P10, thus recruiting, i.e. B cell, NFκB … pathways that should also be possible ways for prevention or treatment in exposed term babies.

The global survey of P5 and P10 responses should indicates more severe effect of HI at P10 than at P5; more genes affected, longer lasting effect. Our previous study using the same Rice-Vannucci paradigm indeed show different effects and indeed larger lesions in P10 pups but, at behavior level in grownups, sequels were different but one cannot consider them more severe in adults lesioned at P10. This observation pointed on the age dependent high specificity of a given harmful stimulus, i.e. towards a population of cells born at this time or passing a checkpoint towards its future differentiation, as it likely occur in pre-oligodendrocytes (Pre-Ol) at P5. On this particular point, one must remark that none of the transcription factors nor membrane receptors involved in Pre-Ol maturation appeared in the lists of HI evoked gene regulations at P5 (nor at P10), showing the limitation of the technic.

Finally, the study also provided a valuable reference for future data mining and for evaluation of prospective therapeutic approaches. Indeed except hypothermia, almost no treatment of at risk infants or lesion bearing infants is fully approved. The reservations of clinician, especially in the prophylactic approaches of at risk populations, are due to the potential risks of interferences with development. On the whole, one may stay modest to envisage that one may a day use some efficient preventive/curative medicament that would not interfere with the plethora of development actors, at transcription or downstream levels. Today a prenatal treatment of preterms using magnesium appeared safe and effective at preventing hemorrhages, cerebral palsy and cognitive/behavior disabilities. Its postnatal use and in term infants has no official recommendation although preclinical studies allow hopes. The self-restrictions in physician wishes to gain with magnesium a novel agent with few co-incident effects mainly resides on pleiotropy of its reported effects. In a preliminary transcriptomic study, we have observed very few transcription effects of magnesium at neuroprotective dose. We wonder that its neuroprotective activity would be revealed in a study based on this one to particularly explore potential anti-inflammatory effect.

References

Baron, J.C., 2001. Perfusion thresholds in human cerebral ischemia: historical perspective and therapeutic implications. Cerebrovasc Dis 11 Suppl 1, 2-8.

Basha, S., Surendran, N., Pichichero, M., 2014. Immune responses in neonates. Expert Rev Clin Immunol 10, 1171-1184.

Fleiss, B., Gressens, P., 2012. Tertiary mechanisms of brain damage: a new hope for treatment of cerebral palsy? Lancet Neurol 11, 556-566.

Kaur, C., Hao, A.J., Wu, C.H., Ling, E.A., 2001. Origin of microglia. Microsc Res Tech 54, 2-9.

Leroux, P., Omouendze, P.L., Roy, V., Dourmap, N., Gonzalez, B.J., Brasse-Lagnel, C., Carmeliet, P., Leroux-Nicollet, I., Marret, S., 2014. Age-dependent neonatal intracerebral hemorrhage in plasminogen activator inhibitor 1 knockout mice. J Neuropathol Exp Neurol 73, 387-402.

Marret, S., Mukendi, R., Gadisseux, J.F., Gressens, P., Evrard, P., 1995. Effect of ibotenate on brain development : an excitotoxic mouse model of microgyria and posthypoxic-like lesions. J Neuropathol Exp Neurol 54, 358-370.

Porte, B., Chatelain, C., Hardouin, J., Derambure, C., Zerdoumi, Y., Hauchecorne, M., Dupre, N., Bekri, S., Gonzalez, B., Marret, S., Cosette, P., Leroux, P., 2017a. Proteomic and transcriptomic study of brain microvessels in neonatal and adult mice. PLoS One 12, e0171048.

Porte, B., Hardouin, J., Zerdoumi, Y., Derambure, C., Hauchecorne, M., Dupre, N., Obry, A., Lequerre, T., Bekri, S., Gonzalez, B., Flaman, J.M., Marret, S., Cosette, P., Leroux, P., 2017b. Major remodeling of brain microvessels during neonatal period in the mouse: A proteomic and transcriptomic study. J Cereb Blood Flow Metab 37, 495-513.

Rice, J.E., 3rd, Vannucci, R.C., Brierley, J.B., 1981. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. Ann Neurol 9, 131-141.

Van den Broeck, C., Himpens, E., Vanhaesebrouck, P., Calders, P., Oostra, A., 2008. Influence of gestational age on the type of brain injury and neuromotor outcome in high-risk neonates. Eur J Pediatr 167, 1005-1009.

ANNEXE A: ***Detailled analysis of genes defining seKPaths***

MAPK pathway: Only one gene in the path had high index of induction (Hspa1a, coding HSP70) with early 5 to 6-fold change, but Hspa1a gene was also associated with other pathways. Conversely, Hspb1 (coding heat shock protein b1) that showed high induction index in P5 but also in P10 mice appeared only associated to MAPK pathway in our data. No other induction restricted to P5 had high index.

Repressed genes associated to MAPK seKPath at P5 exhibited high repression index. FGF12, RASPGRP1 PTPRR, NTF3 and to a lesser extent GM5741 coded proteins have functions in signal transduction. Their repression reflects a slowing of MAP kinases signaling. In addition, a number of induced genes code for proteins involved in regulating (slowing) MAPkinase signaling i.e. the Growth arrest and DNA damage-inducible proteins GADD45A, GADD45B and GADD45G, the Dual specificity protein phosphatases DUSP1, DUSP4, DUSP, DUSP10 and DUSP16 and NR4a1. The other inductions poorly described this path since there were distributed in many others. There are the so-called early genes with wery high induction; Fos, Jun, Jund, inflammation initiators srf, Atf4 and receptors IL1R1, TNFRSF1a CD14 and apoptosis inducers fas. On the whole, the MAPK signaling pathway associated genes regulated after HI in P5 brain after HI did not include MAPkinases coding genes but evoked a coordinated inhibition of MAPK signaling. In P10 brain, all entities in common with P5 had higher Induction index (especially the phospahatases DUSP1 and DUSP16). Conversely the MAPKKK8 gene (Map3k8) was induced only in P10 pup brains from 3h to 24h as well as IL1b. Also specific to P10 mice, early inductions of Hspa8 and Mapt (coding the Tau protein) showed early onset. Several growth factor, receptors and transducers also appeared lately induced (BDNF receptor Trk-B coding gene (Ntrk2), Tgfb1, Tgfb2 Rasgpr3, Rac2) or repressed (Gm5741, coding the gamma subunit of G-proteins and Fgf6).

Proteoglycans in cancer pathway: This pathway exhibited the highest and most constant enrichment in all age/period sets of inductions. Its title indeed appears inappropriate in the context of this study. A global survey indicates a slower onset of inductions in P10 mice. Its included essentially membrane associated glycoproteins also involved in other seKPaths and discussed below.

According to the low contingency of conditions imposed to extract seKPaths, we detected series of paths affected of high FDR at several age/period points, although there were systematically detected for the n >5 and p < 0.05 threshold. This was observed for TNF signaling pathway, HIF-1 signaling pathway, Cytokine-cytokine receptor interaction. Some other pathways fullfiled significant enrichment in the 4 age/period groups, although always with high FDR; PI3K-Akt signaling, transcriptional misregulation in cancer, Phagosome, or late in P5 and P10 mice; Complement and coagulation cascades, chemokine signaling pathways and focal adhesion. Some pathways appeared enriched only In P10 mice. B cell receptor signaling pathway exhibited 15 genes up regulate including X specific to this path. Lysosome and platelet activation had high FDR. Finally, three pathways were significantly enriched in P5 mice including much down regulated genes; Neuroactive ligand receptor interaction, steroid biosynthesis and Wnt signaling pathways.

HIF-1 signaling pathway: Indeed after carotid ligature and low oxygen exposure, it is not surprising to detect HIF-1 signaling factors. 13 and 14 genes related to the pathway were observed in P5 and P10 mice respectively, of which 11 were common. Beside this similarity, the best statitistical significance was noted in early inductions of P10 mice. In P5 mice, all the genes associated to the path were affected in the first 12h post HI. Of note HIF-1 coding gene itself did not appeared increased. It is possible that 3h after the end of HI, its induction has already decreased. But several genes under HIF-1 control were induced (VEGFA and its receptor Flt1, Angiopoïetins 1 and 2. In P10 mice, few genes induced at P5 were not recorded, and none with top Induction INDEX. Common P5 and P10 activated genes often had higher induction INDEX at P10 than at P5, except Flt 1 and Serpine1 (coding for plasminogen activator inhibitor type 1). The highest indexes were observed for Hmox1, Slc2a1, TIMP1 and Pfkb3, all coding for proteins involved in resistance to aggression, Heme-oxygenase blunts heme oxidant potential, TIMP1 blocks several métalloproteinases, Slc2a1 favors glucose supply and Pfkb3 participates in the moderation of transcriptional activity. The ENO1 and ENO1b enolases described as hypoxia tolerance factors were only induced in P10 mice.
Altogether the observation in HIF-1 signaling pathway should indicate a more complex HI response at P10.

TNF signaling pathway: Very similar gene inductions contributed to enrichment of TNF signaling pathways in P5 and P10 mice. Amongst the 11 genes in common, eight were detected at all time points in either P5 or P10 mice. The early response genes ATF4 and Jun showed induction up to 12h, and CCL5 only from 12h post HI in P5 mice. At P10, the inductions were extended. Ten on the 11 entities exhibited top 50 index. Interrestingly, Bcl3 showed significant P5 specific induction with high index. The effect observed over the 24h period peaked at 12h post-HI. Reciprocally, four genes had induction in P10 mice only; IL1b, Map3k8 Casp8 and the only with high induction Index related to NFκB signaling: Nfkbia.

Cytokine-cytokine receptor interaction pathway: Genes in this seKPath were cytokines and chemokines and receptors. On the 34 entities recorded, 18 genes were observed in both P5 and P10. CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL6, CCL7, CCL9, CCL12, CSF1 coding genes and Tnfrsf12a exhibited high induction indexes at both P5 and P10, most of them over the entire 24h period and a maximum induction at 12h post-HI. Ccl17, PF4 were only induced at P5, while CD40 was rapidly down-regulated and IL11, Cxcl16 lately induced in P10 mice. Of note Il1b was only detected in P10 mice while Il1r1 was induced at both stages and quicker at P5 than in P10 mice.

Several receptors were common and with high index; namely Tnfrsf1a with top20 and top10 induction index at P5 and P10. Activated over the 24h it maximum amplitude appeared delayed in P10 mice. The same was observed for Osmr only detected late at P10. IL6ra, Il15ra and Tnfrsf9 were early responses element early induced at P5 specifically with induction Index in top50. Several cytokine receptors specific to P10 were induced late and with low induction index; Il1R2, Cx3cr1, TGFbr2. Tnfrsf13b was down-regulated early with index in top20 repression in both P5 and P10.

Transcriptionnal misregulation in cancer pathway included various entities involved in brain tissue responses to HI. Most of these genes indeed participate in transcription regulation. High induction index was calculated for genes induced in both P5 and P10 brains; Cebpb, Mlf1, H3f3b. Among genes regulated in P5 brains, only the down regulated Rxrg had high index. Conversely in P10 brains Cdkn1 and Foxo1 showed high index constant inductions. Several genes exhibited inductions at P10 only, but with low indexes (below the median).

The Pi3K-Akt pathway exhibited several age differences. Although 29 and 30 genes included in the pathway were recorded in P5 and P10 mice, 27 were detected over the first 12h and only 2 appeared late in P5 brains, while only 12 were common to early and late lists in P10 animals. In the later, 5 genes had early induction and 14 genes exhibited late regulation. This was in concordance with the previously mentioned monophasic P5 and biphasic P10 responses to HI. Nr4a1 appears in the top10 induction index with early and transient high amplitude induction in both P5 and P10 brains. This factor is likely to involved in vascular response to injury. Transcription activator Atf4 also the same kinetics but with higher amplitude in P10 mice. The others high indexed genes were Spp1 (osteopontin; a cytokine involved in inflammation) exhibiting a progressive induction culminating at 24h at both ages, Csf1, Mtor and Vwf. Specific repression of Fgf12 (topt10 repression) was noted in P5 brains only, while Fn1 (coding fibronectin) was the only high index gene noted at P10 exclusively.

Phagosome pathway did not show very significant enrichment estimated at the level of p value unless late at P10. High induction indexes were noted for the majority of entities in common (Cd14, Tuba1c, Tubb6 and to a lesser extent Tlr2 with higher amplitude at P10. At P5 many specific entities were down regulated with high index; Tubb1a, Tubb3, Tubb4b, Tubb4a, Tubb5. In P10, Actb, H2-KA and Actg1 were detected early and late with high index. In addition, 8 genes were up-regulated late at P10 only although with momoderate to low indexes, except for Ncf4. Very few down regulations were noted in this pathway and with low significance.

ANNEXE B: Gene Ontology

seGO terms related to DNA transcription and RNA metabolism (DNAt-RNAm)

Post HI transcription of genes coding proteins involved in DNA transcription and RNA metabolism, identified on the basis of annotation in GO terms, allowed to identify 251 and 158 genes in P5 an P10 pups. Only 89 genes (27.8% of the total) were in common, of which 80 genes had similar induction kinetics (Figure 8A). At the two ages, peak induction was observed 6h post-HI, but started earlier with maximum amplitude in P5 pups (Figure 8B). Up regulations observed 24h post-HI at P5 were for a very minor proportion at their maximum at this time indicating the extinction of the phenomenon. Although a wave on induction was noted in P10 mice, maximum amplitude of regulated genes were uniformly distributed.

Genes gathering in these GO terms exhibited among the highest induction recorded. Genes observed induced at both stages (n = 89) showed correlated induction amplitude (r^2 = 0.91, slope = 2.2). Considering genes in common although with regulation amplitude (< 2 fold) no correlation was observed (r^2 = 0.024). 162 genes annotated in these GO were recorded only at P5 and only 69 distinct genes were recorded only at P10. Altogether, induction response to HI of genes coding proteins of DNA and RNA synthesis appeared more prominent and precocious at P5 and share a small proportion of early genes (near 50 including, Jun, Fas, FosB…) with in P10 animals (Figure 8B). To evaluate the nature of functions underscoring these activations, we looked at the most enriched GO terms in our samples.

GO Analyses in clusters

Regulation of transcription

A total of 426 genes annotated with DNA/RNA biosynthesis related GO were up regulated in the entire experiment. Of note, GO enrichment were significant from 3h to 12h post HI only. However, we have included in our analysis the genes associated to these GO when their fold change at the 24h delay was significant. HI P5 response included 255 genes that were never detected enriched after P10 HI. Reciprocally, 68 genes were only detected in P10 extracts. Only 103 genes (24% of the total) were activated by HI at P5 and P10. A rapid induction of 200 genes was observed 3h after P5 HI while only 59 after P10 HI; only 14 of them being common. The maximum activation at P5 was reached after 6h (234 genes). A large decline was observed at 12h post HI and continued at 24h time point.

In P10 extracts, an increase of up regulated genes number was observed after 6h followed by a slow progressive increase at 12h and 24h. Not only, activations in P10 brain were delayed, the nature of genes regulated was to a large extent different (n = 56; 54 % of genes activated after P10 HI). These data show that i) a high amplitude rapid and transient transcription regulation is induced by HI in P5 pups, ii) in P10 animals, the response to HI had late onset and late high amplitude regulations, iii) the P10 response was made of delayed activation of genes activated at P5 and recruit a majority of distinct entities.

Cell death

A total of 209 genes annotated with cell death/apoptosis GO were up regulated in the entire experiment. Their activation kinetics in P5 or P10 animals revealed an overall delayed response in P10 animals. HI P5 response included 172 genes that were never detected enriched after P10 HI. Reciprocally, 129 genes (mostly activated 24h post HI) were only detected in P10 extracts. Only 92 genes (44% of the total) were activated by HI at P5 and P10. A rapid induction of 80 genes was observed 3h after P5 HI while only 37 after P10 HI; only 18 of them being common. The maximum activation at P5 was reached after 12h (119 genes).
In P10 extracts, two-fold less genes were up regulated 3h after HI (37 genes) compared to what occurred at P5 +3h. A first increase was observed a 6h and a second at 24h post-HI. At this delay post HI, 77 genes were up regulated including 53 genes (53%) of the P10 specific response. A minority of genes (n = 47) exhibited the same activation kinetics at the two ages (22% of the common list) while 31 genes (15%) had delayed activation at P10 compared to P5. The highest amplitudes of regulations in P5 pups were observed in the P5 specifically induced genes at 12h post HI while in P10 pups, the maximum up regulations were noted in the P10 specific genes. Among cell death and apoptosis related genes, the amplitude of induction was also age dependent. Near half of genes had higher regulation amplitude in P10 mice from 3h to 12h post HI, this proportion rose at 24h (48.9, 49.1, 47.4 and 58.6% at 3, 6, 12 and 24h post-HI). Altogether these data show that i) cell death was induced earlier in P5 pups, ii) the number of genes recruited was higher up to 12h post P5 HI and iii) a delayed, high amplitude and to a large extent based on different gene entities was induced 24h post P10 HI, while at this delay the phenomenon decreased in P5 brains.

To understand the differences in nature of immune/inflammatory effects of HI at P5 or P10, we have made a pathway analysis of the lists of genes actually recruited at the different time points.

Immunity-Inflammation

A total of 332 genes annotated with immunity/inflammation GO were up-regulated at least once in the entire experiment. Their activation kinetics in P5 or P10 animals revealed an overall delayed response in P10 animals. HI P5 response included 120 genes that were never detected enriched after P10 HI. Reciprocally, 76 genes (mostly activated 24h post HI) were only detected in P10 extracts. Only 136 genes (41% of the total) were activated by P5 and P10 HI. A rapid induction of 91 genes was observed 3h after P5 HI while only 23 after P10 HI; only 9 of them being common. The maximum activation at P5 was reached after 12h (47 genes), indicating that a P5 type of immune inflammation reactivity was not only earlier but different of P10 response. In P10 extracts, a strong increase was noted 6h after HI that plateaued until 12h, then another increase was noted after 24h. At this delay post HI, 154 genes were up regulated including 80% of the P10 specific response. Few genes (n = 58) exhibited the same activation kinetics at the two ages (43% of the common list) while 71 genes (52%) had delayed activation at P10 compared to P5. Among genes exhibiting enhanced transcription in P5 and P10 pups, the amplitude of induction was also age dependent. One third of genes had higher regulation amplitude in P10 mice 3h post HI but this proportion rose along with time (35.3, 57.8, 61.2 and 87.9% at 3, 6, 12 and 24h post HI). Altogether these data show that i) the time course of immune inflammation response to HI depends on the age of animals, ii) the nature of the responses are different and iii) part of the late (24h) status in P10 animals is common to HI P5 effects but delayed and amplified.

To understand the differences in nature of immune/inflammatory effects of HI at P5 or P10, we have made a pathway analysis of the lists of genes recruited at the different time points.

Angiogenesis

A total of 116 genes annotated in GO related to Angiogenesis were up regulated in the entire experiment. An early onset was observed in P5 animals with a lot of genes exhibiting their highest amplitude increase 3h after HI. The maximum was recorded 12h post HI with a second phase of high amplitude regulations. At 24h the angiogenic reaction in P5 animals is clearly

extinguishing at transcription level. In P10 animals the angiogenic reaction at 3 h was three-fold lower than in P5 mice, but the genes induced were essentially the same. Surprisingly, 6h after HI an angiogenic response started although made of activations of a completely distinct series of genes activated in P5 mice. Later, a P10 angiogenic response continued to rise although a high amplitude response was noted 24h after HI. HI P5 response included 40 genes that were never detected enriched after P10 HI. Reciprocally, 22 genes were specific to P10 brains. Near half of total genes in these GO (n = 53; 46%) were induced in P5 and P10 mice, although with different kinetics. These data show i) a rapid onset of angiogenic response in P5 mice, ii) a transient low activation 3h after HI at P10 of one third of genes activated at P5, iii) the decreasing response 24h after P5 HI while activation rise at 24h in P10 pups.

Signaling

Among the 691 genes annotated in GO related to signaling, a large proportion also refer to development (n = 421). Thus, 270 signatures remained of genes associated to signaling but not to developmental processes. A huge proportion of them was only detected in P5 pups (45.5%) while only 22.6% were specific to P10 pups and 31.8% appeared in P5 and P10 HI pup brains. Inductions of the highest amplitude occur at 12h and to a lesser extent as early as 3h in P5 brains while 60% of genes up regulated in P10 animals have their maximal expression 24h post HI. These data showed i) the early onset of a signaling activity in P5 pups in successive waves, and ii) a delayed response in P10 pups restrained to a smaller gene number.

Development

A total of 624 genes annotated in GO related to development were up regulated in the entire experiment. Only 189 (30.3%) exhibited altered expression in both P5 and P10 mice and only 112 genes (17.9%) with isochrone kinetics. 251 genes were only activated in P5 mice while 173 were specific to P10 animals. In P5 animals, most gene exhibited post HI high amplitude time dependent modulation while in P10 mice mostly show smooth induction curve over the 24h post HI period. The number of genes with highest amplitude regulation was maximum 12h post HI in P5 pups (164 genes over 437; 37.5%) while it was minimum at 24h (71 genes; 16%). Reciprocally the numbers were 41 genes over 362 (11.3%) with maximum induction at 3h, and 206 genes (56.9%) with maximum induction at 24 post HI in P10 pups. Once again, the kinetics were different in P5 and P10 pups. This might be less surprising concerning

development associated genes since P5 and P10 pups had distinct developmental status. These data show that i) in P5 pups HI induced more gene induction than in P10 pups; ii) that induction in P5 pups were short in duration while P10 inductions lasted longer time, iii) that a minority of genes related to the same GO features had altered expression at both stages.

Protein phosphorylation

A total of 183 genes annotated in GO related to phosphorylation were up-regulated in the entire experiment. An early onset was observed in P5 animals; 61 genes among the 138 exhibiting up-regulation in P5 animals (44.2%) had highest induction 3h after HI. A rapid decline was observed and only 12% had highest expression at 24h post HI. In P10 animals 105 genes related to phosphorylation GO exhibited up regulation although with a very different kinetics. 50 genes had maximum increase 3 or 6 h after HI and 45 genes had maximum 24h after HI. In addition, 8 genes had U shaped kinetics with induction level after 6 and 12h lowest than at 3 and 24 h post HI. HI at P5 increased expression of 78 genes (42.6% of total inductions) specific to P5 animals while P10 specific inductions only confer to 44 genes (24%). 61 genes were affected at both ages (33.3%) although with distinct kinetics for 24 of them. These data show i) a very rapid onset of phosphorylation regulation in P5 mice, ii) a transient activation 3h-12h after HI at P10 of one third of genes activated at P5, iii) the decreasing response 24h after P5 HI while activation rise at 24h in P10 pups.

Protein metabolism (except phosphorylation)

A total of 107 genes annotated in GO related to protein metabolism at the exclusion of phosphorylation were up regulated in the entire experiment and only 48 (45.3%) had altered expression in both P5 and P10 pups. In P5 pups 57 genes (on the 86 genes with altered expression recorded at this stage; 66.3%) were not altered in P10 pups. Reciprocally 2 genes (3% of the 70 genes with altered expression after HI at P10 were not recorded in P5 pups. In P5 pups, two peak of high amplitude inductions were noted at 12h and 3h post HI while in P10, 50 gene inductions were maximum 24h post HI (57% of P10 inducrtions). These data show that Biphasic earl responses to HI affected P5 mice genes involved in protein metabolisms including

DISCUSSION & PERSPECTIVES

L'hypoxie-ischémie est, avec l'inflammation, l'un des facteurs de risque principaux liés à l'apparition des lésions cérébrales néonatales (Lawn et al., 2005; Volpe, 2012). Les études cliniques et expérimentales s'accordent sur le fait que les lésions induites par l'HI dépendent grandement du stade de développement (Towfighi et al., 1997; Van den Broeck et al., 2008). C'est pourquoi, nous avons choisi d'étudier ces processus chez la Souris à 5 et 10 jours dont le développement cérébral mime respectivement celui d'enfants nés prématurés (autour de 30 SG) et à terme (autour de 40 SG) (Clancy et al., 2001; Semple et al., 2013). Nous avons choisi d'utiliser le modèle dit de « Rice et Vannucci » (Rice et al., 1981) qui est un modèle validé et très utilisé pour modéliser, chez le rongeur, les lésions observées en pédiatrie (Rocha-Ferreira et al., 2018; Vannucci and Vannucci, 2005).

Nous avons réalisé deux études utilisant ce modèle, sous deux approches méthodologiques très différentes : une approche longitudinale alliant imagerie IRM, histologie et analyse comportementale à l'âge adulte chez des souris sauvages (WT) et invalidées pour le tPA (tPA-KO), et une approche globale transcriptomique.

Dans l'étude 1 (*Neonatal cerebral hypoxia-ischemia in mice triggers age-dependent vascular effects and disabilities in adults : impact of tPA*), l'objectif était de dégager des corrélations entre la lésion hypoxo-ischémique périnatale aux deux stades développementaux, évaluée par imagerie IRM en séquence T2, et les déficits comportementaux à l'âge adulte. Les tests choisis permettent d'évaluer des déficits cognitifs observés aussi bien chez les nourrissons à la suite de lésions périnatales (Volpe, 2012) que dans des études expérimentales (Alexander et al., 2014; Sanches et al., 2015). Nous avons cherché à évaluer le rôle du tPA car cette protéase montre un intérêt particulier en période périnatale. Les fonctions du tPA dans le SNC (cf introduction) sont nombreuses et toutes ont un potentiel neurotoxique existant aussi probablement dans la période périnatale. Néanmoins, peu d'études se sont penchées sur ce sujet. Il a été démontré dans un modèle excitotoxique son implication dans plusieurs types de lésions, de l'induction et de la croissance de lésions kystiques, à l'activation microgliale (Hennebert et al., 2004, 2005). D'autres approches, *in-vitro* et *ex-vivo* menées à Rouen, montrent qu'il est plus abondant et plus sécrété au niveau de l'endothélium vasculaire cérébral du nouveau-né (Henry et al., 2013; Legros et al., 2009) et que son activité prolongée (par invalidation de son inhibiteur) entraîne la rupture vasculaire et l'hémorragie (Leroux et al., 2014). Cet ensemble de données conduit à rechercher les effets, au niveau vasculaire, de stimuli délétères pendant la période

périnatale. Si les lésions touchant les nouveau-nés sont difficiles à détecter, un des premiers outils est l'échographie qui permet la détection de l'œdème, pouvant lui-même être le signe d'une souffrance vasculaire (Michinaga and Koyama, 2015).

Les résultats de l'étude 1 nous permettent de discuter quelques éléments clefs :

Une atteinte spécifique de la substance blanche d'origine vasculaire ?

De nombreuses études cliniques font état d'une atteinte spécifique de la substance blanche (SB) chez les nouveau-nés prématurés comparé aux nouveau-nés à terme (Larroque et al., 2003; Bax et al., 2006; Van den Broeck et al., 2008; Tilborg et al., 2018a). Cette atteinte de la SB est due notamment à l'immaturité des pré-oligodendrocytes, alors sensibles aux phénomènes délétères d'excitotoxicité, de stress oxydant et / ou d'inflammation (Volpe et al., 2011; Tilborg et al., 2018b). Cette sensibilité des pré-oligodendrocytes est observée dans de nombreux modèles expérimentaux de lésions néonatales (Marret et al., 1995b; Back et al., 2002; Buser et al., 2010; Daher et al., 2018). Elle conduit à des déficits pérennes de myélinisation à l'âge adulte. Dans notre étude nous montrons également une atteinte de la SB à l'IRM en séquence T2, chez les souris âgées de 5 jours exclusivement, et cela chez les souris WT comme tPA-KO. Un hypersignal observé en imagerie en séquence T2 nous permet d'observer l'eau libre, mais ne nous permet pas de différencier un œdème ionique sans rupture de BHE, d'un œdème vasogénique avec rupture et extravasation de protéines sériques, les deux ayant pour conséquence une entrée d'eau dans le parenchyme depuis le compartiment vasculaire (Michinaga and Koyama, 2015).

Notre étude histologique et enzymatique permet de mettre en évidence une rupture de la BHE colocalisée avec une activation microgliale dans le cortex et l'hippocampe des souris âgées de 5 et 10 jours. Ce sont les mêmes structures que celles montrant un hypersignal T2 dans l'étude longitudinale. De même, l'atteinte spécifique de la SB à P5 à l'IRM se traduit par une extravasation d'IgG et une activation microgliale. Cette étude est la première, à notre connaissance, à montrer une vulnérabilité vasculaire des vaisseaux de la SB, spécifique du stade développemental et contemporaine d'atteintes oligodendrocytaires. Savoir dans quelle mesure l'atteinte vasculaire que nous observons est antérieure, voire causale des atteintes des oligodendrocytes reste à évaluer. Cependant, la présence de protéines sériques dans la substance blanche entraîne l'apparition d'œdème, d'un stress oxydant et d'inflammation

(Wagner et al., 2005). Ces éléments nous permettent de poser l'hypothèse que l'atteinte spécifique des vaisseaux de la SB à P5 dans les 24 premières heures après le phénomène d'HI pourrait être à l'origine du passage de protéines sériques dans le parenchyme. Cela induisant ainsi les phénomènes de stress oxydant et d'inflammation auxquels les précurseurs d'oligodendrocytes sont particulièrement sensibles, participant ainsi à la pathogenèse des LPV (Back et al., 2005).

Nos résultats montrent que l'activité MMP-9 des vaisseaux de la SB, sous dépendance du tPA, est responsable de cette atteinte vasculaire. D'autre part, nous montrons l'absence remarquable de ces activités protéasiques dans la SB des animaux de 10 jours alors quelles sont bien présentes dans le cortex et les structures sous-corticales. Cela montre que les vaisseaux de la SB ont acquis une maturité passant par la perte de ces activités. Outre que cela a été montré par des approches structurales globales (Porte et al., 2017a), cela indique qu'une diversité de répertoire d'expression existe dans les vaisseaux selon les régions cérébrales (Macdonald et al., 2009; Saunders et al., 2013). A cela s'ajoute l'absence de ces activité tPA et MMP dans les vaisseaux de l'hippocampe, quelque soit le stade de développement. Dans l'hippocampe, nous observons aussi que les activités protéases proviennent des neurones, la présence de tPA dans ces cellules ayant déjà été démontrée auparavant (Adhami et al., 2008). La présence de ces activités protéasiques neuronales, colocalisées avec les hypersignaux T2 à l'IRM et l'extravasation des protéines sériques, nous permet cependant de conclure à une sensibilité vasculaire néonatale liée à ces activités protéases, d'origine neuronale dans l'hippocampe.

L'étude des animaux tPA-KO nous permet de confirmer le lien déjà décrit entre tPA et MMP-9 (Wang et al., 2003; Adibhatla and Hatcher, 2008). Chez ces animaux, nous n'observons plus les activités MMP-9 vasculaires, corticales ou de la SB, non plus que l'extravasation des protéines sériques ou l'activation microgliale dans ces structures. Le rôle du tPA dans la promotion de l'inflammation a déjà été montré par ailleurs chez le jeune (Hennebert et al., 2005). Dans le contexte d'HI néonatale qui nous préoccupe, il semble donc que l'action du tPA passe par une atteinte vasculaire primaire, favorisant dans un second temps l'inflammation. Dans l'hippocampe, l'invalidation du tPA ne prévient pas l'activité MMP-9 observée dans les neurones, mais protège de l'extravasation de protéines sériques et de l'inflammation chez les animaux âgés de 5 jours spécifiquement. Ainsi, cette structure montre un profil développemental particulier au niveau vasculaire. Il faut donc envisager des modes d'actions

différents, indirects, de ces protéases avec les vaisseaux dans le cas particulier de l'hippocampe.

Chez les animaux tPA-KO nous n'observons pas d'augmentation de l'activité MMP-9 par zymographie en gel ni au niveau vasculaire par zymographie *in-situ*. Ceci confirme le lien déjà décrit entre le tPA et les MMPs vasculaires (Omouendze et al., 2013). L'invalidation du tPA permet également de prévenir l'extravasation d'IgG et l'activation microgliale dans le cortex et la substance blanche. Le rôle du tPA dans l'inflammation a déjà été démontré par ailleurs chez le jeune et l'adulte (Siao and Tsirka, 2002; Hennebert et al., 2005). Cependant, dans notre contexte d'hypoxie-ischémie néonatale, l'action du tPA passerait par une atteinte vasculaire favorisant l'inflammation.

Les vaisseaux de l'hippocampe restent un cas particulier. L'invalidation du tPA ne prévient pas les activités MMP neuronales observées dans cette structure, ni à P5, ni à P10. Cependant, l'absence de tPA protège les vaisseaux de l'hippocampe à P5 mais pas à P10. Ceci sous-tendrait une évolution développementale dans les interactions de ces protéases avec les vaisseaux de l'hippocampe, impliquant l'activation de MMPs indépendamment du tPA.

Il existe une forte spécification des vaisseaux cérébraux comparés aux vaisseaux périphériques (Daneman et al., 2010a), mais il existe également des différences entre vaisseaux cérébraux néonataux et adultes (Fernandez-Lopez et al., 2012; Saunders et al., 2013; Stolp et al., 2016) et plus finement encore, des différences entre les vaisseaux cérébraux de souris de 5 et 10 jours (Porte et al., 2017a, 2017b). D'autre part, des évolutions le long même de l'arbre vasculaire ont été reportées, entre artérioles, capillaires et veinules, affectant particulièrement des éléments de la BHE (Macdonald et al., 2009). Toutes ces différences sont très probablement dues aux interactions avec les cellules environnantes : péricytes, astrocytes, neurones (Al Ahmad et al., 2011). L'étude chez l'Homme, de la spécificité vasculaire de l'hippocampe et surtout de la substance blanche, par des approches protéomiques post-mortem dans un premier temps, semble une piste de recherche intéressante. Ces deux structures sont en effet probablement celles dont les atteintes sous-tendent les déficits cognitifs d'apprentissage (hippocampe) et de sociabilité (SB) que nous avons observés. Il nous semble donc particulièrement nécessaire de poursuivre la translation de ces résultats chez l'Homme.

Impact du stade de développement lors de l'hypoxie-ischémie sur les déficits à long terme.

La plupart des études cliniques étudiant le devenir des enfants s'attache, le plus souvent, à une classe d'âge (prématuré ou né à terme) ou à un type d'atteinte (de la SB par exemple). Mais ces études ne comparent que rarement les différences entre les déficits comportementaux des nouveau-nés à terme ou prématurés. Cependant nous pouvons dégager quelques tendances. Les déficits observés à la suite d'une lésion chez le nouveau-né prématuré ou à terme sont différents en termes d'occurrence et de types de séquelles. Les enfants nés prématurés ont globalement un taux plus élevé de PC, de retard mental et de déficits cognitivo-comportementaux comparé à celui des enfants nés à terme (Moster et al., 2008; Johnson et al., 2018). La prévalence des types de PC diffère entre ces deux groupes avec notamment plus de PC dystoniques et d'hémiparésies chez les enfants nés à terme (Van den Broeck et al., 2008).

Dans notre étude, nous avons montré des déficits comportementaux spécifiques du stade de développement lors de l'HI. Nos résultats sont en accord avec d'autres études expérimentales qui se sont également intéressées à l'impact de l'âge de l'HI sur les déficits à long terme chez le rat (Alexander et al., 2014; Sanches et al., 2015). En effet, ces deux études montrent également des déficits d'apprentissage (spatial ou non) plus marqués chez les rats hypoxié-ischémiés à P7 comparés aux rats à P3, ces deux stades correspondant aux stades P10 et P5 chez la souris (Clancy et al., 2001).

En ce qui concerne l'activité locomotrice et les déficits moteurs, une hyperactivité locomotrice sans impact de l'âge a été montrée dans un test d'*openfield* (Sanches et al., 2015). De même, les déficits moteurs semblent plus spécifiques des rats hypoxiés à P7 (Alexander et al., 2014; Sanches et al., 2015). Sur ces aspects, nos résultats ne sont pas en accord avec ces études. Nous n'avons trouvé aucune atteinte locomotrice dans un test d'activité en cage de vie (résultats non-illustrés), ni de déficit moteur dans le test de piscine de Morris. Cependant, le test d'activité en cage de vie n'a pas de composante d'anxiété au contraire de l'*openfield,* ce qui pourrait expliquer ces divergences (Belovicova et al., 2017). Notre test d'interaction sociale apporte une information complémentaire. Il a permis de mettre en évidence des déficits chez les souris lésées à P5 plus importants qu'à P10. En effet, si les animaux montrent un moindre intérêt pour le congénère inconnu, seuls les animaux lésés à P5 montrent une hyperactivité liée à la présence du congénère inconnu. En ce sens où la rencontre peut être considérée comme un élément de stress ou d'anxiété, l'hyperactivité observée chez les

animaux de 5 jours nous rapproche des études en *openfield* chez le rat, une spécificité liée à l'âge en plus.

Notre étude chez les animaux tPA-KO montre une prévention de tous les déficits chez les animaux lésés à P5, qu'ils soient d'apprentissage ou d'interaction sociale, hyperactivité incluse. Chez les animaux tPA-KO lésés à P10, seuls les légers déficits d'interaction sociale sont prévenus. Le fait que l'invalidation du tPA prévienne l'inflammation spécifique de la SB et les déficits d'interaction sociale, nous inciterait à faire le lien entre cette structure et cette atteinte comportementale. L'interaction sociale est en effet une fonction hautement intégrée qui met en jeu de nombreuses aires cérébrales distantes, il est donc probable qu'une atteinte des fibres de la substance blanche en période périnatale puisse engendrer ces déficits à long terme. Les mécanismes possibles pourraient être une perte d'oligodendrocytes ou un arrêt de leur maturation menant à des déficits de myélinisation à long terme (Tilborg et al., 2018b).

En revanche, les déficits d'apprentissage observés à la suite d'une HI à P10 ne sont pas prévenus par l'invalidation du tPA, nous permettant de relier ces déficits à la rémanence de l'activité MMP-9 et de l'atteinte vasculaire dans l'hippocampe, structure bien identifiée pour son rôle dans les processus d'apprentissage (Moser et al., 2017; Gilchrist et al., 2018).

Analyse en composantes principales.

L'ACP nous a permis de mettre en évidence une association franche non ambigüe (alignement en vecteur) des hypersignaux T2 (à J+1) corticaux, hippocampiques, des ganglions de la base et de la perte tissulaire globale à l'âge adulte, avec les performances d'apprentissage dans le test de piscine de Morris, plus marqués chez les animaux lésés à P10. Chez les animaux lésés à P5, les hypersignaux T2 dans la substance blanche ont une vectorisation intermédiaire entre les paramètres d'interaction sociale et d'apprentissage, indiquant un impact probable des atteintes de la substance blanche dans ces deux comportements. Ces données sont cohérentes avec les conclusions d'Alexander et Coll. concernant les déficits importants des rats lésés à P7, liés à une perte tissulaire globale à l'âge adulte. Chez les rats lésés à P3 ils proposent plutôt une perte de connectivité neuronale, bien qu'ils ne montrent pas d'atteinte de la substance blanche, ce qui au plan fonctionnel rejoint nos observations (Alexander et al., 2014). Chez la souris, les atteintes de la substance blanche à P5 sont bien renseignées (Marret et al., 1995b; Hennebert et al., 2004; Daher et al., 2017,

2018). Dans l'ACP, le facteur âge apparaît donc clairement associé aux capacités d'interaction sociale, ce qui met en exergue l'hyperactivité observée exclusivement à P5 dans notre étude.

La place de l'effet sexe dans notre étude.

Les études récentes pointent de plus en plus fréquemment la nécessité d'évaluer ces lésions et leurs conséquences fonctionnelles selon le sexe des animaux (McEwen and Milner, 2017). Outre la difficulté pratique à réunir à l'instant t des effectifs équilibrés suffisants, il nous semble que plusieurs questions préalables doivent être résolues avant de s'engager dans cette étude chez le rongeur. Autant la validité de la correspondance entre les développements cérébro-corticaux à P5 et P10 et ceux d'enfants prématurés et nés à terme n'est plus contestée, autant rien n'indique qu'au plan de la différenciation sexuelle du cerveau, cette correspondance temporelle ait une valeur. En particulier, la période critique pour la masculinisation du cerveau chez le rongeur se prolonge jusqu'à 10 jours postnataux, alors que chez l'homme cette période critique survient en anténatal (McCarthy et al., 2017). Cette masculinisation semble largement sous le contrôle d'enzymes convertissant la testostérone en œstrogène chez le rongeur. Cependant, savoir si et dans quelle mesure ce mécanisme est transposable chez l'Homme est sujet à débat (Motta-Mena and Puts, 2017; McCarthy et al., 2017; Luoto and Rantala, 2018; Puts and Motta-Mena, 2018).

L'objectif de notre étude était d'identifier des phénomènes à court terme, retentissant sur le long terme. Or, nous n'avons observé aucune différence liée au sexe en imagerie IRM à court terme. Ceci est en accord avec la littérature expérimentale. En effet, il n'a pas été montré de différence liée au sexe sur les comportements périnataux (à J+1) à la suite d'une HI (Daher et al., 2018), ni sur l'induction des cytokines pro-inflammatoire TNF-α et IL-1β (Mirza et al., 2015). En clinique, aucune observation ne va dans le sens d'atteintes structurales spécifiques en fonction du sexe de l'enfant. Des différences liées au sexe apparaissent cependant chez la souris à partir de trois jours et jusqu'à l'âge adulte, d'un point de vue structural, inflammatoire et comportemental (Mirza et al., 2015; Al Mamun et al., 2018; Charriaut-Marlangue et al., 2018; Daher et al., 2018). Globalement, les femelles semblent mieux récupérer la perte tissulaire, cependant, cela ne se traduit pas toujours par de meilleures performances comportementales. Pour une majorité des paramètres comportementaux étudiés, les déficits sont similaires entre mâles et femelles, pour d'autres les données de la littérature sont contradictoires (pour revue Netto et al., 2017). Enfin, quelques atteintes spécifiques liées au

sexe ont été répertoriées. Cependant, ces dernières sont également dépendantes du test dans une même catégorie de comportements évalués (par exemple, sensorielle ou d'apprentissage) (Netto et al., 2017). Ces données démontrent des interactions croisées, complexes, des lésions initiales avec le développement en cours et ultérieur (Volpe, 2009), très probablement dues à une imprégnation hormonale différente et ce, dès la première semaine de vie chez le rongeur (McCarthy, 2016).

Néanmoins, nous avons renseigné le facteur sexe dans notre ACP et ce facteur est celui qui contribue le moins à la variabilité totale de notre étude. De plus, il n'existe, à notre connaissance, aucune donnée dans la littérature concernant un effet du sexe sur la différenciation vasculaire en période périnatale, phénomène qui pourrait interférer avec nos conclusions sur une atteinte vasculaire précoce.

Prédictibilité de l'imagerie IRM sur les déficits à long terme.

Dans notre étude, les lésions à l'imagerie IRM sont de tailles très variables, mimant une hétérogénéité interindividuelle observée aussi chez l'Homme, bien que nos animaux et procédures soient très standardisés. Dans nos tentatives de corrélations entre tailles de lésions et déficits d'apprentissage, nous n'avons, de même qu'en clinique, pas observé de corrélation univoque entre tailles de lésions et déficits ultérieurs (Bax et al., 2006; Franckx et al., 2018; Sewell and Andescavage, 2018; Taylor et al., 2018). L'utilisation des souris tPA-KO nous a permis de mettre en évidence que l'imagerie IRM en séquence T2, à elle seule, est insuffisante pour différencier l'œdème avec ou sans rupture de la BHE. L'IRM T2 n'est pas la méthode d'imagerie la plus utilisée, notamment chez les prématurés pour lesquels l'échographie transfontanellaire lui est préférée. Cependant, chaque technique d'imagerie montre des limites, et aucune à ce jour, ne permet à elle seule de poser un pronostique développemental (Graham et al., 2016). Notre étude montrant une souffrance vasculaire dans la plupart des cas, nous pensons qu'une recherche de marqueurs circulants de cette souffrance serait un bon outil diagnostic complémentaire chez les enfants présentant un tableau clinique d'hypoxie-ischémie. Différents biomarqueurs circulants sont déjà à l'étude (Graham et al., 2016, 2018). En particulier, des taux élevés de MMP-9 circulantes ont été détectés chez l'Homme et chez la Souris à la suite d'une HI (Bednarek et al., 2012). Des études plus approfondies, utilisant des approches de spectrométrie de masse notamment, seraient à

même d'identifier de nouveaux biomarqueurs de souffrance et/ou de rupture vasculaire et représentent un champ d'investigation d'intérêt.

~

Les approches « omiques » sont régulièrement utilisées lors d'études développementales et permettent des analyses globales, sans apriori, et utiles pour la communauté scientifique en tant que bases de données (Fernandez-Lopez et al., 2012; Saunders et al., 2013; Sharma et al., 2015; Gonzalez-Lozano et al., 2016; Porte et al., 2017a, 2017b).

Dans l'étude 2 (*Analysis of hypoxia-ischemia induced gene induction and/or repression in neonate mouse brain at two stages of perinatal development: micro-arrays transcriptomic analysis and biological validation),* toujours en cours d'analyse, nous avons choisi de cibler la différence en terme de réponse à l'hypoxie-ischémie entre les souris de 5 et 10 jours, par une approche transcriptomique couvrant tout le génome de la Souris. L'étude 1 ayant montré des différences dès 24h après l'HI, nous avons choisi d'évaluer la réponse transcriptomique à l'HI pendant ces 24 premières heures. Il s'agissait d'identifier des évènements, spécifiques ou communs aux deux stades, sur lesquels une intervention thérapeutique précoce serait, à terme, envisageable. Dans un premier temps, nous avons analysé l'évolution de l'ensemble des transcrits entre 5 et 10 jours chez les animaux naïfs. Puis, dans un second temps nous avons pu analyser l'impact du développement sur la réponse différenciée à l'HI.

Il existe de nombreuses étapes de régulation entre l'induction d'un gène et l'action de la protéine néosynthétisée et de grands écarts sont souvent rapportés. C'est pourquoi nous avons abordé l'analyse en nous concentrant plutôt sur des groupes de gènes montrant des variations coordonnées. Pour cela, nous avons utilisé les annotations de *GeneOntology* (GO) et recherché des enrichissements de fonctions par une approche statistique. Parallèlement, nous avons effectué des analyses de *pathways*, qui utilisent des bases de données approuvées et régulièrement mises à jour de séries de gènes contribuant à des fonctions intégrées.

Les quelques validations que nous avons réalisées par Western blot et qui concernent des variations de transcrits de gènes codant des protéines d'intérêt (HIF-1α, VEGFA et l'actine-

β), montrent une convergence avec les résultats d'analyse de transcrits. Nous envisageons également une validation protéique par une approche d'immunodétection multiplexe concernant les voies de signalisation de l'inflammation, qui montrent un fort intérêt, étant grandement et différentiellement modulées en réponse à l'HI aux deux âges.
Dans l'état actuel des travaux, nous pouvons discuter certains aspects de la réponse transcriptomique à l'HI entre les souris de 5 et 10 jours.

L'évolution ontogénique du transcriptome impacte la réponse à l'hypoxie-ischémie.

C'est un fait, le développement cérébral progresse entre P5 et P10 et les analyses de transcrits en attestent. Cependant, le but de l'étude n'était pas de décrire l'ontologie des transcrits cérébraux entre ces deux stades mais d'évaluer si ces changements pouvaient interférer avec la réponse à l'HI. Entre P5 et P10, presque un tiers des gènes de la souris montre une évolution significative, répartie de façon équilibrée entre des inductions et des répressions. En comparaison, la totalité des gènes affectés par l'HI (moins de 2000) ne représente que 8% environ du génome. Parmi ces gènes, la répartition des inductions et des répressions, plutôt en faveur des inductions (60%), montre qu'il n'y a pas d'arrêt des activités biologiques pendant les 24 premières heures, mais des réponses biologiques diversifiées.

Le premier fait remarquable concernant les différences de réponses à P5 et P10, concerne l'identité des gènes mis en jeu. Seulement une minorité d'entre eux sont communs aux deux stades, notamment pour les répressions d'expression. À P5, les inductions/répressions affectent indifféremment (dans les mêmes proportions) des gènes d'expression augmentée ou réduite pendant le développement spontané de 5 à 10 jour. Au contraire, à P10, une grande majorité des inductions/répressions induites par l'HI, va contre le sens de variation développementale. Cela indique ***i)*** que des stratégies cellulaires/tissulaires différentes d'inductions/répressions sont mises en jeu à P5 et P10, ***ii)*** qu'à P10, l'HI induit des effets opposés à l'évolution développementale de la transcription pour la majorité des gènes affectés. Notons néanmoins que nous établissons cette conclusion sur l'évolution développementale de ces gènes pendant la période précédant l'HI (de 5 à 10 jours). Cette observation ressemble à un arrêt, voire à une opposition, induite par l'HI, du processus développemental en cours. Ce type d'impact pourrait apparaître pour les gènes affectés par l'HI à P5 si nous connaissions leur profil développemental entre P0 et P5.

Contrairement aux animaux lésés à P5, la réponse des animaux lésés à P10 ne montre pas de ralentissement 24h après l'HI, bien au contraire. Ceci laisse envisager une réponse qui peut durer bien au-delà et ainsi, les effets prolongés de l'HI à P10 pourraient interférer plus longtemps avec le développement. Ceci est en accord avec nos observations de lésions plus étendues à P10 rapportées dans le travail en 1ère partie et avec la littérature (Dupré et al., submitted; Alexander et al., 2014; Sanches et al., 2015). Cependant, la taille de lésion à elle seule n'est pas prédictive du devenir cognitivo-comportemental ultérieur. Si la réponse transcriptomique à l'HI semble être en voie d'achèvement après 24h chez les animaux à P5, à l'âge adulte ils montrent néanmoins des déficits cognitifs significatifs (Dupré et al., submitted). Il y a donc des effets qualitatifs déterminant, dépendant de l'âge, par exemple dus à une atteinte durable des précurseurs d'oligodendrocytes (Tilborg et al., 2018b). Nos approches d'analyses des termes GO ou par *pathway* montrent leur limite, n'indiquant pas de variation notable des gènes de l'oligodendrogenèse allant dans ce sens (par exemple : PDGF-Rα, CNPase, MBP).

Les réponses à l'hypoxie-ischémie à P5 et à P10 montrent des convergences globales.

Les analyses par GO et par *pathway* sont deux approches complémentaires. L'analyse par GO est basée sur l'annotation hiérarchisée des gènes (et/ou de la protéine codée) en fonction de leurs localisations cellulaires et de leurs fonctions, et profite de l'annotation de la quasi-totalité du génome. Ceci permet une analyse statistique assez complète de l'enrichissement de fonctions/localisations. L'analyse par *pathway* nécessite, à l'inverse, une description (et validation) préalable de fonctions spécifiques sous forme de listes de gènes. Chez la souris, seulement 183 *pathways* sont décrits, (contre plus de 800 chez l'Homme) ce qui limite l'analyse aux fonctions décrites.

Un fait remarquable de notre étude est l'observation d'une forte convergence des termes GO et *pathways* statistiquement enrichis dans les listes de gènes induits par l'HI à P5 et P10, malgré des listes de gènes très différentes. Les fonctions biologiques enrichies concernent principalement : la régulation de la transcription, l'inflammation, la mort cellulaire et l'angiogenèse. Si ce décallage (gènes/fonctions) peut surprendre, il est déjà apparu dans d'autres études utilisant des approches protéomiques et transcriptomiques, notamment lors de l'analyse des microvaisseaux cérébraux entre P5 et P10 chez la souris, où les mêmes

fonctions sont assurées par des acteurs (gènes/protéines) différents (Porte et al., 2017a, 2017b).

Les réponses à l'hypoxie-ischémie à P5 et à P10 montrent des <u>divergences</u> globales.

Bien que les fonctions biologiques enrichies par l'HI à P5 et P10 soient très similaires, au moins 4 différences majeures apparaissent au niveau global, ou au niveau des gènes induits : ***i)*** comme mentionné auparavant, la nature des acteurs associés à ces fonctions est très largement différente, ***ii)*** les gènes affectés montrent des cinétiques et des médianes d'amplitude maximale différentes au cours des 24h, ***iii)*** parmi les gènes affectés en commun par l'HI, la cinétique d'induction des gènes est majoritairement retardée à P10, en termes de délai d'induction (répression) et d'amplitude maximale, ***iv)*** les gènes réprimés à P5 et à P10 sont presque totalement distincts, avec seulement 8% de gènes en commun.

Chez les animaux à P5, concernant aussi bien les inductions que les répressions, la cinétique des gènes affectés par l'HI indique un phénomène en cours de résolution à 24h, alors qu'à P10 la cinétique apparaît comme un phénomène qui prend de l'ampleur à 24h. La comparaison de l'amplitude d'induction des gènes affectés à 12h et 24h montre des variations opposées selon l'âge pour la majorité d'entre eux, en diminution à P5 et en augmentation à P10.

Ces observations plaident pour un effet transitoire de l'HI à P5 ne durant pas beaucoup plus de 24h alors que l'effet est très probablement plus ample et plus durable à 10 jours. En clinique néonatale, l'HI qui affecte les prématurés peut être prolongée, alors que l'hypoxie du nouveau-né à terme est plutôt ponctuelle. Cela pointe peut-être une limite de la transposition chez l'Homme des observations faites dans notre modèle, dans lequel les animaux de 5 et 10 jours sont soumis au même évènement délétère, c'est-à-dire 40 min d'hypoxie à 8% d'O_2.

Il existe des spécificités de réponse à l'hypoxie-ischémie en fonction du stade de développement.

Les répressions induites par l'HI montrent des différences importantes liées à l'âge. Chez les animaux à P5, nous montrons une répression coordonnée de gènes, centrée à 12h post-HI. La majorité de ces gènes code des protéines localisées à la membrane cellulaire et impliquées dans les fonctions synaptiques. Une telle coordination ne semble pas due au hasard (statistiquement significatif) et pourrait indiquer une diminution transitoire de la

transmission synaptique. Cette observation est d'autant plus remarquable que parmi tous les termes GO et les *pathways* extraits des listes de gènes induits, quasiment aucun n'implique strictement des fonctions nerveuses. Nous formulons l'hypothèse qu'une diminution de transcription des canaux potassiques, pourrait induire une diminution de l'excitabilité neuronale et de la transmission synaptique. Notre étude calcimétrique montre effectivement une diminution des taux de cellules répondantes à une concentration dépolarisante de K^+ chez les animaux à P5. Certaines des réponses observées apparaissent tardivement. Elles peuvent être dues, soit à l'effet du K^+ sur la cellule concernée après la mise en jeu de processus intracellulaires, soit à des activations trans-synaptiques. Il conviendra d'élucider ce type de réponse en présence d'inhibiteur de la libération synaptique ou de la transmission intracellulaire par exemple par des inhibiteurs de MAPK. D'autre part, pour aller plus loin dans l'interprétation de ces résultats, des contrôles chez les animaux à P10 devraient être réalisées. En effet, les répressions observées à P10 sont très différentes, aucun *pathway*, ni aucun terme GO ne montre d'enrichissement spécifique dans la liste des répressions à P10, pouvant signifier que ces répressions étaient aléatoires. Si la diminution d'excitabilité que nous observons à P5 est bien liée aux diminutions de transcrits observées à 12h post-HI spécifiquement, elle ne devrait pas être retrouvée chez les animaux à P10.

L'hypothèse d'une répression aléatoire à P10 serait concevable, étant donné que l'HI entraîne une déplétion énergétique et que les inductions coordonnées de gènes que nous observons par ailleurs consomment de l'énergie. Cette hypothèse s'oppose alors à l'apparente coordination de ces répressions à rebours des évolutions développementales discutées plus haut. Ces éléments soulèvent des questions intéressantes qui méritent de plus amples investigations.

Apports de l'étude « omique ».

Des études précédentes ont montré des différences au niveau des transcrits entre des vaisseaux néonataux et adultes (Fernandez-Lopez et al., 2012; Saunders et al., 2013; Stolp et al., 2016; Porte et al., 2017a, 2017b), des différences au niveau de la microglie au cours du développement chez la Souris (Orre et al., 2014) et chez l'Homme (Galatro et al., 2017). Cependant, à notre connaissance, notre étude est la première à explorer la sensibilité différentielle à l'HI à deux stades de développement. L'utilisation d'un modèle murin a ses limites dans la transposition à l'Homme (voir plus haut). De plus, la souris ne naît pas

prématurée et ne subit ni la privation précoce des facteurs maternels trophiques, ni l'insuffisance respiratoire fréquente et durable chez le prématuré et qui participent aux phénomènes délétères. Néanmoins, notre étude confirme des différences majeures en fonction du développement cortical de nouveau-nés prématurés ou à terme, observés en clinique. (*i.e.* vulnérabilité de la substace blanche, hyperactivité du prématuré et déficits cognitifs du nouveau-né à terme)(Van den Broeck et al., 2008).

Cette étude fournit, en outre, des pistes d'investigation pour les recherches à venir :

En premier lieu, à quel point la répression coordonnée de gènes impliqués dans la transmission synaptique 12h post-HI, est-elle à relier à l'extinction des processus observée à 24h chez les souris de 5 jours ? La question se pose du fait que ni l'un, ni l'autre de ces éléments n'ait été observé chez les souris de 10 jours. De plus, la diminution d'excitation neuronale par le K^+ n'est pas sans rappeler l'utilisation de l'hypothermie chez les nouveau-nés à terme dont l'objectif principal est de diminuer de façon globale la neurotransmission cérébrale et l'inflammation.

D'autres pistes d'investigation concernent : ***i)*** le processus inflammatoire, apparemment différent entre les souris à P5 et P10, avec notamment le recrutement de lymphocytes B chez les animaux de 10 jours, ***ii)*** l'exploration des voies de signalisation intracellulaire associées à NFkB, MAPK, Pi3K, TLR. La modulation de ces voies pourrait être envisagée comme moyen potentiel de prévention chez les nouveau-nés.

Enfin, notre étude fournit une base de données valide pour de futures analyses et pour l'évaluation de thérapies de neuroprotection. En effet, excepté l'hypothermie chez le nouveau-né à terme (Azzopardi et al., 2014; Zhang et al., 2017), presque aucun traitement ne fait consensus chez les enfants à risques de, ou montrant des lésions, le souci étant de trouver un traitement efficace et interférant le moins possible avec le développement en cours. Aujourd'hui, le traitement prophylactique par le sulfate de magnésium des mères en menace d'accouchement prématuré apparait sûr et efficace pour prévenir les hémorragies, la paralysie cérébrale et les déficits cognitifs (Chollat et al., 2014; Doyle et al., 2015; Gano et al., 2016). Cependant, il n'est pas utilisé chez les enfants nés à terme car on ne connait pas ses effets dans ce contexte particulier, le magnésium possédant des effets pléiotropes au sein du SNC. Dans une étude préliminaire, nous observons que le sulfate de magnésium, à des doses

neuroprotectrices, montre très peu d'effets sur la transcription à P5. Nous supposons que la nature de son activité neuroprotectrice pourrait être révélée par une étude de transcriptomique, afin d'explorer notamment ses potentiels effets anti-inflammatoires, ce qui pourrait ouvrir la voie à son utilisation chez certains enfants nés à terme.

Intérêt des approches méthodologiques combinées.

Au cours de ces travaux de thèse, nous avons utilisé différentes stratégies regroupant une approche globale sans apriori par transcriptomique, une approche longitudinale alliant l'imagerie IRM périnatale et des études comportementales à l'âge adulte, et enfin des techniques conventionnelles immunohistochimiques et histo-enzymatiques fonctionnelles plus ciblées. Les résultats obtenus à l'aide de ces différentes techniques ne sont pas totalement superposables mais cependant très complémentaires. En effet, si la réponse transcriptomique à l'HI chez les souris de 10 jours laisse penser à un phénomène plus intense et plus durable dans le temps qu'après l'HI à 5 jours, les déficits à long terme sont observés chez les souris lésées aux deux stades. Les atteintes sont différentes mais on ne peut préjuger de leur gravité respective et conclure que l'impact à long terme est plus important chez les souris lésées à 10 jours. De plus, l'approche transcriptomique à elle seule n'aurait pas permis de confirmer une atteinte spécifique de la substance blanche. En effet, aucun terme GO ni aucun *pathway* activé à la suite de l'HI ne concerne des fonctions spécifiquement neurales.

Ces approches sont complémentaires également au regard de l'inflammation. Si l'étude immunohistochimique montre l'activation d'un processus inflammatoire aux deux âges à la suite de l'HI, l'étude des transcrits indique une cinétique et une nature de réponse inflammatoire différentes. Une étude détaillée des mécanismes de l'inflammation et de l'immunité innée devra être réalisée, prenant en compte le développement de ces voies au cours des premiers jours de vie post-natale. L'étude fonctionnelle des activités enzymatiques montre aussi une activité vasculaire du tPA et de la MMP-9 induite par l'HI alors que l'étude des transcrits ne nous a pas permis de voir cet aspect de la réponse à l'HI. Ceci n'est pas totalement surprenant du fait des nombreuses étapes de régulation existant entre l'expression du gène et l'enzyme active, notamment pour les MMPs dont l'activation passe par une action (clivage) sur le zymogène (Page-McCaw et al., 2007; Rempe et al., 2016).

Enfin, l'étude des processus pathologiques dans l'étude 1 semble nous indiquer que l'inhibition de la MMP-9 ou du tPA apparait comme une bonne piste pour la protection

vasculaire en cas d'HI. Cependant, l'étude parallèle à laquelle j'ai contribué et qui est présentée en annexe I nous indique que ces activités vasculaires participent au processus physiologique de migration vasculo-dépendante des interneurones GABAergiques pendant la même période développementale, soulignant ainsi le risque d'interférences potentielles qu'une stratégie de neuroprotection faisant appel à des inhibiteurs de protéases pourrait avoir sur le développement.

Conclusion.

Ce travail pose plus de questions qu'il n'apporte de réponses simples aux difficultés de prévention et de prise en charge des nouveau-nés à risques et porteurs de lésions cérébrales néonatales acquises. Néanmoins, il fournit une base de données disponible à tous, validée statistiquement et dans un modèle animal également bien décrit. Ceci permettra de tester globalement des approches thérapeutiques potentielles (par exemple l'usage du $MgSO_4$ chez l'enfant à terme). Ce travail ouvre également plusieurs perspectives de recherche notamment orientées vers la maturité vasculaire ou immunitaire. Enfin, il pourrait déboucher sur des modes de diagnostic (par la recherche de biomarqueurs circulant signe de souffrance vasculaire ou neurale) et de prise en charge distincts des enfants selon leur terme de naissance.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adams Waldorf, K.M., and McAdams, R.M. (2013). Influence of Infection During Pregnancy on Fetal Development. Reproduction 146, R151–R162.

Adén, U., Favrais, G., Plaisant, F., Winerdal, M., Felderhoff-Mueser, U., Lampa, J., Lelièvre, V., and Gressens, P. (2010). Systemic inflammation sensitizes the neonatal brain to excitotoxicity through a pro-/anti-inflammatory imbalance: key role of TNFalpha pathway and protection by etanercept. Brain Behav. Immun. 24, 747–758.

Adhami, F., Yu, D., Yin, W., Schloemer, A., Burns, K.A., Liao, G., Degen, J.L., Chen, J., and Kuan, C.-Y. (2008). Deleterious Effects of Plasminogen Activators in Neonatal Cerebral Hypoxia-Ischemia. The American Journal of Pathology 172, 1704–1716.

Adibhatla, R.M., and Hatcher, J.F. (2008). Tissue plasminogen activator (tPA) and matrix metalloproteinases in the pathogenesis of stroke: therapeutic strategies. CNS Neurol Disord Drug Targets 7, 243–253.

Al Ahmad, A., Taboada, C.B., Gassmann, M., and Ogunshola, O.O. (2011). Astrocytes and pericytes differentially modulate blood–brain barrier characteristics during development and hypoxic insult. J Cereb Blood Flow Metab 31, 693–705.

Al Mamun, A., Yu, H., Romana, S., and Liu, F. (2018). Inflammatory Responses are Sex Specific in Chronic Hypoxic–Ischemic Encephalopathy. Cell Transplant 27, 1328–1339.

Albertsson, A.-M., Bi, D., Duan, L., Zhang, X., Leavenworth, J.W., Qiao, L., Zhu, C., Cardell, S., Cantor, H., Hagberg, H., et al. (2014). The immune response after hypoxia-ischemia in a mouse model of preterm brain injury. Journal of Neuroinflammation 11.

Alexander, M., Garbus, H., Smith, A.L., Rosenkrantz, T.S., and Fitch, R.H. (2014). Behavioral and histological outcomes following neonatal HI injury in a preterm (P3) and term (P7) rodent model. Behavioural Brain Research 259, 85–96.

Alliot, F., Godin, I., and Pessac, B. (1999). Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. Developmental Brain Research 117, 145–152.

Althabe, F., Howson, C.P., Kinney, M., Lawn, J., and World Health Organization (2012). Born too soon: the global action report on preterm birth.

Alvarez, J.I., Katayama, T., and Prat, A. (2013). Glial influence on the Blood Brain Barrier. Glia 61, 1939–1958.

Ancel, P.-Y., Marret, S., Larroque, B., Arnaud, C., Zupan-Simunek, V., Voyer, M., Rozé, J.-C., Matis, J., Burguet, A., Ledésert, B., et al. (2005). Are maternal hypertension and small-for-gestational age risk factors for severe intraventricular hemorrhage and cystic periventricular leukomalacia? Results of the EPIPAGE cohort study. Am. J. Obstet. Gynecol. 193, 178–184.

Anderson, A.W., Marois, R., Colson, E.R., Peterson, B.S., Duncan, C.C., Ehrenkranz, R.A., Schneider, K.C., Gore, J.C., and Ment, L.R. (2001a). Neonatal auditory activation detected by functional magnetic resonance imaging. Magn Reson Imaging 19, 1–5.

Anderson, S.A., Eisenstat, D.D., Shi, L., and Rubenstein, J.L.R. (1997). Interneuron Migration from Basal Forebrain to Neocortex: Dependence on Dlx Genes. Science 278, 474–476.

Anderson, S.A., Marin, O., Horn, C., Jennings, K., and Rubenstein, J.L. (2001b). Distinct cortical migrations from the medial and lateral ganglionic eminences. Development 128, 353–363.

Andreone, B.J., Lacoste, B., and Gu, C. (2015). Neuronal and Vascular Interactions. Annual Review of Neuroscience 38, 25–46.

Ang, E.S.B.C., Haydar, T.F., Gluncic, V., and Rakic, P. (2003). Four-Dimensional Migratory Coordinates of GABAergic Interneurons in the Developing Mouse Cortex. J. Neurosci. 23, 5805–5815.

Armstrong, D.L., Sauls, C.D., and Goddard-Finegold, J. (1987). Neuropathologic findings in short-term survivors of intraventricular hemorrhage. Am. J. Dis. Child. 141, 617–621.

Armulik, A., Genové, G., Mäe, M., Nisancioglu, M.H., Wallgard, E., Niaudet, C., He, L., Norlin, J., Lindblom, P., Strittmatter, K., et al. (2010). Pericytes regulate the blood-brain barrier. Nature 468, 557–561.

Arnold, T., and Betsholtz, C. (2013). The importance of microglia in the development of the vasculature in the central nervous system. Vascular Cell 5, 4.

Arquié, C., Leroux, P., Bodenant, C., Laquerrière, A., Marpeau, L., and Marret, S. (2002). Glucocorticoid treatment in an ischaemic-like excitotoxic model of periventricular leucomalacia in mice. BJOG 109, 989–996.

Asztalos, E.V., Murphy, K.E., Willan, A.R., Matthews, S.G., Ohlsson, A., Saigal, S., Armson, B.A., Kelly, E.N., Delisle, M.-F., Gafni, A., et al. (2013). Multiple courses of antenatal corticosteroids for preterm birth study: outcomes in children at 5 years of age (MACS-5). JAMA Pediatr 167, 1102–1110.

Attwell, D., Buchan, A.M., Charpak, S., Lauritzen, M., MacVicar, B.A., and Newman, E.A. (2010). Glial and neuronal control of brain blood flow. Nature 468, 232–243.

Ayoub, A.E., Cai, T.-Q., Kaplan, R.A., and Luo, J. (2005). Developmental expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and their potential role in the histogenesis of the cerebellar cortex. J. Comp. Neurol. 481, 403–415.

Azzopardi, D., Strohm, B., Marlow, N., Brocklehurst, P., Deierl, A., Eddama, O., Goodwin, J., Halliday, H.L., Juszczak, E., Kapellou, O., et al. (2014). Effects of hypothermia for perinatal asphyxia on childhood outcomes. N. Engl. J. Med. 371, 140–149.

Baburamani, A.A., Ek, C.J., Walker, D.W., and Castillo-Melendez, M. (2012). Vulnerability of the developing brain to hypoxic-ischemic damage: contribution of the cerebral vasculature to injury and repair? Frontiers in Physiology 3.

el-Bacha, R.S., and Minn, A. (1999). Drug metabolizing enzymes in cerebrovascular endothelial cells afford a metabolic protection to the brain. Cell. Mol. Biol. (Noisy-Le-Grand) 45, 15–23.

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

Back, S.A., Luo, N.L., Borenstein, N.S., Levine, J.M., Volpe, J.J., and Kinney, H.C. (2001). Late Oligodendrocyte Progenitors Coincide with the Developmental Window of Vulnerability for Human Perinatal White Matter Injury. J. Neurosci. 21, 1302–1312.

Back, S.A., Han, B.H., Luo, N.L., Chricton, C.A., Xanthoudakis, S., Tam, J., Arvin, K.L., and Holtzman, D.M. (2002). Selective Vulnerability of Late Oligodendrocyte Progenitors to Hypoxia–Ischemia. J. Neurosci. 22, 455–463.

Back, S.A., Luo, N.L., Mallinson, R.A., O'Malley, J.P., Wallen, L.D., Frei, B., Morrow, J.D., Petito, C.K., Roberts, C.T., Murdoch, G.H., et al. (2005). Selective vulnerability of preterm white matter to oxidative damage defined by F2-isoprostanes. Annals of Neurology 58, 108–120.

Badaut, J., Ashwal, S., and Obenaus, A. (2011). Aquaporins in cerebrovascular disease: a target for treatment of brain edema? Cerebrovasc. Dis. 31, 521–531.

Baeten, K.M., and Akassoglou, K. (2011). Extracellular matrix and matrix receptors in blood-brain barrier formation and stroke. Dev Neurobiol 71, 1018–1039.

Balasubramaniam, J., Xue, M., Buist, R.J., Ivanco, T.L., Natuik, S., and Del Bigio, M.R. (2006). Persistent motor deficit following infusion of autologous blood into the periventricular region of neonatal rats. Exp. Neurol. 197, 122–132.

Baldacci, S., Gorini, F., Santoro, M., Pierini, A., Minichilli, F., and Bianchi, F. (2018). Environmental and individual exposure and the risk of congenital anomalies: a review of recent epidemiological evidence. Epidemiol Prev 42, 1–34.

Ballabh, P. (2010). Intraventricular Hemorrhage in Premature Infants: Mechanism of Disease. Pediatric Research 67, 1–8.

Ballabh, P. (2014). Pathogenesis and Prevention of Intraventricular Hemorrhage. Clinics in Perinatology 41, 47–67.

Ballabh, P., Braun, A., and Nedergaard, M. (2004a). Anatomic Analysis of Blood Vessels in Germinal Matrix, Cerebral Cortex, and White Matter in Developing Infants. Pediatric Research 56, 117–124.

Ballabh, P., Braun, A., and Nedergaard, M. (2004b). The blood–brain barrier: an overview. Neurobiology of Disease 16, 1–13.

Ballabh, P., Xu, H., Hu, F., Braun, A., Smith, K., Rivera, A., Lou, N., Ungvari, Z., Goldman, S.A., Csiszar, A., et al. (2007). Angiogenic inhibition reduces germinal matrix hemorrhage. Nature Medicine 13, 477–485.

Bandeira, F., Lent, R., and Herculano-Houzel, S. (2009). Changing numbers of neuronal and non-neuronal cells underlie postnatal brain growth in the rat. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 106, 14108–14113.

Baranes, D., Lederfein, D., Huang, Y.-Y., Chen, M., Bailey, C.H., and Kandel, E.R. (1998). Tissue Plasminogen Activator Contributes to the Late Phase of LTP and to Synaptic Growth in the Hippocampal Mossy Fiber Pathway. Neuron 21, 813–825.

Barger, N., Keiter, J., Kreutz, A., Krishnamurthy, A., Weidenthaler, C., Martínez-Cerdeño, V., Tarantal, A.F., and Noctor, S.C. (2018). Microglia: An Intrinsic Component of the Proliferative Zones in the Fetal Rhesus Monkey (Macaca mulatta) Cerebral Cortex. Cereb Cortex.

Baron, A., Montagne, A., Cassé, F., Launay, S., Maubert, E., Ali, C., and Vivien, D. (2010). NR2D-containing NMDA receptors mediate tissue plasminogen activator-promoted neuronal excitotoxicity. Cell Death & Differentiation 17, 860–871.

Barrett, R.D., Bennet, L., Davidson, J., Dean, J.M., George, S., Emerald, B.S., and Gunn, A.J. (2007). Destruction and reconstruction: Hypoxia and the developing brain. Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews 81, 163–176.

Basham, M.E., and Seeds, N.W. (2001). Plasminogen expression in the neonatal and adult mouse brain. J. Neurochem. 77, 318–325.

Baud, O., Fayol, L., Gressens, P., Pellerin, L., Magistretti, P., Evrard, P., and Verney, C. (2003). Perinatal and early postnatal changes in the expression of monocarboxylate transporters MCT1 and MCT2 in the rat forebrain. Journal of Comparative Neurology 465, 445–454.

Bax, M., Goldstein, M., Rosenbaum, P., Leviton, A., Paneth, N., Dan, B., Jacobsson, B., Damiano, D., and Executive Committee for the Definition of Cerebral Palsy (2005). Proposed definition and classification of cerebral palsy, April 2005. Dev Med Child Neurol 47, 571–576.

Bax, M., Tydeman, C., and Flodmark, O. (2006). Clinical and MRI Correlates of Cerebral Palsy: The European Cerebral Palsy Study. JAMA 296, 1602–1608.

Bear, M., Connors, B., and Paradiso, M. (2007). Neuroscience : Exploring the brain (Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins).

Bednarek, N., Clément, Y., Lelièvre, V., Olivier, P., Loron, G., Garnotel, R., and Gressens, P. (2009). Ontogeny of MMPs and TIMPs in the Murine Neocortex. Pediatric Research 65, 296–300.

Bednarek, N., Svedin, P., Garnotel, R., Favrais, G., Loron, G., Schwendiman, L., Hagberg, H., Morville, P., Mallard, C., and Gressens, P. (2012). Increased MMP-9 and TIMP-1 in mouse neonatal brain and plasma and in human neonatal plasma

after hypoxia–ischemia: a potential marker of neonatal encephalopathy. Pediatric Research 71, 63–70.

Been, J.V., Lievense, S., Zimmermann, L.J.I., Kramer, B.W., and Wolfs, T.G.A.M. (2013). Chorioamnionitis as a risk factor for necrotizing enterocolitis: a systematic review and meta-analysis. J. Pediatr. 162, 236-242.e2.

Bell, R.D., Winkler, E.A., Singh, I., Sagare, A.P., Deane, R., Wu, Z., Holtzman, D.M., Betsholtz, C., Armulik, A., Sallstrom, J., et al. (2012). Apolipoprotein E controls cerebrovascular integrity via cyclophilin A. Nature 485, 512–516.

Belovicova, K., Bogi, E., Csatlosova, K., and Dubovicky, M. (2017). Animal tests for anxiety-like and depression-like behavior in rats. Interdiscip Toxicol 10, 40–43.

Benchenane, K., Berezowski, V., Ali, C., Fernández-Monreal, M., López-Atalaya, J.P., Brillault, J., Chuquet, J., Nouvelot, A., MacKenzie, E.T., Bu, G., et al. (2005). Tissue-type plasminogen activator crosses the intact blood-brain barrier by low-density lipoprotein receptor-related protein-mediated transcytosis. Circulation 111, 2241–2249.

Berezowski, V., Landry, C., Dehouck, M.-P., Cecchelli, R., and Fenart, L. (2004). Contribution of glial cells and pericytes to the mRNA profiles of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated proteins in an in vitro model of the blood-brain barrier. Brain Res. 1018, 1–9.

Bernoud, N., Fenart, L., Bénistant, C., Pageaux, J.F., Dehouck, M.P., Molière, P., Lagarde, M., Cecchelli, R., and Lecerf, J. (1998). Astrocytes are mainly responsible for the polyunsaturated fatty acid enrichment in blood-brain barrier endothelial cells in vitro. J. Lipid Res. 39, 1816–1824.

Bertrand, T., Lesept, F., Chevilley, A., Lenoir, S., Aimable, M., Briens, A., Hommet, Y., Bardou, I., Parcq, J., and Vivien, D. (2015). Conformations of tissue plasminogen activator (tPA) orchestrate neuronal survival by a crosstalk between EGFR and NMDAR. Cell Death Dis 6, e1924.

Billiards, S.S., Haynes, R.L., Folkerth, R.D., Borenstein, N.S., Trachtenberg, F.L., Rowitch, D.H., Ligon, K.L., Volpe, J.J., and Kinney, H.C. (2008). Myelin Abnormalities without Oligodendrocyte Loss in Periventricular Leukomalacia. Brain Pathol 18, 153–163.

Biran, V., Duy, A.P., Decobert, F., Bednarek, N., Alberti, C., and Baud, O. (2014). Is melatonin ready to be used in preterm infants as a neuroprotectant? Developmental Medicine & Child Neurology 56, 717–723.

Blanquie, O., Kilb, W., Sinning, A., and Luhmann, H.J. (2017). Homeostatic interplay between electrical activity and neuronal apoptosis in the developing neocortex. Neuroscience 358, 190–200.

de Boer, A.G., and Gaillard, P.J. (2006). Blood-brain barrier dysfunction and recovery. J Neural Transm (Vienna) 113, 455–462.

Bolisetty, S., Dhawan, A., Abdel-Latif, M., Bajuk, B., Stack, J., Lui, K., and Collection, on behalf of the N.S.W. and A.C.T.N.I.C.U.D. (2014). Intraventricular Hemorrhage and Neurodevelopmental Outcomes in Extreme Preterm Infants. Pediatrics 133, 55–62.

Bouyssi-Kobar, M., Murnick, J., Brossard-Racine, M., Chang, T., Mahdi, E., Jacobs, M., and Limperopoulos, C. (2018). Altered Cerebral Perfusion in Infants Born Preterm Compared with Infants Born Full Term. The Journal of Pediatrics 193, 54-61.e2.

Boveri, M., Berezowski, V., Price, A., Slupek, S., Lenfant, A.-M., Benaud, C., Hartung, T., Cecchelli, R., Prieto, P., and Dehouck, M.-P. (2005). Induction of blood-brain barrier properties in cultured brain capillary endothelial cells: Comparison between primary glial cells and C6 cell line. Glia 51, 187–198.

Boyle, A.K., Rinaldi, S.F., Norman, J.E., and Stock, S.J. (2017). Preterm birth: Inflammation, fetal injury and treatment strategies. Journal of Reproductive Immunology 119, 62–66.

Braun, A., Xu, H., Hu, F., Kocherlakota, P., Siegel, D., Chander, P., Ungvari, Z., Csiszar, A., Nedergaard, M., and Ballabh, P. (2007). Paucity of Pericytes in Germinal Matrix Vasculature of Premature Infants. J. Neurosci. 27, 12012–12024.

Brouwer, A., Groenendaal, F., Haastert, I.-L. van, Rademaker, K., Hanlo, P., and Vries, L. de (2008). Neurodevelopmental Outcome of Preterm Infants with Severe Intraventricular Hemorrhage and Therapy for Post-Hemorrhagic Ventricular Dilatation. The Journal of Pediatrics 152, 648–654.

Buisson, A., Nicole, O., Docagne, F., Sartelet, H., Mackenzie, E.T., and Vivien, D. (1998). Up-regulation of a serine protease inhibitor in astrocytes mediates the neuroprotective activity of transforming growth factor beta1. FASEB J. 12, 1683–1691.

Bunn, H.F., and Jandl, J.H. (1968). Exchange of heme among hemoglobins and between hemoglobin and albumin. J. Biol. Chem. 243, 465–475.

Burri, P.H., Dbaly, J., and Weibel, E.R. (1973). The postnatal growth of the rat lung. I. Morphometry. The Anatomical Record 178, 711–730.

Buser, J.R., Segovia, K.N., Dean, J.M., Nelson, K., Beardsley, D., Gong, X., Luo, N.L., Ren, J., Wan, Y., Riddle, A., et al. (2010). Timing of Appearance of Late Oligodendrocyte Progenitors Coincides with Enhanced Susceptibility of Preterm Rabbit Cerebral White Matter to Hypoxia-Ischemia. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism 30, 1053–1065.

Candelario-Jalil, E., Yang, Y., and Rosenberg, G.A. (2009). Diverse roles of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in neuroinflammation and cerebral ischemia. Neuroscience 158, 983–994.

Cardoso, F.L., Brites, D., and Brito, M.A. (2010). Looking at the blood–brain barrier: Molecular anatomy and possible investigation approaches. Brain Research Reviews 64, 328–363.

Carmeliet, P. (2003). Angiogenesis in health and disease. NATURE MEDICINE 9, 8.

Carmeliet, P., and Collen, D. (1995). Role of the plasminogen/plasmin system in thrombosis, hemostasis, restenosis and atherosclerosis evaluation in transgenic animals. Trends Cardiovasc. Med. 5, 117–122.

Carmeliet, P., and Jain, R.K. (2011). Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. Nature 473, 298–307.

Carmeliet, P., and Storkebaum, E. (2002). Vascular and neuronal effects of VEGF in the nervous system: implications for neurological disorders. Semin. Cell Dev. Biol. 13, 39–53.

Carmeliet, P., and Tessier-Lavigne, M. (2005). Common mechanisms of nerve and blood vessel wiring. Nature 436, 193–200.

Carvey, P.M., Hendey, B., and Monahan, A.J. (2009). The blood-brain barrier in neurodegenerative disease: a rhetorical perspective. J. Neurochem. 111, 291–314.

Cassé, F., Bardou, I., Danglot, L., Briens, A., Montagne, A., Parcq, J., Alahari, A., Galli, T., Vivien, D., and Docagne, F. (2012). Glutamate controls tPA recycling by astrocytes, which in turn influences glutamatergic signals. J. Neurosci. 32, 5186–5199.

Chakraborti, S., Mandal, M., Das, S., Mandal, A., and Chakraborti, T. (2003). Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. Mol. Cell. Biochem. 253, 269–285.

Charriaut-Marlangue, C., Leconte, C., Csaba, Z., Chafa, L., Pansiot, J., Talatizi, M., Simon, K., Moretti, R., Marchand-Leroux, C., Baud, O., et al. (2018). Sex differences in the effects of PARP inhibition on microglial phenotypes following neonatal stroke. Brain, Behavior, and Immunity 73, 375–389.

Checchin, D., Sennlaub, F., Levavasseur, E., Leduc, M., and Chemtob, S. (2006). Potential role of microglia in retinal blood vessel formation. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 47, 3595–3602.

Chollat, C., Enser, M., Houivet, E., Provost, D., Bénichou, J., Marpeau, L., and Marret, S. (2014). School-age outcomes following a randomized controlled trial of magnesium sulfate for neuroprotection of preterm infants. J. Pediatr. 165, 398-400.e3.

Chollat, C., Le Doussal, L., de la Villéon, G., Provost, D., and Marret, S. (2017). Antenatal magnesium sulphate administration for fetal neuroprotection: a French national survey. BMC Pregnancy Childbirth 17.

Chow, M.S.M., Wu, S.L., Webb, S.E., Gluskin, K., and Yew, D.T. (2017). Functional magnetic resonance imaging and the brain: A brief review. World J Radiol 9, 5–9.

Clancy, B., Darlington, R.B., and Finlay, B.L. (2001). Translating developmental time across mammalian species. Neuroscience 105, 7–17.

Clancy, B., Kersh, B., Hyde, J., Darlington, R.B., Anand, K.J.S., and Finlay, B.L. (2007). Web-based method for translating neurodevelopment from laboratory species to humans. Neuroinformatics 5, 79–94.

Clarke, L.E., and Barres, B.A. (2013). Emerging roles of astrocytes in neural circuit development. Nat Rev Neurosci 14, 311–321.

Clément, T., Rodriguez-Grande, B., and Badaut, J. (2018). Aquaporins in brain edema. J. Neurosci. Res.

Concheiro, M., Lendoiro, E., Castro, A. de, Gónzalez-Colmenero, E., Concheiro-Guisan, A., Peñas-Silva, P., Macias-Cortiña, M., Cruz-Landeira, A., and López-Rivadulla, M. (2017). Bioanalysis for cocaine, opiates, methadone, and amphetamines exposure detection during pregnancy. Drug Testing and Analysis 9, 898–904.

Conner, E.S., Lorenzo, A.V., Welch, K., and Dorval, B. (1983). The role of intracranial hypotension in neonatal intraventricular hemorrhage. J. Neurosurg. 58, 204–209.

Crowther, C.A., Middleton, P.F., Voysey, M., Askie, L., Duley, L., Pryde, P.G., Marret, S., and Doyle, L.W. (2017). Assessing the neuroprotective benefits for babies of antenatal magnesium sulphate: An individual participant data meta-analysis. PLoS Med 14.

Cunningham, L.A., Wetzel, M., and Rosenberg, G.A. (2005). Multiple roles for MMPs and TIMPs in cerebral ischemia. Glia 50, 329–339.

Daher, I., Le Dieu-Lugon, B., Dourmap, N., Lecuyer, M., Ramet, L., Gomila, C., Ausseil, J., Marret, S., Leroux, P., Roy, V., et al. (2017). Magnesium Sulfate Prevents Neurochemical and Long-Term Behavioral Consequences of Neonatal Excitotoxic Lesions: Comparison Between Male and Female Mice. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 76, 883–897.

Daher, I., Le Dieu-Lugon, B., Lecointre, M., Dupré, N., Voisin, C., Leroux, P., Dourmap, N., Gonzalez, B.J., Marret, S., Leroux-Nicollet, I., et al. (2018). Time- and sex-dependent efficacy of magnesium sulfate to prevent behavioral impairments and cerebral damage in a mouse model of cerebral palsy. Neurobiology of Disease 120, 151–164.

Dammann, O., and Leviton, A. (1997). Maternal intrauterine infection, cytokines, and brain damage in the preterm newborn. Pediatr. Res. 42, 1–8.

Dammann, O., Ferriero, D., and Gressens, P. (2011). Neonatal Encephalopathy or Hypoxic-Ischemic Encephalopathy? Appropriate Terminology Matters. Pediatric Research 70, 1–2.

Daneman, R., Zhou, L., Agalliu, D., Cahoy, J.D., Kaushal, A., and Barres, B.A. (2010a). The Mouse Blood-Brain Barrier Transcriptome: A New Resource for Understanding the Development and Function of Brain Endothelial Cells. PLoS One 5.

Daneman, R., Zhou, L., Kebede, A.A., and Barres, B.A. (2010b). Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis. Nature 468, 562–566.

Daniel, T.O., and Abrahamson, D. (2000). Endothelial Signal Integration in Vascular Assembly. Annual Review of Physiology 62, 649–671.

Darlington, R.B., Dunlop, S.A., and Finlay, B.L. (1999). Neural development in metatherian and eutherian mammals: variation and constraint. J. Comp. Neurol. 411, 359–368.

Dekkers, M.P.J., Nikoletopoulou, V., and Barde, Y.-A. (2013). Cell biology in neuroscience: Death of developing neurons: new insights and implications for connectivity. J. Cell Biol. 203, 385–393.

Deng, W. (2010). Neurobiology of injury to the developing brain. Nature Reviews Neurology 6, 328–336.

Derrick, M., Luo, N.L., Bregman, J.C., Jilling, T., Ji, X., Fisher, K., Gladson, C.L., Beardsley, D.J., Murdoch, G., Back, S.A., et al. (2004). Preterm fetal hypoxia-ischemia causes hypertonia and motor deficits in the neonatal rabbit: a model for human cerebral palsy? J. Neurosci. 24, 24–34.

Didier, N., Romero, I.A., Créminon, C., Wijkhuisen, A., Grassi, J., and Mabondzo, A. (2003). Secretion of interleukin-1beta by astrocytes mediates endothelin-1 and tumour necrosis factor-alpha effects on human brain microvascular endothelial cell permeability. J. Neurochem. 86, 246–254.

Ding, X., Gu, R., Zhang, M., Ren, H., Shu, Q., Xu, G., and Wu, H. (2018). Microglia enhanced the angiogenesis, migration and proliferation of co-cultured RMECs. BMC Ophthalmol 18.

Djonov, V.G., Kurz, H., and Burri, P.H. (2002). Optimality in the developing vascular system: Branching remodeling by means of intussusception as an efficient adaptation mechanism. Developmental Dynamics 224, 391–402.

Docagne, F., Nicole, O., Marti, H.H., MacKenzie, E.T., Buisson, A., and Vivien, D. (1999). Transforming growth factor-beta1 as a regulator of the serpins/t-PA axis in cerebral ischemia. FASEB J. 13, 1315–1324.

Dohare, P., Zia, M.T., Ahmed, E., Ahmed, A., Yadala, V., Schober, A.L., Ortega, J.A., Kayton, R., Ungvari, Z., Mongin, A.A., et al. (2016). AMPA-Kainate Receptor Inhibition Promotes Neurologic Recovery in Premature Rabbits with Intraventricular Hemorrhage. J. Neurosci. 36, 3363–3377.

Dohgu, S., Takata, F., Matsumoto, J., Oda, M., Harada, E., Watanabe, T., Nishioku, T., Shuto, H., Yamauchi, A., and Kataoka, Y. (2011). Autocrine and paracrine up-regulation of blood–brain barrier function by plasminogen activator inhibitor-1. Microvascular Research 81, 103–107.

Doyle, L.W., Anderson, P.J., and Lee, K.J. (2015). Antenatal magnesium sulfate and outcomes for school-aged children--reply. JAMA 313, 306–307.

Driscoll, D.J.O.', Felice, V.D., Kenny, L.C., Boylan, G.B., and O'Keeffe, G.W. (2018). Mild prenatal hypoxia-ischemia leads to social deficits and central and peripheral inflammation in exposed offspring. Brain Behav. Immun. 69, 418–427.

Dudvarski Stankovic, N., Teodorczyk, M., Ploen, R., Zipp, F., and Schmidt, M.H.H. (2016). Microglia–blood vessel interactions: a double-edged sword in brain pathologies. Acta Neuropathol 131, 347–363.

Ehrlich, P. (1885). Das sauerstoff-bedürfnis des organismus. Eine Farbenanalytische Studie. Habilitation thesis, Berlin. (Berlin).

Ehrlich, P. (1906). Ueber die beziehungen von chemischer constitution, vertheilung, und pharmakologischen wirkung. (Berlin: Wiley).

Ek, C.J., Dziegielewska, K.M., Stolp, H., and Saunders, N.R. (2006). Functional effectiveness of the blood-brain barrier to small water-soluble molecules in developing and adult opossum (Monodelphis domestica). J. Comp. Neurol. 496, 13–26.

Ek, C.J., Dziegielewska, K.M., Habgood, M.D., and Saunders, N.R. (2012). Barriers in the developing brain and Neurotoxicology. Neurotoxicology 33, 586–604.

Eklind, S., Mallard, C., Arvidsson, P., and Hagberg, H. (2005). Lipopolysaccharide induces both a primary and a secondary phase of sensitization in the developing rat brain. Pediatr. Res. 58, 112–116.

Engelhardt, B. (2003). Development of the blood-brain barrier. Cell and Tissue Research 314, 119–129.

Engelhardt, B., and Liebner, S. (2014). Novel insights into the development and maintenance of the blood–brain barrier. Cell Tissue Res 355, 687–699.

Engelhardt, B., Conley, F.K., and Butcher, E.C. (1994). Cell adhesion molecules on vessels during inflammation in the mouse central nervous system. J. Neuroimmunol. 51, 199–208.

Errede, M., Girolamo, F., Rizzi, M., Bertossi, M., Roncali, L., and Virgintino, D. (2014). The contribution of CXCL12-expressing radial glia cells to neuro-vascular patterning during human cerebral cortex development. Front. Neurosci. 8.

Evrard, P., Marret, S., and Gressens, P. (1997). Environmental and genetic determinants of neural migration and postmigratory survival. Acta Paediatr Suppl 422, 20–26.

Fantin, A., Vieira, J.M., Gestri, G., Denti, L., Schwarz, Q., Prykhozhij, S., Peri, F., Wilson, S.W., and Ruhrberg, C. (2010). Tissue macrophages act as cellular chaperones for vascular anastomosis downstream of VEGF-mediated endothelial tip cell induction. Blood 116, 829–840.

Farhy-Tselnicker, I., and Allen, N.J. (2018). Astrocytes, neurons, synapses: a tripartite view on cortical circuit development. Neural Development 13.

Favrais, G., Schwendimann, L., Gressens, P., and Lelièvre, V. (2007). Cyclooxygenase-2 mediates the sensitizing effects of systemic IL-1-beta on excitotoxic brain lesions in newborn mice. Neurobiol. Dis. 25, 496–505.

Favrais, G., van de Looij, Y., Fleiss, B., Ramanantsoa, N., Bonnin, P., Stoltenburg-Didinger, G., Lacaud, A., Saliba, E., Dammann, O., Gallego, J., et al. (2011). Systemic inflammation disrupts the developmental program of white matter. Annals of Neurology 70, 550–565.

Feeney, J.F., and Watterson, R.L. (1946). The development of the vascular pattern within the walls of the central nervous system of the chick embryo. Journal of Morphology 78, 231–303.

Feng, S., Cen, J., Huang, Y., Shen, H., Yao, L., Wang, Y., and Chen, Z. (2011). Matrix Metalloproteinase-2 and -9 Secreted by Leukemic Cells Increase the Permeability of Blood-Brain Barrier by Disrupting Tight Junction Proteins. PLoS One 6.

Fenstermacher, J., Gross, P., Sposito, N., Acuff, V., Pettersen, S., and Gruber, K. (1988). Structural and functional variations in capillary systems within the brain. Ann. N. Y. Acad. Sci. 529, 21–30.

Ferguson, J.E. (2005). Mechanisms of Endothelial Differentiation in Embryonic Vasculogenesis. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 25, 2246–2254.

Fernandez-Lopez, D., Faustino, J., Daneman, R., Zhou, L., Lee, S.Y., Derugin, N., Wendland, M.F., and Vexler, Z.S. (2012). Blood-Brain Barrier Permeability Is Increased After Acute Adult Stroke But Not Neonatal Stroke in the Rat. Journal of Neuroscience 32, 9588–9600.

Fernández-Monreal, M., López-Atalaya, J.P., Benchenane, K., Cacquevel, M., Dulin, F., Le Caer, J.-P., Rossier, J., Jarrige, A.-C., MacKenzie, E.T., Colloc'h, N., et al. (2004). Arginine 260 of the Amino-terminal Domain of NR1 Subunit Is Critical for Tissue-type Plasminogen Activator-mediated Enhancement of N -Methyl-D-aspartate Receptor Signaling. Journal of Biological Chemistry 279, 50850–50856.

Fischer, H.S., Reibel, N.J., Bührer, C., and Dame, C. (2017). Prophylactic Early Erythropoietin for Neuroprotection in Preterm Infants: A Meta-analysis. Pediatrics 139, e20164317.

Fleiss, B., Nilsson, M.K.L., Blomgren, K., and Mallard, C. (2012). Neuroprotection by the histone deacetylase inhibitor trichostatin A in a model of lipopolysaccharide-sensitised neonatal hypoxic-ischaemic brain injury. J Neuroinflammation 9, 70.

Forstreuter, F., Lucius, R., and Mentlein, R. (2002). Vascular endothelial growth factor induces chemotaxis and proliferation of microglial cells. J. Neuroimmunol. 132, 93–98.

Franckx, H., Hasaerts, D., Huysentruyt, K., and Cools, F. (2018). Cranial ultrasound and neurophysiological testing to predict neurological outcome in infants born very preterm. Dev Med Child Neurol 60, 1232–1238.

Fredriksson, L., Lawrence, D.A., and Medcalf, R.L. (2017). tPA modulation of the blood-brain barrier: a unifying explanation for the pleiotropic effects of tPA in the CNS? Semin Thromb Hemost 43, 154–168.

Fuentealba, L.C., Obernier, K., and Alvarez-Buylla, A. (2012). Adult Neural Stem Cells Bridge Their Niche. Cell Stem Cell 10, 698–708.

Fukuda, S. (2004). Focal Cerebral Ischemia Induces Active Proteases That Degrade Microvascular Matrix. Stroke 35, 998–1004.

Fukuda, A.M., and Badaut, J. (2012). Aquaporin 4: a player in cerebral edema and neuroinflammation. J Neuroinflammation 9, 279.

Galatro, T.F., Holtman, I.R., Lerario, A.M., Vainchtein, I.D., Brouwer, N., Sola, P.R., Veras, M.M., Pereira, T.F., Leite, R.E.P., Möller, T., et al. (2017). Transcriptomic analysis of purified human cortical microglia reveals age-associated changes. Nature Neuroscience 20, 1162–1171.

Gano, D., Ho, M.-L., Partridge, J.C., Glass, H.C., Xu, D., Barkovich, A.J., and Ferriero, D.M. (2016). Antenatal Exposure to Magnesium Sulfate Is Associated with Reduced Cerebellar Hemorrhage in Preterm Newborns. J. Pediatr. 178, 68–74.

Gentil, B.J., Benaud, C., Delphin, C., Remy, C., Berezowski, V., Cecchelli, R., Feraud, O., Vittet, D., and Baudier, J. (2005). Specific AHNAK expression in brain endothelial cells with barrier properties. J. Cell. Physiol. 203, 362–371.

George, S., Gunn, A.J., Westgate, J.A., Brabyn, C., Guan, J., and Bennet, L. (2004). Fetal heart rate variability and brain stem injury after asphyxia in preterm fetal sheep. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 287, R925-933.

Georgiadis, P., Xu, H., Chua, C., Hu, F., Collins, L., Huynh, C., Lagamma, E.F., and Ballabh, P. (2008). Characterization of acute brain injuries and neurobehavioral profiles in a rabbit model of germinal matrix hemorrhage. Stroke 39, 3378–3388.

Gianni-Barrera, R., Trani, M., Fontanellaz, C., Heberer, M., Djonov, V., Hlushchuk, R., and Banfi, A. (2013). VEGF over-expression in skeletal muscle induces angiogenesis by intussusception rather than sprouting. Angiogenesis 16, 123–136.

Gianni-Barrera, R., Bartolomeo, M., Vollmar, B., Djonov, V., and Banfi, A. (2014). Split for the cure: VEGF, PDGF-BB and intussusception in therapeutic angiogenesis. Biochemical Society Transactions 42, 1637–1642.

Gilchrist, C., Cumberland, A., Walker, D., and Tolcos, M. (2018). Intrauterine growth restriction and development of the hippocampus: implications for learning and memory in children and adolescents. Lancet Child Adolesc Health 2, 755–764.

Gilles, F., Gressens, P., Dammann, O., and Leviton, A. (2018). Hypoxia-ischemia is not an antecedent of most preterm brain damage: the illusion of validity. Dev Med Child Neurol 60, 120–125.

Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M.F., Conway, S.J.,

Ng, L.G., Stanley, E.R., et al. (2010). Fate Mapping Analysis Reveals That Adult Microglia Derive from Primitive Macrophages. Science 330, 841–845.

Goasdoué, K., Miller, S.M., Colditz, P.B., and Björkman, S.T. (2017). Review: The blood-brain barrier; protecting the developing fetal brain. Placenta 54, 111–116.

Golden, P.L., and Pollack, G.M. (2003). Blood-brain barrier efflux transport. J Pharm Sci 92, 1739–1753.

Goldmann, E. (1913). Vitalfarbung am zentralnervensystem (Abhandl Konigl preuss Akad Wiss).

Gonzalez, F.F., and Ferriero, D.M. (2009). Neuroprotection in the Newborn Infant. Clinics in Perinatology 36, 859–880.

Gonzalez-Lozano, M.A., Klemmer, P., Gebuis, T., Hassan, C., van Nierop, P., van Kesteren, R.E., Smit, A.B., and Li, K.W. (2016). Dynamics of the mouse brain cortical synaptic proteome during postnatal brain development. Sci Rep 6, 35456.

Goulay, R., Naveau, M., Gaberel, T., Vivien, D., and Parcq, J. (2018). Optimized tPA: A non-neurotoxic fibrinolytic agent for the drainage of intracerebral hemorrhages. J. Cereb. Blood Flow Metab. 38, 1180–1189.

Gould, D.B., Phalan, F.C., Breedveld, G.J., van Mil, S.E., Smith, R.S., Schimenti, J.C., Aguglia, U., van der Knaap, M.S., Heutink, P., and John, S.W.M. (2005). Mutations in Col4a1 cause perinatal cerebral hemorrhage and porencephaly. Science 308, 1167–1171.

Graham, E.M., Burd, I., Everett, A.D., and Northington, F.J. (2016). Blood Biomarkers for Evaluation of Perinatal Encephalopathy. Front Pharmacol 7.

Graham, E.M., Everett, A.D., Delpech, J., and Northington, F.J. (2018). Blood biomarkers for evaluation of perinatal encephalopathy: state of the art. Current Opinion in Pediatrics 30, 199–203.

Gram, M., Sveinsdottir, S., Ruscher, K., Hansson, S.R., Cinthio, M., Akerström, B., and Ley, D. (2013). Hemoglobin induces inflammation after preterm intraventricular hemorrhage by methemoglobin formation. J Neuroinflammation 10, 100.

Greenberg, D.A., and Jin, K. (2005). From angiogenesis to neuropathology. Nature 438, 954–959.

Gu, X., Chen, W., Volkow, N.D., Koretsky, A.P., Du, C., and Pan, Y. (2018). Synchronized Astrocytic Ca2+ Responses in Neurovascular Coupling during Somatosensory Stimulation and for the Resting State. Cell Reports 23, 3878–3890.

Gupta, K.K., Gupta, V.K., and Shirasaka, T. (2016). An Update on Fetal Alcohol Syndrome-Pathogenesis, Risks, and Treatment. Alcohol. Clin. Exp. Res. 40, 1594–1602.

Hagberg, H., Peebles, D., and Mallard, C. (2002). Models of white matter injury: Comparison of infectious, hypoxic-ischemic, and excitotoxic insults. Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews 8, 30–38.

Hahn-Dantona, E., Ramos-DeSimone, N., Sipley, J., Nagase, H., French, D.L., and Quigley, J.P. (1999). Activation of proMMP-9 by a plasmin/MMP-3 cascade in a tumor cell model. Regulation by tissue inhibitors of metalloproteinases. Ann. N. Y. Acad. Sci. 878, 372–387.

Hamilton, N.B., Attwell, D., and Hall, C.N. (2010). Pericyte-mediated regulation of capillary diameter: a component of neurovascular coupling in health and disease. Front Neuroenergetics 2.

Haram, K., Mortensen, J.H., Magann, E.F., and Morrison, J.C. (2017). Antenatal corticosteroid treatment: factors other than lung maturation. The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine 30, 1437–1441.

Harding, J.E., and Dalziel, S.R. (2016). Re: Antenatal corticosteroids: a time for more careful scrutiny of the indications?: The most reliable evidence is reassuring. BJOG 123, 1707–1708.

Harding, D., Brull, D., Humphries, S.E., Whitelaw, A., Montgomery, H., and Marlow, N. (2005). Variation in the interleukin-6 gene is associated with impaired cognitive development in children born prematurely: a preliminary study. Pediatr. Res. 58, 117–120.

Harding, D.R., Dhamrait, S., Whitelaw, A., Humphries, S.E., Marlow, N., and Montgomery, H.E. (2004). Does interleukin-6 genotype influence cerebral injury or developmental progress after preterm birth? Pediatrics 114, 941–947.

Hasan, S.U., Potenziano, J., Konduri, G.G., Perez, J.A., Van Meurs, K.P., Walker, M.W., Yoder, B.A., and Newborns Treated With Nitric Oxide (NEWNO) Trial Group (2017). Effect of Inhaled Nitric Oxide on Survival Without Bronchopulmonary Dysplasia in Preterm Infants: A Randomized Clinical Trial. JAMA Pediatr 171, 1081–1089.

Hawkins, B.T., and Davis, T.P. (2005). The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. Pharmacol. Rev. 57, 173–185.

Hawkins, B.T., and Egleton, R.D. (2006). Fluorescence imaging of blood–brain barrier disruption. Journal of Neuroscience Methods 151, 262–267.

Haynes, R.L., Folkerth, R.D., Keefe, R.J., Sung, I., Swzeda, L.I., Rosenberg, P.A., Volpe, J.J., and Kinney, H.C. (2003). Nitrosative and oxidative injury to premyelinating oligodendrocytes in periventricular leukomalacia. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 62, 441–450.

Haynes, R.L., Baud, O., Li, J., Kinney, H.C., Volpe, J.J., and Folkerth, R.D. (2005). Oxidative and Nitrative Injury in Periventricular Leukomalacia: A Review. Brain Pathology 15, 225–233.

Haynes, R.L., Folkerth, R.D., Trachtenberg, F.L., Volpe, J.J., and Kinney, H.C. (2009). Nitrosative stress and inducible nitric oxide synthase expression in periventricular leukomalacia. Acta Neuropathol 118, 391–399.

Heineking, B., Riebel, T., Scheer, I., Kulozik, A., Hoehn, T., and Bührer, C. (2003). Intraventricular hemorrhage in a full-term neonate associated with sinus venous thrombosis and homozygosity for the plasminogen activator inhibitor-1 4G/4G polymorphism. Pediatrics International 45, 93–96.

Heinke, J., Patterson, C., and Moser, M. (2012). Life is a pattern: vascular assembly within the embryo. Front Biosci (Elite Ed) 4, 2269–2288.

Hellström, M., Kalén, M., Lindahl, P., Abramsson, A., and Betsholtz, C. (1999). Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. Development 126, 3047–3055.

Henderson, S.J., Weitz, J.I., and Kim, P.Y. (2018). Fibrinolysis: strategies to enhance the treatment of acute ischemic stroke. J. Thromb. Haemost.

Hennebert, O., Marret, S., Carmeliet, P., Gressens, P., Laquerrière, A., and Leroux, P. (2004). Role of tissue-derived plasminogen activator (t-PA) in an excitotoxic mouse model of neonatal white matter lesions. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 63, 53–63.

Hennebert, O., Laudenbach, V., Laquerriere, A., Verney, C., Carmeliet, P., Marret, S., and Leroux, P. (2005). Ontogenic study of the influence of tissue plasminogen activator (t-PA) in neonatal excitotoxic brain insult and the subsequent microglia/macrophage activation. Neuroscience 130, 697–712.

Henry, V.J., Lecointre, M., Laudenbach, V., Ali, C., Macrez, R., Jullienne, A., Berezowski, V., Carmeliet, P., Vivien, D., Marret, S., et al. (2013). High t-PA release by neonate brain microvascular endothelial cells under glutamate exposure affects neuronal fate. Neurobiology of Disease 50, 201–208.

Hino, H., Akiyama, H., Iseki, E., Kato, M., Kondo, H., Ikeda, K., and Kosaka, K. (2001). Immunohistochemical localization of plasminogen activator inhibitor-1 in rat and

human brain tissues. Neurosci. Lett. 297, 105–108.

Hirschberger, R.G., Kuban, K.C.K., O'Shea, T.M., Joseph, R.M., Heeren, T., Douglass, L.M., Stafstrom, C.E., Jara, H., Frazier, J.A., Hirtz, D., et al. (2018). Co-occurrence and Severity of Neurodevelopmental Burden (Cognitive Impairment, Cerebral Palsy, Autism Spectrum Disorder, and Epilepsy) at Age Ten Years in Children Born Extremely Preterm. Pediatr. Neurol. 79, 45–52.

Husson, I., Mesplès, B., Bac, P., Vamecq, J., Evrard, P., and Gressens, P. (2002). Melatoninergic neuroprotection of the murine periventricular white matter against neonatal excitotoxic challenge. Ann. Neurol. 51, 82–92.

Ikeda, T., Mishima, K., Yoshikawa, T., Iwasaki, K., Fujiwara, M., Xia, Y.X., and Ikenoue, T. (2001). Selective and long-term learning impairment following neonatal hypoxic-ischemic brain insult in rats. Behav. Brain Res. 118, 17–25.

Iliff, J.J., Wang, M., Liao, Y., Plogg, B.A., Peng, W., Gundersen, G.A., Benveniste, H., Vates, G.E., Deane, R., Goldman, S.A., et al. (2012). A Paravascular Pathway Facilitates CSF Flow Through the Brain Parenchyma and the Clearance of Interstitial Solutes, Including Amyloid. Science Translational Medicine 4, 147ra111-147ra111.

Inder, T., Neil, J., Yoder, B., and Rees, S. (2005). Patterns of cerebral injury in a primate model of preterm birth and neonatal intensive care. J. Child Neurol. 20, 965–967.

Isaacs, E.B., Lucas, A., Chong, W.K., Wood, S.J., Johnson, C.L., Marshall, C., Vargha-Khadem, F., and Gadian, D.G. (2000). Hippocampal volume and everyday memory in children of very low birth weight. Pediatr. Res. 47, 713–720.

Itoh, Y., and Suzuki, N. (2012). Control of brain capillary blood flow. J. Cereb. Blood Flow Metab. 32, 1167–1176.

Janzer, R.C., and Raff, M.C. (1987). Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. Nature 325, 253–257.

Jiang, X., and Nardelli, J. (2016). Cellular and molecular introduction to brain development. Neurobiology of Disease 92, 3–17.

Jiang, Y., Fan, X., Yu, Z., Cheng, C., Wang, X.-S., Lo, E.H., Sun, X., and Wang, X. (2015). Low dose tPA plus annexin A2 combination attenuates tPA delayed treatment- associated hemorrhage and improves recovery in rat embolic focal stroke. Neuroscience Letters 602, 73–78.

Jin, R., Yang, G., and Li, G. (2010). Molecular insights and therapeutic targets for blood–brain barrier disruption in ischemic stroke: Critical role of matrix metalloproteinases and tissue-type plasminogen activator. Neurobiology of Disease 38, 376–385.

Johnson, S., Waheed, G., Manktelow, B.N., Field, D.J., Marlow, N., Draper, E.S., and Boyle, E.M. (2018). Differentiating the Preterm Phenotype: Distinct Profiles of Cognitive and Behavioral Development Following Late and Moderately Preterm Birth. J. Pediatr. 193, 85-92.e1.

Johnston, M.V. (2005). Excitotoxicity in Perinatal Brain Injury. Brain Pathology 15, 234–240.

Johnston, M.V. (2009). Plasticity in the developing brain: implications for rehabilitation. Dev Disabil Res Rev 15, 94–101.

Joyce, T., and Huecker, M.R. (2018). Pediatric Abusive Head Trauma (Shaken Baby Syndrome). In StatPearls, (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing), p.

Jullienne, A., Montagne, A., Orset, C., Lesept, F., Jane, D.E., Monaghan, D.T., Maubert, E., Vivien, D., and Ali, C. (2011). Selective inhibition of GluN2D-containing N-methyl-D-aspartate receptors prevents tissue plasminogen activator-promoted neurotoxicity both in vitro and in vivo. Molecular Neurodegeneration 6, 68.

Kahle, K.T., Simard, J.M., Staley, K.J., Nahed, B.V., Jones, P.S., and Sun, D. (2009). Molecular

mechanisms of ischemic cerebral edema: role of electroneutral ion transport. Physiology (Bethesda) 24, 257–265.

Kang, S.W., Choi, S.-K., Park, E., Chae, S.-J., Choi, S., Jin Joo, H., Lee, G.-J., and Park, H.-K. (2011). Neuroprotective effects of magnesium-sulfate on ischemic injury mediated by modulating the release of glutamate and reduced of hyperreperfusion. Brain Research 1371, 121–128.

Kaur, C., and Ling, E.A. (2009). Periventricular white matter damage in the hypoxic neonatal brain: Role of microglial cells. Progress in Neurobiology 87, 264–280.

Kaur, C., Sivakumar, V., Ang, L.S., and Sundaresan, A. (2006). Hypoxic damage to the periventricular white matter in neonatal brain: role of vascular endothelial growth factor, nitric oxide and excitotoxicity. J. Neurochem. 98, 1200–1216.

Kaur, C., Rathnasamy, G., and Ling, E.-A. (2017). Biology of Microglia in the Developing Brain. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 76, 736–753.

Kesler, S.R., Ment, L.R., Vohr, B., Pajot, S.K., Schneider, K.C., Katz, K.H., Ebbitt, T.B., Duncan, C.C., Makuch, R.W., and Reiss, A.L. (2004). Volumetric Analysis of Regional Cerebral Development in Preterm Children. Pediatr Neurol 31, 318–325.

Khwaja, O., and Volpe, J.J. (2008). Pathogenesis of cerebral white matter injury of prematurity. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed 93, F153–F161.

Kimura, A., Sakurai, T., Yoshikura, N., Koumura, A., Hayashi, Y., Ohtaki, H., Chousa, M., Seishima, M., and Inuzuka, T. (2015). Identification of target antigens of antiendothelial cell antibodies against human brain microvascular endothelial cells in healthy subjects. Curr Neurovasc Res 12, 25–30.

Kostović, I., Kostović-Srzentić, M., Benjak, V., Jovanov-Milošević, N., and Radoš, M. (2014). Developmental Dynamics of Radial Vulnerability in the Cerebral Compartments in Preterm Infants and Neonates. Front. Neurol. 5.

Kozberg, M.G., Chen, B.R., DeLeo, S.E., Bouchard, M.B., and Hillman, E.M.C. (2013). Resolving the transition from negative to positive blood oxygen level-dependent responses in the developing brain. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 110, 4380–4385.

Kratzer, I., Chip, S., and Vexler, Z.S. (2014). Barrier mechanisms in neonatal stroke. Front Neurosci 8.

Kruse, M., Michelsen, S.I., Flachs, E.M., Brønnum-Hansen, H., Madsen, M., and Uldall, P. (2009). Lifetime costs of cerebral palsy. Developmental Medicine & Child Neurology 51, 622–628.

Kułak, W., Okurowska-Zawada, B., Sienkiewicz, D., Paszko-Patej, G., and Krajewska-Kułak, E. (2010). Risk factors for cerebral palsy in term birth infants. Adv Med Sci 55, 216–221.

Kumar, S., and Bandyopadhyay, U. (2005). Free heme toxicity and its detoxification systems in human. Toxicol. Lett. 157, 175–188.

Kusuhara, H., and Sugiyama, Y. (2005). Active efflux across the blood-brain barrier: role of the solute carrier family. NeuroRx 2, 73–85.

Kwaan, H.C., Wang, J., and Weiss, I. (2004). Expression of receptors for plasminogen activators on endothelial cell surface depends on their origin. J. Thromb. Haemost. 2, 306–312.

Labeyrie, P.-E., Goulay, R., Lizarrondo, S.M. de, Hébert, M., Gauberti, M., Maubert, E., Delaunay, B., Gory, B., Signorelli, F., Turjman, F., et al. (2017). Vascular Tissue-Type Plasminogen Activator Promotes Intracranial Aneurysm Formation. Stroke 48, 2574–2582.

Laclef, C., and Métin, C. (2018). Conserved rules in embryonic development of cortical interneurons. Seminars in Cell & Developmental Biology 76, 86–100.

Lacoste, B., Comin, C.H., Ben-Zvi, A., Kaeser, P.S., Xu, X., Costa, L. da F., and Gu, C. (2014).

Sensory-related neural activity regulates the structure of vascular networks in the cerebral cortex. Neuron 83, 1117–1130.

Larrivée, B., Freitas, C., Suchting, S., Brunet, I., and Eichmann, A. (2009). Guidance of vascular development: lessons from the nervous system. Circ. Res. 104, 428–441.

Larroque, B., Marret, S., Ancel, P.-Y., Arnaud, C., Marpeau, L., Supernant, K., Pierrat, V., Rozé, J.-C., Matis, J., Cambonie, G., et al. (2003). White matter damage and intraventricular hemorrhage in very preterm infants: the EPIPAGE study. J. Pediatr. 143, 477–483.

Lawn, J.E., Cousens, S., Zupan, J., and Lancet Neonatal Survival Steering Team (2005). 4 million neonatal deaths: when? Where? Why? Lancet 365, 891–900.

Lecointre, M., Hauchecorne, M., Chaussivert, A., Marret, S., Leroux, P., Jegou, S., Leroux-Nicollet, I., Gonzalez, B.J., and Henry, V.J. (2014). The efficiency of glutamate uptake differs between neonatal and adult cortical microvascular endothelial cells. J. Cereb. Blood Flow Metab. 34, 764–767.

Lee, Y.A. (2017). White Matter Injury of Prematurity: Its Mechanisms and Clinical Features. J Pathol Transl Med 51, 449–455.

Lee, H.S., and McCarty, J.H. (2014). Inducible gene deletion in glial cells to study angiogenesis in the central nervous system. Methods Mol. Biol. 1135, 261–274.

Lee, G.S., Filipovic, N., Miele, L.F., Lin, M., Simpson, D.C., Giney, B., Konerding, M.A., Tsuda, A., and Mentzer, S.J. (2010). Blood flow shapes intravascular pillar geometry in the chick chorioallantoic membrane. Journal of Angiogenesis Research 2, 11.

Lee, S.-R., Kim, H.-Y., Rogowska, J., Zhao, B.-Q., Bhide, P., Parent, J.M., and Lo, E.H. (2006a). Involvement of matrix metalloproteinase in neuroblast cell migration from the subventricular zone after stroke. J. Neurosci. 26, 3491–3495.

Lee, S.-W., Kim, W.J., Park, J.A., Choi, Y.K., Kwon, Y.-W., and Kim, K.-W. (2006b). Blood-brain barrier interfaces and brain tumors. Arch. Pharm. Res. 29, 265–275.

Legros, H., Launay, S., Roussel, B.D., Marcou-Labarre, A., Calbo, S., Catteau, J., Leroux, P., Boyer, O., Ali, C., Marret, S., et al. (2009). Newborn- and Adult-Derived Brain Microvascular Endothelial Cells Show Age-Related Differences in Phenotype and Glutamate-Evoked Protease Release. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism 29, 1146–1158.

Lekic, T., Manaenko, A., Rolland, W., Krafft, P.R., Peters, R., Hartman, R.E., Altay, O., Tang, J., and Zhang, J.H. (2012). Rodent neonatal germinal matrix hemorrhage mimics the human brain injury, neurological consequences, and post-hemorrhagic hydrocephalus. Exp Neurol 236, 69–78.

Lekic, T., Klebe, D., Poblete, R., Krafft, P., Rolland, W., Tang, J., and Zhang, J. (2015). Neonatal Brain Hemorrhage (NBH) of Prematurity: Translational Mechanisms of the Vascular-Neural Network. Current Medicinal Chemistry 22, 1214–1238.

Leonetti, C., Macrez, R., Pruvost, M., Hommet, Y., Bronsard, J., Fournier, A., Perrigault, M., Machin, I., Vivien, D., Clemente, D., et al. (2017). Tissue-type plasminogen activator exerts EGF-like chemokinetic effects on oligodendrocytes in white matter (re)myelination. Molecular Neurodegeneration 12.

Leroux, P., Omouendze, P.L., Roy, V., Dourmap, N., Gonzalez, B.J., Brasse-Lagnel, C., Carmeliet, P., Leroux-Nicollet, I., and Marret, S. (2014). Age-Dependent Neonatal Intracerebral Hemorrhage in Plasminogen Activator Inhibitor 1 Knockout Mice. Journal of Neuropathology & Experimental Neurology 73, 387–402.

Letinic, K., Zoncu, R., and Rakic, P. (2002). Origin of GABAergic neurons in the human neocortex. Nature 417, 645–649.

Ley, D., Romantsik, O., Vallius, S., Sveinsdóttir, K., Sveinsdóttir, S., Agyemang, A.A.,

Baumgarten, M., Mörgelin, M., Lutay, N., Bruschettini, M., et al. (2016). High Presence of Extracellular Hemoglobin in the Periventricular White Matter Following Preterm Intraventricular Hemorrhage. Frontiers in Physiology 7.

Li, F., Lan, Y., Wang, Y., Wang, J., Yang, G., Meng, F., Han, H., Meng, A., Wang, Y., and Yang, X. (2011). Endothelial Smad4 maintains cerebrovascular integrity by activating N-cadherin through cooperation with Notch. Dev. Cell 20, 291–302.

Li, J., Baud, O., Vartanian, T., Volpe, J.J., and Rosenberg, P.A. (2005). Peroxynitrite generated by inducible nitric oxide synthase and NADPH oxidase mediates microglial toxicity to oligodendrocytes. Proc Natl Acad Sci U S A 102, 9936–9941.

Li, J., Radhika Ramenaden, E., Peng, J., Koito, H., Volpe, J.J., and Rosenberg, P.A. (2008). TNFα Mediates LPS-Induced Microglial Toxicity to Developing Oligodendrocytes When Astrocytes Are Present. J Neurosci 28, 5321–5330.

Licht, T., and Keshet, E. (2015). The vascular niche in adult neurogenesis. Mech. Dev. 138 Pt 1, 56–62.

Lijnen, H.R. (2001). Role of the fibrinolytic and matrix metalloproteinase systems in arterial neointima formation after vascular injury. Verh. K. Acad. Geneeskd. Belg. 63, 605–622.

Lin, E.P., Miles, L., Hughes, E.A., McCann, J.C., Vorhees, C.V., McAuliffe, J.J., and Loepke, A.W. (2014). A combination of mild hypothermia and sevoflurane affords long-term protection in a modified neonatal mouse model of cerebral hypoxia-ischemia. Anesth. Analg. 119, 1158–1173.

Lipton, S.A., and Rosenberg, P.A. (1994). Excitatory Amino Acids as a Final Common Pathway for Neurologic Disorders. New England Journal of Medicine 330, 613–622.

Liu, Y. fei, Zhang, Y., Dai, D., and Xu, Z. (2014). Expression of NF-κB, MCP-1 and MMP-9 in a Cerebral Aneurysm Rabbit Model. Can J Neurol Sci 41, 200–205.

Loeliger, M., Inder, T., Cain, S., Ramesh, R.C., Camm, E., Thomson, M.A., Coalson, J., and Rees, S.M. (2006). Cerebral outcomes in a preterm baboon model of early versus delayed nasal continuous positive airway pressure. Pediatrics 118, 1640–1653.

Lorenzl, S., Albers, D.S., Narr, S., Chirichigno, J., and Beal, M.F. (2002). Expression of MMP-2, MMP-9, and MMP-1 and Their Endogenous Counterregulators TIMP-1 and TIMP-2 in Postmortem Brain Tissue of Parkinson's Disease. Experimental Neurology 178, 13–20.

Lossi, L., and Merighi, A. (2003). In vivo cellular and molecular mechanisms of neuronal apoptosis in the mammalian CNS. Prog. Neurobiol. 69, 287–312.

Louessard, M., Lacroix, A., Martineau, M., Mondielli, G., Montagne, A., Lesept, F., Lambolez, B., Cauli, B., Mothet, J.-P., Vivien, D., et al. (2016). Tissue Plasminogen Activator Expression Is Restricted to Subsets of Excitatory Pyramidal Glutamatergic Neurons. Mol. Neurobiol. 53, 5000–5012.

Luo, J. (2005). The role of matrix metalloproteinases in the morphogenesis of the cerebellar cortex. Cerebellum 4, 239–245.

Luoto, S., and Rantala, M.J. (2018). On estrogenic masculinization of the human brain and behavior. Hormones and Behavior 97, 1–2.

Lynch, D.R., and Guttmann, R.P. (2002). Excitotoxicity: Perspectives Based onN-Methyl-d-Aspartate Receptor Subtypes. J Pharmacol Exp Ther 300, 717–723.

Ma, S., Kwon, H.J., Johng, H., Zang, K., and Huang, Z. (2013). Radial glial neural progenitors regulate nascent brain vascular network stabilization via inhibition of Wnt signaling. PLoS Biol. 11, e1001469.

Macdonald, J.A., Murugesan, N., and Pachter, J.S. (2009). Endothelial cell heterogeneity of

blood-brain barrier gene expression along the cerebral microvasculature. Journal of Neuroscience Research NA-NA.

Madzwamuse, S.E., Baumann, N., Jaekel, J., Bartmann, P., and Wolke, D. (2015). Neuro-cognitive performance of very preterm or very low birth weight adults at 26 years. Journal of Child Psychology and Psychiatry 56, 857–864.

Makanya, A.N., Stauffer, D., Ribatti, D., Burri, P.H., and Djonov, V. (2005). Microvascular growth, development, and remodeling in the embryonic avian kidney: The interplay between sprouting and intussusceptive angiogenic mechanisms. Microscopy Research and Technique 66, 275–288.

Mallard, C., and Vexler, Z. (2015). Modeling ischemia in the immature brain: how translational are animal models? Stroke 46, 3006–3011.

Mallard, C., Welin, A.-K., Peebles, D., Hagberg, H., and Kjellmer, I. (2003). White matter injury following systemic endotoxemia or asphyxia in the fetal sheep. Neurochem. Res. 28, 215–223.

Mallard, C., Ek, C.J., and Vexler, Z.S. (2018). The myth of the immature barrier systems in the developing brain: role in perinatal brain injury. The Journal of Physiology 596, 5655–5664.

Mallard, E.C., Rees, S., Stringer, M., Cock, M.L., and Harding, R. (1998). Effects of chronic placental insufficiency on brain development in fetal sheep. Pediatr. Res. 43, 262–270.

Marín-Padilla, M. (1997). Developmental neuropathology and impact of perinatal brain damage. II: white matter lesions of the neocortex. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 56, 219–235.

Marín-Padilla, M. (2012). The human brain intracerebral microvascular system: development and structure. Front Neuroanat 6.

Marret, S., Gressens, P., Gadisseux, J.F., and Evrard, P. (1995a). Prevention by magnesium of excitotoxic neuronal death in the developing brain: an animal model for clinical intervention studies. Dev Med Child Neurol 37, 473–484.

Marret, S., Mukendi, R., Gadisseux, J.F., Gressens, P., and Evrard, P. (1995b). Effect of ibotenate on brain development: an excitotoxic mouse model of microgyria and posthypoxic-like lesions. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 54, 358–370.

Marret, S., Foix-l'Hélias, L., Ancel, P.-Y., Kaminski, M., Larroque, B., Marcou-Labarre, A., and Laudenbach, V. (2008). Est-il possible de protéger le cerveau de l'enfant né prématuré et de diminuer le taux de séquelles neuro-développementales ? Archives de Pédiatrie 15, S31–S41.

Matsuzaki, F., and Shitamukai, A. (2015). Cell Division Modes and Cleavage Planes of Neural Progenitors during Mammalian Cortical Development. Cold Spring Harb Perspect Biol 7, a015719.

McCarthy, M.M. (2016). Sex differences in the developing brain as a source of inherent risk. Dialogues Clin Neurosci 18, 361–372.

McCarthy, M.M., Nugent, B.M., and Lenz, K.M. (2017). Neuroimmunology and neuroepigenetics in the establishment of sex differences in the brain. Nature Reviews Neuroscience 18, 471–484.

McColl, B.W., Rothwell, N.J., and Allan, S.M. (2008). Systemic inflammation alters the kinetics of cerebrovascular tight junction disruption after experimental stroke in mice. J. Neurosci. 28, 9451–9462.

McEwen, B.S., and Milner, T.A. (2017). Understanding the Broad Influence of Sex Hormones and Sex Differences in the Brain. J Neurosci Res 95, 24–39.

McQuillen, P.S., and Ferriero, D.M. (2004). Selective vulnerability in the developing central nervous system. Pediatric Neurology 30, 227–235.

Mesplès, B., Plaisant, F., Fontaine, R., and Gressens, P. (2005). Pathophysiology of neonatal brain lesions: Lessons from animal models of

excitotoxicity: Cytokines and neonatal brain lesions. Acta Paediatrica 94, 185–190.

Michinaga, S., and Koyama, Y. (2015). Pathogenesis of Brain Edema and Investigation into Anti-Edema Drugs. International Journal of Molecular Sciences 16, 9949–9975.

Miller, F.D., and Gauthier, A.S. (2007). Timing is everything: making neurons versus glia in the developing cortex. Neuron 54, 357–369.

Miller, S.L., Wallace, E.M., and Walker, D.W. (2012). Antioxidant Therapies: A Potential Role in Perinatal Medicine. NEN 96, 13–23.

Mirza, M.A., Ritzel, R., Xu, Y., McCullough, L.D., and Liu, F. (2015). Sexually dimorphic outcomes and inflammatory responses in hypoxic-ischemic encephalopathy. Journal of Neuroinflammation 12, 32.

Miyoshi, G., and Fishell, G. (2011). GABAergic Interneuron Lineages Selectively Sort into Specific Cortical Layers during Early Postnatal Development. Cereb Cortex 21, 845–852.

Miyoshi, G., Hjerling-Leffler, J., Karayannis, T., Sousa, V.H., Butt, S.J.B., Battiste, J., Johnson, J.E., Machold, R.P., and Fishell, G. (2010). Genetic fate mapping reveals that the caudal ganglionic eminence produces a large and diverse population of superficial cortical interneurons. J. Neurosci. 30, 1582–1594.

Molyneaux, B.J., Arlotta, P., Menezes, J.R.L., and Macklis, J.D. (2007). Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. Nature Reviews Neuroscience 8, 427–437.

Moretti, R., Pansiot, J., Bettati, D., Strazielle, N., Ghersi-Egea, J.-F., Damante, G., Fleiss, B., Titomanlio, L., and Gressens, P. (2015). Blood-brain barrier dysfunction in disorders of the developing brain. Front Neurosci 9.

Morris, C. (2007). Definition and classification of cerebral palsy: a historical perspective. Dev Med Child Neurol Suppl 109, 3–7.

Moser, E.I., Moser, M.-B., and McNaughton, B.L. (2017). Spatial representation in the hippocampal formation: a history. Nat. Neurosci. 20, 1448–1464.

Moster, D., Lie, R.T., and Markestad, T. (2008). Long-term medical and social consequences of preterm birth. N. Engl. J. Med. 359, 262–273.

Motta-Mena, N.V., and Puts, D.A. (2017). Endocrinology of human female sexuality, mating, and reproductive behavior. Horm Behav 91, 19–35.

Murugan, M., Sivakumar, V., Lu, J., Ling, E.-A., and Kaur, C. (2011). Expression of N-methyl D-aspartate receptor subunits in amoeboid microglia mediates production of nitric oxide via NF-κB signaling pathway and oligodendrocyte cell death in hypoxic postnatal rats. Glia 59, 521–539.

Nadarasa, J., Deck, C., Meyer, F., Willinger, R., and Raul, J.-S. (2014). Update on injury mechanisms in abusive head trauma - shaken baby syndrome. Pediatr Radiol 44, 565–570.

Nagase, H., Visse, R., and Murphy, G. (2006). Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. Cardiovasc. Res. 69, 562–573.

Narboux-Nême, N., and Wassef, M. (2003). [Origin of GABAergic cortical interneurons in mice and humans]. Med Sci (Paris) 19, 408–411.

Natalucci, G., Latal, B., Koller, B., Rüegger, C., Sick, B., Held, L., Bucher, H.U., Fauchère, J.-C., and Swiss EPO Neuroprotection Trial Group (2016). Effect of Early Prophylactic High-Dose Recombinant Human Erythropoietin in Very Preterm Infants on Neurodevelopmental Outcome at 2 Years: A Randomized Clinical Trial. JAMA 315, 2079–2085.

Netto, C.A., Sanches, E., Odorcyk, F.K., Duran-Carabali, L.E., and Weis, S.N. (2017). Sex-dependent consequences of neonatal brain hypoxia-ischemia in the rat. Journal of Neuroscience Research 95, 409–421.

Nicole, O., Docagne, F., Ali, C., Margaill, I., Carmeliet, P., MacKenzie, E.T., Vivien, D., and Buisson, A. (2001). The proteolytic activity of

tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling. Nat. Med. 7, 59–64.

Nishioku, T., Matsumoto, J., Dohgu, S., Sumi, N., Miyao, K., Takata, F., Shuto, H., Yamauchi, A., and Kataoka, Y. (2010). Tumor Necrosis Factor-α Mediates the Blood–Brain Barrier Dysfunction Induced by Activated Microglia in Mouse Brain Microvascular Endothelial Cells. Journal of Pharmacological Sciences 112, 251–254.

Novak, C.M., Ozen, M., and Burd, I. (2018a). Perinatal Brain Injury: Mechanisms, Prevention, and Outcomes. Clinics in Perinatology 45, 357–375.

Novak, C.M., Eke, A.C., Ozen, M., Burd, I., and Graham, E.M. (2018b). Risk Factors for Neonatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy in the Absence of Sentinel Events. Am J Perinatol.

Nykjaer, A., Petersen, C.M., Møller, B., Jensen, P.H., Moestrup, S.K., Holtet, T.L., Etzerodt, M., Thøgersen, H.C., Munch, M., and Andreasen, P.A. (1992). Purified alpha 2-macroglobulin receptor/LDL receptor-related protein binds urokinase.plasminogen activator inhibitor type-1 complex. Evidence that the alpha 2-macroglobulin receptor mediates cellular degradation of urokinase receptor-bound complexes. J. Biol. Chem. 267, 14543–14546.

Obiang, P., Macrez, R., Jullienne, A., Bertrand, T., Lesept, F., Ali, C., Maubert, E., Vivien, D., and Agin, V. (2012). GluN2D subunit-containing NMDA receptors control tissue plasminogen activator-mediated spatial memory. J. Neurosci. 32, 12726–12734.

Ohtaka-Maruyama, C., and Okado, H. (2015). Molecular Pathways Underlying Projection Neuron Production and Migration during Cerebral Cortical Development. Frontiers in Neuroscience 9.

Oliveira, T.A., Bersusa, A.A.S., Santos, T.F.D., Aquino, M.M.A. de, and Mariani Neto, C. (2016). Perinatal Outcomes in Pregnant Women Users of Illegal Drugs. Rev Bras Ginecol Obstet 38, 183–188.

Olney, J.W. (1986). Inciting excitotoxic cytocide among central neurons. Adv. Exp. Med. Biol. 203, 631–645.

Olsen, I.E., Lawson, M.L., Ferguson, A.N., Cantrell, R., Grabich, S.C., Zemel, B.S., and Clark, R.H. (2015). BMI Curves for Preterm Infants. PEDIATRICS 135, e572–e581.

Omouendze, P.L., Henry, V.J., Porte, B., Dupré, N., Carmeliet, P., Gonzalez, B.J., Marret, S., and Leroux, P. (2013). Hypoxia-Ischemia or Excitotoxin-Induced Tissue Plasminogen Activator- Dependent Gelatinase Activation in Mice Neonate Brain Microvessels. PLoS ONE 8, e71263.

Ordyan, N.E., Akulova, V.K., Mironova, V.I., and Otellin, V.A. (2017). Behavior Disorders Caused by Perinatal Hypoxia in Juvenile Rats and Their Correction with GABA Derivative. Bull. Exp. Biol. Med. 164, 118–122.

Orre, M., Kamphuis, W., Osborn, L.M., Melief, J., Kooijman, L., Huitinga, I., Klooster, J., Bossers, K., and Hol, E.M. (2014). Acute isolation and transcriptome characterization of cortical astrocytes and microglia from young and aged mice. Neurobiol. Aging 35, 1–14.

Orrock, J.E., Panchapakesan, K., Vezina, G., Chang, T., Harris, K., Wang, Y., Knoblach, S., and Massaro, A.N. (2016). Association of Brain Injury and Neonatal Cytokine Response during Therapeutic Hypothermia (TH) in Newborns with Hypoxic-Ischemic Encephalopathy (HIE). Pediatr Res 79, 742–747.

O'Shea, M. (2008). Cerebral palsy. Semin. Perinatol. 32, 35–41.

O'shea, T.M., and Doyle, L.W. (2001). Perinatal glucocorticoid therapy and neurodevelopmental outcome: an epidemiologic perspective. Seminars in Neonatology 6, 293–307.

Oskoui, M., Coutinho, F., Dykeman, J., Jetté, N., and Pringsheim, T. (2013). An update on the prevalence of cerebral palsy: a systematic review and meta-analysis. Developmental Medicine & Child Neurology 55, 509–519.

Ouzzine, M., Gulberti, S., Ramalanjaona, N., Magdalou, J., and Fournel-Gigleux, S. (2014). The UDP-glucuronosyltransferases of the blood-brain barrier: their role in drug metabolism and detoxication. Front Cell Neurosci 8, 349.

Page-McCaw, A., Ewald, A.J., and Werb, Z. (2007). Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. Nat Rev Mol Cell Biol 8, 221–233.

Palma, C.D., Goulay, R., Chagnot, S., Lizarrondo, S.M.D., Anfray, A., Salaun, J.-P., Maubert, E., Lechapt-Zalcman, E., Andreiuolo, F., Gakuba, C., et al. (2018). Cerebrospinal fluid flow increases from newborn to adult stages. Developmental Neurobiology 78, 851–858.

Pang, P.T., and Lu, B. (2004). Regulation of late-phase LTP and long-term memory in normal and aging hippocampus: role of secreted proteins tPA and BDNF. Ageing Research Reviews 3, 407–430.

Paolicelli, R.C., Bolasco, G., Pagani, F., Maggi, L., Scianni, M., Panzanelli, P., Giustetto, M., Ferreira, T.A., Guiducci, E., Dumas, L., et al. (2011). Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. Science 333, 1456–1458.

Park, H.-J., Jeong, S.-K., Kim, S.-R., Bae, S.-K., Kim, W.-S., Jin, S.-D., Koo, T.H., Jang, H.-O., Yun, I., Kim, K.-W., et al. (2009). Resveratrol inhibits Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide-induced endothelial adhesion molecule expression by suppressing NF-κB activation. Arch. Pharm. Res. 32, 583–591.

Park, J.-A., Choi, K.-S., Kim, S.-Y., and Kim, K.-W. (2003). Coordinated interaction of the vascular and nervous systems: from molecule- to cell-based approaches. Biochemical and Biophysical Research Communications 311, 247–253.

Pascal, A., Govaert, P., Oostra, A., Naulaers, G., Ortibus, E., and Broeck, C.V. den (2018). Neurodevelopmental outcome in very preterm and very-low-birthweight infants born over the past decade: a meta-analytic review. Developmental Medicine & Child Neurology 60, 342–355.

Pasquet, N., Douceau, S., Naveau, M., Lesept, F., Louessard, M., Lebouvier, L., Hommet, Y., Vivien, D., and Bardou, I. (2018). Tissue-Type Plasminogen Activator Controlled Corticogenesis Through a Mechanism Dependent of NMDA Receptors Expressed on Radial Glial Cells. Cereb. Cortex.

Pawlak, R., Melchor, J.P., Matys, T., Skrzypiec, A.E., and Strickland, S. (2005). Ethanol-withdrawal seizures are controlled by tissue plasminogen activator via modulation of NR2B-containing NMDA receptors. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 102, 443–448.

Peppiatt, C.M., Howarth, C., Mobbs, P., and Attwell, D. (2006). Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes. Nature 443, 700–704.

Perlman, J.M., McMenamin, J.B., and Volpe, J.J. (1983). Fluctuating cerebral blood-flow velocity in respiratory-distress syndrome. Relation to the development of intraventricular hemorrhage. N. Engl. J. Med. 309, 204–209.

Perlman, J.M., Goodman, S., Kreusser, K.L., and Volpe, J.J. (1985). Reduction in intraventricular hemorrhage by elimination of fluctuating cerebral blood-flow velocity in preterm infants with respiratory distress syndrome. N. Engl. J. Med. 312, 1353–1357.

Persidsky, Y., Ramirez, S.H., Haorah, J., and Kanmogne, G.D. (2006). Blood-brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions. J Neuroimmune Pharmacol 1, 223–236.

Peyre, E., Silva, C.G., and Nguyen, L. (2015). Crosstalk between intracellular and extracellular signals regulating interneuron production, migration and integration into the cortex. Frontiers in Cellular Neuroscience 9.

Pleasure, D., Soulika, A., Singh, S.K., Gallo, V., and Bannerman, P. (2006). Inflammation in white

matter: clinical and pathophysiological aspects. Ment Retard Dev Disabil Res Rev 12, 141–146.

Polavarapu, R., Gongora, M.C., Yi, H., Ranganthan, S., Lawrence, D.A., Strickland, D., and Yepes, M. (2007). Tissue-type plasminogen activator-mediated shedding of astrocytic low-density lipoprotein receptor-related protein increases the permeability of the neurovascular unit. Blood 109, 3270–3278.

Porte, B., Hardouin, J., Zerdoumi, Y., Derambure, C., Hauchecorne, M., Dupre, N., Obry, A., Lequerre, T., Bekri, S., Gonzalez, B., et al. (2017a). Major remodeling of brain microvessels during neonatal period in the mouse: A proteomic and transcriptomic study. J. Cereb. Blood Flow Metab. 37, 495–513.

Porte, B., Chatelain, C., Hardouin, J., Derambure, C., Zerdoumi, Y., Hauchecorne, M., Dupré, N., Bekri, S., Gonzalez, B., Marret, S., et al. (2017b). Proteomic and transcriptomic study of brain microvessels in neonatal and adult mice. PLoS ONE 12, e0171048.

Powell, E.M., Campbell, D.B., Stanwood, G.D., Davis, C., Noebels, J.L., and Levitt, P. (2003). Genetic Disruption of Cortical Interneuron Development Causes Region- and GABA Cell Type-Specific Deficits, Epilepsy, and Behavioral Dysfunction. J. Neurosci. 23, 622–631.

Pugh, C.W., and Ratcliffe, P.J. (2003). Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. Nature Medicine 9, 677–684.

Puts, D., and Motta-Mena, N.V. (2018). Is human brain masculinization estrogen receptor-mediated? Reply to Luoto and Rantala. Horm Behav 97, 3–4.

Rantone, T.H., Grönlund, J.U., Jalonen, J.O., Ekblad, U.U., Kääpä, P.O., Kero, P.O., and Välimäki, I. a. T. (2002). Comparison of the effects of antenatal magnesium sulphate and ritodrine exposure on circulatory adaptation in preterm infants. Clin Physiol Funct Imaging 22, 13–17.

Ream, M.A., and Lehwald, L. (2018). Neurologic Consequences of Preterm Birth. Curr Neurol Neurosci Rep 18, 48.

Reemst, K., Noctor, S.C., Lucassen, P.J., and Hol, E.M. (2016). The Indispensable Roles of Microglia and Astrocytes during Brain Development. Front Hum Neurosci 10.

Reese, T.S., and Karnovsky, M.J. (1967). Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. J. Cell Biol. 34, 207–217.

Rempe, R.G., Hartz, A.M., and Bauer, B. (2016). Matrix metalloproteinases in the brain and blood–brain barrier: Versatile breakers and makers. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism 36, 1481–1507.

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

Richards, C.L., and Malouin, F. (2013). Cerebral palsy: definition, assessment and rehabilitation. Handb Clin Neurol 111, 183–195.

Risau, W. (1991). Embryonic angiogenesis factors. Pharmacology & Therapeutics 51, 371–376.

Risau, W. (1997). Mechanisms of angiogenesis. Nature 386, 671–674.

Risau, W., and Flamme, I. (1995). Vasculogenesis. Annual Review of Cell and Developmental Biology 11, 73–91.

Roberts, D., Brown, J., Medley, N., and Dalziel, S.R. (2017). Antenatal corticosteroids for accelerating fetal lung maturation for women at risk of preterm birth. Cochrane Database Syst Rev 3, CD004454.

Robinson, S., Li, Q., DeChant, A., and Cohen, M.L. (2006). Neonatal loss of γ–aminobutyric acid pathway expression after human perinatal brain injury. J Neurosurg 104, 396–408.

Rocha-Ferreira, E., Poupon, L., Zelco, A., Leverin, A.-L., Nair, S., Jonsdotter, A., Carlsson,

Y., Thornton, C., Hagberg, H., and Rahim, A.A. (2018). Neuroprotective exendin-4 enhances hypothermia therapy in a model of hypoxic-ischaemic encephalopathy. Brain 141, 2925–2942.

Roland, E.H., Poskitt, K., Rodriguez, E., Lupton, B.A., and Hill, A. (1998). Perinatal hypoxic-ischemic thalamic injury: clinical features and neuroimaging. Ann. Neurol. 44, 161–166.

Rosenbaum, P., Paneth, N., Leviton, A., Goldstein, M., Bax, M., Damiano, D., Dan, B., and Jacobsson, B. (2007). A report: the definition and classification of cerebral palsy April 2006. Dev Med Child Neurol Suppl 109, 8–14.

Rosenberg, G.A. (2002). Matrix metalloproteinases in neuroinflammation. Glia 39, 279–291.

Rosenberg, G.A., and Estrada, E.Y. (2015). Matrix Metalloproteinases and TIMPs Are Associated With Blood-Brain Barrier Opening After Reperfusion in Rat Brain. 8.

Rössler, K., Neuchrist, C., Kitz, K., Scheiner, O., Kraft, D., and Lassmann, H. (1992). Expression of leucocyte adhesion molecules at the human blood-brain barrier (BBB). J. Neurosci. Res. 31, 365–374.

Rousset, C.I., Chalon, S., Cantagrel, S., Bodard, S., Andres, C., Gressens, P., and Saliba, E. (2006). Maternal exposure to LPS induces hypomyelination in the internal capsule and programmed cell death in the deep gray matter in newborn rats. Pediatr. Res. 59, 428–433.

Rundhaug, J.E. (2005). Matrix metalloproteinases and angiogenesis. J. Cell. Mol. Med. 9, 267–285.

Rymo, S.F., Gerhardt, H., Wolfhagen Sand, F., Lang, R., Uv, A., and Betsholtz, C. (2011). A two-way communication between microglial cells and angiogenic sprouts regulates angiogenesis in aortic ring cultures. PLoS ONE 6, e15846.

Saghatelyan, A. (2009). Role of blood vessels in the neuronal migration. Semin. Cell Dev. Biol. 20, 744–750.

Sanches, E.F., Arteni, N., Nicola, F., Aristimunha, D., and Netto, C.A. (2015). Sexual dimorphism and brain lateralization impact behavioral and histological outcomes following hypoxia–ischemia in P3 and P7 rats. Neuroscience 290, 581–593.

Sashindranath, M., Sales, E., Daglas, M., Freeman, R., Samson, A.L., Cops, E.J., Beckham, S., Galle, A., McLean, C., Morganti-Kossmann, C., et al. (2012). The tissue-type plasminogen activator–plasminogen activator inhibitor 1 complex promotes neurovascular injury in brain trauma: evidence from mice and humans. Brain 135, 3251–3264.

Saunders, N.R., Daneman, R., Dziegielewska, K.M., and Liddelow, S.A. (2013). Transporters of the blood-brain and blood-CSF interfaces in development and in the adult. Mol. Aspects Med. 34, 742–752.

Schoefl, G.I. (1963). STUDIES ON INFLAMMATION. III. GROWING CAPILLARIES: THEIR STRUCTURE AND PERMEABILITY. Virchows Arch Pathol Anat Physiol Klin Med 337, 97–141.

Seeds, N.W., Siconolfi, L.B., and Haffke, S.P. (1997). Neuronal extracellular proteases facilitate cell migration, axonal growth, and pathfinding. Cell Tissue Res. 290, 367–370.

Seeds, N.W., Basham, M.E., and Haffke, S.P. (1999). Neuronal migration is retarded in mice lacking the tissue plasminogen activator gene. Proceedings of the National Academy of Sciences 96, 14118–14123.

Segovia, K.N., McClure, M., Moravec, M., Luo, N.L., Wan, Y., Gong, X., Riddle, A., Craig, A., Struve, J., Sherman, L.S., et al. (2008). Arrested oligodendrocyte lineage maturation in chronic perinatal white matter injury. Ann. Neurol. 63, 520–530.

Sellier, E., Platt, M.J., Andersen, G.L., Krägeloh-Mann, I., De La Cruz, J., Cans, C., and Surveillance of Cerebral Palsy Network (2016). Decreasing prevalence in cerebral palsy: a multi-

site European population-based study, 1980 to 2003. Dev Med Child Neurol 58, 85–92.

Semple, B.D., Blomgren, K., Gimlin, K., Ferriero, D.M., and Noble-Haeusslein, L.J. (2013). Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. Prog Neurobiol 0, 1–16.

Sewell, E.K., and Andescavage, N.N. (2018). Neuroimaging for Neurodevelopmental Prognostication in High-Risk Neonates. Clin Perinatol 45, 421–437.

Shankaran, S., Laptook, A., Wright, L.L., Ehrenkranz, R.A., Donovan, E.F., Fanaroff, A.A., Stark, A.R., Tyson, J.E., Poole, K., Carlo, W.A., et al. (2002). Whole-body hypothermia for neonatal encephalopathy: animal observations as a basis for a randomized, controlled pilot study in term infants. Pediatrics 110, 377–385.

Sharma, K., Schmitt, S., Bergner, C.G., Tyanova, S., Kannaiyan, N., Manrique-Hoyos, N., Kongi, K., Cantuti, L., Hanisch, U.-K., Philips, M.-A., et al. (2015). Cell type- and brain region-resolved mouse brain proteome. Nat. Neurosci. 18, 1819–1831.

Shatz, C.J., and Rakic, P. (1981). The genesis of efferent connections from the visual cortex of the fetal rhesus monkey. J. Comp. Neurol. 196, 287–307.

Sheikh, A., Meng, X., Liu, J., Mikhailova, A., Kao, J.P.Y., McQuillen, P.S., and Kanold, P.O. (2019). Neonatal Hypoxia-Ischemia Causes Functional Circuit Changes in Subplate Neurons. Cereb. Cortex 29, 765–776.

Shepherd, E., Salam, R.A., Middleton, P., Han, S., Makrides, M., McIntyre, S., Badawi, N., and Crowther, C.A. (2018). Neonatal interventions for preventing cerebral palsy: an overview of Cochrane Systematic Reviews. Cochrane Database Syst Rev 6, CD012409.

Shih, S.T.F., Tonmukayakul, U., Imms, C., Reddihough, D., Graham, H.K., Cox, L., and Carter, R. (2018). Economic evaluation and cost of interventions for cerebral palsy: a systematic review. Developmental Medicine & Child Neurology 60, 543–558.

Siao, C.-J., and Tsirka, S.E. (2002). Tissue Plasminogen Activator Mediates Microglial Activation via Its Finger Domain through Annexin II. 7.

Siao, C.-J., Fernandez, S.R., and Tsirka, S.E. (2003). Cell type-specific roles for tissue plasminogen activator released by neurons or microglia after excitotoxic injury. J. Neurosci. 23, 3234–3242.

Siegenthaler, J.A., Sohet, F., and Daneman, R. (2013). “Sealing off the CNS”: cellular and molecular regulation of blood-brain barriergenesis. Curr Opin Neurobiol 23, 1057–1064.

Simard, M., Arcuino, G., Takano, T., Liu, Q.S., and Nedergaard, M. (2003). Signaling at the gliovascular interface. J. Neurosci. 23, 9254–9262.

Sîrbulescu, R.F., Ilieş, I., and Zupanc, G.K.H. (2015). Matrix metalloproteinase-2 and -9 in the cerebellum of teleost fish: Functional implications for adult neurogenesis. Mol. Cell. Neurosci. 68, 9–23.

Sköld, M.K., and Kanje, M. (2008). Vascular endothelial growth factor in central nervous system injuries - a vascular growth factor getting nervous? Curr Neurovasc Res 5, 246–259.

Smith, M.W., and Gumbleton, M. (2006). Endocytosis at the blood-brain barrier: from basic understanding to drug delivery strategies. J Drug Target 14, 191–214.

Smithers-Sheedy, H. (2016). Declining prevalence of cerebral palsy in Europe: good news? Developmental Medicine & Child Neurology 58, 14–14.

Squarzoni, P., Oller, G., Hoeffel, G., Pont-Lezica, L., Rostaing, P., Low, D., Bessis, A., Ginhoux, F., and Garel, S. (2014). Microglia modulate wiring of the embryonic forebrain. Cell Rep 8, 1271–1279.

Squier, W. (2011). The "Shaken Baby" syndrome: pathology and mechanisms. Acta Neuropathol 122, 519.

Stolp, H.B., and Dziegielewska, K.M. (2009). Review: Role of developmental inflammation and blood–brain barrier dysfunction in neurodevelopmental and neurodegenerative diseases. Neuropathology and Applied Neurobiology 35, 132–146.

Stolp, H.B., and Molnár, Z. (2015). Neurogenic niches in the brain: help and hindrance of the barrier systems. Front. Neurosci. 9.

Stolp, H.B., Dziegielewska, K.M., Ek, C.J., Potter, A.M., and Saunders, N.R. (2005). Long-term changes in blood–brain barrier permeability and white matter following prolonged systemic inflammation in early development in the rat. European Journal of Neuroscience 22, 2805–2816.

Stolp, H.B., Liddelow, S.A., Sá-Pereira, I., Dziegielewska, K.M., and Saunders, N.R. (2013). Immune responses at brain barriers and implications for brain development and neurological function in later life. Front Integr Neurosci 7.

Stolp, H.B., Liddelow, S.A., and Saunders, N.R. (2016). Editorial: Ontogeny and Phylogeny of Brain Barrier Mechanisms. Front. Neurosci. 10.

Stridh, L., Mottahedin, A., Johansson, M.E., Valdez, R.C., Northington, F., Wang, X., and Mallard, C. (2013). Toll-like receptor-3 activation increases the vulnerability of the neonatal brain to hypoxia-ischemia. J. Neurosci. 33, 12041–12051.

Strong, L.H. (1964). The early embryonic pattern of internal vascularization of the mammalian cerebral cortex. The Journal of Comparative Neurology 123, 121–138.

Styp-Rekowska, B., Hlushchuk, R., Pries, A.R., and Djonov, V. (2011). Intussusceptive angiogenesis: pillars against the blood flow. Acta Physiologica 202, 213–223.

Sugimoto, J., Romani, A.M., Valentin-Torres, A.M., Luciano, A.A., Ramirez Kitchen, C.M., Funderburg, N., Mesiano, S., and Bernstein, H.B. (2012). Magnesium decreases inflammatory cytokine production: a novel innate immunomodulatory mechanism. J. Immunol. 188, 6338–6346.

Sumi, N., Nishioku, T., Takata, F., Matsumoto, J., Watanabe, T., Shuto, H., Yamauchi, A., Dohgu, S., and Kataoka, Y. (2010). Lipopolysaccharide-Activated Microglia Induce Dysfunction of the Blood–Brain Barrier in Rat Microvascular Endothelial Cells Co-Cultured with Microglia. Cell Mol Neurobiol 30, 247–253.

Suzuki, Y. (2010). Tissue-type plasminogen activator (t-PA) induces stromelysin-1 (MMP-3) in endothelial cells through activation of lipoprotein receptor-related protein. Japanese Journal of Thrombosis and Hemostasis 21, 308–313.

Suzuki, Y., Nagai, N., Umemura, K., Collen, D., and Lijnen, H.R. (2007). Stromelysin-1 (MMP-3) is critical for intracranial bleeding after t-PA treatment of stroke in mice. Journal of Thrombosis and Haemostasis 5, 1732–1739.

Sweeney, M.D., Ayyadurai, S., and Zlokovic, B.V. (2016). Pericytes of the neurovascular unit: Key functions and signaling pathways. Nat Neurosci 19, 771–783.

Szpecht, D., Gadzinowski, J., Seremak-Mrozikiewicz, A., Kurzawińska, G., and Szymankiewicz, M. (2017). Role of endothelial nitric oxide synthase and endothelin-1 polymorphism genes with the pathogenesis of intraventricular hemorrhage in preterm infants. Sci Rep 7.

Tahraoui, S. l., Marret, S., Bodénant, C., Leroux, P., Dommergues, M. a., Evrard, P., and Gressens, P. (2001). Central Role of Microglia in Neonatal Excitotoxic Lesions of the Murine Periventricular White Matter. Brain Pathology 11, 56–71.

Tanaka, D.H., and Nakajima, K. (2012). Migratory pathways of GABAergic interneurons

when they enter the neocortex. European Journal of Neuroscience 35, 1655–1660.

Tau, G.Z., and Peterson, B.S. (2010). Normal Development of Brain Circuits. Neuropsychopharmacology 35, 147–168.

Taylor, M.J., Vandewouw, M.M., Young, J.M., Card, D., Sled, J.G., Shroff, M.M., and Raybaud, C. (2018). Magnetic resonance spectroscopy in very preterm-born children at 4 years of age: developmental course from birth and outcomes. Neuroradiology 60, 1063–1073.

Thanabalasundaram, G., Pieper, C., Lischper, M., and Galla, H.-J. (2010). Regulation of the blood–brain barrier integrity by pericytes via matrix metalloproteinases mediated activation of vascular endothelial growth factor in vitro. Brain Research 1347, 1–10.

Thomas, J.-L., Spassky, N., Villegas, E.M.P., Olivier, C., Cobos, I., Goujet-Zalc, C., Martínez, S., and Zalc, B. (2000). Spatiotemporal development of oligodendrocytes in the embryonic brain. Journal of Neuroscience Research 59, 471–476.

Thompson, D.K., Wood, S.J., Doyle, L.W., Warfield, S.K., Lodygensky, G.A., Anderson, P.J., Egan, G.F., and Inder, T.E. (2008). Neonate hippocampal volumes: Prematurity, perinatal predictors, and 2-year outcome. Annals of Neurology 63, 642–651.

Tilborg, E. van, Achterberg, E.J.M., Kammen, C.M. van, Toorn, A. van der, Groenendaal, F., Dijkhuizen, R.M., Heijnen, C.J., Vanderschuren, L.J.M.J., Benders, M.N.J.L., and Nijboer, C.H.A. (2018a). Combined fetal inflammation and postnatal hypoxia causes myelin deficits and autism-like behavior in a rat model of diffuse white matter injury. Glia 66, 78–93.

Tilborg, E. van, Theije, C.G.M. de, Hal, M. van, Wagenaar, N., Vries, L.S. de, Benders, M.J., Rowitch, D.H., and Nijboer, C.H. (2018b). Origin and dynamics of oligodendrocytes in the developing brain: Implications for perinatal white matter injury. Glia 66, 221–238.

Towfighi, J., Mauger, D., Vannucci, R.C., and Vannucci, S.J. (1997). Influence of age on the cerebral lesions in an immature rat model of cerebral hypoxia–ischemia: a light microscopic study. Developmental Brain Research 100, 149–160.

Tsai, A., Lasky, R., John, S., Evans, P., and Kennedy, K. (2014). Predictors of neurodevelopmental outcomes in preterm infants with intraparenchymal hemorrhage. J Perinatol 34, 399–404.

Tsai, H.-H., Niu, J., Munji, R., Davalos, D., Chang, J., Zhang, H., Tien, A.-C., Kuo, C.J., Chan, J.R., Daneman, R., et al. (2016). Oligodendrocyte precursors migrate along vasculature in the developing nervous system. Science 351, 379–384.

Tsirka, S.E., Rogove, A.D., Bugge, T.H., Degen, J.L., and Strickland, S. (1997). An extracellular proteolytic cascade promotes neuronal degeneration in the mouse hippocampus. J. Neurosci. 17, 543–552.

Ueno, M., Fujita, Y., Tanaka, T., Nakamura, Y., Kikuta, J., Ishii, M., and Yamashita, T. (2013). Layer V cortical neurons require microglial support for survival during postnatal development. Nature Neuroscience 16, 543–551.

Umbreit, J. (2007). Methemoglobin--it's not just blue: a concise review. Am. J. Hematol. 82, 134–144.

Van den Broeck, C., Himpens, E., Vanhaesebrouck, P., Calders, P., and Oostra, A. (2008). Influence of gestational age on the type of brain injury and neuromotor outcome in high-risk neonates. Eur. J. Pediatr. 167, 1005–1009.

Van Wart, H.E., and Birkedal-Hansen, H. (1990). The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87, 5578–5582.

Vandooren, J., Steen, P.E.V. den, and Opdenakker, G. (2013). Biochemistry and

molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9): The next decade. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology 48, 222–272.

Vannucci, R.C., and Vannucci, S.J. (2005). Perinatal hypoxic-ischemic brain damage: evolution of an animal model. Dev. Neurosci. 27, 81–86.

Veltkamp, R., Bieber, K., Wagner, S., Beynon, C., Siebing, D.A., Veltkamp, C., Schwaninger, M., and Marti, H.H. (2006). Hyperbaric oxygen reduces basal lamina degradation after transient focal cerebral ischemia in rats. Brain Research 1076, 231–237.

Verkman, A.S., Binder, D.K., Bloch, O., Auguste, K., and Papadopoulos, M.C. (2006). Three distinct roles of aquaporin-4 in brain function revealed by knockout mice. Biochim. Biophys. Acta 1758, 1085–1093.

Verstraete, M., and Collen, D. (1985). [Tissue plasminogen activator, a new specific thrombolytic of fibrin. Molecular mechanisms and clinical application]. Bull. Acad. Natl. Med. 169, 1109–1116.

Vesalius, A. (1543). De Humani Corporis Fabrica (The Fabric of the Human Body) (Basel).

Vexler, Z.S., and Ferriero, D.M. (2001). Molecular and biochemical mechanisms of perinatal brain injury. Semin Neonatol 6, 99–108.

Vidaeff, A.C., Belfort, M.A., and Steer, P.J. (2016a). Antenatal corticosteroids: a time for more careful scrutiny of the indications? BJOG 123, 1067–1069.

Vidaeff, A.C., Belfort, M.A., and Steer, P. (2016b). Authors' reply re: Antenatal corticosteroids: a time for more careful scrutiny of the indications? BJOG 123, 1708.

Vinchon, M. (2017). Shaken baby syndrome: what certainty do we have? Childs Nerv Syst 33, 1727–1733.

Vitale, A., Vicedomini, D., Vega, G.R., Greco, N., and Messi, G. (2012). Shaken baby syndrome: pathogenetic mechanism, clinical features and preventive aspects. Minerva Pediatr. 64, 641–647.

Volpe, J.J. (2009). Brain injury in premature infants: a complex amalgam of destructive and developmental disturbances. The Lancet Neurology 8, 110–124.

Volpe, J.J. (2012). Neonatal encephalopathy: an inadequate term for hypoxic-ischemic encephalopathy. Ann. Neurol. 72, 156–166.

Volpe, J.J., Kinney, H.C., Jensen, F., E., and Rosenberg, P.A. (2011). The developing oligodendrocyte: key cellular target in brain injury in the premature infant. Int J Dev Neurosci 29, 423–440.

Wagener, F.A., Eggert, A., Boerman, O.C., Oyen, W.J., Verhofstad, A., Abraham, N.G., Adema, G., van Kooyk, Y., de Witte, T., and Figdor, C.G. (2001). Heme is a potent inducer of inflammation in mice and is counteracted by heme oxygenase. Blood 98, 1802–1811.

Wagner, K., Dean, C., Beiler, S., Bryan, D., Packard, B., Smulian, A., Linke, M., and Courten-Myers, G. (2005). Plasma Infusions into Porcine Cerebral White Matter Induce Early Edema, Oxidative Stress, Pro-Inflammatory Cytokine Gene Expression and DNA Fragmentation: Implications for White Matter Injury with Increased Blood- Brain-Barrier Permeability. Current Neurovascular Research 2, 149–155.

Wahl, A.-S. (2018). State-of-the-Art Techniques to Causally Link Neural Plasticity to Functional Recovery in Experimental Stroke Research. Neural Plast. 2018, 3846593.

Wang, J., and Tsirka, S.E. (2005). Contribution of extracellular proteolysis and microglia to intracerebral hemorrhage. Neurocrit Care 3, 77–85.

Wang, L., Zhang, Z.G., Zhang, R.L., Gregg, S.R., Hozeska-Solgot, A., LeTourneau, Y., Wang, Y., and Chopp, M. (2006). Matrix metalloproteinase 2 (MMP2) and MMP9 secreted by erythropoietin-activated endothelial cells promote neural

progenitor cell migration. J. Neurosci. 26, 5996–6003.

Wang, L.-W., CHANG, Y.-C., LIN, C.-Y., HONG, J.-S., and HUANG, C.-C. (2010). Low-dose Lipopolysaccharide Selectively Sensitizes Hypoxic-Ischemia White Matter Injury in the Immature Brain. Pediatr Res 68, 41–47.

Wang, X., Lee, S.-R., Arai, K., Lee, S.-R., Tsuji, K., Rebeck, G.W., and Lo, E.H. (2003). Lipoprotein receptor-mediated induction of matrix metalloproteinase by tissue plasminogen activator. Nat. Med. 9, 1313–1317.

Wassink, G., Gunn, E.R., Drury, P.P., Bennet, L., and Gunn, A.J. (2014). The mechanisms and treatment of asphyxial encephalopathy. Front Neurosci 8.

Waubant, E., Goodkin, D., Bostrom, A., Bacchetti, P., Hietpas, J., Lindberg, R., and Leppert, D. (2003). IFNbeta lowers MMP-9/TIMP-1 ratio, which predicts new enhancing lesions in patients with SPMS. Neurology 60, 52–57.

Webster, C.M., Kelly, S., Koike, M.A., Chock, V., Giffard, R.G., and Yenari, M.A. (2009). INFLAMMATION AND NFκB ACTIVATION IS DECREASED BY HYPOTHERMIA FOLLOWING GLOBAL CEREBRAL ISCHEMIA. Neurobiol Dis 33, 301–312.

Whitelaw, A. (2012). Periventricular hemorrhage: A problem still today. Early Human Development 88, 965–969.

Winkler, E.A., Bell, R.D., and Zlokovic, B.V. (2011). Central nervous system pericytes in health and disease. Nat Neurosci 14, 1398–1405.

Wittwer, A.J., and Howard, S.C. (1990). Glycosylation at Asn-184 inhibits the conversion of single-chain to two-chain tissue-type plasminogen activator by plasmin. Biochemistry 29, 4175–4180.

Won, C., Lin, Z., Kumar T, P., Li, S., Ding, L., Elkhal, A., Szabó, G., and Vasudevan, A. (2013). Autonomous Vascular Networks Synchronize GABA Neuron Migration in the Embryonic Forebrain. Nat Commun 4, 2149.

Woo, M.-S., Park, J.-S., Choi, I.-Y., Kim, W.-K., and Kim, H.-S. (2008). Inhibition of MMP-3 or -9 suppresses lipopolysaccharide-induced expression of proinflammatory cytokines and iNOS in microglia. J. Neurochem. 106, 770–780.

Workman, A.D., Charvet, C.J., Clancy, B., Darlington, R.B., and Finlay, B.L. (2013). Modeling Transformations of Neurodevelopmental Sequences across Mammalian Species. J. Neurosci. 33, 7368–7383.

Wu, Y.W., and Colford, J.M. (2000). Chorioamnionitis as a risk factor for cerebral palsy: A meta-analysis. JAMA 284, 1417–1424.

Yamagata, K., Tagami, M., Nara, Y., Mitani, M., Kubota, A., Fujino, H., Numano, F., Kato, T., and Yamori, Y. (1997). Astrocyte-conditioned medium induces blood-brain barrier properties in endothelial cells. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 24, 710–713.

Yang, Y., and Rosenberg, G.A. (2015). Matrix metalloproteinases as therapeutic targets for stroke. Brain Research 1623, 30–38.

Yao, L., Kan, E.M., Lu, J., Hao, A., Dheen, S.T., Kaur, C., and Ling, E.-A. (2013). Toll-like receptor 4 mediates microglial activation and production of inflammatory mediators in neonatal rat brain following hypoxia: role of TLR4 in hypoxic microglia. J Neuroinflammation 10, 23.

Yepes, M., and Lawrence, D.A. (2004). Tissue-type plasminogen activator and neuroserpin: a well-balanced act in the nervous system? Trends Cardiovasc. Med. 14, 173–180.

Yepes, M., Sandkvist, M., Moore, E.G., Bugge, T.H., Strickland, D.K., and Lawrence, D.A. (2003). Tissue-type plasminogen activator induces opening of the blood-brain barrier via the LDL receptor–related protein. J Clin Invest 112, 1533–1540.

Yepes, M., Roussel, B.D., Ali, C., and Vivien, D. (2009). Tissue-type plasminogen activator in the

ischemic brain: more than a thrombolytic. Trends in Neurosciences 32, 48–55.

Yip, H.-K., Yuen, C.-M., Chen, K.-H., Chai, H.-T., Chung, S.-Y., Tong, M.-S., Chen, S.-Y., Kao, G.-S., Chen, C.-H., Chen, Y.-L., et al. (2016). Tissue plasminogen activator deficiency preserves neurological function and protects against murine acute ischemic stroke. International Journal of Cardiology 205, 133–141.

Yong, V.W., Power, C., Forsyth, P., and Edwards, D.R. (2001). Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system. Nature Reviews Neuroscience 2, 502–511.

Yoshiyama, Y., Asahina, M., and Hattori, T. (2000). Selective distribution of matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) in Alzheimer's disease brain. Acta Neuropathol. 99, 91–95.

Zaghloul, N., Patel, H., and Ahmed, M.N. (2017). A model of Periventricular Leukomalacia (PVL) in neonate mice with histopathological and neurodevelopmental outcomes mimicking human PVL in neonates. PLoS ONE 12, e0175438.

Zhang, W., Ma, J., Danzeng, Q., Tang, Y., Lu, M., and Kang, Y. (2017). Safety of Moderate Hypothermia for Perinatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy: A Meta-analysis. Pediatr. Neurol. 74, 51–61.

Zhang, X., Polavarapu, R., She, H., Mao, Z., and Yepes, M. (2007). Tissue-Type Plasminogen Activator and the Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein Mediate Cerebral Ischemia-Induced Nuclear Factor-κB Pathway Activation. The American Journal of Pathology 171, 1281–1290.

Zlokovic, B.V. (2008). The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. Neuron 57, 178–201.

del Zoppo, G.J., and Mabuchi, T. (2003). Cerebral microvessel responses to focal ischemia. J. Cereb. Blood Flow Metab. 23, 879–894.

Zuccoli, G., Yannes, M.P., Nardone, R., Bailey, A., and Goldstein, A. (2015). Bilateral symmetrical basal ganglia and thalamic lesions in children: an update (2015). Neuroradiology 57, 973–989.

ANNEXE I

Glutamate controls vessel-associated migration of GABA interneurons from the pial migratory route *via* NMDA receptors and endothelial protease activation

Cécile Léger[1], Nicolas Dupré[1], Caroline Aligny[1*], Magalie Bénard[4], Alexis Lebon[4], Vincent Henry[1], Michelle Hauchecorne[1], Ludovic Galas[4], Thierry Frebourg[1], Philippe Leroux[1], Denis Vivien[2,3], Maryline Lecointre[1], Stéphane Marret[1], and Bruno J. Gonzalez[1]*

UNDER REVIEW in *Cellular and Molecular Life Science*

[1]Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM U1245 and Rouen University Hospital, Department of Neonatal Paediatrics and Intensive Care, F 76000, Normandy Centre for Genomic and Personalized Medicine, Rouen, France

[2]Inserm, Université Caen-Normandie, Inserm UMR-S U1237 "Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders" (PhIND), GIP Cyceron, Caen, France.

[3]Caen University Hospital, CHU Caen, Department of Clinical Research, Caen, France

[4]Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM, PRIMACEN, Rouen, France.

**These authors equally contributed to this work.*

Abbreviations

aCSF	Artificial cerebrospinal fluid
CR	Calretinin
DCX	Doublecortin
MMP-9	Matrix metalloproteinase 9
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor 1
PMR	Pial migratory route
SST	Somatostatin
t-PA	Tissue-plasminogen activator

Abstract

During cortex development, fine interactions between pyramidal cells and migrating GABA neurons are required to orchestrate correct positioning of interneurons, but cellular and molecular mechanisms are not yet clearly understood. Functional and age-specific expression of NMDA receptors by neonate endothelial cells suggests a vascular contribution to the trophic role of glutamate during cortical development. Associating functional and loss-of-function approaches, we found that glutamate stimulates activity of the endothelial proteases MMP-9 and t-PA along the pial migratory route and radial cortical microvessels. Activation of MMP-9 was NMDAR-dependent and abrogated in t-PA$^{-/-}$ mice. Time-lapse recordings revealed that glutamate stimulated migration of GABA interneurons along vessels through a NMDAR-dependent mechanism. In Gad67-GFP mice, t-PA invalidation and *in vivo* administration of a MMP inhibitor impaired positioning of GABA interneurons in superficial cortical layers whereas Grin1 endothelial invalidation resulted in a strong reduction of the thickness of the pial migratory route and a marked depopulation of interneurons in superficial cortical layers. This study supports that glutamate controls the vasculo-dependent migration of GABA interneurons by regulating the activity of endothelial proteases. This effect requires endothelial NMDAR and is t-PA–dependent. These data reinforce the debate regarding safety of molecules with NMDA antagonist properties administered to preterm and term neonates.

Key words Endothelial cells, GABA interneuron, migration, MMP-9, NMDAR, t-PA

Introduction

At the cellular and molecular levels, there is increasing evidence that, in the developing cortex, endothelial cells are not phenotypically or regionally similar [1, 2]. For example, in the mouse, the transcriptomic and proteomic expression profiles of cortical microvessels revealed age-dependent specificities that will drastically change postnatally because of strong remodeling of the extracellular matrix, cell adhesion, and junction protein expression [1]. Similarly, at a given developmental stage, endothelial cells of the pial surface have phenotypic identities distinct from those of the periventricular vascular network, suggesting distinct contributions to the developing brain [2]. Consistent with this notion, meninges have been shown to release chemoattractive factors such as the chemokine CXCl12 essential in the control of nervous cell migration [3, 4]. Interestingly, it has been shown that there are region-specific and age-specific changes in the expression of both NMDA receptor subunits and excitatory amino acid transporters by neonatal endothelial cells [5, 6] and in vitro studies showed that NMDA is able to promote secretion of two endothelial proteases, i.e., matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and tissue-plasminogen activator (t-PA) by cultured neonatal endothelial cells [6]. These two proteases are involved in the control of cell migration in physiological and/or pathological conditions [7, 8] and the preferential expression pattern of NMDA receptors by endothelial cells during the perinatal period coincides with the late migration of GABA interneurons [9]. Because it has been demonstrated that during cortical development, interneurons migrate tangentially while closely interacting with the vasculature of the pial migratory routes [2, 10, 11], these data suggest that the endothelial NMDA receptor would contribute in the vessel-associated interneuron migration. Consistent with this hypothesis, several recent data showed that the migration of GABAergic neurons is regulated by excitatory neurons [12] and that exposure of mouse neonate cortices to molecules with NMDA antagonist properties such as ketamine, alcohol, or MK801 resulted in endothelial cell autophagy followed by massive apoptotic death of migrating tangential GABA interneurons present in the superficial cortical layers [13-17].

In humans, late migration of GABAergic neurons has also been reported with at least 20% of interneurons still migrating in the developing cortex at term [18]. Moreover, at the clinical level, the brains of preterm and term neonates can be frequently exposed to molecules with NMDA antagonist properties during early life for the purposes of neuroprotection or anesthesia [19-21]. In addition, the innocuousness of NMDA antagonists in the developing brain is not consensual and it is more and more suspected a functional link between NMDA receptor

hypofunction during early life and impaired positioning of GABA interneurons that could lead to adult diseases [22-24].

In the present study, we reported that glutamate, by interacting with endothelial NMDA receptors stimulates the activity of endothelial proteases, increases vessel-associated cell migration and contributes to the vascular-dependent positioning of GABA interneurons arising from the pial migratory route to radially enter the cortex. These data provide new evidence that the activation of the endothelial NMDA receptors by glutamate constitutes a mechanism involved in the control of the vasculo-dependent migration of cortical interneurons.

Materials and Methods

Wild-type and transgenic mice

For each mouse strain, animals were kept in a temperature-controlled room (21 ± 1°C) with a 12-h/12-h light/dark cycle (lights on from 7:00 AM to 7:00 PM) and free access to food and water. Animal care and manipulation complied with recommendations issued by the French and European guidelines for the care and use of laboratory animals (Council Directive 86/609/EEC, license no. 21CAE035) and were supervised by an authorized investigator (B.J.G., authorization no. 7687 from the Ministère de l'Agriculture et de la Pêche). Naval Medical Research Institute mice were purchased from Janvier (Le Genest Saint Isle, France). FVB-Tg(GadGFP)45704Swn transgenic mice (#003718) were obtained from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). In this mouse strain, GABAergic interneurons arising from the GEs express enhanced green fluorescent protein under the control of the mouse Gad1 gene promoter [25]. t-PA knockout (t-PA$^{-/-}$) mice in the C57Bl6/129 background (t-PA$^{-/-}$ in a ratio of 87.5:12.5%) were developed and provided by the Center for Molecular and Vascular Biology at the University of Leuven in Belgium [26]. Double transgenic Gad67GFP/t-PA$^{-/-}$ mice were developed by Inserm U1245. Floxed Grin1 mice (B6.129S4-Grin1tm2Stl/J; # 005246) were from The Jackson Laboratory. Floxed Grin1 mice allow deletion of the GluN1 subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor in Cre recombinase expressing cells/tissues. VE-Cadherin-Cre (B6.FVB-Tg(Cdh5-cre)7Mlia/J; # 006137) were from The Jackson Laboratory. Cre expression can be seen in the embryo and in adult endothelium of developing and quiescent vessels.

Chemicals

Glutamate, Coomassie blue, Hoechst 33258, isolectin-B4-TRITC/FITC, phosphate-buffered saline (PBS), bovine serum albumin (BSA), plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1), and Triton X-100 were from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). MK801 was obtained from Tocris (R&D, Lille, France). GM6001 was provided by Millipore SAS (Molsheim, France). SDS-PAGE Tris-glycine gel (containing 0.1% gelatin as a gelatinase substrate), renaturing buffer, developing buffer, DQ-gelatin-FITC, and DQ-casein-FITC were from Invitrogen (Cergy Pontoise, France). The gelatinase inhibitor SB-3CT was from Biomol (Lonza Sales Ltd, Basel, Switzerland). Paraformaldehyde (PFA) was obtained from Labonord (Templemars, France). Characteristics of the primary antibodies against CD31, calretinin, Cre recombinase, collagen IV, doublecortin (DCX), GABA, GFAP, GFP, gluN1, MMP-9, somatostatin (SST), Gad67, and β-actin are

summarized in Supplementary Table 1. The secondary antibodies Alexa Fluor 488 donkey anti-rabbit IgG (A-21206), Alexa Fluor 488 goat anti-rat (A-11006), and Alexa Fluor 594 donkey anti-goat IgG (A-11058) used for immunohistochemistry were from Invitrogen.

Genotyping by polymerase chain reaction

Mouse tail DNAs were extract using NucleoSpin® DNA Rapidlyse (Macherey-Nagel, Düren, Germany) and were amplified on a thermal cycler with the following program: 2 min, 94°C; 2 sec, 94°C; 15 sec, 65°C -0.5°C per cycle decrease; 10 sec, 68°C; repeats step 2-4 for 10 cycles; 10 sec, 94°C; 15 sec 50°C; 10 sec, 72°C, repeats step 3-5 for 28 cycles; 2 min, 72°C. Genotyping of Grin1 was performed with primers 5'-AAACAGGGCTCAGTGGGTAA and 3'-GTGCTGGGATCCACATTCAT. The Cre transgene was detected with primers 5'-GCGGTCTGGCAGTAAAAACTATC and 3'-GTGAAACAGCATTGCTGTCACTT. Electrophorese was conducted on 3.5% of agarose gels and visualized with ethidium bromide.

Preparation and treatment of cerebral slices from neonate mice

Cortex brain slices were obtained from mice on postnatal day 2 (P2). Previous studies demonstrated that this stage presented developmental and lesional characteristics similar to those described for human neonates [27, 28]. Practically, mice were euthanized by decapitation and brains were rapidly dissected to isolate the hemispheres. The neocortex was immediately placed in ice-cold artificial cerebrospinal fluid (aCSF) containing (in mM) the following: NaCL, 125; KCL, 3; $CaCl_2$, 2; NaH_2PO_4, 1.2; $NaHCO_3$, 26; and D-glucose, 10 (pH 7.4). Transverse slices (250 µm) were cut at 4°C using a vibratome (VT1000S; Leica, Reuil-Malmaison, France), transferred into 24-well Costar plates (Cambridge, MA) containing aCSF, and incubated during a recovery period of 30 min at 37°C in a humidified incubator with a controlled atmosphere of 5% CO_2/95% air. Then, slices were washed with fresh aCSF and treated for 3 h at 37°C with glutamate (25, 50, 100 µM), MK801 (20 µM), SB-3CT (10 µM), and PAI-1 (5 nM) alone or in combination.

SDS-PAGE gelatin and casein zymography

Gelatin zymograms were used to reveal matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 activities. Casein zymograms were used to reveal t-PA activity. Experiments were performed in P2 cortical extracts. Practically, microdissected cortices were washed in fresh aCSF and

homogenized in 50 µL of lysis buffer (50 µM Hepes; pH 7.5; 150 mM NaCl; 10 mM EDTA; 10 mM glycerophosphate; 100 mM natrium fluoride; 1% Triton X-100). After centrifugation of the homogenates (20,000*g* × 15 min), the supernatants were collected and protein concentrations were determined by the Bradford assay. Proteins were loaded as 15 and 30 µg/well for gelatin and casein zymography, respectively, and separated by electrophoresis. For gelatin zymography, the gels were incubated in renaturing buffer (Triton X-100, 12.5 ml; H_2O, 487.5 ml) for 30 min at room temperature and in developing buffer (glycine, 3.75 mM; EDTA, 1.45 mM) for another 30 min at room temperature. After transfer in fresh developing buffer, gels were incubated for 5 days at 37°C, stained in 0.5% Coomassie blue for 1 hour, and rinsed for 1 hour in distilled water. Light stripes on a blue background indicated gelatin digestion of the gel by gelatinases. For casein zymography, gels were incubated in renaturing buffer at 4°C overnight and rinsed in water for 30 min at 4°C. Then, gels were transferred in developing buffer for 3 h and 30 min at 37°C and stained with 0.5% Coomassie blue for 1 h. Finally, they were de-stained in 40% methanol and 10% acetic acid for 30 min at room temperature. Light stripes on a blue background indicated casein digestion of the gel by t-PA. Digital images of the gels were acquired and digestion stripes were quantified using Explora Nova Mercator Software (La Rochelle, France).

In situ gelatinase and casein zymography on brain slices

In situ MMP and casein zymography were performed for 250-µm brain slices from wild-type (WT) or t-PA$^{-/-}$ mice previously stained by isolectin-B4-TRITC to visualize the pial migratory route. Slices were incubated for 30 min in aCSF containing isolectin-B4-TRITC (1/50) at 37°C in a humidified incubator under a controlled atmosphere of 5% CO_2/95% air. After two washes for 10 min with aCSF, slices were incubated for 3 h with the quenched gelatinase substrate DQ-gelatin-FITC (1/50) or DQ-casein-FITC (1/125) in the presence of glutamate (100 µM), MK801 (20 µM), and/or SB-3CT (10 µM) alone or in combination. Quantification of FITC fluorescence, indicative of cell-specific digestion of the substrate, was performed by time-lapse recordings using a fluorescent videomicroscope system (DMI 6000B; Leica, Reuil-Malmaison, France) coupled to the Explora Nova Mercator Software. Microphotographs were acquired at 488 nm and 540 nm every 15 min for 3 h to follow the kinetics of DQ-gelatin-FITC and DQ-casein-FITC degradations and to visualize cortical microvessels from the pial migratory route, respectively. A background level was defined in a negative region of the slice.

Immunohistochemistry

Brain slices previously fixed with 4% PFA in PBS were incubated overnight at 4°C with various primary antibodies diluted in incubation buffer (PBS containing 1% BSA and 3% Triton X-100) (Supplementary Table 1). Then, the slices were rinsed three times with PBS for 20 min and incubated with the same incubation buffer containing an adequate secondary antibody. Cell nuclei were visualized by incubating slices for 5 min with 1 µg/ml Hoechst 33258 in PBS. Fluorescent signals were observed with a Leica DMI 6000B microscope. The intensity profiles of immunolabeled slices were done using the *Line scan* tool of the Metamorph software (Roper Scientific, Evry, France). Control for nonspecific binding of the secondary antibody was performed by omitting the primary antibodies.

Western blot

Microdissected cortices from WT and transgenic mice were rapidly homogenized in ice-cold lysis buffer. After centrifugation, supernatants were collected and protein concentrations were determined by the Bradford assay. The pellet was denatured at 100°C for 5 min in 50 µL of Tris/HCl (pH 7.5) containing 20% glycerol, 0.7 M 2-mercaptoethanol, 0.004% (w/v) bromophenol blue, and 3% (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS), and then it was electrophoresed on 10% SDS-polyacrylamide gel. After separation, the proteins were electrically transferred to a polyvinyldifluoridine membrane (PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA). The membrane was incubated with blocking solution (5% BSA in Tris-buffered saline containing 0.05% Tween 20) at room temperature for 1 h and incubated overnight with primary antibodies against somatostatin and actin (Supplementary Table 1). After incubation with the corresponding secondary antibodies coupled to peroxidase (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), proteins were visualized using an enhanced chemiluminescence ECL Plus immunoblotting detection system (ECL; Bio-Rad Laboratories, Marne la Coquette, France). The intensity of the immunoreactive bands was quantified using a blot analysis system (Bio-Rad Laboratories), and β-actin was used as a loading control. Commercial markers (Seeblue pre-stained standard; Invitrogen) were used as molecular weight standards.

Quantification of the vessel-associated GABAergic interneurons and measurement of the PMR thickness

Quantification of vessel-associated GABAergic interneurons was performed after double immunostaining of P2 cortical slices with GABA and CD31 antibodies (Supplementary Table 1). Images were acquired and saved in TIFF format using a Leica TCS SP8 MP confocal microscope. Images were subsequently opened in Leica LAS AF Lite software and the distance between GABA interneurons and radial vessels analyzed. For distances between 0 and 15 µm, GABA interneurons were considered as associated with vessels. The quantification of the PMR thickness in t-PA null mice and in Grin1/VeCadherin mice was done using the Leica LAS AF Lite software.

Quantification of GABA, Gad67 and somatostatin neuronal densities

For measurements of GABA neuronal density in the superficial cortical layers of wild type, t-PA$^{-/-}$ and Grin1^{flox}/VeCadherin^{Cre} mice, images were acquired after different immulabeling using GABA, Gad67 or somatostatin antibodies. Images were then saved in TIFF format using a Leica DMI 6000B microscope and analyzed using the Mercator software. Regions of interest (ROIs) were defined in the superficial layers I-IV from the somatosensory cortex. Then, a counting frame was applied within the ROI and a threshold was set to differentiate FITC-positive cells from the background [29]. Using a segmentation process, a computer calculated the number and cumulated area of objects within the ROI, thus yielding cell number and cell density, respectively.

Quantification of primary neurite density in double transgenic Gad67-GFP/t-PA$^{-/-}$ mice

Quantification of primary neurite densities of GABA interneurons populating the cortical superficial layers was performed at P15 on both Gad67-GFP/t-PA^{WT} and Gad67-GFP/t-PA$^{-/-}$ mice. A reference focal plane corresponding to the Gad67-GFP cell body was first defined with a confocal laser scanning microscope (Noran Instruments, Middleton, WI) using INTERVISION software (Noran Instruments). Then, Z-series of four images were acquired with a 2-µm step on both sides of the reference plane and saved in TIFF format. Next, acquired images were deconvolved and compiled for three-dimensional (3D) reconstruction using AutoQuant X_3 deconvolution software (Media Cybernetics, Rockville, MD) to quantify the number of primary neurites per cell body.

Quantification of spine morphology and density in Gad67-GFP/t-PA$^{-/-}$ mice

A fine network of secondary and tertiary dendrites was acquired from Gad67-GFP/t-PA^{WT} and double transgenic Gad67-GFP/t-PA$^{-/-}$ mice using a Leica TCS SP2 AOBS confocal laser scanning imaging system (Leica Microsystems AG). Z-stack series of images were later deconvolved using AutoQuant X_3 software and loaded into IMARIS imaging software (Bitplane, Zurich, Switzerland) for 3D reconstruction. The Filament Tracer function was used to assign and classify spines, thus yielding spine density and spine categories (stubby, filipodia-shaped, or mushroom-shaped). For a given slice, two ROIs were defined, two to three dendrites were quantified per ROI, and the total number of quantified neuritis was fixed at 40 per group.

Quantification of tangential and radial migration

Brain slices from P2 neonates were previously stained by isolectin-B4-TRITC to localize the vascular network of the pial migratory route. To label cortical cells, slices were incubated for 5 min in 10 µM Cell Tracker Green (CTG; Invitrogen) added to the culture medium. The chemically defined culture medium was composed of DMEM/Ham's F12 with 1% N2 supplement and 1% antibiotic-antimycotic solution (Sigma-Aldrich). Slices were subsequently washed with culture medium, placed onto a polyester membrane insert from a six-well plate, and incubated in a 5% CO_2 atmosphere. After labeling, slices were transferred to an incubator attached to the stand of a confocal macroscope (TCS LSI; Leica Microsystems). The temperature of the chamber was kept at 37.0 ± 0.5°C using a temperature controller (Tempcontrol 37-2 digital 2-channel; PeCon, Ulm, Germany), and the slices were supplied with a constant gas flow (95% O_2, 5% CO_2; CO_2 controller; PeCon). To visualize cell migration in the tissue slices, the preparation was illuminated with a 488-nm wavelength light by means of a laser diode through a confocal laser scanning macroscope equipped with a ×2 dry objective (working distance, 39 mm; diameter, 58 mm; Leica Microsystems). Fluorescence emission was detected from 500 to 530 nm. To finely resolve the movement of interneurons, images were acquired with an additional optical zoom factor of 1.5 to 2.0. Images were collected every 30 min for up to 6 h. Tracking maps were designed using Metamorph and ImageJ (NIH) upgraded with the *tracking* plug-in allowing access to the total distance covered and maximal speed parameters [30].

Quantification of locomotor activity of t-PA$^{-/-}$ mice

Locomotor activity of P15 WT and t-PA$^{-/-}$ mice was assessed using a Versamax 4.2 apparatus (Accuscan Instruments Inc., Columbus, OH, USA) and the behavioral analysis platform of the Institute of Research and Innovation in Biomedicine (IRIB; Normandy University). Animals were isolated for 30 min in individual cages before being placed in individual 20-cm × 20-cm × 30-cm compartments to limit anxiety in a dark, sound-attenuated, and temperature-regulated (20 ± 1°C) room. The test takes advantage of a rodent's natural tendency to explore a new environment. Video-tracking was performed during a 30-min period and analyzed using ANY-maze software (Stoelting, Wood Dale, IL, USA).

In vivo exposure of Gad67-GFP mice to GM6001

The MMP inhibitor GM6001 (10 mg/kg) was administered daily by subcutaneous injection to pregnant Gad67-GFP mice from E15 to birth and in neonates from birth to P7. The dose of GM6001 administered was based on previous comparative studies that showed that a 10-mg/kg GM6001 subcutaneous injection significantly decreased cortical MMP activity [31]. The control group was treated with 1% DMSO in PBS. No modification of body weight of pregnant mice was seen in the control and GM6001-treated groups; however, the body weight of pups from the GM6001 group was significantly reduced. After birth, pups were raised until P15 to quantify the density of cortical Gad67-GFP interneurons.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the biostatistic Prism software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Tests used for each experiment, the number of independent experiments, and p values are summarized in Supplementary Table 2.

Results

Immunohistochemical characterization of the pial migratory route in neonate mice

Several research groups reported that a significant number of GABA interneurons are still migrating in the superficial cortical layers at birth and during the early postnatal life of both mouse [9] and human [18] neonates. However, most previous studies referring to vessel-associated migration were performed during embryonic stages [11, 32]. Based on these statements, we performed immunohistochemistry experiments on the pial migratory route in P2 neonate mice (Fig. 1). CD31 immunolabeling revealed a thin network of microvessels lining the developing superficial cortical layers (Fig. 1A, B; arrowheads) and radial perforating microvessels (Fig. 1A, B; arrows). Co-labeling experiments using CD31 and GFAP antibodies revealed a single row of astrocytes with radial-oriented short processes entering the superficial cortical layers (Supplementary Fig. 1A-C; arrows). DCX immunohistochemistry also showed tangentially oriented cells lining the inner face of the pial migratory route (Supplementary Fig. 1D-F; arrows). At low magnification, confocal acquisitions confirmed the presence of DCX-positive cells lining the PMR and revealed cell clusters stacking at the junction between the PMR and radial cortical microvessels (Fig. 1C-D; arrows). Co-labeled DCX-GABA cells with a tangential orientation were observed along the PMR (Fig. 1E) and a linescan analysis of triple-labeled DCX-GABA-CD31 cortical slices showed that both DCX and GABA immunoreactive profiles overlapped and were localized just below pial vessels (Fig. 1F-H). In addition, confocal acquisitions at low magnification of double immunolabeling experiments targeting GABA and CD31 clearly showed a preferential while not exclusive association of GABA interneurons with radial microvessels in the superficial cortical layers (Fig. 1I and Supplementary Fig. 1G). Quantitative analysis revealed different “vessel-association” patterns between superficial and deep cortical layers at P2; the proportion of interneurons interacting with microvessels being significantly more important in the superficial layers of the developing cortex (Fig. 1J). These data indicate that in mouse neonates, late migrating GABA interneurons are interacting with vessels from the pial migratory route and radial microvessels from the superficial cortical layers.

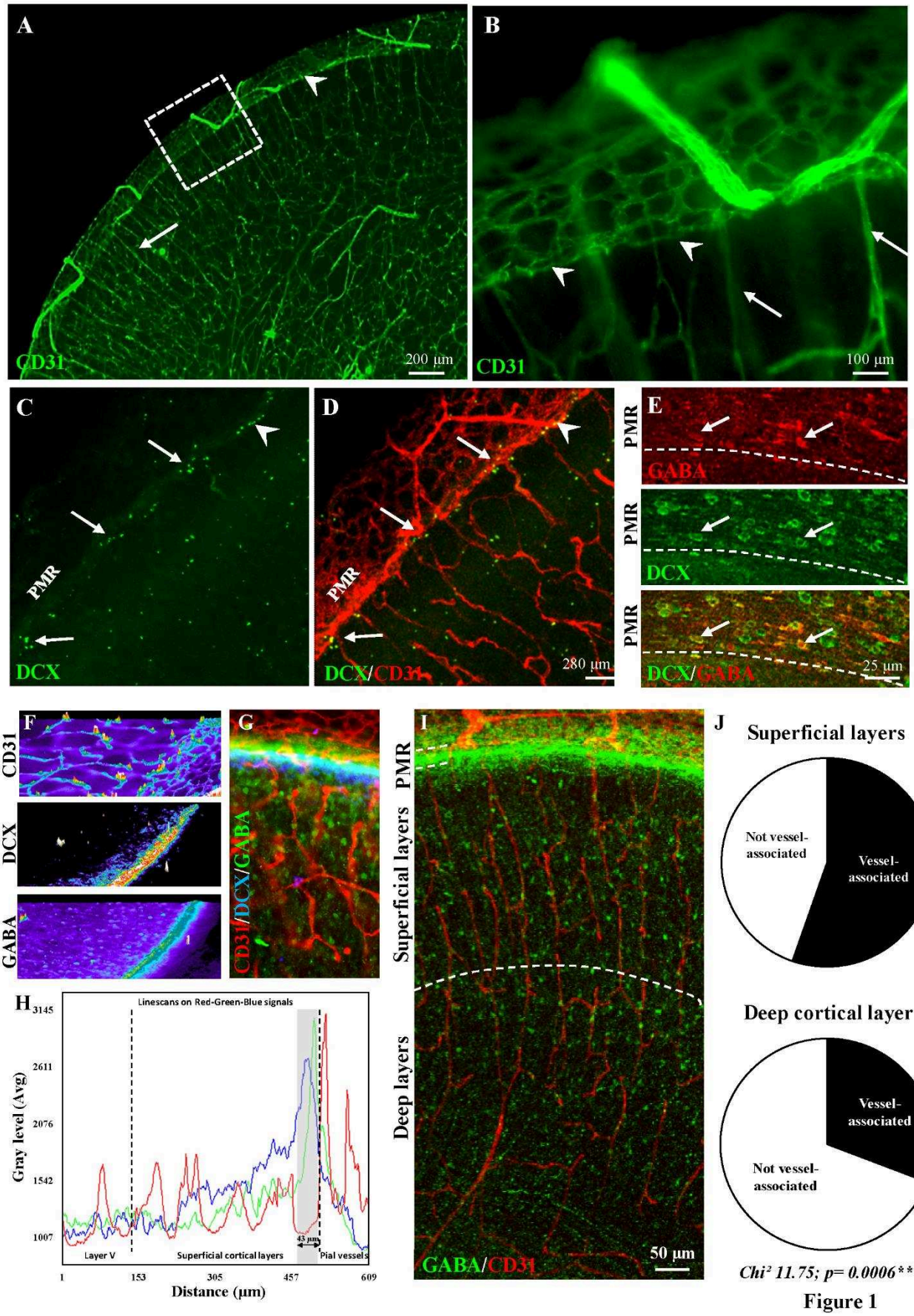

A
CD31
200 µm
B
CD31
100 µm
C
PMR
DCX
D
PMR
DCX/CD31
280 µm
E
PMR
GABA
PMR
DCX
PMR
DCX/GABA
25 µm
F
CD31
DCX
GABA
G
CD31/DCX/GABA
H
Linescans on Red-Green-Blue signals
Gray level (Avg)
3145
2611
2076
1542
1007
Layer V
Superficial cortical layers
43 µm
Pial vessels
1
153
305
457
609
Distance (µm)
I
PMR
Superficial layers
Deep layers
GABA/CD31
50 µm
J
Superficial layers
Not vessel-associated
Vessel-associated
Deep cortical layers
Vessel-associated
Not vessel-associated
Chi² 11.75; p= 0.0006***

Figure 1

NMDA receptors impact MMP-9 activity in the pial migratory route

Recent studies showed transcriptomic and proteomic specificities of cortical microvessels in neonate mice [1]. In particular, the expression of NMDA receptors is exacerbated in neonatal endothelial cells when compared to adults [6]. However, the distribution pattern of endothelial NMDA receptors in the developing cortex and the possible interactions with the pial migratory route was unknown. GluN1 immunohistochemistry experiments performed on P2 cortices showed intense immunolabeling in radial glia with numerous terminal processes ending at the level of the pial migratory route (Fig. 2A; arrows). GluN1 immunoreactivity was also detected in endothelial cells from the pial migratory route as well as in radial microvessels (Fig. 2B-D; arrowheads). Although MMP-9 is well known to contribute to the pathophysiology of several diseases involving dysfunction of the neurovascular unit during stroke [33] or dysregulation of cell migration with cancers [34], the contribution of MMP-9 to the control of vasculo-dependent neuronal migration has never been investigated. Immunohistochemistry showed strong MMP-9 labeling at the level of the pial migratory route (Fig. 2E-G). Interestingly, MMP-9 immunolabeling was preferentially localized in the inner face of the pial vessels where migrating GABA interneurons are observed (Fig. 2E-G; arrows). Gel zymography experiments performed with P2 cultured cortical extracts showed that glutamate induces a concentration-dependent increase of MMP-9 activity ($p<0.05$; Fig. 2H). The glutamate-induced increase of MMP-9 activity was abolished by the NMDA receptor antagonist MK801 (20 µM; $p<0.01$; Fig. 2I) and by the MMP-9 inhibitor SB-3CT (10 µM; $p<0.001$; Fig. 2J).

Because gel zymography performed on P2 cortical extracts provided data regarding MMP-9 activity but gave no information regarding histological localization, we also performed real-time *in situ* zymography for cultured P2 cortical slices using DQ-gelatin-FITC (Fig. 3A-G). Co-labeling of cortical microvessels with isolectin-B4-TRITC revealed that gelatinase activity was predominantly vascular and detected in the pial vessels (Fig. 3A-C). Time-lapse acquisition also showed gelatinase activity in radial microvessels restricted to the superficial cortical layers (Fig. 3F, G; arrows). Quantification of the gelatinase activity showed that glutamate (100 µM) induces significant ($p<0.0001$) and time-dependent increases of DQ-gelatin-FITC proteolysis (Fig. 3H). This effect was abrogated by MK801 (20 µM; Fig. 3H) as well as by SB-3CT (10 µM; Fig. 3I). These data indicate that in P2 cortical slices, glutamate is able to stimulate MMP-9 activity in vessels from the pial migratory route through an NMDA receptor–dependent mechanism.

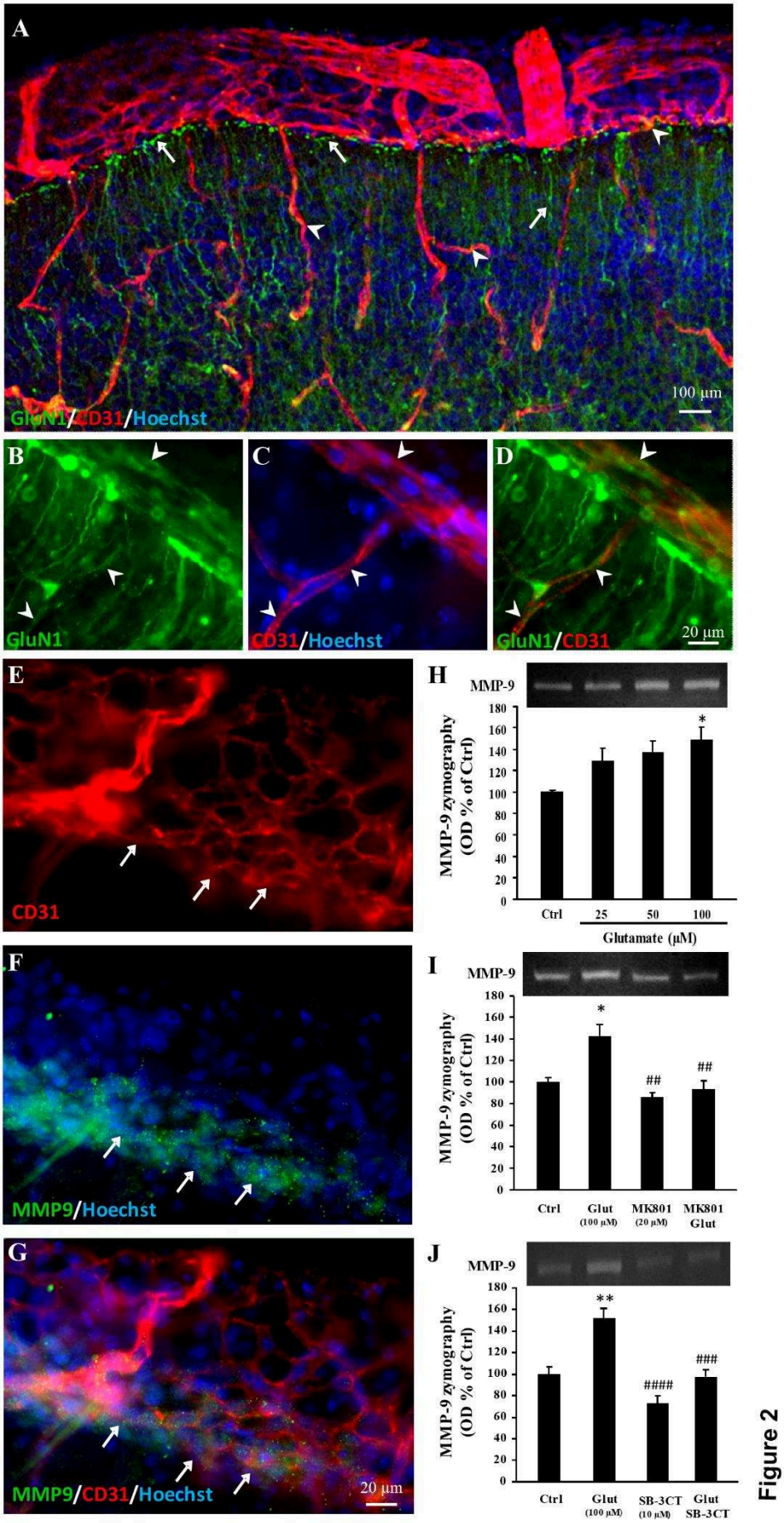
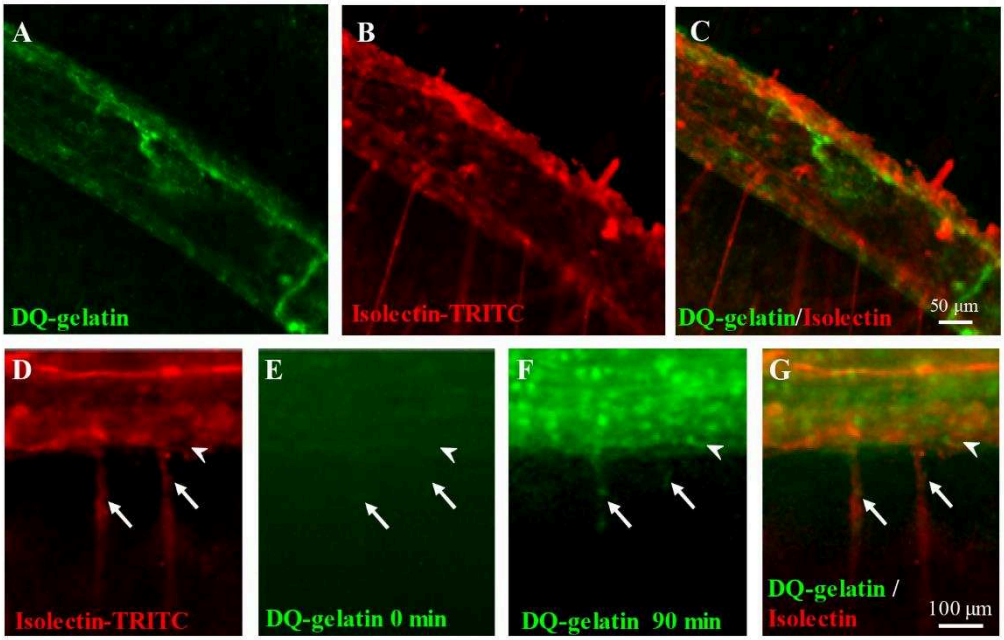

A
GluN1/CD31/Hoechst
100 µm
B
GluN1
C
CD31/Hoechst
D
GluN1/CD31
20 µm
E
CD31
F
MMP9/Hoechst
G
MMP9/CD31/Hoechst
20 µm
H
MMP-9
MMP-9 zymography (OD % of Ctrl)
Ctrl
25
50
100
Glutamate (µM)
I
MMP-9
MMP-9 zymography (OD % of Ctrl)
Ctrl
Glut (100 µM)
MK801 (20 µM)
MK801 Glut
J
MMP-9
MMP-9 zymography (OD % of Ctrl)
Ctrl
Glut (100 µM)
SB-3CT (10 µM)
Glut SB-3CT

Figure 2


A
DQ-gelatin
B
Isolectin-TRITC
C
DQ-gelatin/Isolectin
50 µm
D
Isolectin-TRITC
E
DQ-gelatin 0 min
F
DQ-gelatin 90 min
G
DQ-gelatin /
Isolectin
100 µm

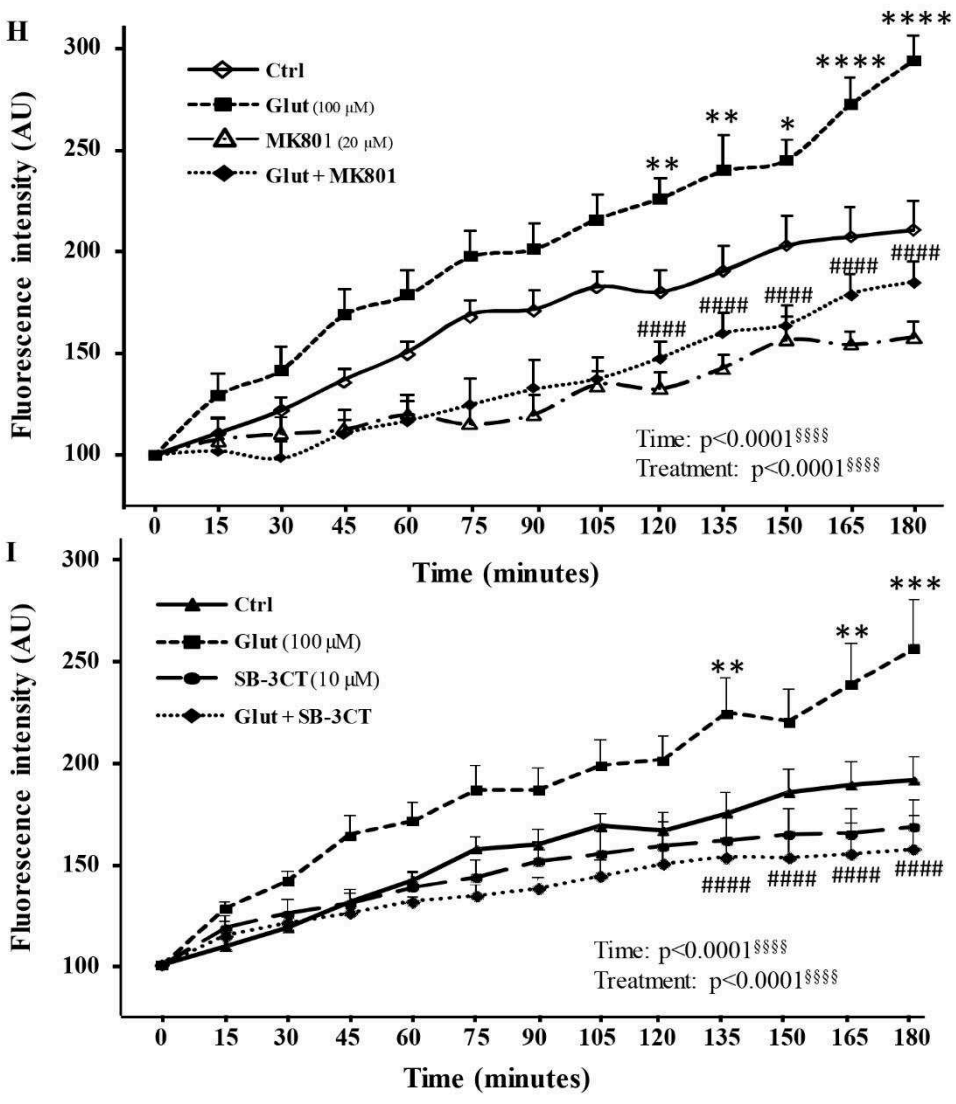

H
Fluorescence intensity (AU)
Ctrl
Glut (100 µM)
MK801 (20 µM)
Glut + MK801
Time: p<0.0001§§§§
Treatment: p<0.0001§§§§
Time (minutes)
I
Fluorescence intensity (AU)
Ctrl
Glut (100 µM)
SB-3CT (10 µM)
Glut + SB-3CT
Time: p<0.0001§§§§
Treatment: p<0.0001§§§§
Time (minutes)

Figure 3

Glutamate controls t-PA activity in the pial migratory route

Previous studies have reported that t-PA is able to promote MMP-9 activation in a pathological context [35]. However, other research groups mentioned delayed neuronal migration in t-PA$^{-/-}$ mice [36]. Considering this literature, it was tempting to speculate the contribution of t-PA to the control of MMP-9 activity in the pial migratory route. Immunohistochemistry experiments revealed intense t-PA labeling in both the pial and radial microvessels entering the superficial cortical layers (Fig. 4A; arrows). In addition, gel zymography experiments indicated that 6-h incubation of cultured P2 cortical slices with glutamate (100 µM) induces a significant increase in t-PA activity ($p<0.01$; Fig. 4B). This effect was blocked by MK801 (20 µM; $p<0.05$; Fig. 4B) and the t-PA inhibitor PAI-1 (5 nM; $p<0.05$; Fig. 4C). Real-time *in situ* zymography performed on P2 cortical slices using DQ-casein-FITC showed that protease activity was localized in vessels bordering the pial migratory route (arrowheads) as well as in cortical radial microvessels (Fig. 4D-F; arrows). Quantification indicated that glutamate (100 µM) induced a time-dependent and significant increase of the DQ-casein-FITC proteolysis ($p<0.0001$; Fig. 4G). This effect of glutamate was abrogated by MK801 ($p<0.0001$; Fig. 4G). In addition, gel and *in situ* zymography revealed that treatment of P2 cortical slices from t-PA$^{-/-}$ mice with glutamate (100 µM) failed to stimulate MMP-9 activity (Fig. 4H, I). These data indicate that glutamate is able to stimulate t-PA activity in vessels from the pial migratory route through an NMDA receptor–dependent mechanism and that glutamate-induced MMP-9 activation is t-PA–dependent.

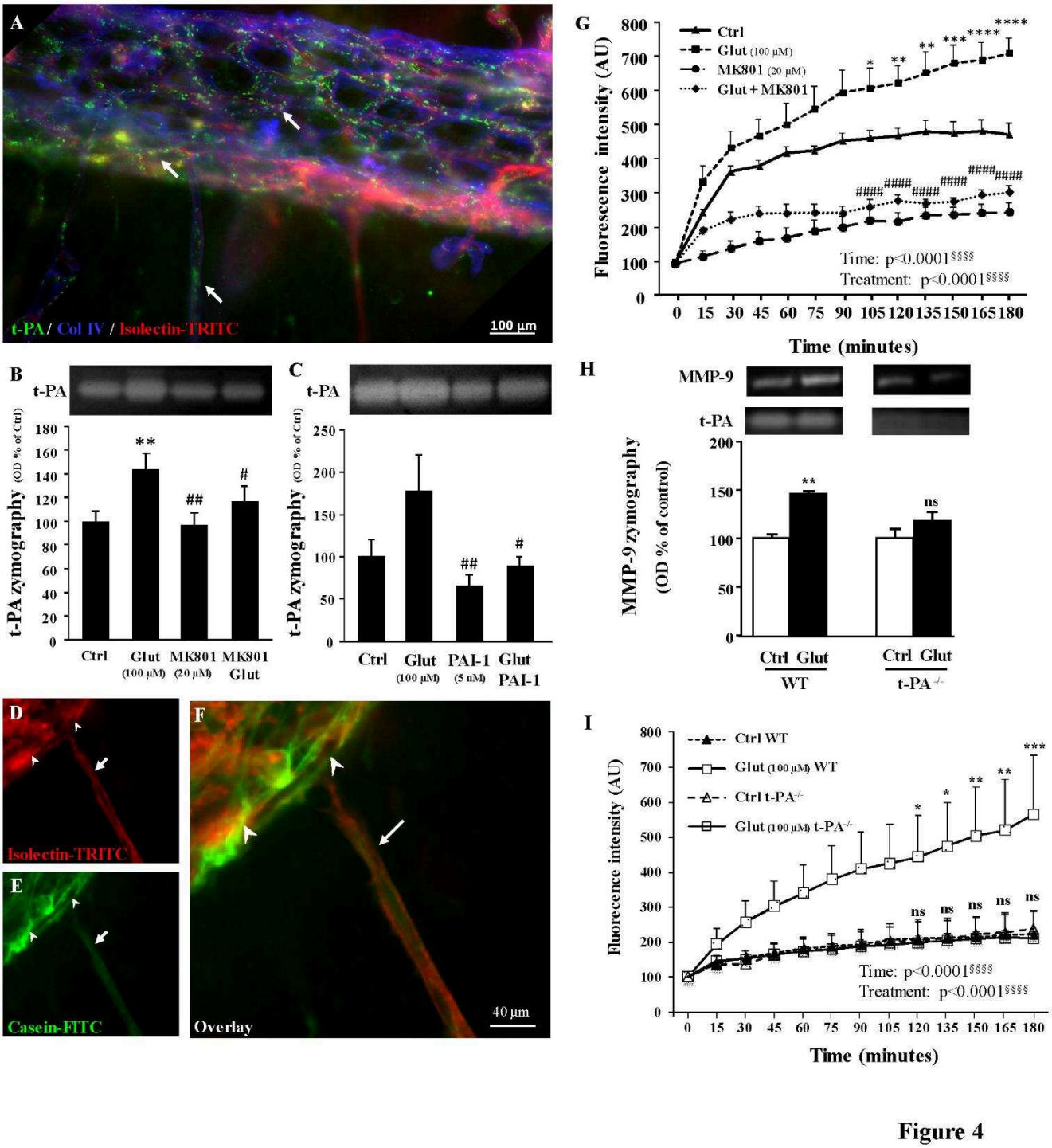
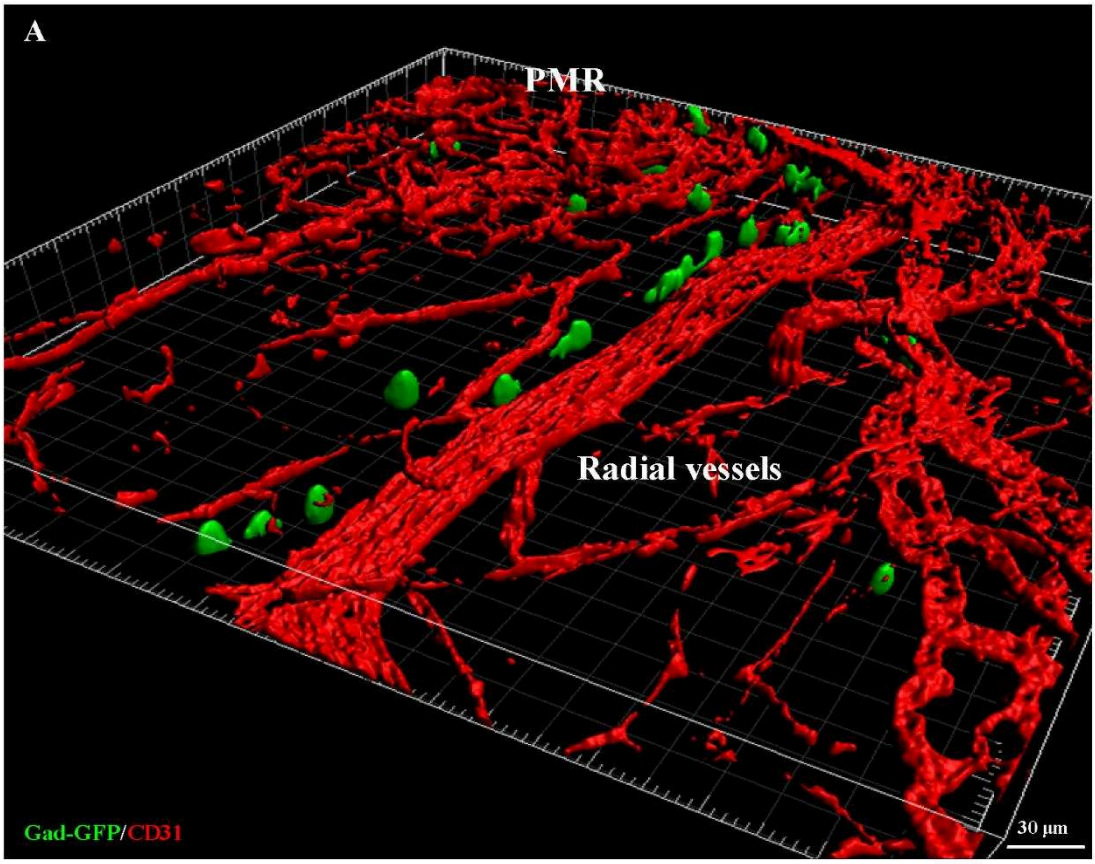
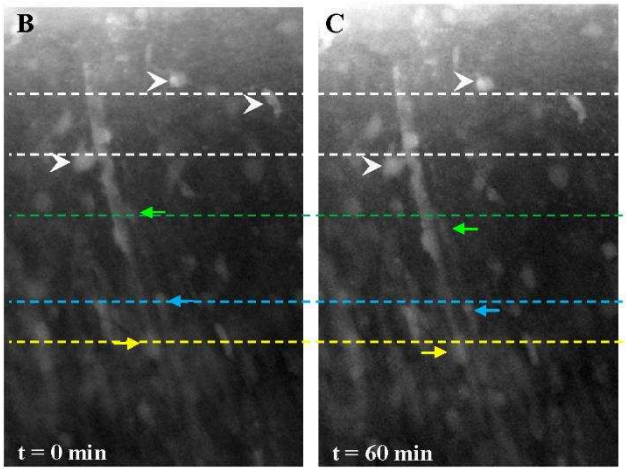

A
t-PA / Col IV / Isolectin-TRITC
100 µm
B
t-PA
t-PA zymography (OD % of Ctrl)
Ctrl
Glut (100 µM)
MK801 (20 µM)
MK801 Glut
C
t-PA
t-PA zymography (OD % of Ctrl)
Ctrl
Glut (100 µM)
PAI-1 (5 nM)
Glut PAI-1
D
Isolectin-TRITC
E
Casein-FITC
F
Overlay
40 µm
G
Fluorescence intensity (AU)
Ctrl
Glut (100 µM)
MK801 (20 µM)
Glut + MK801
Time: p<0.0001§§§§
Treatment: p<0.0001§§§§
Time (minutes)
H
MMP-9
t-PA
MMP-9 zymography (OD % of control)
Ctrl Glut
WT
Ctrl Glut
t-PA-/-
I
Fluorescence intensity (AU)
Ctrl WT
Glut (100 µM) WT
Ctrl t-PA-/-
Glut (100 µM) t-PA-/-
Time: p<0.0001§§§§
Treatment: p<0.0001§§§§
Time (minutes)

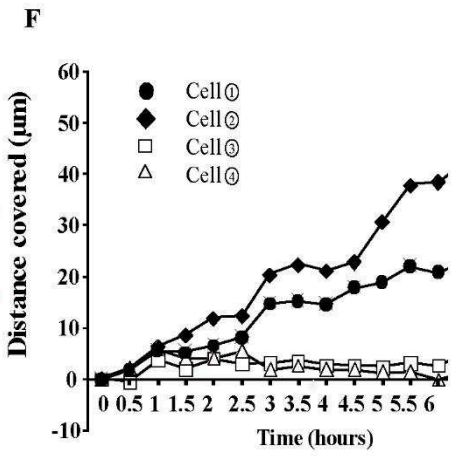
Figure 4

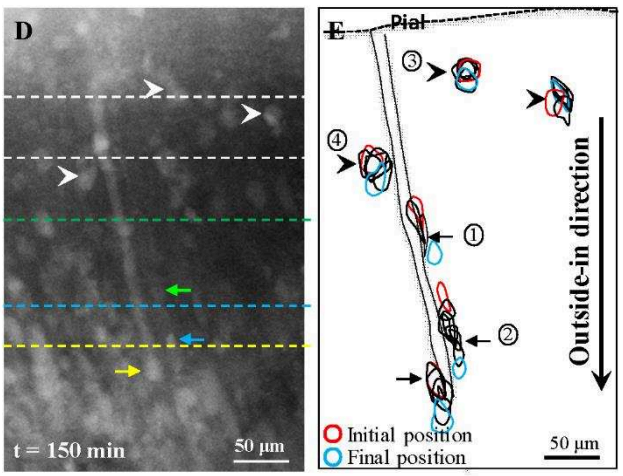
Glutamate controls vascular-dependent migration of GABA interneurons in the pial migratory route

Because t-PA and MMP-9 are involved in the remodeling of the extracellular matrix following ischemic stroke [37], and because the present study revealed NMDA-dependent effects of glutamate on the endothelial activity of these two proteases, we hypothesized that glutamate could regulate the vascular-dependent migration of GABA interneurons along the pial migratory route. Gad67-GFP mice whose neurons are known to populate the superficial cortical layers [26] confirmed the preferential association with microvessels at P2 (Fig. 5A; Supplementary Fig. 2). Moreover, to investigate the effects of glutamate on the migration of GABAergic cells along the PMR and radial vessels, we performed time-lapse acquisitions using a confocal laser scanning macroscope (Fig. 5B-G). Time-lapse acquisitions revealed several cells migrating in an outside-in direction in close interaction with microvessels (Fig. 5B-E; arrows; Supplementary video). Some cells close to microvessels covered up to 40 µm of distances during the first 6 h of recording (Fig. 5F). The addition of glutamate (50 µM) to the culture medium significantly increased the maximal speed of both tangential and radial migrating cells ($p<0.01$; Fig. 5G). In contrast, incubation of the slices with MK801 (20 µM) reduced cell migration ($p<0.001$; Fig. 5G). These data indicate that in neonates, glutamate stimulates the vascular-dependent migration of GABA interneurons through an NMDA receptor–dependent mechanism.


A
PMR
Radial vessels
Gad-GFP/CD31
30 µm


B
t = 0 min
C
t = 60 min


F
Distance covered (µm)
Cell①
Cell②
Cell③
Cell④
Time (hours)


D
t = 150 min
50 µm
E
Pial
Outside-in direction
Initial position
Final position
50 µm

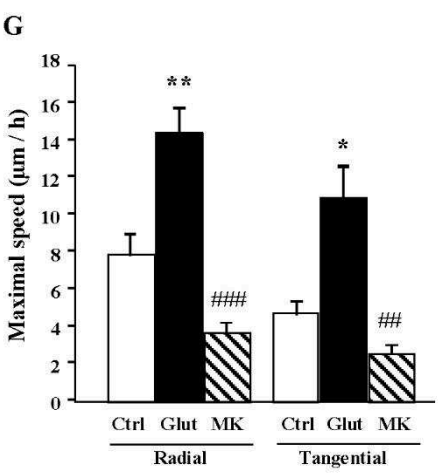

G
Maximal speed (µm / h)
**
*
###
##
Ctrl
Glut
MK
Radial
Tangential

Figure 5

t-PA invalidation and *in vivo* MMP inhibition impair the integration of GABA interneurons migrating via the pial migratory route

To research developmental consequences of the impairment of t-PA and MMP activities characterized in pial and radial microvessels during perinatal life, we performed histological and behavioral studies in t-PA$^{-/-}$ and double transgenic Gad67-GFP/t-PA$^{-/-}$ mice (Fig. 6). Double immunolabeling experiments targeting GABA and CD31 revealed a marked reduction of the PMR thickness in P2 t-PA$^{-/-}$ mice ($p<0.01$; Fig. 6A-E). In addition, immunohistochemistry showed that, in t-PA$^{-/-}$ mice, the distance of GABA interneurons from the PMR was significantly reduced ($p<0.001$; Fig. 6A-E). Because a major phase of elimination/maturation of the GABAergic neurons has been described during the first 2 weeks postnatally [38], we investigated spine morphology of Gad67-GFP neurons at P15. Confocal microscopy acquisition in superficial layers II-IV of P15 Gad67-GFP/t-PA^{wt} revealed several GABAergic neurons with dendritic spines (Fig. 6F). The 3D image analysis with the Imaris *Filament tracer* application allowed discrimination of three subtypes of spines (mushrooms, filipodia, and stubbies; Fig. 6G). Quantification showed no significant differences in spine density between Gad67-GFP/t-PA^{WT} and Gad67-GFP/t-PA$^{-/-}$ mice (Fig. 6H). In contrast, the distribution of spine subtypes was significantly impaired (Fig. 6I). In particular, the proportion of filipodia was increased in P15 Gad67-GFP/t-PA$^{-/-}$ mice ($p<0.05$; Fig. 6I). Furthermore, behavioral experiments showed that morphometric and cellular impairments observed in t-PA$^{-/-}$ mice at P15 were associated with locomotor troubles; indeed, a marked increase in the total distance covered was found in male and female t-PA$^{-/-}$ mice at P15 ($p<0.01$ for females and males; Fig. 6J). Previous reports indicated that *in vivo* administration of the MMP inhibitor GM6001 was able to impact vascular remodeling in mouse brain [39], we consequently investigated the effects of a daily injection of GM6001 (10 mg/kg) during perinatal life in Gad67-GFP mice (Fig. 6K-N). As observed in t-PA$^{-/-}$ mice (Supplementary Fig. 3), data revealed a marked reduction in the density of Gad67-GFP neurons at P15 in the superficial cortical layers of animals *in vivo*-exposed to GM6001 during perinatal life ($p<0.001$ for females and males; Fig. 6K-M). In addition, several ectopic cells were observed in deep cortical layers (Fig. 6K,L,N; arrows). Altogether, these data indicate that impairment of vascular proteases affects the positioning of GABAergic interneurons populating the superficial cortical layers and this cellular phenotype is associated with exacerbated locomotor activity in t-PA null mice.

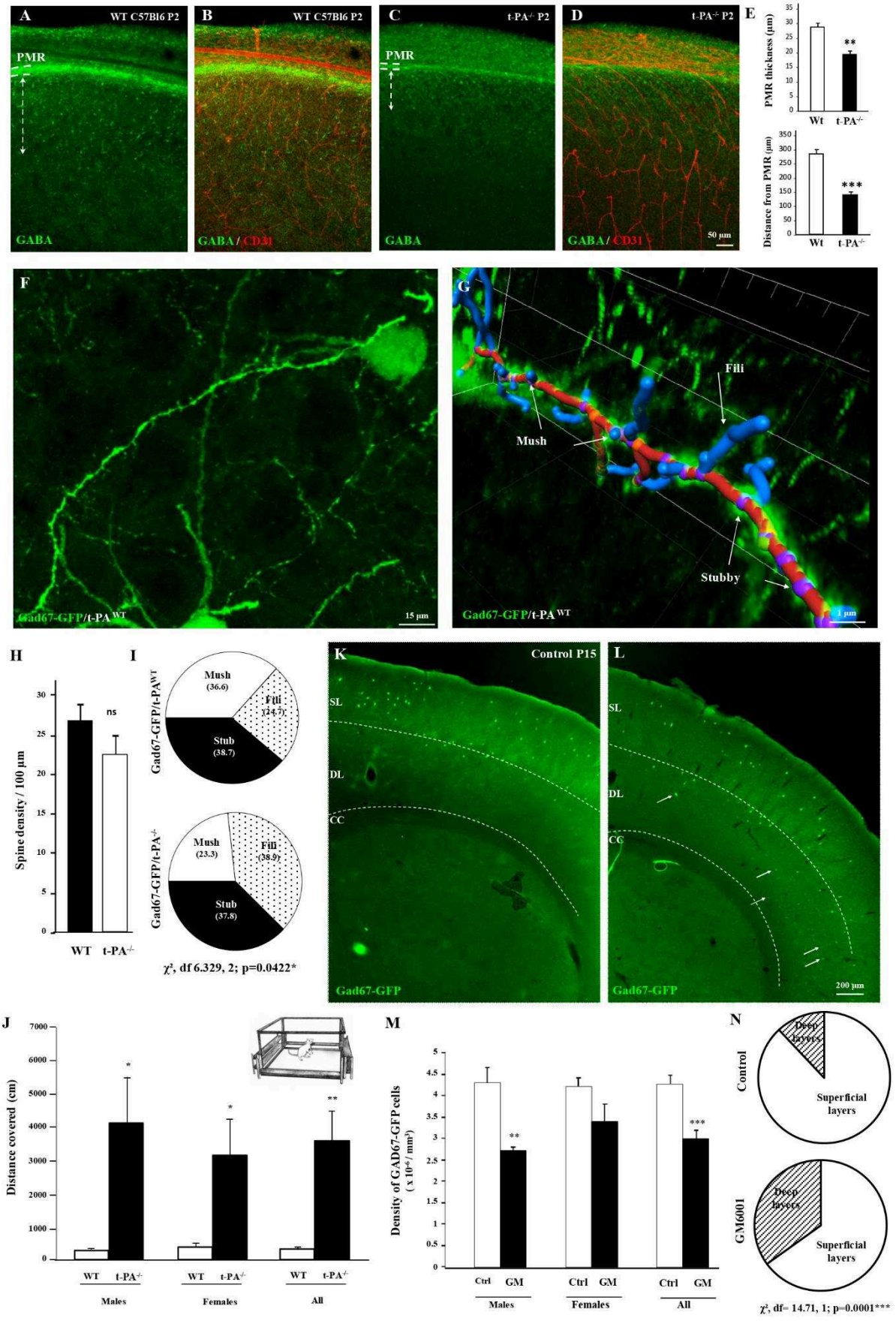

A
WT C57Bl6 P2
PMR
GABA
B
WT C57Bl6 P2
GABA / CD31
C
t-PA-/- P2
PMR
GABA
D
t-PA-/- P2
GABA / CD31
50 µm
E
PMR thickness (µm)
Wt
t-PA-/-
**
Distance from PMR (µm)
***
F
Gad67-GFP/t-PA WT
15 µm
G
Fili
Mush
Stubby
Gad67-GFP/t-PA WT
1 µm
H
Spine density / 100 µm
ns
WT
t-PA-/-
I
Gad67-GFP/t-PA WT
Mush (36.6)
Fili (24.7)
Stub (38.7)
Gad67-GFP/t-PA-/-
Mush (23.3)
Fili (38.9)
Stub (37.8)
χ², df 6.329, 2; p=0.0422*
K
Control P15
SL
DL
CC
Gad67-GFP
L
SL
DL
CG
Gad67-GFP
200 µm
J
Distance covered (cm)
WT
t-PA-/-
Males
Females
All
M
Density of GAD67-GFP cells (x 10-6 / mm3)
Ctrl
GM
Males
Females
All
N
Control
Deep layers
Superficial layers
GM6001
Deep layers
Superficial layers
χ², df= 14.71, 1; p=0.0001***

Figure 6

The positioning of GABA interneurons populating the superficial cortical layers is impaired in Grin1^{flox}/VeCa^{Cre} mice

Previous studies reported the expression of NMDA receptors by migrating GABAergic precursors [40]. In order to reinforce the demonstration of a direct contribution of the endothelial NMDA receptor on migrating GABA interneurons in the PMR and superficial cortical layers, we used Grin1^{flox}/VeCadherin^{CRE} mice (Fig. 7A,B). Major phenotypic abnormalities were observed regarding the positioning of GABA interneurons at two developmental stages. At birth, the thickness of the PMR was strongly reduced in Grin1^{flox}/VeCadherin^{CRE} mice ($p<0.0001$; Fig. 7C,D). This effect was associated with a significant decrease of the GABA interneuron density in the developing superficial layers ($p<0.01$; Fig. 7C,E). In adults, the cortical positioning of GABA interneurons remained clearly impaired in Grin1^{flox}/VeCadherin^{CRE} mice (Fig. 7F-I). In particular, a strong depopulation of Gad67-immunoreactive interneurons was observed and quantified in the superficial cortical layers II, III and IV ($p<0.001$; $p<0.0001$; $p<0.0001$; Fig. 7J). Interestingly, ectopic cells were found in layer V and the thickness of layer I was significantly increased in Grin1^{flox}/VeCadherin^{CRE} mice ($p<0.0001$; Fig. 7G,K). These results strongly support the contribution of the endothelial NMDA receptor for a correct positioning of GABA interneurons populating the superficial cortical layers.

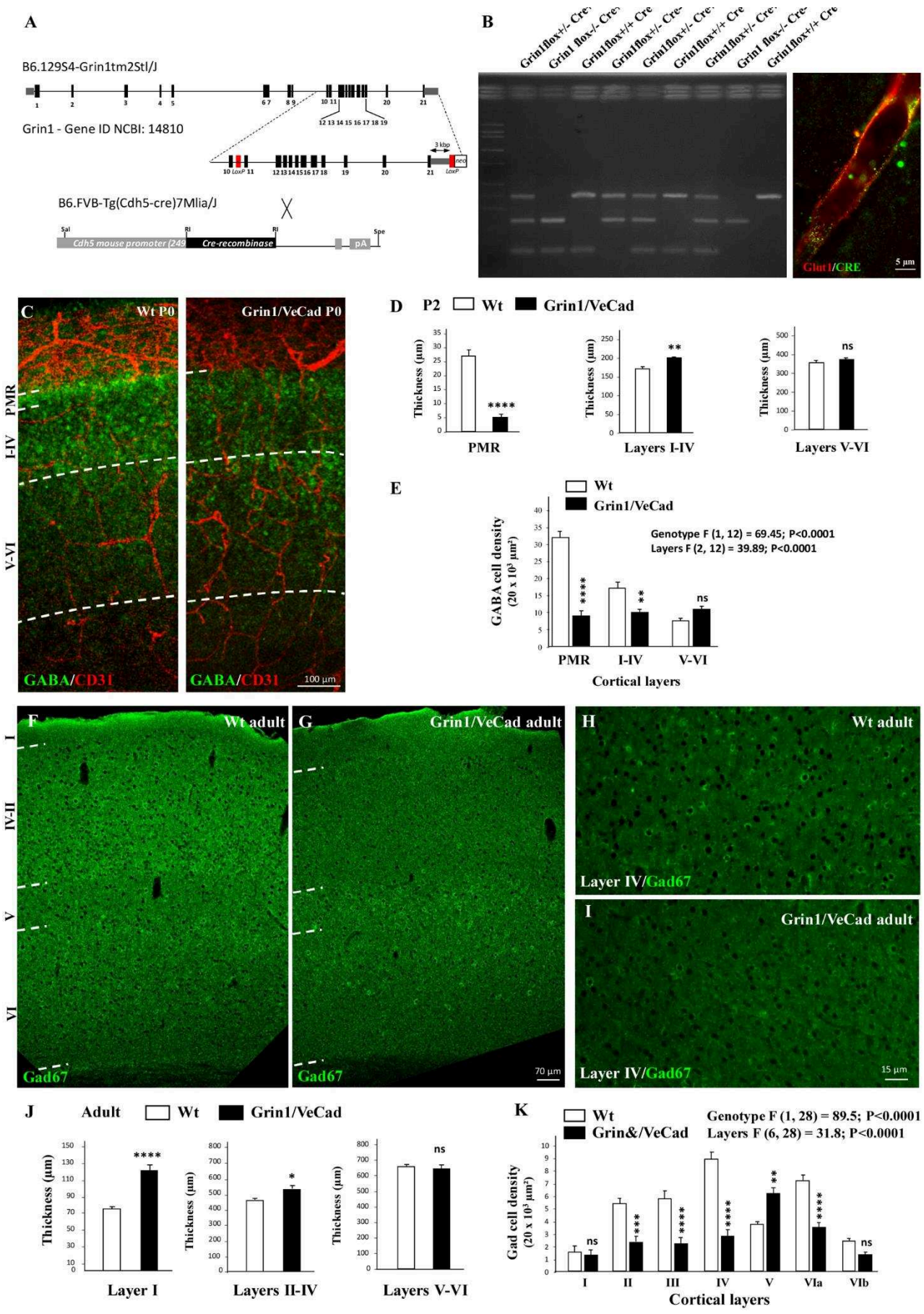

A
B6.129S4-Grin1tm2Stl/J
Grin1 - Gene ID NCBI: 14810
B6.FVB-Tg(Cdh5-cre)7Mlia/J
Cdh5 mouse promoter (249
Cre-recombinase
pA
B
Glut1/CRE
5 µm
C
Wt P0
Grin1/VeCad P0
PMR
I-IV
V-VI
GABA/CD31
100 µm
D
P2
Wt
Grin1/VeCad
Thickness (µm)
PMR
Layers I-IV
Layers V-VI
ns
E
GABA cell density
(20 x 10³ µm²)
Genotype F (1, 12) = 69.45; P<0.0001
Layers F (2, 12) = 39.89; P<0.0001
Cortical layers
F
Wt adult
G
Grin1/VeCad adult
H
Layer IV/Gad67
I
Gad67
70 µm
15 µm
J
Adult
Layer I
Layers II-IV
Layers V-VI
K
Grin&/VeCad
Genotype F (1, 28) = 89.5; P<0.0001
Layers F (6, 28) = 31.8; P<0.0001
Gad cell density
(20 x 10³ µm²)
I
II
III
IV
V
VIa
VIb

Figure 7

Discussion

Literature suggests that exposure of the developing brain to NMDA antagonists during perinatal life is deleterious for the survival of immature GABA interneurons [13, 16, 17]. In humans, as well as in rodents, numerous GABAergic interneurons are still migrating during late gestation and even after birth [9, 18]. This process has been shown to be vasculo-dependent [11]. Moreover, *in vitro* studies revealed age-specific expression of functional NMDA receptors by endothelial cells during perinatal life [6, 41] and, interestingly, at a pathological level, several recent studies reported links between NMDA receptor hypofunction during early life and GABA interneurons that could contribute to adult diseases [22-24]. Based on these statements, we hypothesized that glutamate would contribute to the control of the vasculo-dependent migration of immature GABA interneurons by modulating the endothelial NMDA receptor.

Using WT and transgenic (Gad67-GFP, Gad67-GFP/t-PA$^{-/-}$, Grin1^{flox}/VeCad^{Cre}) mice, highlights of the present study are ***i)*** glutamate induces a NMDA-dependent increase of MMP-9 and t-PA activities in microvessels along the pial migratory route and radial cortical microvessels in superficial layers, ***ii)*** there is a strong association of GABA interneurons with radial microvessels in the developing cortical layers, ***iii)*** glutamate induces a NMDA-dependent increase of the migration speed of immature GABA interneurons along the pial migratory route and radial cortical vessels, ***iv)*** effects of glutamate on MMP-9 activity is t-PA dependent and t-PA invalidation impairs the positioning of GABA interneurons in the superficial cortical layers, and ***v)*** a depopulation of GABA interneurons occurs in superficial cortical layers in mice exposed perinatally to the MMP inhibitor GM6001 and in Grin1^{flox}/VeCad^{Cre} mice.

Glutamate regulates MMP-9 and t-PA activities in cortical microvessels

Although the vasculo-dependent migration of GABAergic interneurons along the pial migratory route has been clearly shown [10], cellular interactions and molecular mechanisms are poorly understood. It has been shown that deletion of VEGF from endothelial cells resulted in impaired angiogenesis and marked alteration of the GABAergic cortical lamination reinforcing the contribution of microvessels to GABAergic neuronal migration [42]. Moreover, several studies showed that migration of GABAergic neurons requires a close relationship with excitatory pyramidal cells [12, 43]. For example, recent data revealed that neuregulin 3

expressed by pyramidal excitatory neurons acts as a chemoattractive factor for GABAergic interneurons [12]. Nevertheless, very few data are available regarding mechanisms able to regulate the vasculo-dependent migration of GABA interneurons. Using transcriptomic, proteomic, and pharmacological approaches, we previously showed that endothelial cells from neonate mice present specific phenotypic characteristics and, in particular, express high levels of functional NMDA receptors [1, 6, 41]. In line with this notion, glutamate has been shown in pathological conditions such as stroke to exacerbate the release and recycling activity of the endothelial proteases MMP-9 [44] and t-PA [45, 46]. Taken together, these data suggest that excitatory neurons would be able to regulate endothelial cell activity not only in pathological conditions but also in a developmental context. Consistent with this hypothesis, the present study showed that both MMP-9 and t-PA immunoreactivities were detected in microvessels from the PMR, whereas gel and *in situ* zymography revealed that glutamate induced a dose-dependent and MK801-dependent increase of endothelial MMP-9 and t-PA activities. In addition, the effects of glutamate on the vascular MMP-9 activity were abrogated in t-PA$^{-/-}$ mice. All these data indicate that in mouse neonates, glutamate stimulates MMP-9 activity in vessels from the PMR through NMDA receptor–dependent and t-PA–dependent mechanisms.

Glutamate stimulates the vasculo-dependent migration of GABA interneurons *via* an NMDA-dependent mechanism

In the mature brain, neurotransmitters are mainly released in synapses for communication between neurons [47]. However, during nervous system development, a trophic role of neurotransmitters implies neuronal release before their axons establish contacts with their target cells. Even if there is increasing evidence of such physiological roles, these extrasynaptic trophic roles are less understood [47]. Because MMP-9 is involved in proteolysis of the extracellular matrix [48], our data prompted us to investigate glutamate effects on the vasculo-dependent migration of GABA interneurons. Using immunohistochemistry performed from birth to P2, our data clearly showed a close interaction of GABA interneurons with microvessels of the cortical superficial layers. Video-tracking experiments indicated that glutamate was able to stimulate both tangential and radial vessel-associated migration, whereas MK801 induced an opposite effect. Consistent with these data, recent studies showed that neuronal projections from pyramidal cells are able to release factors such as

neuregulin 3 that are involved in the control of GABA interneuron positioning [43, 49], and several lines of evidence indicated that glutamate released by excitatory cells in the developing brain can act as a guidance cue for migrating cells [50]. Altogether, the present data support that glutamate impacts endothelial protease activity *via* NMDA receptors and promotes the vasculo-dependent migration of GABA interneurons.

t-PA invalidation and *in vivo* treatment with GM6001 alter the cortical positioning of GABA interneurons in superficial layers

During embryonic life, interneurons migrate tangentially and then switch their mode of migration from tangential to radial as they invade the cortical plate [10, 51]. Whereas cells from MGE and CGE take similar tangential migration paths with migrating above and below the cortical plate [51], an important sorting of GABA interneurons occurs during the first 2 postnatal weeks, leading to the final layer-specific positioning [38]. This developmental time-course prompt us to quantify the cortical positioning of GABA interneurons at P15. The results showed that in the superficial cortical layers, the density of Gad67-GFP interneurons as well as somatostatin-immunoreactive neurons was markedly reduced in both t-PA$^{-/-}$ and GM6001-treated mice. In addition, because several studies reported dendritic spines in interneurons [52, 53], we analyzed spine morphology in the cortex of double mutant Gad67-GFP/tPA$^{-/-}$ mice. Data revealed that in t-PA null mice, the distribution of dendritic spines was significantly impaired with an increased proportion of filipodia. These morphometric impairments were associated with an exacerbated locomotor activity of t-PA$^{-/-}$ mice at P15. Interestingly, several studies previously described long-term behavioral troubles of t-PA null mice related to disinhibition [54, 55]. All these data suggest that the dysregulation of two endothelial proteases are associated with altered positioning of GABA interneurons populating the superficial cortical layers. These results also open new research avenues and raise new questioning regarding whether the positioning of GABA interneurons would be impaired in animals perinatally exposed to factors such as ketamine or in MMP-9 null mice.

The positioning of GABA interneurons in the cortical superficial layers is impaired in Grin1^{flox}/VeCad^{Cre} mice

Previous *in vitro* studies revealed that neonatal endothelial cells express NMDA receptors [6]. In particular, glutamate was shown to induce a MK801-dependent activation of MMP-9 in

cultured endothelial cells supporting a direct effect of glutamate on this cell type. However, because in the developing brain NMDA receptors are expressed by numerous cell types including immature GABA interneurons [40], we characterized the positioning of GABA interneurons in Grin1^{flox}/VeCad^{Cre} mice. At birth, data revealed a marked reduction of the PMR thickness and a significant depopulation of GABA interneurons in the developing superficial layers. Similarly, in adult Grin1^{flox}/VeCad^{Cre} mice, the positioning of GABA interneurons in the cortical superficial layers I-IV was markedly impaired with a strong decreased of Gad67 immunoreactive neurons. In addition, numerous ectopic cells were found in the cortical layer V. Interestingly, the presence of ectopic cells in deep layers was also observed in animals *in vivo*-exposed to GM6001. The presence of such ectopic cells would be explained by distinct mechanisms regulating the deep and the pial migratory routes [10]. Interestingly, in alcohol-exposed animal models, it has been also described a depopulation of GABA interneurons in superficial cortical layers while ectopic cells were found in layer V [56]. Taken together, it is tempting to bring together our present data and the NMDA-antagonist properties of alcohol.

In conclusion, results from the present study support a role of the endothelial NMDA receptor in the control of the late vasculo-dependent migration of GABA interneurons populating the superficial cortical layers. They show that glutamate regulates the activity of endothelial cells and, in particular, the activity of two endothelial proteases, *i.e.*, MMP-9 and t-PA, *via* an NMDA-dependent mechanism. They also indicate that glutamate promotes the vessel-associated GABAergic neuronal migration through NMDA receptor and t-PA–dependent mechanisms. At a pathophysiological level, the present data reinforce the debate regarding the use of molecules with NMDA antagonist properties such as anesthetics during perinatal life when a late vasculo-dependent migration of interneurons still occurs.

Acknowledgements

This work was supported by the Normandy University (ERI28, UMR1245), the Institut National de la Santé et Recherche Médicale (INSERM; ERI28, UMR1245), the Conseil Régional de Normandie, the LARC-Neuroscience network, and the Regional Platform for Cell Imaging (PRIMACEN), the Fondation Paralysie Cérébrale, the Fondation de France. This study is labeled by the competitiveness cluster Medicen-Paris Region. CL is a recipient of a fellowship from the Région Normandie.

References

1. Porte B, Hardouin J, Zerdoumi Y, Derambure C, Hauchecorne M, Dupre N, Obry A, Lequerre T, Bekri S, Gonzalez B, Flaman JM, Marret S, Cosette P, Leroux P (2017) Major remodeling of brain microvessels during neonatal period in the mouse: A proteomic and transcriptomic study. J Cereb Blood Flow Metab 37:495-513.
2. Tan X, Liu WA, Zhang XJ, Shi W, Ren SQ, Li Z, Brown KN, Shi SH (2016) Vascular Influence on Ventral Telencephalic Progenitors and Neocortical Interneuron Production. Dev Cell 36:624-638.
3. Borrell V, Marín O (2006) Meninges control tangential migration of hem-derived Cajal-Retzius cells via CXCL12/CXCR4 signaling. Nat Neurosci 9:1284-1293.
4. Zarbalis K, Choe Y, Siegenthaler JA, Orosco LA, Pleasure SJ (2012) Meningeal defects alter the tangential migration of cortical interneurons in Foxc1hith/hith mice. Neural Dev 7:2.
5. Lecointre M, Hauchecorne M, Chaussivert A, Marret S, Leroux P, Jegou S, Leroux-Nicollet I, Gonzalez BJ, Henry VJ (2014) The efficiency of glutamate uptake differs between neonatal and adult cortical microvascular endothelial cells. J Cereb Blood Flow Metab 34:764-767.
6. Legros H, Launay S, Roussel BD, Marcou-Labarre A, Calbo S, Catteau J, Leroux P, Boyer O, Ali C, Marret S, Vivien D, Laudenbach V (2009) Newborn- and adult-derived brain microvascular endothelial cells show age-related differences in phenotype and glutamate-evoked protease release. J Cereb Blood Flow Metab 29:1146-1158.
7. Barkho BZ, Munoz AE, Li X, Li L, Cunningham LA, Zhao X (2008) Endogenous matrix metalloproteinase (MMP)-3 and MMP-9 promote the differentiation and migration of adult neural progenitor cells in response to chemokines. Stem Cells 26:3139-3149.
8. Siconolfi LB, Seeds NW (2001) Mice lacking tPA, uPA, or plasminogen genes showed delayed functional recovery after sciatic nerve crush. J Neurosci 21:4348-4355.
9. Inada H, Watanabe M, Uchida T, Ishibashi H, Wake H, Nemoto T, Yanagawa Y, Fukuda A, Nabekura J (2011) GABA regulates the multidirectional tangential migration of GABAergic interneurons in living neonatal mice. PLoS One 6:e27048.
10. Luhmann HJ, Fukuda A, Kilb W (2015) Control of cortical neuronal migration by glutamate and GABA. Front Cell Neurosci 9:1-15.
11. Won C, Lin Z, Kumar T P, Li S, Ding L, Elkhal A, Szabó G, Vasudevan A (2013) Autonomous vascular networks synchronize GABA neuron migration in the embryonic forebrain. Nat Commun 4:2149.
12. Bartolini G, Sánchez-Alcañiz JA, Osório C, Valiente M, García-Frigola C, Marín O (2017) Neuregulin 3 mediates cortical plate invasion and laminar allocation of GABAergic interneurons. Cell Rep 18:1157-1170.
13. Aligny C, Roux C, Dourmap N, Ramdani Y, Do-Rego JC, Jégou S, Leroux P, Leroux-Nicollet I, Marret S, Gonzalez BJ (2014) Ketamine alters cortical integration of GABAergic interneurons and induces long-term sex-dependent impairments in transgenic Gad67-GFP mice. Cell Death Dis 5:e1311.
14. Desfeux A, El Ghazi F, Jégou S, Legros H, Marret S, Laudenbach V, Gonzalez BJ. (2010) Dual effect of glutamate on GABAergic interneuron survival during cerebral cortex development in mice neonates. Cereb Cortex. 20:1092-1108.
15. Girault V, Gilard V, Marguet F, Lesueur C, Hauchecorne M, Ramdani Y, Laquerrière A, Marret S, Jégou S, Gonzalez BJ, Brasse-Lagnel C, Bekri S (2017) Prenatal alcohol exposure impairs autophagy in neonatal brain cortical microvessels. Cell Death Dis. 8:e2610.
16. Roux C, Aligny C, Lesueur C, Girault V, Brunel V, Ramdani Y, Genty D, Driouich A, Laquerrière A, Marret S, Brasse-Lagnel C, Gonzalez BJ, Bekri S (2015) NMDA receptor blockade in the developing cortex induces autophagy-mediated death of immature cortical GABAergic interneurons: An ex vivo and in vivo study

in Gad67-GFP mice. Exp Neurol 267:177-193.
17. Wang Q, Shen FY, Zou R, Zheng JJ, Yu X, Wang YW (2017) Ketamine-induced apoptosis in the mouse cerebral cortex follows similar characteristic of physiological apoptosis and can be regulated by neuronal activity. Mol Brain 10:24.
18. Xu G, Broadbelt KG, Haynes RL, Folkerth RD, Borenstein NS, Belliveau RA, Trachtenberg FL, Volpe JJ, Kinney HC (2011) Late development of the GABAergic system in the human cerebral cortex and white matter. J Neuropathol Exp Neurol 70:841-858.
19. Bhutta AT (2007) Ketamine: a controversial drug for neonates. Semin Perinatol 31:303-308.
20. Salmeen KE, Jelin AC, Thiet MP (2014) Perinatal neuroprotection. F1000Prime Rep 6:6.
21. Volpe JJ (2009) Brain injury in premature infants: a complex amalgam of destructive and developmental disturbances. Lancet Neurol 8:110-124.
22. Hardingham GE, Do KQ (2016) Linking early-life NMDAR hypofunction and oxidative stress in schizophrenia pathogenesis. Nat Rev Neurosci 17:125-134.
23. Kaushal S, Tamer Z, Opoku F, Forcelli PA (2016) Anticonvulsant drug-induced cell death in the developing white matter of the rodent brain. Epilepsia 57:727-734.
24. Nakazawa K, Jeevakumar V, Nakao K (2017) Spatial and temporal boundaries of NMDA receptor hypofunction leading to schizophrenia. NPJ Schizophr 3:7.
25. Oliva AA Jr, Jiang M, Lam T, Smith KL, Swann JW (2000) Novel hippocampal interneuronal subtypes identified using transgenic mice that express green fluorescent protein in GABAergic interneurons. J Neurosci 20:3354-3368.
26. Carmeliet P, Schoonjans L, Kieckens L, Ream B, Degen J, Bronson R, De Vos R, van den Oord JJ, Collen D, Mulligan RC (1994) Physiological consequences of loss of plasminogen activator gene function in mice. Nature 368:419-424.
27. Marret S, Mukendi R, Gadisseux JF, Gressens P, Evrard P (1995) Effect of ibotenate on brain development: an excitotoxic mouse model of microgyria and posthypoxic-like lesions. J Neuropathol Exp Neurol 54:358-370.
28. Mesplès B, Plaisant F, Fontaine RH, Gressens P (2005) Pathophysiology of neonatal brain lesions: lessons from animal models of excitotoxicity. Acta Paediatr 94:185-190.
29. Roux C, Lesueur C, Aligny C, Brasse-Lagnel C, Genty D, Marret S, Laquerrière A, Bekri S, Gonzalez BJ (2014) 3-MA inhibits autophagy and favors long-term integration of grafted Gad67-GFP GABAergic precursors in the developing neocortex by preventing apoptosis. Cell Transplant 23:1425-1450.
30. Bénard M, Lebon A, Komuro H, Vaudry D, Galas L (2015) Ex vivo imaging of postnatal cerebellar granule cell migration using confocal macroscopy. J Vis Exp 99:e52810.
31. Sifringer M, Stefovska V, Zentner I, Hansen B, Stepulak A, Knaute C, Marzahn J, Ikonomidou C (2007) The role of matrix metalloproteinases in infant traumatic brain injury. Neurobiol Dis 25:526-535.
32. Marín O (2013) Cellular and molecular mechanisms controlling the migration of neocortical interneurons. Eur J Neurosci 38:2019-2029.
33. Zhao BQ, Wang S, Kim HY, Storrie H, Rosen BR, Mooney DJ, Wang X, Lo EH (2006) Role of matrix metalloproteinases in delayed cortical responses after stroke. Nat Med 12:441-445.
34. Joseph JV, van Roosmalen IA, Busschers E, Tomar T, Conroy S, Eggens-Meijer E, Peñaranda Fajardo N, Pore MM, Balasubramanyian V, Wagemakers M, Copray S, den Dunnen WF, Kruyt FA (2015) Serum-induced differentiation of glioblastoma neurospheres leads to enhanced migration/invasion capacity that is associated with increased MMP9. PLoS One 10:e0145393.
35. Chaturvedi M, Kaczmarek L (2014) Mmp-9 inhibition: a therapeutic strategy in ischemic stroke. Mol Neurobiol 49:563-573.
36. Seeds NW, Basham ME, Haffke SP (1999) Neuronal migration is retarded in mice lacking the tissue plasminogen activator gene. Proc Natl Acad Sci U S A 96:14118-14123.
37. Turner RJ, Sharp FR (2016) Implications of MMP9 for blood brain barrier disruption

and hemorrhagic transformation following ischemic stroke. Front Cell Neurosci 4;10:56.
38. Southwell DG, Paredes MF, Galvao RP, Jones DL, Froemke RC, Sebe JY, Alfaro-Cervello C, Tang Y, Garcia-Verdugo JM, Rubenstein JL, Baraban SC, Alvarez-Buylla A (2012) Intrinsically determined cell death of developing cortical interneurons. Nature 491:109-113.
39. Pham LD, Hayakawa K, Seo JH, Nguyen MN, Som AT, Lee BJ, Guo S, Kim KW, Lo EH, Arai K (2012) Crosstalk between oligodendrocytes and cerebral endothelium contributes to vascular remodeling after white matter injury. Glia 60:875-881.
40. Deng R, Kao JPY, Kanold PO (2017) Distinct translaminar glutamatergic circuits to GABAergic interneurons in the neonatal auditory cortex. Cell Rep 19:1141-1150.
41. Henry VJ, Lecointre M, Laudenbach V, Ali C, Macrez R, Jullienne A, Berezowski V, Carmeliet P, Vivien D, Marret S, Gonzalez BJ, Leroux P (2013) High t-PA release by neonate brain microvascular endothelial cells under glutamate exposure affects neuronal fate. Neurobiol Dis 50:201-208.
42. Li S, Haigh K, Haigh JJ, Vasudevan A (2013) Endothelial VEGF sculpts cortical cytoarchitecture. J Neurosci 33:14809-14815.
43. Ciceri G, Dehorter N, Sols I, Huang ZJ, Maravall M, Marín O (2013) Lineage-specific laminar organization of cortical GABAergic interneurons. Nat Neurosci 16:1199-1210.
44. Michaluk P, Kaczmarek L (2007) Matrix metalloproteinase-9 in glutamate-dependent adult brain function and dysfunction. Cell Death Differ 14:1255-1258.
45. Cassé F, Bardou I, Danglot L, Briens A, Montagne A, Parcq J, Alahari A, Galli T, Vivien D, Docagne F (2012) Glutamate controls tPA recycling by astrocytes, which in turn influences glutamatergic signals. J Neurosci 32:5186-5199.
46. Gaberel T, Macrez R, Gauberti M, Montagne A, Hebert M, Petersen KU, Touze E, Agin V, Emery E, Ali C, Vivien D (2013) Immunotherapy blocking the tissue plasminogen activator-dependent activation of N-methyl-D-aspartate glutamate receptors improves hemorrhagic stroke outcome. Neuropharmacology 67:267-271.
47. Ruediger T, Bolz J (2007) Neurotransmitters and the development of neuronal circuits. Adv Exp Med Biol 621:104-115.
48. Zechariah A, ElAli A, Hermann DM (2010) Combination of tissue-plasminogen activator with erythropoietin induces blood-brain barrier permeability, extracellular matrix disaggregation, and DNA fragmentation after focal cerebral ischemia in mice. Stroke 41:1008-1012.
49. Lodato S, Rouaux C, Quast KB, Jantrachotechatchawan C, Studer M, Hensch TK, Arlotta P (2011) Excitatory projection neuron subtypes control the distribution of local inhibitory interneurons in the cerebral cortex. Neuron 69:763-779.
50. Nguyen L, Rigo JM, Rocher V, Belachew S, Malgrange B, Rogister B, Leprince P, Moonen G (2001) Neurotransmitters as early signals for central nervous system development. Cell Tissue Res 305:187-202.
51. Miyoshi G, Fishell G (2011) GABAergic interneuron lineages selectively sort into specific cortical layers during early postnatal development. Cereb Cortex 21:845-852.
52. Guirado R, Perez-Rando M, Sanchez-Matarredona D, Castillo-Gómez E, Liberia T, Rovira-Esteban L, Varea E, Crespo C, Blasco-Ibáñez JM, Nacher J (2014) The dendritic spines of interneurons are dynamic structures influenced by PSA-NCAM expression. Cereb Cortex. 24:3014-3024.
53. Keck T, Scheuss V, Jacobsen RI, Wierenga CJ, Eysel UT, Bonhoeffer T, Hübener M (2011) Loss of sensory input causes rapid structural changes of inhibitory neurons in adult mouse visual cortex. Neuron 71:869-882.
54. Pawlak R, Magarinos AM, Melchor J, McEwen B, Strickland S (2003) Tissue plasminogen activator in the amygdala is critical for stress-induced anxiety-like behavior. Nat Neurosci 6:168-174.
55. Pothakos K, Robinson JK, Gravanis I, Marsteller DA, Dewey SL, Tsirka SE (2010) Decreased serotonin levels

associated with behavioral disinhibition in tissue plasminogen activator deficient (tPA-/-) mice. Brain Res 1326:135-142.
56. Shenoda BB (2017) An overview of the mechanisms of abnormal GABAergic interneuronal cortical migration associated with prenatal ethanol exposure. Neurochem Res 42:1279-1287.

Figure legends

Fig. 1 Immunohistochemical characterization of the pial migratory route (PMR) in mouse neonates. **A,B** Low-magnification (**A**) and high-magnification (**B**) photographs visualizing cortical microvessels in transversal cortical slices labeled with CD31 antibodies at P2. Arrow heads indicate a thin network of vessels at the level of the PMR. Arrows indicate cortical radial microvessels. **C,D** Double immunolabeling experiments showing a low magnification DCX-positive cells (**C**) lining the PMR (**D**; arrowhead). Arrows indicate DCX-positive cells stacking at the level of radial microvessels arising from the PMR. **E** Double immunolabeling experiments showing at high magnification tangential cells along the PMR immunoreactive for DCX and GABA (arrows). **F-H** Linescan analysis (**F**) of the CD31 (red), DCX (blue) and GABA (green) fluorescent signals acquired from a cultured brain slice at P2 (**G**). Intensity profiles (**H**) indicate that DCX and GABA immunofluorescences overlap and border the inner part of pial vessels. **I** Confocal acquisition of GABA immunoractive cells and CD31-labelled microvessels in the developing neocortex at P2. Note a marked vascular interaction of GABA interneurons along radial microvessels. **J** Quantification of vessel-associated GABAergic interneurons in the developing neocortex at P2. Note that the vessel association is preferentially observed in the developing superficial layers. Distributions of vessel-associated neurons between superficial and deep layers were compared using the Chi^2 test.

Fig. 2 GluN1 immunoreactivity in microvessels from the pial migratory route (PMR) and glutamate-dependent regulation of MMP-9 activity. **A-D** Double immunolabeling experiments showing CD31-positive microvessels and GluN1 immunoreactivity in the neocortex of P2 mice. Immunohistochemistry reveals numerous GluN1-positive cortical radial fibers (**A**; arrows) and GluN1-positive endothelial cells in the pial migratory route (**B-D**; arrow heads). **E-G** Double immunolabeling experiments showing CD31-positive microvessels (**E**) and MMP-9 immunoreactivity (**F**) in vessels from the pial migratory route. The overlay (**G**) indicates that MMP-9 immunoreactivity mainly co-localizes with endothelial cells present in the inner part of the migratory route (arrows). **H** Quantification by gel zymography of the effects of 6-h exposure of P2 cortical slices to graded concentrations (25-100 µM) of glutamate on MMP-9 activity. **I** Quantification by gel zymography of the effect of the NMDA antagonist MK801 (20 µM) on the glutamate-induced increase of MMP-9 activity. **J** Quantification by gel zymography of the effect of the MMP-9 inhibitor SB-3CT (10 µM) on the glutamate-induced increase of

MMP-9 activity. *p < 0.05; **p < 0.01 *vs* control and $^{\#\#}$p < 0.01; $^{\#\#\#}$p < 0.001; $^{\#\#\#\#}$p<0.0001 *vs* glutamate using one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test.

Fig. 3 *In situ* characterization of the effects of glutamate on MMP activity in vessels from the pial migratory route. **A-C** *In situ* zymography performed for P2 cortical slices visualizing the MMP gelatinase activity in control conditions after 60-min incubation with the quenched fluorogenic substrate DQ-gelatin-FITC. Note that the gelatinase activity (**A**) overlaps with microvessels present in the pial migratory route labeled with isolectin-TRITC (**B, C**). **D-G** Microphotographs acquired by videomicroscopy showing a time-dependent increase of the gelatinase activity in cultured slices incubated with glutamate (100 µM) from 0 to 90 min. Note that in addition to the PMR (arrow heads), a fluorescent signal also progressively appeared in radial cortical vessels (arrows; **F**, **G**). **H** Time-lapse quantification by videomicroscopy of the fluorescence intensity resulting from DQ-gelatin-FITC cleavage after treatment of brain slices with aCSF (Ctrl), glutamate (100 µM), and the NMDA antagonist MK801 (20 µM) alone or co-incubated (**H**). **I** Quantification by videomicroscopy of the fluorescence intensity resulting from DQ-gelatin-FITC cleavage after treatment of brain slices with aCSF (Ctrl), glutamate (100 µM) and the MMP2/9 inhibitor SB-3CT (10 µM) alone or co-incubated. §§§§p<0.0001 significant time and treatment interactions using two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001; ****p < 0.0001 *vs* control at the same time point and $^{\#\#\#\#}$p<0.0001 *vs* glutamate at the same time point.

Fig. 4 Visualization and quantification of the effects of glutamate on t-PA activity in vessels from the pial migratory route. **A** Triple labeling visualizing t-PA, collagen IV, and microvessels in the pial migratory route. Note the presence of strong vascular t-PA immunoreactivity in both tangential and radial cortical vessels (arrows). **B** Quantification by gel zymography of the effects of aCSF (Ctrl), glutamate (100 µM), and the NMDA antagonist MK801 (20 µM) alone or co-incubated on t-PA activity after 3-h treatment of P2 cortical slices. **C** Quantification by gel zymography of the effects of aCSF (Ctrl), glutamate (100 µM), and the t-PA inhibitor PAI-1 (5 µg/ml) alone or co-incubated on t-PA activity after 3-h treatment of P2 cortical slices. **D-F** Microphotographs acquired by *in situ* zymography and visualizing cortical microvessels (**D**) and the fluorescent signal resulting from the cleavage of the quenched casein-FITC substrate (**E**) in cultured P2 cortical slices. Overlay reveals a strong protease activity associated with the pial

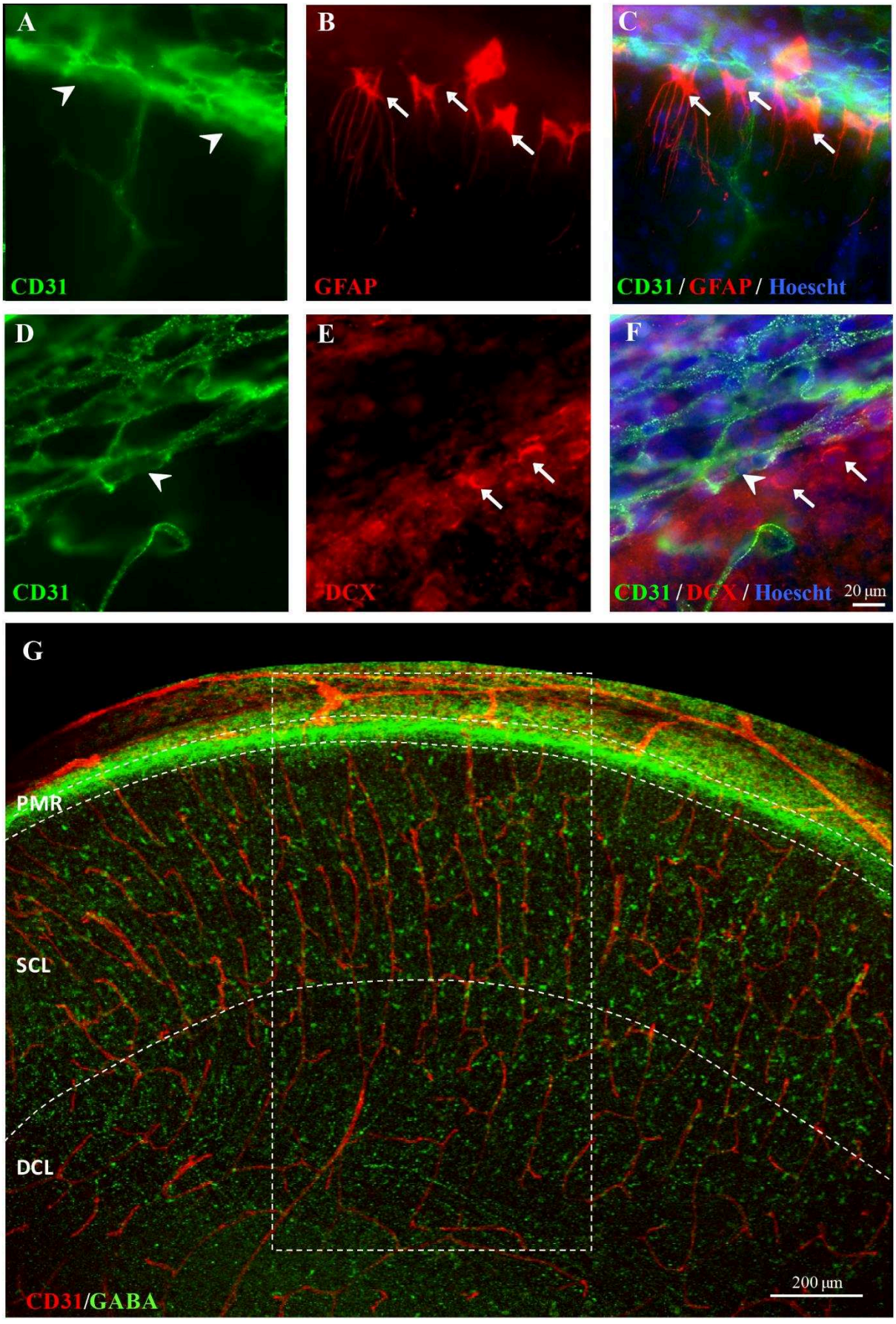
migratory route (arrowheads) and radial cortical microvessels (arrows, **F**). **G** Quantification by time-lapse videomicroscopy of the fluorescence intensity resulting in casein-FITC cleavage after incubation of P2 brain slices with aCSF (Ctrl), glutamate (100 µM), and MK801 (20 µM) alone or co-incubated. **H** Quantification by gel zymography of the effects of glutamate (100 µM) on MMP-9 activity in P2 cortical extracts from wild-type (WT) and t-PA$^{-/-}$ mice. **I** Quantification by *in situ* zymography of the effects of glutamate (100 µM) on the cleavage of the quenched casein-FITC substrate in WT and t-PA$^{-/-}$ mice at the level of the pial migratory route in P2 cortical slices. §§§§p<0.0001 significant time and treatment interactions using two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001; ****p < 0.0001 *vs* control and $^{\#}$p<0.05; $^{\#\#}$p<0.01; $^{\#\#\#\#}$p<0.0001 *vs* glutamate.

Fig. 5 Effects of glutamate and MK801 on the vessel-associated migration of GABA interneurons. **A** 3D Imaris modeling of migrating interneurons along radial microvessels in Gad67-GFP mice at P2. GFP-positive neurons were visualized by immunohistochemistry and microvessels labelled with CD31 antibodies. **B-D** Microphotographs acquired from the same cultured slice at different times of tracking (0 min, **B**; 60 min, **C**; and 150 min, **D**). Arrows indicate migrating cells along microvessels. Arrowheads indicate immobile large cells. **E** Stacked graph visualizing the position of several cells during 6-h video-tracking. **F** Quantification of the distance covered by the four cells identified in **E**. **G** Effects of glutamate (50 µM) and MK801 (20 µM) on the migration speed of cells moving tangentially and radially along microvessels. **p < 0.01 *vs* control and $^{\#\#\#}$p < 0.001 *vs* glutamate using one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test.

Fig. 6 Effects of t-PA invalidation and *in vivo* GM6001 exposure on the cortical positioning and the spine morphology of GABA interneurons populating the superficial cortical layers. **A-E** Visualization of GABA interneurons (**A-C**) and microvessels (**B, D**) in P2 cortical slices from wild type (**A, B**) and t-PA null (**C, D**) mice. Note the reduction of the PMR thickness (**B**, **D**, **E**, upper panel) and the reduced distance of GABA interneurons from the PMR (**B**, **D**, **E**, lower panel) in t-PA null mice. **F** Visualization of a Gad67-GFP neuron presenting dendritic spines in the superficial cortical layers of a wild-type mouse at P15. **G** Illustration of a graphic design obtained after spine analysis performed with the *Filament tracer* tool from the Imaris software. Three spine subtypes were analyzed: filipodia (Fili), mushrooms (Mush), and

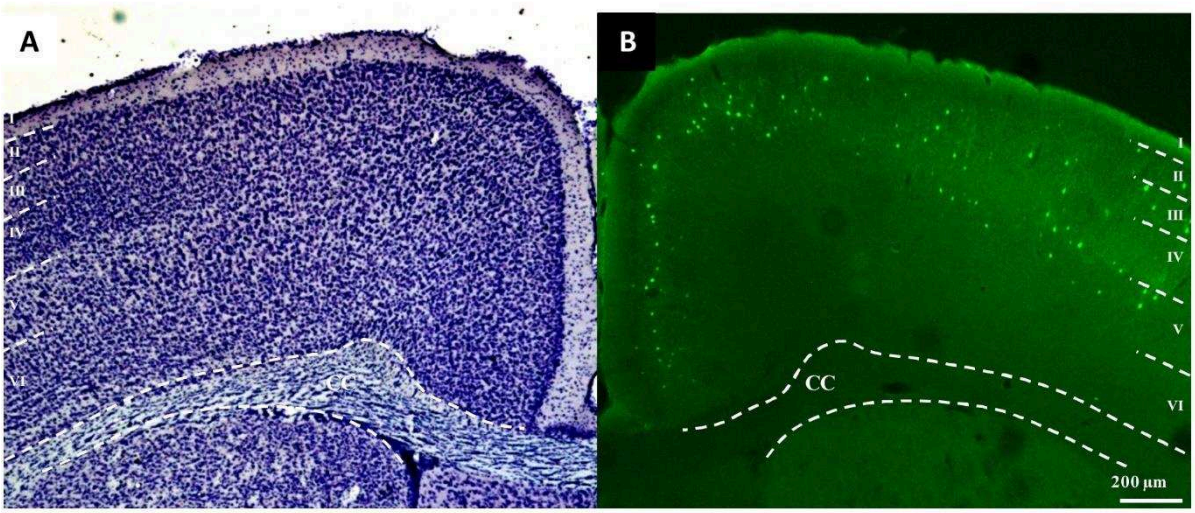
stubbies (Stub). Fiber is colored in red, muschrooms and filipodia in blue, stubby in purple. **H, I** Quantification of the spine density (**H**) and the distribution of spine subtypes (**I**) in wild-type and t-PA$^{-/-}$ mice at P15. **J** Quantification of the locomotor activity of wild-type and t-PA$^{-/-}$ mice at P15. **K, L** Visualization of the positioning of Gad67-GFP neurons at P15 in control (**K**) and *in vivo*-exposed mice to the MMP inhibitor GM6001 (10 mg/kg; **L**). Note the presence of numerous ectopic cells in deep layers (arrows). **M** Effect of *in vivo* treatment with GM6001 (10 mg/kg) on the density of Gad67-GFP interneurons in the superficial cortical layers at P15. **N** Distribution of Gad67-GFP neurons between superficial and deep cortical layers in control and GM6001-treated mice. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001 *vs* control using the unpaired t test**.** Statistical analysis of the neuronal distributions was done using the Chi² test.

Fig. 7 Effects of endothelial GluN1 invalidation on the pial migratory route and on the positioning of GABA interneuron. **A,B** Gene identity maps of floxed Grin1 and VE-Cadherin-Cre transgenic mice (**A**) used to generate Grin1$^{flox-/-}$/VeCad^{Cre-} transgenic mice (**B**; left panel). The endothelial expression of the CRE recombinase was controlled by immunohistochemistry (B; right panel). **C** Double immunohistochemistry experiments visualizing microvessels and GABA interneurons in the developing cortex of wild type (left panel) and Grin1$^{flox-/-}$/VeCad^{Cre-} (right panel) mice at birth (P0). **D, E** Quantification of the thickness of the PMR, the developing cortical layers (**D**) and of the GABA interneuron density (**E**) in wild type and Grin1$^{flox-/-}$/VeCad^{Cre-} mice at birth (P0). **F,G** Visualization at low magnification of the positioning of Gad67-positive neurons in the neocortex of adult wild type (**F**) and Grin1$^{flox-/-}$/VeCad^{Cre-} (**G**) mice. Note a depopulation of Gad67-immunoreactive cells in the superficial cortical layers in Grin1$^{flox-/-}$/VeCad^{Cre-} mice. **H, I** Visualization at high magnification of the density of Gad67-positive neurons in the layer IV of the neocortex from wild type (**H**) and Grin1$^{flox-/-}$/VeCad^{Cre-} (**I**) mice. **J, K** Quantification of the thickness of cortical layers (**J**) and of the Gad67 interneuron density (**K**) in adult wild type and Grin1$^{flox-/-}$/VeCad^{Cre-} mice. *p < 0.05; **p < 0.01; ****p < 0.0001 *vs* wt using the unpaired t test (**D**, **J**). Two-way ANOVA test followed by a Bonferroni's multiple comparison test (**E**, **K**), **p < 0.01; ***p < 0.001; ****p < 0.001*vs* wt.



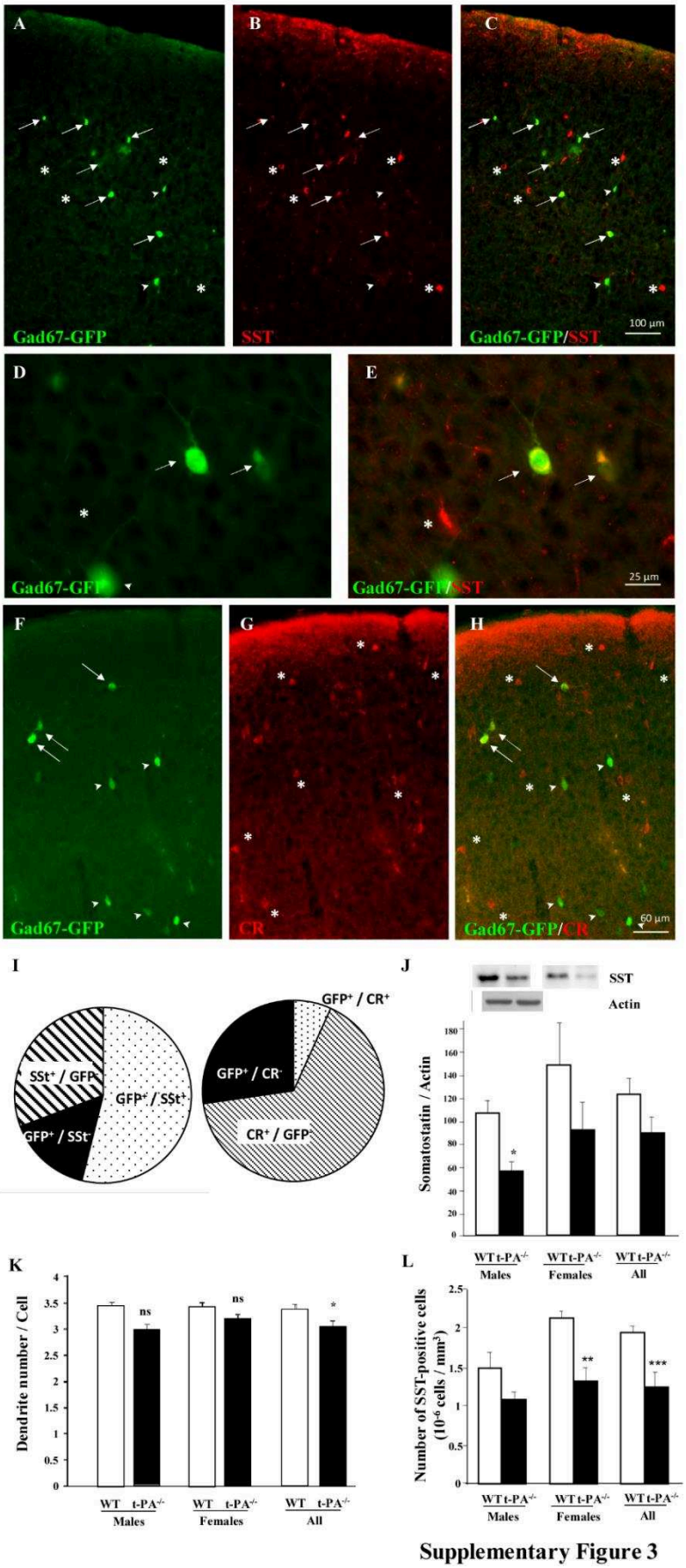
Supplementary Figure 1

Supplementary Fig. 1 Immunohistochemical characterization of the pial migratory route in mouse neonates. **A-C** Double immunolabeling experiments showing CD31-positive microvessels from the pial migratory route (arrow heads; **A**) and GFAP immunoreactive astrocytes (arrows; **B**). Overlay of both signals (**C**) indicates that astrocytes are lining the inner face of the pial migratory route. **D-F** Double immunolabeling experiments showing microvessels from the pial migratory route (arrow head; **D**) and doublecortin-positive cells (arrows; **E**). Overlay (**F**) indicates that doublecortin immunoreactive cells are lining the inner face of the pial migratory route. **G** Large view of the image shown in Fig. 1I (insert) of the developing neocortex at P2 and showing the strong association of GABA-immunoreactive cells with radial vessels in the superficial cortical layers.



Supplementary Figure 2

Supplementary Fig. 2 Positioning of Gad67-GFP interneurons in the mature cortex of transgenic mouse FVB-Tg(GadGFP)45704Swn. **A** Cresyl violet staining of the neocortex of adult Gad67-GFP mice. **B** Visualization of the positioning of Gad67-GFP interneurons. Note the preferential localization of the GFP expressing neurons in the superficial cortical layers.



Supplementary Figure 3

Supplementary Fig. 3 Effect of t-PA invalidation on the positioning of GABA interneurons populating the superficial cortical layers. **A-H** Microphotographs visualizing the eGFP (**A,D,F**), somatostatin (SST; **B**), calretinin (CR; **G**) and the overlays eGFP/SST (**C,E**) and eGFP/CR (**H**) in Gad67-GFP mice at P15. Arrows indicate co-labelled cells. Stars indicate SST^+/GFP^- as well as CR^+/GFP^- cells. Arrowheads indicate SST^-/GFP^+ as well as CR^-/GFP^+ cells. **I** Quantification of the distribution of eGFP, SST and/or CR-positive cells. **J** Western blot quantification of somatostatin (SST) expression in the somatosensory cortex of wild-type and t-$PA^{-/-}$ mice at P15. **K** Quantification of the density of primary neurites of SST interneurons in the superficial layers of the somatosensory cortex of wild-type and t-$PA^{-/-}$ mice at P15. **L** Quantification of the density of SST interneurons in the superficial cortical layers in wild-type and t-$PA^{-/-}$ mice at P15. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001 *vs* wt using the unpaired t test.

Supplementary Table 1 Origin and characteristics of the primary antibodies used for the immunohistochemical and Western blot studies.

Antibodies	Trade reference	Purified species	Supplier	Dilution	Solution of incubation
CD31/PECAM	IHC: cat 550274	Rat	BD-Pharmigen	1/400	1% BSA, 3% Triton X-100 in PBS
Calretinin CR	IHC: cat 180211	Rabbit	ThermoFisher Scientific	1/400	1% BSA, 3% Triton X-100 in PBS
CRE recombinase	IHC: Ab190177	Rabbit	Abcam	1/400	1% BSA, 3% Triton X-100 in PBS
GFAP	IHC: Ab7260	Rabbit	Sigma	1/400	1% BSA, 3% Triton X-100 in PBS
Doublecortin DCX	IHC: Ab18723	Rabbit	Abcam	1/400	1% BSA, 3% Triton X-100 in PBS
DCX (for GABA co-labeling)	IHC: Ab135349	Mouse	Abcam	1/400	1% BSA, 3% Triton X-100 in PBS
GABA	IHC: A2052	Rabbit	Sigma-Aldrich	1/400	1% BSA, 3% Triton X-100 in PBS
GFP	IHC: Ab6673	Goat	Abcam	1/400	1% BSA, 3% Triton X-100 in PBS
GluN1	IHC: SC1467	Goat	Santa Cruz	1/400	1% BSA, 3% Triton X-100 in PBS
MMP-9	IHC: PAB12714	Rabbit	Abnova	1/400	1% BSA, 3% Triton X-100 in PBS
Collagen IV ColIV	IHC: Ab86042	Mouse	Abcam	1/400	1% BSA, 3% Triton X-100 in PBS
Somatostatin SST	IHC: SC13099 WB: SC13099	Rabbit	Santa Cruz	1/400 1/1000	IHC: 1% BSA, 3% Triton X-100 in PBS WB: BSA (5% in TBST)
t-PA	IHC	Rabbit	Generous gift from R. Lijnen	1/400	1% BSA, 3% Triton X-100 in PBS
β-Actin	WB: A5441	Mouse	Sigma- Aldrich	1/5000	Milk (5% in TBST)

Supplementary Table 2 Statistical analysis

Experiments	Test	n independents experiments	p value *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001
Distribution of vessel-associated GABA interneurons	Chi^2	7 slices from 3 independent animals	Chi^2,df: 11.75, 1 p=0.0006***
Gel zymography Dose effect of glutamate on MMP9 activity (Fig. 2H)	One way ANOVA Dunnett post-test	n=3	ANOVA F 4.733 p=0.0350* Dunnett's p=0.0162*
Gel zymography Effect of MK801 on glutamate-induced MMP9 activity (Fig. 2I)	One way ANOVA Tukey post-test	n=3	ANOVA F 15.23 p=0.0011** Tukey's Ctrl vs Glut p=0.0114* Glut vs MK801 p=0.0012$^{\#\#}$ Glut vs Glut + MK p=0.0028$^{\#\#}$
Gel zymography Effect of SB3CT on glutamate-induced MMP9 activity (Fig. 2J)	One way ANOVA Tukey post-test	n=3	ANOVA F 30.72 p<0.0001**** Tukey's Ctrl vs Glut p=0.0014** Glut vs SB3CT p<0.0001$^{\#\#\#\#}$ Glut vs Glut + SB3CT p=0.0009$^{\#\#\#}$
In situ zymography Effect of glutamate and MK801 on MMPs activity on P2 slices (Fig. 3H)	Two way ANOVA Tukey post-test	n=5	ANOVA Interaction F 2.793 p<0.0001**** Treatment F 48.68 p<0.0001**** Time F 137.8 p<0.0001**** Tukey's For t=180 min Ctrl vs GLUT p<0.0001**** Glut vs Glut+MK801 p<0.0001$^{\#\#\#\#}$
In situ zymography Effect of glutamate and SB3CT on MMPs activity on P2 slices (Fig. 3I)	Two way ANOVA Tukey post-test	n=5	ANOVA Interaction F 1.538 p=0.0339* Treatment F 30.25 p<0.0001**** Time F 57.17 p<0.0001**** Tukey's For t=180 min Ctrl vs Glut p<0.0001**** Glut vs Glut+SB3CT p<0.0001$^{\#\#\#\#}$
Gel zymography Effect of MK801 on glutamate-induced tPA activity (Fig. 4B)	One way ANOVA Tukey post-test	n=3	ANOVA F 7.638 p=0.0014** Tukey's Ctrl vs Glut p=0.0079** Glut vs MK801 p=0.0011$^{\#\#}$ Glut vs Glut + MK801 p=0.0495$^{\#}$

Gel zymography Effect of PAI-1 on glutamate-induced tPA activity (Fig. 4C)	One way ANOVA Tukey post-test	n=3	ANOVA F 5.610 p=0.0059** Tukey's Glut vs PAI p=0.0043$^{\#\#}$ Glut vs Glut + MK p=0.0365$^{\#}$
In situ zymography Effect of glutamate on DQcasein activity (Fig. 4G)	Two way ANOVA Tukey post-test	n=5	ANOVA Interaction F 3.329 p<0.0001**** Treatment F 33.70 p<0.0001**** Time F 286.2 p<0.0001**** Tukey's For t=180 min Ctrl vs Glut P<0.0001**** Glut vs Glu + MK801 P<0.0001$^{\#\#\#\#}$
Gel zymography Effect of glutamate on MMP9 activity in tPA-/- mice (Fig. 4H)	Unpaired t test	n=3	WT p=0.0014** tPA-/- p=0.2720, ns
In situ zymography Effect of glutamate on MMPs activity in tPA-/- (Fig. 4I)	Two way ANOVA Tukey post-test	n=4	ANOVA Interaction F 0.6479 p=0.9364, ns Treatment F 3.818 p<0.0001**** Time F 32.09 p<0.0001**** Tukey's For t=180 min Ctrl WT vs Glut WT p=0.0008*** Ctrl tPA-/- vs Glu tPA-/- p=0.9898, ns
Time lapse videomicroscopy Migration speed (Fig. 5H)	One way ANOVA Tukey post-test	n=3 at least 20 cells	Radial ANOVA F 33.5 p=0.0006*** Tukey's Ctrl vs Glut p=0.0052** Glut vs MK p=0.0005$^{\#\#\#}$ Tangential ANOVA F 12.2 p=0.0077** Tukey's Ctrl vs Glut p=0.024*

			Glut vs MK p=0.008##
PMR thickness and distance from PMR in tPA-null mice Fig. 6E	Unpaired t test	n=3 at least 2 slices per animal	Thickness p=0.0033** Distance from PMR p=0.0002***
Thickness of cortical layers in Grin1^{flox}/VeCad^{cre} mice at P0 Fig. 6I	Unpaired t test	At least 10 ROI analyzed from 3 independent animals	PMR, p<0.0001**** Layers I-IV, p=0.0017** Layers V-VI, p=0.0674^{ns}
Cortical densities of GABA interneurons in Grin1^{flox}/VeCad^{cre} at P0 Fig. 6J	Two way ANOVA Sidak's post-test	n=3	ANOVA Interaction Genotype F 69.45, p<0.0001**** Interaction Layers F 39.89, p<0.0001**** Sidak's multiple comparison test PMR, p<0.0001**** I-IV, p=0.0073** V-VI, p=0.1745 ns
Thickness of cortical layers in Grin1^{flox}/VeCad^{cre} mice in adult Fig. 6L	Unpaired t test	At least 10 ROI analyzed from 3 independent animals	PMR, p<0.0001**** Layers I-IV, p=0.0017** Layers V-VI, p=0.0674 ns
Cortical densities of GABA interneurons in adult Grin1^{flox}/VeCad^{cre} Fig. 6M	Two way ANOVA Sidak's post-test	n=3	ANOVA Interaction Genotype F 89.5, p<0.0001**** Interaction Layers F 31.8, p<0.0001**** Sidak's multiple comparison test I, p>0.9999 ns II, p=0.0002*** III, p<0.0001**** IV, p<0.0001**** V, p=0.0020** VIa, p<0.0001**** VIb, p=0.5385 ns
Spine density in Gad67GFP/tPA$^{-/-}$ mice (Fig. 7E)	Unpaired t test	n =20 fibers from 3 animals	WT vs tPA-/- males p=0.4106, ns
Spine distribution in Gad67GFP/tPA$^{-/-}$ (Fig. 7F)	Chi square test	n =20 fibers analyzed from 3 animals	Chi-square, df 6.329, 2 p=0.422*
Density of Gad67-GFP cells in	Chi square test	n =5 ROI analyzed per	Chi-square, df 14.71, 1 p=0.0001****

GM6001 exposed mice (Fig. 7I)		slice from 3 animals	
Effect of GM6001 on the density of Gad67GFP cells (Fig. 7J)	Unpaired t test	Males n=4 Females n=4 Males + females n=8	Ctrl vs GM6001 males p=0.004** Ctrl vs GM6001 females p=0.1420, ns Ctrl vs males +females p=0.0006***
Quantification of motor activity in tPA-/- mice (Fig. 7K)	Unpaired t test	Males n=8 Females n=8 Males + females n=16	WT vs tPA-/- males p=0.0211* WT vs tPA-/- frmales p=0.027* WT vs tPA-/- females + males p=0.0032**
Western blot somatostatin in tPA-/- (Suppl Fig. 3J)	Unpaired t test	Males n=3 Females n=3 Males + females n=6	WT vs tPA-/- males p=0.0219* WT vs tPA-/- females p=0.055, ns WT vs tPA-/- females + males p=0.0753, ns
Primary dendrite density in tPA-/- mice (Suppl Fig. 3K)	Unpaired t test	Males n=3 Females n=3 Males + females n=6	WT vs tPA-/- males p=0.2302, ns WT vs tPA-/- females p=0.2573, ns WT vs tPA-/- females + males p=0.0402*
Density of somatostatin cells in tPA-/- mice (Suppl Fig. 3L)	Unpaired t test	Males n=8 Females n=8 Males + females n=16	WT vs tPA-/- males p=0.0755, ns WT vs tPA-/- females p=0.0021** WT vs tPA-/- females + males p=0.001***