

Effet du rémifentanil sur le cerveau en développement Fabien Tourrel

▶ To cite this version:

Fabien Tourrel. Effet du rémifentanil sur le cerveau en développement. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2017. Français. NNT: 2017NORMR151. tel-04043930

HAL Id: tel-04043930 https://theses.hal.science/tel-04043930

Submitted on 24 Mar 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers. L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité ASPECTS MOLECULAIRES ET CELLULAIRES DE LA BIOLOGIE

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

Effet du Rémifentanil sur le cerveau en développement

Présentée et soutenue par Fabien TOURREL

Thèse soutenue publiquement le 15 mai 2017						
devant le jury composé de						
Mr Olivier BAUD	PUPH-Réanimation et Pédiatrie Néonatale, Hôpital Robert Debré,	Rapporteur				
Mr Pierre TOURNEUX	PUPH-Reanimation et Soins Continus Pediatriques, CHU Amiens, PériTox-UMI-01, Université Picardie, Amiens	Rapporteur				
Mme Géraldine FAVRAIS	MCU-PH-Pédiatrie, CHRU Tours, INSERM U930, Université François Rabelais, Tours	Examinateur				
Mr Vincent COMPERE	PUPH-Anesthésie Réanimation, CHU Rouen, INSERM U1239, Université de Rouen Normandie	Examinateur				
Mr Bruno GONZALEZ	DR INSERM U1245, Genetics and Pathophysiology of Neurodevelopmental Disorders, Université de Rouen Normandie	Examinateur				
Mme Sylvie JEGOU	CR INSERM U1245, Genetics and Pathophysiology of Neurodevelopmental Disorders, Université de Rouen Normandie	Directrice de Thèse				

Thèse dirigée par Sylvie JEGOU, INSERM U1245, équipe « Genetics and Pathophysiology of Neurodevelopmental Disorders »







REMERCIEMENTS

Au Pr Olivier Baud, vous me faites l'honneur de siéger dans ce jury. Merci d'avoir accepté d'être rapporteur de ce manuscrit.

Au Pr Pierre Tourneux, vous me faites l'honneur de siéger dans ce jury. Merci d'avoir accepté de juger ce travail et d'en être rapporteur.

Au Dr Géraldine Favrais, vous avez accepté d'examiner ce mémoire. Je vous remercie chaleureusement d'avoir pris le temps de vous intéresser à notre travail.

Au Pr Vincent Compère, tu as accepté d'être examinateur de ce travail, qui n'aurait pu exister sans ton implication dans l'encadrement des jeunes médecins anesthésistes-réanimateurs du CHU de Rouen. Merci pour cela et tout le reste au cours de ces années passées au sein du DAR du CHU de Rouen.

Au Dr Bruno Gonzalez, merci d'avoir accepté d'être examinateur de ce travail ; tu as été un soutien constant au cours de mes années passées par intermittence au laboratoire et tu as bien souvent pu apporter ton expertise afin d'avancer dans ce projet, le tout dans une ambiance extrêmement positive et sympathique, merci aussi pour çà.

Au Dr Sylvie Jégou, merci pour cette direction de thèse de longue haleine, merci pour tes qualités humaines et scientifiques, merci pour la rigueur que tu as imposée à ce travail, merci pour l'investissement énorme dont tu as fait preuve au cours de ces dernières années, j'en suis conscient. Notre collaboration sur ce projet a été pour moi un très grand plaisir. Il n'aurait probablement pas abouti sans toi.

A Claire, pour toujours me soutenir depuis déjà tant d'année dans mes différents projets, professionnels et non professionnels, pour la vie que l'on a passé ensemble, et qui reste encore à venir.

A mes enfants, ma très belle et (trop !) grande Lili, à l'esprit affuté, aux traits d'humour qui font toujours mouche, mon moyen Basile, petit garçon dont le sens de la justice fait ma fierté, et qui me permet d'avoir toujours un partenaire lors des soirées foot à la maison, et ma petite Fanny, qui sera sans doute toujours le bébé de la famille, même à 45 ans.

REMERCIEMENTS

A mes parents, mon frère, sa petite famille, vivement les prochaines escapades au soleil ou sous la neige !

Au laboratoire, merci tout particulièrement à Maryline : tu as énormément travaillé à nos côtés, et tu as permis de mener à bien une grande partie de ces travaux expérimentaux. Par ailleurs, tu participes également activement au bon déroulement de l'étude clinique REAGI ; sans toi tout serait beaucoup plus compliqué ! Ces moments ont été partagés avec une excellente entente, ce qui facilite bien sûr les choses.

Merci au Pr Stéphane Marret : vous avez très régulièrement apporté votre avis expert sur notre thématique, que ce soit dans le cadre de nos résultats expérimentaux, ou bien dans l'étude clinique menée en parallèle, et qui n'aurait pas pu exister sans votre collaboration.

Au Pr Vincent Laudenbach : tu m'as mis le pied à l'étrier il y a maintenant 7 ans au sein du laboratoire, et pour cela je te remercie. Je te souhaite le meilleur pour la suite.

A mon ami Clément : tu m'as suivi sur cette thématique, et nous avons travaillé ensemble quelques longues journées, à mettre au point les manips et à réaliser des coupes sériées, tout en dissertant longuement sur les quelques hauts et nombreux bas de l'Olympique de Marseille. Vivement votre retour en normandie, que l'on puisse poursuivre...

Merci également à Léna, pour avoir transitoirement vécu pour le rémifentanil et ses effets sur le cerveau en développement... C'est toujours un plaisir de te croiser en salle de naissance !

Merci bien sûr à Arnaud Desfeux, Vincent Henry, Pamela Kwetieu, Caroline Aligny, Christian Roux, Céline Lesueur, et tous ceux qui m'ont accompagné et formé aux diverses techniques qui ont été nécessaires à la réalisation de ces travaux. Merci à eux pour les bons moments passés en dehors du labo également !

Merci au Département d'Anesthésie-Réanimation du CHU de Rouen, aux Prs Bertrand Dureuil et Benoit Veber, pour m'avoir permis d'aménager mon temps entre le laboratoire et le CHU, et la bienveillance dont ils ont fait preuve au cours de ces années.

REMERCIEMENTS

Merci à mes collègues du PME, les Drs Rachet, Rieu, Provost, Gillet, Thibault, qui ont fait preuve d'une très grande compréhension et qui ont accepté que j'attribue une partie de mon temps à cette recherche expérimentale. Merci à vous pour la patience dont vous avez toujours fait preuve fasse à quelques réguliers problèmes d'organisation et de planning !

Merci aussi à l'ensemble de l'équipe médicale d'obstétrique, le Pr Verspyck, le Pr Roman, le Pr Marpeau, l'ensemble des PH et chefs de clinique de gynéco-obstétrique croisés durant mes années de PH au sein du PME.

Merci à l'ensemble de l'équipe médicale de la réanimation néonatale du CHU, avec qui nous avons travaillé au quotidien sur l'étude REAGI. (Et plus particulièrement aux Drs Stéphanie Torre et Alexandra Chadie ; oui, il y a des chouchous).

Merci à mes amis, pour lesquels je n'établierai pas de liste exhaustive, et aux membres du groupe Saint Hilaire, pour l'équilibre apporté à ma vie au cours de ces années partagées entre l'activité clinique et la recherche fondamentale.

RESUME

L'amélioration de la protection du développement neurologique des nouveau-nés prématurés est un enjeu majeur de la prise en charge de ces enfants lors de leur séjour en réanimation néonatale. En effet, malgré la diminution de la morbi-mortalité obtenue par le meilleur suivi obstétrical, par les soins de réanimation en salle de naissance et dans les premières semaines de vie, les nouveau-nés prématurés sont à risque de développer des troubles du neurodéveloppement, entraînant d'éventuelles séquelles neurologiques et induisant des handicaps moteurs et cognitifs pouvant être définitifs. Il apparaît donc important d'évaluer l'impact de la prise en charge périnatale sur ces troubles du neurodéveloppement. L'impact de l'exposition à l'anesthésie générale au cours de cette période néonatale sur le cerveau en développement est encore actuellement un sujet de discussion s'intégrant à cette problématique. Le rémifentanil est un morphinique de synthèse dont les propriétés pharmacocinétiques (court délai d'action, absence d'accumulation, durée d'action courte) favorisent l'utilisation en période périnatale. Avant la naissance, il peut être administré à la mère de l'enfant à naître au cours d'anesthésie générale pour césarienne, ou bien comme analgésique alternatif à l'analgésie péri-médullaire. Il est également de plus en plus utilisé afin d'encadrer certains gestes invasifs de réanimation néonatale. En pratique, l'exposition à ce morphinique en période néonatale, souvent en contexte de prématurité, est de plus en plus fréquente. Il apparaissait donc nécessaire d'évaluer son potentiel impact sur le cerveau en développement. Les études menées sur les mécanismes impliqués dans l'hyperalgésie induite par le rémifentanil au niveau médullaire ont démontré une interaction entre le morphinique et le récepteur sensible au NMDA (R-NMDA). Par ailleurs, il a été observé dans un modèle ex vivo de tranches organotypiques de cerveau de souriceau âgé de 2 jours (P2) que l'activation du R-NMDA exerce une action duale sur le cortex : pro-nécrotique dans les couches profondes matures (V-VI) et anti-apoptotique dans les couches superficielles immatures (II-IV).

Le premier objectif de cette thèse était d'identifier une éventuelle interaction entre le rémifentanil et le R-NMDA au sein du cortex immature en utilisant le modèle *ex vivo* précédemment décrit. Le but étant *in fine* d'évaluer, en cas de modulation de l'activité des R-NMDA par le rémifentanil, le sens de cette modulation et les voies impactées.

RESUME

Les travaux menés dans ce but ont fait l'objet d'une première publication. Nous avons montré que le rémifentanil exerce une action anti-apoptotique au sein des couches II-IV du cortex immature sans modifier la mort cellulaire nécrotique dans les couches corticales profondes V-VI. L'effet anti-apoptotique du rémifentanil met en jeu le récepteur μ et le R-NMDA et implique la voie intrinsèque de l'apoptose. En présence de NMDA, le rémifentanil potentialise son effet inhibiteur sur l'apoptose sans augmenter son action sur la nécrose. Le rémifentanil et la glycine, présente dans la préparation commerciale du rémifentanil (Ultiva®), agissent de façon synergique pour inhiber l'apoptose corticale.

Les lésions cérébrales des nouveau-nés engendrent des déficits fonctionnels plus ou moins prononcés à moyen et long termes. L'enjeu de la deuxième partie de ce travail de thèse consistait donc à évaluer dans un contexte excitotoxique chez le souriceau, les conséquences *in vivo* des effets potentiellement neuroprotecteurs du rémifentanil observés dans le modèle *ex vivo*, non seulement sur l'aspect lésionnel, mais également sur l'aspect fonctionnel.

Dans ce but, nous avons utilisé un modèle murin *in vivo*, de lésions cérébrales excitotoxiques provoquées par l'injection intracorticale d'iboténate chez le souriceau P2. Ce modèle permet de provoquer des lésions intracérébrales évocatrices des leucomalacies périventriculaires constatées en pratique clinique chez les nouveau-nés prématurés. Dans un premier temps l'impact du rémifentanil sur la production de radicaux libres, l'astrogliose réactionnelle, la mort apoptotique et la taille des lésions, induites par l'injection d'iboténate a donc été évalué jusqu'à cinq jours après l'induction de la lésion. Dans un second temps, grâce à des tests comportementaux, les conséquences de l'exposition au rémifentanil chez les souriceaux lésés ont été évaluées sur leurs performances sensorimotrices jusqu'à 12 jours de vie ainsi que sur leur activité locomotrice à 18 jours de vie.

Une deuxième publication (en voie de soumission) présente les résultats de ces travaux. Un effet neuroprotecteur du rémifentanil a été mis en évidence, avec une diminution très significative (divisée par 3) de la taille des lésions corticales observées à P7 chez les souris exposées au rémifentanil au moment de l'induction de la lésion. Cet effet bénéfique est précédé d'une diminution de la production des radicaux libres, de l'activité apoptotique, de la mort cellulaire ainsi qu'une diminution de l'astrogliose dans l'hémisphère lésé. Le test de géotaxie négative et le test d'agrippement effectués jusqu'à P12, nous ont permis de montrer RESUME

que l'administration de rémifentanil permet de contrebalancer les effets délétères de la lésion sur les performances sensorimotrices des souriceaux. A P18, les souris femelles lésées et traitées par le rémifentanil sont moins anxieuses dans le dispositif d'*Open Field* que les souris contrôles. L'effet anxiolytique du rémifentanil chez les mâles lésés apparaît plus fugace. Aucun effet propre du rémifentanil n'a été observé sur les performances sensorimotrices jusqu'à P12, ni sur l'anxiété dans le test d'*Open Field* à P18.

Nos résultats expérimentaux obtenus *ex vivo* et *in vivo* mettant en évidence un effet anti-apoptotique et neuroprotecteur du rémifentanil chez la Souris, nous ont incités à déposer en novembre 2013 un protocole de recherche médicale REAGI porté par le Département d'anesthésie-réanimation du CHU de Rouen (Investigateur principal F. Tourrel). Le projet REAGI est une étude prospective, randomisée, monocentrique et menée en double aveugle sur une période de 4 ans et demi. Elle a pour objectif principal de comparer l'état clinique des enfants nés de césarienne sous anesthésie générale et certains critères de développement de ces enfants, avec administration ou non de rémifentanil avant le clampage du cordon. Les données de cette étude sont en cours de recueil, le suivi étant réalisé dans les 2 premières années de vie. La levée d'aveugle sera réalisée en 2018.

Nous avons donc montré au cours de nos travaux expérimentaux un effet bénéfique du rémifentanil chez la souris nouveau-née. La neuroprotection induite par l'exposition à ce morphinique est liée à un effet anti-apoptotique mettant en jeu le récepteur μ et le R-NMDA. Nous avons non seulement pu constater cette neuroprotection sur le plan anatomique et histologique, mais également sur le plan fonctionnel, à court et moyen termes. Ces résultats expérimentaux sont encourageants, mais ne permettent pas de préjuger des résultats qui seront obtenus en étude clinique. Les résultats de l'étude REAGI seront donc importants, car ils permettront la première évaluation des conséquences cliniques de l'exposition au rémifentanil en période périnatale, avec l'espoir d'entrevoir des effets similaires à ceux qui ont été constatés chez l'animal.

SUMMARY

Improving the protection of the developing brain of preterm infants is a major challenge in the care of these children during their stay in neonatal resuscitation. In spite of the reduction in morbidity and mortality resulting from better obstetrical follow-up resuscitation in the birth room and the first weeks of life, premature infants are at risk of developing neurodevelopment disorders. Neurological sequels, motor and cognitive impairments resulting from these disorders can be definitive. It is therefore important to assess the effect of perinatal management on neurodevelopmental disorders. The impact of exposure to general anesthesia during the neonatal period on the developing brain is still currently a topic of discussion integrating this problem. Remifentanil is a synthetic opioid with pharmacokinetic properties (short duration of action, absence of accumulation) that promote its perinatal use. Before birth, it can be administered to the mother of the unborn child during general anesthesia for caesarean section, or during labour for epidural analgesia. It is also increasingly used as a sedative for some invasive procedures during neonatal intensive care stay. Actually, exposure to this morphinic in the neonatal period, often in the context of prematurity, is becoming more and more frequent. It was therefore necessary to assess its potential impact on the developing brain. Studies of the mechanisms involved in remifentanil mediated hyperalgesia demonstrated an interaction between this molecule and the NMDA-sensitive receptor (NMDA-R) in the spinal cord. Furthermore, an ex vivo model of brain organotypic slices from 2-day-old (P2) mice showed that NMDA-R activation exerts a dual action on the developing cortex: pro-necrotic in mature deep layers (V-VI) and anti-apoptotic in the immature superficial layers (II-IV).

The first objective of this PhD thesis was to identify a possible interaction between remifentanil and NMDA-R in the immature cortex using the previously described *ex vivo* model of cultured brain slices. In particular, the aim was to determine whether remifentanil would modify the activity of NMDA-Rs and to characterize the impacted pathways. The work carried out for this purpose was the subject of a first publication. We have shown that remifentanil exerts an anti-apoptotic action within the II-IV layers of the immature cortex without altering necrotic cell death in deep V-VI cortical layers. The anti-apoptotic effect of remifentanil involves the receptor μ and NMDA-R and the intrinsic apoptotic pathway. In the presence of NMDA, remifentanil potentiates its inhibitory effect on apoptosis without increasing its action

on necrosis. Remifentanil and glycine, present in the commercial formulation of remifentanil (Ultiva[®]), act synergistically to inhibit cortical apoptosis.

In human, neonatal brain lesions may induce more or less pronounced functional deficits at medium and long term. In a second part of my PhD thesis, we aimed to determine whether the neuroprotective effects of remifentanil previously found *ex vivo* were also observed *in vivo* by focusing on anatomical, functional and behavioral aspects.

For this purpose, we used an *in vivo* murine model of excitotoxic brain lesions caused by the intracortical injection of ibotenate in P2 mice. This model allows inducing intracerebral lesions similar to the periventricular leucomalacies observed in premature infants. In a first step, the impact of remifentanil on the production of free radicals, reactional astrogliosis, apoptotic death and lesion size induced by the injection of ibotenate was thus evaluated up to five days after the induction of the lesion. In a second step, the integrative aspects were considered by behavioral tests. The consequences of exposure to remifentanil in ibotenate-treated mice were evaluated on several sensorimotor tests up to P12 days as well as on locomotor activity at P18. Results were compiled in a second publication under submission.

A clear neuroprotective effect of remifentanil was demonstrated. In particular data revealed that, when it was co-administered with ibotenate at P2, remifentanil induced a very significant reduction in the size of the cortical lesions (divided by 3) at P7. This beneficial effect is preceded by a decrease in the production of free radicals, apoptotic activity, cell death and in a reduction of astrogliosis in the injured hemisphere. Negative geotaxy tests and grip tests performed up to P12 have shown that administration of remifentanil helps to counteract the deleterious effects of the lesion on the sensorimotor performance of mice. At P18, female mice injured and treated with remifentanil are less anxious in the open field device than control mice. The anxiolytic effect of remifentanil in injured males appears more fleeting. No specific effect of remifentanil administered alone was observed on sensorimotor performances up to P12, nor on anxiety in the open field test at P18.

Our experimental results obtained both *ex vivo* and *in vivo* and demonstrating an anti-apoptotic and neuroprotective effect of remifentanil in mice led us to deposit in November 2013 a medical research protocol: the REAGI protocol (Principal Investigator F.

SUMMARY

Tourrel). The REAGI project is a prospective, randomized, monocentric, double blinded study over a 4 ½ years period. Its main objective is to compare the clinical condition of children born of caesarean section under general anesthesia with or without remifertanil administration prior to cord clamping on developmental outcomes. The data from this study are being collected during the first 2 years of life.

In conclusion, we demonstrated in our experimental work a beneficial effect of remifentanil in newborn mice. The neuroprotection induced by the exposure to this morphinic is related to an anti-apoptotic effect involving the μ -receptor and the NMDA-R. We didn't only observe this neuroprotection on the anatomical and histological observations, but also at short and medium term behavioral levels. These experimental results are encouraging but do not allow to prejudge the results that will be obtained in clinical study. The results of the REAGI study will therefore be important because they will provide the first evaluation of the clinical consequences of exposure to remifentanil in the perinatal period, with the hope of seeing similar effects to those characterized in animals.

AC : adénylate cyclase ADNP : activity-dependent neuroprotective protein AG : anesthésie générale AMPc : adénosine monophosphate cyclique Ask : apotosis signal-regulating kinase ATP : adénosine triphosphate Bax : BCL-2-associated X protein Bcl-2 : B-cell lymphoma 2 **BDNF** : brain derived neurotrophic factor BHE : barrière hémato-encéphalique Ca²⁺ : ion calcium Cl⁻: ion chlore EAAT : excitatory amino acid transporter Erk : extracellular signal-regulated kinases GFAP : glial fibrillary acidic protein Gi/Go : protéine G de type Gi/Go **GLNase** : glutaminase GluA1-4 : sous-unités du R-AMPA GluK1-5 : sous-unités du récepteur kaïnate GluN1-3 : sous-unités du R-NMDA Glut-1 : *glucose transporter 1* Gq : protéine G de type Gq GSase : glutamine synthase Ibo : iboténate ic : intracortical iGluR : récepteur ionotropique du glutamate IL-1 β -6-9-10 : interleukines IRM : imagerie par résonance magnétique JNK : c-Jun N-terminal kinase LPS : lipopolysaccharide LPV : leucomalacie périventriculaire

MAGUK : membrane associated guanylate kinase Mg²⁺ : ion magnésium mGluR : récepteur métabotropique du glutamate Na⁺ : ion sodium nNOS : neuronal nitric oxide synthase NO : nitric oxide ORL-1 : opioid receptor-like 1 PI3K : phosphoinositide 3 kinase PKC : protéine kinase C PMA : phorbol 12-myristate 13-acétate PX : jour postnatal X R-AMPA : récepteur glutamatergique sensible à l'α-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoazole R-GABA_A : récepteur à l'acide gammaaminobutyrique de type A R-KA : récepteur glutamatergique sensible à l'acide kaïnique R-NMDA : récepteur glutamatergique sensible au N-Méthyl-D-Aspartate **ROS** : radicaux libres SA : semaine d'aménorrhée SG : semaine de gestation/de grossesse SNAT : transporteur sodium dépendant SNC : système nerveux central SSPI : salle de surveillance postinterventionnelle TM : domaine transmembranaire TNF-α: tumor necrosis factor V-GLUT1-3 : vesicular glutamate transporter 1-3 Zn²⁺ : ion zinc

Figure 1 : Effets des différents agents anesthésiques communément utilisés en anesthésie
et en réanimation sur l'activité de récepteurs ionotropiques7
Figure 2 : Chronologie des évènements importants au cours du développement du cerveau.
9
Figure 3 : Pourcentage cumulé des troubles de l'apprentissage en fonction de l'âge d'enfants
exposés à 0, 1 ou de multiples anesthésies générales15
Figure 4 : Résultats des tests de mémoire effectués chez des enfants de 6 à 11 ans ayant subi
ou non une anesthésie avant l'âge de 1 an 17
Figure 5 : Liens entre le rémifentanil et le récepteur NMDA
Figure 6 : Libération et recapture du glutamate au sein de la synapse
Figure 7 : Représentation des sites de liaison des divers modulateurs du R-NMDA 31
Figure 8 : Distribution cérébrale des sous-unités du R-NMDA
Figure 9 : Caractère dual du NMDA sur le cortex immature de souris âgée de 2 jours 35
Figure 10 : Mécanismes moléculaires mis en jeu lors de la cascade excitotoxique
Figure 11 : Superposition des étapes du développement cérébral entre l'Homme et la Souris.
Figure 12 : Comparaison de la mise en place des six couches corticales entre l'Homme et la
Souris
Figure 13 : Déroulement de l'étude REAGI 120
Figure 14 : Taux de phosphorylation en position 1472 de la sous-unité GluN2B du R-NMDA
en condition contrôle (aCSF) ou en présence de C.P. rémifentanil 50 μ M 134
Figure 15 : Effets de l'ifenprodil (10 μ M) et de la chelerythrine (10 μ M) seuls ou associés avec
le C.P. rémifentanil (50 μ M) sur les morts apoptotique et nécrotique au sein du cortex de
souris P2

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Incidence des complications cardiovasculaires pendant l'anesthésie (per-op) et
en salle de surveillance post-interventionnelle (SSPI) en fonction de l'âge
Tableau 2 : Incidence des complications respiratoires pendant l'anesthésie (per-op) et en
salle de surveillance post-interventionnelle (SSPI) en fonction de l'âge5
Tableau 3 : Caractéristiques pharmacocinétiques originales du rémifentanil par rapport à
différents morphiniques utilisés en anesthésie humaine8
Tableau 4 : Délais d'extubation, de transfert en salle de réveil et de retour dans le service
chez des enfants classés par groupes d'âge, ayant reçu ou non du rémifentanil pour
tunnellisation de valve ventriculopéritonéale 21
Tableau 5 : Taux de réussite d'intubation sous rémifentanil et effets secondaires indésirables
en fonction de l'âge gestationnel à la naissance 22
Tableau 6 : Classification des récepteurs du glutamate. 28
Tableau 7 : Effet de l'injection d'iboténate sur le cortex en développement chez la Souris.
Tableau 8 : Mise en parallèle de la physiopathologie du développement chez l'Homme et la
Souris
Tableau 9 : Caractéristiques cliniques de la population maternelle étudiée
Tableau 10 : Caractéristiques démographiques des nouveaux nés étudiés 122
Tableau 11 : Evènements indésirables respiratoires néonataux. 123
Tableau 12 : Evaluation néonatale initiale. 124
Tableau 13 : Evènements indésirables hémodynamiques néonataux 124
Tableau 14 : Critères d'évaluation du développement de l'enfant à 1 et 2 ans (1/2) 126
Tableau 15 : Critères d'évaluation du développement de l'enfant à 1 et 2 ans (2/2) 127

Ι.	INTR	ODUCTION1
1.	An	esthésie en période périnatale 3
	a.	Contexte d'utilisation des agents anesthésiques
	b.	Modes d'action des agents anesthésiques6
	с.	Neurodéveloppement et agents anesthésiques8
	c.1	Potentialités délétères et/ou neuroprotectrices : données expérimentales 10
	c.2	Potentialités délétères et/ou neuroprotectrices : données cliniques
2.	Ré	mifentanil 20
	а.	Propriétés pharmacocinétiques 20
	b.	Utilisation du rémifentanil chez les nouveau-nés
	с.	Rémifentanil et récepteur au NMDA 24
3.	Le	glutamate : acteur du neurodéveloppement et de l'excitotoxicité 27
	а.	La neurotransmission glutamatergique27
	b.	Les récepteurs sensibles au N-méthyl-D-aspartate
	с.	Récepteur NMDA : un signal de survie pour les neurones en développement 33
	d.	Le glutamate : un acteur clé dans la cascade excitotoxique et les lésions
	cérél	prales du nouveau-né
4.	Ch	oix du modèle d'étude : parallèle physiopathologique cérébral Homme-Souris 37
II.	Obje	ctifs de la thèse 45
III.	Résu	ltats 49
The	Antia	poptotic Effect of Remifentanil on the Immature Mouse Brain: An Ex Vivo Study
	•••••	
Neu	ropro	tective Effects of Remifentanil Against Excitotoxic Brain Damage in the Newborn
Mice	e	
Rép	ercuss	ions sur l'Adaptation à la Vie Néonatale de l'Utilisation du Rémifentanil au cours
d'un	Prot	ocole d'Anesthésie Générale pour Césarienne dans un Contexte de prématurité
	•••••	
IV.	Discu	ission et perspectives 129
v.	Réfé	rences bibliographiques

I/ INTRODUCTION

1. Anesthésie en période périnatale

a. Contexte d'utilisation des agents anesthésiques

Des progrès significatifs ont été réalisés en termes de prise en charge des enfants prématurés, qui se traduisent par une amélioration de leur survie, ainsi qu'une diminution significative des handicaps neurologiques d'origine périnatale, diminution plus marquée chez les enfants de petit ou très petit poids de naissance (Sellier et al., 2016). La prévalence de ces handicaps a progressivement diminué jusqu'à atteindre environ 1,8/1000 naissances (Sellier et al., 2016). La naissance prématurée, qui intervient pour environ 7 % des grossesses est responsable de la moitié de ces handicaps (soit 4 000 naissances par an en France) (Hagberg et al., 2001; Zeitlin et al., 2013). Parmi les facteurs de risque, les enfants prématurés ou nés à terme peuvent être exposés à une asphyxie néonatale (Reid et al., 2006). Un tiers de ces asphyxies est anténatal et n'est pas diagnostiqué lors de la naissance. La prématurité concerne 60 % des enfants nés par césarienne sous anesthésie générale (AG). De plus, lorsque la césarienne se pratique sous AG, dans 80 % des cas le contexte est celui de l'urgence, avec un risque d'hypoxie fœtale accru (contexte de retard de croissance intra utérin, défaut de perfusion ombilicale par hématome rétroplacentaire ou procidence du cordon ombilical ...)(MacLennan, 1999). L'impact sur l'enfant à naître des agents anesthésiques utilisés lors du protocole anesthésique de la mère n'est actuellement pas clairement établi (Wilder et al., 2009 ; Kalkman et al., 2009). La conduite de recherches orientées vers ces aspects cliniques revêt une importance considérable pour les enfants et leurs familles et pourrait avoir un impact économique majeur, sachant que les enfants prématurés sont susceptibles d'être porteurs de handicaps définitifs.

Les aspects histopathologiques majeurs observés dans le cerveau des enfants prématurés sont les hémorragies intra-crâniennes (qui conduisent à l'hydrocéphalie avec atrophie de la substance blanche) et les maladies de la substance blanche périventriculaire parmi lesquelles les leucomalacies périventriculaires (LPV) sont les plus fréquentes (Pavlova and Krägeloh-Mann, 2013). Les prématurés (nés à moins de 37 semaines de grossesse, SG) et les grands prématurés (< 32 SG) sont des populations à risque de développer des lésions destructrices (clastiques) détectables par échographie ou par imagerie à résonance magnétique (IRM) et responsables de troubles moteurs et/ou cognitifs. Ces lésions affectent

3

INTRODUCTION

entre 5 et 15 % des prématurés et représentent l'une des formes les plus courantes de lésion cérébrale constituant la principale cause de paralysie cérébrale chez les prématurés. En s'approchant du terme, la nature des lésions cérébrales va évoluer et progressivement impacter la substance grise en cours de maturation (Mukerji et al., 2015; Pavlova and Krägeloh-Mann, 2013).

En période néonatale, les nouveau-nés peuvent bénéficier d'une anesthésie générale pour diverses raisons : des chirurgies mineures telles que des réductions de hernies inguinales, ou des chirurgies plus complexes, comme des prises en charge d'omphalocèles ou bien des prises en charge de cardiopathies congénitales. Il peut également être nécessaire de sédater des nouveau-nés au cours de leur prise en charge en réanimation, afin de permettre des soins invasifs, des imageries nécessitant une immobilité prolongée (IRM) ou afin d'optimiser une ventilation mécanique (Lee et al., 2015). Le fait est que les enfants nécessitant ces différents actes sous anesthésie générale sont par définition des enfants fragiles, souvent nés prématurément. Les difficultés de prise en charge de ces enfants sont réelles. En premier lieu, ce qui préoccupe les anesthésistes intervenant chez ces enfants sont les complications immédiatement identifiables. Les complications hémodynamiques et respiratoires sont identifiées comme étant les premières causes de morbi-mortalité en anesthésie pédiatrique (Murat et al., 2004). Un élément apparaissant comme facteur de risque prépondérant est l'âge de l'enfant. Un enfant de moins de 1 an a 10 fois plus de risques d'avoir une complication cardiovasculaire (bradycardie) au cours d'une anesthésie générale par rapport à des enfants âgés de 3 à 4 ans (Tableau 1). De même, les complications respiratoires per-opératoires sont 4 fois plus élevées chez les enfants de moins de 1 an par rapport à des enfants plus âgés (Bordet et al., 2002; Keenan et al., 1994; Murat et al., 2004; Tay et al., 2001) (Tableau 2).

Complications cardiovasculaires	per-op 0-1 an	per-op 1-7 ans	per-op 8-16 ans	SSPI 0-1 an	SSPI 1-7 ans	SSPI 8-16 ans
Anesthésies (n)	3 681	12 495	6 867	3 681	12 495	6 867
Arrêt cardiaque	4	2	2	0	0	0
Bradycardie	12	9	10	0	1	0
Hypertension	0	0	0	1	0	0
Hypotension	4	6	11	0	0	0
Hypovolémie	8	6	3	0	0	1
Défaillance circulatoire	3	2	1	1	0	0
Tachycardie	0	0	1	0	0	0
Troubles du rythme	0	2	5	0	0	0
Total	31	27	33	2	1	1
N/1 000 anesthésies	8,4	2,2	4,8	0,5	0,1	0,2

 Tableau 1 : Incidence des complications cardiovasculaires pendant l'anesthésie (per-op) et en salle de surveillance post-interventionnelle (SSPI) en fonction de l'âge.

D'après Murrat et al., 2004.

Complications	per-op	per-op	per-op	SSPI	SSPI	SSPI
respiratoires	0-1 an	1-7 ans	8-16 ans	0-1 an	1-7 ans	8-16 ans
Anesthésies (<i>n</i>)	3 681	12 495	6 867	3 681	12 495	6 867
Bronchospasme	19	25	4	4	11	5
Hypercapnie	8	10	1	5	5	8
(PetCO₂ > 55mmHg)						
Hypoxémie	56	90	24	21	34	15
(SpO ₂ < 90 %)						
Inhalation	2	4	4	1	5	3
Intubation difficile	9	7	6	-	-	-
non prévue						
Intubation œsophagienne	3	2	1	-	-	-
Intubation sélective	6	3	1	3	5	7
Laryngospasme	17	31	9	1	6	4
Œdème pulmonaire	0	0	2	1	9	7
Pneumothorax	0	2	0	1	7	6
Ré-intubation	13	17	7	5	11	9
Traumatisme dentaire	-	-	-	0	3	1
Dépression respiratoire	-	-	-	12	17	10
post-opératoire						
Total	133	191	59	54	113	75
N/1 000 anesthésies	36,1	15,3	8,6	14,7	9,0	10,9

Tableau 2 : Incidence des complications respiratoires pendant l'anesthésie (per-op) et en salle de surveillance post-interventionnelle (SSPI) en fonction de l'âge.

D'après Murrat et al., 2004.

Les complications neurologiques, par toxicité des différents agents anesthésiques utilisés ont été évoquées depuis de nombreuses années (Dahmani et al., 2012; Ikonomidou et al., 1999; Soriano and Anand, 2005; Wilder et al., 2009). Les conséquences se traduisant par des troubles de l'apprentissage plusieurs années suivant l'anesthésie, rendent compliquée l'analyse de ce phénomène par rapport aux complications hémodynamiques et respiratoires, aux conséquences immédiates, en termes de morbidité voire de mortalité. Les modes d'action même des agents anesthésiques, utilisés lors d'une phase active du développement cérébral, ont conduit à soupçonner d'éventuelles conséquences sur le neurodéveloppement (Jevtovic-Todorovic et al., 2013).

b. Modes d'action des agents anesthésiques

Schématiquement, il existe 3 types de molécules potentiellement utilisées lors d'une anesthésie générale : des agents induisant la narcose, des antalgiques (la plupart du temps des opiacés) et des curares, agissant au niveau des plaques motrices. Parmi ces molécules, celles interagissant avec le système nerveux central (SNC) sont donc les 2 premières, les curares ayant une action tout à fait périphérique (Rudolph and Antkowiak, 2004).

Les agents induisant la narcose ciblent des récepteurs ionotropiques et peuvent être classés en deux grandes catégories (Figure 1) : 1) les inhibiteurs du récepteur glutamatergique sensible au N-méthyl-D-aspartate (R-NMDA) et fortement perméable aux Ca²⁺, comme la kétamine ou le protoxyde d'azote qui bloquent l'activité excitatrice du glutamate ; 2) les potentialisateurs du récepteur à l'acide gamma-aminobutyrique de type A (R-GABA_A) couplé à un canal Cl⁻, comme les benzodiazépines ou les barbituriques qui renforcent l'inhibition synaptique GABAergique (Lee 2015).



Figure 1 : Effets des différents agents anesthésiques communément utilisés en anesthésie et en réanimation sur l'activité de récepteurs ionotropiques.

Les récepteurs canaux sont les cibles privilégiées des agents anesthésiques. Cette figure représente les effets potentiateurs (vert) ou inhibiteurs (rose) de l'action des agents anesthésiques. L'intensité de la couleur des spots est représentative de leur efficacité. Les spots vides dénotent une absence d'effet. Les agents anesthésiques couramment utilisés exercent principalement deux types d'action : 1) un renforcement de l'inhibition synaptique par une activation des récepteurs GABA_A (barbituriques, propofol, étomidate, anesthésiques volatils halogénés) ; 2) un blocage de l'activité excitatrice des récepteurs glutamatergiques de type NMDA (R-NMDA) (kétamine, protoxyde d'azote (N₂O)). En complément de cette action principale *via* les R-NMDA du glutamate et les récepteurs du GABA, certains agents pourraient également avoir, dans des conditions variables (sites anatomique et cellulaire, concentration,...) un effet sur d'autres systèmes neuromodulateurs (acétylcholine, noradrénaline, dopamine, sérotonine...). 5-HT3 : 5-hydroxytryptamine type 3 ; AMPA : α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoazole ; nACh : récepteur nicotinique de l'acétylcholine ; NMDA : N-méthyl-D-aspartate. D'après Rudolph et Antkowiak, 2004.

Enfin, les morphiniques vont également pouvoir agir au niveau du SNC *via* l'activation des récepteurs métabotropiques aux opiacés mu (μ), kappa (κ), et delta (δ) couplés aux protéines G (Kieffer and Evans, 2009; Mansour et al., 1995; Martin et al., 1976; Pleuvry, 1993). La majorité des analgésiques opioïdes sont des agonistes du récepteur μ (MOR) couplé à la protéine G $\alpha_{i/o}$ (Tableau 3). Son activation induit une baisse des taux intracellulaires d'AMPc (adénosine monophosphate cyclique) pouvant initier une diminution de l'influx calcique dans la cellule et une hyperpolarisation cellulaire, aboutissant à une inhibition de la transmission synaptique (Matthes et al., 1996). Le but est d'obtenir une analgésie : en effet, la douleur n'est pas contrôlée en cas d'activation des R-GABA_A et ne l'est que superficiellement en bloquant les R-NMDA. L'utilisation de morphinique en addition des agents inducteurs de narcose se justifie d'une part par cette optimisation de l'analgésie, mais également par la potentialisation de l'effet anesthésique des hypnotiques par les morphiniques (Lysakowski et al., 2001). Par leurs interactions sur différents récepteurs impliqués dans le neurodéveloppement,

INTRODUCTION

l'utilisation des agents anesthésiques impose donc de soulever la question de leur impact sur le cerveau en développement.

	Fentanyl	Alfentanil	Sufentanil	Remifentanil
Affinité pour le récepteur μ	+++	+	++++	++
Délais d'action (min)	5	1,5	5	1
Demi-vie contextuelle après 30 min de perfusion (min)	30	20	10	4
Demi-vie contextuelle après 4h de perfusion (min)	270	60	40	5
Demi-vie contextuelle après 10h de perfusion (min)	>600	60-120	60-120	5

Tableau 3 : Caractéristiques pharmacocinétiques originales du rémifentanil par rapport à différents morphiniques utilisés en anesthésie humaine.

Le rémifentanil apparaît unique par sa pharmacocinétique (délai d'action faible et métabolisme rapide). D'après Egan et al., 1996 et Hughes et al., 1992.

c. Neurodéveloppement et agents anesthésiques

La chronologie des évènements du développement cérébral commence par la neurulation, puis se poursuit pendant la période prénatale par la prolifération, la migration, la différenciation cellulaire, la synaptogenèse et enfin la myélinisation (Figure 2). Ces deux dernières phases se poursuivent après la naissance. Ainsi, le synaptogenèse est maximale de 34 semaines d'aménorrhée (SA) à 2 ans de vie et la myélinisation se poursuit jusqu'à l'âge adulte (Monk et al., 2001; Sinner et al., 2014; Tau and Peterson, 2010). Aux trois dernières étapes, se superpose le processus de mort cellulaire programmée : l'apoptose. Cette mort programmée est un événement important dans le développement normal où elle permet l'élimination de cellules endommagées, anormales ou excédentaires et contrôle ainsi le nombre de neurones et de cellules gliales (Naruse and Keino, 1995). Toutefois mal contrôlée, elle peut également promouvoir et même aggraver un processus pathologique (Hetts, 1998).



Figure 2 : Chronologie des évènements importants au cours du développement du cerveau.

Ce diagramme représente le développement du cerveau humain qui débute par la neurulation puis les processus de prolifération et de migration neuronale suivis par la synaptogenèse et la myélinisation. A ces trois derniers évènements, se superpose le processus d'apoptose. D'après Tau et Peterson, 2010.

Les signalisations glutamatergique et GABAergique sont particulièrement importantes tout au long du développement cérébral (Herlenius and Lagercrantz, 2004; Nguyen et al., 2001). Les R-NMDA et les R-GABA_A, cibles de la plupart des molécules utilisées en anesthésie, y jouent un rôle prépondérant. Ainsi, les R-NMDA interviennent dans la différenciation neuronale, la plasticité synaptique et la survie cellulaire (Dingledine et al., 1999; Paoletti and Neyton, 2007). La présence de R-NMDA sur les cônes de croissance favorise le guidage axonal et la formation initiale des synapses (Wang et al., 2011b). L'activation des R-GABA_A chez l'adulte est associée à une inhibition synaptique, mais la situation est différente au cours du développement. Dans le cerveau immature, l'activation des R-GABA_A provoque une dépolarisation. Cette action dépolarisante ou « excitatrice » du GABA est due à une concentration intracellulaire élevée en ions chlorure et à un potentiel de repos plus hyperpolarisé que le potentiel d'équilibre du chlore dans les neurones immatures (Galanopoulou, 2007; Owens et al., 1996). Cette propriété s'explique par la différence de maturité entre les systèmes d'extrusion du chlore (co-transporteur potassium-chlore KCC2) et les systèmes responsables de son accumulation (co-transporteur sodium-potassium-chlore NKCC1) (Li and Xu, 2008). Alors que NKCC1 est présent dès les stades embryonnaires, KCC2 n'est exprimé qu'aux stades périnataux et voit son niveau d'expression s'accroître au cours de la première semaine de vie postnatale chez le rongeur (Clayton et al., 1998; Kahle and Staley, 2008; Rivera et al., 1999). Le passage progressif du GABA excitateur vers le GABA inhibiteur s'établit chez le rongeur à partir du 5^{ème} jour postnatal (P5) jusqu'à P17 en fonction de l'espèce, du sexe et de la région cérébrale concernée (Ben-Ari et al., 2007). Chez l'Homme, l'expression corticale de KCC2 augmente fortement à partir de la 30^{ème} semaine de gestation (Vanhatalo et al., 2005). Les R-GABA_A interviennent dans la prolifération, la migration et la survie cellulaire (Bolteus and Bordey, 2004; Haydar et al., 2000; Parga et al., 2007). Ils jouent également un rôle dans la croissance dendritique et l'intégration synaptique (Chattopadhyaya et al., 2007; Ge et al., 2006; Henschel et al., 2008). Les récepteurs aux opiacés jouent un rôle dans la différentiation neuronale (Persson et al., 2003; Sargeant et al., 2008). De plus, les récepteurs δ sont impliqués dans la neurogenèse et la prolifération cellulaire (Sargeant et al., 2008)

c.1 Potentialités délétères et/ou neuroprotectrices : données expérimentales

Compte tenu de l'implication des R-NMDA et des R-GABA_A dans le développement cérébral, l'impact de la modulation de leur activité sur le neurodéveloppement a été assez largement étudié sur un plan expérimental. Les interactions des agents anesthésiques avec les R-NMDA et les R-GABA_A semblent, dans la littérature, être majoritairement délétères sur le cerveau en développement. La plupart des études menées chez le rongeur et le primate non humain retrouvent une augmentation de la mort apoptotique en cas d'exposition aux molécules d'anesthésie en période fœtale ou postnatale (Bhutta et al., 2007; Brambrink et al., 2012; Ikonomidou et al., 1999; Patel and Sun, 2009; Soriano and Anand, 2005; Wang and Slikker, 2008; Yon et al., 2005; Zhu et al., 2010). Une potentialisation de l'effet proapoptotique est observée quand deux anesthésiques, tels que la kétamine et le midazolam sont associés (Ikonomidou et al., 1999; Young et al., 2005)

De plus, l'exposition aux antagonistes du R-NMDA ou aux agonistes des R-GABAA impacte sur le développement neuronal, en termes de différenciation et de plasticité neuronale. Ainsi la kétamine, administrée chez la souris gestante, induit une mortalité et une altération de la différenciation des interneurones GABAergiques corticaux de la souris nouveau-née (Aligny et al., 2014). In vitro, une faible dose de kétamine altère la morphologie neuronale et l'arborescence dendritique sans avoir d'incidence sur la mort cellulaire (Vutskits et al., 2006, 2007). De plus, en période périnatale, une seule injection de kétamine modifie le profil d'expression corticale des sous-unités du R-NMDA et l'adressage de celui-ci à la membrane, suggérant un retard dans la maturation synaptique (Lecointre et al., 2015). Le sevoflurane, qui semble avoir des effets plutôt positifs en clinique, a également été exploré sur le plan expérimental. Un travail réalisé en 2013 montre qu'une exposition de rats nouveaunés à du sevoflurane 2 % pendant 2 h (une posologie tout à fait superposable à ce qui est utilisé en clinique humaine) entraîne au niveau de l'hippocampe des altérations dans la plasticité synaptique persistant jusqu'à l'âge adulte (Kato et al., 2013). Le propofol et l'isoflurane modifient la densité dendritique des neurones, mais en altèrent également la fonction, en perturbant le transport axonal suite à une perte de microtubules (Briner et al., 2010; Lemkuil et al., 2011; Pearn et al., 2012; Vutskits et al., 2005).

L'exposition aux agents anesthésiques peut également influencer l'expression des récepteurs qu'ils ciblent. Ainsi, l'exposition de jeunes singes à la kétamine pendant 24 h induit une augmentation de l'expression corticale du R-NMDA chez ces animaux (Slikker et al., 2007). Chez la Souris, la kétamine module l'expression corticale des sous-unités du R-NMDA en fonction de l'âge auquel elle est administrée (Lecointre et al., 2015). La perturbation des signalisations glutamatergique et GABAergique par les anesthésiques chez l'animal entraîne des perturbations comportementales durables. Ainsi, la kétamine administrée en période périnatale entraîne des déficits cognitifs durables chez le primate non humain (Paule et al., 2011) ainsi que des perturbations de l'activité locomotrice chez la souris adulte (Fredriksson et al., 2004; Lecointre et al., 2015; Viberg et al., 2008). L'exposition au sevoflurane pendant la période néonatale diminue également les performances des rats, devenus adultes, à des tests de reconnaissance aux odeurs (Stratmann et al., 2014).

11

Cependant, ces résultats négatifs sont à mettre en balance avec d'autres observations. Dans la majorité des cas, les données précédentes ont été obtenues chez des animaux ne subissant aucune agression chirurgicale, ni soumis à un stress ou à un stimulus nociceptif tel qu'on peut l'observer dans les situations cliniques. Plusieurs études menées dans des modèles hypoxo-ischémiques ou traumatiques chez le rongeur adulte montrent en effet que la kétamine peut exercer un effet neuroprotecteur (Church et al., 1988; Shapira et al., 1994). Cet effet neuroprotecteur a également été décrit chez le rat nouveau-né ayant subi une hypoxoischémie cérébrale, une inflammation ou une situation de stress répété (Anand et al., 2007; Rovnaghi et al., 2008; Spandou et al., 1999). De même, un préconditionnement par l'isoflurane 24 h avant une épreuve hypoxo-ischémique semble réduire les conséquences en termes de perte neuronale au niveau du cortex cérébral et de l'hippocampe. Cet effet neuroprotecteur s'accompagne d'une amélioration des performances motrices et cognitives chez des rats âgés de 6 jours (Zhao et al., 2007). Plus récemment, il a été montré, dans un modèle néonatal murin de cerveau agressé (par hypoxie-ischémie) qu'une association d'une hypothermie modérée et une inhalation de sevoflurane pouvait être neuroprotectrice (Lin et al., 2014a). Ces différentes observations montrent bien que le contexte d'exposition aux différents agents d'anesthésie compte énormément lorsqu'il s'agit d'en évaluer les conséquences.

Concernant les morphiniques, plusieurs études menées *in vivo* chez le rongeur adulte reportent un effet neurotoxique des morphiniques (Emeterio et al., 2006; Mao et al., 2002). Il a également été rapporté chez le Rat, que l'exposition prénatale à la morphine affecte la migration et la survie des neurones embryonnaires (Harlan and Song, 1994). Pendant la période périnatale, l'exposition à la morphine diminue la densité neuronale corticale chez le raton (Seatriz and Hammer, 1993). Plus récemment, il a été observé que l'administration répétée de morphine chez le raton de P1 à P7 augmente la mort apoptotique des neurones du cortex et de l'amygdale alors que ceux de l'hippocampe, de l'hypothalamus et du tronc cérébral ne sont pas atteints (Bajic et al., 2012). En revanche, administrée plus tard chez le raton de P7 à P15 ou de P15 à P20, la morphine n'induit pas d'apoptose corticale et ne perturbe pas la différentiation dendritique (Massa et al., 2012). L'administration de morphine chez des rates gestantes provoque des altérations cognitives associées à une diminution

INTRODUCTION

hippocampique de l'activité et de l'expression des R-NMDA postsynaptiques chez le raton (Lin et al., 2009). Enfin, dans un modèle de culture de cellules neuronales et microgliales issues de fœtus humain, il a été observé un effet apoptotique de la morphine (Hu et al., 2002). Un mécanisme est proposé afin d'expliquer ces effets délétères constatés : les morphiniques agissent sur le récepteur μ , couplé à une protéine G_{i/o}. Une stimulation prolongée du récepteur μ induit la phosphorylation du récepteur, puis le découplage du récepteur et de la protéine G, suivi d'une association à la β -arrestine. Par la suite, un complexe récepteur/ β -arrestine/Erk, inhibe les effets positifs de Erk sur la croissance du neurone. De plus, la β -arrestine peut entraîner une augmentation de l'apoptose *via* JNK (*c-Jun N-terminal Kinase*) et Ask (*Apoptosis signal-regulating kinase*) (Tegeder and Geisslinger, 2004). Une exposition chronique aux morphiniques induit également une diminution de l'expression du facteur neurotrophique BDNF (*brain derived neurotrophic factor*) au niveau de l'hippocampe (Schrott et al., 2008). L'ensemble de ces effets induit au final une diminution de la croissance cérébrale.

A l'instar des anesthésiques ciblant les R-NMDA et les R-GABAA, l'administration d'opioïdes peut avoir un impact positif dans un contexte d'atteinte cérébrale. Ainsi, la biphaline, un dimère analogue des enképhalines, testée sur un modèle murin de traumatisme crânien induit un effet neuroprotecteur. Les performances comportementales réalisées jusqu'à 7 jours après un traumatisme crânien standardisé sont en effet améliorées chez les animaux traumatisés et traités par la biphaline. Ces animaux retrouvent des performances similaires aux animaux non traumatisés. La co-administration de naltrexone, antagoniste des récepteurs opioïdes, réverse l'action de la biphaline, suggérant l'implication de ces récepteurs dans son effet neuroprotecteur. Il n'existe cependant à l'heure actuelle pas de données plus complètes permettant d'expliquer clairement les effets neuroprotecteurs constatés (Lesniak et al., 2016). Lors d'un épisode de douleur intense ou de douleurs moindres mais répétées chez le rat nouveau-né, il a également été décrit un effet anti-apoptotique de la morphine au niveau cérébral (Dührsen et al., 2013). Toutefois, l'impact des opoïdes dans un contexte de souffrance cérébrale peut varier suivant les conditions d'utilisation. Une étude menée dans un contexte hypoxo-ischémique chez le rat nouveau-né montre que l'infusion continue pendant 72 h de morphine n'a aucune incidence sur les dommages cérébraux (Kawaraguchi et al., 2008). Dans un contexte excitotoxique, l'administration de sufentanyl n'a aucun impact

13
sur l'étendue de la lésion cérébrale induite chez le souriceau alors que le fentanyl exacerbe l'étendue de la lésion *via* l'activation des récepteurs ORL1 (*opioid receptor-like 1*) (Laudenbach et al., 2001).

Les études expérimentales publiées concernent surtout l'impact de la morphine sur le cerveau en développement, en revanche il n'existe pas, en dehors de nos travaux, de données s'intéressant précisément aux effets du rémifentanil sur le cerveau en développement. Cependant, un effet neuroprotecteur du rémifentanil a été observé chez des rats adultes, dans un modèle hypoxo-ischémique (Jeong et al., 2012). Les tailles d'infarctus cérébraux induits par l'ischémie sont en effet significativement moins étendues chez les animaux traités par le rémifentanil par rapport au groupe contrôle, et de meilleures performances fonctionnelles sont observées. Cet effet est accompagné d'une diminution significative du facteur inflammatoire TNF- α (tumor necrosis factor). L'effet bénéfique du rémifentanil n'est pas retrouvé après la co-administration d'un antagoniste des récepteurs aux morphiniques δ , suggérant une implication de ces derniers dans les effets neuroprotecteurs observés.

c.2 Potentialités délétères et/ou neuroprotectrices : données cliniques

La transposition des données retrouvées dans ces expérimentations animales à l'Homme n'est pas aisée pour plusieurs raisons : le métabolisme des agents anesthésiques administrés est différent, et il est reconnu qu'une durée d'exposition longue et des doses élevées sont souvent nécessaires chez l'animal afin de retrouver un impact significatif sur les différents paramètres étudiés. Le deuxième élément important limitant l'extrapolation des données animales à l'Homme est l'absence de chirurgie dans les différents protocoles animaux. La douleur et l'inflammation systémique liées à la chirurgie sont notamment absentes des protocoles expérimentaux précédemment cités. Enfin, dans la plupart des cas, les différents paramètres physiologiques (respiratoires, hémodynamiques) ne sont pas contrôlés lors des études animales *in vivo*. Or, ces paramètres sont modifiés par l'AG, et pourraient avoir un impact sur les effets délétères constatés. En effet, l'hypoxie et l'hypotension potentiellement induites par une AG non contrôlée peuvent aggraver ces effets délétères. Chez l'Homme, des mesures correctives permettent de maîtriser ces effets : ventilation mécanique contrôlée, management hémodynamique avec utilisation de

vasopresseurs au besoin ... Ces différences conduisent certains auteurs à nier la possibilité d'un impact sur le neurodéveloppement humain, comparativement à ce qui est démontré chez l'animal (Hansen, 2015).

Depuis la fin des années 2000, avec le développement des connaissances concernant la physiopathologie des lésions cérébrales néonatales, il a été pris conscience que les agents anesthésiques utilisés en période périnatale pouvaient interférer avec la genèse de ces lésions. Plusieurs études ont donc tenté d'évaluer les éventuelles conséquences de l'utilisation d'agents anesthésiques en période périnatale.

En 2009, une étude de cohorte s'intéressant à 5357 enfants nés dans le Minnesota entre 1976 et 1982 s'est intéressée à la survenue ou non de troubles de l'apprentissage en fonction de l'exposition à une ou plusieurs AG. Cinq cent quatre-vingt-treize enfants sur les 5 357 avaient été exposés à une AG. Sur ces 593 enfants, les 449 ayant été exposés à une AG avant l'âge de 4 ans ne présentaient pas d'altération de l'apprentissage par rapport à la population non exposée. Les 144 enfants ayant subi plusieurs AG avant 4 ans étaient eux significativement plus enclins à développer des troubles de l'apprentissage (Figure 3). L'exposition à de multiples AG avant 4 ans ressortait donc comme étant un facteur de risque de développer des troubles de l'apprentissage dans les années suivantes.



Figure 3 : Pourcentage cumulé des troubles de l'apprentissage en fonction de l'âge d'enfants exposés à 0, 1 ou de multiples anesthésies générales. D'après Wilder et al., 2009.

Pour autant, il était impossible d'établir un lien de cause à effet entre les AG répétées et la survenue de troubles de l'apprentissage. En effet, ces études comportent un nombre important de facteurs confondants, et en premier lieu les motifs ayant motivé la réalisation des AG. L'impact de ces diverses pathologies ainsi que les hospitalisations répétées dans la petite enfance sont en effet difficilement individualisables de l'impact lié à l'AG elle-même (Wilder et al., 2009).

En 2013, une revue de la littérature a fait le point sur les données cliniques s'intéressant aux conséquences de l'anesthésie sur le neurodéveloppement (Sanders et al., 2013). Neuf études rétrospectives étaient incluses dans la méta-analyse. Des tendances d'associations entre anesthésie dans l'enfance et effets secondaires néfastes sur le neurodéveloppement étaient suggérées, mais sans qu'il existe de lien réellement démontré. De même, une autre méta-analyse incluant sept études rétrospectives, pour un total de 40 685 enfants ne retrouvait pas non plus de lien évident entre anesthésie et impact sur le neurodéveloppement (DiMaggio et al., 2012)

Une étude plus récente a associé les résultats cliniques et expérimentaux, en explorant les effets d'une AG sur la mémoire à court terme (Stratmann et al., 2014). Les enfants étudiés avaient été endormis avant l'âge de 1 an. Des tests étaient réalisés entre l'âge de 6 et 11 ans. Le groupe ayant été endormi était comparé à un groupe contrôle, constitué d'enfants appariés par sexe et par âge, et n'ayant en revanche jamais été exposés à une AG. La chirurgie et le type d'agents anesthésiques utilisés étaient répertoriés. Les chirurgies réalisées étaient variées, allant de l'hernie inguinale à l'urétérocèle en passant par des ténotomies du tendon d'Achille. Le protocole d'anesthésie n'était pas standardisé, et comprenait des halogénés (sevoflurane, isoflurane, halotane), plus ou moins associés à du protoxyde d'azote. Certains enfants avaient également été exposés à du propofol au cours de la chirurgie. Aucune précision n'était apportée sur l'utilisation de morphiniques et/ou d'autres antalgiques pendant la procédure chirurgicale. Il est cependant très probable que de telles molécules aient été utilisées au cours de l'acte chirurgical. Des tests de reconnaissance étaient réalisés : les enfants du groupe « anesthésie générale » étaient significativement moins performants que les enfants du groupe contrôle (Figure 4). Une étude expérimentale était réalisée en parallèle, utilisant des tests de reconnaissance chez le Rat. Deux groupes avaient été constitués, l'un

exposé à une anesthésie générale par sevoflurane à 7 jours de vie, et un groupe contrôle non anesthésié. Sur ces tests de reconnaissance, les animaux exposés aux agents anesthésiques avaient de moins bons résultats que ceux du groupe contrôle. L'ensemble de ces données justifie donc le fait de mieux chercher à comprendre les effets d'une anesthésie générale sur un cerveau en développement.



Figure 4 : Résultats des tests de mémoire effectués chez des enfants de 6 à 11 ans ayant subi ou non une anesthésie avant l'âge de 1 an.

Les taux de succès (c'est à dire la probabilité de reconnaître correctement un ancien élément comme étant ancien) et le taux de fausses alarmes (c'est à dire la probabilité de reconnaître à tort un nouvel élément comme étant ancien) sont indiqués pour chaque test. Pour le test de reconnaissance de couleurs, le taux de succès était significativement plus faible dans le groupe des enfants anesthésiés. Les taux de fausses alertes n'étaient pas différents entre les groupes pour chaque test. D'après Stratmann et al., 2014.

L'un des problèmes liés à ces études, au moins en partie rétrospectives, reste le nombre considérable de facteurs confondants entrant en jeu dans l'analyse, dont l'environnement socio-culturel de l'enfant au cours de son développement, ainsi que les causes diverses motivant les actes anesthésiques. Un autre écueil majeur de ces travaux est l'absence de contrôle du protocole anesthésique, et donc la diversité de drogues utilisées dans le groupe « anesthésie générale », terminologie très générique rassemblant divers protocoles, utilisant des molécules aux effets et aux cibles variés ayant pour but commun d'aboutir à la

narcose des patients. Les différents auteurs concluent donc en soulignant logiquement le manque de données issues d'études prospectives, randomisées permettant de gommer au moins partiellement ces défauts afin de pouvoir avancer sur l'évaluation clinique de cet impact.

Afin de limiter ces biais, des études prospectives sont nécessaires. Dans cette optique, l'étude « GAS », publiée en 2016, a comparé l'impact sur le neurodéveloppement d'une anesthésie générale versus une anesthésie locorégionale, réalisées chez des enfants âgés d'au moins 60 semaines après aménorrhée (Davidson et al., 2016). Les enfants inclus avaient en pratique entre 1 et 3 mois lors de la chirurgie. Les enfants étaient opérés d'une hernie inguinale. Deux groupes d'environ 360 enfants étaient constitués, l'un sous AG par sevoflurane (un hypnotique halogéné) exclusivement, et l'autre sous anesthésie locorégionale (anesthésie caudale, ou bloc ilio inguinal, ilio hypogastrique au choix). Dans ce travail, la chirurgie réalisée était homogène, et présente dans le groupe « anesthésie générale » et le groupe contrôle. De plus, les protocoles anesthésiques étaient eux aussi standardisés. Dans ces conditions, et en s'appuyant sur les tests réalisés (échelles de bayley-III et MacArthur-Bates), aucune différence n'était relevée en termes de neurodéveloppement à 2 ans. La conclusion des auteurs de cette étude était la suivante : une exposition de moins d'une heure à du sevoflurane dans la première année de naissance n'a pas de conséquences sur le neurodéveloppement à 2 ans de vie. Ces résultats peuvent sembler en contradiction avec les résultats des études précédemment citées. En réalité, l'intérêt de ce travail est de commencer à hiérarchiser les différents agents d'anesthésie utilisés en termes de rapport bénéfice/risque. Il semble donc que le sevoflurane soit plutôt à privilégier lors d'une anesthésie générale chez l'enfant.

L'impact neurotoxique ou neuroprotecteur de la kétamine sur le cerveau en développement en utilisation clinique est également peu clair et reste très controversé au vu des données actuelles (Yan and Jiang, 2014). La kétamine est le plus souvent associée à d'autres anesthésiques en pratique pédiatrique et les études rétrospectives de l'impact de la kétamine administrée seule sont peu nombreuses. Une étude regroupant les données de plusieurs services pédiatriques et concernant 10 000 enfants ne révèle pas de séquelles à court terme chez les enfants exposés à la kétamine (Green and Coté, 2009). Toutefois, les

doses administrées pour la sédation et l'analgésie chez les patients étaient plus faibles que celles utilisées pour l'anesthésie. Plus récemment, il a été décrit dans une étude clinique prospective préliminaire que l'exposition à la kétamine chez des enfants (3-22 mois), à plus de trois reprises lors d'un acte chirurgical bénin, avait un impact défavorable sur leurs performances psychomotrices quelques jours après l'intervention. Une augmentation de la S-100β plasmatique, un marqueur de souffrance cérébrale, est également observée après l'administration de kétamine (Yan et al., 2014). Jusqu'à présent, aucune étude prospective n'a été menée à plus long terme chez l'enfant, ni chez le nouveau-né.

Concernant les morphiniques, leur effet sur les lésions néonatales est controversé dans la littérature : l'étude clinique NEOPAIN, étude prospective, multicentrique, randomisée, s'intéressant à l'effet de l'utilisation de la morphine chez des enfants ventilés concluait en 2004 à une plus forte incidence de lésions hémorragiques intra-ventriculaires chez les enfants traités par les morphiniques (Anand et al., 2004). Toutefois, certains biais peuvent expliquer en partie ces résultats : posologies en morphine élevées et instabilités hémodynamiques plus fréquentes chez les enfants ayant présenté secondairement des hémorragies intraventriculaires. Par ailleurs, une autre étude réalisée chez des enfants prématurés n'a pas retrouvé cet effet délétère de la morphine (Simons et al., 2003).

Plus récemment, une étude s'est intéressée aux effets d'une exposition à la morphine chez des enfants nés en grande prématurité (< 30 SA). Les effets sur le développement anatomique du cerveau et sur l'apparition de troubles du comportement étaient étudiés. A l'âge de 2 ans, les enfants exposés au morphinique présentaient un défaut de développement cortical ainsi qu'une plus forte prévalence de troubles du comportement. Ces effets n'étaient pas retrouvés à l'âge de 7 ans, suggérant une adaptation secondaire à ces troubles du développement cérébral initiaux (Steinhorn et al., 2015).

L'étude de l'impact de l'anesthésie sur le cerveau en développement dépend donc très probablement non seulement de l'agent anesthésique utilisé, du terme auquel cet agent est utilisé, mais également du contexte dans lequel cet agent est utilisé : contexte excitotoxique ou pas, par exemple.

2. Rémifentanil

a. Propriétés pharmacocinétiques

Le rémifentanil est un morphinique de synthèse dérivé de la piperidine, de forte affinité pour les récepteurs μ , et d'affinité moindre pour les récepteurs δ et κ . Sa molécule comporte une liaison ester qui le rend facilement dégradable par des estérases aspécifiques présentes dans les différents tissus organiques. Le métabolite issu de cette dégradation (acide carboxylique) présente une faible affinité pour les récepteurs μ , δ et κ et n'a pas de conséquence clinique. Contrairement aux autres morphiniques, l'élimination du rémifentanil est donc indépendante de la fonction rénale et hépatique. Les études pharmacocinétiques réalisées mettent en évidence un faible volume de distribution, associé à un délai d'action bref de 1 à 2 minutes. Sa demi-vie d'élimination varie de 3 à 10 min (Glass, 1995a). Ces propriétés pharmacocinétiques sont similaires dans des populations d'âges différents et sont également valables chez les nouveau-nés. Une étude s'intéressant à la pharmacocinétique du rémifentanil chez les enfants suggère même une élimination plus rapide chez les enfants âgés de moins de 2 mois (Ross et al., 2001)

b. Utilisation du rémifentanil chez les nouveau-nés

Le rémifentanil est utilisé depuis plusieurs années en chirurgie pédiatrique. En 2008, une équipe a publié des résultats concernant son expérience de l'utilisation du rémifentanil en chirurgie digestive. Les résultats ont montré une sécurité d'utilisation du produit, quelle que soit la tranche d'âge considérée : enfants nouveau-nés prématurés, nouveau-nés à terme ou enfants de moins de 2 ans (Michel et al., 2008). Une autre étude suggère la sûreté et l'efficacité de l'utilisation du rémifentanil chez les enfants, y compris nouveau-nés. Soixantedeux enfants, nouveau-nés prématurés, nouveau-nés non prématurés, enfants de moins de 1 an et enfants de plus de 1 an étaient endormis pour dérivation ventriculopéritonéale. En plus de l'isoflurane et du protoxyde d'azote, utilisés pour endormir ces enfants, deux groupes étaient constitués, l'un recevant du rémifentanil et l'autre du sérum physiologique. Le groupe rémifentanil avait une réponse hémodynamique moindre à la nociception que le groupe ayant reçu du sérum physiologique, lors de ce temps opératoire douloureux. Pour autant, l'exposition à ce morphinique n'avait pas d'incidence négative sur la durée d'intubation et sur le délai de transfert en salle de réveil (Tableau 4) (Chambers et al., 2002).

	Remifentanil	Saline	p-Value
Ex-premature babies*	(<i>n</i> = 4)	(<i>n</i> = 4)	
Tracheal extubation; min	5.0 (4.5-6.5 [4.0-8.0])	6.5 (5.5-11.0 [5.0-15.0])	0.34
Transfer to recovery; min	6.5 (6.0-8.5 [6.0-10.0])	7.5 (7.0–13.0 [7.0–18])	> 0.9
Discharge to ward; min	13.0 (10.0-22.5 [7.0-32.0])	13.5 (11.5-19.5 [11.0-24.0])	> 0.9
Neonates	(n = 8)	(n = 5)	
Tracheal extubation; min	3.0 (2.5-4.0 [1.0-4.0])	2.0 (2.0-3.0 [0-11.0])	0.44
Transfer to recovery; min	5.0 (4.0-6.0 [3.0-9.0])	5.0 (3.0-8.0 [3.0-12.0])	> 0.9
Discharge to ward; min	8.0 (7.5-12.0 [7.0-14.0])	12.0 (9.0-15.0 [7.0-15.0])	0.29
Infants	(n = 13)	(n = 11)	
Tracheal extubation; min	3.0 (2.0-4.5 [1.0-8.0])	3.0 (2.0-6.0 [1.0-15.0])	0.57
Transfer to recovery; min	4.5 (4.5-5.5 [1.0-10.0])	7.0 (4.0-7.0 [2.0-18.0])	0.24
Discharge to ward; min	9.5 (6.0-13.0 [2.0-32.0])	12.0 (10.0-15.0 [7.0-24.0])	0.17
Children over 1 year	(n = 12)	(n = 13)	
Tracheal extubation; min	3.0 (2.0-4.0 [1.0-7.0])	4.0 (3.0-6.0 [1.0-14.0])	0.19
Transfer to recovery; min	4.0 (4.0-5.0 [2.0-8.0])	7.0 (4.0-8.0 [2.0-15.0])	0.09
Discharge to ward; min	10.0 (8.0-14.0 [6.0-19.0])	16.0 (11.0-24.0 [7.0-44.0])	0.03
All ages combined	(n = 33)	(n = 29)	
Tracheal extubation; min	3.0 (2.0-4.0 [1.0-8.0])	3.0 (2.0-6.0 [0-15.0])	0.29
Transfer to recovery; min	4.0 (4.0-5.0 [1.0-10.0])	7.0 (4.0-8.0 [2.0-18.0])	0.06
Discharge to ward; min	9.0 (7.0–13.0 [2.0–32.0])	14. 0 (10.0–19.0 [7.0–44.0])	0.01

Tableau 4 : Délais d'extubation, de transfert en salle de réveil et de retour dans le service chez des enfants classés par groupes d'âge, ayant reçu ou non du rémifentanil pour tunnellisation de valve ventriculopéritonéale.

On ne retrouve pas de différence significative sur ces critères chez les nouveau-nés, y compris prématurés. D'après Chambers et al. 2002.

En chirurgie, l'avantage du rémifentanil par rapport aux autres morphiniques de synthèse, tel que le sufentanyl ou le fentanyl, provient de ses propriétés pharmacocinétiques. Il permet d'obtenir une analgésie puissante, utile lors de chirurgies majeures, sans retarder l'extubation et le transfert en salle de réveil. L'utilisation du rémifentanil a également été décrite pour des sédations lors de procédures moins invasives. Les rétinopathies des nouveau-nés prématurés traitées par laser peuvent notamment bénéficier de l'analgésie procurée par ce morphinique. Une première étude avait inclus six enfants nés prématurément bénéficiant de ces soins en réanimation néonatale. Malgré des posologies très élevées en rémifentanil (un enfant allant jusqu'à recevoir 20 µg/kg/min de rémifentanil durant un court instant), aucune complication hémodynamique (bradycardie ou hypotension) ou respiratoire

(rigidité thoracique) n'était retrouvée dans ce petit groupe de patients. Les auteurs concluaient que l'utilisation de rémifentanil semble sûre pour ce type d'intervention en unité de soins intensifs pédiatriques (Sammartino et al., 2003). Un autre travail s'est intéressé au même sujet, sur le même type de population, 64 enfants étant inclus. Les posologies per procédurales variaient de 0,2 à 0,6 µg/kg/min. Sur les 64 enfants, un épisode de bradycardie et un épisode d'hypotension étaient relevés. L'impact de l'utilisation du rémifentanil sur la ventilation post procédurale semblait négligeable (Demirel et al., 2014). Un autre versant important de l'utilisation du rémifentanil est la sédation lors de procédures d'intubation naso ou oro trachéale et lors de ventilation mécanique, dans le but d'adapter au mieux les enfants ventilés à leur respirateur artificiel. L'intubation est une procédure entraînant une forte stimulation nociceptive, ce qui justifie le fait de la réaliser sous sédation. Dans la plupart des études publiées, les protocoles d'anesthésie utilisant du rémifentanil sont aussi efficaces ou plus efficaces que les protocoles n'en utilisant pas, en ce qui concerne la qualité de l'analgésie ou bien les conditions d'exposition glottique. De plus, peu d'effets secondaires indésirables hémodynamiques ou respiratoires sont retrouvés au cours des études cliniques réalisées dans ce contexte (Tableau 5) (Avino et al., 2014; Badiee et al., 2013; Choong et al., 2010; Crawford et al., 2005; Pereira e Silva et al., 2007).

Parameter	GA≥32 weeks (<i>n</i> =7)	GA<32 weeks (<i>n</i> =16)	Р	
Mean (SD) duration of successful intubation (s)	24.1 (4.6)	14.5 (6)	0.87	
Attempts for successful intubation				
One time	6 (85.7)	11 (68.8)	0.383	
Two times	1 (14.3)	2 (12.5)	0.684	
Three times	0 (0)	1 (6.3)	0.696	
Four times	0 (0)	2 (12.5)	0.474	
Duration of apnea (min)	10 (4.6)	9 (5.2)	0.667	
Chest rigidity	0 (0)	4 (25)	0.204	
Laryngospasm	2 (28.6)	7 (43.8)	0.418	
Naloxan usage	0 (0)	5 (31.3)	0.130	

Data are presented as number (%), Otherwise specified; GA=Gestational age

Tableau 5 : Taux de réussite d'intubation sous rémifentanil et effets secondaires indésirables en fonction de l'âge gestationnel à la naissance.

D'après Badiee et al. 2013.

Par ailleurs, toujours dans un contexte de prématurité, des protocoles de sédation sont actuellement développés afin d'encadrer les procédures d'administration de surfactant en cas de maladie des membranes hyalines. L'évaluation de tels protocoles semble actuellement favorable à l'utilisation du rémifentanil, ne retrouvant pas d'effets indésirables notables, et induisant une analgésie et des conditions de réalisation de la procédure satisfaisantes (Welzing et al., 2009). Enfin, l'utilisation de rémifentanil a été évaluée lors de protocoles de sédation chez des enfants sous ventilation mécanique. Ces sédations sont utilisées de façon prolongée, la plupart du temps sur des périodes de plusieurs jours (3 à 7 jours). Lorsque le morphinique administré est le rémifentanil, le délai d'élimination permettant d'envisager une extubation de l'enfant est un peu plus de 10 fois plus court que lorsque ce morphinique est du fentanyl ou de la morphine. Dans ces études, on ne retrouve pas non plus d'effets secondaires indésirables notables (Giannantonio et al., 2009; e Silva et al., 2008; Stoppa et al., 2004; Welzing et al., 2012).

Les effets secondaires indésirables classiquement décrits lors de l'utilisation de rémifentanil sont essentiellement des effets hémodynamiques et respiratoires. Sur le plan hémodynamique, les effets sont dose-dépendants. Une bradycardie et une hypotension peuvent survenir en cas de bolus réalisé sur une courte durée et à une forte posologie. La limitation de l'utilisation de ce type d'administration permet dans la grande majorité des cas d'éviter ces effets hémodynamiques (Weale et al., 2004). Sur le plan respiratoire, le rémifentanil, comme tous les morphiniques, est dépresseur respiratoire. Lors de son administration de la capnie expirée, si le patient sédaté est en ventilation spontanée (Ansermino et al., 2005). L'avantage du rémifentanil, y compris en cas de survenue de dépression respiratoire plus profonde qu'attendue, réside une nouvelle fois dans son profil pharmacocinétique particulier permettant d'obtenir une reprise rapide de la ventilation après arrêt de la perfusion continue.

Les caractéristiques pharmacocinétiques du rémifentanil font de lui le morphinique dont l'utilisation est théoriquement la moins risquée au cours de l'induction chez la femme enceinte, patiente présentant un risque élevé d'inhalation de liquide gastrique. De plus, des

études réalisées en péri partum suggèrent l'existence de son métabolisme chez le nouveauné (Kan et al., 1998; Ngan Kee et al., 2006). Des études récentes ont montré de faibles répercussions cliniques néonatales au cours de l'utilisation du rémifentanil pour des césariennes sous AG. L'une d'entre elle, s'intéressant à des enfants nés au-delà de 35 SA et de plus de 2 500 g estimés en ante partum, montrait que les enfants nés de césarienne nécessitaient une stimulation externe un peu plus importante que les enfants du groupe contrôle dans les toutes premières minutes de vie (Noskova et al., 2015). Une autre étude, s'intéressant cette fois-ci à l'utilisation du rémifentanil pendant le travail en alternative à l'analgésie péridurale, montrait que l'administration de rémifentanil chez la mère n'avait que peu de conséquences sur l'état clinique des nouveau-nés. Aucune différence cliniquement significative n'était notée en termes de score d'Apgar et de pH au cordon (Lin et al., 2014b).

Enfin, une étude réalisée en 2014 a comparé deux doses de rémifentanil administrées chez des enfants prématurés, âgés en moyenne de 26 SA. Le morphinique était administré afin de couvrir des gestes douloureux lors de l'hospitalisation des enfants en réanimation néonatale, chez des enfants en ventilation mécanique. Cette étude s'est intéressée aux effets secondaires respiratoires et hémodynamiques du morphinique, mais aucune évaluation à moyen ou long terme des fonctions cognitives n'avait été envisagée (Shin et al., 2014).

Ces trois études précédentes illustrent l'intérêt suscité par l'utilisation clinique du rémifentanil chez des nouveau-nés, y compris prématurés. Or, jusqu'à présent, il n'existe aucune donnée expérimentale permettant d'envisager un éventuel impact sur le neurodéveloppement des enfants exposés, qu'il soit positif ou négatif. Il existe pourtant des débuts de pistes physiopathologiques qui pourraient lier le rémifentanil et le R-NMDA dans un contexte de lésions cérébrales néonatales.

c. Rémifentanil et récepteur au NMDA

Il est maintenant clairement démontré que les opioïdes, au-delà de leur effet analgésique, peuvent amplifier chez l'animal algique, les processus de sensibilisation à la douleur, c'est l'hyperalgésie (Célèrier et al., 2000; Convertino et al., 2015; Roeckel et al., 2016). En clinique, la pharmacocinétique d'élimination très rapide du rémifentanil a permis de mettre en évidence l'hyperalgésie aux morphiniques (Angst et al., 2003; Vinik and Kissin,

1998). Il a été montré depuis que cette hyperalgésie existe quel que soit le morphinique utilisé (Angst and Clark, 2006). Le récepteur μ est la cible privilégiée des opiacés utilisés en clinique et son activation induit une analgésie mais également une hyperalgésie (Lee et al., 2011a; Matthes et al., 1996). L'existence de plusieurs isoformes du récepteur µ semble être responsable de ces effets opposés. Le récepteur µ est une protéine à 7 domaines transmembranaires (7 TM) couplée à une protéine G, encodé par le gène humain OPRM1 et murin Oprm1. Depuis sa caractérisation initiale en tant que protéine à 7 TM encodée par 4 exons, plusieurs variants d'épissage alternatif ont été découverts (Pasternak and Pan, 2013). Chez l'Homme, trois isoformes sont décrites : 7 TM (MOR1), 6 TM (MOR1K) et 1 TM. L'isoforme MOR1K est tronquée dans son extrémité N-terminale et n'a pas de domaine extracellulaire, ni de premier domaine transmembranaire. L'activation du récepteur MOR1K induit une excitation cellulaire via l'activation d'une protéine $G\alpha_s$, alors que l'activation du récepteur canonique MOR1 inhibe l'activité cellulaire via l'activation d'une protéine $G\alpha_{i/o}$ (Gris et al., 2010). Plus récemment, il a été montré chez la Souris que la répression de l'expression de MOR1K dans la moelle épinière par une stratégie anti-sens empêche l'hyperalgésie induite par une administration chronique de morphine (Oladosu et al., 2015). Ces résultats ont amené à l'hypothèse que le récepteur canonique MOR à 7 TM est impliqué dans les effets analgésiques des morphiniques alors que la forme tronquée à 6 TM intervient dans l'hyperalgésie.

Plusieurs mécanismes d'action sont proposés dans le développement de l'hyperalgésie induite par les morphiniques. L'un d'eux met en jeu le R-NMDA (Roeckel et al., 2016). En 2005, Joly et collaborateurs ont montré que des fortes doses de rémifentanil per-opératoires entraînaient une augmentation des phénomènes d'hypersensibilité aiguë à la douleur en post-opératoire. L'effet du rémifentanil était prévenu par la kétamine, indiquant l'implication des R-NMDA dans l'hyperalgésie induite par le morphinique (Joly et al., 2005). Ce lien a été confirmé chez l'animal par une approche électrophysiologique concentrée sur les neurones dorsaux de la moelle épinière de Rat qui montrait un effet significatif du rémifentanil sur l'activation des R-NMDA de ces cellules. Les récepteurs μ et δ semblent impliqués dans ces effets (Zhao and Joo, 2008). Selon le modèle d'hyperalgésie induite par une perfusion prolongée de morphinique décrit par Simonnet et Rivat en 2003, la stimulation du récepteur

μ par les opioïdes peut entraîner l'activation du R-NMDA *via* une réaction de phosphorylation par des protéines kinases, dont la PKC (protéine kinase C ; Figure 5 ; Simonnet and Rivat, 2003). En 2009, une étude menée sur la moelle épinière de rat adulte a montré que le rémifentanil induit la phosphorylation de la sous-unité GluN2B du R-NMDA. Cette phosphorylation semble impliquée dans les phénomènes d'hyperalgésie et est inhibée par la co-administration de kétamine (Gu et al., 2009). Plus récemment, il a été démontré dans le même modèle expérimental que la potentialisation du R-NMDA par la morphine est dépendante de l'activation de la PKC (Zhao et al., 2012).



Figure 5 : Liens entre le rémifentanil et le récepteur NMDA.

L'administration de rémifentanil permet d'inhiber la douleur, mais entraîne en parallèle une hyperalgésie *via* la phosphorylation du R-NMDA par la PKC, en présence d'une stimulation nociceptive. D'après Simonnet and Rivat , 2003.

Le rémifentanil, initialement commercialisé et utilisé en pratique clinique sous le nom d'Ultiva[®] (Glaxo SmithKline) puis sous forme générique (rémifentanil, Mylan), contient dans ses excipients de la glycine en quantité non négligeable (pour les conditionnements de 1 mg d'Ultiva[®], 50 µM de rémifentanil sont associés à environ 3,6 mM de glycine). Il est donc possible que la glycine présente comme excipient dans la préparation utilisée en pratique clinique puisse avoir un impact significatif en agissant en tant que co-activateur du R-NMDA. Une étude électrophysiologique (*patch-clamp*) a exploré en 2005, les effets du rémifentanil et

de la glycine sur l'activation du R-NMDA. Un effet significatif était induit en présence de glycine, et cet effet était encore significativement augmenté lorsque le rémifentanil était associé à la glycine (Guntz et al., 2005).

Un lien étroit entre le rémifentanil et le R-NMDA a donc été établi au niveau des neurones de la corne dorsale de la moelle épinière. Dans cette région anatomique, il semble que le rémifentanil et la glycine aient un impact fonctionnel sur les neurones *via* le R-NMDA, induisant un effet indésirable d'hyperalgésie (Guntz et al., 2005).

3. Le glutamate : acteur du neurodéveloppement et de l'excitotoxicité

a. La neurotransmission glutamatergique

Le glutamate est le principal neurotransmetteur excitateur du SNC que ce soit au cours du développement ou chez l'adulte (Meldrum, 1990). L'émergence des synapses glutamatergiques au cours du développement est graduelle et repose sur les niveaux d'expression de molécules-clés pour la plasticité (Lohmann and Kessels, 2014). La transmission glutamatergique implique les cellules gliales ainsi que les neurones pré- et post-synaptiques (Figure 6). Le glutamate agit sur différents mécanismes cellulaires par l'intermédiaire de récepteurs présentant des répartitions et des fonctionnalités variables au cours du développement (Luján et al., 2005). En effet, après sa libération par le pool vésiculaire, le glutamate diffuse dans la fente synaptique et agit sur deux types de récepteurs qui se rapprochent par des similitudes de séquence et de transduction. Il s'agit des récepteurs ionotropiques (ou récepteurs-canaux, iGluR), récepteurs tétramériques perméables aux cations, et des récepteurs métabotropiques qui sont des récepteurs à 7 TM et couplés à une protéine G (mGluR ; Tableau 6 ; Hollmann et Heinemann, 1994).

	Récepteurs glutamatergiques							
	Récepteurs ionotropiques			Récepteurs métabotropiques				
		NMDA		AMPA	Kaïnate	Groupe I	Groupe II	Groupe III
Sous-unités	GluN1	GluN2A GluN2B GluN2C GluN2D	GluN3A GluN3B	GluA1 GluA2 GluA3 GluA4	GluK1 GluK2 GluK3 GluK4 GluK5	mGluR1 mGluR5	mGluR2 mGluR3	mGluR4 mGluR6 mGluR7 mGluR8
Pôlo		Na⁺		Na⁺	Na⁺	Gq	Gi/	'Go
Nole		(Ca ²⁺)		(Ca ²⁺)	(Ca ²⁺)	↑PLC	\downarrow	AC

Tableau 6 : Classification des récepteurs du glutamate.

La famille des iGluR est divisée en trois classes, classées selon leur affinité sélective pour un ligand. La famille des mGluR est divisée en trois groupes selon leur homologie de séquence, leurs propriétés pharmacologiques et leurs caractéristiques de transduction du signal. AC : adénylate cyclase ; GluA1-4 : sous-unités des récepteurs AMPA ; GluK1-5 : sous-unités des récepteurs Kaïnate ; GluN : sous-unités des récepteurs NMDA ; Gq : protéine G de type Gq ; Gi/Go : protéine G de type Gi/Go ; PLC : phospholipase C. (Chandrasekar, 2013).

Les iGluR sont responsables de la transmission synaptique excitatrice rapide. En effet, leur activation à l'origine d'un flux ionique à travers la membrane du neurone post-synaptique entraîne la dépolarisation de celui-ci et l'activation des potentiels d'action. Les mGluR, quant à eux, ne répondent qu'à des expositions prolongées au glutamate et une fois activés, ces récepteurs sont responsables de modulations lentes des réponses synaptiques *via* l'action de leur protéine G, leurs effecteurs et leurs seconds messagers (Attwell and Gibb, 2005; Conn and Pin, 1997; Niswender et al., 2010).

Au sein des iGluR, trois classes ont été identifiées : les récepteurs sensibles à l' α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoazole (R-AMPA), les récepteurs sensibles à l'acide kaïnique (R-KA) et les R-NMDA. Chacun de ces récepteurs est composé de quatre sous-unités formant un canal transmembranaire perméable aux cations. Les R-AMPA sont composés de différentes combinaisons des sous-unités GluA1, GluA2, GluA3 et GluA4. Ces récepteurs sont responsables de la transmission synaptique rapide. La fonction de ces récepteurs varie selon la composition en sous-unités. Par exemple, la présence de la sous-unité GluA2 favorise la perméabilité du canal au Na⁺ et l'absence de la sous-unité GluA2 rend le récepteur perméable au Ca²⁺ (Hanley, 2014). Les R-KA sont composés d'une association de 4 sous-unités : GluK1 à GluK5. Ces récepteurs régulent la dépolarisation post-synaptique, modulent la libération synaptique du glutamate et jouent un rôle important dans la maturation des circuits neuronaux au cours du développement (Lerma and Marques, 2013). Les R-NMDA sont des tétramères, contenant deux sous-unités GluN1 obligatoires, associées à des sous-unités GluN2 ou GluN3 (Herguedas et al., 2013). Les différentes possibilités d'association des sous-unités donnent autant de sous-types de R-NMDA différents (Paoletti et al., 2013). Ces R-NMDA sont largement exprimés dans le SNC et jouent un rôle clé dans la signalisation glutamatergique (Groc et al., 2009).

Les mGluR sont des récepteurs à 7 TM ayant leur partie N-terminale extracellulaire et leur partie C-terminale intracellulaire. Leur répartition en 3 groupes distincts est liée aux voies de signalisation intracellulaires différentes. Les mGluR du groupe I (mGluR1 et mGluR5) participent à l'excitabilité neuronale tandis que les mGluR du groupe II (mGluR2 et mGluR3) et du groupe III (mGluR4-6-7 et mGluR8), principalement pré-synaptiques, diminuent la libération du glutamate (Niswender and Conn, 2010).

Les taux extracellulaires de glutamate sont régulés par une famille de transporteurs Na⁺/K⁺ dépendants : les transporteurs d'acides aminés excitateurs (EAAT : *excitatory amino acid transporter*) (Divito and Underhill, 2014). Présents à la surface des cellules gliales, ces EAAT recaptent le glutamate libéré dans la fente synaptique. Ce glutamate est ensuite rapidement converti en glutamine *via* la glutamine synthétase. La glutamine est recaptée par les neurones présynaptiques *via* des transporteurs sodium-dépendants (SNATs) et est retransformée en glutamate *via* une glutaminase. L'activation de transporteurs vésiculaires pré-synaptiques (VGLUT1, -2 et -3) permet de charger les vésicules du neurone pré-synaptique en glutamate (Santos et al., 2009). Ces transporteurs accumulent le glutamate dans les vésicules d'exocytose nécessaires à la sécrétion du glutamate. Ces transporteurs présentent 70 % d'homologie de séquence entre eux, sont composés de 10 domaines transmembranaires et jouent un rôle clé dans la sécrétion du glutamate.



Figure 6 : Libération et recapture du glutamate au sein de la synapse.

AMPAr : récepteurs AMPA ; EAATs : *excitatory amino acid transporter* ; GLNase : glutaminase ; GSase : glutamine synthase ; NMDAr : récepteur NMDA ; SNATs : transporteurs sodium-dépendants ; VGLUT : transporteur vésiculaire du glutamate.

b. Les récepteurs sensibles au N-méthyl-D-aspartate

Les R-NMDA sont des récepteurs ionotropiques perméables au Ca²⁺. Ils sont largement exprimés au sein du SNC et par leur diversité, leur composition en sous-unités, leurs propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques ainsi que leur implication au niveau physiologique et pathologique, ces récepteurs jouent un rôle majeur dans la transmission glutamatergique et la plasticité synaptique (Groc et al., 2009). Les R-NMDA sont des tétramères composés d'un dimère de sous-unités GluN1 obligatoires et de sous-unités GluN2 et/ou GluN3 (Figure 7). Il existe 4 sous-unités GluN2 (GluN2A-GluN2D) et 2 sous-unités GluN3 (GluN3A et GluN3B). Le dimère GluN1 est essentiel au fonctionnement du R-NMDA. En effet, même si cette sous-unité est incapable de fixer le glutamate, elle possède le site de liaison du co-agoniste du R-NMDA, la glycine ou D-sérine, indispensable à l'activation du récepteur (Mothet et al., 2015; Van Horn et al., 2013). Les sous-unités GluN1, elles forment un R-NMDA fonctionnel. Les sous-unités GluN3 ont la même particularité que les sous-unités GluN1, puisqu'elles ne possèdent pas le site de liaison du glutamate, mais possèdent celui du co-agoniste glycine. La structure des différentes

sous-unités du R-NMDA est comparable d'un type de sous-unité à l'autre : cette structure comprend un domaine N-terminal extracellulaire, permettant l'oligomérisation des récepteurs, un domaine de liaison des agonistes, un domaine membranaire qui participe à la formation du canal ionique et un domaine C-terminal impliqué dans le trafic et l'ancrage des récepteurs à la synapse (Cull-Candy and Leszkiewicz, 2004). La composition en sous-unités du R-NMDA lui confère des propriétés biophysiques et pharmacologiques spécifiques : par exemple, les R-NMDA contenant les sous-unités GluN2A ou GluN2B peuvent être bloqués par le sulfate de magnésium jusqu'à ce qu'ils puissent être activés par dépolarisation, alors que les R-NMDA contenant les sous-unités GluN2C, GluN2D, GluN3A et GluN3B présentent une faible sensibilité au blocage par le sulfate de magnésium (Cull-Candy and Leszkiewicz, 2004; Pachernegg et al., 2012).



Figure 7 : Représentation des sites de liaison des divers modulateurs du R-NMDA.

Le site de liaison de l'agoniste glutamate se situe sur les sous-unités GluN2 et le site de liaison du co-agoniste glycine/D-sérine est situé sur les sous-unités GluN1. Les polyamines et le Zn^{2+} sont des modulateurs du R-NMDA ayant respectivement des effets potentialisateurs ou inhibiteurs sur l'activité du récepteur. Le Mg²⁺ se fixe au cœur du canal et bloque le récepteur de manière dépendante du potentiel. Ca²⁺ : ion calcium ; GluN1/2A-D : sous-unités du R-NMDA ; K⁺ : ion potassium ; Mg²⁺ : ion magnésium ; Zn²⁺ : ion zinc. (Source : Lundbeck Institute CNS Forum, 2002)

La distribution des sous-unités du R-NMDA varie au cours du développement et selon la région cérébrale (Figure 8). La sous-unité GluN1 est ubiquitaire dans le SNC immature et adulte. Dans les stades précoces du développement, la sous-unité GluN2B est la sous-unité prédominante, largement exprimée au niveau du cortex et de l'hippocampe. Les souris KO pour la sous-unité GluN2B et chez qui cette sous-unité est échangée par la sous-unité GluN2A

survivent peu. Chez ces animaux, une diminution de l'amplitude du courant entrant en cas de stimulation des R-NMDA a été mise en évidence et des altérations du comportement social ont été observées (Wang et al., 2011a). Les récepteurs comportant la sous-unité GluN2B semblent donc essentiels à un neurodéveloppement normal.

Au fur et à mesure du développement, les R-NMDA du cortex et de l'hippocampe changent de composition. La sous-unité GluN2B est abondante autour de la naissance, puis décroît progressivement. Parallèlement, la sous-unité GluN2A augmente progressivement après la naissance, pour ensuite devenir dominante par rapport à GluN2B dans le cortex, et chez l'adulte cette sous-unité est abondamment exprimée dans l'ensemble du SNC (Babb et al., 2005; Liu et al., 2004; Luján et al., 2005; Monyer et al., 1994; Paoletti et al., 2013; Szczurowska and Mareš, 2013). Ce changement de dominance entre les deux-unités GluN2 intervient aux environs de P5 chez la Souris (Lecointre et al., 2015; Liu et al., 2004). Un tel changement qualitatif des sous-unités GluN2B vers GluN2A a également été décrit dans le cortex humain en période post-natale (Jantzie et al., 2015). A l'âge adulte, la sous-unité GluN2B est exprimée préférentiellement au niveau du pro-encéphale, alors que la sous-unité GluN2A est exprimée de façon ubiquitaire au niveau du SNC (Monyer et al., 1992). De la même manière, il existe une régulation de l'expression des sous-unités GluN2C/D et GluN3A/B dans le temps et l'espace. La sous-unité GluN2C apparaît plus tardivement que les sous-unités GluN2A et GluN2B et se confine au cervelet et aux bulbes olfactifs (Cull-Candy et al., 2001). La sous-unité GluN2D est fortement exprimée après la naissance puis diminue jusqu'à l'âge adulte, tout comme la sous-unité GluN3A, tandis que la sous-unité GluN3B augmente progressivement pour atteindre un maximum à l'âge adulte.



Figure 8 : Distribution cérébrale des sous-unités du R-NMDA.

L'expression des sous-unités du R-NMDA varie en fonction de la structure cérébrale mais également au cours du développement. Haut : Distribution des ARNm des sous-unités GluN1, GluN2A-D dans le cerveau en développement du Rat. Bas : Distribution des ARNm des sous-unités du R-NMDA au cours du développement. (Paoletti, 2011 ; Paoletti et al., 2013).

c. Récepteur NMDA : un signal de survie pour les neurones en développement

De nombreuses études ont montré que les neurotransmetteurs dont le glutamate, sont cruciaux pendant le développement et que les précurseurs neuronaux expriment des récepteurs aux neurotransmetteurs bien avant le début du processus de synaptogenèse (Luján et al., 2005; Nguyen et al., 2001). Au cours du neurodéveloppement, le glutamate exerce de nombreuses actions trophiques. Il va par exemple réguler la migration neuronale, l'axogenèse, la dendritogenèse ou encore contribuer à la stabilisation synaptique (Jansson and Åkerman, 2014; Wroge et al., 2012). De nombreux neurones immatures tels que les précurseurs granulaires du cervelet expriment les R-NMDA avant que les synapses soient établies (Komuro and Rakic, 1993). L'inhibition du R-NMDA se traduit par un arrêt de la maturation pouvant conduire à la mort de la cellule (Adams et al., 2004; Fiske and Brunjes, 2001; Hsu et al., 2000; Monti and Contestabile, 2000). Il a été décrit que l'activation des

R-NMDA régule la division cellulaire des précurseurs neuronaux dans la zone ventriculaire et la zone sous-ventriculaire du cortex cérébral (Haydar et al., 2000), la migration des neurones en grain (Yacubova and Komuro, 2003) et la synaptogenèse (Pérez-Otaño and Ehlers, 2004). Ces données suggèrent qu'une inhibition du R-NMDA pendant le développement pourrait avoir un impact négatif sur les futures fonctions cognitives de l'adulte (Anand and Scalzo, 2000; Deutsch et al., 1998; Ikonomidou et al., 2000). Ainsi, plusieurs auteurs soulèvent l'hypothèse d'un lien entre l'hypofonction du R-NMDA et des pathologies telles que le syndrome d'alcoolisation fœtal et la schizophrénie (Bubeníková-Valesová et al., 2008; Olney et al., 2001). D'autres données indiquent que le glutamate exerce un effet neurotrophique et que les R-NMDA sont impliqués dans le contrôle de l'apoptose dépendante de la voie mitochondriale. Ainsi, une étude réalisée in vitro sur des cultures de neurones en grain du cervelet montre que l'activation des R-NMDA augmente l'expression du gène antiapoptotique Bcl-2 et diminue celle du gène pro-apoptotique Bax (Zhu et al., 2005). A l'inverse, l'exposition de neurones corticaux en culture à des antagonistes du R-NMDA se traduit par la translocation de Bax à la membrane externe mitochondriale et par la libération du cytochrome C mitochondrial vers le cytosol (Yoon et al., 2003). Plus récemment, des études menées au laboratoire ont mis en évidence le caractère dual de l'action du NMDA au sein du néocortex immature de souriceau : pro-nécrotique dans les couches profondes matures (V-VI) et anti-apoptotique dans les couches superficielles immatures (II-IV) (Desfeux et al., 2010) (Figure 9).



Figure 9 : Caractère dual du NMDA sur le cortex immature de souris âgée de 2 jours.

En condition contrôle (image de gauche), une forte activité apoptotique est observée au niveau des couches corticales superficielles, et une faible activité nécrotique est visualisée dans les couches profondes. En présence de forte concentration de NMDA, sur une même tranche (image de droite), une nette diminution de l'activité apoptotique est observée au niveau des couches superficielles, accompagnée d'une forte augmentation de l'activité nécrotique au niveau des couches profondes. D'après Desfeux et al., 2010.

d. Le glutamate : un acteur clé dans la cascade excitotoxique et les lésions cérébrales du nouveau-né

Néanmoins, le glutamate est aussi au cœur d'un processus conduisant à des dommages cellulaires importants : il s'agit de l'excitotoxicité. L'excitotoxicité est un acteur majeur de la mise en place des lésions cérébrales chez les nouveaux nés (Volpe, 2009).

La perte cellulaire induite par l'excitotoxicité découle d'une cascade d'événements. Un déficit de perfusion et d'apport en oxygène (hypoxo-ischémie) va conduire à un déséquilibre entre les apports énergétiques et les besoins des cellules nerveuses. Cette défaillance énergétique va se traduire par une déplétion des réserves d'adénosine triphosphate (ATP) et un dysfonctionnement des pompes Na⁺/K⁺ ATP-dépendantes, aboutissant à la dépolarisation des neurones. Les neurones vont alors libérer de façon massive et incontrôlée le glutamate. L'accumulation de glutamate au niveau synaptique et extra-synaptique est favorisée par le blocage des systèmes de recapture EAAT ATP-dépendants présents au niveau neuronal, glial et vasculaire (Perego et al., 2000). La concentration anormalement élevée de glutamate va entraîner une stimulation excessive des récepteurs au glutamate. L'entrée massive de Na⁺ et 35

de Ca²⁺ dans les neurones par l'intermédiaire des R-AMPA, R-KA et R-NMDA induit une succession d'événements aboutissant à la mort cellulaire. L'influx de Na⁺ va conduire à une entrée d'eau qui induira un œdème cellulaire et la destruction du tissu nerveux via un processus nécrotique (Bonde et al., 2005). L'activation des R-NMDA et des canaux calciques dépendants du potentiel membranaire va entraîner un important influx de Ca²⁺ amplifié par la mobilisation du Ca²⁺ intracellulaire provenant du réticulum endoplasmique suite à l'activation de la voie de l'inositol triphosphate par les récepteurs métabotropiques (Kritis et al., 2015). La concentration intracellulaire excessive de Ca²⁺ va conduire à l'activation des protéases (dégradant le cytosquelette), de lipases (telles que la phospholipase A2 générant ainsi des radicaux libres), de la calmoduline, de la NO-synthase (nitric oxyde-synthase) et à l'induction de gènes précoces impliqués dans l'expression ou la régulation de l'apoptose (Gavaldà et al., 2008). A terme, la mise en place de cette cascade excitotoxique conduit à une mort neuronale importante, une activation microgliale, une prolifération astrocytaire et un réarrangement microvasculaire (Kaindl et al., 2012; Lee et al., 2011b; Mehta et al., 2013). L'ensemble de ces effets immédiats et retardés du glutamate va contribuer au développement de lésions cérébrales (Figure 10). Le R-NMDA occupe une place décisive au sein de la cascade excitotoxique. En effet, en bloquant l'activité du récepteur par l'antagoniste non compétitif MK801, une protection neuronale en présence de fortes doses de glutamate est observée (Foster et al., 1988).



Figure 10 : Mécanismes moléculaires mis en jeu lors de la cascade excitotoxique.

La libération massive et incontrôlée du glutamate et le blocage de ses systèmes de recapture provoquent une accumulation du neurotransmetteur. La suractivation des récepteurs glutamatergiques modifie l'homéostasie ionique pouvant conduire à un oedème cellulaire, une augmentation excessive des concentrations de calcium intracellulaire, un stress oxydatif et l'activation des caspases. Selon l'intensité de ces différents processus, la cellule pourra dégénérer selon un mécanisme nécrotique (mort immédiate) ou apoptotique (mort retardée) AMPA/KAI-R : récepteur α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole-propionate/kaïnate du glutamate, ATP : adénosine triphosphate, Ca²⁺ : ion calcium, Na⁺ : ion sodium, NMDA-R : récepteur N-méthyl-D-aspartate du glutamate. D'après Meldrum 2000.

4. Choix du modèle d'étude : parallèle physiopathologique cérébral Homme-Souris

L'extrapolation des données expérimentales à la pratique clinique est difficile. La durée de gestation chez la Souris est de 20 jours alors qu'elle est d'environ 39 semaines chez l'humain. Le cerveau murin est lissencéphalique, l'épaisseur de la substance blanche est beaucoup plus faible que chez l'humain. De plus, bien que la séquence du développement cérébral humain soit globalement comparable à celle observée chez le rongeur, les échelles

de temps sont très différentes et les phases du développement humain sont beaucoup plus longues et complexes.

Le cerveau est particulièrement sensible aux agents pharmacologiques, dont les anesthésiques, durant la période critique de synaptogenèse, appelée « *brain growth-spurt period* », qui s'étale chez l'Homme du 6^{ème} mois de grossesse jusqu'aux premières années de vie, et qui correspondrait chez le rongeur aux deux premières semaines après la naissance (Figure 11) (Ikonomidou, 2009; Mellon et al., 2007; Olney et al., 2000; Rice and Barone, 2000; Young et al., 2005; Yudkowitz, 2010).



Figure 11 : Superposition des étapes du développement cérébral entre l'Homme et la Souris.

Le développement cérébral se déroule en plusieurs étapes : la neurogenèse, la gliogenèse, la synaptogenèse, la myélinisation et enfin la plasticité cérébrale qui se poursuit tout au long de l'individu. Bien que la séquence de développement cérébral humain soit longue et complexe, elle est globalement comparable à celle observée chez le rongeur. Les stades de développement cérébral se déroulant dans les premiers jours de vie chez le rongeur peuvent modéliser le développement cérébral au cours du dernier trimestre de grossesse chez l'Homme. De plus, bien que les échelles de temps soient différentes, il existe une période que l'on nomme « *brain growth-spurt period* » où le cerveau est particulièrement sensible aux agents pharmacologiques et notamment ceux touchant la transmission glutamatergique. Cette période se situe entre le dernier trimestre de grossesse et les premières années de vie chez l'Homme et dans les 15 premiers jours de vie chez la Souris.

A la naissance, le cerveau des rongeurs est loin d'être mature, si bien que de nombreuses études considèrent que les stades de développement cérébral se déroulant dans les premiers jours de vie chez le Rat et la Souris, peuvent modéliser des stades de

développement cérébral se déroulant au cours du dernier trimestre de la grossesse chez l'Homme. Il faut aussi cependant prendre en considération le fait qu'il y ait, au sein d'une même espèce, des différences temporelles dans le développement des différentes régions cérébrales (Clancy et al., 2007; Rice and Barone, 2000).

Malgré ces différences développementales, les travaux de Marret et collaborateurs ont montré des similitudes entre des lésions excitotoxiques observées chez la Souris et les lésions cérébrales d'origine périnatale observées en clinique chez l'humain (Marret et al., 1995a). Chez la souris nouveau-née, les effets d'une injection intracorticale (ic) d'iboténate (Ibo), un agoniste glutamatergique, ont été comparés à différents âges (PO, P2, P5 et P10). Cette étude a permis d'élaborer un modèle d'étude murin in vivo du cerveau en développement dans un contexte lésionnel. Les auteurs ont montré que la variabilité des lésions et des dysmorphies induites par l'iboténate était fonction de la sensibilité des neurones et des astrocytes vis-à-vis de l'excitotoxine, sensibilité variable au cours du développement cérébral (Tableau 7). Ainsi, administré le jour de la naissance (PO) ou chez le souriceau P2, l'Ibo induit une mort neuronale dans les couches corticales V et VI les plus matures (Figure 12). Aux stades P5 ou P10, l'injection d'Ibo est délétère pour toutes les couches corticales II-VI (Marret et al., 1995a). Ces lésions corticales induites à P2 ou P5 sont accompagnées dans plus de 90 % des cas par des lésions kystiques de la substance blanche évoluant à long terme vers des atrophies (Marret et al., 1995a ; Tahraoui et al., 2001). Ces lésions sont fortement évocatrices des aspects d'une leucomalacie périventriculaire (LPV) rencontrée chez le nouveau-né prématuré. Leur évolution vers l'atrophie et fréquemment vers la dilatation ventriculaire correspond au devenir d'une LPV chez l'enfant. Les lésions obtenues chez la souris de 10 jours sont évocatrices des lésions hypoxo-ischémiques du nouveau-né à terme avec des lésions rencontrées essentiellement au niveau de la substance grise. Une lésion de la substance blanche est également observée dans 50 % des cas (Tahraoui et al., 2001). La sensibilité variable des différentes couches corticales à l'Ibo pendant la période post-natale doit être mise en parallèle avec une différence de profil d'expression des sous-unités du R-NMDA dans les couches superficielles et profondes du cortex et une modification des profils d'expression corticale des sous-unités du R-NMDA pendant cette période (Lecointre et al., 2015; Liu et al., 2004).

Principales observations microscopiques des lésions induites par l'injection d'iboténate			
au sein du cortex			
Injection à PO	Importante perte neuronale dans les couches V et Via du néocortex.		
Injection à P2	Dommages intermédiaires entre les injections réalisées à PO et P5, la perte		
	neuronale prédomine dans la couche V.		
Injection à P5	Importante perte neuronale dans les couches II, III, IV, V, Via et VIb avec une		
	disparition complète ou presque des corps cellulaires des neurones le long du		
	site d'injection.		
Injection à P10	Toutes les couches corticales sont endommagées de manière équivalente.		

 Tableau 7 : Effet de l'injection d'iboténate sur le cortex en développement chez la Souris.

 Distriction d'iboténate sur le cortex en développement chez la Souris.

D'après Marret et al., 1995a.



Figure 12 : Comparaison de la mise en place des six couches corticales entre l'Homme et la Souris. Le schéma du haut représente la mise en place des couches corticales chez l'Homme (D'après Bear *et al.*, 2007).

Les images du dessous sont des colorations au crésyl violet mettant en évidence les différentes couches corticales aux trois stades de développement (P2, P5 et P10) chez la Souris (données personnelles). I-VI : couches corticales ; CC : corps calleux : P2, 5, 10 : jours postnataux ; SA : semaines d'aménorrhée.

L'Ibo est un agoniste irréversible du R-NMDA et de certains récepteurs métabotropiques du glutamate (types 1, 2 et 5) (Marret et al., 1995a; Tahraoui et al., 2001). L'Ibo agit essentiellement sur les R-NMDA. En effet, alors que des antagonistes des R-AMPA/KA et des mGluR du groupe I n'ont aucun effet sur les lésions induites par l'Ibo, l'injection d'antagonistes du R-NMDA, tels que le MK-801 ou la D-AP7, prévient la formation des lésions (Husson et al., 2004; Marret et al., 1995a; Tahraoui et al., 2001). D'autres agents pharmacologiques ont permis de montrer le rôle essentiel des R-NMDA dans les lésions induites par l'acide iboténique. En effet, l'administration de kynurénate, un antagoniste de la glycine, s'est révélée neuroprotectrice (Marret et al., 1999). Le magnésium administré sous la forme de MgSO4, bloqueur du R-NMDA, est neuroprotecteur à la fois au niveau de la substance blanche et au niveau du néocortex (Marret et al., 1995b).

Sur le plan cellulaire, il a été mis en évidence une activation microgliale et une dégénérescence astrocytaire très précoce dans les mécanismes de la lésion de la substance blanche (Haldipur et al., 2014; Tahraoui et al., 2001). Sur la base de marquages immunohistologiques, il a été observé une forte apoptose dans l'hémisphère ipsilatéral à la lésion dans la journée qui suit l'injection d'Ibo (Haldipur et al., 2014; Husson et al., 2002, 2005). La microglie activée précocement au niveau des lésions de la substance blanche est essentiellement de la microglie résidente du cerveau. De plus, l'expression transitoire de la sous-unité GluN1 du R-NMDA sur ces cellules est corrélée avec la fenêtre de sensibilité à l'Ibo au niveau de la substance blanche (P2 à P10) (Tahraoui et al., 2001). Le rôle délétère de la microglie dans le développement des lésions excitotoxiques a été conforté par plusieurs travaux qui montrent que l'activation de la microglie par le NMDA libèrent des facteurs cytotoxiques pour les astrocytes (Tahraoui et al., 2001) et les neurones corticaux (Kaindl et al., 2012). Il a également été montré que l'invalidation de la sous-unité GluN1 du R-NMDA dans les cellules microgliales diminue la taille des lésions induites par l'Ibo (Kaindl et al., 2012). Une altération transitoire de la barrière hémato-encéphalique à proximité du site d'injection de l'Ibo est observée 2 heures après l'administration de la toxine (Moretti et al., 2015). La déplétion astrocytaire visualisée autour de la lésion kystique dans les premières 24 heures après l'injection d'Ibo, est suivie d'une astrogliose réactionnelle s'établissant progressivement et visible jusqu'à l'âge adulte (Haldipur et al., 2014; Husson et al., 2005; Tahraoui et al., 2001).

La densité de cellules microgliales activées décroît à partir du 3^{ème} jour post-lésion pour atteindre une densité normale un mois plus tard (Tahraoui et al., 2001).

L'implication de cytokines pro-inflammatoires dans la survenue des lésions est fortement suspectée (Hagberg et al., 2015). Des travaux réalisés dans le modèle Ibo à 5 jours de vie chez la Souris, ont montré un rôle délétère de ces molécules. En effet, le prétraitement des animaux par des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β , IL-6 et IL-9) exacerbe les lésions de la substance blanche induites par l'Ibo (Dommergues et al., 2000). Réciproquement, l'administration d'IL-10, cytokine anti-inflammatoire, réverse les effets aggravants de l'IL-1 β et de l'IL-9 sur les lésions de la substance blanche et du cortex, induites par l'Ibo (Mesples et al., 2003).

Ce modèle murin est en mesure de constituer un modèle expérimental pertinent pour l'étude des lésions cérébrales néonatales.

La potentialité neuroprotectrice de plusieurs facteurs de croissance, de survie cellulaire ou agents pharmacologiques a été montrée dans ce modèle. On peut citer le *vasoactive stimulating peptide* (VIP) (Gressens et al., 1997), la mélatonine (Husson et al., 2002), le BDNF (Husson et al., 2005), les glucocorticoïdes (Arquié et al., 2002), l'agent anti-épileptique Topiramate (Sfaello et al., 2005), l'ADNP (*activity-dependent neuroprotective protein*) (Sokolowska et al., 2011) ou plus récemment l'agoniste α 2-adrenergique Dexmedetomidine (Degos et al., 2013) et le 17 β -estradiol (Pansiot et al., 2016).

Les données neurodéveloppementales de la littérature et celles issues de l'utilisation du souriceau nouveau-né dans des modèles de lésion néonatale décrivant des analogies neuroanatomiques entre les lésions corticales développées chez la Souris et le nouveau-né humain permettent de dresser un parallèle Homme–Souris. Sur cette base et en gardant en mémoire le décalage de la neurogenèse corticale, nous considérons que le cerveau d'un souriceau P2 ou P5 peut être un modèle d'étude du cerveau d'un grand prématuré (24 SA) ou prématuré (30 à 34 SA) et que celui d'un souriceau P10 est assimilable à celui d'un nouveauné humain à terme (37 à 39 SA) (Tableau 8).

Jours postnataux chez la Souris	Semaines d'aménorrhée chez l'Homme
P0	18 SA
P2	24 SA (grand prématuré)
P5	30-34 SA (prématuré)
P10	37-39 SA (nouveau-né à terme)

Tableau 8 : Mise en parallèle de la physiopathologie du développement chez l'Homme et la Souris.D'après Marret *et al.*, 1995a.

En obstétrique, le rémifentanil est souvent utilisé dans un contexte de naissance prématurée, par exemple pour des césariennes sous AG pour pré-éclampsie (Park et al., 2011a). Par ailleurs, l'effet dual du glutamate sur le cortex immature a été mis en évidence dans des études antérieures du laboratoire à partir de cerveaux murins au stade P2 (Desfeux et al., 2010). Nous avons donc choisi le stade P2 pour l'étude du rémifentanil *ex vivo* et *in vivo*.

II/ OBJECTIFS DE LA THESE

L'extension de l'utilisation du rémifentanil au cours de césarienne en urgence, et donc dans un contexte de prématurité, mais également lors de protocoles de sédation menés dans les services de néonatalogie et de pédiatrie nécessite d'évaluer l'impact du morphinique sur le cerveau en développement.

Le lien entre le rémifentanil et le R-NMDA a été précédemment démontré, notamment au niveau médullaire, dans l'étude des mécanismes induisant une hyperalgésie suite à l'exposition à ce morphinique (Gu et al., 2009; Guntz et al., 2005; Joly et al., 2005; Zhao and Joo, 2008). Comme précédemment évoqué, le glutamate et le R-NMDA jouent un rôle prépondérant dans le neurodéveloppement normal, et dans la survenue de lésions cérébrales néonatales en cas d'agression cérébrale (Foster et al., 1988; Liu et al., 2004). Des travaux antérieurs de l'équipe ont montré dans un modèle de tranches organotypiques cérébrales que le NMDA exerce une action duale sur le cortex immature de souris P2 : pro-nécrotique dans les couches profondes matures et anti-apoptotique dans les couches superficielles immatures (Desfeux et al., 2010).

Le premier objectif de cette thèse était donc d'identifier une éventuelle interaction entre le rémifentanil et le R-NMDA au sein du cerveau immature en utilisant le modèle *ex vivo* précédemment décrit. Le but étant *in fine* d'évaluer, en cas de modulation de l'activité des R-NMDA par le rémifentanil, le sens de cette modulation, et les voies impactées. En effet, l'activation du R-NMDA ayant des effets opposés sur les morts nécrotique et apoptotique au sein du cortex immature, il apparaissait possible d'imaginer qu'une modulation de l'activité du récepteur par le rémifentanil pouvait impacter ses effets sur la nécrose et/ou l'apoptose.

Dans un premier temps, nous avons recherché l'action propre du rémifentanil sur les morts nécrotique et apoptotique, et l'implication du R-NMDA dans cette action. Dans un second temps, nous avons évalué l'action du rémifentanil sur les effets nécrotique et antiapoptotique induits par le NMDA. Enfin, nous avons recherché la contribution de la glycine, co-agoniste du R-NMDA et contenue dans la forme commerciale du rémifentanil utilisée en clinique, dans les effets *ex vivo* du rémifentanil sur le cerveau en développement.

Les lésions cérébrales des nouveau-nés impliquent des déficits fonctionnels plus ou moins prononcés à moyen et long termes (Mukerji et al., 2015). L'enjeu de la deuxième partie

de ce travail de thèse consistait donc à évaluer dans un contexte excitotoxique les conséquences *in vivo* des effets potentiellement neuroprotecteurs du rémifentanil observés dans le modèle *ex vivo*, non seulement sur l'aspect lésionnel, mais également sur l'aspect fonctionnel.

Le deuxième objectif de cette thèse était donc de mesurer l'impact du rémifentanil sur la production des radicaux libres, la mort apoptotique et la taille des lésions induites par l'injection ic d'Ibo chez le souriceau P2, et dans un second temps, grâce à des tests comportementaux, d'évaluer les conséquences fonctionnelles de cette exposition sur le comportement sensorimoteur des souriceaux jusqu'à P12 et l'activité locomotrice des souris à P18.

Les études cliniques menées chez les nouveau-nés prématurés ou à terme indiquent que l'utilisation du rémifentanil est sûre ; son effet analgésique et sa tolérance hémodynamique et respiratoire sont semblables voire meilleurs que d'autres anesthésiques (Giannantonio et al., 2009; Penido et al., 2010; Welzing et al., 2009). Son utilisation est même recommandée pour la prise en charge de la douleur chez le nouveau-né (Penido et al., 2010). Pourtant son impact sur le cerveau en développement et le devenir neurologique du nouveau-né n'est pas élucidé (Penido et al., 2010). Nos résultats expérimentaux obtenus *ex vivo* et *in vivo* mettant en évidence un effet anti-apoptotique et neuroprotecteur du rémifentanil chez la Souris, nous ont incités à déposer en novembre 2013 un protocole de recherche médicale REAGI porté par le Département d'anesthésie-réanimation du CHU de Rouen (Investigateur principal F. Tourrel). Le projet REAGI est une étude prospective, randomisée, monocentrique et menée en double aveugle sur une période de 4 ans et demi. Elle a pour objectif principal de comparer l'état clinique des enfants nés de césarienne sous anesthésie générale et certains critères de développement de ces enfants, avec administration ou non de rémifentanil avant le clampage du cordon.

III/ RESULTATS
The Antiapoptotic Effect of Remifentanil on the Immature Mouse Brain: An Ex Vivo Study

Fabien Tourrel, Pamela Kwetieu de Lendeu, Lénaïg Abily-Donval, Clément Chollat, Stéphane Marret, François Dufrasne, Patricia Compagnon, Yasmina Ramdani, Bertrand Dureuil, Vincent Laudenbach, Bruno José Gonzalez, Sylvie Jégou

Anesthesia and Analgesia, 118 : 1041-1051, 2014

Le rémifentanil est de plus en plus utilisé en contexte néonatal, y compris prématuré, que ce soit au cours de césarienne sous anesthésie générale ou en réanimation néonatale pour sédation. La modulation de l'activité des R-NMDA par la phosphorylation de sa sousunité GluN2B par les morphiniques a été explorée dans les modèles d'étude de l'hyperalgésie. De plus, le R-NMDA est impliqué dans les mécanismes excitotoxiques mis en jeu dans la formation des lésions cérébrales néonatales. Le NMDA exerce un effet anti-apoptotique et pro-nécrotique sur le cerveau immature. Nous avons donc émis l'hypothèse d'une possible modulation des mécanismes lésionnels touchant le cerveau immature par le rémifentanil.

Le but de cette étude était d'évaluer l'impact du rémifentanil sur la mort cellulaire nécrotique et apoptotique au niveau du cortex cérébral immature, dans un modèle *ex vivo* chez la souris nouveau-née.

Dans cet article, nous avons cherché à répondre aux questions suivantes :

- 1. Le rémifentanil peut-il moduler la mort nécrotique et apoptotique en agissant sur le R-NMDA au niveau du cortex cérébral immature ?
- 2. Quelles sont les voies qui peuvent être impliquées dans ces effets ?
- La glycine contenue dans la préparation commerciale du rémifentanil joue-t-elle un rôle dans ces effets ?

The Antiapoptotic Effect of Remifentanil on the Immature Mouse Brain: An Ex Vivo Study

Fabien Tourrel, MD,* Pamela Kwetieu de Lendeu, PhD,* Lénaïg Abily-Donval, MD,* Clément Chollat, MD,* Stéphane Marret, MD, PhD,* François Dufrasne, PhD,† Patricia Compagnon, MD,‡ Yasmina Ramdani,* Bertrand Dureuil, MD, PhD,§ Vincent Laudenbach, MD, PhD,* Bruno Jose Gonzalez, PhD,* and Sylvie Jégou, PhD*

BACKGROUND: The use of remifentanil in a context of potential prematurity led us to explore ex vivo the opioid effects on the immature mouse brain. Remifentanil enhances medullary glutamatergic N-methyl-p-aspartate (NMDA) receptor activity. Furthermore, in neonatal mouse cortex, NMDA was previously shown to exert either excitotoxic or antiapoptotic effects depending on the cortical layers. With the use of a model of acute cultured brain slices, we evaluated the potential necrotic and apoptotic effects of remifentanil, alone or associated with its glycine vehicle (commercial preparation of remifentanil, C.P. remifentanil), on the immature brain.

METHODS: Cerebral slices from postnatal day 2 mice were treated up to 5 hours with the different compounds, incubated alone or in the presence of NMDA. The necrotic effect was studied by measuring lactate dehydrogenase activity and 7-Aminoactinomycin D labeling. Apoptotic death was evaluated by measurement of caspase-3 activity and cleaved caspase-3 protein levels, using Western blot and immunohistochemistry. Extrinsic and intrinsic apoptotic pathways were investigated by measuring caspase-8, caspase-9 activities, Bax protein levels, and mitochondrial integrity.

RESULTS: C.P. remifentanil was ineffective on necrotic death, whereas it significantly reduced caspase-3 activity and cortical cleaved caspase-3 levels. C.P. remifentanil inhibited cortical Bax protein expression, caspase-9 activity, and preserved mitochondrial integrity, whereas it had no effect on caspase-8 activity. Its action targeted the neocortex superficial layers, and it was reversed by the opioid receptors antagonist naloxone and the NMDA antagonist MK801. Remifentanil and glycine acted synergistically to inhibit apoptotic death. In addition, C.P. remifentanil enhanced the antiapoptotic effect of NMDA, whereas it did not improve NMDA excitotoxicity in brain slices.

CONCLUSION: The present data indicate that at a supraclinical concentration C.P. remifentanil had no pronecrotic effect but exerted ex vivo antiapoptotic action on the immature mouse brain, involving the opioid and NMDA receptors, and the mitochondrial-dependent apoptotic pathway. Assessment of the impact of the antiapoptotic effect of remifentanil in in vivo neonatal mouse models of brain injury will also be essential to measure its consequences on the developing brain. (Anesth Analg 2014;118:1041–51)

Funding: University of Rouen, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Fonds Européen pour le Développement Régional (FEDER), Societe Francaise d'Anesthesie et de Reanimation (SFAR), Regional Platform for Cell Imaging, Conseil Regional de Haute-Normandie, La Fondation Motrice

The authors declare no conflicts of interest.

Reprints will not be available from the authors.

Address correspondence to Sylvie Jégou, PhD, ERI 28 Laboratory of Microvascular Endothelium and Neonate Brain Lesions, Rouen Institute for Biomedical Research (IRIB), University of Rouen, 76183 Rouen Cedex, France. Address e-mail to sylvie.jegou@univ-rouen.fr.

 $Copyright @ 2014 \ International \ Anesthesia \ Research \ Society \ DOI: 10.1213/ANE.00000000000159$

espite major improvements in the survival of premature infants, the rate of neurodevelopmental disabilities related to perinatal brain injury has not decreased significantly in developed countries.¹ Premature infants born via urgent cesarean delivery under general anesthesia are at increased risk of hypoxic-ischemic and excitotoxic insults to the brain.^{2,3} Remifentanil is considered the most suitable opioid for obstetric anesthesia and analgesia as well as fetal immobilization during intrauterine surgery.^{4,5} It is a synthetic potent, ultrashort-acting µ opioid metabolized by nonspecific plasma and tissue esterases. These pharmacokinetic properties allow infusion for a short time period and a rapid recovery at the end of its administration.⁶⁷ Its use is particularly relevant for anesthesia induction during cesarean delivery in pregnant women who are prone to gastric reflux and aspiration. Indeed, remifentanil and alfentanyl are the opioids with the fastest onset of action and are compatible with a rapid sequence induction, theoretically without increasing the risk of maternal inhalation.8,9 In addition, peripartum studies have suggested that remifentanil readily crosses the placenta¹⁰ and is also rapidly metabolized in neonates.¹¹

Data concerning the impact of opioids on the developing brain are controversial. Clinical studies from the NEOPAIN trial have shown that severe intraventricular hemorrhage

May 2014 • Volume 118 • Number 5

www.anesthesia-analgesia.org 1041

From the *Laboratory of Microvascular Endothelium and Neonate Brain Lesions, Rouen Institute for Biomedical Research (IRIB), University of Rouen, Cedex, France; †Laboratory of Pharmaceutical Organic Chemistry, ULB, Brussels, Belgium; Departments of ‡Pharmacology, and §Anesthetics and Intensive Care, Rouen University Hospital, Rouen, France. Fabien Tourrel, MD, is currently affiliated with Département of Anesthetics and Intensive Care, Rouen University Hospital, Rouen, France; Lénaïg Abily-Donval, MD, Clément Chollat, MD, Stéphane Marret, MD, PhD, and Vincent Laudenbach, MD, PhD, are currently affiliated with Department of Neonatal Paediatrics and Intensive Care, Rouen University Hospital, Rouen, France.

This report was previously presented, in part, at the 2010 and 2012 SFAR congress, 2009 and 2011 Journées Francophones de Recherche en Néonatologie (JFRN) congress, 2012 European Congress Perinatal Medicine, 2011 Colloque Société des Neurosciences

Remifentanil and Neonatal Mouse Cortex

occurred more frequently in ventilated preterm neonates receiving open-label morphine.¹² More recent investigations indicated that preemptive morphine analgesia in preterm neonates might result in subtle neurobehavioral differences in premature infants¹³ and altered some morphometric and behavioral variables in early childhood.¹⁴ Conversely, other reassuring results revealed that preterm or very preterm infants receiving brief or prolonged sedative and/or analgesia, respectively, did not exhibit subsequent neurological and neurodevelopmental disabilities.^{15,16} Although clinical investigations indicated that remifentanil seems to be an effective and safe opioid used in neonatal intensive care and anesthesia practice,⁵ no data report the effect of remifentanil on neonatal brains.

Previous reports demonstrated that an infusion of remifentanil, like other opioids, induces postoperative secondary hyperalgesia that involves the activation of the medullary glutamatergic N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor.¹⁷⁻²¹ More recent data evidenced that the tyrosine phosphorylation of the NR2B subunit of the NMDA receptor contributes to remifantanil-induced postoperative hyperalgesia.²² The cortical NMDA receptor, because of its high permeability toward Ca,2+ plays an important role in the development of neonatal brain lesions through the induction of an excitotoxic process.^{23,24} However, we demonstrated that NMDA can exert a dual effect on the immature postnatal day 2 (P2) neonatal mouse cortex: a necrotic death occurred in the deep cortical layers V to VI, contrasting with an antiapoptotic effect in the immature layers II to IV.25 Considering NMDA necrotic and antiapoptotic effects on the immature brain and that remifentanil can interact with the NMDA receptors, we investigated the potential effects of remifentanil and its clinically used formulation, C.P. remifentanil, on cell death in cortical slices from mouse neonates.

METHODS

Animals

NMRI (National Marine Research Institute) mice (Janvier, Le Genest Saint Isle, France) were kept in a temperature-controlled room $(21^{\circ}C \pm 1^{\circ}C)$ with an established photoperiod (the lights were on from 7 AM to 7 PM) with free access to food and tap water. Animal manipulations were performed in accordance with the European Communities Council Directives (86/609/EEC), the French National legislation (ethical approval no. 76–114), were approved by the local ethics committee (agreement N/02-09-06/15) and were under the supervision of authorized investigators (BJG, SJ authorizations no. 76.A.87 and 76.A.34 from the Ministère de l'Agriculture et de la Pêche).

Chemicals

Remifentanil hydrochloride was synthesized and purified as previously described.¹⁷ The clinically used remifentanil formulation, C.P. remifentanil (Ultiva®, GlaxoSmithKline, France), contained 3.7 mM glycine per 50 μ M remifentanil. NMDA and the NMDA receptor antagonist MK801 were purchased from Tocris (Bristol, United Kingdom). β -nicotinamide adenine dinucleotide (NADH), sodium pyruvate, glycine and naloxone hydrochloride, protease and phosphatase inhibitor cocktails, and rabbit anti-actin polyclonal antibody were from Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). The Alexa Fluor® 488 donkey anti-rabbit IgG (A-21206) and anti-mouse IgG (A-21200) were from Invitrogen (Cergy Pontoise, France). The caspase-3 substrate Ac-DEVD-AMC, caspase-8 substrate Ac-LETD-AMC, and the caspase-9 substrate Ac-LEHD-AMC were obtained from Enzo Life Sciences (Plymouth Meeting, PA). Rabbit anti-caspase-3 (#9662), anti-cleaved caspase-3 (#9661), polyclonal antibodies, and cell lysis buffer (#9803) were purchased from Cell Signaling Technology (Boston, MA). Rabbit anti-Bax polyclonal antibody (ab57-14) was from Abcam (Cambridge, United Kingdom). ECL RPN 2108 kit for Western blot experiments was from GE Healthcare 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-(Orsav, France). The tetraethylbenzimi- dazolylcarbocyanine iodide (JC-1) mitochondrial probe was from Molecular Probes (Leiden, the Netherlands).

Preparation and Treatment of Cerebral Slices from Postnatal Day 2 Mice

Brain slices were obtained from P2 mice. Excitotoxic and hypoxic-ischemic cortical lesions induced at this developmental stage presented similarities with those observed in preterm infants.²⁶⁻²⁹ Pups were killed by decapitation and their brains rapidly dissected to isolate the cerebral hemispheres. Meninges covering the brain were carefully removed, and the brain was immediately placed into ice-cold artificial cerebrospinal fluid (aCSF) containing (in mM): NaCl, 125; KCl, 3; CaCl₂, 2; NaH₂PO4, 1.2; NaHCO₃, 26; D-Glucose 10; pH 7.4. Frontal sections (250 µm) were cut at 4°C by using a vibratome VT1000S (Leica Microsystems, Nanterre, France). For each pup, 3 to 4 slices were collected through the median forebrain from the rostral level of the junction of corpus callosum. For each slice, the 2 hemispheres were rapidly separated and individually transferred into 24-well plates containing aCSF (200 µL) and incubated for a 30-minute recovery period at $37^\circ C$ in a humidified incubator under controlled atmosphere of 5% CO₂/95% air. After recovery, hemislices were washed with fresh aCSF and treated for 3 or 5 hours at 37°C. For each pair of hemisections, one was incubated in aCSF alone (control), and the other was incubated in aCSF supplemented with the different drugs. Thus, the controlateral hemisphere was considered an internal control of the treated hemisphere. For comparison of different incubation times (0, 3, and 5 hours) on enzyme activities, hemislice processed just after recovery time was considered control (t₀).

Remifentanil Half-Life in the Ex Vivo Model

The stability of remifentanil in our ex vivo experiment was investigated by combining reverse-phase high-performance liquid chromatography analysis with tandem mass spectrometry. Remifentanil (50 μ M) was incubated as described above, in the absence or presence of brain P2 slices for 5 hours. An aliquot of incubation medium was collected each hour and immediately frozen. Samples were concentrated using a 0.21 × 30 mm POROS R2/20 (Applied Biosystems, les Ulis, France) and analyzed on a 0.21 × 50 mm Alltima HP C18 HL, 3 μ m (Grace, Epernon France) at a constant flow

ANESTHESIA & ANALGESIA

rate (200 μ L/min). The mobile phase consisted of a gradient established over 5 minutes with 0.2% formic acid and 2 mM ammonium formate in acetonitrile. The concentration of remifentanil was calculated using a calibration curve. The half-life of remifentanil incubated in medium alone or in the presence of brain slices was 1 hour 50 minutes and 1 hour 36 minutes, respectively.

Lactate Dehydrogenase Activity Assay

Lactate dehydrogenase (LDH) activity in the extracellular medium was used as an index of cell lysis.³⁰ After hemibrain slice exposure to aCSF alone or with C.P. remifentanil (10–240 μ M) or NMDA (6.25–400 μ M), 30 μ L incubation medium was collected and mixed with 100 μ L freshly made solution containing 0.5 mM NADH. Conversion of NADH to its oxidized form NAD⁺ was initiated by adding 20 μ L of 5 mM sodium pyruvate. LDH activity was then monitored for 15 minutes by measuring the decrease of NADH absorbance using spectrophotometry at 340 nm with a Chameleon plate reader (ScienceTec, les Ulis, France).

Caspase Activity Assays

For caspase-3 activity measurements, each hemibrain slice was resuspended in 200 μ L hypotonic lysis buffer, and 90 μ L homogenate was incubated at 30°C with caspase buffer containing 50 μ M caspase-3 substrate Z-DEVD-AMC. For caspase-8 and caspase-9 activities measurements, 4 hemibrain slices were pooled in 300 μ L hypotonic lysis buffer, and 90 μ L homogenate was incubated with buffer containing 50 μ M caspase-8 substrate Ac-LETD-AMC or caspase-9 substrate Ac-LEHD-AMC. As a positive control, caspase-3 activity was evaluated in the same preparation. Fluorescence intensity was quantified every 5 minutes for 2 hours at excitation/emission wavelengths of 485/520 nm, respectively, using a Chameleon plate reader (Hidex, Turku, Finland).

Visualization of Cell Death

Cell death associated with plasma membrane permeability was visualized after 5 hours of treatment using 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) a noncell-permeant DNA intercalator. Briefly, hemibrain slices were washed with phosphate buffer saline (PBS) at 37°C and incubated for 5 minutes with 15 μ M 7-AAD (producing red fluorescence in the nuclei of dead cells). Sections were then washed 3 times for 5 minutes in PBS at 37°C and fixed overnight at 4°C with 4% paraformaldehyde (PFA) in PBS as in previous immunohistochemical studies. Dead cells were visualized using a fluorescence videomicroscope system DMI 6000B Leica (Rueil-Malmaison, France) at excitation/emission wavelengths of 530 and 585 nm, respectively.

Western Blot Analysis

Hemislices were incubated for 5 hours with aCSF or 50 μ M C.P. remifentanil. Cortices were rapidly dissected, and total cellular proteins from 4 hemicortices per brain were extracted using 300 μ L cell lysis buffer containing 1% Triton X-100, 20 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 μ g/mL leupeptin and supplemented with 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1% protease and phosphatase inhibitor cocktails. The homogenate was centrifuged (20,000g, 4°C, 15 minutes), and the supernatant proteins

were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis using 15% acrylamide gel and transferred to nitrocellulose Amersham Hybond-ECL membranes by electroelution. Membranes were blocked in Tris-buffered saline containing 0.1% Tween 20 and 5% bovine serum albumin at room temperature for 1 hour and incubated overnight at 4°C in blocking buffer with antibodies against caspase-3 or Bax (dilution 1:1000). After washes, they were incubated with a secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase at room temperature for 1 hour. Peroxidase labeling was detected using the ECL Western blotting detection system. To check equal protein loading, membranes were stripped and reprobed with actin antibody. Autoradiographic films were quantified using ImageQuant TL analysis system (GE Healthcare). Commercial markers (Seablue prestained standard, Invitrogen) were used as molecular weight standards.

Cleaved Caspase-3 and Bax Immunohistochemistry

Hemibrain slices previously incubated in aCSF or 50 μ M C.P. remifentanil were fixed with 4% PFA, incubated overnight at 4°C with rabbit antibodies directed against cleaved caspase-3 or Bax (dilution 1:200 in PBS containing 1% bovine serum albumin and 0.1 % Triton X-100). Sections were then rinsed twice with PBS for 20 minutes and incubated with the same incubation buffer containing an Alexa Fluor® 488 donkey anti-rabbit IgG. Cell nuclei were visualized by incubating the slices with 1 μ g/mL Hoechst 33258 in PBS. Fluorescent signals were observed with a Leica DMI 6000B microscope (Philips Rearch, Eindhoven, Netherlands). The specificity of the immunoreactions was controlled by substituting the primary antibodies by PBS.

Electron Microscopy

Ultrastructural studies were performed according to standardized protocols. Briefly, cortex obtained from hemibrain slices previously exposed to aCSF alone or 50 μ M C.P. remifentanil for 5 hours were fixed in 2.5% glutaraldehyde solution, postfixed with osmium tetroxide, and embedded in resin epoxy. Semithin sections were stained with toluidine blue. Ultrathin sections (70 nm) were contrasted with uranyl acetate and lead citrate and examined under a PHILIPS CM10 electron microscopy.

Visualization and Quantification of Pyknotic Nuclei

Hemislices from 6 P2 mice were treated for 5 hours in aCSF alone (control condition) or in the presence of 50 μ M C.P. remifentanil. Five minutes before the end of the incubation, sections were treated for 5 minutes with 1 μ g/mL Hoechst, washed twice with PBS for 5 minutes, and fixed overnight with 4% PFA. TIFF format images of the Hoechst positive nuclei were acquired, and the proportion of pyknotic nuclei in the regions of interest (ROIs) was quantified using the Metamorph image analysis station (Roper Scientific). Ten ROIs per section were considered. Data were expressed as the ratio of pyknotic nuclei over the total number of nuclei.

Visualization and Quantification of Mitochondrial Integrity

Mitochondrial membrane potential was assessed using the ratiometric probe JC-1. In healthy cells, the intact membrane

Remifentanil and Neonatal Mouse Cortex

potential allows the lipophilic dye JC-1 to enter into the mitochondria where it accumulates and aggregates, producing an intense orange signal. In cells where the mitochondrial membrane potential collapses, the JC-1 remains monomeric and stays in the cytoplasm, where it emits green fluorescence. Brain hemislices from P2 mice were treated for 5 hours at 37°C in the absence or presence of 50 μM C.P. remifentanil, incubated for 30 minutes with 3 μ L/mL JC-1, and finally washed twice for 5 minutes with PBS at the same temperature. Fluorescence was visualized immediately without previous fixation at the 485-nm excitation and 530 nm (green) emission wavelengths and at 550-nm excitation and 590 nm (orange) emission wavelengths. Green and orange signals were acquired and saved in TIFF format using a computer-assisted image analysis station Metamorph. Fluorescence intensity profiles corresponding to monomeric, and aggregated JC-1 were used to quantify the 590/530 ratio. For each fluorescent signal, a background level was defined in a negative region of the images. The quantification was performed in the superficial layers of the frontoparietal cortex on 10 to 12 ROIs from 2 hemislices per animal, and 6 mice were analyzed.

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using PRISM (Graphpad San Diego, CA). The data were plotted as mean \pm SEM. Minimum sample sizes were calculated according to our previous study using the same experimental model.²⁵ For a given condition, the number of control and treated hemislices was the same. Each sample size was specified in the figure legends. Differences between groups were assessed by 1-way analysis of variance test followed by a post hoc multiple comparison Dunnett test or unpaired *t* test depending on the experimental design. Because sample sizes were too small to test the distribution, a conservative approach was chosen: for each test, a *P*-value of 0.01 or less was considered statistically significant. Results from analyses were reported with corresponding 95% confidence intervals (CIs) when *P* < 0.15. Each experiment was independent of the others.

RESULTS

Effect of C.P. Remifentanil on Necrotic and Apoptotic Cell Death

Action of C.P. remifentanil on P2 cerebral slices was evaluated by quantifying LDH and caspase-3 activities representative of cell lysis³⁰ and apoptotic³¹ cell death, respectively. Treatment of slices with aCSF alone increased LDH and caspase-3 activities after 3- (P = 0.0063, 95% CI, 100.4 to 606.6] for LDH; P = 0.4 for caspase-3) and 5-hour incubation times (P < 0.0001, 95% CI, 321.1-827.4 for LDH and *P* < 0.0001, 95% CI, 804.9–1242 for caspase-3), (Fig. 1A), suggesting a basal excitotoxic and apoptotic process in control slices. As described before, a 5-hour treatment with 400 μ M NMDA simultaneously increased LDH activity (P < 0.0001, 95% CI, 15.5-41.1; Fig. 1B) and inhibited caspase-3 activity (P = 0.0012, 95% CI, -44.5 to -9.3; Fig. 1C).²⁵ When compared with the control condition (aCSF alone), exposure to graded concentrations of C.P. remifentanil from 10 to 240 µM for 5 hours did not significantly modify LDH activity (Fig. 1B). In contrast, from the dosage 50 µM, C.P. remifentanil significantly inhibited caspase-3 activity (P = 0.0079, 95%CI, -37.4 to -4.5 for 50 µM; P = 0.0015, 95% CI, -39.2 to -7.8 for 240 µM; Fig 1C). Because quantification of LDH and caspase-3 activities are not representative of cortical lamination, necrotic and apoptotic death were also visualized in P2 brain slices using the fluorescent probe 7-AAD and cleaved (potentially activated) caspase-3 immunohistochemistry, respectively. At P2, the development of cortical layers is not totally achieved, and deep layers V to VI are more mature than superficial layers II to IV that remain immature with neurons still migrating.32 In control conditions, a 7-AAD signal was homogeneous in the neocortex (Fig. 1D, right) while cleaved caspase-3-labeled cells were mainly localized in the superficial II to IV (Fig. 1D, left). When cortical slices were exposed to 50 µM C.P.remifentanil, in agreement with that of the quantification of LDH and caspase-3 activities, the distribution pattern of 7-AAD labeling was not modified (Fig. 1E, right) whereas a decrease of cleaved caspase-3-immunoreactivity was found in the superficial layers II to IV (Fig. 1E, left). To further confirm the presence of apoptotic cells in these layers, electron microscopic observation and double labeling with Hoechst and cleaved caspase-3 antibody were performed. Typical pyknotic nuclei presenting condensed chromatin were more readily found by electronic microscopy in aCSF-treated slices (Fig. 2A, left) than in C.P. remifentanil-treated slices (Fig. 2A, right). At high magnification, cleaved caspase-3 immunolabeled cells contained condensed nucleus, indicating that they were engaged in apoptotic death (Fig. 2B, upper), whereas cleaved caspase-3 negative cells exhibited nucleus with normal appearance (Fig. 2B). A comparison of nucleus morphology by Hoechst counterstaining at high magnification in control and C.P. remifentanil conditions indicated that C.P. remifentanil significantly decreased the proportion of pyknotic nuclei in superficial layers (P = 0.0043, 95%) CI, -4.7 to -1.1; Fig. 2C).

Caspase-3 is an executioner protease involved in different apoptotic cascades.³¹ To identify the signaling pathway(s) associated with the antiapoptotic effect of C.P. remifentanil, we quantified caspase-8 and caspase-9 activities, 2 initiator caspases of the extrinsic and intrinsic pathways, respectively. Exposure of neonatal brain slices to 50 μ M C.P. remifentanil for 3 hours inhibited caspase-9 as well caspase-3 activities (*P*= 0.0007, 95% CI, –54.3 to –16.3 and *P*= 0.0014, 95% CI, –38.9 to –10.4, respectively; Fig. 3A). Conversely, C.P. remifentanil had no effect on caspase-8 activity (Fig. 3A), suggesting that C.P remifentanil interacts with the mitochondrial pathway.

Western blot analysis using an antibody directed against caspase-3 revealed that 50 μ M C.P. remifentanil strongly decreased expression of the activated fragment (17 KDa) in mouse cortices, confirming that C.P. remifentanil exerts antiapoptotic action (*P*= 0.0004, 95% CI, -47.8 to -19.9; Fig. 3B). Genes from the Bcl-2 family play a key role in initiating the mitochondrial apoptotic pathway.³³ Quantification of proapoptotic Bax expression by Western blot showed that treatment of slices with 50 μ M C.P. remifentanil reduced Bax levels in cortex extracts. However, this decrease was not statistically significant (*P*= 0.0249, 95% CI, -69.6 to -06.2; Fig. 3B). The visualization of Bax signal

ANESTHESIA & ANALGESIA



Figure 1. Effect of commercial preparation (C.P.) remifentanil on necrotic and apoptotic cell death. A, Quantification of lactate dehydrogenase (LDH) and caspase-3 activities in postnatal day 2 (P2) cortical sections incubated for 3 or 5 hours in artificial cerebrospinal fluid (aCSF) alone. LDH activity was significantly increased from a 3-hour incubation, whereas caspase-3 activity was significantly increased only after a 5-hour exposure. Each value represents the mean (\pm SEM) from 8 brains per group (in parentheses). ***P*= 0.0063, 95% Cl, 100.4–606.6, *****P* < 0.0001, 95% Cl, 321.1–827.4 for LDH and *P* < 0.0001, 95% Cl, 804.9–1242 for caspase-3 vs control group (Time 0 hour) (Dunnett's post hoc test). Quantification of LDH (B) and caspase-3 (C) activities in brain slices from P2 mice incubated for 5 hours in aCSF alone (open column) or exposed to N-methyl-paspartate (NMDA) or to increased dosages of C.P remifentanil. B, NMDA (400 μ M) increased LDH activity *****P* < 0.0001, 95% Cl, 15.5–41.1. C.P remifentanil (10–240 μ M) did not significantly affect LDH activity as compared with the aCSF group. C. C.P remifentanil (50 and 240 μ M) and NMDA (400 μ M) significantly decreased apoptotic activity. Each value represents the mean (\pm SEM) from 7 to 13 brains per group (in parentheses). ***P* = 0.0012, 95% Cl, -44.5 to -9.3 for NMDA 400 μ M, *P* = 0.0079, 95% Cl, -37.4 to -4.5 for C.P remifentanil 50 μ M; *P* = 0.0015, 95% Cl, -39.2 to -7.8 for C.P remifentanil 240 μ M vs aCSF group (Dunnett post hoc test). D–E, Visualization of the cleaved caspase-3 immunoreactivity (right, green signal) and the overlay of necrotic cell death with 7-AAD labeling (right, red signal) and cleaved caspase-3 immunoreactivity (right, green signal) and the overlay of necrotic cell death with 7-AAD labeling on 0 C.P. remifentanil (50 μ M) (E). Note that C.P. remifentanil decreased the apoptotic signal in superficial layers II to IV, whereas it did not affect necrotic death. Scale bar: 200 μ M.

was performed by immunohistochemistry. In control slices, superficial immature layers II to IV were intensively labeled with Bax antibody (Fig 3C, left). Treatment of slices with 50 μ M C.P. remifertanil for 5 hours markedly decreased the

Bax signal in the cortical layers (Fig. 3C, right). Because Bax and caspase-9 activation are associated with induction of the mitochondrial apoptotic pathway, we visualized and quantified mitochondrial integrity in the immature layers



Figure 2. A, Electron microscopy photographs showing nuclei ultrastructure in the cortical layers II to IV from slices incubated for 5 hours in artificial cerebrospinal fluid (aCSF) (left) or commercial preparation (C.P.) remifentanii (50 μ M) (right). pN = pyknotic nucleus exhibiting condensed chromatin; N = nucleus with normal morphology. Scale bar: 1 μ m. B, Overlay of cleaved caspase-3 immunoreactivity and Hoechst labeling in the cortical layers II to IV (upper). Note that cleaved caspase-3 labeling overlaps with nuclei presenting a condensed (arrows) morphology. Open arrows indicate nuclei with normal morphology. Scale bar: 20 μ m. C, Quantification of pyknotic nuclei in superficial cortical layers from brain slices exposed to aCSF or C.P. remifentanii (50 μ M). Each value represents the mean (±SEM) from 6 brains (in parentheses). ***P* = 0.0043, 95% Cl, -4.7 to -1.1 vs aCSF group (unpaired *t* test).

II to IV by using the ratiometric probe JC-1. A dotted red signal was representative of the aggregated form of JC-1 into healthy mitochondria (Fig. 4A), while green fluorescence visualized the cytosolic form of the probe (Fig. 4B). At low magnification, overlap of the aggregated and monomeric forms of JC-1 showed that 50 μ M C.P. remifentanil increased the red fluorescent signal, resulting in a significant increase of the JC-1 590/530 ratio (*P* < 0.0001, 95% CI, 98.9–199.5; Fig. 4, D and E) and indicating that C.P. remifentanil preserved mitochondrial integrity.

Involvement of Opioid and NMDA Receptors in the Antiapoptotic Effect of C.P. Remifentanil

Remifentanil has a high affinity for μ -opioid receptors. To assess whether the opioid receptors antagonist naloxone was able to reverse the effect of C.P. remifentanil, 50 μ M C.P. remifentanil was coincubated with naloxone (Fig. 5A). Naloxone incubated alone did not affect caspase-3 activity, conversely, at dosages of 1 or 2 mM; it, respectively, partially or totally abolished C.P. remifentanil-induced caspase-3 inhibition.

Previous studies indicated that medullary NMDA receptor activation contributes to C.P. remifentanil-induced



Figure 3. Characterization of the apoptotic pathway inhibited by commercial preparation (C.P.) remifentanil. (A) Quantification of caspase-8, caspase-9, and caspase-3 activities in brain slices from postnatal day 2 (P2) mice incubated for 3 hours in artificial cerebrospinal fluid (aCSF) alone (open column) or exposed to C.P remifentanil (50 µM). Each value represents the mean (±SEM) from 8 to 14 brains per group (in parentheses). **P = 0.0014, 95% Cl, -38.9 to -10.4 for caspase 3, ***P = 0.0007, 95% Cl, -54.3 to -16.3 for caspase 9 vs aCSF group (unpaired t test). B, Quantification by Western blot of the effect of C.P remifentanil (50 µM) on cleaved caspase-3 (left) and Bax (right) protein expression in P2 cortical slices after a 5 hour treatment. Representative immunoblots from P2 cortical extracts are shown. Densitometric measurements were normalized for actin. Each value is the mean (±SEM) from 6 to 7 independent cortical extracts (in parentheses). ***P = 0.0004, 95% CI, -47.8 to -19.9 for cleaved caspase 3, *P = 0.0249, 95% Cl, -69.6 to -6.2 for Bax vs aCSF group (unpaired *t* test). C, Visualization of Bax immunoreactivity in the cortical lavers II to IV of P2 brain slices after a 5-hour exposure to aCSF alone (left) or exposed to C.P remifentanil (50 µM) (right). Scale bar: 50 µm.

postoperative hyperalgesia.^{17,21,22} Furthermore, we previously showed that NMDA decreased apoptosis in P2 brain slices.²⁵ To assess the implication of NMDA receptors in the antiapoptotic action of C.P. remifentanil, we investigated

ANESTHESIA & ANALGESIA



Figure 4. Effect of commercial preparation (C.P.) remifentanil on mitochondrial integrity in postnatal day 2 (P2) cortical slices. A–C, Visualization at high magnification of the aggregated (590 nm) (A) and the monomeric (B) forms of the mitochondrial probe JC-1 and the overlay of both signals (C) in control condition. D, Overlay at low magnification of the aggregated (590 nm) and monomeric (530 nm) JC-1 signals in the superficial layers of P2 brain slices incubated in artificial cerebrospinal fluid (aCSP alone or exposed to C.P. remifentanil (50 μ M). E, Ratiometric quantification of the fluorescent signals associated with the aggregated (590 nm) and nonaggregated (530 nm) forms of the mitochondrial probe JC-1 in cortical slices incubated in aCSF alone or exposed to C.P. remifentanil (50 μ M) during 5 hours. Each value represents the mean (±SEM) from 6 brains (in parentheses). *****P* < 0.0001, 95% Cl, 98.9–199.5 vs aCSF group (unpaired *t* test).

the effect of 50 μ M C.P. remifentanil in the presence of the NMDA antagonist MK801 (Fig. 5B). As described previously, 20 μ M MK801 used alone likely increased the activity of caspase-3 (*P*= 0.0116, 95% CI, 02.9–26.4). In the presence of 20 μ M MK801, C.P. remifentanil lost its inhibitory effect on caspase-3 activity.

Effect of C.P. Remifentanil in the Presence of NMDA

We have shown that exposure of P2 brain slices to NMDA exerts a dual effect in the neocortex: an increase of necrotic and excitotoxic cell death in deep mature layers and a decrease of apoptosis in superficial immature layers. NMDA, respectively, increased and reduced LDH and caspase-3 activities in a dose-dependent manner.²⁵ To evaluate the effect of C.P. remifentanil at different levels of NMDA receptor activation in immature brain, we quantified LDH and caspase-3 activities after a 5 hours incubation of brain slices with an ineffective dosage of C.P. remifentanil (25 μ M) in the presence of graded concentrations of NMDA (Fig. 6). As described previously,²⁵ NMDA increased LDH and decreased caspase-3 activities in a dose-dependent



Figure 5. Involvement of opioid and N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in the antiapoptotic effect of commercial preparation (C.P.) remifentanil. (A) C.P. remifentanil (50 μ M) significantly inhibited apoptotic activity (**P = 0.0085, 95% Cl, -37.3 to -4.6). Coincubated with the opioid receptors antagonist naloxone, the antiapoptotic action of C.P. remifentanil was partially or totally reversed by 1 or 2 mM naloxone, respectively. B, In presence of the NMDA antagonist MK801 (20 μ M), C.P. remifentanil (50 μ M) was devoid of an inhibitory effect on caspase-3 activity. Each value represents the mean (±SEM) from 5 to 9 brains per group (in parentheses). ***P = 0.0002, 95% Cl, -32.4 to -9.6 for C.P. remifentanil 50 μ M, *P = 0.0096, 95% Cl, 3.3–26.8 for C.P. remifentanil 50 μ M + MK801 20 μ M vs aCSF group (Dunnett post hoc test).

manner. The addition of 25 μ M C.P. remifentanil did not modify LDH activity measured in the presence of 6.25 to 100 μ M NMDA. Furthermore, the significant increase in LDH activity induced by 400 μ M NMDA (P= 0.010, 95% CI, 10.1–46.5) was reduced in the presence of C.P. remifentanil. Conversely, coadministration of 25 μ M C.P. remifentanil with ineffective dosages of NMDA (6.25–25 μ M) markedly inhibited caspase-3 activity (P = 0.0007, 95% CI, –38.2 to –14.4 for 6.25 μ M, P = 0.006, 95% CI, –54.1 to –13.9 for 25 μ M). In addition, 25 μ M C.P. remifentanil enhanced the antiapoptotic effect of 100 μ M NMDA (P = 0.006, 95% CI, –25.9 to –6.7). Altogether, these data indicated that C.P. remifentanil enhances the antiapoptotic action of NMDA without improving its excitotoxicity.

www.anesthesia-analgesia.org 1047

Remifentanil and Neonatal Mouse Cortex



Figure 6. Effect of 25 μ M commercial preparation (C.P.) remifentanil (ineffective dosage when incubated alone) in presence of graded concentrations of N-methyl-b-aspartate (NMDA) (6.25–400 μ M) on lactate dehydrogenase (LDH) and caspase-3 activities in postnatal day 2 (P2) brain slices after a 5-hour treatment. NMDA increased LDH (closed square) (##P = 0.010, 95% Cl, 10.1–46.5 for NMDA 400 μ M) and decreased caspase-3 activities (closed inverted triangle) (#P = 0.0226, 95% Cl, -35.9 to -2.3 for NMDA 100 μ M; ##P = 0.003, 95% Cl, -41.2 to -7.6 for NMDA 200 μ M; ##P = 0.0011, 95% Cl, -43.8 to -10.2 for NMDA 400 μ M varificial cerebrospinal fluid (aCSF) group (Dunnett post hoc test)) in a dose-dependent manner as compared with the control condition (aCSF alone). Addition of 25 μ M C.P. remifentanil din ot modify necrotic activity in the presence of NMDA (6.25–100 μ M) (\blacktriangle). Conversely, it abolished 400 μ M NMDA-evoked LDH activity. In the presence of ineffective NMDA dosages (6.25–25 μ M), 25 μ M C.P. remifentanil significantly decreased caspase-3 activity (***P = 0.0007, 95% Cl, -38.2 to -4.3 for NMDA 6.25 μ M; ** P = 0.0019, 95% Cl, -48.7 to -21.9 for NMDA 12.5 μ M; ** P = 0.0060, 95% Cl, -54.1 to -13.9 for NMDA 25 μ M vs NMDA-treated slices [unpaired t test]). Addition of 25 μ M C.P. remifentanil enhanced the antiapoptotic effect of 100 μ M NMDA (**P = 0.0087, 95% Cl, -26.4 to -6.3). Each curve represents the mean (±SEM) from 3 to 9 brains per group. Each value between parentheses represents the number of brains per group (top of the graph for the dotted lines and bottom of the graph for the solid lines).

Synergistic Effect of Remifentanil and Glycine

Each 1-mg C.P. remifentanil vial contains 15 mg glycine as adjunct. In an attempt to determine the differential role of remifentanil and glycine to the antiapoptotic effect of C.P. remifentanil, we tested the effect of 50 μ M synthetic remifentanil supplemented or not with 3.6 mM glycine (Fig. 7A). Incubation of brain slices with 50 µM remifentanil or 3.6 mM glycine alone had no impact on apoptotic activity. In contrast, the combination of both compounds likely inhibited caspase-3 activity (P = 0.0155, 95% CI, -38.8 to -3.5) in the same order of magnitude as 50 µM C.P. remifentanil (P = 0.0025, 95% CI, -35.2 to -6.8), suggesting a glycine-dependent effect. Although 50 µM remifentanil was devoid of action in basal condition (Fig. 7A), coincubation of 50 µM remifentanil with 12.5 µM NMDA exerted a significant antiapoptotic effect (Fig. 7B, P = 0.0005, 95% CI, -42.3 to -11.1), indicating that remifentanil by itself was active in a NMDA receptor activation condition.

In an attempt to confirm the glycine implication, we tested the effect of 25 μ M synthetic remifentanil supplemented or not with 1.8 mM glycine in the presence of 12.5 μ M NMDA (Fig. 7B). Incubation of brain slices with 25 μ M remifentanil or 1.8 mM glycine alone had no impact on apoptotic activity, whereas the addition of 25 μ M remifentanil and 1.8 mM glycine (25 μ M C.P. remifentanil) significantly inhibited caspase-3 activity (*P* = 0.0002, 95% CI, -54.4 to -16.2), indicating that remifentanil, glycine, and NMDA likely act synergistically.

DISCUSSION

Several studies focusing on the use of remifentanil and its effect on parturients have been conducted during general anesthesia for cesarean delivery.^{34–37} Conversely, the impact

of remifentanil exposure on the neonatal brain remains unstudied. The only study data concern the clinical state of neonates, such as Apgar scores, and hemodynamic and respiratory variables.35-37 By using a model of brain organotypic slices from P2 neonate mice, we investigated this unexplored aspect of remifentanil known to interact with NMDA receptors.^{17,21,22,38} At this developmental stage, intracortical injection of glutamate analog was shown to produce brain damage mimicking that observed in human preterm neonates.^{26,29} Even if different receptors are involved in glutamate-induced excitotoxicity, the NMDA receptor is considered to play an important role in the development of excitotoxic lesions.^{23,39} In our model, incubation of brain slices during 5 hours in aCSF alone significantly increased cell lysis and apoptosis, suggesting that this model can be considered an acute cerebral injury model. The current study provided as evidence for the first time that C.P. remifentanil exerts an antiapoptotic effect on the neonatal cortex in the aggressive conditions imposed by our experimental model. However, because apoptosis is a physiological phenomenon, it is currently not possible to determine the in vivo effect of this pharmacological limitation of apoptosis by C.P. remifentanil.40

In the hyperalgesia model, it has been shown that C.P. remifentanil increases the activity of NMDA receptors through a μ -opioid receptor-initiated cascade.^{17–21} Presently, we found that the inhibitory effect of C.P. remifentanil was reversed by the opioid receptor antagonist naloxone and the NMDA antagonist MK801. These data suggest the implication of NMDA receptors in the antiapoptotic effect of C.P. remifentanil, and the role of opioid receptors as a trigger of an intracellular pathway are able to positively regulate the activity of NMDA receptors.

ANESTHESIA & ANALGESIA

Α 100 (9) 80 caspase-3 activity (% of control 60 40 20 0 C.P.remi (50 µM) + ÷ remi (50 µM) gly (3.6 mM) В (8) 100 (6) (8) caspase-3 activity (4) `80 (% of control 60 40 20 0 NMDA (12.5 µM) + ÷ ÷ remi (25 µM) remi (50 µM) gly (1.8 mM) C.P.remi (25 µM)

Figure 7. Contribution of glycine to the commercial preparation (C.P.) remifentanil antiapoptotic effect A, Quantification of caspase 3 activity in brain slices from postnatal day 2 (P2) mice incubated for 5 hours in artificial cerebrospinal fluid (aCSF) alone (open column) or exposed to C.P. remifentanil (50 µM), remifentanil (50 µM), glycine (3.6 mM), or the association of remifentanil (50 $\mu\text{M})$ and glycine (3.6 mM). Remifentanil or glycine, used alone, did not affect apop totic activity. Conversely, treatment of slices with both compounds significantly inhibited caspase-3 activity in the same order of magnitude as C.P remifentanii (50 μ M) (*P = 0.0155, 95% Cl, -38.8 to -3.5 for remifentanii 50 μ M + glycine 3.6 mM; **P = 0.0025, 95% CI, -35.2 to -6.8 for C.P remifentanil 50 µM vs aCSF group; Dunnett post hoc test). Each value represents the mean (±SEM) from 4 to 9 brains per group. B, Effect of remifentanil (25 and 50 μ M), glycine (1.8 mM), or C.P remifentanil (25 and 50 $\mu\text{M})$ coincubated with 12.5 μ M N-methyl-p-aspartate (NMDA) (ineffective dosage) on caspase-3 activity in P2 brain slices after 5-hour treatment. In the presence of NMDA, remifentanil (50 $\mu\text{M})$ exerted a significant antiapoptotic effect (****P = 0.0005, 95% Cl, -42.3 to -11.1] vs aCSF group; Dunnett post hoc test). Remifentanil (25 μ M) or glycine (1.8 mM) used alone did not significantly affect apoptotic activity. Conversely, 25 µM C.P remifentanil, containing remifentanil (25 µM) and glycine **P = 0.0002, (1.8 mM), significantly inhibited apoptotic activity (95% CI, -54.4 to -16.2 vs aCSF group; Dunnett post hoc test). Each value represents the mean (±SEM) from 4 to 8 brains per group (in parentheses).

We previously showed in our model that NMDA exerts a strong antiapoptotic effect on immature layers II to IV of the immature cortex (where neurons are still migrating at this stage)³² and that NMDA receptor blockade promotes apoptosis in the superficial layers via the proapoptotic protein Bax induction and mitochondrial pathway activation.25 We found here that C.P. remifentanil did not modify the activity of caspase-8 that is associated with the extrinsic apoptotic pathway. Conversely, C.P. remifentanil decreased caspase-9 activity as well as cleaved caspase-3 and Bax protein expression in the superficial cortex. Furthermore, C.P. remifentanil preserved mitochondrial integrity. All these data suggest that C.P. remifentanil inhibits the intrinsic mitochondrial-dependent apoptotic pathway. NMDA was previously shown to promote strong excitotoxic cell death in neonatal cortical slices, especially in deep cortical layers (containing postmigrating and differentiated neurons).25 Surprisingly, C.P. remifentanil had no effect on the necrotic process. NMDA receptors are heteromeric complexes consisting of NR1, NR2 (2A-2D), and NR3 subunits. The NR1 subunit is essential for functional NMDA receptor channels whereas the NR2 subunits modulate channel functional properties.41 It has been reported that phosphorylation of NR2B tyrosine 1472, which is associated with enrichment of NMDA receptor synaptic expression,42 may be involved in upregulation of NMDA receptor function by remifentanil.22 Further experiments in our ex vivo model will be needed to determine whether C.P. remifentanil can differently modulate phosphorylation of NMDA receptors both in superficial and deep layers of the immature cortex.

The efficient dosage of C.P. remifentanil (50 μ M) in the present study was comparable with that previously used in an experimental study of the involvement of C.P. remifentanil in hyperalgesia.¹⁷ However, this concentration is far from clinical dosages, which range from 10 to 100 nM.⁴³ Thus, additional experiments using an in vivo model will be necessary to get closer to clinical conditions with clinically relevant dosages of C.P. remifentanil.

During acute cerebral injury, extracellular levels of glutamate varied throughout the brain tissue. For example, in a sheep model of neonatal hypoxic-ischemic lesions, a positive correlation has been shown between the glutamate efflux and the extension of the cerebral lesion.⁴⁴ Furthermore, in a rodent neonatal hypoxic-ischemic model, extracellular concentrations of excitatory amino acids, including glutamate, were found to be higher in infarcted and border zone areas compared with the undamaged cortex.45 To study the effect of C.P. remifentanil at different levels of NMDA receptor activation, we incubated C.P. remifentanil in the presence of graded concentrations of NMDA. In our model, NMDA was previously shown to exert necrotic or antiapoptotic effects depending on the cortical layers.²⁵ In the present study, we found that C.P. remifentanil enhances the NMDA-induced antiapoptotic effect, which occurs in superficial layers. Conversely, the association of C.P. remifentanil with graded NMDA concentrations did not improve NMDA-induced excitotoxicity in deeper layers. These data strongly support a functional interaction between activation of opioid receptors by C.P. remifentanil and NMDA receptors specifically in superficial layers of the neonatal cortex.

www.anesthesia-analgesia.org 1049

Remifentanil and Neonatal Mouse Cortex

C.P. remifentanil contains glycine, which is a coagonist of NMDA receptors. Because previous reports had different conclusions concerning the contribution of glycine in activation of NMDA receptors by C.P. remifentanil,^{17,38} it was essential to evaluate remifentanil, glycine, or the association of both in our model. In basal conditions, we showed that 50 µM remifentanil is ineffective on caspase-3 activity, whereas its association with glycine significantly inhibits the apoptotic process. In the presence of a low dosage of NMDA, NMDA receptors were probably slightly activated. In this configuration, 50 µM remifentanil and endogenous glycine seemed to be sufficient to reduce apoptotic death. Moreover, the addition of a lower dosage of remifentanil or glycine alone did not modify cortical caspase-3 activity, whereas remifentanil associated with glycine at the same dosage exerted a significant antiapoptotic effect. Taken together, these data suggest that remifentanil and glycine likely synergistically activate NMDA receptors in the immature cortex.

In conclusion, by using a model of acute brain organotypic slices from neonatal mice, the present study demonstrated that at a supraclinical concentration C.P. remifentanil has no necrotic effect but exerts antiapoptotic action on the immature cortex, involving both opioid and NMDA receptors, and the apoptotic mitochondrial pathway. Furthermore, remifentanil and glycine synergistically inhibited the apoptotic process. The assessment of the impact of the antiapoptotic effect of remifentanil in in vivo neonatal mouse models of brain injury will also be essential to measure its consequences on the developing brain.

DISCLOSURES

Name: Fabien Tourrel, MD.

Contribution: This author helped design and conduct the study, analyze the data, and write the manuscript.

Attestation: Fabien Tourrel has seen the original study data, reviewed the analysis of the data, and approved the final manuscript.

Name: Pamela Kwetieu de Lendeu, PhD.

Contribution: This author helped conduct the study and analyze the data.

Attestation: Pamela Kwetieu de Lendeu has seen the original study data, reviewed the analysis of the data, and approved the final manuscript.

Name: Lénaïg Abily-Donval, MD.

Contribution: This author helped conduct the study and analyze the data.

Attestation: Lénaïg Abily-Donval has seen the original study data, reviewed the analysis of the data, and approved the final manuscript.

Name: Clément Chollat, MD.

Contribution: This author helped conduct the study and analyze the data.

Attestation: Clément Chollat has seen the original study data, reviewed the analysis of the data, and approved the final manuscript.

Name: Stéphane Marret, MD, PhD.

Contribution: This author helped design the study.

Attestation: Stéphane Marret approved the final manuscript. **Name:** François Dufrasne, PhD

Contribution: This author helped Synthesis of remifentanil **Attestation:** François Dufrasne approved the final manuscript

Name: Patricia Compagnon, MD.

Contribution: This author helped in vitro remifentanil pharmacokinetics.

Attestation: Patricia Compagnon approved the final manuscript.

Name: Yasmina Ramdani.

Contribution: This author helped electronic microscopy study. **Attestation:** Yasmina Ramdani approved the final manuscript. **Name:** Bertrand Dureuil, MD, PhD.

Contribution: This author helped design the study.

Attestation: Bertrand Dureuil approved the final manuscript.

Name: Vincent Laudenbach, MD, PhD

Contribution: This author helped design the study **Attestation:** Vincent Laudenbach approved the final manuscript **Name:** Bruno Jose Gonzalez, PhD.

Contribution: This author helped design and conduct the study and analyze the data.

Attestation: Bruno Jose Gonzalez has seen the original study data, reviewed the analysis of the data, and approved the final manuscript.

Name: Sylvie Jégou, PhD.

Contribution: This author helped design and conduct the study, analyze the data, and write the manuscript.

Attestation: Sylvie Jegou has seen the original study data, reviewed the analysis of the data, approved the final manuscript, and is the author responsible for archiving the study files. **This manuscript was handled by:** Gregory J. Crosby, MD.

REFERENCES

- Himmelmann K, Hagberg G, Uvebrant P. The changing panorama of cerebral palsy in Sweden. X. Prevalence and origin in the birth-year period 1999-2002. Acta Paediatr 2010;99:1337–43
- Larroque B, Delobel M, Arnaud C, Marchand L; Groupe Epipage. [Outcome at 5 and 8 years of children born very preterm]. Arch Pediatr 2008;15:589–91
- 3. Volpe JJ. Brain injury in premature infants: a complex amalgam of destructive and developmental disturbances. Lancet Neurol 2009;8:110-24
- 4. Marsh DF, Hodkinson B. Remifentanil in paediatric anaesthetic practice. Anaesthesia 2009;64:301–8
- Penido MG, Garra R, Sammartino M, Pereira e Silva Y. Remifentanil in neonatal intensive care and anaesthesia practice. Acta Paediatr 2010;99:1454–63
- Egan TD, Minto CF, Hermann DJ, Barr J, Muir KT, Shafer SL. Remifentanil versus alfentanil: comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics in healthy adult male volunteers. Anesthesiology 1996;84:821–33
- Glass PS. Remifentanil: a new opioid. J Clin Anesth 1995;7:558–63
- Egan TD, Lemmens HJ, Fiset P, Hermann DJ, Muir KT, Stanski DR, Shafer SL. The pharmacokinetics of the new short-acting opioid remifentanil (GI87084B) in healthy adult male volunteers. Anesthesiology 1993;79:881–92
- El-Orbany M, Connolly LA. Rapid sequence induction and intubation: current controversy. Anesth Analg 2010;110:1318–25
- Kan RE, Hughes SC, Rosen MA, Kessin C, Preston PG, Lobo EP. Intravenous remifentanil: placental transfer, maternal and neonatal effects. Anesthesiology 1998;88:1467–74
- Welzing L, Ebenfeld S, Dlugay V, Wiesen MH, Roth B, Mueller C. Remifentanil degradation in umbilical cord blood of preterm infants. Anesthesiology 2011;114:570–7
- Anand KJ, Hall RW, Desai N, Shephard B, Bergqvist LL, Young TE, Boyle EM, Carbajal R, Bhutani VK, Moore MB, Kronsberg SS, Barton BA; NEOPAIN Trial Investigators Group. Effects of morphine analgesia in ventilated preterm neonates: primary outcomes from the NEOPAIN randomised trial. Lancet 2004;363:1673–82
- 13. Rao R, Sampers JS, Kronsberg SS, Brown JV, Desai NS, Anand KJ. Neurobehavior of preterm infants at 36 weeks

1050 www.anesthesia-analgesia.org

ANESTHESIA & ANALGESIA

postconception as a function of morphine analgesia. Am J Perinatol 2007;24:511-7

- Ferguson SA, Ward WL, Paule MG, Hall RW, Anand KJ. A pilot study of preemptive morphine analgesia in preterm neonates: effects on head circumference, social behavior, and response latencies in early childhood. Neurotoxicol Teratol 2012;34:47–55
- latencies in early childhood. Neurotoxicol Teratol 2012;34:47–55 15. MacGregor R, Evans D, Sugden D, Gaussen T, Levene M. Outcome at 5-6 years of prematurely born children who received morphine as neonates. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed 1998;79:F40–3
- Rozé JC, Denizot S, Carbajal R, Ancel PY, Kaminski M, Arnaud C, Truffert P, Marret S, Matis J, Thiriez G, Cambonie G, André M, Larroque B, Bréart G. Prolonged sedation and/or analgesia and 5-year neurodevelopment outcome in very preterm infants: results from the EPIPAGE cohort. Arch Pediatr Adolesc Med 2008;162:728–33
- Guntz E, Dumont H, Roussel C, Gall D, Dufrasne F, Cuvelier L, Blum D, Schiffmann SN, Sosnowski M. Effects of remifentanil on N-methyl-D-aspartate receptor: an electrophysiologic study in rat spinal cord. Anesthesiology 2005;102:1235–41
- Li X, Angst MS, Clark JD. Opioid-induced hyperalgesia and incisional pain. Anesth Analg 2001;93:204–9
- Joly V, Richebe P, Guignard B, Fletcher D, Maurette P, Sessler DI, Chauvin M. Remifentanil-induced postoperative hyperalgesia and its prevention with small-dose ketamine. Anesthesiology 2005;103:147–55
- Simonnet G, Rivat C. Opioid-induced hyperalgesia: abnormal or normal pain? Neuroreport 2003;14:1–7
- Zhao M, Joo DT. Enhancement of spinal N-methyl-D-aspartate receptor function by remifentanil action at delta-opioid receptors as a mechanism for acute opioid-induced hyperalgesia or tolerance. Anesthesiology 2008;109:308–17
- tolerance. Anesthesiology 2008;109:308–17
 22. Gu X, Wu X, Liu Y, Cui S, Ma Z. Tyrosine phosphorylation of the N-Methyl-D-Aspartate receptor 2B subunit in spinal cord contributes to remifentanil-induced postoperative hyperalgesia: the preventive effect of ketamine. Mol Pain 2009;5:76
- 23. Mishra OP, Fritz KI, Delivoria-Papadopoulos M. NMDA receptor and neonatal hypoxic brain injury. Ment Retard Dev Disabil Res Rev 2001;7:249–53
- 24. Johnston MV. Excitotoxicity in perinatal brain injury. Brain Pathol 2005;15:234–40
- Desfeux A, El Ghazi F, Jégou S, Legros H, Marret S, Laudenbach V, Gonzalez BJ. Dual effect of glutamate on GABAergic interneuron survival during cerebral cortex development in mice neonates. Cereb Cortex 2010;20:1092–108
- Marret S, Mukendi R, Gadisseux JF, Gressens P, Evrard P. Effect of ibotenate on brain development: an excitotoxic mouse model of microgyria and posthypoxic-like lesions. J Neuropathol Exp Neurol 1995;54:358–70
- Mesplès B, Plaisant F, Fontaine RH, Gressens P. Pathophysiology of neonatal brain lesions: lessons from animal models of excitotoxicity. Acta Paediatr 2005;94:185–90
- Sheldon RA, Chuai J, Ferriero DM. A rat model for hypoxic-ischemic brain damage in very premature infants. Biol Neonate 1996;69:327–41
- Tahraoui SL, Marret S, Bodénant C, Leroux P, Dommergues MA, Evrard P, Gressens P. Central role of microglia in neonatal excitotoxic lesions of the murine periventricular white matter. Brain Pathol 2001;11:56–71
- Cechetti F, Rhod A, Simão F, Santin K, Salbego C, Netto CA, Siqueira IR. Effect of treadmill exercise on cell damage in rat

hippocampal slices submitted to oxygen and glucose deprivation. Brain Res 2007;1157:121–5

- Siegel RM. Caspases at the crossroads of immune-cell life and death. Nat Rev Immunol 2006;6:308–17
- Berry M, Rogers AW, Eayrs JT. Pattern of cell migration during cortical histogenesis. Nature 1964;203:591–3
 Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: oppostempostary oppostation of the straight of the str
- Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. Nat Rev Mol Cell Biol 2008;9:47–59
- 34. Bouattour L, Ben Amar H, Bouali Y, Kolsi K, Gargouri A, Khemakhem K, Kallel N, Trabelsi K, Guermazi M, Rekik A, Karoui A. [Maternal and neonatal effects of remifentanil for general anaesthesia for Caesarean delivery]. Ann Fr Anesth Reanim 2007;26:299–304
- Ngan Kee WD, Khaw KS, Ma KC, Wong AS, Lee BB, Ng FF. Maternal and neonatal effects of remifentanil at induction of general anesthesia for cesarean delivery: a randomized, double-blind, controlled trial. Anesthesiology 2006;104:14–20
 Draisci G, Valente A, Suppa E, Frassanito L, Pinto R, Meo F, De
- 36. Draisci G, Valente A, Suppa E, Frassanito L, Pinto R, Meo F, De Sole P, Bossù E, Zanfini BA. Remifentanil for cesarean section under general anesthesia: effects on maternal stress hormone secretion and neonatal well-being: a randomized trial. Int J Obstet Anesth 2008;17:130–6
- 37. Yoo KY, Jeong CW, Park BY, Kim SJ, Jeong ST, Shin MH, Lee J. Effects of remifentanil on cardiovascular and bispectral index responses to endotracheal intubation in severe pre-eclamptic patients undergoing Caesarean delivery under general anaesthesia. Br J Anaesth 2009;102:812–9
- Hahnenkamp K, Nollet J, Van Aken HK, Buerkle H, Halene T, Schauerte S, Hahnenkamp A, Hollmann MW, Strümper D, Durieux ME, Hoenemann CW. Remifentanil directly activates human N-methyl-D-aspartate receptors expressed in Xenopus laevis oocytes. Anesthesiology 2004;100:1531–7
 Hilton GD, Nunez JL, Bambrick L, Thompson SM, McCarthy
- Hilton GD, Nunez JL, Bambrick L, Thompson SM, McCarthy MM. Glutamate-mediated excitotoxicity in neonatal hippocampal neurons is mediated by mGluR-induced release of Ca++ from intracellular stores and is prevented by estradiol. Eur J Neurosci 2006;24:3008–16
- Kuida K, Zheng TS, Na S, Kuan C, Yang D, Karasuyama H, Rakic P, Flavell RA. Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. Nature 1996;384:368–72
 Mori H, Mishina M. Structure and function of the NMDA
- Mori H, Mishina M. Structure and function of the NMDA receptor channel. Neuropharmacology 1995;34:1219–37
- 42. Goebel-Goody SM, Davies KD, Alvestad Linger RM, Freund RK, Browning MD. Phospho-regulation of synaptic and extrasynaptic N-methyl-d-aspartate receptors in adult hippocampal slices. Neuroscience 2009;158:1446–59
- Ross AK, Davis PJ, Dear Gd GL, Ginsberg B, McGowan FX, Stiller RD, Henson LG, Huffman C, Muir KT. Pharmacokinetics of remifentanil in anesthetized pediatric patients undergoing elective surgery or diagnostic procedures. Anesth Analg 2001;93:1393–401
- 44. Loeliger M, Watson CS, Reynolds JD, Penning DH, Harding R, Bocking AD, Rees SM. Extracellular glutamate levels and neuropathology in cerebral white matter following repeated umbilical cord occlusion in the near term fetal sheep. Neuroscience 2003;116:705–14
- Puka-Sundvall M, Gilland E, Bona E, Lehmann A, Sandberg M, Hagberg H. Development of brain damage after neonatal hypoxia-ischemia: excitatory amino acids and cysteine. Metab Brain Dis 1996;11:109–23

Neuroprotective Effects of Remifentanil Against Excitotoxic Brain Damage in the Newborn Mice

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

La neuroprotection des enfants prématurés est un sujet central en réanimation néonatale. Les progrès de prise en charge initiale de ces enfants ont permis de diminuer la morbi-mortalité périnatale. L'enjeu des années à venir est de réussir à diminuer les séquelles neurologiques issues de ces naissances prématurées. Des stratégies de protection ont été développées, incluant l'administration de corticoïdes ou de sulfate de magnésium en période périnatale. Nous avions précédemment mis en évidence un effet anti-apoptotique du rémifentanil, morphinique de synthèse, sur le cortex cérébral immature, dans un modèle expérimental *ex vivo*. Dans cette nouvelle étude, nous avons évalué l'effet du rémifentanil dans un modèle expérimental lésionnel *in vivo*, à court et moyen termes.

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

Dans cet article, nous avons cherché à répondre aux questions suivantes :

- L'effet anti-apoptotique mis en évidence *ex vivo* a-t-il des conséquences *in vivo* sur la taille des lésions induites par injection intracérébrale d'iboténate ?
- 2. L'exposition au rémifentanil de manière concommittante à la création de lésions excitotoxiques a-t-elle des conséquences fonctionnelles à court et moyen termes ?
- 3. Quels mécanismes peuvent être mis en jeu dans les effets constatés in vivo ?

Neuroprotective Effects of Remifentanil Against Excitotoxic Brain Damage in the Newborn Mice

Clément Chollat^{1,2*}, Maryline Lecointre^{1*}, Matthieu Leuillier¹, Isabelle Remy-Jouet³, Jean-Claude Do Rego⁴, Lénaïg Abily-Donval^{1,5}, Yasmina Ramdani¹, Vincent Richard³, Patricia Compagnon⁶, Bertrand Dureuil⁷, Stéphane Marret^{1,5}, Bruno José Gonzalez¹, Sylvie Jégou^{1§}, Fabien Tourrel^{1,7§}.

¹INSERM U1245, "Genetics and Pathophysiology of Neurodevelopmental Disorders" Team, Institute of Research and Innovation in Biomedicine, Faculty of Medicine, Normandy University, France.

²Department of Neonatal Intensive Care, Port Royal University Hospital, APHP, Paris France.

³INSERM U1096, Biology Oxidative Stress Systems (BOSS) platform, Institute for Research and Innovation in Biomedicine, Normandy University, Rouen, France.

⁴Platform of Behavioural Analysis (SCAC), Faculty of Medicine, Rouen, France.

⁵Department of Neonatal Paediatrics and Intensive Care, Rouen University Hospital, Rouen, France.

⁶Department of Pharmacology, Rouen University Hospital, Rouen, France.

⁷Department Anesthetics and Intensive Care, Rouen University Hospital, Rouen, France.

*§ Equally contributed to this work

Address correspondence to: Fabien Tourrel, Inserm U1245, Genetics and Pathophysiology of Neurodevelopmental Disorders Team, Normandy University-UNIRouen, Faculty of Medicine, 22 Bld Gambetta, 76183 Rouen Cedex, France.

E-mail: fabien.tourrel@chu-rouen.fr

Introduction

Better protect the developing brain of very preterm infants remains a daily challenge for all specialists in perinatal care. Medicalization of pregnancy, organization of maternity departments in different levels of care, advent of prenatal corticosteroids, improving resuscitation in delivery room and critical care during the first weeks of life of premature newborns have contributed to improve neonatal mortality and morbidity of very preterm infants (Sellier et al., 2016; Ancel et al., 2015; Himmelmann, 2014). Despite these primordial advances, this population is vulnerable and remain at risk of developing neurological impairments as cerebral palsy, cognitive deficits, learning disabilities, behavioral disturbances, psychiatric disorders and/or neurosensory deficiencies (Surman et al., 2009; Volpe, 2009; Ball et al., 2013; Taylor, 2011). Hypothesis about the genesis of these deficits include a combination of environmental and/or genetic factors during the prenatal, perinatal and postnatal periods, inducing or modulating brain lesions in preterm newborns (Van SteenWinckel et al., 2014; Penn et al., 2016). To limit the occurrence of such events, implementation of strategies of neuroprotection in brain development seems essential (Marret et al., 2008; Degos et al., 2008; Chang 2015). It could take place during prenatal period as corticosteroids or magnesium sulfate administration, but also at birth and during the first weeks of life (Crowther at al., 2012; Doyle et al., 2009 ; 2015). Evaluate the benefit / risk balance for each administration of potentially deleterious drug to the brain, as anesthetics, is one of those strategies (Anand and Soriano, 2004; Favrais et al., 2014; Strattmann et al., 2014). Fetuses and preterm newborns are exposed to anesthetics especially during cesarean delivery in case of general anesthesia or in neonatal intensive care when sedation and analgesia is recommended (Laudenbach et al., 2009; Butwick et al., 2015; Durrmeyer et al., 2010; Carbajal et al., 2015). The role of these agents remains extremely controversial: 1) On one hand, management of pain is essential for the premature newborn. The lack of care pain could lead to short and long-term complications as behavioral and cognitive disorders (Grunau et al., 1998; Grunau et al., 2009; Hall and Anand, 2014). 2) On other hand, anesthetics, including some opioids, have been implicated as being potentially deleterious. In animal studies, opioid exposure is associated with alterations in neuronal proliferation and neuronal degeneration. These alterations could be accompanied by behavioral changes (Atici et al., 2004; Seatriz and Hammer, 1993; Boasen et al., 2009). In some human studies, morphine exposition in very preterm infant is associated with early alterations in cerebral structure and with short-term neurobehavioral problems (Ferguson et al., 2012; Steinhorn et al., 2015). A recent review highlights conflicting results about the effect of morphine on immature brain (Schuurmans et al 2015).

Among opioids used in neonatology, remifentanil has attractive pharmacokinetic properties: it is a synthetic ultrashort-acting opioid, potent μ -opioid receptor agonist, metabolized by non-specific plasma and tissue esterases and, consequently, unaffected by renal or liver function (Penido et al., 2010; Welzing et al., 2011). Its use is relevant for general anesthesia of parturient women during cesarean delivery or analgesia for invasive procedures as tracheal intubation or central line placement for the newborn in neonatal intensive care (Giannantonio et al., 2009; Marsh and Hodkinson, 2009; Welzing et al., 2009).

In several experimental studies evaluating the hyperalgesia model, remifentanil has been shown to activate the glutamatergic N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor through a μ-opioid receptor-initiated cascade (Guntz et al., 2005; Li et al., 2001; Joly et al., 2005; Zhao and Joo, 2008). Furthermore, in neonatal mouse cortex, we demonstrated that NMDA can cause either excitotoxic or antiapoptotic effects, depending on the cortical layers (Desfeux et al., 2010). Using an *ex vivo* model of brain slices from postnatal day 2 mice (P2), we previously showed that remifentanil exerts an anti-apoptotic activity without necrotic effect, involving both opioids and NMDA receptors (NMDA-R), and the intrinsic mitochondrial-dependent apoptotic pathway (Tourrel et al., 2014). Considering these initial results suggesting a neuroprotective effect of remifentanil and in order to further explore the effects of remifentanil on the immature injured brain, a well-defined rodent model of neonatal brain lesion by intracortical injection of the NMDA-R agonist ibotenate was used to evaluate in vivo the impact of remifentanil (Marret et al., 1995; Gressens et al., 1996). This excitotoxic model can reproduce some aspects of perinatal brain lesions observed in human preterm neonates and has been used as an efficient model to evaluate the efficiency of therapeutic agents on perinatal brain injury (Arquié et al., 2002; Husson et al., 2005; Sfaello et al., 2005; Degos et al., 2013).

In this study, we investigated the effects of remifentanil exposure in P2 male and female mice in context of excitotoxicity on 1) brain reactive oxygen species (ROS) production, cell death, astrogliosis and size of ibotenate-induced lesion and, 2) sensorimotor development and motor performance from the neonatal period.

Materials and Methods

Animals

NMRI (Naval Medical Research Institute) mice (Janvier, Le Genest Saint Isle, France) were kept in a temperature-controlled room (21±1°C) with an established photoperiod (the lights were on from 7 a.m to 7 p.m) with free access to food and tap water. Animal manipulations were performed in accordance with the European Communities Council Directives (86/609/EEC), the French National legislation (ethical approvals n° 01316.02 and 01680.02), and were under the supervision of authorized investigators (SJ, ML authorizations n° A76-34 and A76-13 from the Ministère de l'Agriculture et de la Pêche). Females were individually housed and inspected daily for pregnancy and delivery. The day of birth was considered as postnatal day 0 (P0). In all litters included, P2 male and female pups (2.26-2.35 g) were randomly assigned to each experimental group.

Remifentanil administration: determination of effective dose of remifentanil for inducing sedation in P2 pups

The clinically used remifentanil formulation, Ultiva^{*} (containing 3.7 mM glycine per 50 μ M remifentanil), was purchased from GlaxoSmithKline (France) and diluted in NaCl 0.9 %. P2 pups received 3 intraperitoneal (ip) injections of Ultiva^{*} (20 μ l/g) over a 10-min period or the same volume of NaCl. Three doses of Ultiva^{*} was used to evaluate the effective dose for inducing sedation, each Ultiva^{*} injection contained 50, 250 or 500 ng of remifentanil. To determine the effective dose of remifentanil in P2 pups, the sedation time was measured, using the righting reflex test performed after the last injection of remifentanil. Control mice were injected with NaCl. When a neonate is placed in the supine position, it immediately turns over in a righting reflex to restore its normal prone position. The pups were placed supine on a plane surface and their mean time to return to a normal prone position during two

consecutive trials was recorded (cut-off: 60 seconds). The righting reflex was assessed until 30 min after the last injection. Between tests, pups stayed with their dams. Behavioral test to measure sedation time was carried out during the first part of the light phase (between 9 a.m. and 11 a.m.). Nineteen to 22 P2 pups providing from 7 litters were included in each experimental group.

Determination of plasma remifentanil concentrations

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

Physiological measures

P2 pups were ip injected with remifentanil (3 x 500 ng/g) or NaCl as described before.

Ventilation and heart rates

The remifentanil group (remi) or NaCl group were compared to a third group of untreated pups. Pups were maintained in a cotton nest, filmed during 5 min. From the film, two investigators unaware of the experimental group counted the number of breaths within 30 sec. Three counts were performed by pup and 7-13 pups were used for each experimental group.

Heart rate was monitored for 5 min immediately after the last injection of remifentanil or NaCl and 9 pups were used per experimental group. Electrocardiogram (ECG) recordings were taken using subcutaneous surgical steel needle electrodes (ECG) (29-gauge, 12-mm length) taped to the pup's foot pads. Signal was acquired at 1000 μ s rate by using PowerLab data acquisition system and biopotential amplifiers operated with LabChart 8.0 software (AD Instruments Ltd, UK), and data were analyzed using the ECG module of LabChart Pro 8.0 software (AD Instruments Ltd, UK).

Blood gas analysis

Pups were decapitated immediately after the last injection and trunk blood (mix of venous and arteriol blood) from 7 pups were collected and pooled in heparinized capillary tubes. Blood gas (pCO₂, pO₂) and pH were measured immediately from 8 blood pools using a clinical (ABL800 Flex, Radiometer).

Ibotenate administration: model of excitotoxic brain lesions

Ibotenic acid was purchased from Tocris Bioscience (UK) and diluted in 0.1 M Phosphate Buffered Saline (PBS) containing 0.02 % acetic acid. Intracortical (ic) injection of ibotenate was performed at P2 pups immediately after the last ip injection of remifentanil (500 ng/g) (Ibo/remi group) or NaCl (Ibo/NaCl group), In some experiments, a third group of unlesioned and untreated pups was added (unlesioned group). As previously described (Marret et al., 1995; Gressens et al., 1997; Hennebert et al., 2005), injection was given under a warming lamp using a 26-gauge needle mounted on a Hamilton syringe micro-dispenser device. The needle was inserted 2 mm under the external surface of scalp skin in the frontoparietal area of the right hemisphere, 2 mm from the middle in the lateral-medial plane, and 2 mm anterior from the sagittal suture in the rostro-caudal plane. Two 1-µl boluses containing each 5 µg ibotenate were injected 30 sec apart. After the procedure, the pups returned to their dams. Pilot injection tests were done with the CellTracker[™] Red (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) to standardize the injection protocol.

Measurement of ROS production by Electron Paramagnetic Resonance (EPR) spectroscopy

The production of ROS was evaluated using EPR spectroscopy as described before (Kohlhauer et al., 2015). P2 pups were sacrified at 10 min and 5 hours post-lesion. At the same time, unlesioned P2 pups from the same litters were used. Five to 7 pups providing from 3

litters were included in each group. Brains from Ibo/NaCl and Ibo/remi groups were rapidly dissected and a frontal section bracketing the ibotenate-injection site was dissected. An equivalent section was dissected from brain of unlesioned pups. Tissues were frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C until analysis. Tissues were homogenized (Polytron) in Krebs/HEPES buffer (pH 7.4) and incubated at 37°C for 60 min in the same buffer containing chelators deferoxamine (25 mM) and diethyldithiocarbamate (5 mM), and spin probe CMH (1-hydroxy-3-methocarbonyl-2,2,5,5-tetramethyl pyrrolidine hydrochloride; 500 mM; Noxygen, Hamburg, Germany). Then, samples were introduced into an insulin syringe and frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C until EPR measurement. Spectra of the oxidized product of CMH (CM°) were recorded at 77 K in a liquid nitrogen-cooled Dewar, using an MS400 spectrometer (Magnettech) with the following acquisition parameters: microwave power 20 mW; microwave frequency 9.5 GHz; modulation amplitude 5 G; modulation frequency 100 kHz; gain 500;Team sweep time 60 s; one scan. Intensity of the spectra was expressed in arbitrary units (AU) per mg of protein.

In situ labeling and quantification of cortical caspase activity

For *in situ* labeling, caspase activity was visualized using the CaspACE FITC-VAD-FMK *in situ* marker from Promega (Charbonnières les Bains, France). This fluorescent caspase inhibitor enters cells and is cleaved by activated caspases releasing the fluorescent FITC group. P2 pups from Ibo/NaCl and Ibo/remi groups were sacrified at 5 hours post-lesion. Six to 10 pups providing from 3 litters were included in each group. Brains were rapidly dissected to isolate the cerebral hemisphere. Meninges covering the brain were carefully removed and the brain was immediately placed into ice-cold artificial cerebrospinal fluid (aCSF) containing (in mM): NaCl, 125; KCl, 3; CaCl₂, 2; NaH₂PO4, 1.2; NaHCO₃, 26; D-Glucose 10; pH 7.4. Frontal sections (250 μm) were cut at 4°C by using a vibratome VT1000S (Leica, France). For each pup, 2 slices immediately adjacent to the site of ic injection were collected and incubated with 10 μM CaspACE FITC-VAD-FMK for 20 min at 37°C in a humidified incubator under controlled atmosphere of 5% CO₂/95% air. Then, slices were washed 3 times with warm aCSF and fixed overnight in 4% PFA in PBS. Labeling was visualized with a Leica DMI 6000B microscope. Green signal visualized at the excitation and emission wavelengths 485 and 520 nm, respectively,

was acquired and saved in TIFF format using the Metamorph image analysis station (Roper Scientific). A region of interest (ROI) around the site of injection was defined and the proportion of labeled area was determined by image segmentation with the Metamorph analysis software.

Cleaved Caspase-3 immunohistochemistry

P2 pups from Ibo/NaCl and Ibo/remi groups were sacrified at 24 hours post-lesion. For each P3 pup, 2 frontal slices (250 μm) immediately adjacent to the site of ic injection were cut as previously described. Brain slices were fixed with 4% PFA, incubated overnight at 4°C with rabbit antibodies directed against cleaved caspase-3 (#9661, Cell Signaling Technology, Boston, MA) and diluted (1:200) in PBS containing 1% bovine serum albumin and 0.1 % Triton X-100. Sections were then rinsed twice with PBS for 20 minutes and incubated with the same incubation buffer containing an Alexa Fluor[®] 488 donkey anti-rabbit IgG. The specificity of the immunoreaction was controlled by substituting the primary antibodies by PBS.

Fragmented DNA detection by enzyme-immunoassay (ELISA)

The presence of fragmented DNA after cell death was assessed by measuring the cytoplasmic histone-associated DNA using a specific two-side ELISA with an anti-histone primary antibody and a secondary anti-DNA antibody according to the manufacturer's instructions (Cell Death Detection ELISA^{PLUS}, Roche Diagnostics, Germany). P2 pups from Ibo/NaCl and Ibo/remi groups were sacrified at 24 hours post-lesion. At P3, brains from Ibo/NaCl, Ibo/remi or unlesioned pups providing from the same litters were rapidly dissected. Sixteen to 22 pups providing from 4 litters were included in each group. From each right hemisphere, a frontal section (2-mm thickness) from either side of ibotenate-injection site was dissected for cell death detection ELISA assay. An equivalent section was dissected from brain of unlesioned pups. Brain tissue was homogenized in 1 ml of lysis buffer and incubated for 30 min at room temperature. After centrifugation to remove nuclei and cellular debris, the cytoplasmic fractions were diluted 1:2 (vol/vol) with lysis buffer. Then, 20 µl from each sample were transferred to a 96-well plate precoated with anti-histone antibody to which 80 µl immunoreagent mix were added. After incubation and washes, the wells were treated with

the chromogen 2,2'-azinobis (3-ethylbinzothiazoline) sulfonic acid as a substrate. The color intensity was read at 405 nm, while that at 490 nm was used as a blank. The optical density of each sample was normalized by each sample's protein concentration.

GFAP immunohistochemistry and western blot

For immunohistochemistry, 5 pups from Ibo/NaCl and Ibo/remi groups were sacrified 24 hours later. Brains were immediately fixed in 4 % formalin for 7 days and embedded in paraffin. Glial fibrillary acidic protein (GFAP, a marker of astrocytes) immunostaining was performed on 7-µm-thick slices using successively a goat anti-GFAP (sc-6170, Santa Cruz Biotechnology, dilution 1:200) and an Alexa Fluor 594 donkey anti-goat IgG (A-11058, Invitrogen, dilution 1/400). The specificity of the immunoreaction was controlled by substituting the primary antibody by PBS.

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

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

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

Determination of lesion size

Ibo/NaCl and Ibo/remi pups providing from 8 litters were sacrified by decapitation 5 days after ic ibotenate injection. Brains were immediately fixed in 4 % formalin for 7 days and embedded in paraffin. Coronal sections (7-µm thick) were cut and stained with cresyl violet to determine the maximal extent of the lesion. Previous reports have shown an excellent correlation between the maximal radial, lateral-medial and fronto-occipital diameters of ibotenate-induced lesions (Marret et al., 1995; Husson et al., 2005). Therefore, sectioning the entire brain in the coronal plane provided an accurate and reproducible determination of the maximal fronto-occipital diameter of the lesion, which was used as an index of lesion size. Two investigators-blinded to the treatment groups determined the lesion size in each brain.

Behavioral assessments of neonate mice sensorimotor development

In a first set of experiments, the effect of remifentanil was evaluated in the lesional model and in a second set of experiments, the proper effect of remifentanil was evaluated in unlesioned pups. A third group of untreated P2 pups was included in both sets of experiments. Pups providing from 7 litters were experimented (11-25 pups per experimental group). Males and females were randomly assigned to the different groups. The measures of sensorimotor development were assessed by negative geotaxis and suspension tests according to methods described by Altman and Sudarshan (1975). The pups were weighed and tested between 9:00 and 11:00 a.m. Negative geotaxis is a postural reaction bringing the animal in the upright position when it was placed downwards. The animals were placed on a 20° tilted plane, with their head facing down, and the mean time to realize a full rotation of 180°, face up, was measured in each group. The negative reflex was assessed from P6 to P8. For suspension test, a nylon thread was suspended 15 cm above a soft surface. Pups were gently held and their

forepaws were brought into contact with the thread in order to provoke a grasping reflex. The mean time the pups were able to hold onto the thread with their forepaws was recorded. Grasping reflex/grip strength was measured from P10 to P12.

Juvenile mouse behavior in open field

P2 lesioned (Ibo/NaCl and Ibo/remi groups) and unlesioned (NaCl and remi groups) pups were observed for exploratory and locomotor activity at P18. All tests were performed between 9 a.m. and 1 p.m. Total distance travelled in open-field during a 30-min period was recorded using an automated image analysis system (Ethovision XT9.0, Noldus Information Technologies, Vageningen, The Netherlands). Animals were isolated for 10 min in individual cages before being placed in the experimental device (40 x 40 x 30 cm) and behavior was videotaped to later analysis. When mice are introduced in the open field, they are inclined to explore mainly the peripheral zone of the apparatus. This tendency to remain close the wall, called thigmotaxis, was shown to be selectively sensitive of the action of anxiolytic drugs and is considered as an index of anxiety in rodent (Treit and Fundytus., 1988). After a 5-min period of habituation, thigmotaxis was assessed by the time spent in the central area of the open field (30 x 30 cm) during five successive one-min periods. Four animals could be tested in parallel and male and female mice were tested separately.

Results

Remifentanil anesthesia, pharmacokinetics and physiological responses

Neonatal exposure to remifentanil significantly affected the righting reflex latency time (Figure 1A). Following remifentanil administration at doses 250 and 500 ng/g, the pups rapidly fell asleep and spent significantly more time on their back as compared to the control pups (p<0.001) and to the pups administered with the lower dose of remifentanil (50 ng/g, p<0.05 and p<0.01). As compared to the control group, the pups injected with the lower dose of remifentanil (50 ng/g) exhibited only low sleepiness, with no significant increase of latency time to restore a normal prone position. From 10-min post-injection time, pups injected with the highest dose 500 ng/g significantly spent more time to turn over as compared to pups injected with 250 ng/g remifentanil (p<0.01 and p<0.05 at 10 and 15 min, respectively),

indicating a dose-dependent effect of remifentanil on sedation. Thirty minutes after remifentanil injection (250 or 500 ng/g), pups showed righting reflex latency time equivalent to NaCl-treated mice, indicating that animals recovered rapidly from anesthesia. There was no mortality during and after anesthesia. Considering these results, the highest tested dose of remifentanil (500 ng/g) was used in the following steps of the study.

Remifentanil is the only opioid that is quickly degraded by nonspecific plasma and tissue esterases (Penido et al., 2010). Five minutes after the last injection (500 ng/g), the plasmatic concentration of remifentanil measured by combining HPLC analysis with tandem mass spectrometry was 10.03 ± 0.35 ng/L (n=14).

Remifentanil exposure led to changes in ventilatory mechanics in neonatal mice, resulting in a significant lower respiratory frequency as compared to untreated and NaCl-treated pups (Figure 1B, p<0.001). Blood gases measured following remifentanil administration revealed a respiratory acidosis characterized by a more acidic pH and a hypercapnia (Figures 1C and D, p<0.01). Conversely, pO2 values were not significantly different between remifentanil and NaCl-treated pups indicating that remifentanil sedation did not induce hypoxia (Figure 1E). Figure 1F shows representative ECG traces recorded after remifentanil or NaCl administration. Without anesthesia, heart rate values were in an acceptable range (485.9 \pm 36.1 bpm) (Ishii et al., 2001). Intraperitoneal injection of remifentanil significantly reduced heart rate compared to NaCl injection (p<0.05).

Remifentanil protects the neonatal brain against ibotenate-induced damage.

In a well-known model of perinatal brain damage, where the glutamatergic agonist ibotenate induces focal lesions (Marret et al., 1995; Gressens et al., 1997; Hennebert et al., 2005), we have studied the impact of remifentanil treatment in mice pups. Cleaved caspase-3 immunohistochemistry and cell track probe were used to visualize the injection site of ibotenate (Figures 2A-C). During excitotoxic process, the excessive activation of glutamate receptors leads to massive calcium influx, damage to cellular membranes and leakage of reactive oxygen species (ROS), inducing neural cell death (Dugan and Choi, 1994). Brain ROS production was evaluated by EPR at 10 min and 5 hours post-lesion (Figure 2D). Ten minutes

after ic ibotenate injection at P2, an excessive production of ROS was detected in brains from Ibo/NaCl group as compared to unlesioned group (p<0.01). The production of ROS was more pronounced at 5 hours post-lesion (p<0.01). Conversely, in Ibo/remi group, a weak increase of ROS was measured at 10 min post-lesion (p<0.05) and at 5 hours post-lesion, the ROS production was not significantly different from unlesioned group (p=0.0513).

Five hours post-lesion, ic ibotenate injection induced a large increase of caspase activity around lesion site, as measured by *in situ* labeling with FITC-VAD-FMK (Figures 2E, G). Remifentanil administration significantly reduced cortical caspase activity induced by ibotenate insult (p<0.05, figures 2F, G).

Cleaved caspase-3 immunohistochemistry performed at P3 showed that ic ibotenate injection induced a widespread apoptotic signal in the ipsilateral hemisphere (Figures 2H1 and H2). The immunolabeling was particularly dense in cortex around the injection site and in the striatum. Conversely, the apoptotic immunolabeling observed in the ibotenate-treated hemisphere of remifentanil group appeared weaker (Figures 2I1 and 2I2).

Nucleosomal DNA fragmentation and histone release is a characteristic of apoptotic process. Quantitative analysis on P3 of DNA fragmentation showed that ic ibotenate injection potently increased cell death in ipsilateral hemisphere as compared to unlesioned group (p<0.001, Figure 2J). Remiferitanil administration significantly decreased ibotenate-induced DNA fragmentation in the injected hemisphere (Figure 2J).

One day after ic ibotenate injection, a decrease of cortical thickness was observed and a destructive cyst of white matter was already present (Figure 3A1). GFAP immunodetection was used to examine the astroglial reactivity around the lesion site. In the ipsilateral hemisphere to the lesion of Ibo/NaCl pup, GFAP positive astrocytes were found in the cortex, striatum and thalamus, the higher signal being observed in the interior zone bordering the lateral ventricle (Figures 3A1 and A2). In the contralateral hemisphere, GFAP immunolabeling was visualized only in thalamus and the periventricular zones (data not shown). In the ipsilateral hemisphere of Ibo/remi pup, the immunolabeling appeared much weaker than in Ibo/NaCl pup (Figures 3B1 and B2). Evaluation of the immunolabed area in the interior zone bordering the lateral ventricle revealed a drastic decrease of astroglial reactivity in the Ibo/remi group (Figure 3C, p<0.05). Western blot analysis showed a significant decrease in GFAP cortical levels after remiferitanil treatment (Figure 3D, p<0.05).

Mouse pups injected with ic ibotenate and ip NaCl at P2 developed cortical lesions and periventricular white matter cysts examined at P7 (Figure 3E). The cortical lesion was typical, with neural depopulations in the entire depth of the neocortex (cortical layers II-VI). In addition, ibotenate injection resulted in shrinkage of the white matter, together with the development of a cystic formation. Remifentanil exposure produced a reduction of the ibotenate-induced cortical lesion size (up to 67%, p<0.001; Figure 3F). Similarly, in the Ibo/remi group, the occurrence of cystic lesions in white matter was lower than in Ibo/NaCl group (51% vs 62 %; data not shown), although this decrease was not statistically significant, based on Fisher exact test (p=0.4553). Of note, there was no significant gender effect on lesion size induced by ic ibotenate. In addition, the protective effect of remifentanil was significant in both males and females (p<0.01 and p<0.05, respectively).

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

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

In an initial step, we first determined whether the developmental characteristics in body weight of lesioned P2 pups differed between remifentanil- and NaCl-treated groups (Supplementary Figure 1A and B). Measurement of weight from P2 to P12 showed a significant increase in the body weight gain of male Ibo/remi pups compared to Ibo/NaCl pups (p=0.0002). The body weight gain of female pups until P12 was not significantly different between Ibo/remi and Ibo/NaCl groups (p=0.2179).

In order to determine if the neuroprotective effects of remifentanil positively impact on the sensorimotor development, several tests were used *i.e.* negative geotaxis (P6-P8), and grasping reflex (P10-P12). Two-way ANOVA revealed that lesioned male and female pups and exposed to remifentanil more rapidly rotated at 180 °C than NaCl-treated pups (p<0.001) and showed performance closed to unlesioned pups (Figures 4A and B). The analysis for the grasping reflex/grip strength showed a higher latency before falling for male remifentaniltreated pups (Figure 5C, p=0.0054), which exhibited similar performance to unlesioned pups. Until P11, the unlesioned females showed poor performances in grasping reflex (Figure 4D). At P12, the latency times before falling of unlesioned females were close to those of unlesioned males (Figures 4C and D). At this age, lesioned females and treated with remifentanil exhibited higher latency times than NaCl-treated females, however remifentanil effect did not reach statistical significance (Figure 4D).

The impact of remifentanil treatment was also investigated in unlesioned male and female pups. A two-way ANOVA did not reveal a significant difference in body weights between the experimental groups from P2 and P12 (Supplementary Figure 1C and D). The measurements of performances in negative geotaxis (P6-P8, Figure 5A and B) and suspension (P10-P12, Figure 5C and D) tests did not show any difference between remifentanil and NaCl groups, regardless of gender.

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

To determine whether neonatal remifentanil exposure in a lesional context leads to a lasting effect, an open field test was conducted to assess locomotor activity before weaning (P18). At P18, body weight of mice did not differ between Ibo/remi and Ibo/NaCl groups, in males (8.06 ± 0.19 vs 8.01 ± 0.27) as in females (7.78 ± 0.33 vs 7.62 ± 0.30). In male, no significant difference was found between Ibo/remi and Ibo/NaCl groups concerning the distance covered during 30 min in the entire compartment (Figure 6A) or concerning the time spent in the center during the first 5 min after the habituation period (Figure 6B). Although,

lesioned females injected with remifentanil at P2 covered a similar distance than NaCl-injected females in the entire compartment (Figure 6C), they significantly spent more time in the open-field center than controls (p=0.0054; Figure 6D). These data suggest that lesioned females exposed to remifentanil in neonatal period were less anxious than NaCl-treated mice.

In unlesioned mice, the distance covered in the entire open-field during 30 min (Figure 7A and C) and the time spent in the center zone (Figure 7B and D) did not differ between remiferitanil and NaCl-treated animals, whatever the gender considered.

Discussion

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

Premature infants born via urgent cesarean delivery under general anesthesia are at increased risk of hypoxic-ischemic and excitotoxic insults to the brain. Remifentanil is considered the most suitable opioid for obstetric anesthesia and analgesia as well as fetal immobilization during intrauterine surgery (Avino et al., 2014; Badiee et al., 2013; Choong et al., 2010; Crawford et al., 2005; Michel et al., 2008, Pereira e Silva et al., 2007). Previous studies have suggested that remifentanil readily crosses the placenta and is also rapidly metabolized in neonates.

Although from a clinical point of view, the dose of 500 ng/g remifentanil seems quite high for neonates at least 8 to 10 times the daily dose in man.

Dose determination for an animal experimental study is a classical point of discussion. Thus, we firstly characterized the effective dose of remifentanil for inducing a transient sedation in P2 neonates. The dose of 500 ng/g in 3 injections appears to give the most relevant

RESULTATS : Article II

clinical effect, evaluated by loss of righting reflex. The dose of remifentanil injected in mice neonate is much higher than doses usually used in humans (5 µg/kg, intravenous) (Demirel et al., 2014). Drugs metabolism and pharmacokinetic can be very different between humans and animals and the gaps between effective doses in mice and humans are commonly observed. For example, ketamine and midazolam doses required to induce anesthesia in mice neonates are 10 to 30 times the anesthesia-inducing doses for human infants (Lecointre et al., 2015; Young et al., 2005). Moreover, plasmatic determination of remifentanil in mice neonates was 10 nmol/L, really near from remifentanil concentrations measured in human during clinical practice (from 10 to 100 nmol/L) (Egan et al., 1996; Ross et al., 2001). These findings reinforced the choice of the 500 ng/g intraperitoneal dose of remifentanil for each injection.

Hypotension, bradycardia, decreased respiratory rate, apnoea are common clinical side effects observed during used of remifentanil (Chanavaz et al., 2005). In human, it is also well established that these side effects can be harmful on damaged brain: the occurrence of a single episode of arterial hypotension (systolic blood pressure <90 mmHg for at least 5 minutes) is associated with a significant increase in neurological morbidity and mortality (Chesnut et al., 1993). Pre-hospital and intra-hospital arterial hypotension is associated with a mortality increase (Miller et al., 1978; Stocchetti et al., 1996; Manley et al., 2001). In the context of human damaged brain, hypoxemia is significantly associated with poorer neurological outcome, and the duration of hypoxemia is associated with an increase in mortality (Murray et al., 2007; Bratton et al., 2007). The absence of CO₂ control is also associated with poor clinical outcome (Roberts et al., 2015). In our study, there are some concerns about the significant hypercapnia when neonate mice were treated by remifentanil. It could have a proper effect on brain lesions. Experimental studies have reported that hypercapnia causes cell damage and microvascular degeneration in the newborn rodent brain by inducing nitrative stress (Das et al., 2009; Honoré et al., 2010). Before that, mild hypercapnia (55 mmHg) and normocapnia (38mmHg) were associated with less brain damage than hypocapnia (26 mmHg) in a hypoxia-ischemia model in immature rats (Vanucci et al., 1995). In contrast, extreme hypercapnia (100 mmgHg) and hypocapnia (26 mmgHg) exacerbated cerebral injury (Vanucci et al., 2001). In human preterm neonates, hypercapnia has been proposed for prevention of bronchopulmonary dysplasia. The impact of this

83

hypercapnia on cerebral lesions (intraventricular haemorrhage) wasn't statistically significant in a randomised controlled trial, even if some negative trends on this outcome were observed (Thome et al., 2015). So, the effect of mild hypercapnia on immature brain remains unclear, in rodent as well as human. Although the pCO2 value in remifentanil-treated group is statistically higher than in NaCl group (45 mmHg vs 35 mmHg, respectively), it ranges between normocapnia (38 mmHg) and mild hypercapnia (55 mm) conditions described in the Vanucci study. In these conditions, immature rats have similar severities of hypoxic-ischemic brain damage (Vanucci et al., 1995 ; Vanucci et al., 1997). So, the minor pCO2 rise observed after remifentanil administration has probably no impact in on our neonatal mice model.

We found that remifentanil treatment has the same physiological side effects than those encountered in human clinical practice. It was not possible to evaluate blood pressure on neonatal mice. Hemodynamic side effect of the treatment by remifentanil was evaluated by the decrease of heart rate. This adverse side effect of remifentanil is well known in human, always associated with hypotension (Chanavaz et al., 2005). As remifentanil-treated pups have a decreased heart rate, it is reasonable to assume that this bradycardia was associated with hypotension. In the preterm infant, hypotension is associated with increased mortality, intraventricular hemorrhage, periventricular leukomalacia, and neurodevelopmental morbidity (Miall-Allen et al., 1987; Watkins et al., 1989; Goldstein et al., 1995; Cunningham et al., 1999). Together, remifentanil respiratory and hemodynamics side effects, uncontrolled in our model because of the technical limitations due to the use of P2 neonate pups, should have a deleterious impact on brain injury induced by ic ibotenate.

When injected in immature mice, the ibotenate produces, mainly through the activation of NMDA-R, cerebral lesions mimicking some aspects of the developmental lesions observed in human preterm neonates (Marret et al., 1995; Gressens et al., 1996). Following ibotenate injection, the brain of the newborn undergoes a series of cellular and molecular changes, ranging from inflammatory changes such as microgial activation, reactive gliosis, ROS and cytokine production within a few hours of the insult, to neuronal loss within a few days (Dommergues et al., 2000; Tarahoui et al., 2001; Kaindl et al., 2012). Ibotenate administered at P2 in mice induced cortical neuronal death, resulting in an abnormal microgyria-like

sulcation of the cortex. Furthermore, it produced periventricular white matter cystic lesions (Marret et al., 1995; Gressens et al., 1996). Excitotoxic neuronal cell death in the neonate rodent was previously described to involve apoptotic and necrotic mechanisms (Portera-Caillau et al., 1997). In this context, our data showed that, within the first hours post-lesion, remifentanil treatment decreased the ROS production and caspase-3 activity in the lesioned hemisphere of pups. At one day post-lesion, a decrease of caspase-3 immunoreactive signal and apoptotic cell death was observed in brain from remifentanil-treated pup, leading a significant reduction of the lesion size observed at P7. Altogether, our data support a protective effect of remifentanil against neonatal excitotoxic brain, probably involving an antiapoptotic action as we previously showed in an *ex vivo* model of P2 brain slices (Tourrel et al., 2014). Our data are also consistent with recent studies showing a neuroprotective effect of remifentanil focal brain ischemia in adult rodents (Park et al., 2011; Jeong et al., 2012).

In our present work, we did not investigate the action mechanisms underlying the neuroprotective action of remifentanil. Inflammation is increasing recognized as being a critical contributor to injury outcome in the immature brain. It participates in early and late injury, as well in repair and recovery after insult (Hagberg et al., 2015). During an excitotoxic challenge, leucocyte infiltration, microglial activation and reactive astrogliosis participate to brain inflammation, triggering release of many neurotoxic compounds such as free radicals and cytokines (Marret et al., 1995; Hallenbeck, 1996, Tahraoui et al., 2001). We found that remifentanil alleviates brain ROS production and astrogliosis induced by ibotenate injection, suggesting that the opioid could modulate the neuroinflammation. In adult rat, remifentanil preconditioning has been shown to alleviate brain damage of cerebral ischemia reperfusion and to reduce expression of TNF- α , ROS production as well release of cytochrome C and caspases 3 and 9 activities (Zhang et al., 2013; Hu et al., 2013). Furthermore, in vitro data have demonstrated that remifentanil inhibits neutrophils migration (Hofbauer et al., 2000) and cytokines (TNF- α , IL-6 and IL-8) production by human activated neutrophils (Hyejin et al., 2013). All these data indicate a potential anti-inflammatory effect of remifentanil in our neonatal lesional model.
In the rest of our study, we investigated whether a functional neuroprotective effect of remifentanil could be found in developing mice. In our lesional conditions, remifentanil injection at P2 counterbalances the behavioral deficits observed in the negative geotaxis test in males and females and in the grip test, especially in males. The tests used evaluate the motor activity and sensory development of the mouse (Altman and Sudarshan, 1975). It has been shown in rodents that delayed sensorimotor reflexes during development may result from hypomyelination of the subcortical white matter (Wu et al., 2008). In addition, 5 days after the injection of ibotenate, our results showed that the size of the lesion is significantly decreased in the mice treated with remifentanil. Taken together, the data suggest that remifentanil by protecting the cortical structure and the white matter, preserves the motor afferences and the integrating centers of the proprioceptive information coming from the muscles and joints allowing the triggering of the reversal reflex. Similarly, results obtained with the geotaxis tests support that the functional link between the sensorimotor cortex and the thalamic nuclei that integrate the vestibular system information is preserved, thus allowing the perception of rotation and vertical orientation. In the grip test, the effect of the lesion is only detectable at P12 in females, but does not reach significance. This result can be explained by a muscle development of the upper limbs in females less important than in males. Gripping performance in females is therefore poorer than in males, this is particularly noticeable at P10 and P11. Consequently, a protective effect of remifentanil could be more difficult to reveal in in the female group whereas it was significant in males. The open field test performed at P18 does not reveal motor deficit in the injured mice from both sexes treated or not with remifentanil. These results are consistent with the very strong cerebral plasticity described in rodents, particularly during the synaptogenesis period occurring within the first three postnatal weeks (Jenkins and Merzenich, 1987). Such plasticity was shown to result in a marked compensation of motor impairments induced by the lesion (Chu and Jones, 2000). However, because in the open field, mice are placed in a new environment, this test is also indicative of anxiety that can be evaluated by the time spent in the center of the device in the first minutes of the test. Our results showed that females injured and treated with remifentanil spend more time in the central area than injured animals that received NaCl, suggesting a less anxious state of remifentanil treated animals. Interestingly, this effect was

RESULTATS : Article II

also observed in males but only during the first two minutes. The anxiolytic effect of remifentanil in lesional conditions is in agreement with several data from the literature showing the involvement of opiate receptors in the regulation of emotional states, including anxiety (Lutz and Kieffer, 2013). In the context of systemic administration of remifentanil to prevent brain damage of preterm babies, it is essential to ensure that it is devoid of side effects by its own. When administered alone to P2 mice, remifentanil did not induce any changes in body weight and did not affect sensorimotor tests or animal anxiety.

The present study provide the first evidence that the anti-apoptotic effects of Ultiva[®] on the developing mouse brain which were previously shown *ex vivo* using a model of organotypic cortical slices are also found *in vivo* in a neonatal model of excitotoxic lesions. This neuroprotective effect of remiferitanil is associated with a reduction of brain lesion sizes and prevention of several behavioural deficits occurring during the first 18 days of life. Further experiments would be planned to better understand the mechanisms involved in this neuroprotective effect in particular regarding gender specific effects.

References

Altman J., Sudarshan K. (1975). Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. Anim Behav. 23(4):896-920.

Anand K.J., Soriano S.G. (2004). Anesthetic agents and the immature brain: are these toxic or therapeutic? Anesthesiology. 101(2):527-30.

Ancel P.Y., Goffinet F., EPIPAGE-2 Writing Group, Kuhn P., Langer B., Matis J., Hernandorena X., Chabanier P., Joly-Pedespan L., Lecomte B., Vendittelli F., Dreyfus M., Guillois B., Burguet A., Sagot P., Sizun J., Beuchée A., Rouget F., Favreau A., Saliba E., Bednarek N., Morville P., Thiriez G., Marpeau L., Marret S., Kayem G., Durrmeyer X., Granier M., Baud O., Jarreau P.H., Mitanchez D., Boileau P., Boulot P., Cambonie G., Daudé H., Bédu A., Mons F., Fresson J., Vieux R., Alberge C., Arnaud C., Vayssière C., Truffert P., Pierrat V., Subtil D., D'Ercole C., Gire C., Simeoni U., Bongain A., Sentilhes L., Rozé J.C., Gondry J., Leke A., Deiber M., Claris O., Picaud J.C., Ego A., Debillon T., Poulichet A., Coliné E., Favre A., Fléchelles O., Samperiz S., Ramful D., Branger B., Benhammou V., Foix-L'Hélias L., Marchand-Martin L., Kaminski M. (2015). Survival and morbidity of preterm children born at 22 through 34 weeks' gestation in France in 2011: results of the EPIPAGE-2 cohort study. JAMA Pediatr. 169(3):230-8.

Arquié C., Leroux P., Bodenant C., Laquerrière A., Marpeau L., Marret S. (2002). Glucocorticoid treatment in an ischaemic-like excitotoxic model of periventricular leucomalacia in mice. BJOG. 109(9):989-96.

Atici S., Cinel L., Cinel I., Doruk N., Aktekin M., Akca A., Camdeviren H., Oral U. (2004). Opioid neurotoxicity: comparison of morphine and tramadol in an experimental rat model. Int J Neurosci. 114(8):1001-11.

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

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

Ball G., Srinivasan L., Aljabar P., Counsell S.J., Durighel G., Hajnal J.V., Rutherford M.A., Edwards A.D. (2013). Development of cortical microstructure in the preterm human brain. Proc Natl Acad Sci U S A. 110(23):9541-6.

Boasen JF, McPherson RJ, Hays SL, Juul SE, Gleason CA. (2009). Neonatal stress or morphine treatment alters adult mouse conditioned place preference. Neonatology. 95(3):230-9.

Bratton SL, Chestnut RM, Ghajar J, McConnell Hammond FF, Harris OA, Hartl R, Manley GT, Nemecek A, Newell DW, Rosenthal G, Schouten J, Shutter L, Timmons SD, Ullman JS, Videtta W, Wilberger JE, Wright DW. (2007). Guidelines for the management of severe traumatic brain injury. I. Blood pressure and oxygenation. Brain Trauma Foundation.; American Association of Neurological Surgeons.; Congress of Neurological Surgeons.; Joint Section on Neurotrauma and Critical Care, AANS/CNS. J Neurotrauma. 24 Suppl 1:S7-13.

Butwick AJ, El-Sayed YY, Blumenfeld YJ, Osmundson SS, Weiniger CF. (2015). Mode of anaesthesia for preterm Caesarean delivery: secondary analysis from the Maternal-Fetal Medicine Units Network Caesarean Registry. Br J Anaesth. 115(2):267-74.

Carbajal R, Eriksson M, Courtois E, Boyle E, Avila-Alvarez A, Andersen RD, Sarafidis K, Polkki T, Matos C, Lago P, Papadouri T, Montalto SA, Ilmoja ML, Simons S, Tameliene R, van Overmeire B, Berger A, Dobrzanska A, Schroth M, Bergqvist L, Lagercrantz H, Anand KJ; EUROPAIN Survey Working Group. (2015). Sedation and analgesia practices in neonatal intensive care units (EUROPAIN): results from a prospective cohort study. Lancet Respir Med.

Chanavaz C, Tirel O, Wodey E, Bansard JY, Senhadji L, Robert JC, Ecoffey C. (2005). Haemodynamic effects of remifentanil in children with and without intravenous atropine. An echocardiographic study. Br J Anaesth. 94(1):74-9.

Chang E. (2015). Preterm birth and the role of neuroprotection. BMJ. 350:g6661.

Chesnut RM, Marshall SB, Piek J, Blunt BA, Klauber MR, Marshall LF. (1993). Early and late systemic hypotension as a frequent and fundamental source of cerebral ischemia following severe brain injury in the Traumatic Coma Data Bank. Acta Neurochir Suppl (Wien). 59:121-5

Choong, K., AlFaleh, K., Doucette, J., Gray, S., Rich, B., Verhey, L., and Paes, B. (2010). Remifentanil for endotracheal intubation in neonates: a randomised controlled trial. Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed. 95, F80-84.

Chu, C.J., and Jones, T.A. (2000). Experience-dependent structural plasticity in cortex heterotopic to focal sensorimotor cortical damage. Exp. Neurol. 166, 403–414.

Crawford, M.W., Hayes, J., and Tan, J.M. (2005). Dose-response of remifentanil for tracheal intubation in infants. Anesth. Analg. 100, 1599–1604.

Crowther CA, Aghajafari F, Askie LM, Asztalos EV, Brocklehurst P, Bubner TK, Doyle LW, Dutta S, Garite TJ, Guinn DA, Hallman M, Hannah ME, Hardy P, Maurel K, Mazumder P, McEvoy C, Middleton PF, Murphy KE, Peltoniemi OM, Peters D, Sullivan L, Thom EA, Voysey M, Wapner RJ, Yelland L, Zhang S; PRECISE Study Group. (2012). Repeat prenatal corticosteroid prior to preterm birth: a systematic review and individual participant data meta-analysis for the PRECISE study group (prenatal repeat corticosteroid international IPD study group: assessing the effects using the best level of evidence) - study protocol. Syst Rev. 1:12.

Cunningham S, Symon AG, Elton RA, Zhu C, McIntosh N. (1999). Intra-arterial blood pressure reference ranges, death and morbidity in very low birthweight infants during the first seven days of life. Early Hum Dev. 56(2-3):151-65.

Das S, Du Z, Bassly S, Singer L, Vicencio AG. (2009). Effects of chronic hypercapnia in the neonatal mouse lung and brain. Pediatr Pulmonol. 44(2):176-82.

Degos V, Loron G, Mantz J, Gressens P. (2008). Neuroprotective strategies for the neonatal brain. Anesth Analg. 106(6):1670-80.

Degos V, Charpentier TL, Chhor V, Brissaud O, Lebon S, Schwendimann L, Bednareck N, Passemard S, Mantz J, Gressens P. (2013). Neuroprotective effects of dexmedetomidine against glutamate agonist-induced neuronal cell death are related to increased astrocyte brain-derived neurotrophic factor expression. Anesthesiology. 118(5):1123-32.

Demirel, N., Bas, A.Y., Kavurt, S., Celik, I.H., Yucel, H., Turkbay, D., Hekimoğlu, E., and Koc, O. (2014). Remifentanil analgesia during laser treatment for retinopathy of prematurity: a

practical approach in neonatal intensive care unit. Am. J. Perinatol. 31, 983–986.

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(5):1092-108.

Dommergues MA, Patkai J, Renauld JC, Evrard P, Gressens P. (2000). Proinflammatory cytokines and interleukin-9 exacerbate excitotoxic lesions of the newborn murine neopallium. Ann Neurol. 47(1):54-63.

Doyle LW, Anderson PJ, Lee KJ. (2015). Antenatal magnesium sulfate and outcomes for school-aged children--reply. JAMA. 313(3):306-7.

Doyle LW, Crowther CA, Middleton P, Marret S, Rouse D. (2009). Magnesium sulphate for women at risk of preterm birth for neuroprotection of the fetus. Cochrane Database Syst Rev. (1):CD004661.

Dugan LL, Choi DW. (1994). Excitotoxicity, free radicals, and cell membrane changes. Ann Neurol. 35 Suppl:S17-21.

Durrmeyer X, Vutskits L, Anand KJ, Rimensberger PC. (2010). Use of analgesic and sedative drugs in the NICU: integrating clinical trials and laboratory data. Pediatr Res. 67(2):117-27.

Egan TD, Minto CF, Hermann DJ, Barr J, Muir KT, Shafer SL. (1996). Remifentanil versus alfentanil: comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics in healthy adult male volunteers. Anesthesiology. 84(4):821-33.

Favrais G, Tourneux P, Lopez E, Durrmeyer X, Gascoin G, Ramful D, Zana-Taieb E, Baud O. (2014). Impact of common treatments given in the perinatal period on the developing brain. Neonatology. 106(3):163-72.

Ferguson SA, Ward WL, Paule MG, Hall RW, Anand KJ. (2012). A pilot study of preemptive morphine analgesia in preterm neonates: effects on head circumference, social behavior, and response latencies in early childhood. Neurotoxicol Teratol. 34(1):47-55.

Giannantonio C, Sammartino M, Valente E, Cota F, Fioretti M, Papacci P. (2009). Remifentanil analgosedation in preterm newborns during mechanical ventilation. Acta Paediatr. 98(7):1111-5.

Goldstein RF, Thompson RJ Jr, Oehler JM, Brazy JE. (1995). Influence of acidosis, hypoxemia, and hypotension on neurodevelopmental outcome in very low birth weight infants. Pediatrics. 95(2):238-43.

Gressens P, Marret S, Evrard P. (1996). Developmental spectrum of the excitotoxic cascade induced by ibotenate: a model of hypoxic insults in fetuses and neonates. Neuropathol Appl Neurobiol. 22(6):498-502.

Gressens P, Marret S, Hill JM, Brenneman DE, Gozes I, Fridkin M, Evrard P. (1997). Vasoactive intestinal peptide prevents excitotoxic cell death in the murine developing brain. J Clin Invest. 100(2):390-7.

Grunau RE, Oberlander T, Holsti L, Whitfield MF. (1998). Bedside application of the Neonatal Facial Coding System in pain assessment of premature neonates. Pain. 76(3):277-86.

Grunau RE, Whitfield MF, Petrie-Thomas J, Synnes AR, Cepeda IL, Keidar A, Rogers M, Mackay M, Hubber-Richard P, Johannesen D. (2009). Neonatal pain, parenting stress and interaction, in relation to cognitive and motor development at 8 and 18 months in preterm infants. Pain. 143(1-2):138-46.

Guntz E, Dumont H, Roussel C, Gall D, Dufrasne F, Cuvelier L, Blum D, Schiffmann SN, Sosnowski M. (2005). Effects of remifentanil on N-methyl-D-aspartate receptor: an electrophysiologic study in rat spinal cord. Anesthesiology. 102(6):1235-41.

Hagberg, H., Mallard, C., Ferriero, D.M., Vannucci, S.J., Levison, S.W., Vexler, Z.S., and Gressens, P. (2015). The role of inflammation in perinatal brain injury. Nat. Rev. Neurol. 11, 192–208.

Hall RW, Anand KJ. (2014). Pain management in newborns. Clin Perinatol. 41(4):895-924.

Hallenbeck, J.M. (1996). Significance of the inflammatory response in brain ischemia. Acta

Neurochir. Suppl. 66, 27–31.

Hennebert O, Laudenbach V, Laquerriere A, Verney C, Carmeliet P, Marret S, 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(3):697-712.

Himmelmann K, Uvebrant P. (2014). The panorama of cerebral palsy in Sweden. XI. Changing patterns in the birth-year period 2003-2006. Acta Paediatr. 103(6):618-24.

Hofbauer, R., Frass, M., Gmeiner, B., Sandor, N., Schumann, R., Wagner, O., and Kaye, A.D. (2000). Effects of remifentanil on neutrophil adhesion, transmigration, and intercellular adhesion molecule expression. Acta Anaesthesiol. Scand. 44, 1232–1237.

Honoré JC, Kooli A, Hou X, Hamel D, Rivera JC, Picard E, Hardy P, Tremblay S, Varma DR, Jankov RP, Mancini JA, Balazy M, Chemtob S. (2010). Sustained hypercapnia induces cerebral microvascular degeneration in the immature brain through induction of nitrative stress. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 298(6):R1522-30.

Hu X, Xie C, He S, Zhang Y, Li Y, Jiang L. (2013). Remifentanil postconditioning improves global cerebral ischemia-induced spatial learning and memory deficit in rats via inhibition of neuronal apoptosis through the PI3K signaling pathway. Neurol Sci. 34(11):1955-62. doi: 10.1007/s10072-013-1419-4. Epub 2013 Apr 23.

Husson I, Rangon CM, Lelièvre V, Bemelmans AP, Sachs P, Mallet J, Kosofsky BE, Gressens P. (2005). BDNF-induced white matter neuroprotection and stage-dependent neuronal survival following a neonatal excitotoxic challenge. Cereb Cortex. 15(3):250-61.

Hyejin, J., Mei, L., Seongheon, L., Cheolwon, J., Seokjai, K., Hongbeom, B., Minsun, K., Sungsu, C., and Sanghyun, K. (2013). Remifentanil attenuates human neutrophils activation induced by lipopolysaccharide. Immunopharmacol. Immunotoxicol. 35, 264–271.

Ishii T, Kuwaki T, Masuda Y, Fukuda Y. (2001). Postnatal development of blood pressure and baroreflex in mice. Auton Neurosci. 94(1-2):34-41.

93

Jenkins, W.M., and Merzenich, M.M. (1987). Reorganization of neocortical representations after brain injury: a neurophysiological model of the bases of recovery from stroke. Prog. Brain Res. 71, 249–266.

Jeong, S., Kim, S.J., Jeong, C., Lee, S., Jeong, H., Lee, J., and Yoo, K.Y. (2012). Neuroprotective effects of remifentanil against transient focal cerebral ischemia in rats. J. Neurosurg. Anesthesiol. 24, 51–57.

Joly V, Richebe P, Guignard B, Fletcher D, Maurette P, Sessler DI, Chauvin M. (2005). Remifentanil-induced postoperative hyperalgesia and its prevention with small-dose ketamine. Anesthesiology. 103(1):147-55.

Kaindl AM, Degos V, Peineau S, Gouadon E, Chhor V, Loron G, Le Charpentier T, Josserand J, Ali C, Vivien D, Collingridge GL, Lombet A, Issa L, Rene F, Loeffler JP, Kavelaars A, Verney C, Mantz J, Gressens P. (2012). Activation of microglial N-methyl-D-aspartate receptors triggers inflammation and neuronal cell death in the developing and mature brain. Ann Neurol. 72(4):536-49.

Kohlhauer M, Lidouren F, Remy-Jouet I, Mongardon N, Adam C, Bruneval P, Hocini H, Levy Y, Blengio F, Carli P, Vivien B, Ricard JD, Micheau P, Walti H, Nadeau M, Robert R, Richard V, Mulder P, Maresca D, Demené C, Pernot M, Tanter M, Ghaleh B, Berdeaux A, Tissier R. (2015). Hypothermic Total Liquid Ventilation Is Highly Protective Through Cerebral Hemodynamic Preservation and Sepsis-Like Mitigation After Asphyxial Cardiac Arrest. Crit Care Med. 43(10):e420-30.

Laudenbach V, Mercier FJ, Rozé JC, Larroque B, Ancel PY, Kaminski M, Bréart G, Diemunsch P, Subtil D, Lejus C, Fresson J, Arnaud C, Rachet B, Burguet A, Cambonie G. (2009). Epipage Study Group. Anaesthesia mode for caesarean section and mortality in very preterm infants: an epidemiologic study in the EPIPAGE cohort. Int J Obstet Anesth. 18(2):142-9.

Lecointre M, Vézier C, Bénard M, Ramdani Y, Dupré N, Brasse-Lagnel C, Henry VJ, Roy V, Marret S, Gonzalez BJ, Jégou S, Leroux-Nicollet I. (2015). Age-dependent alterations of the

NMDA receptor developmental profile and adult behavior in postnatally ketamine-treated mice. Dev Neurobiol. 75(3):315-33.

Li X, Angst MS, Clark JD. (2001) Opioid-induced hyperalgesia and incisional pain. Anesth Analg. 93(1):204-9.

Lutz, P.-E., and Kieffer, B.L. (2013). Opioid receptors: distinct roles in mood disorders. Trends Neurosci. 36, 195–206.

Manley G, Knudson MM, Morabito D, Damron S, Erickson V, Pitts L. (2001) Hypotension, hypoxia, and head injury: frequency, duration, and consequences. Arch Surg. 136(10):1118-23.

Marret S, Foix-L'hélias L, Ancel PY, Kaminski M, Larroque B, Marcou-Labarre A, Laudenbach V. (2008). Is it possible to protect the preterm infant brain and to decrease later neurodevelopmental disabilities? Arch Pediatr. 15 Suppl 1:S31-41.

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(3):358-70.

Marsh DF, Hodkinson B. (2009). Remifentanil in paediatric anaesthetic practice. Anaesthesia. 64(3):301-8.

Miall-Allen VM, de Vries LS, Whitelaw AG. (1987). Mean arterial blood pressure and neonatal cerebral lesions. Arch Dis Child. 62(10):1068-9.

Miller JD, Sweet RC, Narayan R, Becker DP. (1978). Early insults to the injured brain. JAMA. 240(5):439-42.

Murray GD, Butcher I, McHugh GS, Lu J, Mushkudiani NA, Maas AI, Marmarou A, Steyerberg EW. (2007). Multivariable prognostic analysis in traumatic brain injury: results from the IMPACT study. J Neurotrauma. 24(2):329-37.

Park, S.-W., Yi, J.-W., Kim, Y.-M., Kang, J.-M., Kim, D.O., Shin, M.-S., Kim, C.-J., Lee, D.I., Kim,

D.-H., and Lee, B.J. (2011). Remifentanil alleviates transient cerebral ischemia-induced memory impairment through suppression of apoptotic neuronal cell death in gerbils. Korean J. Anesthesiol. 61, 63–68.

Penido MG, Garra R, Sammartino M, Pereira e Silva Y. (2010). Remifentanil in neonatal intensive care and anaesthesia practice. Acta Paediatr. 99(10):1454-63.

Penn AA, Gressens P, Fleiss B, Back SA, Gallo V. (2016).Controversies in preterm brain injury. Neurobiol Dis. 92(Pt A):90-101.

Pereira e Silva, Y., Gomez, R.S., Marcatto, J. de O., Maximo, T.A., Barbosa, R.F., and Simões e Silva, A.C. (2007). Morphine versus remifentanil for intubating preterm neonates. Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed. 92, F293-294.

Portera-Cailliau C, Price DL, Martin LJ. (1997). Excitotoxic neuronal death in the immature brain is an apoptosis-necrosis morphological continuum. J Comp Neurol. 378(1):70-87.

Roberts BW, Karagiannis P, Coletta M, Kilgannon JH, Chansky ME, Trzeciak S. (2015). Effects of PaCO2 derangements on clinical outcomes after cerebral injury: A systematic review. Resuscitation. 91:32-41.

Ross AK, Davis PJ, Dear Gd GL, Ginsberg B, McGowan FX, Stiller RD, Henson LG, Huffman C, Muir KT. (2001). Pharmacokinetics of remifentanil in anesthetized pediatric patients undergoing elective surgery or diagnostic procedures. Anesth Analg. 93(6):1393-401.

Seatriz JV, Hammer RP Jr. (1993). Effects of opiates on neuronal development in the rat cerebral cortex. Brain Res Bull. 30(5-6):523-7.

Schuurmans J, Benders M, Lemmers P, van Bel F. (2015). Neonatal morphine in extremely and very preterm neonates: its effect on the developing brain - a review. J Matern Fetal Neonatal Med. 28(2):222-8.

Sellier E, Platt MJ, Andersen GL, Krägeloh-Mann I, De La Cruz J, Cans C. (2016). Surveillance of Cerebral Palsy Network. Decreasing prevalence in cerebral palsy: a multi-site European population-based study, 1980 to 2003. Dev Med Child Neurol. 58(1):85-92.

96

Sfaello I, Baud O, Arzimanoglou A, Gressens P. (2005). Topiramate prevents excitotoxic damage in the newborn rodent brain. Neurobiol Dis. 20(3):837-48.

Steinhorn R, McPherson C, Anderson PJ, Neil J, Doyle LW, Inder T. (2015). Neonatal morphine exposure in very preterm infants-cerebral development and outcomes. J Pediatr. 166(5):1200-1207.

Stocchetti N, Furlan A, Volta F. (1996). Hypoxemia and arterial hypotension at the accident scene in head injury. J Trauma. 40(5):764-7.

Stratmann G, Lee J, Sall JW, Lee BH, Alvi RS, Shih J, Rowe AM, Ramage TM, Chang FL, Alexander TG, Lempert DK, Lin N, Siu KH, Elphick SA, Wong A, Schnair CI, Vu AF, Chan JT, Zai H, Wong MK, Anthony AM, Barbour KC, Ben-Tzur D, Kazarian NE, Lee JY, Shen JR, Liu E, Behniwal GS, Lammers CR, Quinones Z, Aggarwal A, Cedars E, Yonelinas AP, Ghetti S. (2014). Effect of general anesthesia in infancy on long-term recognition memory in humans and rats. Neuropsychopharmacology. 39(10):2275-87.

Surman G, Hemming K, Platt MJ, Parkes J, Green A, Hutton J, Kurinczuk JJ. (2009). Children with cerebral palsy: severity and trends over time. Paediatr Perinat Epidemiol. 23(6):513-21.

Tahraoui SL, Marret S, Bodénant C, Leroux P, Dommergues MA, Evrard P, Gressens P. (2001). Central role of microglia in neonatal excitotoxic lesions of the murine periventricular white matter. Brain Pathol. 11(1):56-71.

Taylor HG, Klein N, Anselmo MG, Minich N, Espy KA, Hack M. (2011). Learning problems in kindergarten students with extremely preterm birth. Arch Pediatr Adolesc Med. 165(9):819-25.

Thome UH, Genzel-Boroviczeny O, Bohnhorst B, Schmid M, Fuchs H, Rohde O, Avenarius S, Topf HG, Zimmermann A, Faas D, Timme K, Kleinlein B, Buxmann H, Schenk W, Segerer H, Teig N, Gebauer C, Hentschel R, Heckmann M, Schlösser R, Peters J, Rossi R, Rascher W, Böttger R, Seidenberg J, Hansen G, Zernickel M, Alzen G, Dreyhaupt J, Muche R, Hummler HD; PHELBI Study Group. (2015). Permissive hypercapnia in extremely low birthweight infants (PHELBI): a randomised controlled multicentre trial. Lancet Respir Med. 3(7):534-43. Tourrel F, de Lendeu PK, Abily-Donval L, Chollat C, Marret S, Dufrasne F, Compagnon P, Ramdani Y, Dureuil B, Laudenbach V, Gonzalez BJ, Jégou S. (2014). The antiapoptotic effect of remifentanil on the immature mouse brain: an ex vivo study. Anesth Analg. 118(5):1041-51.

Treit D, Fundytus M. Thigmotaxis as a test for anxiolytic activity in rats.(1988). Pharmacol Biochem Behav. 31(4):959-62.

Vannucci RC, Towfighi J, Heitjan DF, Brucklacher RM. (1995). Carbon dioxide protects the perinatal brain from hypoxic-ischemic damage: an experimental study in the immature rat. Pediatrics. 95(6):868-74.

Vannucci RC, Brucklacher RM, Vannucci SJ. (1997). Effect of carbon dioxide on cerebral metabolism during hypoxia-ischemia in the immature rat. Pediatr Res. 42(1):24-9.

Vannucci RC, Towfighi J, Brucklacher RM, Vannucci SJ. (2001). Effect of extreme hypercapnia on hypoxic-ischemic brain damage in the immature rat. Pediatr Res. 49(6):799-80.

Van Steenwinckel J, Schang AL, Sigaut S, Chhor V, Degos V1, Hagberg H, Baud O, Fleiss B, Gressens P. (2014). Brain damage of the preterm infant: new insights into the role of inflammation. Biochem Soc Trans. 42(2):557-63.

Volpe JJ. (2009). Brain injury in premature infants: a complex amalgam of destructive and developmental disturbances. Lancet Neurol. 8(1):110-24.

Welzing L, Kribs A, Huenseler C, Eifinger F, Mehler K, Roth B. (2009). Remifentanil for INSURE in preterm infants: a pilot study for evaluation of efficacy and safety aspects. Acta Paediatr. 98(9):1416-20.

Welzing L, Ebenfeld S, Dlugay V, Wiesen MH, Roth Β, Mueller C. (2011). Remifentanil degradation in umbilical cord blood of preterm infants. Anesthesiology. 114(3):570-7.

Wu, L.-L., Zhang, L., Shao, J., Qin, Y.-F., Yang, R.-W., and Zhao, Z.-Y. (2008). Effect of perinatal iron deficiency on myelination and associated behaviors in rat pups. Behav. Brain Res. 188, 263–270.

Young C, Jevtovic-Todorovic V, Qin Y-Q, Tenkova T, Wang , Labruyere J, Olney JW. (2005). Potential of ketamine and midazolam, individually or in combination, to induce apoptotic neurodegeneration in the infant mouse brain. Br J Pharmacol. 146(2): 189–197.

Zhang, Y., Li, Y.-W., Wang, Y.-X., Zhang, H.-T., Zhang, X.-M., Liang, Y., Zhang, X.-S., Wang, W.-S., Liu, H.-G., Zhang, Y., et al. (2013). Remifentanil preconditioning alleviating brain damage of cerebral ischemia reperfusion rats by regulating the JNK signal pathway and TNF- α /TNFR1 signal pathway. Mol. Biol. Rep. 40, 6997–7006.

Zhao M, Joo DT. (2008). Enhancement of spinal N-methyl-D-aspartate receptor function by remifentanil action at delta-opioid receptors as a mechanism for acute opioid-induced hyperalgesia or tolerance. Anesthesiology. 109(2):308-17.

Watkins A. M., West C. R., Cooke R. W. (1989). Blood pressure and cerebral haemorrhage and ischaemia in very low birthweight infants. Early Hum. Dev. 19, 103–110.



Fig. 1



Fig. 2



ic Ibotenate

ď



Fig. 3



Fig. 4



Fig. 5



Fig. 6



Fig. 7



Supplementary Fig. 1

Fig 1: Effect of remifentanil exposure on postural righting reflex latency time and physiological parameters in P2 neonates. (A) Time differences needed to turn over and return to prone position between remifentanil-treated and control P2 mice. Pups received 3 injections of remifentanil (50, 250 or 500 ng/g) or NaCl 0.9% and the test was performed each 5 min. ***p < 0.001 vs NaCl, •• p < 0.01, ••• p < 0.001vs remifentanil (50 ng/g), #p< 0.05, ##p < 0.01 vs remifentanil (250 ng/gr), (Two-way ANOVA, Bonferroni post-test) (B) Respiratory frequency evaluated during one min period in untreated, remifentanil (3x500 ng/g)- and NaCl-treated P2 mice. ***p < 0.001 vs untreated or NaCl groups (Kruskall-Wallis test). (C-E) Blood gas analyses (pH, pCO₂ and pCO₂) performed in remifentanil (3x500 ng/g)- and NaCl-treated P2 mice. **p < 0.01 (Mann Whitney test). (F) Effect of remifentanil anesthesia on heart rate in P2 pups. Representative electrocardiogram (ECG) tracing from P2 mice injected with remifentanil (3 x 500 ng/gr) or saline (left panel). Quantification of heart beats recorded during one min in remifentanil and control groups (right panel). *p < 0.05 (Mann Whitney test). All values are expressed as mean ± SEM. Number of animals is indicated in parentheses.

Fig. 2: Effect of remifentanil exposure on ibotenate-induced ROS production and cell death in brain neonate mice. (A-C) Photomicrograhs illustrating the intracortical site injection at P2. (A) Visualization of cleaved caspase-3 immunoreactivity in P2 brain five hours after intracortical injection of saline. Arrow indicates the injection site in P2 cortex. (B) CellTracked Red (CT-red) was used to retrieve the depth of injection site. Note the cavity induced by the injection (*). (C) Overlay of A and B. Scale bar 400 µm. (D) The ROS production was assessed at 10 min and 5 hours post-lesion by electron paramagnetic resonance spectroscopy (EPR) in brain ipsilateral hemisphere of Ibo/NaCl and Ibo/remi groups and compared to ROS production in unlesioned group. ## p<0.01, # p<0.05 vs unlesioned group (Mann Whitney test). (E-G) Effect of remifentanil exposure (3x500 ng/g) on in situ caspase activity in P2 cortex five hours after ic ibotenate injection. Visualization of FITC-VAD-FMK signal in cortex of NaCl-(E) or remifentanil-(F) treated P2 pups and injected with ic ibotenate. Note a stronger FITC-VAD-FMK signal around the site of injection in the cortex of Ibo/NaCl pup (E) as compared to Ibo/remifentanil pup (F). Scale bar 200 μm. (G) Remifentanil exposure significantly decreased in situ caspase activity (FITC-VAD-FMK signal) in ibotenate-injected pups (Ibo/remi).*p < 0.05 vs Ibo/NaCl group (Mann Whitney test). (H-I) Cleaved-caspase-3 immunoreactivity visualized on P3 in two frontal successive brain sections from NaCl-(H1-2) or remifentanil-(I1-2) treated pups and injected with ic ibotenate. Note that the apoptotic signal in the injected side of the brain was weaker in the remifentanil-treated pup. Scale bar 100 μ m. **(J)** Quantitative analysis on P3 of DNA fragmentation in brain extracts from NaCl- or remifentanil-treated pups injected with ic ibotenate on P2 as compared to unlesioned P3 pups. ### *p* < 0.001 vs unlesioned group (Kruskal-Wallis test), * p<0.05 vs Ibo/NaCl group (Mann Whitney test). Values are expressed as mean ± SEM. Number of animals is indicated in parentheses.

Fig. 3: Effect of remifentanil exposure on reactive astrogliosis and lesion size induced by ibotenate-injection. (A-B) GFAP immunolabeling performed at P3 in frontal brain sections from NaCl-(A1-2) or remifentanil-(B1-2) treated pups and injected with ic ibotenate at P2. In ipsilateral hemisphere of NaCl-treated pup (Ibo/NaCl), significant red GFAP-immunostaining was visualized in cortex (cx), thalamus (Th), striatum (Str) and areas bordering the lateral ventricle (LV) (A1-2). In brain from remifentanil-treated pup (Ibo/remi), the GFAP signal appeared weaker (B1-2). White arrows point the sites of ibotenate injection performed at P2. Asteriks indicate white matter cysts. In Ibo/NaCl slice, blood autofluorescence occurred in cyst. Arrowheads indicate GFAP-immunolabeling observed under lateral ventricle. Scale bars: 500 μm (A1, B1) and 50 μm (A2, B2). (C) Quantitative analysis of GFAP-immunostaining detected in interior area bordering the lateral ventricle (illustrated in A2 and B2 by arrowheads). * p<0.05 vs Ibo/NaCl group (Mann Whitney test). (D) Quantification by Western blot of GFAP protein expression in cortical extracts from P3 Ibo/NaCl and Ibo/remi pups. Representative immunoblots from cortical extracts are shown. Densitometric measurements were normalized for β -actin. Values are expressed as mean ± SEM. * p<0.05 vs lbo/NaCl group (Mann Whitney test). (E) Cresyl violet-stained section showing brain lesion induced by ibotenate injected at P2 and studied at age P7. Arrow points to the neuronal loss in cortical layers II-VI and star indicates the white matter lesion (cyst). LV, lateral ventricle. Scale bar 1 mm. (F) Effect of remiferitanil exposure on lesion size induced by ic ibotenate at P2 and studied at P7. The neuroprotective effect of remifentanil against neonatal excitotoxic damage is significant in male as well in female pups. *p < 0.05, **p < 0.01, *** p < 0.001 vs Ibo/NaCl group (Mann Whitney test). Values represent the mean ± SEM. Number of animals is indicated in parentheses.

Fig. 4: Effect of remifentanil exposure on sensorimotor performances of mice neonates injected with ibotenate at P2. (A-B) Quantification of negative geotaxis reflex in male (A) and female (B) neonates. Time necessary to rotate 180° was measured at P6 to P8 in unlesioned pups and ibotenate-injected pups exposed or not to remifentanil at P2. (C-D) Quantification of the grasping reflex in male (C) and female (D) neonates. Time latency before failing on the wire suspension test was measured at P10 to P12. Values are expressed as mean \pm SEM. *p < 0.05, **p < 0.01 lbo/remi vs lbo/NaCl, #p< 0.05, ##p< 0.01, ###p< 0.001 lbo/NaCl vs untreated (Two-way ANOVA test, Bonferroni post-test). Values represent the mean length of the lesions \pm SEM. Number of animals is indicated in parentheses.

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

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

Fig.7: Effect of remifentanil exposure in neonatal period on spontaneous motor activity of P18 juvenile unlesioned mice. (A-B) Quantification over 30 min of the total distance covered in the entire compartment (**A**, **C**) and the time spent in the center zone (**B**, **D**) by male (**A**, **B**) and female (**C**, **D**). Animals were injected with remifentanil or NaCl at P2 and studied at P18. Displacements were measured for three consecutive periods of 10 min. The time spent in the 110 center was measured for the first five consecutive periods of 1 min. No differences were found (Two-way ANOVA). Number of animals is indicated in parentheses.

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

Répercussions sur l'Adaptation à la Vie Néonatale de l'Utilisation du Rémifentanil au cours d'un Protocole d'Anesthésie Générale pour Césarienne dans un Contexte de prématurité

Protocole REAGI : REmifentanil pour Anesthesie Générale en contexte d'Immaturité

2012/175/HP

N° EUDRACT 2013-001850-83

Investigateur principal et coordinateur : Dr Fabien Tourrel

Promoteur : Délégation à la Recherche Clinique et à l'Innovation

La prise en charge d'une patiente pour césarienne est indissociable de la prise en charge de l'enfant à naître. En effet, les agents anesthésiques utilisés peuvent avoir, en fonction de leur nature et de la posologie administrée, un effet sur le nouveau-né après passage transplacentaire. La prise en charge de ces enfants dans la période du post-partum immédiat doit prendre en considération leur possible intoxication par les agents anesthésiques administrés à la mère. L'étude REAGI (Répercussions sur l'adaptation à la vie néonatale de l'utilisation de rémifentanil au cours d'un protocole d'anesthésie générale pour césarienne dans un contexte de prématurité) est une étude prospective, randomisée, monocentrique, menée en double aveugle et s'intéressant aux conséquences à court et moyen termes de l'exposition néonatale au rémifentanil, morphinique de synthèse utilisé notamment dans des protocoles d'anesthésie générale pour césarienne.

Le but de cette étude était de comparer l'état clinique des enfants nés de césarienne sous anesthésie générale avec administration de rémifentanil à celui des enfants nés de césarienne sous anesthésie générale sans utilisation de morphinique.

Dans cette étude, nous cherchons à répondre aux questions suivantes :

- L'exposition au rémifentanil en pré-natal a-t-elle un impact sur l'examen de l'enfant à la naissance ?
- Cette exposition a-t-elle un impact à moyen terme sur le développement de l'enfant ?

1. Etude clinique REAGI : contexte de l'étude

Parallèlement à ces investigations expérimentales, une étude clinique randomisée a été menée totalement en aveugle, s'intéressant à l'administration maternelle de rémifentanil en prénatal immédiat, dans un contexte d'anesthésie générale (AG) pour césarienne.

L'étude REAGI (Répercussions sur l'adaptation à la vie néonatale de l'utilisation de rémifentanil au cours d'un protocole d'anesthésie générale pour césarienne dans un contexte de prématurité) est une étude prospective, randomisée, monocentrique, menée en double aveugle et s'intéressant aux conséquences à court et moyen termes de l'exposition néonatale au rémifentanil, morphinique de synthèse utilisé notamment dans des protocoles d'AG pour césarienne. La population concernée par cette étude est constituée par des patientes âgées de plus de 18 ans, porteuses d'une grossesse simple et ayant une indication à une césarienne sous AG en contexte de prématurité.

a) Anesthésie générale et césarienne

Fréquente encore dans les années 1970-80, la nécessité de réaliser des AG pour une césarienne a fortement diminué depuis la généralisation des techniques antalgiques par voie péridurale au cours du travail. Le recours à cette technique reste tout de même non exceptionnel puisqu'à l'heure actuelle, en France, 5 % des césariennes sont réalisées sous AG. Dans d'autres pays, comme l'Allemagne, la proportion d'AG pour césarienne était, récemment, proche de 50 à 60 % (Schneck et al., 1999). Au CHU de Rouen, entre 2005 et 2008, 80 % des césariennes sous AG étaient réalisées dans un contexte d'urgence ou de semi-urgence. De plus, 58,8 % de ces césariennes sous AG étaient réalisées dans un contexte de prématurité. L'AG est surtout indiquée dans un contexte d'urgence chez une parturiente n'ayant pas de cathéter péridural.

Une des problématiques au cours de l'AG pour césarienne est celle de la place des agents opioïdes. En effet, la littérature n'apporte pas à ce jour de réponse claire concernant l'utilisation des morphiniques avant l'extraction du nouveau-né, la balance bénéfice maternel/risque néo-natal devant être évaluée au cas par cas. En effet, si l'administration d'opiacé dès l'induction est bénéfique pour la mère (meilleur contrôle des réactions neurovégétatives aux stimulations nociceptives), l'impact sur le nouveau-né peut être défavorable en matière d'adaptation à la vie extra-utérine. Ceci est d'autant plus vrai si la naissance se déroule dans un contexte de prématurité et/ou de souffrance fœtale aiguë.

b) Anesthésie générale et nouveau-né

La prise en charge d'une patiente pour césarienne est indissociable de la prise en charge de l'enfant à naître. En effet, les agents anesthésiques utilisés peuvent avoir, en fonction de leur nature et de la posologie administrée, un effet sur le nouveau-né après passage transplacentaire. La prise en charge de ces enfants dans la période du post-partum immédiat doit prendre en considération leur possible intoxication par les agents anesthésiques administrés à la mère.

A l'exception des curares, la plupart des agents anesthésiques ont un petit poids moléculaire et sont très liposolubles. La fraction libre, non liée aux protéines, de ces agents passe donc aisément la barrière placentaire.

Dans notre étude, le protocole utilisé dans le groupe contrôle est le protocole classiquement recommandé, associant thiopental à 5 mg/kg et succinylcholine (curare dépolarisant) à 1,5 mg/kg, permettant de réaliser une induction en séquence rapide. Les patientes du groupe rémifentanil reçoivent les mêmes molécules à l'induction, plus le rémifentanil à la posologie de 0,5 µg/kg sur 30 secondes suivi d'une perfusion à 0,1 µg/kg/min jusqu'à l'hystérotomie, temps chirurgical à partir duquel la perfusion était interrompue.

Le thiopental, hypnotique recommandé lors de l'induction d'anesthésie pour césarienne, est une molécule de faible poids moléculaire (130 Kda) et très liposoluble. Son transfert placentaire est donc important et rapide. Les rapports de concentration materno-fœtaux vont de 0,4 à 1,1. Le thiopental peut donc être à l'origine d'effets indésirables chez le nouveau-né, en particulier neurologiques, respiratoires ou hémodynamiques mais qui en pratique ont peu d'impact clinique dans les heures suivant l'exposition (Tumukunde et al., 2015).

En ce qui concerne les dérivés morphiniques, les rapports de concentration maternofœtaux sont de 0,81 pour le sufentanil et de 0,71 à 0,88 pour le rémifentanil (Johnson et al., 1997; Kan et al., 1998). Les opiacés sont des bases faibles. Leur pourcentage ionisé augmente donc lorsque le pH diminue. Cette forme ionisée ne passe pas la barrière placentaire. Au cours d'acidose fœtale, lors de souffrance fœtale aiguë, un phénomène d'accumulation (« *trapping* ») du morphinique, du côté fœtal du placenta est donc possible.

Concernant le rémifentanil, les études pharmacocinétiques réalisées mettent en évidence un faible volume de distribution, associé à un délai d'action bref de 1 à 2 minutes. Sa demi-vie d'élimination varie de 3 à 10 minutes (Glass, 1995b). Le métabolisme du rémifentanil par les estérases tissulaires, présentes de manière ubiquitaire, rend ses propriétés pharmacocinétiques indépendantes du surpoids, de la fonction rénale et de la fonction hépatique (Dershwitz et al., 1996; Egan et al., 1998; Hoke et al., 1997; Pitsiu et al., 2004). Chez l'Homme, la concentration de rémifentanil dans le sang fœtal atteint approximativement 50 % de la concentration sanguine maternelle. Le rapport entre les concentrations artérielle et veineuse du rémifentanil est approximativement de 30 % chez le fœtus, ce qui suggère l'existence de son métabolisme chez le nouveau-né (Kan et al., 1998)(Ngan Kee et al., 2006).

2. Objectifs de l'étude

a) Objectif principal

L'objectif principal de l'essai est de comparer l'état clinique, évalué par le score d'Apgar à 5 min, des enfants nés de césarienne sous anesthésie générale avec administration de rémifentanil à celui des enfants nés de césarienne sous AG sans utilisation de morphinique avant le clampage du cordon ombilical. (Score d'Apgar : score calculé à 1, 5 et 10 minutes de vie, évaluant l'adaptation à la vie extra-utérine du nouveau-né, à travers 5 items : fréquence cardiaque, mouvements respiratoires, tonus musculaire, réactivité à la stimulation cutanée et coloration.)

b) Objectifs secondaires

Les objectifs secondaires sont les suivants :

- confirmer le meilleur contrôle hémodynamique chez les mères traitées par rémifentanil,

- évaluer la fréquence d'utilisation d'agents anesthésiques d'entretien avant clampage du cordon,

- confirmer l'absence d'impact clinique de l'utilisation de rémifentanil chez les enfants à moyen terme.

3. Population étudiée

a) Nombre de sujets

Compte tenu des possibilités de recrutement dans cette étude monocentrique pilote, l'effectif a été fixé à 30 couples mère/enfant par groupe.

D'après les données cliniques du CHU de Rouen concernant l'ensemble des naissances prématurées entre 2005 et 2008, 40 % des enfants du bras sans rémifentanil auront un score d'Apgar < 7 à 5 minutes. On retient un risque de première espèce de 5 % et une formulation unilatérale, c'est-à-dire que l'on recherche une diminution de la proportion de nouveau-nés prématurés ayant un score d'Apgar à 5 minutes < 7 avec le rémifentanil. L'effectif total de 60 couples mère-enfant (30 par groupe) permet de disposer d'une puissance statistique de 80 % pour une différence de 28 % (40 % dans le groupe sans rémifentanil contre 12 % dans le groupe avec rémifentanil).

L'effectif de 30 couples mère-enfant par groupe permet d'estimer dans chaque groupe la proportion de nouveau-nés prématurés ayant un score d'Apgar à 5 minutes < 7 avec une précision donnée par une largeur de l'intervalle de confiance à 95 % de cette proportion de ± 18 % dans le pire de cas (si cette proportion est de 50 %).

b) Critères relatifs à l'inclusion des sujets

Critères d'inclusion de la patiente:

-Patiente de plus de 18 ans,

-Patiente porteuse d'une grossesse simple ayant une indication à une césarienne sous AG en contexte de prématurité (< 37SA),

-Patiente informée et ayant signé un consentement écrit pour sa participation à cette recherche,

-Affiliation à un régime de sécurité sociale.

Critères d'inclusion de l'enfant:

Parents informés et non-opposition signée par le père et la mère pour la participation de l'enfant à cette recherche (sauf si un des parents ne possède pas ou plus l'autorité parentale).

Critères de non-inclusion de la patiente:

-Accouchement par voie basse,

-Pathologie maternelle nécessitant l'utilisation d'un morphinique à l'induction,

-Pré-éclampsie sévère,

-Délai de plus de 14 semaines entre l'information et l'inclusion,

-Patiente sous tutelle ou curatelle,

-Contre-indication(s) au rémifentanil.

Critères de non-inclusion de l'enfant:

-Pathologie fœtale diagnostiquée dans la période prénatale mettant en jeu le pronostic vital de l'enfant.

Pour des raisons de maintien d'aveugle obligatoire jusqu'à la fin du suivi des enfants, 2 ans après la dernière inclusion, les 2 groupes seront nommés « bras A » et « bras B » dans ce rapport, sans possibilité de connaître la nature des traitements reçus dans ces 2 bras, remifentanil ou placebo.

4. Différentes phases du projet:

Le calendrier de l'étude REAGI peut se partager en 3 séquences distinctes (Figure 13) : la période d'inclusion, la période de suivi, et enfin l'analyse des résultats. La période d'inclusion s'est donc étalée du 02/02/2014 au 02/08/2016. Par conséquent, la levée d'aveugle et l'analyse statistique définitive sera réalisée après le dernier rendez vous de suivi pédiatrique, programmé autour du 02/08/2018.

Au moment de la rédaction de cette thèse, la période d'inclusion était donc achevée, et la période de suivi en cours. Sur cette période d'inclusion, 55 patientes ont été incluses et randomisées (sur 60 prévues initialement), et 3 sont sorties prématurément de l'étude : un retrait de consentement, une curatelle ignorée lors de la randomisation, et une patiente s'étant améliorée après inclusion, et donc ne nécessitant plus d'être césarisée. Nous avons donc finalement pu inclure 27 patientes sur 30 prévues dans le bras A et 25 patientes sur 30 prévues dans le bras B. Comme convenu dans le protocole, les patientes vues en consultation d'anesthésie au cours du 3^{ème} trimestre de grossesse sur cette période d'inclusion de 30 mois, ont bien reçu l'information de cette étude.



Figure 13 : Déroulement de l'étude REAGI.

Cette information et ces inclusions ont été réalisées par les anesthésistes réanimateurs du service de gynécologie obstétrique (les docteurs Marie Laure Thibault, Delphine Provost, Michel Rieu, Romain Gillet et Fabien Tourrel, investigateur principal), ainsi que par certains anesthésistes réanimateurs effectuant des gardes en gynécologie obstétrique, sous le contrôle de l'investigateur principal. Comme prévu, les randomisations ont été effectuées par les infirmiers de salle de réveil post-interventionnelle du bloc de gynécologie obstétrique, ce qui a garanti le maintien du double aveugle au cours de la procédure. Le recueil des données per-opératoires et post-opératoires immédiates a été réalisé par les médecins anesthésistes en charge des patientes pendant la procédure (pour les données maternelles) ainsi que par les pédiatres en charge de la réanimation néonatale (pour les données néonatales) (Tableaux 9-13).

Suite à la période périnatale immédiate, un suivi de 2 ans est donc prévu chez les enfants inclus, avec un examen pédiatrique centré sur le développement de l'enfant, à 1 an et 2 ans de vie (Tableau 14).

Sur 30 rendez-vous à 1 an initialement théoriquement possibles au moment de la rédaction de cette thèse, 21 ont eu lieu, et 9 n'ont pu être réalisés : 5 enfants décédés avant 1 an, et 4 perdus de vue. Pour les rendez-vous à 2 ans, sur 11 théoriquement possibles, 7 ont eu lieu, et 4 n'ont pu être réalisés : 2 enfants décédés, et 2 perdus de vue.

5. Résultats obtenus

La levée d'aveugle n'étant effective que dans 2 ans, une analyse intermédiaire des résultats obtenus lors de la césarienne (en per- et post-opératoire immédiat) a été réalisée par Estelle Houivet (unité de biostatistique du CHU de Rouen), en maintenant l'aveugle. Ainsi, 2 bras sont individualisés, sans que l'on puisse savoir quelle était la nature du traitement reçu dans chacun de ces bras. Ces résultats n'ont pas été soumis à des tests statistiques, l'étude n'étant pas encore arrivée à son terme. Il s'agit donc d'une présentation purement descriptive des résultats obtenus.

Les données maternelles recueillies (Tableau 9) semblent indiquer que la randomisation a bien joué son rôle : même si aucune analyse statistique n'est réalisée, il
semble bien que les bras A et B sont constitués de couples mère/enfant comparables, notamment sur le sexe-ratio. Cette impression sera à confirmer après la levée d'aveugle.

	Population Totale (n = 52)		Bras A (n = 27)		Bras B (n = 25)		
Age mère (années)							
Médiane (min ; max)	30,0 (18	,1 ; 44,1)	29,6 (19	29,6 (19,3 ; 44,1)		31,2 (18,1 ; 39,6)	
Moyenne (EC)	30,7	(5,8)	30,5	(6,0)	30,9	30,9 (5,8)	
Taille mère (cm)							
Médiane (min ; max)	162,5 (1	50 ; 183)	165 (150 ; 183)		161 (150 ; 178)		
Moyenne (EC)	163,2	2 (7,4)	163,	9 (7,4)	162,4	l (7,5)	
Poids mère (kg)							
Médiane (min ; max)	70 (42	2;122)	70 (42	2 ; 122)	70 (50	70 (50 ; 118)	
Moyenne (EC)	74,5	(18,8)	74,4	(18,3)	74,6	(19,6)	
IMC mère							
Médiane (min ; max)	26,5 (17,0 ; 49,1)		25,7 (17,0 ; 43,1)		27,4 (20,3 ; 49,1)		
Moyenne (EC)	28,0 (6,9)		27,7 (6,8)		28,2 (7,1)		
Parité	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%	
1	18	34,6	7	26,9	11	44,0	
2	10	19,2	7	26,9	3	12,0	
3	9	17,4	5	19,2	3	12,0	
4	6	11,5	5	19,2	1	4,0	
5	7	13,5	1	3,8	6	24,0	
6	2	3,8	1	3,8	1	4,0	
Indication de la césarienne	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%	
RCIU	4	7,7	3	11,1	1	4,0	
Troubles du rythme	9	17,3	5	18,5	4	16,0	
Hémorragie	2	3,8	1	3,7	1	4,0	
HRP	9	17,3	4	14,8	5	20,0	
Placenta prævia	12	23,1	6	22,2	6	24,0	
Autres	16	30,8	8	29,6	8	32,0	

Tableau 9 : Caractéristiques cliniques de la population maternelle étudiée.

Démographie Enfant	Population Totale (n = 52)		Bras A (n = 27)		Bras B (n = 25)		
Terme (semaines)							
Médiane (min ; max)	31,5 (24	,0 ; 36,0)	32 (26 ; 36)		31 (24 ; 36)		
Moyenne (EC)	31,3 (3,7)		31,5	31,5 (3,5)		31,2 (3,9)	
Terme en classe (semaines)	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%	
[24 – 28]	15	28,8	9	33,3	6	24,0	
]28 – 32]	13	25,0	5	18,5	8	32,0	
]32 – 36])	24	46,2	13	48,1	11	44,0	
Sexe	30	57,7				=	
Garçon			15 (55,6%)		15 (60%)		
Fille	22	42,3	12(44,4%)		10 (40%)		
Poids (gr)							
Médiane (min ; max)	1535 (60	00 ; 3230)	1440 (70	1440 (700 ; 3230)		0 ; 3170)	
Moyenne (EC)	1738,0 (777,6)		1761,5 (757,7)		1712,6 (813,5)		

Tableau 10 : Caractéristiques démographiques des nouveaux nés étudiés.

RESULTATS : Protocole de recherche biomédicale REAGI

Examen Enfant (1/3)	Population Totale (n = 52)		Bras A (n = 27)		Bras B (n = 25)	
Détresse respiratoire	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%
Non	8	15,4	6	22,2	2	8,0
Oui	44	84,6	21	77,8	23	92,0
Si détresse respiratoire, rigidité thoracique	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%
Non	34	77,3	15	71,4	19	82,6
Oui	10	22,7	6	28,6	4	17,4
Si détresse respiratoire, ventilation au masque	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%
Non	1	2,3	0	0,0	1	4,3
Oui	43	97,7	21	100,0	22	95,7
Si ventilation au masque, durée de la ventilation manuelle (sec)	n = 43		n = 21		n = 22	
Médiane (min ; max)	300 (6 ; 900)		300 (6 ; 900)		180 (9 ; 600)	
Moyenne (EC)	300,3 (242,6)		393,9 (273,8)		211,1 (170,9)	
Si ventilation au masque, pression d'insufflation (cmH2O)	n = 43		n = 21		n = 22	
Médiane (min ; max)	20 (0 ; 30)		20 (18	; 30)	20 (0	; 25)
Moyenne (EC)	20,2	(4,9)	21,3 (3,6)		19,0 (5,8)	
Si détresse respiratoire, intubation	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%
Non	28	63,6	14	66,7	14	60,9
Oui	16	36,4	7	33,3	9	39,1
Si intubation, durée d'intubation naso trachéale (heures)	n = 16		n = 7		n = 9	
Médiane (min ; max)	18 (1 ; 85)		24 (2 ; 85)		16 (1 ; 48)	
Moyenne (EC)	22,6 (22,1)		29,3 (29,5)		17,4 (14,1)	
Si intubation, surfactant	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%
Non	5	31,3	2	28,6	3	33,3
Oui	11	68,8	5	71,4	6	66,7

Tableau 11 : Evènements indésirables respiratoires néonataux.

RESULTATS : Protocole de recherche biomédicale REAGI

Examen Enfant (2/3)	Population Totale (n = 52)		Bras A (n = 27)		Bras B (n = 25)		
pH au cordon	n=	= 46	n = 25		n = 21		
Médiane (min ; max)	7,27 (6,	68 ; 7,40)	7,27 (6,6	8 ; 7 <i>,</i> 35)	7,26 (6,9	7,26 (6,91 ; 7,40)	
Moyenne (EC)	7,22	(0,15)	7,22 (0,17)		7,23 (0,11)		
Lactate au cordon	n =	= 46	n = 25		n = 21		
Médiane (min ; max)	2,45 (0,	90 ; 21,0)	2,50 (0,9	0 ; 21,0)	2,0 (1,3	0;14,8)	
Moyenne (EC)	4,55	(4,83)	4,54 (5,26)	4,57 (4,38)	
Score d'apgar à 1 min	n=	= 52	n =	27	n =	25	
Médiane (min ; max)	4,50	(0 ; 10)	5 (0 ;	; 10)	4 (0	; 9)	
Moyenne (EC)	4,94 (3,12)		5,15 (3,21)		4,72 (3,08)		
Score d'apgar à 1 min	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%	
< 7	31	59,6	16	59,3	15	60,0	
≥ 7	21	40,4	11	40,7	10	40,0	
Score d'apgar à 5 min	n = 52		n = 27		n =	25	
Médiane (min ; max)	8 (0 ; 10)		8 (2 ; 10)		8 (0	; 10)	
Moyenne (EC)	6,94 (2,55)		7,37 (2,17)		6,48 (2,89)		
Score d'apgar à 5 min	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%	
< 7	20	38,5	9	33,3	11	44,0	
≥ 7	32	61,5	18	66,7	14	56,0	
Score d'apgar à 10 min	n = 52		n = 27		n = 25		
Médiane (min ; max)	9 (0 ; 10)		10 (5 ; 10)		9 (0 ; 10)		
Moyenne (EC)	8,65 (1,82)		8,89 (1,45)		8,40 (2,16)		
Score d'apgar à 10 min	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%	
< 7	4	7,7	2	7,4	2	8,0	
≥ 7	48	92,3	25	92,6	23	92,0	

Tableau 12 : Evaluation néonatale initiale.

Examen Enfant (3/3)	Population Totale (n = 52)		Bras A (n = 27)		Bras B (n = 25)	
Bradycardie	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%
Non	33	63,5	18	66,7	15	60,0
Oui	19	36,5	9	33,3	10	40,0
Massage cardiaque externe (MCE)	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%
Non	48	92,3	27	100,0	21	84,0
Oui	4	7,7	0	0,0	4	16,0
Administration de Naloxone	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%
Non	52	100,0	27	100,0	25	100,0
Oui	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Réanimation hémodynamique	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%
Non	34	65,4	18	66,7	16	64,0
Oui	18	34,6	9	33,3	9	36,0
Si oui, durée de la réanimation (min)	n=	= 18	n =	9	n =	= 9
Médiane (min ; max)	10 (2	1 ; 24)	10 (1	; 15)	9 (6	; 24)
Moyenne (EC)	9,39 (4,72)		8,78 (3,90)		10,00 (5,59)	
Administration d'adrénaline	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%
Non	50	96,2	27	100,0	23	92,0
Oui	2	3,8	0	0,0	2	8,0

Tableau 13 : Evènements indésirables hémodynamiques néonataux.

Sur le critère principal de l'étude, il ne semble pas qu'il y ait de différence entre les 2 groupes concernant le pourcentage d'enfants ayant un score d'Apgar <7 à 5 minutes de vie. Les données recueillies chez l'enfant permettront possiblement de constater des différences dès la naissance, sur les paramètres ventilatoires notamment. Par ailleurs, les bras A et B semblent différer sur certains critères secondaires, tels que la fréquence de survenue d'une détresse respiratoire ou bien encore la durée moyenne de ventilation au masque (Tableau 11).

L'analyse complète et définitive de l'ensemble des données recueillies au cours de l'étude REAGI sera réalisée après levée d'aveugle, et permettra de répondre aux questions initialement posées.

6. Perspectives cliniques

Dans les 2 années à venir, le suivi des enfants issus des césariennes va donc être poursuivi (Tableau 14-15). Une fois l'analyse des résultats effectuée, il est probable qu'il faille envisager une étude à plus grande échelle (multicentrique) afin de confirmer les conclusions qui seront issues du premier travail constitué par l'étude REAGI.

Par ailleurs, d'autres études sont à mener dans un contexte néonatal, mais dans d'autres situations cliniques : utilisation du rémifentanil lors de protocoles de sédation en réanimation néonatale, afin d'aider la tolérance d'une ventilation mécanique, par exemple, ou bien d'encadrer certains gestes de réanimation invasifs (poses de cathéters, intubations...).

	Suivi à 1 an	Suivi à 2 ans					
	Examen pédiatri	ique - Croissance					
Poid	s – Taille – IMC – Périmètre crânien – Taille du père	Poids – Taille – IMC – Périmètre crânien					
	Examen pédiatrique – Appareil Neurosensoriel						
Scor	e Moteur	Score Moteur					
1.	Se met assis seul, assis bien stable. Quatre pattes, se met debout, marche tenu. Anticipe l'orientation de la prise, met la main en bonne position pour attraper une règle (présentée de face, verticale puis horizontale à proximité de la main).	 Court, monte les escaliers, saute sur les 2 pieds. Chutes protégées quand il court. Commence à gribouiller de lui-même ou sur invitation. Empile 2 cubes au moins. Marche après 18 mois. Chutes non protégées. 					
2.	Mis assis : tient bien, ébauche la position « petit lapin ». Petit retard des acquisitions mais pas d'anomalie du tonus à l'examen. Avance la main de façon stéréotypée vers l'objet avant de l'attraper Se retourne, rampe Mis assis : tient un moment	 Approche directe de l'objet. Saisit des miettes. 3. Marche anormale ou marche assistée (diplégie). Se sert très préférentiellement d'une main. Approche de l'objet très approximative. Pas de préhension fine 					
4.	avec cyphose de l'axe. Hypertonie distale des membres inférieurs. Déficit unilatéral. Préhension cubito-palmaire des objets. NSP	4. NSP					
	-	Age de la marche					
Para	lysie Cerebrale : Oui/Non	Paralysie Cerebrale : Oui/Non					
Trait	ement anti-épileptique : Oui/Non	Traitement anti-épileptique : Oui/Non					
Imag	gerie Cerebrale Neonatale : Oui/Non	Imagerie Cerebrale (entre 1 et 2 ans) : Oui/Non					
Hydi	rocepalie : Oui/Non	-					
Scor 1. 2. 3. 4. 5.	e Cognitif Pince pouce – index. Explore attentivement les objets et porte peu à la bouche. Commence à mettre un objet dans une boîte. Comprend les ordres simples, dit 2-3 mots, comprend l'interdiction. Recherche du jouet caché ostensiblement sous un tissu. Activités exploratrices moins élaborées, porte beaucoup à la bouche. Vide les boîtes et jette. Dévisage l'étranger, double les monosyllabes. Pointe du doigt, fait bravo et au revoir. Signe du manteau (anticipation des situations). Bon contact visuel mais explorations non fonctionnelles. Babillage modéré sans disyllabe. Devant un objet à distance, ne fait que le regarder. Mauvais contact. Manipulations stéréotypées ou absence de manipulations. Né répond pas aux propositions de la mère. NSP	 Score Cognitif Encastre avec réflexion et application (puzzle). Veut s'habiller seul. Sait faire semblant de téléphoner (avec ou sans téléphone). Nomme une image, assemble 2 mots. Jeu d'identification à sa poupée ou sa peluche. Cherche à partager l'attention et à échanger. Désigne l'objet ou l'animal sur image sans les nommer. Désigne les parties de son corps. Attention plus labile, se lasse assez vite. Encastrements aléatoires. Pas de jeu d'identification. Utilise des mots isolés, accepte de les répéter. Aucune préférence vis-à-vis d'un objet ou d'une activité. Ne fait que déménager, vide et jette, ne remet pas dans la boîte. Charabia sans mots compréhensibles. Ne sait pas exprimer son désir par le geste ou l'attitude. Activités très stéréotypées. Ne pointe pas du doigt, ne suit pas le regard. Production de sons stéréotypés. Auto ou hétéro agressif. 					
Scor	e Visuel	Score Visuel					
1.	Poursuite visuelle sur 180° avec parallélisme des globes occulaires. Troubles modérés de l'acculemetrisité mais barres	 Poursuite visuelle sur 180° avec parallélisme des globes occulaires. Strabisme avec bonne fication de chaque cuil et 					
2. 3.	poursuite. Nystagmus, plafonnement du regard, strabisme,	 Strabisme avec bonne fication de chaque œll et bonne poursuite. Myopie. Strabisme avec mauvaise fixation de l'œil, poursuite 					
4.	poursuite imparfaite. Pas de poursuite et/ou fixation imparfaite. NSP	perturbée. 4. Plafonnement du regard, pas de poursuite. 5. NSP					
Exan	nen par un ophtalmologiste : Qui/Non	Examen par un ophtalmologiste : Qui/Non					

Tableau 14 : Critères d'évaluation du développement de l'enfant à 1 et 2 ans (1/2).

	Suivi à 1 an	Suivi à 2 ans			
	Examen pédiatrique – App	areil Neurosensoriel (Suite)			
Scor	e Auditif	Score Auditif			
1.	Réponses adaptées à la voix et au bruit.	1. Réponses adaptées à la voix et au bruit.			
2.	Réponses d'orientation douteuse.	2. Réponses d'orientation douteuses.			
3.	Absence de réponse	3. Absence de réponse			
4.	NSP	4. NSP			
Dép	istage de la surdité la 1 ^{ère} année : Oui/Non	Examen par un ORL entre 1 an et 2 ans : Oui/Non			
	-	Aérateurs transtympaniques entre 1 an et 2 ans : Qui/Non			
	-	Adénoïdectomie entre 1 an et 2 ans : Oui/Non			
	Examen pédiatriqu	e – Développement			
Scor	e Sommeil	Score Sommeil			
1.	Pas de problème.	1. Pas de problème.			
2.	Petites difficultés facilement résolues.	Petites difficultés facilement résolues.			
3.	Difficultés moyennes demandant une implication	3. Difficultés moyennes demandant une implication			
	particulière des parents pour gérer le problème.	particulière des parents pour gérer le problème.			
4.	Difficultés importantes : préoccupation quotidienne	4. Difficultés importantes : préoccupation quotidienne			
	à la limite du tolérable pour les parents	à la limiote du tolérable pour les parents			
5.	NSP	5. NSP			
Scor	e Alimentation	Score Alimentation			
1.	Pas de problème.	1. Pas de problème.			
2.	Petites difficultés facilement résolues.	Petites difficultés facilement résolues.			
3.	Difficultés moyennes demandant une implication	3. Difficultés moyennes demandant une implication			
	particulière des parents pour gérer le problème.	particulière des parents pour gérer le problème.			
4.	Difficultés importantes : préoccupation quotidienne	4. Difficultés importantes : préoccupation quotidienne			
	à la limite du tolérable pour les parents.	à la limite du tolérable pour les parents.			
5.	NSP	5. NSP			
Alla	itement maternel : Oui/Non	-			
Refl	ux gastro-oesophagien la 1 ^{ere} année : Oui/Non	-			
Scor	e Psychosocial	Score Psychosocial			
1.	Pas de problème.	1. Pas de problème.			
2.	Enfant exigeant, se calmant facilement.	2. Enfant exigeant, se calmant facilement.			
3.	Enfant passif ou remuant, demandant une	3. Enfant passif ou remuant, demandant un			
	intervention de l'entourage.	intervention de l'entourage.			
4.	Enfant agite, difficilement consolable ou	4. Enfant agite, difficilement consolable ou			
_	extremement passif.	extremement passif.			
5.	NSP Examon nódia	5. NSP			
Non	Examen pedia	Nombro d'anfants vivant au fovor			
Gar	de à temps complet : parents, assistante sociale	Carde à temps complet : parents, accistante sociale			
Ban	nonnière autre	poupopnière autre			
Mod	la da garda : collectiva, non collectiva, putra	Mode de garde : collective, non collective, putre			
Nive	au d'études de la mère : école primaire, secondaire	wode de garde : conective, non conective, autre			
nive	au hac enseignement sunérieur NSP	-			
Mèr	e maîtrise mal le français : Qui/Non	_			
Nive	e mattrise marie nançais . Our won	-			
nivo	au hac enseignement sunérieur NSD	-			
Dòre	au buc, chiseignement superieur, NSF				
rere	inani ise marie mançais . Oul/ NON	•			

Tableau 15 : Critères d'évaluation du développement de l'enfant à 1 et 2 ans (2/2).

L'impact de l'utilisation d'agents anesthésiques au cours du développement cérébral est un sujet qui reste d'actualité (Andropoulos and Greene, 2017). Dans un premier temps, des questions générales ont été soulevées par des études de suivi de cohortes, retrouvant un impact globalement négatif de l'anesthésie sur le neurodéveloppement (Wilder et al., 2009). Les biais liés à la méthodologie de ces études rétrospectives non contrôlées ne permettaient pas de conclure réellement. Un des facteurs confondants est lié à l'utilisation d'un terme générique regroupant l'exposition à une AG. Or, diverses molécules, aux effets biologiques distincts peuvent être utilisées afin d'obtenir narcose et analgésie : antagonistes NMDA, agonistes GABA_A, opioïdes, ... Chez le rongeur immature, il a été montré que les associations de substances anesthésiques peuvent entraîner une neuroapoptose plus importante par comparaison à chacune des drogues administrées seules. C'est le cas de l'association du midazolam avec de l'isoflurane et du protoxyde d'azote (Jevtovic-Todorovic et al., 2003), de la kétamine à du midazolam (Young et al., 2005) ou du midazolam à l'isoflurane et du protoxyde d'azote (Sanchez et al., 2011). Il apparaît donc indispensable d'évaluer indépendamment les effets de différentes classes de molécules utilisées au cours des AG. En effet, le recours à l'AG étant dans la plupart des situations une nécessité, la question qui se pose est de réussir à déterminer l'association médicamenteuse la plus sûre pour le cerveau des enfants exposés à ces drogues anesthésiques. C'est en ce sens que les différents travaux menés au cours de cette thèse ont été entrepris. Nous avons évalué expérimentalement les effets du morphinique rémifentanil, qui est l'un des agents d'anesthésie de plus en plus utilisé dans le contexte périnatal, sur le cerveau en développement. (Avino et al., 2014; Badiee et al., 2013; Giannantonio et al., 2009; Shin et al., 2014; Welzing et al., 2009)

Effet anti-apoptotique du rémifentanil sur le cortex immature de Souris : étude expérimentale *ex vivo*.

Jusqu'à présent, il n'existait pas de données expérimentales sur les effets du rémifentanil sur le cerveau en développement. Les seules données existantes portaient sur les conséquences cliniques à court terme d'une exposition au rémifentanil (Draisci et al., 2008; Ngan Kee et al., 2006; Yoo et al., 2009). L'utilisation d'un modèle de tranches organotypiques issues de cerveaux de souris P2 a permis d'étudier l'impact d'une exposition au rémifentanil, 131

connu pour interagir avec le R-NMDA (Gu et al., 2009; Guntz et al., 2005; Hahnenkamp et al., 2004; Zhao and Joo, 2008). Le R-NMDA joue un rôle central dans le développement de lésion excitotoxique (Hilton et al., 2006; Mishra et al., 2001), ce qui laissait envisager une potentielle modulation des mécanismes excitotoxiques lors d'une exposition au rémifentanil. Ce modèle *ex vivo* permet de simuler un environnement d'agression aiguë du tissu cérébral : cela est mis en évidence par l'augmentation significative de la nécrose et de l'apoptose cellulaires après 5 heures d'incubation des tranches dans le milieu de survie seul. Ce travail expérimental *ex vivo* nous a permis de mettre en évidence un effet anti-apoptotique du rémifentanil au sein du cortex en développement.

Dans ce premier travail expérimental, nous avons essayé d'envisager les différentes voies impliquées dans l'effet anti-apoptotique constaté lors de l'exposition au rémifentanil. En se basant sur ce qui avait déjà été démontré sur les mécanismes impliqués dans l'hyperalgésie induite par les morphiniques et impliquant le R-NMDA (Joly et al., 2005; Zhao and Joo, 2008), nous avons pu montrer que l'effet anti-apoptotique du rémifentanil est annulé par la co-administration de naloxone, antagoniste des récepteurs opioïdes, ou de MK801, antagoniste du R-NMDA. Ces résultats suggèrent une implication des récepteurs opioïdes et des R-NMDA dans l'effet anti-apoptotique du rémifentanil. La diminution de l'expression du facteur pro-apoptotique Bax et de la caspase-3 clivée a été mise en évidence par western blot dans les extraits corticaux issus de tranches organotypiques incubées en présence de rémifentanil. La protéine Bax est une protéine pro-apoptotique spécifique de la voie mitochondriale (Inoue et al., 2009). Cette protéine intervient au niveau de la membrane mitochondriale après sa déphosphorylation. Elle participe à la formation de pores membranaires qui permettent la libération du cytochrome C et la formation de l'apoptosome. Nous avons également montré que le rémifentanil permettait de préserver l'intégrité mitochondriale. L'ensemble de ces données suggère que le rémifentanil inhibe la voie intrinsèque mitochondriale de l'apoptose. Il avait précédemment été démontré que le NMDA avait une action anti-apoptotique forte au niveau des couches superficielles immatures du cortex (couches II à IV) associée à une action pro-nécrotique au niveau des couches profondes (couches V-VI), où se situent les neurones matures (Desfeux et al., 2010). Le R-NMDA étant impliqué dans l'effet anti-apoptotique du rémifentanil, il est surprenant de ne pas avoir

constaté d'augmentation de la mort nécrotique au niveau des couches profondes sous rémifentanil. Cela est probablement lié au fait que le rémifentanil n'agit pas sur le R-NMDA comme un simple activateur, mais qu'il module plutôt son activité. On peut également supposer que le degré d'interaction entre récepteurs μ et R-NMDA soit différent selon la maturité corticale. En effet, il a été montré une répartition corticale différente des sous-unités GluN2A et GluN2B qui composent le R-NMDA chez la souris nouveau-née. Ainsi, la sous-unité GluN2A est surtout présente dans les couches superficielles alors GluN2B est exprimée dans toutes les couches du néocortex (Lecointre et al., 2015; Liu et al., 2004). Par ailleurs, la composition GluN2A/GluN2B influence la cinétique d'activation du R-NMDA (Vicini et al., 1998) et conditionne sa localisation cellulaire par rapport à la synapse (Köhr, 2006).

Une modulation de l'activité du R-NMDA suite à une stimulation prolongée du récepteur μ , *via* des protéines kinases dont la PKC, avait été montrée dans le cadre d'études sur l'hyperalgésie (Simonnet and Rivat, 2003). Il avait également été montré qu'une perfusion prolongée de rémifentanil augmente le taux de phosphorylation de la sous-unité GluN2B du R-NMDA, au niveau de la tyrosine 1472 (Gu et al., 2009). L'expression de la sous-unité GluN2B est présente en période anténatale et augmente après la naissance, avec une localisation corticale prédominante (Paoletti, 2011). Nous avons donc émis l'hypothèse que cette phosphorylation de la sous-unité GluN2B pouvait être responsable des effets observés au niveau du cortex immature sous rémifentanil. Dans des études complémentaires, nous avons observé par western blot, une augmentation significative des taux corticaux de GluN2B phosphorylé en position 1472 après incubation de tranches organotypiques en présence de rémifentanil 50 μ M (Figure 14 ; données L. Abily-Donval et C. Chollat).





Après une incubation de 5 heures en présence de C.P. rémifentanil (50 μM), une augmentation du taux de phosphorylation de GluN2B dans le cortex P2 est observée (*p<0.05, unpaired t-test). C.P. remi : forme commerciale du rémifentanil. (n) : nombre de cerveaux par groupe expérimental.

Il a été décrit précédemment au niveau hippocampique que le PMA (phorbol 12myristate 13-acétate), activateur de la PKC, induit une augmentation de la tyrosinephosphorylation du GluN2B (Grosshans and Browning, 2001) et l'activation du R-NMDA (Xiong et al., 1998). La PKC étant potentiellement impliquée dans la phosphorylation induite par le rémifentanil, les taux de PTyr1472GluN2B ont été quantifiés en présence de rémifentanil et de chelerythrine 10 µM, inhibiteur spécifique de la PKC. En présence de chelerythrine, le rémifentanil n'est plus capable d'augmenter la phosphorylation de GluN2B (données C. Chollat). Parallèlement, des études complémentaires nous ont permis d'observer que l'effet inhibiteur du rémifentanil sur l'activité caspase-3 clivée est bloqué en présence d'un inhibiteur GluN2B (ifenprodil 10 μM) ou de chelerythrine (10 μM) (Figure 15). De la même manière, l'effet anti-apoptotique du rémifentanil mis en évidence par immunohistochimie dans les couches II-IV n'est plus observé en présence des inhibiteurs (Figure 15). Dans notre modèle, on peut faire l'hypothèse que le rémifentanil en activant les récepteurs µ stimule, via l'action de la PKC, la phosphorylation de GluN2B en position 1472 connue pour augmenter l'activité du R-NMDA (Xiong et al., 1998). Cette cascade d'évènements pourrait ainsi initier l'action anti-apoptotique du rémifentanil. L'activation de la sous-unité GluN2B semble donc protectrice dans notre modèle. Dans la littérature, le rôle de GluN2B sur la survie cellulaire reste controversé. Si pour Liu et collaborateurs (Liu et al., 2007), GluN2B est impliquée dans la mort cellulaire induite par le NMDA, l'équipe de Hardingham a démontré dans un modèle de neurones hippocampiques en développement que GluN2B peut transmettre un signal de survie ou de mort cellulaire selon l'intensité et la fréquence du stimulus reçu (Martel et al., 2009).



Figure 15 : Effets de l'ifenprodil (10 μM) et de la chelerythrine (10 μM) seuls ou associés avec le C.P. rémifentanil (50 μM) sur les morts apoptotique et nécrotique au sein du cortex de souris P2.
(A) Visualisation de l'immunomarquage caspase-3 clivée au sein du cortex (couches II-IV) après incubation pendant 5 heures en condition contrôle (aCSF) ou avec le rémifentanil seul ou associé avec les inhibiteurs. (B) Effet du C.P. rémifentanil seul ou incubé en présence des inhibiteurs sur l'activité caspase-3 clivée et l'activité lactate deshydrogénase (LDH). C.P. remi : forme commerciale du rémifentanil. L'ifenprodil et la chelerythrine réversent l'action anti-apoptotique du rémifentanil (**p<0.01). Il est à noter que les inhibiteurs n'exercent pas d'effet propre sur les activités caspase-3 clivée et LDH. (n) : nombre de cerveaux par groupe expérimental.

La forme commercialisée du rémifentanil (Ultiva[®]) est associée à une forte quantité de glycine, co-agoniste du R-NMDA. Nous avons donc étudié les effets du rémifentanil et de la glycine, indépendemment. Nos données montrent que le rémifentanil et la glycine agissent en synergie pour inhiber la mort apoptotique, et que cet effet est encore majoré en présence de NMDA, y compris à des doses relativement faible. Il est donc plus pertinent d'étudier les

effets de l'association glycine/rémifentanil telle qu'elle est utilisée et administrée en clinique humaine. En effet, lors de l'utilisation de la préparation commerciale de rémifentanil, les taux circulants de glycine augmentent significativement (Bonnet et al., 2007).

L'ensemble des études menées au cours de ce premier travail expérimental, sur le modèle *ex vivo* de tranches organotypiques de cerveau immature, montre un effet anti-apoptotique significatif du rémifentanil. Cet effet semble passer par l'inhibition de la voie intrinsèque mitochondriale de l'apoptose.

Cependant, après ce travail *ex vivo*, il n'est pas possible de conclure à un effet globalement bénéfique ou négatif de cet effet anti-apoptotique dans des conditions *in vivo* : l'apoptose étant un phénomène physiologique au cours du développement cérébral normal (Kuida et al., 1996), il est difficile d'envisager les conséquences globales de son inhibition au cours du développement cérébral. Par ailleurs, même si ce modèle expérimental présente certains avantages, il reste éloigné d'un modèle expérimental *in vivo*.

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

Le rémifentanil est considéré comme le morphinique le plus adapté en anesthésie obstétricale, en cas de chirurgie fœtale intra-utérine mais également pour la sédation des nouveau-nés prématurés en réanimation néonatale (Marsh and Hodkinson, 2009; Penido et al., 2010). Les enfants nés prématurément sont à haut risque d'agressions cérébrales hypoxo-ischémiques et excitotoxiques (Larroque et al., 2008; Volpe, 2009). La potentialité neuroprotectrice du rémifentanil mise en évidence dans notre modèle expérimental *ex vivo* nous a incités à connaître son impact *in vivo* dans un modèle lésionnel. L'excitoxicité participe de façon majeure au développement des lésions cérébrales en période périnatale. Le modèle de lésion par injection intracorticale (ic) d'iboténate à P2 permet de mimer les lésions de la substance blanche et les lésions corticales observées chez certains grands prématurés au stade d'environ 24 SA (Marret et al., 1995a). Ces lésions peuvent être observées chez le nouveau-né prématuré lors d'un diagnostic de leucomalacie périventriculaire (LPV) (Marret et al., 1998; Volpe, 2009). Elles semblent être à l'origine de la majorité des séquelles

ultérieures de la grande prématurité (handicap moteur, retard intellectuel, troubles spécifiques du développement et anomalies sensorielles (Allen et al., 2011; Marlow et al., 2007; Mikkola et al., 2005).

Dans la première partie de notre étude, nous avons caractérisé la dose de rémifentanil administrée afin de reproduire chez le souriceau des conditions de sédation comparables à celles rencontrées en clinique humaine. La dose de 500 ng/g administrée en 3 injections permet d'obtenir une durée de sédation pendant au moins 15 min et une concentration plasmatique du morphinique de 10 nmol/L comparable aux taux plasmatiques décrits chez l'humain en pédiatrie (10 à 100 nmol/L (Ross et al., 2001)). Ces deux paramètres ont motivé le choix de cette dose pour la suite de notre étude chez l'animal. L'efficacité de sédation ne diffère pas entre les souriceaux mâles et femelles (données non présentées), ce qui laisse supposer que le métabolisme du rémifentanil est comparable entre les deux sexes. La dose efficace de rémifentanil injectée chez le souriceau P2 est beaucoup plus élevée que celle utilisée en clinique : sur 15 minutes, en clinique humaine, des doses avoisinant les 5 µg/kg sont administrées par voie intraveineuse, à mettre en regard des 500 µg/kg administrés par voie intra-péritonéale chez les souris nouveau-nées (Demirel et al., 2014). Cet écart peut s'expliquer par 2 facteurs majeurs : la voie d'administration n'étant pas la même, les propriétés pharmacocinétiques ne sont pas comparables. De plus, cet écart de posologie est couramment constaté dans les études expérimentales menées chez l'animal. Ainsi, 10 fois plus de kétamine et 30 fois plus de midazolam sont nécessaires pour induire une anesthésie chez le souriceau, en comparaison des doses administrées chez l'enfant (Lecointre et al., 2015; Young et al., 2005).

Les effets secondaires couramment observés en clinique suite à l'administration de rémifentanil sont l'hypotension, la bradycardie, la baisse du rythme respiratoire et l'apnée transitoire (Chanavaz et al., 2005). Certaines études prospectives ont décrit une fréquence plus élevée d'épisodes d'hypotension artérielle et de bradycardie chez les prématurés qui développent des lésions de leucomalacie (Marret et al., 1998). Les enfants nés prématurément, de part l'immaturité de leurs systèmes respiratoire et cardiovasculaire, sont exposés à un risque de déficit d'apport d'oxygène au cerveau (Ikonomidou and Kaindl, 2011). Leur réseau vasculaire est immature et ils présentent un déficit d'autorégulation du débit

137

sanguin cérébral (Boylan et al., 2000). Chez le souriceau P2, l'administration de rémifentanil provoque une baisse du rythme respiratoire ou une bradycardie comme il est observé couramment en clinique. Il n'a pas été possible d'évaluer la pression artérielle chez le souriceau. Toutefois, il est bien connu chez l'Homme que la baisse du rythme cardiaque par le rémifentanil est associée à une hypotension (Chanavaz et al., 2005). On peut raisonnablement supposer que la bradycardie induite chez le souriceau par le rémifentanil est associée.

L'hypercapnie permissive est proposée en clinique pour la prévention de la dysplasie bronchopulmonaire chez le prématuré (Masood et al., 2009). Des études menées chez le rongeur nouveau-né ont montré qu'une hypercapnie prolongée (60-70 mmHg) pouvait engendrer une mort cellulaire au niveau cérébral (Das et al., 2009), dont une dégénérescence vasculaire corticale (Honoré et al., 2010). Dans un modèle hypoxo-ischémique, il a été observé que les rats nouveau-nés soumis à une hypercapnie modérée (55 mmHg) n'ont pas plus de dommages cérébraux que les animaux en condition de normocapnie (38 mmHg) (Vannucci et al., 1995). En revanche, des conditions extrêmes d'hypercapnie (100 mmHg) ou d'hypocapnie (26 mmHg) exacerbent les lésions induites (Vannucci et al., 2001). Dans un récent essai multicentrique randominé mené sur une population de grands prématurés (23-28 SG), il n'a pas été observé de conséquences délétères de l'hypercapnie permissive en termes de mortalité, d'hémorragie ventriculaire ou de rétinopathie (Thome et al., 2015), ou de neurodéveloppement jusqu'à l'âge de 2 ans (Thome et al., 2017). Dans notre étude, bien que la pCO₂ chez les souriceaux traités avec le rémifentanil soit significativement plus élevée que chez les animaux contrôles (44.30 vs 32,55 mmHg), elle se situe entre les valeurs de normocapnie (38 mmHg) et d'hypercapnie modérée (55 mmHg) décrites dans l'étude expérimentale de Vanucci et collaborateurs (1995). On peut donc supposer que la légère augmentation de la pCO₂ observée sous rémifentanil n'a pas d'incidence en termes de lésion dans notre modèle.

Des études menées chez le rongeur adulte ont décrit précédemment un potentiel neuroprotecteur du rémifentanil suite à une ischémie cérébrale (Jeong et al., 2012; Park et al., 2011b). Bien qu'une baisse du rythme respiratoire et cardiaque soit considérée comme une composante délétère lors d'une naissance prématurée, nous montrons dans notre modèle

138

murin de LPV induit par injection d'Ibo que l'administration de rémifentanil a un effet neuroprotecteur en termes d'incidence sur la taille des lésions induites par l'excitotoxine.

Plusieurs études cliniques ont rapporté que le sexe mâle est associé à une augmentation du risque de la mortalité néonatale chez des enfants prématurés (Bacak et al., 2005), avec une prévalence plus importante des hémorragies et des infections chez les garçons (Kent et al., 2012). Il a également été décrit que les garçons sont plus à risque de développer des déficits moteurs sévères et des faibles scores de fonction cognitive à 6 ans (Marlow et al., 2005; Jarvis et al., 2005). Dans notre modèle, le taux de survie à 5 heures et 5 jours post-lésion dans le groupe Ibo/NaCl, et la taille des lésions induites par l'Ibo entre les deux sexes ne sont pas significativement différents. De plus, si le taux de survie du groupe Ibo/remi à 5 heures post-lésion est significativement plus important uniquement chez les mâles, l'effet bénéfique du rémifentanil sur la taille des lésions ne diffère pas entre les deux sexes.

Au cours d'une lésion cérébrale aiguë, il a été mis en évidence l'apparition d'un processus inflammatoire susceptible d'augmenter la taille des lésions par l'augmentation de la production de cytokines (IL-1 β et TNF- α principalement), de chemokines et de radicaux libres suite à l'activation microgliale et astrocytaire. Cette cascade d'événements va conduire à une mort cellulaire par apoptose ou nécrose (Degos et al., 2008; Higuchi, 2003; Kaindl et al., 2012; Tahraoui et al., 2001). Nous avons étudié l'action du rémifentanil sur certains éléments de cette cascade. L'injection ic d'Ibo provoque, dès 10 minutes, une augmentation de la production de radicaux libres dans l'hémisphère lésé. Cette augmentation est plus importante après 5 heures post-lésion. Dans ce sens, il a été montré que la production de radicaux libres potentialise les lésions induites par l'Ibo (Dommergues et al., 1998; Marret et al., 1999). Le traitement par le rémifentanil tend à diminuer la production de radicaux libres mesurée à 5 heures post-lésion.

Dans notre étude précédente, nous avons mis en évidence un effet anti-apoptotique du rémifentanil au sein du cortex P2 (Tourrel et al., 2014). Nous montrons, dans la présente étude, que l'administration de rémifentanil diminue l'activité caspase-3 induite par l'Ibo autour du site d'injection et mesurée dès 5 heures après la lésion. A 24 heures post-lésion, l'immunoréactivité caspase-3 clivée et la mort cellulaire induites par l'Ibo sont diminuées dans 139

l'hémisphère ipsilatéral des souriceaux lésés et traités avec le rémifentanil. L'ensemble de nos résultats démontre que, dans un contexte d'exitotoxicité en période périnatale, le rémifentanil exerce un effet neuroprotecteur. Son action est visible dès les premières heures après la lésion et implique une inhibition de la production des radicaux libres et de l'apoptose induites par l'injection d'Ibo.

Comme décrit dans la littérature, l'injection ic d'Ibo à P2 induit une astrogliose modérée et diffuse, révélée par le marquage dirigé contre le marqueur astrocytaire *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) (Marret et al., 1995a). Lors d'un épisode ischémique, les astrocytes peuvent s'activer en modifiant leur phénotype morphologique et fonctionnel, c'est l'astrogliose réactionnelle (Pekny and Nilsson, 2005). Ils participent alors à l'inflammation cérébrale en sécrétant des cytokines et des chemokines et produisant le NO (Dong and Benveniste, 2001). Il a été montré récemment que lors de l'astrogliose réactionnelle, l'induction des astrocytes de type A1 par les facteurs inflammatoires sécrétés par la microglie activée, promeut rapidement la mort des neurones et des oligodendrocytes (Liddelow et al., 2017). Dans notre étude, l'immunomarquage GFAP observé chez les animaux lésés et traités par le rémifentanil est diminué dans la région périventriculaire et la quantification protéique par western blot révèle une diminution de la GFAP dans le cortex ipsilatéral à la lésion. Ces données suggèrent que le rémifentanil diminue l'astrogliose réactionnelle induite par l'iboténate.

Dans notre présente étude, le(s) mécanisme(s) d'action qui sous-tend(ent) l'effet neuroprotecteur du rémifentanil n'ont pas été identifié(s). Toutefois, plusieurs données de la littérature nous permettent d'avancer quelques hypothèses. Lors d'une lésion cérébrale aiguë, il est décrit une réponse inflammatoire caractérisée par l'accumulation de cellules inflammatoires et de médiateurs pro-inflammatoires dans le cerveau lésé. L'infiltration de leucocytes, l'activation microgliale et astrocytaire cérébrale participent au processus inflammatoire (Degos et al., 2008). L'infiltration leucocytaire a lieu rapidement (entre 2 et 6 heures) après l'induction de la lésion et les polynucléaires neutrophiles sont les premiers présents (Hallenbeck, 1996). Après leur adhésion sur l'endothélium et diapédèse, les leucocytes s'infiltrent au regard de la lésion et libèrent des facteurs pro-inflammatoires. Plusieurs études expérimentales ont montré que l'inhibition de l'infiltration des neutrophiles

permettait une neuroprotection en diminuant la taille des lésions (Chopp et al., 1996; Yenari et al., 1998). Il a été décrit que le rémifentanil pouvait protéger d'une lésion induite par une ischémie-reperfusion au niveau cardiaque (Wong et al., 2010), hépatique (Liu et al., 2015) mais également au niveau cérébral (Jeong et al., 2012; Zhang et al., 2013). Chez le rat adulte ischémié, un préconditionnement avec le rémifentanil diminue l'expression cérébrale du TNF- α et de son récepteur de type 1 (TNFR1), la production de ROS, du cytochrome C et des caspases 3 et 9 (Zhang et al., 2013). De plus, des études *in vitro* ont montré que le rémifentanil est capable d'inhiber la migration des neutrophiles à travers les cellules endothéliales (Hofbauer et al., 2000) et de réduire la production de cytokines inflammatoires (TNF- α , l'IL-6 et l'IL-8) par les neutrophiles activés par le lipopolysaccharide (LPS) (Hyejin et al., 2013). Tous ces éléments de la littérature vont dans le sens d'un effet anti-inflammatoire du rémifentanil qu'il faudrait étudier dans notre modèle lésionnel.

Le rémifentanil présente des parentés structurales avec le fentanyl et ses dérivés, dont le sufentanil. De façon surprenante, il a été montré dans le même modèle excitotoxique à P5, que le fentanyl et le sufentanil avaient des effets différents sur les lésions induites par l'Ibo (Laudenbach et al., 2001). Tandis que le fentanyl exacerbe l'étendue de la lésion, le sufentanil n'a aucun effet. L'effet délétère du fentanyl est réversé par un antagoniste des récepteurs *opioid receptor-like 1* (ORL1) et non par la naloxone, antagoniste non sélectif des opïacés. Par ailleurs, une étude récente menée sur un modèle *in vitro* de neutrophiles humains activés par le LPS, a mesuré l'impact du fentanyl et de ses dérivés rémifentanil, sufentanil et alfentanil sur la production de cytokines inflammatoires (TNF- α , IL-6, IL-8). Seul le rémifentanil exerce un effet anti-inflammatoire et son action serait médiée par l'activation des récepteurs κ (Hyejin et al., 2013). Cette spécificité d'action du rémifentanil sur le processus inflammatoire pourrait expliquer la divergence d'effets des différents opioïdes dans un contexte lésionnel.

Dans la suite de notre étude, nous avons cherché à déterminer si l'effet neuroprotecteur du rémifentanil pouvait être visible au niveau fonctionnel chez le souriceau. Dans notre modèle lésionnel, l'injection à P2 de rémifentanil permet de contre-balancer les effets délétères de la lésion observés dans le test de géotaxie négative chez les mâles et les femelles, et dans le test d'agrippement en particulier chez les mâles. Les tests utilisés permettent d'évaluer l'activité motrice et le développement sensoriel du souriceau (Altman and Sudarshan, 1975). Il a été montré chez le rongeur qu'un retard des réflexes sensorimoteurs au cours du développement pouvait résulter d'une hypomyélinisation de la substance blanche sous-corticale (Wu et al., 2008). Or, 5 jours après l'injection d'iboténate, la taille de la lésion est diminuée chez les souriceaux traités par le rémifentanil. On peut supposer que le morphinique, en préservant la structure corticale et la substance blanche, préserve les afférences motrices et les centres intégrateurs des informations proprioceptives provenant des muscles et des articulations permettant le déclenchement du réflexe de retournement. De même, le lien entre le cortex sensorimoteur et les noyaux thalamiques qui intègrent les informations du système vestibulaire est préservé permettant ainsi la perception de la rotation et de l'orientation verticale. Dans le test d'agrippement, l'effet de la lésion n'est décelable qu'à P12 chez les femelles, sans toutefois atteindre la significativité. Ce résultat peut s'expliquer par un développement musculaire des membres supérieurs chez les femelles moins important que chez les mâles. Les performances d'agrippement chez les femelles sont donc moins bonnes que chez les mâles, ceci est particulièrement visible à P10 et P11. De ce fait, un effet protecteur du rémifentanil n'a pu être observé de manière significative dans ce test chez le groupe femelle. Le test d'Open Field à P18 ne met pas en évidence de déficit moteur chez les souriceaux lésés, traités ou non par le rémifentanil. On peut faire l'hypothèse d'une plasticité cérébrale très forte chez le rongeur, particulièrement pendant la période de synaptogenèse des trois premières semaines de vie post-natale (Jenkins and Merzenich, 1987) avec une compensation des déficits induits par la lésion, comme cela a été décrit chez des rongeurs avec une lésion des systèmes moteurs (Chu and Jones, 2000). Dans le test d'Open Field, la souris explore un nouvel environnement qui lui est inconnu. L'animal fait preuve de curiosité mais également d'un état anxieux en longeant les parois du dispositif, et qui peut être évalué par le temps passé au centre du dispositif dans les premières minutes du test. Les animaux femelles lésées et traitées par le rémifentanil passent plus de temps dans la zone centrale que les animaux lésés recevant du NaCl, suggérant un état anxieux moindre chez les animaux traités par le rémifentanil. Cet effet est visible chez les mâles uniquement pendant les deux premières minutes. L'effet anxiolytique du rémifentanil en condition lésionnelle est en accord avec plusieurs données de la littérature montrant l'implication des récepteurs aux opiacés dans la régulation des états émotionnels, dont l'anxiété (Lutz and Kieffer, 2013).

Dans le cadre d'une administration systémique du rémifentanil pour prévenir les lésions cérébrales du prématuré, il est essentiel de s'assurer que son administration est dépourvue d'effets propres. Administré chez les souriceaux P2, le rémifentanil n'a pas induit de modifications du poids corporel au cours de la croissance et n'a pas eu d'incidence dans les tests sensorimoteurs ni sur l'état d'anxiété des animaux dans l'*Open Field*. Il est à noter que dans la littérature, l'effet anxiolytique de certains morphiniques a été décrit le plus souvent dans un contexte de conditionnement à la peur (Bowers et al., 2012).

Nos données montrent que le rémifentanil, utilisé sous sa forme associée avec la glycine (Ultiva[®]), n'a pas d'effet propre sur certains paramètres du neurodéveloppement chez le souriceau. L'observation que l' Ultiva[®] soit neuroprotecteur en condition lésionnel conforte l'intérêt de l'utilisation de ce morphinique en clinique obstétricale et en réanimation néonatale.

Etude clinique REAGI.

L'étude REAGI comporte un biais principal, qui limitera forcément l'impact de ses conclusions futures. Le fait que l'étude soit monocentrique n'a pas permis un recrutement compatible avec une puissance élevée. Néanmoins, cette étude aura démontré la faisabilité d'un protocole randomisé en double aveugle dans le contexte de l'urgence obstétricale. L'intérêt de cette étude clinique réside également dans le fait qu'elle est la première à évaluer les enfants exposés au rémifentanil sur le plan du développement neurologique à moyen terme, avec une méthodologie permettant de s'affranchir de facteurs confondants existants dans les études de cohorte notamment. En effet, dans les études cliniques publiées jusqu'à présent, les critères de jugement portent sur les effets immédiats de l'administration de rémifentanil, désirés ou indésirables (niveau de sédation, conditions d'intubation, rigidité thoracique, hypotension, bradycardie...) (Gelberg et al., 2014)(de Kort et al., 2016). Dans notre étude, le critère de jugement principal utilisé (le pourcentage d'enfants ayant un score d'Apgar < 7 à 5 minutes de vie) permet d'avoir une évaluation pronostique initiale des enfants traités par rémifentanil par rapport aux enfants non traités par ce morphinique. En effet, un

2014). Les critères secondaires recueillis à 1 et 2 ans permettent classiquement d'évaluer le neurodéveloppement des enfants (Amiel-Tison and Stewart, 1989), et sont régulièrement utilisés dans des publications récentes en ce sens (Bernardo et al., 2015; Patra et al., 2016).

La levée d'aveugle ne survenant qu'après la période de suivi de 2 ans, il n'est pas possible d'interpréter les différences observées entre les 2 groupes retrouvées sur certains critères (notamment le pourcentage d'enfant ayant un score d'Apgar < 7 à 5 minutes). Cependant, il apparaît probable qu'une étude de plus grande envergure soit à envisager afin de gagner en puissance statistique. Il sera pour cela indispensable de passer par une étude multicentrique, compte tenu de la faible fréquence des césariennes effectuées sous AG par rapport aux césariennes réalisées sous anesthésie loco-régionale. Un autre champ d'investigation clinique du rémifentanil chez le nouveau-né est constitué par les protocoles de sédation utilisés en réanimation néonatale. De la même manière que pour les études s'intéressant à des utilisations plus ponctuelles (intubation, INSURE (procédure d'intubation de très courte durée permettant l'administration de surfactant)) ou plus indirectes (administration de rémifentanil chez la mère avant l'accouchement), les études portant sur la sédation des nouveau-nés par rémifentanil ne se sont jusqu'à présent intéressées qu'à l'efficacité immédiate du rémifentanil ainsi qu'à ses effets secondaires immédiats (hypotension, bradycardie...) (Dahaba et al., 2004; Giannantonio et al., 2009).

Il apparaît donc souhaitable d'envisager la mise au point d'études cliniques évaluant l'impact de tels protocoles de sédation, qui exposent les nouveau-nés à de hautes doses cumulées en rémifentanil, ainsi qu'à une durée d'exposition prolongée.

144

Dans leur ensemble, les travaux menés au cours de cette thèse ont permis d'aborder les effets du rémifentanil sur le cerveau en développement en suivant trois approches : un modèle animal ex vivo, un modèle animal in vivo, et enfin au cours d'une étude clinique humaine. L'expérimentation animale a permis de mettre en évidence un effet neuroprotecteur du rémifentanil en cas d'exposition excitotoxique. Les acteurs impliqués dans cette neuroprotection ont pu au moins en partie être mis en évidence : récepteur µ, R-NMDA et probablement phosphorylation de la sous-unité GluN2B, implicationd de la voie apoptotique mitochondriale. La limitation de la mort apoptotique mise en évidence ex vivo, et retrouvée lors des expérimentations in vivo s'est traduite par une protection de l'intégrité anatomique cérébrale, la taille des lésions induites par l'Ibo étant nettement réduites sous rémifentanil. Dans notre modèle lésionnel animal, cela s'est traduit par une préservation significative sur le plan fonctionnel. Parallèlement à ces résultats, l'étude clinique REAGI pourra conclure quand à l'innocuité à court terme concernant l'utilisation de rémifentanil en administration brève et unique en période périnatale. L'ensemble des premiers résultats est donc encourageant et incite à poursuivre la recherche expérimentale et clinique sur les effets du rémifentanil sur le cerveau en développement. D'une part, les mécanismes en jeu ne sont pas encore totalement élucidés, et nécessiteraient des investigations supplémentaires sur des modèles expérimentaux précliniques : clarification du rôle de la phosphorylation de GluN2B dans l'action anti-apoptotique du rémifentanil, recherche de l'impact du rémifentanil sur l'inflammation au niveau cérébral. D'autre part, en fonction des résultats de l'étude REAGI, il apparaît opportun de mettre au point des études cliniques s'intéressant à d'autres situations cliniques, en cas d'utilisation brève en période néonatale, encadrant des gestes cliniques courts, ou bien lors de protocoles de sédation prolongée. L'enjeu des années à venir n'étant pas de répondre à la question trop générale et trop peu pragmatique consistant à chercher à savoir si le recours à l'anesthésie générale en période néonatale est délétère ou pas, mais de réussir à identifier les drogues à privilégier en cas de recours nécessaire à une anesthésie générale ou sédation en période néonatale. En cas de mise en évidence d'effet bénéfique en contexte d'utilisation clinique, cela permettra également de disposer d'une molécule supplémentaire à intégrer à la stratégie globale de prise en charge des nouveau-nés prématurés, dans le but de préserver au maximum leur neurodéveloppement.

V/ REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adams, S.M., de Rivero Vaccari, J.C., and Corriveau, R.A. (2004). Pronounced cell death in the absence of NMDA receptors in the developing somatosensory thalamus. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *24*, 9441–9450.

Aligny, C., Roux, C., Dourmap, N., Ramdani, Y., Do-Rego, J.-C., Jégou, S., Leroux, P., Leroux-Nicollet, I., Marret, S., and Gonzalez, B.J. (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.

Allen, M.C., Cristofalo, E.A., and Kim, C. (2011). Outcomes of preterm infants: morbidity replaces mortality. Clin. Perinatol. *38*, 441–454.

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

Amiel-Tison, C., and Stewart, A. (1989). Follow up studies during the first five years of life: a pervasive assessment of neurological function. Arch. Dis. Child. *64*, 496–502.

Anand, K.J., and Scalzo, F.M. (2000). Can adverse neonatal experiences alter brain development and subsequent behavior? Biol. Neonate 77, 69–82.

Anand, K.J.S., Hall, R.W., Desai, N., Shephard, B., Bergqvist, L.L., Young, T.E., Boyle, E.M., Carbajal, R., Bhutani, V.K., Moore, M.B., et al. (2004). Effects of morphine analgesia in ventilated preterm neonates: primary outcomes from the NEOPAIN randomised trial. Lancet Lond. Engl. *363*, 1673–1682.

Anand, K.J.S., Garg, S., Rovnaghi, C.R., Narsinghani, U., Bhutta, A.T., and Hall, R.W. (2007). Ketamine reduces the cell death following inflammatory pain in newborn rat brain. Pediatr. Res. *62*, 283–290.

Andropoulos, D.B., and Greene, M.F. (2017). Anesthesia and Developing Brains - Implications of the FDA Warning. N. Engl. J. Med.

Angst, M.S., and Clark, J.D. (2006). Opioid-induced hyperalgesia: a qualitative systematic review. Anesthesiology *104*, 570–587.

Angst, M.S., Koppert, W., Pahl, I., Clark, D.J., and Schmelz, M. (2003). Short-term infusion of the mu-opioid agonist remiferitanil in humans causes hyperalgesia during withdrawal. Pain *106*, 49–57.

Ansermino, J.M., Brooks, P., Rosen, D., Vandebeek, C.A., and Reichert, C. (2005). Spontaneous ventilation with remiferitanil in children. Paediatr. Anaesth. *15*, 115–121.

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 Int. J. Obstet. Gynaecol. *109*, 989–996.

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

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

Babb, T.L., Mikuni, N., Najm, I., Wylie, C., Olive, M., Dollar, C., and MacLennan, H. (2005). Preand postnatal expressions of NMDA receptors 1 and 2B subunit proteins in the normal rat cortex. Epilepsy Res. *64*, 23–30.

Bacak, S.J., Baptiste-Roberts, K., Amon, E., Ireland, B., and Leet, T. (2005). Risk factors for neonatal mortality among extremely-low-birth-weight infants. Am. J. Obstet. Gynecol. *192*, 862–867.

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

Bajic, D., Berde, C.B., and Commons, K.G. (2012). Periaqueductal gray neuroplasticity following chronic morphine varies with age: role of oxidative stress. Neuroscience *226*, 165–177.

Bear, M.F., Connors, B.W., Paradiso, M.A. (2007). Neurosciences: A la découverte du cerveau. Ed Pradel.

Ben-Ari, Y., Gaiarsa, J.-L., Tyzio, R., and Khazipov, R. (2007). GABA: a pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations. Physiol. Rev. *87*, 1215–1284.

Bernardo, J., Friedman, H., Minich, N., Taylor, H.G., Wilson-Costello, D., and Hack, M. (2015). Cognitive and motor function of neurologically impaired extremely low birth weight children. Paediatr. Child Health *20*, e33-37.

Bhutta, A.T., Venkatesan, A.K., Rovnaghi, C.R., and Anand, K.J.S. (2007). Anaesthetic neurotoxicity in rodents: is the ketamine controversy real? Acta Paediatr. Oslo Nor. 1992 *96*, 1554–1556.

Bolteus, A.J., and Bordey, A. (2004). GABA release and uptake regulate neuronal precursor migration in the postnatal subventricular zone. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *24*, 7623–7631.

Bonde, C., Noraberg, J., Noer, H., and Zimmer, J. (2005). Ionotropic glutamate receptors and glutamate transporters are involved in necrotic neuronal cell death induced by oxygen-glucose deprivation of hippocampal slice cultures. Neuroscience *136*, 779–794.

Bonnet, M.-P., Minville, V., Asehnoune, K., Bridoux, D., Poggi-Bach, J., Duranteau, J., and Benhamou, D. (2007). Glycine and ammonia plasma concentrations during sedation with remiferitanil in critically ill patients. Intensive Care Med. *33*, 1179–1182.

Bordet, F., Allaouchiche, B., Lansiaux, S., Combet, S., Pouyau, A., Taylor, P., Bonnard, C., and Chassard, D. (2002). Risk factors for airway complications during general anaesthesia in paediatric patients. Paediatr. Anaesth. *12*, 762–769.

Bowers, M.E., Choi, D.C., and Ressler, K.J. (2012). Neuropeptide regulation of fear and anxiety: Implications of cholecystokinin, endogenous opioids, and neuropeptide Y. Physiol. Behav. *107*, 699–710.

Boylan, G.B., Young, K., Panerai, R.B., Rennie, J.M., and Evans, D.H. (2000). Dynamic cerebral autoregulation in sick newborn infants. Pediatr. Res. *48*, 12–17.

Brambrink, A.M., Evers, A.S., Avidan, M.S., Farber, N.B., Smith, D.J., Martin, L.D., Dissen, G.A., Creeley, C.E., and Olney, J.W. (2012). Ketamine-induced neuroapoptosis in the fetal and neonatal rhesus macaque brain. Anesthesiology *116*, 372–384.

Briner, A., De Roo, M., Dayer, A., Muller, D., Habre, W., and Vutskits, L. (2010). Volatile anesthetics rapidly increase dendritic spine density in the rat medial prefrontal cortex during

synaptogenesis. Anesthesiology 112, 546–556.

Bubeníková-Valesová, V., Horácek, J., Vrajová, M., and Höschl, C. (2008). Models of schizophrenia in humans and animals based on inhibition of NMDA receptors. Neurosci. Biobehav. Rev. *32*, 1014–1023.

Célèrier, E., Rivat, C., Jun, Y., Laulin, J.P., Larcher, A., Reynier, P., and Simonnet, G. (2000). Long-lasting hyperalgesia induced by fentanyl in rats: preventive effect of ketamine. Anesthesiology *92*, 465–472.

Chambers, N., Lopez, T., Thomas, J., and James, M.F.M. (2002). Remifentanil and the tunnelling phase of paediatric ventriculoperitoneal shunt insertion. A double-blind, randomised, prospective study. Anaesthesia *57*, 133–139.

Chanavaz, C., Tirel, O., Wodey, E., Bansard, J.Y., Senhadji, L., Robert, J.C., and Ecoffey, C. (2005). Haemodynamic effects of remifentanil in children with and without intravenous atropine. An echocardiographic study. Br. J. Anaesth. *94*, 74–79.

Chandrasekar, R. (2013). Alcohol and NMDA receptor: current research and future direction. Front. Mol. Neurosci. *6*, 14.

Chattopadhyaya, B., Di Cristo, G., Wu, C.Z., Knott, G., Kuhlman, S., Fu, Y., Palmiter, R.D., and Huang, Z.J. (2007). GAD67-mediated GABA synthesis and signaling regulate inhibitory synaptic innervation in the visual cortex. Neuron *54*, 889–903.

Choong, K., AlFaleh, K., Doucette, J., Gray, S., Rich, B., Verhey, L., and Paes, B. (2010). Remifentanil for endotracheal intubation in neonates: a randomised controlled trial. Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed. *95*, F80-84.

Chopp, M., Li, Y., Jiang, N., Zhang, R.L., and Prostak, J. (1996). Antibodies against adhesion molecules reduce apoptosis after transient middle cerebral artery occlusion in rat brain. J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab. *16*, 578–584.

Chu, C.J., and Jones, T.A. (2000). Experience-dependent structural plasticity in cortex heterotopic to focal sensorimotor cortical damage. Exp. Neurol. *166*, 403–414.

Church, J., Zeman, S., and Lodge, D. (1988). The neuroprotective action of ketamine and MK-801 after transient cerebral ischemia in rats. Anesthesiology *69*, 702–709. Clancy, B., Finlay, B.L., Darlington, R.B., and Anand, K.J.S. (2007). Extrapolating brain development from experimental species to humans. Neurotoxicology *28*, 931–937.

Clayton, G.H., Staley, K.J., Wilcox, C.L., Owens, G.C., and Smith, R.L. (1998). Developmental expression of C1C-2 in the rat nervous system. Brain Res. Dev. Brain Res. *108*, 307–318.

Conn, P.J., and Pin, J.P. (1997). Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. *37*, 205–237.

Convertino, M., Samoshkin, A., Viet, C.T., Gauthier, J., Li Fraine, S.P., Sharif-Naeini, R., Schmidt, B.L., Maixner, W., Diatchenko, L., and Dokholyan, N.V. (2015). Differential Regulation of 6- and 7-Transmembrane Helix Variants of μ-Opioid Receptor in Response to Morphine Stimulation. PloS One *10*, e0142826.

Crawford, M.W., Hayes, J., and Tan, J.M. (2005). Dose-response of remifentanil for tracheal intubation in infants. Anesth. Analg. *100*, 1599–1604.

Cull-Candy, S.G., and Leszkiewicz, D.N. (2004). Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. Sci. STKE Signal Transduct. Knowl. Environ. *2004*, re16.

Cull-Candy, S., Brickley, S., and Farrant, M. (2001). NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. Curr. Opin. Neurobiol. *11*, 327–335.

Dahaba, A.A., Grabner, T., Rehak, P.H., List, W.F., and Metzler, H. (2004). Remifentanil versus morphine analgesia and sedation for mechanically ventilated critically ill patients: a randomized double blind study. Anesthesiology *101*, 640–646.

Dahmani, S., Tourrel, F., Blanc, T., Marret, S., Jegou-Colleter, S., and Laudenbach, V. (2012). [Neurological consequences after long-term sedation in the ICU]. Ann. Fr. Anesthèsie Rèanimation *31*, e25-32.

Das, S., Du, Z., Bassly, S., Singer, L., and Vicencio, A.G. (2009). Effects of chronic hypercapnia in the neonatal mouse lung and brain. Pediatr. Pulmonol. *44*, 176–182.

Davidson, A.J., Disma, N., de Graaff, J.C., Withington, D.E., Dorris, L., Bell, G., Stargatt, R., Bellinger, D.C., Schuster, T., Arnup, S.J., et al. (2016). Neurodevelopmental outcome at 2 years of age after general anaesthesia and awake-regional anaesthesia in infancy (GAS): an international multicentre, randomised controlled trial. Lancet Lond. Engl. *387*, 239–250.

Degos, V., Teissier, N., Gressens, P., Puybasset, L., and Mantz, J. (2008). [Inflammation and acute brain injuries in intensive care]. Ann. Fr. Anesth. Reanim. *27*, 1008–1015.

Degos, V., Charpentier, T.L., Chhor, V., Brissaud, O., Lebon, S., Schwendimann, L., Bednareck, N., Passemard, S., Mantz, J., and Gressens, P. (2013). Neuroprotective effects of dexmedetomidine against glutamate agonist-induced neuronal cell death are related to increased astrocyte brain-derived neurotrophic factor expression. Anesthesiology *118*, 1123–1132.

Demirel, N., Bas, A.Y., Kavurt, S., Celik, I.H., Yucel, H., Turkbay, D., Hekimoğlu, E., and Koc, O. (2014). Remifentanil analgesia during laser treatment for retinopathy of prematurity: a practical approach in neonatal intensive care unit. Am. J. Perinatol. *31*, 983–986.

Dershwitz, M., Hoke, J.F., Rosow, C.E., Michałowski, P., Connors, P.M., Muir, K.T., and Dienstag, J.L. (1996). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of remifentanil in volunteer subjects with severe liver disease. Anesthesiology *84*, 812–820.

Desfeux, A., El Ghazi, F., Jégou, S., Legros, H., Marret, S., Laudenbach, V., and Gonzalez, B.J. (2010). Dual effect of glutamate on GABAergic interneuron survival during cerebral cortex development in mice neonates. Cereb. Cortex N. Y. N 1991 *20*, 1092–1108.

Deutsch, S.I., Mastropaolo, J., and Rosse, R.B. (1998). Neurodevelopmental consequences of early exposure to phencyclidine and related drugs. Clin. Neuropharmacol. *21*, 320–332.

DiMaggio, C., Sun, L.S., Ing, C., and Li, G. (2012). Pediatric anesthesia and neurodevelopmental impairments: a Bayesian meta-analysis. J. Neurosurg. Anesthesiol. *24*, 376–381.

Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., and Traynelis, S.F. (1999). The glutamate receptor ion channels. Pharmacol. Rev. *51*, 7–61.

Divito, C.B., and Underhill, S.M. (2014). Excitatory amino acid transporters: roles in glutamatergic neurotransmission. Neurochem. Int. *73*, 172–180.

Dommergues, M.A., Gallego, J., Evrard, P., and Gressens, P. (1998). Iron supplementation aggravates periventricular cystic white matter lesions in newborn mice. Eur. J. Paediatr. Neurol. EJPN Off. J. Eur. Paediatr. Neurol. Soc. *2*, 313–318.

Dommergues, M.A., Patkai, J., Renauld, J.C., Evrard, P., and Gressens, P. (2000).

Proinflammatory cytokines and interleukin-9 exacerbate excitotoxic lesions of the newborn murine neopallium. Ann. Neurol. 47, 54–63.

Dong, Y., and Benveniste, E.N. (2001). Immune function of astrocytes. Glia 36, 180–190.

Draisci, G., Valente, A., Suppa, E., Frassanito, L., Pinto, R., Meo, F., De Sole, P., Bossù, E., and Zanfini, B.A. (2008). Remifentanil for cesarean section under general anesthesia: effects on maternal stress hormone secretion and neonatal well-being: a randomized trial. Int. J. Obstet. Anesth. *17*, 130–136.

Dührsen, L., Simons, S.H.P., Dzietko, M., Genz, K., Bendix, I., Boos, V., Sifringer, M., Tibboel, D., and Felderhoff-Mueser, U. (2013). Effects of repetitive exposure to pain and morphine treatment on the neonatal rat brain. Neonatology *103*, 35–43.

Egan, T.D., Huizinga, B., Gupta, S.K., Jaarsma, R.L., Sperry, R.J., Yee, J.B., and Muir, K.T. (1998). Remifentanil pharmacokinetics in obese versus lean patients. Anesthesiology *89*, 562–573.

Emeterio, E.P.-S., Tramullas, M., and Hurlé, M.A. (2006). Modulation of apoptosis in the mouse brain after morphine treatments and morphine withdrawal. J. Neurosci. Res. *83*, 1352–1361.

Fiske, B.K., and Brunjes, P.C. (2001). NMDA receptor regulation of cell death in the rat olfactory bulb. J. Neurobiol. *47*, 223–232.

Foster, A.C., Gill, R., and Woodruff, G.N. (1988). Neuroprotective effects of MK-801 in vivo: selectivity and evidence for delayed degeneration mediated by NMDA receptor activation. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *8*, 4745–4754.

Fredriksson, A., Archer, T., Alm, H., Gordh, T., and Eriksson, P. (2004). Neurofunctional deficits and potentiated apoptosis by neonatal NMDA antagonist administration. Behav. Brain Res. *153*, 367–376.

Galanopoulou, A.S. (2007). Developmental patterns in the regulation of chloride homeostasis and GABA(A) receptor signaling by seizures. Epilepsia *48 Suppl 5*, 14–18.

Gavaldà, N., Pérez-Navarro, E., García-Martínez, J.M., Marco, S., Benito, A., and Alberch, J. (2008). Bax deficiency promotes an up-regulation of Bim(EL) and Bak during striatal and cortical postnatal development, and after excitotoxic injury. Mol. Cell. Neurosci. *37*, 663–672.

Ge, S., Goh, E.L.K., Sailor, K.A., Kitabatake, Y., Ming, G., and Song, H. (2006). GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. Nature *439*, 589–593.

Gelberg, J., Kongstad, L., and Werner, O. (2014). Intubation conditions in young infants after propofol and remifentanil induction with and without low-dose rocuronium. Acta Anaesthesiol. Scand. *58*, 820–825.

Giannantonio, C., Sammartino, M., Valente, E., Cota, F., Fioretti, M., and Papacci, P. (2009). Remifentanil analgosedation in preterm newborns during mechanical ventilation. Acta Paediatr. Oslo Nor. 1992 *98*, 1111–1115.

Glass, P.S. (1995a). Pharmacology of remifentanil. Eur. J. Anaesthesiol. Suppl. 10, 73–74.

Glass, P.S. (1995b). Remifentanil: a new opioid. J. Clin. Anesth. 7, 558–563.

Green, S.M., and Coté, C.J. (2009). Ketamine and neurotoxicity: clinical perspectives and implications for emergency medicine. Ann. Emerg. Med. *54*, 181–190.

Gressens, P., Marret, S., Hill, J.M., Brenneman, D.E., Gozes, I., Fridkin, M., and Evrard, P. (1997). Vasoactive intestinal peptide prevents excitotoxic cell death in the murine developing brain. J. Clin. Invest. *100*, 390–397.

Gris, P., Gauthier, J., Cheng, P., Gibson, D.G., Gris, D., Laur, O., Pierson, J., Wentworth, S., Nackley, A.G., Maixner, W., et al. (2010). A novel alternatively spliced isoform of the mu-opioid receptor: functional antagonism. Mol. Pain *6*, 33.

Groc, L., Bard, L., and Choquet, D. (2009). Surface trafficking of N-methyl-D-aspartate receptors: physiological and pathological perspectives. Neuroscience *158*, 4–18.

Grosshans, D.R., and Browning, M.D. (2001). Protein kinase C activation induces tyrosine phosphorylation of the NR2A and NR2B subunits of the NMDA receptor. J. Neurochem. *76*, 737–744.

Gu, X., Wu, X., Liu, Y., Cui, S., and Ma, Z. (2009). Tyrosine phosphorylation of the N-Methyl-D-Aspartate receptor 2B subunit in spinal cord contributes to remifentanil-induced postoperative hyperalgesia: the preventive effect of ketamine. Mol. Pain *5*, 76.

Guntz, E., Dumont, H., Roussel, C., Gall, D., Dufrasne, F., Cuvelier, L., Blum, D., Schiffmann,

S.N., and Sosnowski, M. (2005). Effects of remiferitanil on N-methyl-D-aspartate receptor: an electrophysiologic study in rat spinal cord. Anesthesiology *102*, 1235–1241.

Hagberg, B., Hagberg, G., Beckung, E., and Uvebrant, P. (2001). Changing panorama of cerebral palsy in Sweden. VIII. Prevalence and origin in the birth year period 1991-94. Acta Paediatr. Oslo Nor. 1992 *90*, 271–277.

Hagberg, H., Mallard, C., Ferriero, D.M., Vannucci, S.J., Levison, S.W., Vexler, Z.S., and Gressens, P. (2015). The role of inflammation in perinatal brain injury. Nat. Rev. Neurol. *11*, 192–208.

Hahnenkamp, K., Nollet, J., Van Aken, H.K., Buerkle, H., Halene, T., Schauerte, S., Hahnenkamp, A., Hollmann, M.W., Strümper, D., Durieux, M.E., et al. (2004). Remifentanil directly activates human N-methyl-D-aspartate receptors expressed in Xenopus laevis oocytes. Anesthesiology *100*, 1531–1537.

Haldipur, P., Dupuis, N., Degos, V., Moniaux, N., Chhor, V., Rasika, S., Schwendimann, L., le Charpentier, T., Rougier, E., Amouyal, P., et al. (2014). HIP/PAP prevents excitotoxic neuronal death and promotes plasticity. Ann. Clin. Transl. Neurol. *1*, 739–754.

Hallenbeck, J.M. (1996). Significance of the inflammatory response in brain ischemia. Acta Neurochir. Suppl. *66*, 27–31.

Hanley, J.G. (2014). Subunit-specific trafficking mechanisms regulating the synaptic expression of Ca(2+)-permeable AMPA receptors. Semin. Cell Dev. Biol. *27*, 14–22.

Hansen, T.G. (2015). Anesthesia-related neurotoxicity and the developing animal brain is not a significant problem in children. Paediatr. Anaesth. *25*, 65–72.

Harlan, R.E., and Song, D.D. (1994). Prenatal morphine treatment and the development of the striatum. Regul. Pept. *54*, 117–118.

Haydar, T.F., Wang, F., Schwartz, M.L., and Rakic, P. (2000). Differential modulation of proliferation in the neocortical ventricular and subventricular zones. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *20*, 5764–5774.

Henschel, O., Gipson, K.E., and Bordey, A. (2008). GABAA receptors, anesthetics and anticonvulsants in brain development. CNS Neurol. Disord. Drug Targets 7, 211–224.
Herguedas, B., Krieger, J., and Greger, I.H. (2013). Receptor heteromeric assembly-how it works and why it matters: the case of ionotropic glutamate receptors. Prog. Mol. Biol. Transl. Sci. *117*, 361–386.

Herlenius, E., and Lagercrantz, H. (2004). Development of neurotransmitter systems during critical periods. Exp. Neurol. *190 Suppl 1*, S8-21.

Hetts, S.W. (1998). To die or not to die: an overview of apoptosis and its role in disease. JAMA *279*, 300–307.

Higuchi, Y. (2003). Chromosomal DNA fragmentation in apoptosis and necrosis induced by oxidative stress. Biochem. Pharmacol. *66*, 1527–1535.

Hilton, G.D., Nunez, J.L., Bambrick, L., Thompson, S.M., and McCarthy, M.M. (2006). Glutamate-mediated excitotoxicity in neonatal hippocampal neurons is mediated by mGluRinduced release of Ca++ from intracellular stores and is prevented by estradiol. Eur. J. Neurosci. *24*, 3008–3016.

Hofbauer, R., Frass, M., Gmeiner, B., Sandor, N., Schumann, R., Wagner, O., and Kaye, A.D. (2000). Effects of remifentanil on neutrophil adhesion, transmigration, and intercellular adhesion molecule expression. Acta Anaesthesiol. Scand. *44*, 1232–1237.

Hoke, J.F., Shlugman, D., Dershwitz, M., Michałowski, P., Malthouse-Dufore, S., Connors, P.M., Martel, D., Rosow, C.E., Muir, K.T., Rubin, N., et al. (1997). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of remifentanil in persons with renal failure compared with healthy volunteers. Anesthesiology *87*, 533–541.

Hollmann, M., and Heinemann, S. (1994). Cloned glutamate receptors. Annu. Rev. Neurosci. *17*, 31–108.

Honoré, J.-C., Kooli, A., Hou, X., Hamel, D., Rivera, J.C., Picard, E., Hardy, P., Tremblay, S., Varma, D.R., Jankov, R.P., et al. (2010). Sustained hypercapnia induces cerebral microvascular degeneration in the immature brain through induction of nitrative stress. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. *298*, R1522-1530.

Hsu, C., Hsieh, Y.L., Yang, R.C., and Hsu, H.K. (2000). Blockage of N-methyl-D-aspartate receptors decreases testosterone levels and enhances postnatal neuronal apoptosis in the

preoptic area of male rats. Neuroendocrinology 71, 301–307.

Hu, S., Sheng, W.S., Lokensgard, J.R., and Peterson, P.K. (2002). Morphine induces apoptosis of human microglia and neurons. Neuropharmacology *42*, 829–836.

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.

Husson, I., Mesplès, B., Medja, F., Leroux, P., Kosofsky, B., and Gressens, P. (2004). Methylphenidate and MK-801, an N-methyl-d-aspartate receptor antagonist: shared biological properties. Neuroscience *125*, 163–170.

Husson, I., Rangon, C.-M., Lelièvre, V., Bemelmans, A.-P., Sachs, P., Mallet, J., Kosofsky, B.E., and Gressens, P. (2005). BDNF-induced white matter neuroprotection and stage-dependent neuronal survival following a neonatal excitotoxic challenge. Cereb. Cortex N. Y. N 1991 *15*, 250–261.

Hyejin, J., Mei, L., Seongheon, L., Cheolwon, J., Seokjai, K., Hongbeom, B., Minsun, K., Sungsu, C., and Sanghyun, K. (2013). Remifentanil attenuates human neutrophils activation induced by lipopolysaccharide. Immunopharmacol. Immunotoxicol. *35*, 264–271.

Ikonomidou, C. (2009). Triggers of apoptosis in the immature brain. Brain Dev. 31, 488–492.

Ikonomidou, C., and Kaindl, A.M. (2011). Neuronal death and oxidative stress in the developing brain. Antioxid. Redox Signal. *14*, 1535–1550.

Ikonomidou, C., Bosch, F., Miksa, M., Bittigau, P., Vöckler, J., Dikranian, K., Tenkova, T.I., Stefovska, V., Turski, L., and Olney, J.W. (1999). Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. Science *283*, 70–74.

Ikonomidou, C., Stefovska, V., and Turski, L. (2000). Neuronal death enhanced by N-methyl-Daspartate antagonists. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *97*, 12885–12890.

Iliodromiti, S., Mackay, D.F., Smith, G.C.S., Pell, J.P., and Nelson, S.M. (2014). Apgar score and the risk of cause-specific infant mortality: a population-based cohort study. Lancet Lond. Engl. *384*, 1749–1755.

Inoue, S., Browne, G., Melino, G., and Cohen, G.M. (2009). Ordering of caspases in cells undergoing apoptosis by the intrinsic pathway. Cell Death Differ. *16*, 1053–1061.

Jansson, L.C., and Åkerman, K.E. (2014). The role of glutamate and its receptors in the proliferation, migration, differentiation and survival of neural progenitor cells. J. Neural Transm. Vienna Austria 1996 *121*, 819–836.

Jantzie, L.L., Talos, D.M., Jackson, M.C., Park, H.-K., Graham, D.A., Lechpammer, M., Folkerth, R.D., Volpe, J.J., and Jensen, F.E. (2015). Developmental expression of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor subunits in human white and gray matter: potential mechanism of increased vulnerability in the immature brain. Cereb. Cortex N. Y. N 1991 *25*, 482–495.

Jarvis, S., Glinianaia, S.V., Arnaud, C., Fauconnier, J., Johnson, A., McManus, V., Topp, M., Uvebrant, P., Cans, C., Krägeloh-Mann, I., et al. (2005). Case gender and severity in cerebral palsy varies with intrauterine growth. Arch. Dis. Child. *90*, 474–479.

Jenkins, W.M., and Merzenich, M.M. (1987). Reorganization of neocortical representations after brain injury: a neurophysiological model of the bases of recovery from stroke. Prog. Brain Res. *71*, 249–266.

Jeong, S., Kim, S.J., Jeong, C., Lee, S., Jeong, H., Lee, J., and Yoo, K.Y. (2012). Neuroprotective effects of remifentanil against transient focal cerebral ischemia in rats. J. Neurosurg. Anesthesiol. *24*, 51–57.

Jevtovic-Todorovic, V., Hartman, R.E., Izumi, Y., Benshoff, N.D., Dikranian, K., Zorumski, C.F., Olney, J.W., and Wozniak, D.F. (2003). Early exposure to common anesthetic agents causes widespread neurodegeneration in the developing rat brain and persistent learning deficits. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *23*, 876–882.

Jevtovic-Todorovic, V., Absalom, A.R., Blomgren, K., Brambrink, A., Crosby, G., Culley, D.J., Fiskum, G., Giffard, R.G., Herold, K.F., Loepke, A.W., et al. (2013). Anaesthetic neurotoxicity and neuroplasticity: an expert group report and statement based on the BJA Salzburg Seminar. Br. J. Anaesth. *111*, 143–151.

Johnson, R.F., Herman, N., Arney, T.L., Johnson, H.V., Paschall, R.L., and Downing, J.W. (1997). The placental transfer of sufentanil: effects of fetal pH, protein binding, and sufentanil concentration. Anesth. Analg. 84, 1262–1268.

Joly, V., Richebe, P., Guignard, B., Fletcher, D., Maurette, P., Sessler, D.I., and Chauvin, M. (2005). Remifentanil-induced postoperative hyperalgesia and its prevention with small-dose ketamine. Anesthesiology *103*, 147–155.

Kahle, K.T., and Staley, K.J. (2008). The bumetanide-sensitive Na-K-2Cl cotransporter NKCC1 as a potential target of a novel mechanism-based treatment strategy for neonatal seizures. Neurosurg. Focus *25*, E22.

Kaindl, A.M., Degos, V., Peineau, S., Gouadon, E., Chhor, V., Loron, G., Le Charpentier, T., Josserand, J., Ali, C., Vivien, D., et al. (2012). Activation of microglial N-methyl-D-aspartate receptors triggers inflammation and neuronal cell death in the developing and mature brain. Ann. Neurol. *72*, 536–549.

Kalkman, C.J., Peelen, L., Moons, K.G., Veenhuizen, M., Bruens, M., Sinnema, G., and de Jong, T.P. (2009). Behavior and development in children and age at the time of first anesthetic exposure. Anesthesiology *110*, 805–812.

Kan, R.E., Hughes, S.C., Rosen, M.A., Kessin, C., Preston, P.G., and Lobo, E.P. (1998). Intravenous remifentanil: placental transfer, maternal and neonatal effects. Anesthesiology *88*, 1467–1474.

Kato, R., Tachibana, K., Nishimoto, N., Hashimoto, T., Uchida, Y., Ito, R., Tsuruga, K., Takita, K., and Morimoto, Y. (2013). Neonatal exposure to sevoflurane causes significant suppression of hippocampal long-term potentiation in postgrowth rats. Anesth. Analg. *117*, 1429–1435.

Kawaraguchi, Y., Sasaoka, N., Kawaguchi, M., Inoue, S., Hayashi, H., Konishi, N., and Furuya, H. (2008). Effect of continuous morphine infusion on hypoxic-ischaemic brain damage of neonatal rats. Acta Anaesthesiol. Scand. *52*, 1111–1115.

Keenan, R.L., Shapiro, J.H., Kane, F.R., and Simpson, P.M. (1994). Bradycardia during anesthesia in infants. An epidemiologic study. Anesthesiology *80*, 976–982.

Kent, A.L., Wright, I.M.R., Abdel-Latif, M.E., and New South Wales and Australian Capital Territory Neonatal Intensive Care Units Audit Group (2012). Mortality and adverse neurologic outcomes are greater in preterm male infants. Pediatrics *129*, 124–131. Kieffer, B.L., and Evans, C.J. (2009). Opioid receptors: from binding sites to visible molecules in vivo. Neuropharmacology *56 Suppl 1*, 205–212.

Köhr, G. (2006). NMDA receptor function: subunit composition versus spatial distribution. Cell Tissue Res. *326*, 439–446.

Komuro, H., and Rakic, P. (1993). Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. Science *260*, 95–97.

de Kort, E.H.M., Hanff, L.M., Roofthooft, D., Reiss, I.K.M., and Simons, S.H.P. (2016). Insufficient Sedation and Severe Side Effects after Fast Administration of Remifertanil during INSURE in Preterm Newborns. Neonatology *111*, 172–176.

Kritis, A.A., Stamoula, E.G., Paniskaki, K.A., and Vavilis, T.D. (2015). Researching glutamate induced cytotoxicity in different cell lines: a comparative/collective analysis/study. Front. Cell. Neurosci. *9*, 91.

Kuida, K., Zheng, T.S., Na, S., Kuan, C., Yang, D., Karasuyama, H., Rakic, P., and Flavell, R.A. (1996). Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. Nature *384*, 368–372.

Larroque, B., Ancel, P.-Y., Marret, S., Marchand, L., André, M., Arnaud, C., Pierrat, V., Rozé, J.-C., Messer, J., Thiriez, G., et al. (2008). Neurodevelopmental disabilities and special care of 5year-old children born before 33 weeks of gestation (the EPIPAGE study): a longitudinal cohort study. Lancet Lond. Engl. *371*, 813–820.

Laudenbach, V., Calo, G., Guerrini, R., Lamboley, G., Benoist, J.F., Evrard, P., and Gressens, P. (2001). Nociceptin/orphanin FQ exacerbates excitotoxic white-matter lesions in the murine neonatal brain. J. Clin. Invest. *107*, 457–466.

Lecointre, M., Vézier, C., Bénard, M., Ramdani, Y., Dupré, N., Brasse-Lagnel, C., Henry, V.J., Roy, V., Marret, S., Gonzalez, B.J., et al. (2015). Age-dependent alterations of the NMDA receptor developmental profile and adult behavior in postnatally ketamine-treated mice. Dev. Neurobiol. *75*, 315–333.

Lee, J.H., Zhang, J., Wei, L., and Yu, S.P. (2015). Neurodevelopmental implications of the general anesthesia in neonate and infants. Exp. Neurol. *272*, 50–60.

Lee, M., Silverman, S.M., Hansen, H., Patel, V.B., and Manchikanti, L. (2011a). A comprehensive review of opioid-induced hyperalgesia. Pain Physician *14*, 145–161.

Lee, Y.S., Kang, J.W., Lee, Y.H., and Kim, D.W. (2011b). ID4 mediates proliferation of astrocytes after excitotoxic damage in the mouse hippocampus. Anat. Cell Biol. *44*, 128–134.

Lemkuil, B.P., Head, B.P., Pearn, M.L., Patel, H.H., Drummond, J.C., and Patel, P.M. (2011). Isoflurane neurotoxicity is mediated by p75NTR-RhoA activation and actin depolymerization. Anesthesiology *114*, 49–57.

Lerma, J., and Marques, J.M. (2013). Kainate receptors in health and disease. Neuron *80*, 292–311.

Lesniak, A., Pick, C.G., Misicka, A., Lipkowski, A.W., and Sacharczuk, M. (2016). Biphalin protects against cognitive deficits in a mouse model of mild traumatic brain injury (mTBI). Neuropharmacology *101*, 506–518.

Li, K., and Xu, E. (2008). The role and the mechanism of gamma-aminobutyric acid during central nervous system development. Neurosci. Bull. *24*, 195–200.

Liddelow, S.A., Guttenplan, K.A., Clarke, L.E., Bennett, F.C., Bohlen, C.J., Schirmer, L., Bennett, M.L., Münch, A.E., Chung, W.-S., Peterson, T.C., et al. (2017). Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. Nature *541*, 481–487.

Lin, C.S., Tao, P.L., Jong, Y.J., Chen, W.F., Yang, C.H., Huang, L.T., Chao, C.F., and Yang, S.N. (2009). Prenatal morphine alters the synaptic complex of postsynaptic density 95 with N-methyl-D-aspartate receptor subunit in hippocampal CA1 subregion of rat offspring leading to long-term cognitive deficits. Neuroscience *158*, 1326–1337.

Lin, E.P., Miles, L., Hughes, E.A., McCann, J.C., Vorhees, C.V., McAuliffe, J.J., and Loepke, A.W. (2014a). 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.

Lin, R., Tao, Y., Yu, Y., Xu, Z., Su, J., and Liu, Z. (2014b). Intravenous remifentanil versus epidural ropivacaine with sufentanil for labour analgesia: a retrospective study. PloS One *9*, e112283.

Liu, X., Pan, Z., Su, D., Yang, Z., Zheng, B., Wang, X., and Tian, J. (2015). Remiferitanil 163 Ameliorates Liver Ischemia-Reperfusion Injury Through Inhibition of Interleukin-18 Signaling. Transplantation *99*, 2109–2117.

Liu, X.-B., Murray, K.D., and Jones, E.G. (2004). Switching of NMDA receptor 2A and 2B subunits at thalamic and cortical synapses during early postnatal development. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *24*, 8885–8895.

Liu, Y., Wong, T.P., Aarts, M., Rooyakkers, A., Liu, L., Lai, T.W., Wu, D.C., Lu, J., Tymianski, M., Craig, A.M., et al. (2007). NMDA receptor subunits have differential roles in mediating excitotoxic neuronal death both in vitro and in vivo. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *27*, 2846– 2857.

Lohmann, C., and Kessels, H.W. (2014). The developmental stages of synaptic plasticity. J. Physiol. *592*, 13–31.

Luján, R., Shigemoto, R., and López-Bendito, G. (2005). Glutamate and GABA receptor signalling in the developing brain. Neuroscience *130*, 567–580.

Lutz, P.-E., and Kieffer, B.L. (2013). Opioid receptors: distinct roles in mood disorders. Trends Neurosci. *36*, 195–206.

Lysakowski, C., Dumont, L., Pellegrini, M., Clergue, F., and Tassonyi, E. (2001). Effects of fentanyl, alfentanil, remifentanil and sufentanil on loss of consciousness and bispectral index during propofol induction of anaesthesia. Br. J. Anaesth. *86*, 523–527.

MacLennan, A. (1999). A template for defining a causal relation between acute intrapartum events and cerebral palsy: international consensus statement. BMJ *319*, 1054–1059.

Mansour, A., Fox, C.A., Akil, H., and Watson, S.J. (1995). Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications. Trends Neurosci. *18*, 22–29.

Mao, J., Sung, B., Ji, R.-R., and Lim, G. (2002). Neuronal apoptosis associated with morphine tolerance: evidence for an opioid-induced neurotoxic mechanism. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *22*, 7650–7661.

Marlow, N., Wolke, D., Bracewell, M.A., Samara, M., and EPICure Study Group (2005). Neurologic and developmental disability at six years of age after extremely preterm birth. N. Engl. J. Med. *352*, 9–19. Marlow, N., Hennessy, E.M., Bracewell, M.A., Wolke, D., and EPICure Study Group (2007). Motor and executive function at 6 years of age after extremely preterm birth. Pediatrics *120*, 793–804.

Marret, S., Mukendi, R., Gadisseux, J.F., Gressens, P., and Evrard, P. (1995a). 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., Gressens, P., Gadisseux, J.F., and Evrard, P. (1995b). 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., Zupan, V., Gressens, P., Lagercrantz, H., and Evrard, P. (1998). [Periventricular leukomalacia. I. Histological and pathophysiological aspects]. Arch. Pediatr. Organe Off. Soc. Francaise Pediatr. *5*, 525–537.

Marret, S., Bonnier, C., Raymackers, J.M., Delpech, A., Evrard, P., and Gressens, P. (1999). Glycine antagonist and NO synthase inhibitor protect the developing mouse brain against neonatal excitotoxic lesions. Pediatr. Res. *45*, 337–342.

Marsh, D.F., and Hodkinson, B. (2009). Remifentanil in paediatric anaesthetic practice. Anaesthesia *64*, 301–308.

Martel, M.-A., Wyllie, D.J.A., and Hardingham, G.E. (2009). In developing hippocampal neurons, NR2B-containing N-methyl-D-aspartate receptors (NMDARs) can mediate signaling to neuronal survival and synaptic potentiation, as well as neuronal death. Neuroscience *158*, 334–343.

Martin, W.R., Eades, C.G., Thompson, J.A., Huppler, R.E., and Gilbert, P.E. (1976). The effects of morphine- and nalorphine- like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog. J. Pharmacol. Exp. Ther. *197*, 517–532.

Masood, A., Yi, M., Lau, M., Belcastro, R., Shek, S., Pan, J., Kantores, C., McNamara, P.J., Kavanagh, B.P., Belik, J., et al. (2009). Therapeutic effects of hypercapnia on chronic lung injury and vascular remodeling in neonatal rats. Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. *297*, L920-930.

Massa, H., Lacoh, C.-M., and Vutskits, L. (2012). Effects of morphine on the differentiation and survival of developing pyramidal neurons during the brain growth spurt. Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol. *130*, 168–179.

Matthes, H.W., Maldonado, R., Simonin, F., Valverde, O., Slowe, S., Kitchen, I., Befort, K., Dierich, A., Le Meur, M., Dollé, P., et al. (1996). Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene. Nature *383*, 819–823.

Mehta, A., Prabhakar, M., Kumar, P., Deshmukh, R., and Sharma, P.L. (2013). Excitotoxicity: bridge to various triggers in neurodegenerative disorders. Eur. J. Pharmacol. *698*, 6–18.

Meldrum, B.S. (1990). Anatomy, physiology, and pathology of epilepsy. Lancet Lond. Engl. *336*, 231–234.

Mellon, R.D., Simone, A.F., and Rappaport, B.A. (2007). Use of anesthetic agents in neonates and young children. Anesth. Analg. *104*, 509–520.

Mesples, B., Plaisant, F., and Gressens, P. (2003). Effects of interleukin-10 on neonatal excitotoxic brain lesions in mice. Brain Res. Dev. Brain Res. *141*, 25–32.

Michel, F., Lando, A., Aubry, C., Arnaud, S., Merrot, T., and Martin, C. (2008). Experience with remifentanil-sevoflurane balanced anesthesia for abdominal surgery in neonates and children less than 2 years. Paediatr. Anaesth. *18*, 532–538.

Mikkola, K., Ritari, N., Tommiska, V., Salokorpi, T., Lehtonen, L., Tammela, O., Pääkkönen, L., Olsen, P., Korkman, M., and Fellman, V. (2005). Neurodevelopmental outcome at 5 years of age of a national cohort of extremely low birth weight infants who were born in 1996-1997. Pediatrics *116*, 1391–1400.

Mishra, O.P., Fritz, K.I., and Delivoria-Papadopoulos, M. (2001). NMDA receptor and neonatal hypoxic brain injury. Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev. *7*, 249–253.

Monk, C.S., Webb, S.J., and Nelson, C.A. (2001). Prenatal neurobiological development: molecular mechanisms and anatomical change. Dev. Neuropsychol. *19*, 211–236.

Monti, B., and Contestabile, A. (2000). Blockade of the NMDA receptor increases developmental apoptotic elimination of granule neurons and activates caspases in the rat

cerebellum. Eur. J. Neurosci. 12, 3117–3123.

Monyer, H., Sprengel, R., Schoepfer, R., Herb, A., Higuchi, M., Lomeli, H., Burnashev, N., Sakmann, B., and Seeburg, P.H. (1992). Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. Science *256*, 1217–1221.

Monyer, H., Burnashev, N., Laurie, D.J., Sakmann, B., and Seeburg, P.H. (1994). Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. Neuron *12*, 529–540.

Moretti, R., Zanin, A., Pansiot, J., Spiri, D., Manganozzi, L., Kratzer, I., Favero, G., Vasiljevic, A., Rinaldi, V.E., Pic, I., et al. (2015). Melatonin reduces excitotoxic blood-brain barrier breakdown in neonatal rats. Neuroscience *311*, 382–397.

Mothet, J.-P., Le Bail, M., and Billard, J.-M. (2015). Time and space profiling of NMDA receptor co-agonist functions. J. Neurochem. *135*, 210–225.

Mukerji, A., Shah, V., and Shah, P.S. (2015). Periventricular/Intraventricular Hemorrhage and Neurodevelopmental Outcomes: A Meta-analysis. Pediatrics *136*, 1132–1143.

Murat, I., Constant, I., and Maud'huy, H. (2004). Perioperative anaesthetic morbidity in children: a database of 24,165 anaesthetics over a 30-month period. Paediatr. Anaesth. *14*, 158–166.

Naruse, I., and Keino, H. (1995). Apoptosis in the developing CNS. Prog. Neurobiol. 47, 135– 155.

Ngan Kee, W.D., Khaw, K.S., Ma, K.C., Wong, A.S.Y., Lee, B.B., and Ng, F.F. (2006). Maternal and neonatal effects of remiferitanil at induction of general anesthesia for cesarean delivery: a randomized, double-blind, controlled trial. Anesthesiology *104*, 14–20.

Nguyen, L., Rigo, J.M., Rocher, V., Belachew, S., Malgrange, B., Rogister, B., Leprince, P., and Moonen, G. (2001). Neurotransmitters as early signals for central nervous system development. Cell Tissue Res. *305*, 187–202.

Niswender, C.M., and Conn, P.J. (2010). Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. *50*, 295–322.

Niswender, C.M., Johnson, K.A., Miller, N.R., Ayala, J.E., Luo, Q., Williams, R., Saleh, S., Orton, D., Weaver, C.D., and Conn, P.J. (2010). Context-dependent pharmacology exhibited by negative allosteric modulators of metabotropic glutamate receptor 7. Mol. Pharmacol. *77*, 459–468.

Noskova, P., Blaha, J., Bakhouche, H., Kubatova, J., Ulrichova, J., Marusicova, P., Smisek, J., Parizek, A., Slanar, O., and Michalek, P. (2015). Neonatal effect of remiferitanil in general anaesthesia for caesarean section: a randomized trial. BMC Anesthesiol. *15*, 38.

Oladosu, F.A., Conrad, M.S., O'Buckley, S.C., Rashid, N.U., Slade, G.D., and Nackley, A.G. (2015). Mu Opioid Splice Variant MOR-1K Contributes to the Development of Opioid-Induced Hyperalgesia. PloS One *10*, e0135711.

Olney, J.W., Ishimaru, M.J., Bittigau, P., and Ikonomidou, C. (2000). Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration in the developing brain. Apoptosis Int. J. Program. Cell Death *5*, 515–521.

Olney, J.W., Wozniak, D.F., Jevtovic-Todorovic, V., and Ikonomidou, C. (2001). Glutamate signaling and the fetal alcohol syndrome. Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev. *7*, 267–275.

Owens, D.F., Boyce, L.H., Davis, M.B., and Kriegstein, A.R. (1996). Excitatory GABA responses in embryonic and neonatal cortical slices demonstrated by gramicidin perforated-patch recordings and calcium imaging. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *16*, 6414–6423.

Pachernegg, S., Strutz-Seebohm, N., and Hollmann, M. (2012). GluN3 subunit-containing NMDA receptors: not just one-trick ponies. Trends Neurosci. *35*, 240–249.

Pansiot, J., Pham, H., Dalous, J., Chevenne, D., Colella, M., Schwendimann, L., Fafouri, A., Mairesse, J., Moretti, R., Schang, A.-L., et al. (2016). Glial response to 17β -estradiol in neonatal rats with excitotoxic brain injury. Exp. Neurol. *282*, 56–65.

Paoletti, P. (2011). Molecular basis of NMDA receptor functional diversity. Eur. J. Neurosci. *33*, 1351–1365.

Paoletti, P., and Neyton, J. (2007). NMDA receptor subunits: function and pharmacology. Curr. Opin. Pharmacol. *7*, 39–47.

Paoletti, P., Bellone, C., and Zhou, Q. (2013). NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. Nat. Rev. Neurosci. *14*, 383–400.

Parga, J.A., Rodriguez-Pallares, J., Guerra, M.J., and Labandeira-Garcia, J.L. (2007). Effects of GABA and GABA receptor inhibition on differentiation of mesencephalic precursors into dopaminergic neurons in vitro. Dev. Neurobiol. *67*, 1549–1559.

Park, B.Y., Jeong, C.W., Jang, E.A., Kim, S.J., Jeong, S.T., Shin, M.H., Lee, J., and Yoo, K.Y. (2011a). Dose-related attenuation of cardiovascular responses to tracheal intubation by intravenous remiferitanil bolus in severe pre-eclamptic patients undergoing Caesarean delivery. Br. J. Anaesth. *106*, 82–87.

Park, S.-W., Yi, J.-W., Kim, Y.-M., Kang, J.-M., Kim, D.O., Shin, M.-S., Kim, C.-J., Lee, D.I., Kim, D.-H., and Lee, B.J. (2011b). Remifentanil alleviates transient cerebral ischemia-induced memory impairment through suppression of apoptotic neuronal cell death in gerbils. Korean J. Anesthesiol. *61*, 63–68.

Pasternak, G.W., and Pan, Y.-X. (2013). Mu opioids and their receptors: evolution of a concept. Pharmacol. Rev. *65*, 1257–1317.

Patel, P., and Sun, L. (2009). Update on neonatal anesthetic neurotoxicity: insight into molecular mechanisms and relevance to humans. Anesthesiology *110*, 703–708.

Patra, K., Greene, M.M., Patel, A.L., and Meier, P. (2016). Maternal Education Level Predicts Cognitive, Language, and Motor Outcome in Preterm Infants in the Second Year of Life. Am. J. Perinatol. *33*, 738–744.

Paule, M.G., Li, M., Allen, R.R., Liu, F., Zou, X., Hotchkiss, C., Hanig, J.P., Patterson, T.A., Slikker, W., and Wang, C. (2011). Ketamine anesthesia during the first week of life can cause long-lasting cognitive deficits in rhesus monkeys. Neurotoxicol. Teratol. *33*, 220–230.

Pavlova, M.A., and Krägeloh-Mann, I. (2013). Limitations on the developing preterm brain: impact of periventricular white matter lesions on brain connectivity and cognition. Brain J. Neurol. *136*, 998–1011.

Pearn, M.L., Hu, Y., Niesman, I.R., Patel, H.H., Drummond, J.C., Roth, D.M., Akassoglou, K., Patel, P.M., and Head, B.P. (2012). Propofol neurotoxicity is mediated by p75 neurotrophin receptor activation. Anesthesiology *116*, 352–361.

Pekny, M., and Nilsson, M. (2005). Astrocyte activation and reactive gliosis. Glia 50, 427–434.

Penido, M.G., Garra, R., Sammartino, M., and Pereira e Silva, Y. (2010). Remifentanil in neonatal intensive care and anaesthesia practice. Acta Paediatr. Oslo Nor. 1992 *99*, 1454–1463.

Perego, C., Vanoni, C., Bossi, M., Massari, S., Basudev, H., Longhi, R., and Pietrini, G. (2000). The GLT-1 and GLAST glutamate transporters are expressed on morphologically distinct astrocytes and regulated by neuronal activity in primary hippocampal cocultures. J. Neurochem. *75*, 1076–1084.

Pereira e Silva, Y., Gomez, R.S., Marcatto, J. de O., Maximo, T.A., Barbosa, R.F., and Simões e Silva, A.C. (2007). Morphine versus remifentanil for intubating preterm neonates. Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed. *92*, F293-294.

Pérez-Otaño, I., and Ehlers, M.D. (2004). Learning from NMDA receptor trafficking: clues to the development and maturation of glutamatergic synapses. Neurosignals *13*, 175–189.

Persson, A.I., Thorlin, T., Bull, C., Zarnegar, P., Ekman, R., Terenius, L., and Eriksson, P.S. (2003). Mu- and delta-opioid receptor antagonists decrease proliferation and increase neurogenesis in cultures of rat adult hippocampal progenitors. Eur. J. Neurosci. *17*, 1159–1172.

Pitsiu, M., Wilmer, A., Bodenham, A., Breen, D., Bach, V., Bonde, J., Kessler, P., Albrecht, S., Fisher, G., and Kirkham, A. (2004). Pharmacokinetics of remifentanil and its major metabolite, remifentanil acid, in ICU patients with renal impairment. Br. J. Anaesth. *92*, 493–503.

Pleuvry, B.J. (1993). Opioid receptors and their relevance to anaesthesia. Br. J. Anaesth. 71, 119–126.

Reid, S.M., Lanigan, A., and Reddihough, D.S. (2006). Post-neonatally acquired cerebral palsy in Victoria, Australia, 1970-1999. J. Paediatr. Child Health *42*, 606–611.

Rice, D., and Barone, S. (2000). Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. Environ. Health Perspect. *108 Suppl 3*, 511–533.

Rivera, C., Voipio, J., Payne, J.A., Ruusuvuori, E., Lahtinen, H., Lamsa, K., Pirvola, U., Saarma, M., and Kaila, K. (1999). The K+/Cl- co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. Nature *397*, 251–255.

Roeckel, L.-A., Le Coz, G.-M., Gavériaux-Ruff, C., and Simonin, F. (2016). Opioid-induced hyperalgesia: Cellular and molecular mechanisms. Neuroscience.

Ross, A.K., Davis, P.J., Dear Gd, G.L., Ginsberg, B., McGowan, F.X., Stiller, R.D., Henson, L.G., Huffman, C., and Muir, K.T. (2001). Pharmacokinetics of remifentanil in anesthetized pediatric patients undergoing elective surgery or diagnostic procedures. Anesth. Analg. *93*, 1393–1401, table of contents.

Rovnaghi, C.R., Garg, S., Hall, R.W., Bhutta, A.T., and Anand, K.J. (2008). Ketamine analgesia for inflammatory pain in neonatal rats: a factorial randomized trial examining long-term effects. Behav. Brain Funct. BBF *4*, 35.

Rudolph, U., and Antkowiak, B. (2004). Molecular and neuronal substrates for general anaesthetics. Nat. Rev. Neurosci. *5*, 709–720.

Sammartino, M., Bocci, M.G., Ferro, G., Mercurio, G., Papacci, P., Conti, G., Lepore, D., and Molle, F. (2003). Efficacy and safety of continuous intravenous infusion of remifentanil in preterm infants undergoing laser therapy in retinopathy of prematurity: clinical experience. Paediatr. Anaesth. *13*, 596–602.

Sanchez, V., Feinstein, S.D., Lunardi, N., Joksovic, P.M., Boscolo, A., Todorovic, S.M., and Jevtovic-Todorovic, V. (2011). General Anesthesia Causes Long-term Impairment of Mitochondrial Morphogenesis and Synaptic Transmission in Developing Rat Brain. Anesthesiology *115*, 992–1002.

Sanders, R.D., Hassell, J., Davidson, A.J., Robertson, N.J., and Ma, D. (2013). Impact of anaesthetics and surgery on neurodevelopment: an update. Br. J. Anaesth. *110 Suppl 1*, i53-72.

Santos, M.S., Li, H., and Voglmaier, S.M. (2009). Synaptic vesicle protein trafficking at the glutamate synapse. Neuroscience *158*, 189–203.

Sargeant, T.J., Miller, J.H., and Day, D.J. (2008). Opioidergic regulation of astroglial/neuronal proliferation: where are we now? J. Neurochem. *107*, 883–897.

Schneck, H., Scheller, M., Wagner, R., von Hundelshausen, B., and Kochs, E. (1999). Anesthesia for cesarean section and acid aspiration prophylaxis: a German survey. Anesth. Analg. *88*, 63–

66.

Schrott, L.M., Franklin, L. 'Tonya M., and Serrano, P.A. (2008). Prenatal opiate exposure impairs radial arm maze performance and reduces levels of BDNF precursor following training. Brain Res. *1198*, 132–140.

Seatriz, J.V., and Hammer, R.P. (1993). Effects of opiates on neuronal development in the rat cerebral cortex. Brain Res. Bull. *30*, 523–527.

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.

Sfaello, I., Baud, O., Arzimanoglou, A., and Gressens, P. (2005). Topiramate prevents excitotoxic damage in the newborn rodent brain. Neurobiol. Dis. *20*, 837–848.

Shapira, Y., Lam, A.M., Eng, C.C., Laohaprasit, V., and Michel, M. (1994). Therapeutic time window and dose response of the beneficial effects of ketamine in experimental head injury. Stroke J. Cereb. Circ. *25*, 1637–1643.

Shin, S.H., Kim, H.-S., Lee, J., Choi, K.Y., Lee, J.H., Kim, E.-K., Park, M.S., and Choi, J.-H. (2014). A comparative study of two remifentanil doses for procedural pain in ventilated preterm infants: a randomized, controlled study*. Pediatr. Crit. Care Med. J. Soc. Crit. Care Med. World Fed. Pediatr. Intensive Crit. Care Soc. *15*, 451–455.

e Silva, Y.P., Gomez, R.S., Marcatto, J. de O., Maximo, T.A., Barbosa, R.F., and e Silva, A.C.S. (2008). Early awakening and extubation with remiferitanil in ventilated premature neonates. Paediatr. Anaesth. *18*, 176–183.

Simonnet, G., and Rivat, C. (2003). Opioid-induced hyperalgesia: abnormal or normal pain? Neuroreport *14*, 1–7.

Simons, S.H.P., van Dijk, M., van Lingen, R.A., Roofthooft, D., Duivenvoorden, H.J., Jongeneel, N., Bunkers, C., Smink, E., Anand, K.J.S., van den Anker, J.N., et al. (2003). Routine morphine infusion in preterm newborns who received ventilatory support: a randomized controlled trial. JAMA *290*, 2419–2427.

Sinner, B., Becke, K., and Engelhard, K. (2014). General anaesthetics and the developing brain: an overview. Anaesthesia *69*, 1009–1022.

Slikker, W., Zou, X., Hotchkiss, C.E., Divine, R.L., Sadovova, N., Twaddle, N.C., Doerge, D.R., Scallet, A.C., Patterson, T.A., Hanig, J.P., et al. (2007). Ketamine-induced neuronal cell death in the perinatal rhesus monkey. Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol. *98*, 145–158.

Sokolowska, P., Passemard, S., Mok, A., Schwendimann, L., Gozes, I., and Gressens, P. (2011). Neuroprotective effects of NAP against excitotoxic brain damage in the newborn mice: implications for cerebral palsy. Neuroscience *173*, 156–168.

Soriano, S.G., and Anand, K.J. (2005). Anesthetics and brain toxicity. Curr. Opin. Anaesthesiol. *18*, 293–297.

Spandou, E., Karkavelas, G., Soubasi, V., Avgovstides-Savvopoulou, P., Loizidis, T., and Guiba-Tziampiri, O. (1999). Effect of ketamine on hypoxic-ischemic brain damage in newborn rats. Brain Res. *819*, 1–7.

Steinhorn, R., McPherson, C., Anderson, P.J., Neil, J., Doyle, L.W., and Inder, T. (2015). Neonatal morphine exposure in very preterm infants-cerebral development and outcomes. J. Pediatr. *166*, 1200–1207.e4.

Stoppa, F., Perrotta, D., Tomasello, C., Cecchetti, C., Marano, M., Pasotti, E., Barbieri, M.A., Conti, G., and Pirozzi, N. (2004). Low dose remifentanyl infusion for analgesia and sedation in ventilated newborns. Minerva Anestesiol. *70*, 753–761.

Stratmann, G., Lee, J., Sall, J.W., Lee, B.H., Alvi, R.S., Shih, J., Rowe, A.M., Ramage, T.M., Chang, F.L., Alexander, T.G., et al. (2014). Effect of general anesthesia in infancy on long-term recognition memory in humans and rats. Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol. *39*, 2275–2287.

Szczurowska, E., and Mareš, P. (2013). NMDA and AMPA receptors: development and status epilepticus. Physiol. Res. *62 Suppl 1*, S21-38.

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 Pathol. Zurich Switz. *11*, 56–71.

Tau, G.Z., and Peterson, B.S. (2010). Normal development of brain circuits. Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol. *35*, 147–168.

Tay, C.L., Tan, G.M., and Ng, S.B. (2001). Critical incidents in paediatric anaesthesia: an audit of 10 000 anaesthetics in Singapore. Paediatr. Anaesth. *11*, 711–718.

Tegeder, I., and Geisslinger, G. (2004). Opioids as modulators of cell death and survival-unraveling mechanisms and revealing new indications. Pharmacol. Rev. *56*, 351–369.

Thome, U.H., Genzel-Boroviczeny, O., Bohnhorst, B., Schmid, M., Fuchs, H., Rohde, O., Avenarius, S., Topf, H.-G., Zimmermann, A., Faas, D., et al. (2015). Permissive hypercapnia in extremely low birthweight infants (PHELBI): a randomised controlled multicentre trial. Lancet Respir. Med. *3*, 534–543.

Thome, U.H., Genzel-Boroviczeny, O., Bohnhorst, B., Schmid, M., Fuchs, H., Rohde, O., Avenarius, S., Topf, H.-G., Zimmermann, A., Faas, D., et al. (2017). Neurodevelopmental outcomes of extremely low birthweight infants randomised to different PCO2 targets: the PHELBI follow-up study. Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.

Tourrel, F., de Lendeu, P.K., Abily-Donval, L., Chollat, C., Marret, S., Dufrasne, F., Compagnon, P., Ramdani, Y., Dureuil, B., Laudenbach, V., et al. (2014). The antiapoptotic effect of remifentanil on the immature mouse brain: an ex vivo study. Anesth. Analg. *118*, 1041–1051.

Tumukunde, J., Lomangisi, D.D., Davidson, O., Kintu, A., Joseph, E., and Kwizera, A. (2015). Effects of propofol versus thiopental on Apgar scores in newborns and peri-operative outcomes of women undergoing emergency cesarean section: a randomized clinical trial. BMC Anesthesiol. *15*, 63.

Van Horn, M.R., Sild, M., and Ruthazer, E.S. (2013). D-serine as a gliotransmitter and its roles in brain development and disease. Front. Cell. Neurosci. *7*, 39.

Vanhatalo, S., Palva, J.M., Andersson, S., Rivera, C., Voipio, J., and Kaila, K. (2005). Slow endogenous activity transients and developmental expression of K+-Cl- cotransporter 2 in the immature human cortex. Eur. J. Neurosci. *22*, 2799–2804.

Vannucci, R.C., Towfighi, J., Heitjan, D.F., and Brucklacher, R.M. (1995). Carbon dioxide protects the perinatal brain from hypoxic-ischemic damage: an experimental study in the

immature rat. Pediatrics 95, 868-874.

Vannucci, R.C., Towfighi, J., Brucklacher, R.M., and Vannucci, S.J. (2001). Effect of extreme hypercapnia on hypoxic-ischemic brain damage in the immature rat. Pediatr. Res. *49*, 799–803.

Viberg, H., Pontén, E., Eriksson, P., Gordh, T., and Fredriksson, A. (2008). Neonatal ketamine exposure results in changes in biochemical substrates of neuronal growth and synaptogenesis, and alters adult behavior irreversibly. Toxicology *249*, 153–159.

Vicini, S., Wang, J.F., Li, J.H., Zhu, W.J., Wang, Y.H., Luo, J.H., Wolfe, B.B., and Grayson, D.R. (1998). Functional and pharmacological differences between recombinant N-methyl-D-aspartate receptors. J. Neurophysiol. *79*, 555–566.

Vinik, H.R., and Kissin, I. (1998). Rapid development of tolerance to analgesia during remifentanil infusion in humans. Anesth. Analg. *86*, 1307–1311.

Volpe, J.J. (2009). Brain injury in premature infants: a complex amalgam of destructive and developmental disturbances. Lancet Neurol. *8*, 110–124.

Vutskits, L., Gascon, E., Tassonyi, E., and Kiss, J.Z. (2005). Clinically relevant concentrations of propofol but not midazolam alter in vitro dendritic development of isolated gamma-aminobutyric acid-positive interneurons. Anesthesiology *102*, 970–976.

Vutskits, L., Gascon, E., Tassonyi, E., and Kiss, J.Z. (2006). Effect of ketamine on dendritic arbor development and survival of immature GABAergic neurons in vitro. Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol. *91*, 540–549.

Vutskits, L., Gascon, E., Potter, G., Tassonyi, E., and Kiss, J.Z. (2007). Low concentrations of ketamine initiate dendritic atrophy of differentiated GABAergic neurons in culture. Toxicology *234*, 216–226.

Wang, C., and Slikker, W. (2008). Strategies and experimental models for evaluating anesthetics: effects on the developing nervous system. Anesth. Analg. *106*, 1643–1658.

Wang, C.-C., Held, R.G., Chang, S.-C., Yang, L., Delpire, E., Ghosh, A., and Hall, B.J. (2011a). A critical role for GluN2B-containing NMDA receptors in cortical development and function. Neuron *72*, 789–805.

Wang, P.Y., Petralia, R.S., Wang, Y.-X., Wenthold, R.J., and Brenowitz, S.D. (2011b). Functional NMDA receptors at axonal growth cones of young hippocampal neurons. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *31*, 9289–9297.

Weale, N.K., Rogers, C.A., Cooper, R., Nolan, J., and Wolf, A.R. (2004). Effect of remiferitanil infusion rate on stress response to the pre-bypass phase of paediatric cardiac surgery. Br. J. Anaesth. *92*, 187–194.

Welzing, L., Kribs, A., Huenseler, C., Eifinger, F., Mehler, K., and Roth, B. (2009). Remiferitanil for INSURE in preterm infants: a pilot study for evaluation of efficacy and safety aspects. Acta Paediatr. Oslo Nor. 1992 *98*, 1416–1420.

Welzing, L., Oberthuer, A., Junghaenel, S., Harnischmacher, U., Stützer, H., and Roth, B. (2012). Remifentanil/midazolam versus fentanyl/midazolam for analgesia and sedation of mechanically ventilated neonates and young infants: a randomized controlled trial. Intensive Care Med. *38*, 1017–1024.

Wilder, R.T., Flick, R.P., Sprung, J., Katusic, S.K., Barbaresi, W.J., Mickelson, C., Gleich, S.J., Schroeder, D.R., Weaver, A.L., and Warner, D.O. (2009). Early exposure to anesthesia and learning disabilities in a population-based birth cohort. Anesthesiology *110*, 796–804.

Wong, G.T.C., Li, R., Jiang, L.L., and Irwin, M.G. (2010). Remifentanil post-conditioning attenuates cardiac ischemia-reperfusion injury via kappa or delta opioid receptor activation. Acta Anaesthesiol. Scand. *54*, 510–518.

Wroge, C.M., Hogins, J., Eisenman, L., and Mennerick, S. (2012). Synaptic NMDA receptors mediate hypoxic excitotoxic death. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *32*, 6732–6742.

Wu, L.-L., Zhang, L., Shao, J., Qin, Y.-F., Yang, R.-W., and Zhao, Z.-Y. (2008). Effect of perinatal iron deficiency on myelination and associated behaviors in rat pups. Behav. Brain Res. *188*, 263–270.

Xiong, Z.G., Raouf, R., Lu, W.Y., Wang, L.Y., Orser, B.A., Dudek, E.M., Browning, M.D., and MacDonald, J.F. (1998). Regulation of N-methyl-D-aspartate receptor function by constitutively active protein kinase C. Mol. Pharmacol. *54*, 1055–1063.

Yacubova, E., and Komuro, H. (2003). Cellular and molecular mechanisms of cerebellar granule

cell migration. Cell Biochem. Biophys. 37, 213–234.

Yan, J., and Jiang, H. (2014). Dual effects of ketamine: neurotoxicity versus neuroprotection in anesthesia for the developing brain. J. Neurosurg. Anesthesiol. *26*, 155–160.

Yan, J., Li, Y., Zhang, Y., Lu, Y., and Jiang, H. (2014). Repeated exposure to anesthetic ketamine can negatively impact neurodevelopment in infants: a prospective preliminary clinical study. J. Child Neurol. *29*, 1333–1338.

Yenari, M.A., Kunis, D., Sun, G.H., Onley, D., Watson, L., Turner, S., Whitaker, S., and Steinberg, G.K. (1998). Hu23F2G, an antibody recognizing the leukocyte CD11/CD18 integrin, reduces injury in a rabbit model of transient focal cerebral ischemia. Exp. Neurol. *153*, 223–233.

Yon, J.-H., Daniel-Johnson, J., Carter, L.B., and Jevtovic-Todorovic, V. (2005). Anesthesia induces neuronal cell death in the developing rat brain via the intrinsic and extrinsic apoptotic pathways. Neuroscience *135*, 815–827.

Yoo, K.Y., Jeong, C.W., Park, B.Y., Kim, S.J., Jeong, S.T., Shin, M.H., and Lee, J. (2009). Effects of remifentanil on cardiovascular and bispectral index responses to endotracheal intubation in severe pre-eclamptic patients undergoing Caesarean delivery under general anaesthesia. Br. J. Anaesth. *102*, 812–819.

Yoon, W.J., Won, S.J., Ryu, B.R., and Gwag, B.J. (2003). Blockade of ionotropic glutamate receptors produces neuronal apoptosis through the Bax-cytochrome C-caspase pathway: the causative role of Ca2+ deficiency. J. Neurochem. *85*, 525–533.

Young, C., Jevtovic-Todorovic, V., Qin, Y.-Q., Tenkova, T., Wang, H., Labruyere, J., and Olney, J.W. (2005). Potential of ketamine and midazolam, individually or in combination, to induce apoptotic neurodegeneration in the infant mouse brain. Br. J. Pharmacol. *146*, 189–197.

Yudkowitz, F.S. (2010). Anesthetics and the developing brain. Semin. Cardiothorac. Vasc. Anesth. *14*, 44–45.

Zeitlin, J., Szamotulska, K., Drewniak, N., Mohangoo, A.D., Chalmers, J., Sakkeus, L., Irgens, L., Gatt, M., Gissler, M., Blondel, B., et al. (2013). Preterm birth time trends in Europe: a study of 19 countries. BJOG Int. J. Obstet. Gynaecol. *120*, 1356–1365.

Zhang, Y., Li, Y.-W., Wang, Y.-X., Zhang, H.-T., Zhang, X.-M., Liang, Y., Zhang, X.-S., Wang, W.-177 S., Liu, H.-G., Zhang, Y., et al. (2013). Remiferitanil preconditioning alleviating brain damage of cerebral ischemia reperfusion rats by regulating the JNK signal pathway and TNF- α /TNFR1 signal pathway. Mol. Biol. Rep. 40, 6997–7006.

Zhao, M., and Joo, D.T. (2008). Enhancement of spinal N-methyl-D-aspartate receptor function by remifentanil action at delta-opioid receptors as a mechanism for acute opioid-induced hyperalgesia or tolerance. Anesthesiology *109*, 308–317.

Zhao, J., Xin, X., Xie, G., Palmer, P.P., and Huang, Y. (2012). Molecular and cellular mechanisms of the age-dependency of opioid analgesia and tolerance. Mol. Pain *8*, 38.

Zhao, P., Peng, L., Li, L., Xu, X., and Zuo, Z. (2007). Isoflurane preconditioning improves longterm neurologic outcome after hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. Anesthesiology *107*, 963–970.

Zhu, C., Gao, J., Karlsson, N., Li, Q., Zhang, Y., Huang, Z., Li, H., Kuhn, H.G., and Blomgren, K. (2010). Isoflurane anesthesia induced persistent, progressive memory impairment, caused a loss of neural stem cells, and reduced neurogenesis in young, but not adult, rodents. J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab. *30*, 1017–1030.

Zhu, D., Wu, X., Strauss, K.I., Lipsky, R.H., Qureshi, Z., Terhakopian, A., Novelli, A., Banaudha, K., and Marini, A.M. (2005). N-methyl-D-aspartate and TrkB receptors protect neurons against glutamate excitotoxicity through an extracellular signal-regulated kinase pathway. J. Neurosci. Res. *80*, 104–113.