



HAL
open science

Neuroprotection du lactate dans le cadre de l'hypoxie-ischémie néonatale : Lactate et hypothermie : une double approche pour la neuroprotection dans l'hypoxie-ischémie néonatale

Ifrah Omar Ibrahim

► **To cite this version:**

Ifrah Omar Ibrahim. Neuroprotection du lactate dans le cadre de l'hypoxie-ischémie néonatale : Lactate et hypothermie : une double approche pour la neuroprotection dans l'hypoxie-ischémie néonatale. Neurosciences. Université de Bordeaux, 2024. Français. NNT : 2024BORD0439 . tel-04910180

HAL Id: tel-04910180

<https://theses.hal.science/tel-04910180v1>

Submitted on 24 Jan 2025

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 PRÉSENTÉE

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

SPÉCIALITÉ : NEUROSCIENCES

Par Ifrah OMAR IBRAHIM

**NEUROPROTECTION DU LACTATE DANS LE CADRE DE
L'HYPOXIE-ISCHÉMIE NEONATALE**

**LACTATE ET HYPOTHERMIE : UNE DOUBLE APPROCHE
POUR LA NEUROPROTECTION DANS L'HYPOXIE-ISCHÉMIE NEONATALE**

Sous la direction d'Anne-Karine BOUZIER-SORE

Soutenue le 18 Décembre 2024

Membres du jury :

Mme. Anne-Karine BOUZIER-SORE, Directrice de Recherche CNRS / Université de Bordeaux
M. Remy GUILLEVIN, Professeur des Universités - Praticien Hospitalier / Université de Poitiers
M. Laurent SUISSA, Professeur des Universités - Praticien Hospitalier / Université d'Aix-Marseille
Mme. Rosa Chiara PAOLICELLI, Professeure associée / Université de Lausanne
Mme. Émilie PACARY, Chargée de Recherche Inserm / Université de Bordeaux
M. Luc PELLERIN, Professeur des Universités - Praticien Hospitalier / Université de Poitiers
Mme. Hélène ROUMES, Chargée de Recherche CNRS / Université de Bordeaux

Directrice de thèse
Président
Rapporteur
Rapporteuse
Examinatrice
Invité
Invitée

Cette thèse est dédiée :

*À mes parents **Roda** et **Omar**,
Pour leur amour inconditionnel, leur
soutien indéfectible et les valeurs
qu'ils m'ont transmises*

*À ma petite sœur **Habsa**,
Pour sa joie, sa douceur, sa présence
réconfortante et sa foi en moi*

*À ma tante **Zahra**,
Pour son amour, ses encouragements
et sa bienveillance.*

Lactate et hypothermie : une double approche pour la neuroprotection dans l'hypoxie-ischémie néonatale

Depuis l'introduction du concept de la navette lactate entre astrocyte et neurone (ANLS, pour astrocyte-neuron lactate shuttle) par Pellerin et Magistretti en 1994, il a été proposé que le lactate produit par les astrocytes (via la glycolyse) soit transféré aux neurones en tant que substrat énergétique privilégié. Très récemment, le rôle crucial de cette ANLS dans l'activation cérébrale et les fonctions associées a été démontré *in vivo*. Si le lactate est essentiel à l'activité neuronale, pourrait-il être neuroprotecteur dans des pathologies caractérisées par un déficit énergétique cérébral ? Pour répondre à cette question, nous avons utilisé un modèle d'hypoxie-ischémie néonatale (HIN), une pathologie qui touche 1 à 6 % des nourrissons. Elle résulte d'une diminution du flux sanguin au niveau du cerveau du nouveau-né, entraînant une réduction des apports en oxygène (O₂) et en glucose. À ce jour, la seule prise en charge clinique est l'hypothermie thérapeutique (HT) modérée, qui permet de limiter les séquelles neurologiques induites par cette pathologie, mais près d'un nouveau-né sur deux n'y répond pas favorablement.

Les travaux de l'équipe ont montré, sur un modèle d'HIN chez le rat, que l'administration de lactate avait un effet neuroprotecteur. L'objectif de ma thèse était de déterminer si cette administration de lactate était compatible avec l'HT après un accident d'HIN, et de comparer les effets de la combinaison de ces deux thérapies à ceux de l'HT seule. Pour atteindre cet objectif, ma thèse s'est articulée autour de 3 volets :

- La mise en place d'un protocole d'hypothermie dans un modèle d'HIN chez le rat afin de déterminer les conditions optimales de traitement. Trois durées d'hypothermie (2 h, 3 h et 5 h) post-HIN ont été comparées grâce à un suivi longitudinal des dommages cérébraux mesurés par IRM (Bruker 4,7T) et divers tests comportementaux. Des analyses histologiques et immunohistochimiques ont été réalisées pour compléter ces observations.
- Le potentiel thérapeutique des injections de lactate couplées à l'hypothermie a été comparé aux effets neuroprotecteurs de l'HT seule. La fenêtre optimale pour l'administration du lactate a également été déterminée. Les mécanismes moléculaires impliqués dans ces neuroprotections ont été étudiés par Western blot. Afin de caractériser l'impact de l'administration du lactate dans la neuro-inflammation, son rôle dans la modulation phénotypique des microglies a été évalué.
- Enfin, dans l'objectif final d'un transfert vers la clinique, l'innocuité de l'administration de lactate sur les paramètres sanguins des nouveau-nés a été vérifiée à travers une étude rétrospective chez des prématurés ayant reçu une perfusion de L-lactate de sodium.

Nos résultats ont suggéré que 2 h d'HT suffisaient pour réduire les volumes de lésions cérébrales et obtenir des performances optimales lors des tests comportementaux. De plus, l'administration de lactate couplée à l'HT s'est avérée plus neuroprotectrice par rapport à l'HT seule. Enfin, dans de l'étude rétrospective, la perfusion du L-lactate de sodium chez les bébés prématurés n'a entraîné ni d'augmentation de la lactatémie ni perturbation des autres paramètres sanguins.

En conclusion, l'administration du lactate est non seulement neuroprotectrice dans le cadre de l'HIN, même lorsqu'elle est associée à l'HT, mais aussi bénéfique chez les nouveau-nés prématurés, même en présence d'une lactatémie déjà élevée. Ces résultats ouvrent la voie à une application en pédiatrie clinique.

Lactate and Hypothermia: A Dual Approach for Neuroprotection in Neonatal Hypoxia-Ischemia

Since the introduction of the astrocyte-neuron lactate shuttle (ANLS) concept by Pellerin and Magistretti in 1994, it has been proposed that lactate produced by astrocytes via glycolysis is transferred to neurons as a preferred energy substrate. More recently, the critical role of ANLS in brain activation and its associated functions has been demonstrated *in vivo*. Given that lactate is essential for neuronal activity, the question arises: could it also be neuroprotective in conditions characterized by cerebral energy deficits? To address this question, we used a neonatal hypoxia-ischemia (NHI) model, a leading cause of mortality and subsequent disabilities in infants. NHI results in brain lesions due to a significant reduction in oxygen (O₂) and glucose supply. Currently, the only clinical treatment is moderate therapeutic hypothermia (TH), which helps limit the neurological damage caused by NHI. However, nearly half of the affected newborns do not respond favorably to this treatment.

Research conducted by our team using an NHI rat model demonstrated that lactate administration has neuroprotective effects. The aim of my thesis was to determine whether lactate administration is compatible with HT following an NHI event and to compare the effects of combining these two therapies with HT alone. To achieve this goal, my thesis was structured around three main objectives:

- Development of a hypothermia protocol in an NHI rat model: This was done to identify optimal treatment conditions. Three hypothermia durations (2 h, 3 h, and 5 h) post-NHI were compared through longitudinal monitoring of brain damage using MRI (Bruker 4.7T) and various behavioral tests. Histological and immunohistochemical analysis were also conducted to provide complementary insights.
- Evaluation of the therapeutic potential of lactate combined with hypothermia: The neuroprotective effects of this combination were compared to TH alone. The optimal window for lactate administration was also established. The molecular mechanisms underlying these neuroprotective effects were investigated using Western blot analysis. Additionally, the impact of lactate on neuroinflammation was examined by evaluating its role in modulating microglial phenotypes.
- Assessment of the safety of lactate administration on neonatal blood parameters: This was conducted through a retrospective study of preterm infants who received sodium L-lactate infusions.

Our findings clearly indicated that 2 hours of TH were sufficient to reduce brain lesion volumes and achieve optimal performance in behavioral tests. Moreover, lactate administration combined with TH proved to be more neuroprotective than TH alone. Finally, in the retrospective study, sodium L-lactate infusion in preterm infants did not increase lactatemia or disturb other blood parameters.

In conclusion, lactate administration is neuroprotective in the context of NHI, even when combined with TH, and is safe for preterm infants, even when lactatemia is already elevated. These results suggest promising potential for clinical pediatric applications.

Neonatal hypoxia-ischemia, MRI, Lactate, Brain metabolism, Hypothermia

REMERCIEMENTS

À travers ces quelques mots, je souhaite exprimer ma profonde gratitude envers toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de mon projet de thèse.

Pour commencer, je souhaite exprimer ma gratitude aux membres du jury pour leur disponibilité et le temps précieux qu'ils ont consacré à l'évaluation de mon travail. Leurs analyses pertinentes, leurs questions stimulantes et leurs observations constructives ont considérablement enrichi mon projet de recherche et ouvert de nouvelles perspectives que je me réjouis d'explorer :

- Dr. **Rosa Chiara PAOLICELLI**, Professeure associée au Département des sciences biomédicales de l'Université de Lausanne, me fait l'honneur d'être rapporteure de ce travail. Je tiens à lui témoigner ma reconnaissance pour son expertise et son intérêt pour ce travail.
- Pr. **Laurent SUISSA**, Praticien hospitalier, Unité de neurovasculaire, Hôpital de la Timone de l'Université de Aix-marseille a accepté la charge de rapporteur. Consciente de la faveur qu'il m'accorde, je souhaite lui exprimer toute ma gratitude pour l'évaluation de ce manuscrit.
- Pr. **Remy GUILLEVIN**, Praticien hospitalier, directeur du laboratoire commun I3M et responsable de l'équipe DACTIM-MIS au sein de l'unité mixte de recherche et du laboratoire de mathématiques et applications de l'Université de Poitiers a accepté d'examiner ce travail. Je lui adresse mes remerciements les plus sincères pour sa présence et l'intérêt qu'il porte à ce travail.
- Dr. **Émilie PACARY**, chargée de recherche au sein de l'équipe Neurogénèse et Physiopathologie, au Neurocentre de Magendie (Unité Mixte de Recherche INSERM U1215) de l'Université de Bordeaux, a également accepté d'examiner ce travail. Je lui exprime ici ma reconnaissance pour son intérêt pour cette thématique et pour sa participation à cette soutenance.

Je tiens à remercier chaleureusement **Sylvain Miraux**, directeur du laboratoire, pour m'avoir permis de réaliser cette thèse au CRMSB.

Il me manque les mots pour exprimer toute ma gratitude envers **Anne-Karine Bouzier-Sore**, ma chère directrice de thèse, pour ces trois années d'encadrement. Merci sincèrement de m'avoir formée en métabolisme cérébral et en IRM. J'ai énormément appris à travers ses enseignements et je lui suis profondément reconnaissante. Elle a su trouver l'équilibre parfait entre soutien et autonomie, m'encourageant ainsi à donner le meilleur de moi-même, en particulier lors de ma première chirurgie. Merci pour sa disponibilité sans faille, sa patience, sa rigueur exemplaire, et surtout, pour la bienveillance avec laquelle elle m'a accordée sa confiance. C'est cette confiance qui m'a permis de m'investir pleinement dans ce beau projet et d'y consacrer toute mon énergie. Son exigence scientifique et son expertise ont été des piliers solides sur lesquels j'ai pu bâtir cette thèse. C'est une grande chance et un véritable honneur de pouvoir continuer à évoluer à ses côtés au-delà de cette soutenance.

Je souhaite également exprimer toute ma reconnaissance à **Hélène Roumes**. Sa bienveillance, sa disponibilité et son accompagnement constant durant ces trois années ont été des soutiens inestimables, me permettant d'avancer avec sérénité et confiance dans ce parcours exigeant. Je lui suis profondément reconnaissante pour la finesse de ses conseils dans la réalisation de mes expériences, la pertinence de ses retours qui ont grandement enrichi mes abstracts, mes posters, ainsi que la rédaction de cette thèse. Sans son aide précieuse, ce projet n'aurait pas pris la même envergure.

Je remercie **Luc Pellerin** d'avoir apporté la fameuse ANLS et ses discussions intéressantes sur les MCTs.

Je souhaite aussi exprimer toute ma reconnaissance à **Pierre Goudeneche**. Sa gentillesse, sa présence constante à mes côtés lors de chaque expérience, ainsi que ses encouragements ont été des soutiens inestimables tout au long de ce parcours. Merci pour sa bienveillance et son engagement.

Un immense merci également à **Jeanny Laroche**, pour sa générosité et son aide précieuse dans les expériences in vitro, les tests ELISA et l'immunofluorescence.

Merci à **Stéphane Sanchez** pour ses ligatures de carotides, toujours exécutées avec une précision parfaite, et pour m'avoir transmise son savoir-faire avec une patience infinie, malgré mon rythme parfois moins rapide que le sien.

Je tiens à remercier à **Émeline Ribot** pour sa gentillesse, ses encouragements constants et sa disponibilité précieuse pour la lecture attentive de mon manuscrit. Ses remarques éclairées ont grandement contribué à l'enrichir.

Je remercie également chaleureusement **Christophe Dubois** pour sa disponibilité, son implication attentive dans la relecture de ce manuscrit, ainsi que pour ses commentaires avisés, qui ont grandement contribué à l'améliorer. Ses conseils éclairés sur le protocole d'immunohistochimie m'ont été d'une aide précieuse.

Merci également à **Jean-Michel FRANCONI** pour sa disponibilité et son implication attentive dans la relecture et les corrections de mon manuscrit.

Un immense merci à tous les membres du laboratoire ! Ces trois années passées à vos côtés ont été un réel plaisir.

Merci à **Philippe Massot, Aurélien Trotier** et **Marc Biran** pour leurs précieux conseils et leurs disponibilités face aux problèmes techniques. Un grand merci également à **Karine Viaud** pour son aide et sa disponibilité lors des soucis informatiques.

Un grand merci à mes collègues doctorants (**Élise, Nicolas, Nino** et **Joyce**) de l'open-space, ainsi qu'à ceux du RMSB (**Sarah, Mathilde, Audrey** et **Oumaima**) pour leur bienveillance, leur soutien et la sympathie qu'ils ont su témoigner tout au long de cette aventure.

Mes remerciements les plus chaleureux vont également à **Kowsar**, amie fidèle et précieuse, qui m'a soutenue et encouragée tout au long de cette aventure, ainsi qu'à toutes mes amies, qu'elles soient de longue date ou rencontrées plus récemment.

Je tiens également à remercier **Mohamed** pour sa présence et ses encouragements.

Merci à ma famille qui m'a toujours soutenu et qui m'a permis de devenir la personne que je suis aujourd'hui.

À ma petite sœur **Hafsa**, merci pour sa gentillesse et pour les moments précieux que nous partageons. Sa présence dans ma vie est un trésor, et je suis extrêmement fière d'elle. Je lui souhaite tout le courage du monde pour son parcours en informatique, et sache que je serai toujours à tes côtés, comme je l'ai toujours été.

À ma tante **Zahra**, qui m'a soutenu inlassablement au fil des années : sa dévotion, son amour et sa générosité n'ont jamais eu de limites. Son soutien et sa tendresse ont illuminé ma vie, et je la remercie du fond du cœur pour tout.

À mes parents, je tiens à exprimer ma profonde gratitude. Merci de m'avoir toujours encouragée à donner le meilleur de moi-même et de n'avoir jamais douté de ma capacité à réussir. Je vous suis infiniment reconnaissante pour les innombrables sacrifices que vous avez consentis, pour vos prières, votre patience sans limites et votre amour inconditionnel. Votre soutien a été ma plus grande force, et cette réussite est autant la vôtre que la mienne. J'espère, du fond du cœur, vous avoir apporté du bonheur et de la fierté, et vous avoir témoigné une part de la reconnaissance que je ressens. Je m'efforcerai de continuer à être la fille que vous avez toujours rêvé d'avoir.

COMMUNICATIONS ORALES

Octobre 2023 : **Longitudinal follow-up by MRI and behavioural evaluation to assess the best neuroprotective strategy: Comparison of hypothermia and lactate in a rat model of neonatal hypoxia-ischemia.** Ifrah Omar, Hélène Roumes, Stéphane Sanchez, Marie-Christine Beauvieux, Jean-François Chateil, Luc Pellerin and Anne-Karine Bouzier-Sore. ESMRMB, Basel, Suisse.

Novembre 2023 : **Neuroprotection of lactate combined with hypothermia in a rat model of neonatal hypoxia-ischemia.** Ifrah Omar, Hélène Roumes, Stéphane Sanchez, Jean-François Chateil, Luc Pellerin and Anne-Karine Bouzier-Sore. Journée scientifique du Département STS, Bordeaux, France. SFRMBM, Paris, France.



Octobre 2024 : **Lactate: a promising therapeutic approach in the context of neonatal hypoxia ischemia.** Ifrah Omar, Chloé Perrot, Hélène Roumes, Pierre Goudeneche, Jean-François. Chateil, Marie-Christine Beauvieux, Luc Pellerin, Olivier Tandonnet and Anne-Karine Bouzier-Sore. ESMRMB, Barcelone, Espagne.
Prix du Meilleur Abstract



Décembre 2024 : **Lactate: une approche thérapeutique prometteuse dans le contexte de l'hypoxie-ischémie néonatale.** Ifrah Omar, Chloé Perrot, Hélène Roumes, Pierre Goudeneche, Jean-François. Chateil, Marie-Christine Beauvieux, Luc Pellerin, Olivier Tandonnet and Anne-Karine Bouzier-Sore. Journées Francophones de recherche en néonatalogie, Paris, France. **Prix du Meilleur Abstract**

COMMUNICATIONS AFFICHEES

Novembre 2022 : **Is hypothermia coupled to lactate injection the best neuroprotective strategy after a neonatal hypoxic-ischemic event?** Ifrah Omar, Hélène Roumes, Stéphane Sanchez, Jean-François Chateil, Luc Pellerin and Anne-Karine Bouzier-Sore. Journée scientifique du Département STS, Bordeaux, France.



Décembre 2022 : **Les effets bénéfiques du lactate contre l'hypoxie-ischémie.** Journée de vulgarisation Gar'O'sciences, Bordeaux, France. **Prix du jury**

Mars 2023 : **Neuroprotection dans le contexte de l'hypoxie-ischémie néonatale : Détermination des meilleures conditions d'hypothermie neuroprotectrice chez le raton.** Ifrah Omar, Hélène Roumes, Stéphane Sanchez, Jean-François Chateil, Luc Pellerin and Anne-Karine Bouzier-Sore. SFRMBM, Paris, France.

Mai 2023 : **Neonatal hypoxia-ischemia and neuroprotection of lactate: impact on microglia phenotypic and metabolic switches.** Ifrah Omar, Jane Frezals, Camille Guichard, Florence Ottonnes, Luc Pellerin, Hélène Roumes, Jeanny Laroche-Traineau and Anne-Karine Bouzier-Sore. The Glial Cell Day, Lyon, France.



Novembre 2023 : **Comparison of hypothermia, the standard care procedure, and lactate, a novel approach, for the recovery after a neonatal hypoxia-ischemia insult: a rat pup model study.** Ifrah Omar, Hélène Roumes, Stéphane Sanchez, Jean-François Chateil, Luc Pellerin and Anne-Karine Bouzier-Sore. Journ  e scientifique du Département STS, Bordeaux, France. **Prix du Meilleur Poster**

Mai 2024 : **Lactate: a promising therapeutic approach in the context of neonatal hypoxia ischemia.** Ifrah Omar, Chloé Perrot, Hélène Roumes, Pierre Goudeneche, Jean-François. Chateil, Marie-Christine Beauvieux, Luc Pellerin, Olivier Tandonnet and Anne-Karine Bouzier-Sore. Journées des Neurosciences Translationnelles de Neuratris, Pornichet, France.

Octobre 2024 : **Lactate: a promising therapeutic approach in the context of neonatal hypoxia ischemia.** Ifrah Omar, Chloé Perrot, Hélène Roumes, Pierre Goudeneche, Jean-François. Chateil, Marie-Christine Beauvieux, Luc Pellerin, Olivier Tandonnet and Anne-Karine Bouzier-Sore. ESMRMB, Barcelone, Espagne.

ORGANISATION DU MANUSCRIT

Ce manuscrit est composé de **six chapitres**. **Le premier chapitre** est divisé en trois parties. La première partie introduit le système nerveux central et l'organisation cérébrale. La deuxième partie se concentre sur le métabolisme cérébral, les substrats énergétiques utilisés par le cerveau, les transporteurs associés, ainsi que leur utilisation par les différentes populations de cellules cérébrales. La dernière partie du chapitre 1 aborde la pathologie au centre de cette thèse, en détaillant ses mécanismes, sa prise en charge actuelle et les différentes approches thérapeutiques envisagées aux niveaux préclinique et clinique.

Le deuxième chapitre décrit le modèle animal utilisé pour reproduire cette pathologie en préclinique, en précisant le protocole suivi ainsi que les différentes techniques utilisées dans ce projet de thèse.

Le troisième chapitre aborde le premier objectif de ce projet et regroupe l'ensemble des résultats obtenus pour y répondre.

Le quatrième chapitre est consacré à l'objectif principal de ce projet, où une approche thérapeutique est proposée et testée pour la première fois en préclinique dans le contexte de cette pathologie. Les résultats obtenus sont présentés en détail dans ce chapitre, ouvrant des perspectives pour une application clinique.

Le cinquième chapitre résume l'évaluation d'une approche en clinique ainsi que les résultats obtenus.

Le dernier chapitre propose un bilan des travaux réalisés et discute les perspectives futures de cette recherche.

SOMMAIRE

CHAPITRE 1	1
1. SYSTEME NERVEUX CENTRAL	1
1.1. ORGANISATION CEREBRALE	2
1.2. ORGANISATION CELLULAIRE.....	2
2. METABOLISME ENERGETIQUE CEREBRAL	5
2.1. SUBSTRATS ENERGETIQUES UTILISES PAR LE CERVEAU.....	5
2.1.1. <i>Glucose</i>	5
2.1.1.1. Glycolyse	5
2.1.1.2. Cycle de Krebs	6
2.1.1.3. Phosphorylation oxydative	8
2.1.1.4. Transporteurs de Glucose	8
2.1.1.5. Profils métaboliques des astrocytes et des neurones.....	9
2.1.1.6. Utilisation du glucose par les oligodendrocytes	11
2.1.1.7. Utilisation du glucose par les microglies	11
2.1.2. <i>Corps cétoniques</i>	12
2.1.2.1. Utilisation des corps cétoniques par les oligodendrocytes.....	14
2.1.2.2. Utilisation des corps cétoniques par les microglies	14
2.1.3. <i>Lactate</i>	14
2.1.3.1. La navette lactate astrocyte-neurone (ANLS)	14
2.1.3.2. Utilisation du lactate par les oligodendrocytes.....	17
2.1.3.3. Utilisation du lactate par les microglies	17
2.1.3.4. Rôle de l'ANLS dans l'apprentissage et la mémoire	19
2.1.4. Importance du concept de navette lactate dans la physiopathologie	20
2.1.4.1. Traumatisme crânien	20
2.1.4.2. Accidents vasculaires cérébraux	20
3. HYPOXIE-ISCHEMIE NEONATALE	21
3.1. GENERALITES, ÉPIDEMIOLOGIE ET ÉTILOGIE SUR L'HYPOXIE-ISCHEMIE DES NOUVEAU-NES	21
3.2. PHYSIOPATHOLOGIE DE L'HYPOXIE-ISCHEMIE NEONATALE	22
3.2.1. Excitotoxicité	24
3.2.2. Stress oxydatif	24
3.2.3. Inflammation	24
3.2.4. La mort neuronale	25
3.3. OUTILS PRONOSTIQUES ET DIAGNOSTIQUES	26
3.3.1. Score de Sarnat.....	26
3.3.2. Score d'APGAR.....	26
3.3.3. Électroencéphalogramme (EEG).....	27
3.3.4. Imagerie par Résonance Magnétique (IRM).....	27
3.3.5. Spectroscopie par Résonance Magnétique (SRM)	28
3.4. PRISE EN CHARGE THERAPEUTIQUE DE L'HIN : L'HYPOTHERMIE THERAPEUTIQUE (HT)	28
3.4.1. Mécanismes d'actions de l'HT	28
3.4.2. Limites de l'hypothermie thérapeutique.....	29
3.4.3. Stratégies thérapeutiques couplées à l'HT dans le cadre de l'HIN	30
3.4.3.1. Xénon	30
3.4.3.2. Allopurinol.....	30
3.4.3.3. Mélatonine.....	31
3.4.3.4. Cellules souches	32
3.4.3.5. Érythropoïétine	32
3.4.3.6. Rôle du lactate dans le cadre de l'HIN	33
4. RÉFÉRENCES.....	36

CHAPITRE 253

1. LE MODELE CLASSIQUE D’HIN DE RICE-VANNUCCI.....	53
1.1. ANIMAUX	54
1.2. PROTOCOLE D’HIN.....	54
1.2.1. Description du protocole chirurgical	55
1.2.2. Limites du modèle et optimisation de son protocole.....	55
1.2.3. Mise en place de l’hypothermie thérapeutique et suivi des températures corporelles	56
1.2.4. Groupes expérimentaux.....	57
2. IMAGERIE PAR RESONANCE MAGNETIQUE (IRM).....	58
2.1. HISTORIQUE ET PRINCIPE DE L’IRM.....	58
2.2. L’IMAGERIE DE DIFFUSION	59
2.2.1 Coefficient de Diffusion Apparent (ADC).....	61
2.2.2. Données IRM/ volumes lésionnels	61
2.2.3. Angiographie	62
3. TESTS DE COMPORTEMENTS.....	63
3.1. REFLEXES PRECOCES (P8, P10, P12)	63
3.1.1. Test de redressement.....	63
3.1.2. Test de géotaxie négative.....	63
3.1.3. Test de la locomotion	63
3.2. MODIFIED NEUROLOGICAL SEVERITY SCORE (P24)	63
3.3. TEST DU LABYRINTHE EN CROIX (P38)	65
3.4. TEST DE RECONNAISSANCE DU NOUVEL OBJET (P42-P45)	65
3.5. TEST DE RESTRICTION ALIMENTAIRE (P51)	65
4. PRELEVEMENTS DES CERVEAUX	66
4.1. HISTOLOGIE	66
4.2. COLORATION AU CRESYL VIOLET	66
4.3. IMMUNOHISTOCHEMIE (IHC).....	67
5. WESTERN BLOT	68
5.1. EXTRACTION PROTEIQUE	68
5.2. DOSAGE PROTEIQUE	68
5.3. LES DIFFERENTES ETAPES DU WB [FIGURE 28].....	68
5.3.1. Migration protéique	68
5.3.2. Transfert sur membrane de nitrocellulose.....	68
5.3.3. Incubation des anticorps primaires et secondaires.....	69
5.3.4. Révélation des protéines.....	69
5.3.5. Quantification.....	69
6. CULTURES PRIMAIRES DE CELLULES MICROGLIALES	70
6.1. PROTOCOLE DE CULTURE PRIMAIRE DE CELLULES MICROGLIALES	70
6.2. ÉTUDE DES MARQUEURS PHENOTYPIQUES PAR IMMUNOFLOUORESCENCE	70
6.3. DOSAGE DES CYTOKINES PRO-INFLAMMATOIRES ET ANTI-INFLAMMATOIRES PAR ELISA	71
7. ANALYSE STATISTIQUE DES RESULTATS.....	72
8. REFERENCES.....	73

CHAPITRE 377

1. INTRODUCTION	77
------------------------------	-----------

2. METHODES	78
3. RESULTATS.....	79
3.1. HYPOTHERMIE ET NEUROPROTECTION A COURT TERME	79
3.2. HYPOTHERMIE ET NEUROPROTECTION A LONG TERME.....	81
3.3. EFFET NEUROPROTECTEUR DE L'HYPOTHERMIE SUR LA MICROGLIE.....	83
3.4. EFFETS D'UN RETARD DANS L'INITIATION DE L'HYPOTHERMIE	83
4. DISCUSSION	84
5. REFERENCES.....	87

ARTICLE 1..... 89

CHAPITRE 4113

1. INTRODUCTION	113
2. METHODES	114
2.1. GROUPES D'ANIMAUX.....	114
2.2. CULTURE IN VITRO DE MICROGLIES PRIMAIRES.....	115
2.3. VIABILITE CELLULAIRE	115
2.4. UTILISATION DU LPS POUR L'ACTIVATION MICROGLIALE	116
2.5. DOSAGE DES CONCENTRATIONS DE TNF-A DANS LE SURNAGEANT CELLULAIRE	116
2.6. DOSAGE DU LACTATE	116
3. RESULTATS.....	117
3.1. EFFET NEUROPROTECTEUR IMMEDIAT DE LA PREMIERE INJECTION DE LACTATE	117
3.2. ÉVOLUTION TEMPORELLE DES LACTATEMIES CHEZ LE RATON P7	117
3.3. EFFET NEUROPROTECTEUR DE LA COMBINAISON LACTATE ET HYPOTHERMIE SUR LES VOLUMES DE LESIONS	118
3.4. EFFET NEUROPROTECTEUR DE LA COMBINAISON LACTATE ET HYPOTHERMIE SUR LES FONCTIONS MOTRICES	120
3.5. EFFET DE LA COMBINAISON LACTATE ET HYPOTHERMIE SUR LA MICROGLIE.....	121
3.6. IMPACT DE L'ADMINISTRATION DU LACTATE SUR L'EXPRESSION DE PROTEINES.....	122
3.7. FENETRE OPTIMALE D'ADMINISTRATION DU LACTATE APRES UNE HIN EN COMBINAISON AVEC L'HYPOTHERMIE	124
3.8. ROLE DU LACTATE SUR LA MODULATION PHENOTYPIQUE DES MICROGLIES.....	126
3.8.1. Évaluation de la pureté de la culture primaire microgliale	126
3.8.2. Viabilité cellulaire	126
3.8.3. Analyse de la sécrétion de TNF- α par les microglies en culture primaire	127
4. DISCUSSION	129
5. REFERENCES.....	135

CHAPITRE 5141

1. UTILISATION DU L-LACTATE DE SODIUM EN NEONATOLOGIE.....	141
1.1. DESIGN ET POPULATION DE L'ÉTUDE.....	142
1.1.1. Critères de la cohorte.....	142
1.1.2. Variables biologiques	142
1.1.3. Caractéristiques de la population.....	142
1.2. ADMINISTRATION L-LACTATE DE SODIUM.....	143
1.3. RECUEIL DES DONNEES	143
1.4. ANALYSES STATISTIQUES	143
2. RESULTATS.....	143

2.1.	ÉVOLUTION DES CONCENTRATIONS SANGUINES DU LACTATE.....	143
2.2.	ÉVOLUTION DU PH AVANT, PENDANT ET APRES LA PERFUSION DE LACTATE DE SODIUM 11,2 %.....	145
2.3.	ÉVOLUTION DES CONCENTRATIONS SANGUINES EN BICARBONATES ET EN CHLORE	146
3.	DISCUSSION	147
4.	REFERENCES	149
ARTICLE 2		151
CHAPITRE 6		173
ANNEXES		179
LISTES ABRÉVIATIONS		184

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : SCHEMA DU SNC.....	1
FIGURE 2 : ORGANISATION CEREBRALE.....	2
FIGURE 3 : ORGANISATION CELLULAIRE.....	4
FIGURE 4 : LES NEURONES.....	4
FIGURE 5 : GLYCOLYSE.....	6
FIGURE 6 : CYCLE DE KREBS.....	7
FIGURE 7 : LA CHAINE RESPIRATOIRE.....	8
FIGURE 8 : PROFILS METABOLIQUES DES ASTROCYTES ET NEURONES.....	10
FIGURE 9 : SWITCHES METABOLIQUE ET PHENOTYPIQUE DES PHENOTYPES DES MICROGLIES.....	11
FIGURE 10 : SCHEMA ILLUSTRANT LE METABOLISME DES CORPS CETONIQUES DANS LE CERVEAU.....	13
FIGURE 11 : ANLS.....	16
FIGURE 12 : ROLE DU LACTATE DANS LES OLIGODENDROCYTES.....	17
FIGURE 13 : ROLE DU LACTATE DANS LES MICROGLIES.....	18
FIGURE 14 : NOMBRE DE NOUVEAU-NES TOUCHES PAR L'HIN.....	22
FIGURE 15 : PHYSIOPATHOLOGIE L'HIN ET SES 4 PHASES.....	23
FIGURE 16 : EFFETS THERAPEUTIQUES DE L'HYPOTHERMIE.....	28
FIGURE 17 : APPROCHES THERAPEUTIQUES COUPLEES A L'HT DANS LE CADRE D'HIN.....	33
FIGURE 18 : SCHEMA DESCRIPTIF DU PROTOCOLE D'HIN.....	54
FIGURE 19 : BAIN-MARIE SERVANT AU CONTROLE DES TEMPERATURES POST-HIN.....	56
FIGURE 20 : SUIVI DES TEMPERATURES RECTALES DES RATONS POST-HIN.....	57
FIGURE 21 : DIFFUSIONS ISOTROPE ET ANISOTROPE.....	60
FIGURE 22 : SEQUENCE D'IRM DE DIFFUSION.....	60
FIGURE 23 : MODIFICATION DE LA VITESSE DE DIFFUSION DES MOLECULES D'EAU DANS L'ISCHEMIE CEREBRALE AIGUE.....	61
FIGURE 24 : REPRESENTATION DES REGIONS D'INTERETS (ROI) POUR LA QUANTIFICATION DES LESIONS.....	62
FIGURE 25 : REPRESENTATION DES ROIS POUR L'ACQUISITION DES VALEURS D'ADC.....	62
FIGURE 26 : ANGIOIRM.....	62
FIGURE 27 : SCHEMA DES COUPES.....	66
FIGURE 28 : SCHEMA RECAPITULATIF DES DIFFERENTES ETAPES DU WB.....	69
FIGURE 29 : SCHEMA EXPERIMENTAL RESUMANT L'ENSEMBLE DES METHODES UTILISEES.....	78
FIGURE 30 : VALEURS D'ADC.....	79
FIGURE 31 : DETERMINATION OPTIMALE DE LA DUREE DE L'HT POUR UNE NEUROPROTECTION A COURT TERME.....	80
FIGURE 32 : DETERMINATION OPTIMALE DE LA DUREE DE L'HT POUR UNE NEUROPROTECTION A LONG TERME.....	81
FIGURE 33 : HISTOLOGIE.....	82
FIGURE 34 : IMMUNOHISTOLOGIE.....	83
FIGURE 35 : EFFETS D'UN RETARD DE L'INITIATION DE L'HT.....	84
FIGURE 36 : SCHEMA EXPERIMENTAL RESUMANT L'ENSEMBLE DES METHODES UTILISEES.....	115
FIGURE 37 : SCHEMA RECAPITULANT LES DIFFERENTES CONDITIONS DE LA CULTURE DES MICROGLIES PRIMAIRES.....	116
FIGURE 38 : EFFET NEUROPROTECTEUR IMMEDIAT DE LA PREMIERE INJECTION DE LACTATE.....	117
FIGURE 39 : ÉVOLUTION TEMPORELLE DES CONCENTRATIONS SANGUINES DE LACTATE.....	118
FIGURE 40 : EFFET NEUROPROTECTEUR DE LA COMBINAISON DU LACTATE AVEC L'HT.....	119
FIGURE 41 : EFFET NEUROPROTECTEUR DE LA COMBINAISON DU LACTATE AVEC L'HT.....	120
FIGURE 42 : EFFET NEUROPROTECTEUR DE LA COMBINAISON DU LACTATE AVEC L'HT.....	121
FIGURE 43 : QUANTIFICATION DE L'INTENSITE DE FLUORESCENCE DU MARQUEUR IBA1.....	122
FIGURE 44 : EXPRESSION PROTEIQUE DU BDNF.....	122
FIGURE 45 : EXPRESSION PROTEIQUE DU SOD2.....	123
FIGURE 46 : EXPRESSION PROTEIQUE DU MCT2, MCT4, G6PDH ET GLAST.....	123
FIGURE 47 : COMPARAISON DE DEUX FENETRES D'ADMINISTRATION DU LACTATE APRES UNE HIN.....	125
FIGURE 48 : POURCENTAGE (%) DE CELLULES MICROGLIALES DANS NOS CULTURES PRIMAIRES.....	126
FIGURE 49 : VIABILITE DES MICROGLIES EN PRESENCE DE LACTATE.....	126
FIGURE 50 : DOSAGE DE TNF-A PAR ELISA.....	127
FIGURE 51 : DOSAGES DE LACTATE.....	128
FIGURE 52 : QUANTIFICATION DE L'INTENSITE DE FLUORESCENCE DU MARQUEUR PRO-INFLAMMATOIRE CD86.....	128
FIGURE 53 : QUANTIFICATION DE L'INTENSITE DE FLUORESCENCE DU MARQUEUR ANTI-INFLAMMATOIRE CD206.....	129
FIGURE 54 : ÉVOLUTION DE LA LACTATEMIE APRES LA NAISSANCE.....	144

FIGURE 55 : ÉVOLUTION DU PH SANGUIN APRES LA NAISSANCE.....	146
FIGURE 56 : ÉVOLUTION DES VALEURS DE BICARBONATES APRES LA NAISSANCE.....	146
FIGURE 57 : ÉVOLUTION DES VALEURS DE CHLORE APRES LA NAISSANCE.....	147
FIGURE 58 : SCHEMA DE SYNTHESE.....	176

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : CLASSIFICATION DE SARNAT ET SARNAT.....	27
TABLEAU 2 : TEST DU MNSS.....	64
TABLEAU 3 : LISTE DES DIFFERENTS ANTICORPS PRIMAIRES UTILISES DANS NOTRE ETUDE.....	67
TABLEAU 4 : LISTE DES DIFFERENTS ANTICORPS SECONDAIRES UTILISES DANS NOTRE ETUDE.....	68
TABLEAU 5 : LISTE DES ANTICORPS UTILISES POUR LE WESTERN BLOT.....	70
TABLEAU 6 : LISTE DES DIFFERENTS ANTICORPS PRIMAIRES UTILISES POUR L'IMMUNOHISTOCHEMIE.....	71

Chapitre 1 : Introduction

Cette première partie est dédiée à l'étude de l'organisation cérébrale et cellulaire du système nerveux central.

1. Système nerveux central

Le système nerveux des vertébrés se divise en deux parties : le système nerveux central (SNC) et le système nerveux périphérique. Le SNC joue un rôle essentiel dans l'intégration des informations reçues et la coordination des activités de l'organisme. Il contrôle, régule et harmonise les principales fonctions de l'organisme, telles que la motricité, la perception sensorielle, les fonctions intellectuelles et émotionnelles, ainsi que la régulation des organes. Le SNC est constitué de **l'encéphale** (cerveau, cervelet et tronc cérébral) et de **la moelle épinière** [Figure 1], tandis que le système nerveux périphérique comprend principalement les nerfs crâniens et spinaux.

Le cerveau est un organe constitué de tissu nerveux, responsable des réactions, des sensations, des mouvements, des émotions, de la communication, ainsi que du traitement de la pensée et de la mémoire. Il est protégé par le crâne, les méninges et le liquide céphalorachidien. Le tissu nerveux, très délicat, peut être endommagé par la moindre force. De plus, le cerveau est doté d'une barrière hémato-encéphalique (BHE) qui empêche les diverses substances nocives présentes dans le sang de pénétrer dans le cerveau.

La moelle épinière, située dans la colonne vertébrale, est un élément essentiel du SNC. Elle a pour fonction de transmettre les messages nerveux entre le cerveau et le reste du corps. Elle comprend un centre de coordination de certains réflexes indépendants de la commande cérébrale et permet le transfert d'informations motrices aux muscles, d'informations sensorielles vers le cortex. La moelle épinière est protégée par la colonne vertébrale (Thau et al., 2024).

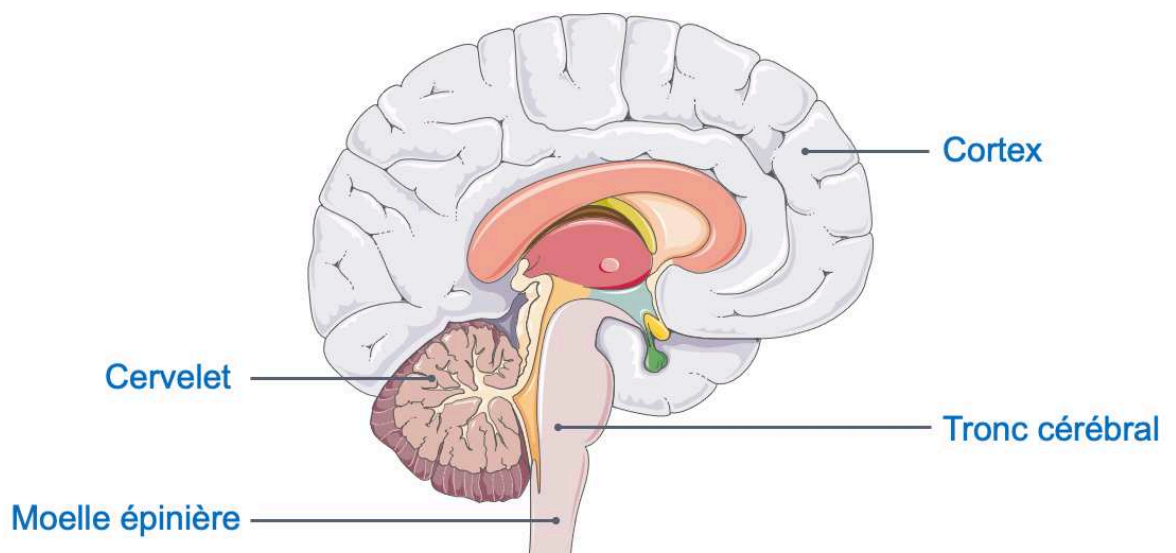


Figure 1: Schéma du SNC. Coupe d'un cerveau humain d'adulte.

1.1. Organisation cérébrale

Le cerveau est constitué de deux hémisphères (droit et gauche) reliés par le corps calleux. Chez seulement 10 % des individus, les rôles des deux hémisphères sont équivalents ou inversés (Papadatou-Pastou et al., 2020), tandis que pour la majorité, l'hémisphère gauche prédomine. Cela signifie que l'hémisphère gauche est plus actif ou dominant que l'hémisphère droit dans certaines fonctions cérébrales, comme le langage, la logique ou l'analyse. Autrement dit, chez la majorité des individus, c'est l'hémisphère gauche qui joue un rôle principal dans certaines activités mentales, par rapport à l'hémisphère droit. Ainsi, bien que le cerveau soit morphologiquement quasi-symétrique, il présente une latéralisation fonctionnelle (Johnstone et al., 2021).

Chaque hémisphère cérébral comprend un lobe frontal, responsable du raisonnement, des fonctions du langage et de la coordination motrice volontaire ; un lobe pariétal, qui gère la conscience du corps et de l'espace environnant ; un lobe occipital, qui permet l'intégration des informations visuelles ; et un lobe temporal, qui est le centre de l'audition, de la mémoire et des émotions [Figure 2a].

Il existe deux autres lobes internes :

- Le lobe limbique, composé de l'hippocampe, de l'amygdale, de l'hypothalamus, du septum et du fornix, qui traite les informations liées aux émotions et à la mémoire ;
- Le lobe de l'insula, situé sous les lobes temporal et pariétal, composé de plus de douze aires distinctes. Il est généralement associé aux fonctions limbiques et joue un rôle important dans la perception de la douleur, des odeurs, du goût, ainsi que dans la conscience de soi [Figure 2b].

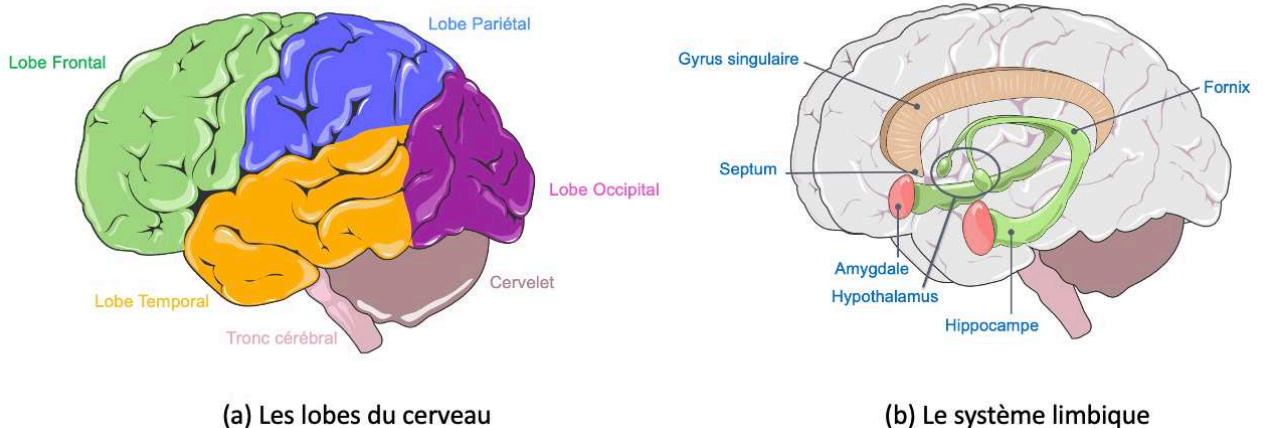


Figure 2 : Organisation cérébrale. (a) Les lobes frontal, temporal, pariétal et occipital. (b) Le système limbique. Les différentes zones cérébrales, appelées lobes, sont responsables de diverses fonctions.

1.2. Organisation cellulaire

Dans le cerveau humain, on retrouve plusieurs types de cellules qui sont regroupées en deux catégories : les cellules nerveuses (ou neurones, au nombre estimé d'environ 86 milliards) et les cellules gliales (ou névroglie, au nombre estimé comparable ou légèrement inférieur à celui des neurones, estimé à environ 85 milliards avec des différences régionales substantielles (Herculano-Houzel, 2009; Verkhratsky & Butt, 2018)). Les neurones permettent la transmission des signaux nerveux alors que les cellules gliales sont impliquées dans un large éventail de processus essentiels au bon fonctionnement du SNC [Figure 3].

Les neurones, cellules excitables du système nerveux, transmettent les informations entre les différentes régions du SNC. Ils sont composés (i) d'un **corps cellulaire** (ou soma), délimité par une membrane cellulaire, qui renferme un noyau et divers éléments essentiels au métabolisme, tels que les mitochondries, l'ensemble baignant dans du cytoplasme, liquide intracellulaire commun à toutes les cellules du corps et (ii) **d'extensions** appelées des neurites. Ces neurites se divisent en 2 groupes : les dendrites et l'axone. Les dendrites sont de nombreux prolongements courts du neurone, tandis que l'axone est un long prolongement fibreux, pouvant être de longueur variable qui se divise lui-même, à son extrémité, en fines branches ou ramifications et se termine par une arborisation. L'extrémité de l'axone entre en contact avec les dendrites des neurones voisins au niveau de la synapse, permettant ainsi la transmission des informations entre les neurones. Les axones sont protégés par les gaines de myéline [Figure 4a]. Structurellement, on distingue trois types de neurones : les neurones unipolaires (principalement sensoriels), bipolaires (sensoriels), et multipolaires (moteurs et interneurones), en fonction du nombre de neurites provenant directement du corps cellulaire [Figure 4b].

Les cellules gliales constituent l'environnement des neurones et assurent des fonctions de soutien et de protection, notamment en fournissant des nutriments et de l'oxygène. Contrairement à la majorité des cellules nerveuses, elles conservent leur capacité de prolifération tout au long de la vie. Les principales populations de cellules gliales se répartissent en trois grands groupes : **les astrocytes, les oligodendrocytes et la microglie** (Jäkel & Dimou, 2017).

Les astrocytes sont les cellules gliales les plus grandes et les plus abondantes du cerveau. L'étymologie du mot "astrocyte" vient de "astro", qui signifie étoile, et de "cyte", qui signifie cellule. Comme leur nom l'indique, ces cellules ont généralement une forme étoilée. Les astrocytes sont présents uniquement dans le SNC et sont caractérisés par une morphologie qui varie selon leur localisation dans le cerveau. Ils jouent un rôle essentiel dans la mise en place des neurones lors du développement (Tardy, 1991). Ils participent à la synthèse et à la régulation des neurotransmetteurs, facilitant ainsi la communication entre les neurones et limitant l'excitotoxicité du glutamate grâce à sa recapture. Ainsi, ils maintiennent l'équilibre et la composition du milieu extracellulaire. De plus, ils assurent la transmission de l'oxygène et des substrats énergétiques du sang aux neurones, tout en évacuant les déchets neuronaux vers le sang. Ces fonctions permettent aux astrocytes de soutenir le métabolisme énergétique des neurones (Pellerin et al., 2007). Les astrocytes peuvent se connecter entre eux via des jonctions communicantes, formant ainsi un réseau fonctionnel appelé syncytium (Scemes & Giaume, 2006). Ce réseau permet l'échange de métabolites et la propagation de signaux, facilitant ainsi la coordination de leurs activités dans le cerveau. En outre, les astrocytes participent à la formation de la synapse tripartite, où ils interagissent avec les neurones et la fente synaptique pour moduler la transmission synaptique, jouant un rôle actif dans la régulation de la communication neuronale (Panatier et al., 2011).

Les oligodendrocytes, plus petits que les astrocytes, forment les gaines de myéline autour des axones dans le SNC, protégeant ainsi les neurones. Cette gaine de myéline accélère la propagation du signal (ou potentiel d'action) le long du neurone et peut être renouvelée jusqu'à trois fois en 24 heures (Xu et al., 2016). Un seul oligodendrocyte peut fournir des gaines de myéline à plusieurs axones de différents neurones (McTigue & Tripathi, 2008).

Les cellules microgliales sont des cellules immunitaires résidentes du SNC. Elles sont impliquées dans l'organisation synaptique, le soutien neuronal trophique pendant le développement, le renouvellement de la myéline, le contrôle de l'excitabilité neuronale, ainsi que la protection et la réparation du cerveau (Bachiller et al., 2018). De plus, en tant que principale source de cytokines inflammatoires, les cellules microgliales sont des médiateurs essentiels de la neuroinflammation et peuvent induire un large spectre de réponses cellulaires (Colonna & Butovsky, 2017). Elles se polarisent vers des phénotypes pro- et anti-inflammatoires avec des fonctions distinctes. Les microglies pro-inflammatoires sont caractérisées par une motilité rapide, la production des espèces réactives de l'oxygène (ERO ou ROS), la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires et la phagocytose. De plus, elles sont capables de moduler la barrière hémato-encéphalique (BHE), facilitant ainsi l'infiltration d'autres

cellules immunitaires dans le SNC (Devanney et al., 2020). En revanche, les microglies anti-inflammatoires nécessitent une activation prolongée pour induire la transcription des gènes impliqués dans la réparation tissulaire, la sécrétion des cytokines anti-inflammatoires, ainsi que la dégradation des acides aminés et des acides gras pour produire des facteurs de croissance (Devanney et al., 2020). Elles jouent également un rôle crucial dans l'élimination des débris cellulaires, ainsi que dans la suppression des synapses redondantes ou inutilisées (phénomène appelé « pruning ») et des agrégats de protéines, susceptibles de nuire au bon fonctionnement du SNC (Colonna & Butovsky, 2017). Le *pruning* intervient principalement pendant le développement précoce du cerveau, notamment durant l'enfance et l'adolescence, mais peut se poursuivre à l'âge adulte. Il est essentiel pour l'apprentissage, la mémoire et l'adaptation du cerveau aux nouvelles expériences. Un dérèglement du *pruning* synaptique a été associé à des troubles neurologiques et psychiatriques, tels que la schizophrénie, l'autisme ou encore la maladie d'Alzheimer (Cardozo et al., 2019).

Parmi les cellules gliales, environ 50 % sont des astrocytes (Pelvig et al., 2008), 10 % des microglies (Masuda et al., 2020), tandis que 40 % sont des oligodendrocytes. Cependant, des études ont révélé que les oligodendrocytes sont bien plus nombreux que prévu, notamment dans la substance blanche (Sherman & Brophy, 2005).

À l'échelle macroscopique, le SNC est constitué de substance grise, principalement composée des corps cellulaires des neurones, et de substance blanche, formée par les axones myélinisés. Ces axones, qui composent la substance blanche, forment des fibres neuronales reliant les neurones entre différentes régions du cerveau.

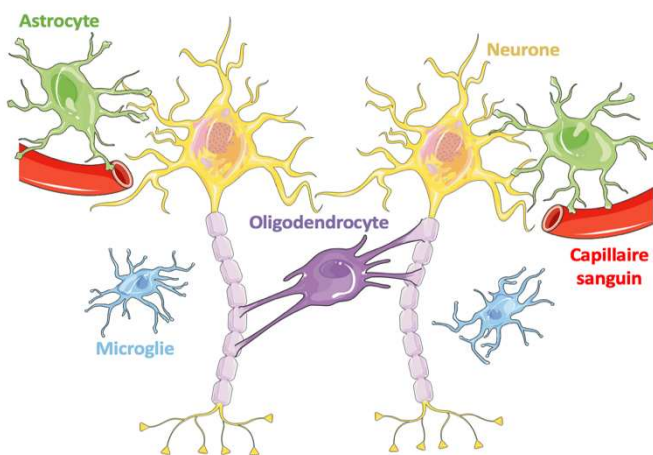
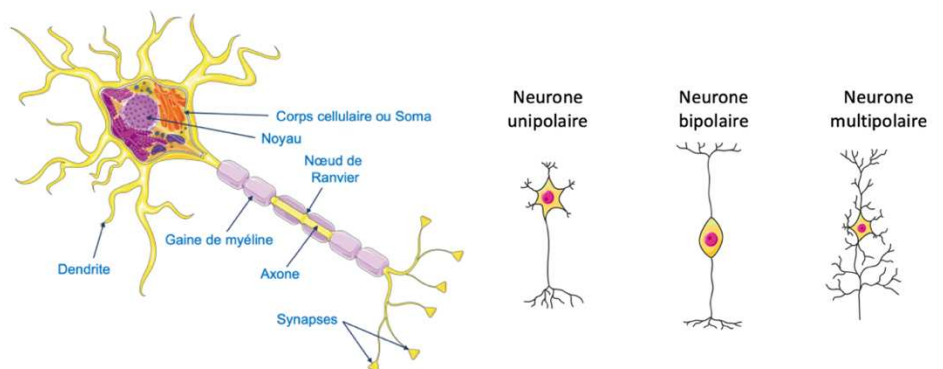


Figure 3 : Organisation cellulaire. Les neurones (en jaune), les astrocytes (en vert), les oligodendrocytes (en violet) et la microglie (en bleu) collaborent en synergie pour assurer la transmission de l'information cérébrale et le bon fonctionnement cérébral.

Figure 4 : Les neurones.

(a) Schéma de la composition neuronale. (b) Schéma des différents types de neurones. De gauche à droite : un neurone unipolaire, un neurone bipolaire et un neurone multipolaire.



(a) Composition du neurone

(b) Différents types de neurone

2. Métabolisme énergétique cérébral

Le cerveau est un organe énergivore. Bien qu'il ne représente que 2 % de la masse corporelle totale, le cerveau adulte consomme 20 % de l'oxygène (O₂) et utilise 25 % du glucose total (environ 5,6 mg de glucose pour 100 g de tissu cérébral humain par minute) (Erbsloh et al., 1958). Parmi les cellules cérébrales, les neurones dépensent 70 à 80 % de l'énergie totale, la partie restante étant utilisée par les cellules gliales (Harris et al., 2012; Hyder et al., 2013).

Plusieurs mécanismes régulent l'utilisation et la production de l'énergie dans le cerveau. Bien que le cerveau nécessite une grande quantité d'énergie, il dispose de réserves énergétiques minimales (glycogène astrocytaire), insuffisantes pour couvrir la totalité de ses besoins. Par conséquent, il dépend principalement des substrats énergétiques provenant du sang, qui passent à travers la BHE. En conditions physiologiques, le glucose est son principal carburant énergétique. Cependant, des études ont montré que lorsque la disponibilité du glucose est limitée, le cerveau peut utiliser des substrats énergétiques alternatifs, notamment les corps cétoniques ; Hasselbalch et al., 1994) et le lactate (Rabinowitz & Enerbäck, 2020; Bouzier-Sore et al., 2003; Schurr, 2006).

Dans le cerveau, il existe plusieurs isoformes de transporteurs de glucose (GLUTs) et de transporteurs des acides monocarboxyliques (MCTs), spécifiques pour le lactate, le pyruvate et les corps cétoniques. Ces transporteurs permettent l'absorption des substrats énergétiques depuis la circulation sanguine à travers la membrane cellulaire endothéliale jusqu'aux cellules cérébrales. L'absorption de ces substrats par les cellules cérébrales dépend du type et de la distribution des transporteurs spécifiques à chaque type de cellule, du taux de transport, du nombre de transporteurs et de l'activité catalytique de chaque transporteur.

2.1. Substrats énergétiques utilisés par le cerveau

Dans cette partie, nous allons mettre l'accent sur les différents substrats énergétiques utilisés par le cerveau, les transporteurs correspondants et leur utilisation par les différents types cellulaires.

2.1.1. Glucose

Après leur absorption via les aliments que nous consommons, les glucides sont dégradés en glucose grâce à l'action d'enzymes présentes dans la salive et notre tube digestif. **Ce glucose est transporté dans le sang jusqu'aux cellules, muscles et organes, où il est utilisé comme principale source d'énergie. Le glucose va être métabolisé et sa dégradation va permettre la production d'énergie sous forme d'adénosine triphosphate (ATP).** Le catabolisme du glucose en ATP se déroule principalement via deux processus : la glycolyse et la respiration cellulaire.

- **Glycolyse** : Le glucose (C₆H₁₂O₆) est d'abord décomposé en deux molécules de pyruvate dans le cytoplasme des cellules, produisant 2 molécules d'ATP et des électrons sous forme de NADH.
- **Cycle de Krebs et chaîne de transport des électrons** : Le pyruvate entre ensuite dans la mitochondrie, où il est entièrement oxydé dans le cycle de Krebs, produisant plus de NADH et FADH₂. Ces électrons sont ensuite transférés à la chaîne de transport des électrons, où l'énergie est utilisée pour générer un gradient de protons à travers la membrane mitochondriale. Ce gradient alimente la synthèse d'ATP par l'ATP synthase.

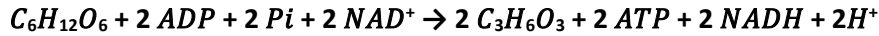
Au total, la dégradation complète d'une molécule de glucose produit en théorie 38 molécules d'ATP.

2.1.1.1. Glycolyse

La glycolyse (aussi appelée Embden-Meyerhof-Parnas) est une voie biochimique vitale qui permet aux cellules de convertir l'énergie du glucose en formes biologiques d'énergie. Elle correspond à la première étape catabolique de la respiration cellulaire aérobie (c'est-à-dire en présence de l'oxygène) et anaérobie (absence d'oxygène) et se déroule entièrement dans le cytoplasme des cellules. La

glycolyse débute avec la phosphorylation du glucose, molécule à 6 atomes de carbone, et se termine par la synthèse de deux pyruvates, molécules à 3 atomes de carbone. Elle permet la production de 2 molécules d'ATP et la régénération de 2 NADH, H⁺.

L'équation bilan de la glycolyse est la suivante :



La glycolyse est composée de deux phases chacune comprenant cinq réactions biochimiques. Au cours de la première phase (réactions 1 à 5), appelée phase de consommation d'énergie, des molécules d'ATP sont utilisées pour phosphoryler le glucose en positions C₁ et C₆. Les cinq réactions suivantes constituent la phase de production d'énergie, durant laquelle des molécules d'ATP et de NADH, H⁺ sont synthétisées [Figure 5].

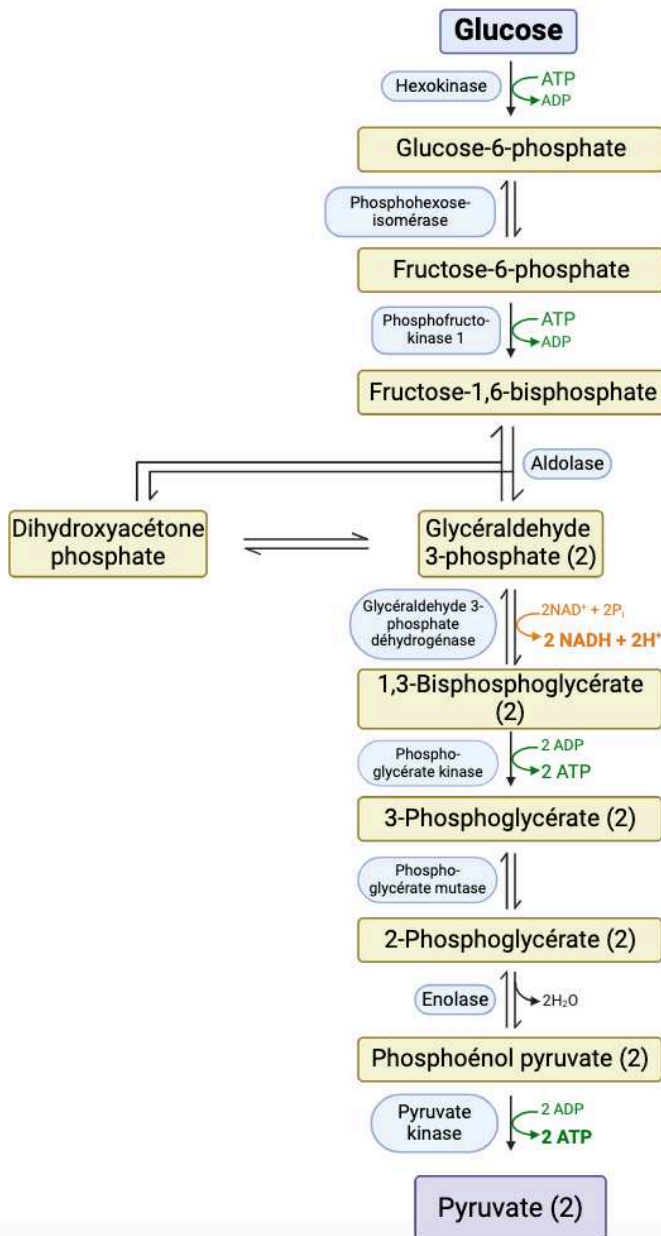


Figure 5 : Glycolyse.

Schéma illustrant les réactions chimiques de la glycolyse (glucose → pyruvate). Ce processus se déroule dans le cytoplasme. Au cours de cette voie métabolique, une molécule de glucose est dégradée pour produire deux molécules de pyruvate et deux molécules d'ATP.

- ADP : adénosine diphosphate
- ATP : adénosine triphosphate
- H₂O : eau
- NAD⁺ : Nicotinamide Adénine Dinucléotide
- NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide réduit

2.1.1.2. Cycle de Krebs

Le cycle de Krebs (ou cycle de l'acide citrique ou cycle des acides tricarboxyliques) est une série de 8 réactions enzymatiques se déroulant dans la mitochondrie. Il suit la glycolyse et permet l'oxydation complète du pyruvate, pour extraire de l'énergie. Le pyruvate est tout d'abord converti en acétyl-

coenzyme A (acétyl-CoA) par la pyruvate déshydrogénase (PDH). Cette enzyme produit une molécule de NADH, H⁺ par molécule de pyruvate, et un acétyl-CoA qui va alimenter le cycle de Krebs (Krebs, 1940). Au cours du cycle, l'acétyl-CoA subit plusieurs décarboxylations (pertes de molécules de CO₂), libérant des électrons sous forme de NADH et FADH₂, qui seront utilisés pour produire de l'ATP dans la chaîne respiratoire. Ainsi, la majorité de l'énergie fournie par les différentes étapes d'oxydation du cycle de Krebs se retrouve stockée sous la forme de coenzymes réduits (NADH, H⁺ et FADH₂). À chaque cycle, le cycle de Krebs ne produit qu'une seule molécule d'ATP (sous forme de GTP), trois molécules de NADH et une molécule de FADH₂ qui seront réoxydées lors la phosphorylation oxydative afin de produire de l'ATP [Figure 6].

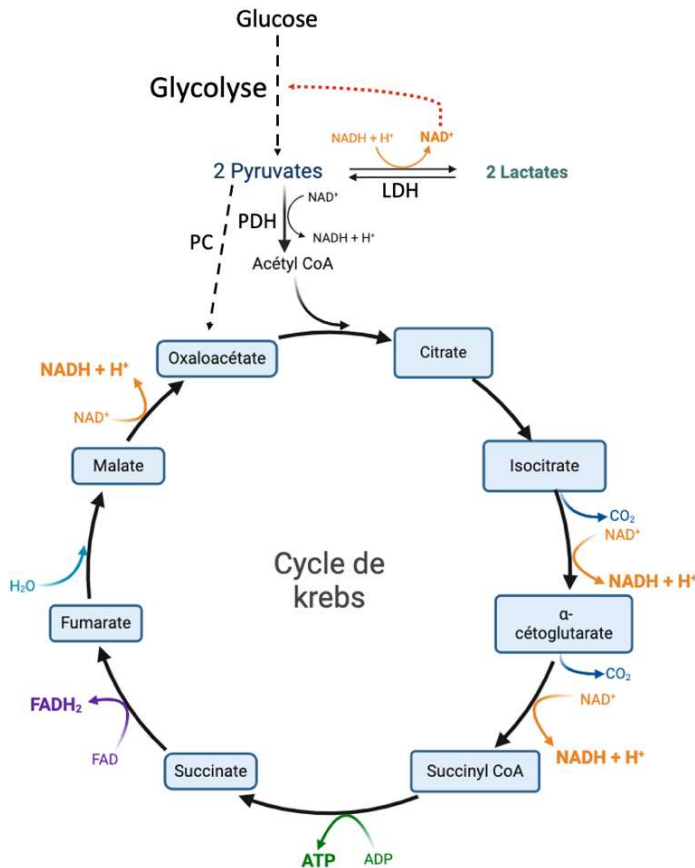


Figure 6 : Cycle de Krebs.

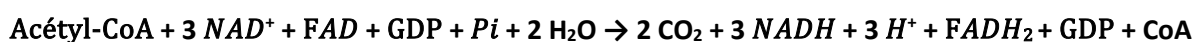
Le cycle de Krebs se déroule dans la mitochondrie. L'acétyl-CoA, produit à partir du pyruvate, apporte deux atomes de carbone qui ressortent sous la forme oxydée de dioxyde de carbone CO₂. La majorité de l'énergie fournie par le cycle de Krebs se retrouve stockée sous la forme de 3 NADH, H⁺ et de 2 FADH₂, alors qu'une seule molécule d'ATP (GTP) est produite directement pendant un tour du cycle.

- Acétyl-CoA : acétyl coenzyme A
- ADP : adénosine diphosphate
- ATP : adénosine triphosphate
- CO₂ : dioxyde de carbone
- FAD : Flavine Adénine Dinucléotide
- FADH₂ Flavine Adénine Dinucléotide réduit
- H₂O : eau
- LDH : lactate déshydrogénase
- NAD⁺ : Nicotinamide Adénine Dinucléotide
- NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide réduit
- PDH : pyruvate déshydrogénase
- PC : pyruvate carboxylase.

Le pyruvate, formé à l'issue de la glycolyse, peut aussi être converti en lactate via la lactate déshydrogénase (LDH) dans le cytosol, un processus qui régénère du NAD⁺ à partir du NADH. Cette réaction de conversion du NADH en NAD⁺ est essentielle pour maintenir le potentiel d'oxydo-réduction cellulaire, permettant ainsi la poursuite de la glycolyse, notamment lorsque le métabolisme oxydatif est ralenti ou inhibé.

Enfin, le pyruvate peut être transformé en oxaloacétate grâce à la pyruvate carboxylase (PC), une enzyme spécifiquement exprimée dans les astrocytes (Shank et al., 1985), jouant un rôle crucial dans l'apport de nouveaux carbones au cycle de Krebs par un processus appelé anaplérose. Ce mécanisme permet ensuite la sortie de carbones du cycle sous forme de glutamate (et GABA), qui seront exportés vers les neurones.

L'équation bilan du cycle de Krebs est la suivante :



2.1.1.3. Phosphorylation oxydative

La phosphorylation oxydative est la dernière étape du catabolisme du glucose. Elle se déroule dans la matrice mitochondriale. Les molécules réductrices que sont NADH, H⁺ et FADH₂ formées durant la glycolyse, l'oxydation du pyruvate et le cycle de Krebs vont transférer leurs électrons à la chaîne de transport des électrons, située au niveau de la membrane mitochondriale interne via les enzymes respiratoires (NAD⁺ par la NADH déshydrogénase, FAD⁺ par la succinate déshydrogénase, Q10 par la cytochrome c réductase, alimentant les complexes I, II et III, respectivement). Le dernier accepteur d'électrons étant le dioxygène, cela signifie que ces réactions ne peuvent se produire qu'en milieu aérobic. Cette succession de transfert d'électrons va produire un gradient de protons (gradient électrochimique) qui permettra la production d'ATP via l'ATP synthase [Figure 7].

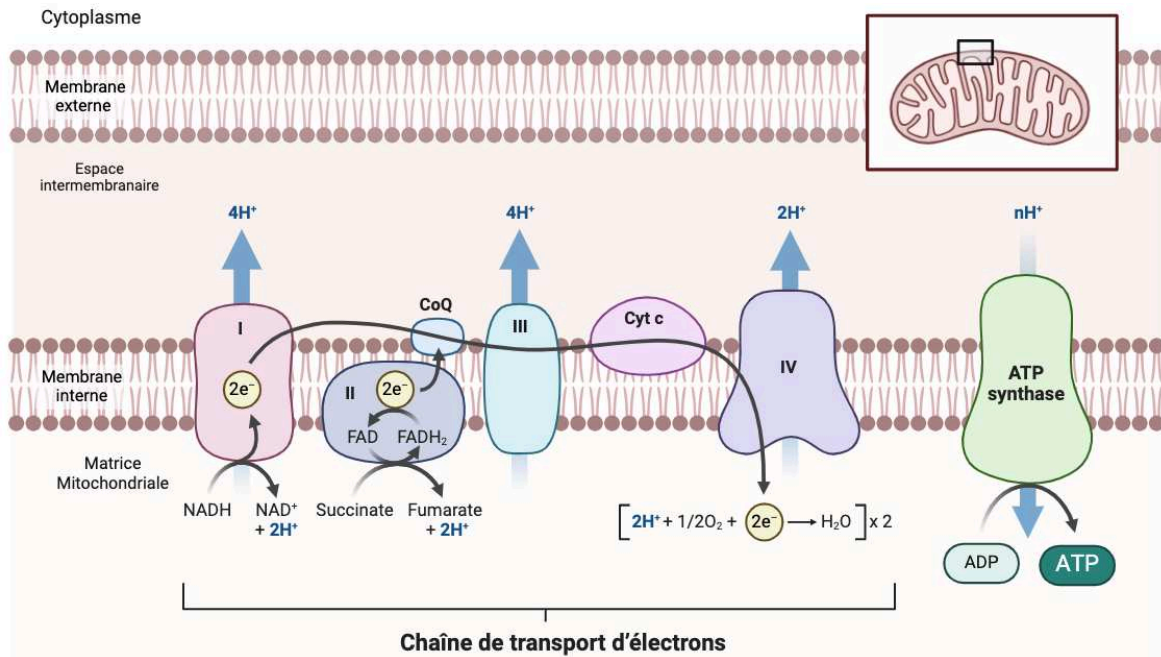


Figure 7 : La chaîne respiratoire. Elle est localisée dans la membrane interne de la mitochondrie. Elle se compose de 5 complexes protéiques (le complexe V étant l'ATP synthase), de structure complexe, en partie incluse dans la membrane mitochondriale interne. Ces complexes facilitent le transport des électrons. La circulation des électrons le long des complexes I à IV de la chaîne respiratoire libère de l'énergie qui va permettre, grâce au pompage de protons, de générer un gradient de concentration H⁺ à travers la membrane interne. La force proton motrice ainsi générée sera utilisée par l'ATP synthase pour produire de l'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique (Pi). ADP : adénosine diphosphate ; ATP : adénosine triphosphate ; FAD : Flavine Adénine Dinucléotide ; FADH₂ Flavine Adénine Dinucléotide réduit ; H₂O : eau ; NAD⁺ : Nicotinamide Adénine Dinucléotide ; NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide réduit ; O₂ : oxygène.

En tenant compte de la diffusion passive de certains protons à travers la membrane mitochondriale, chaque molécule de NADH génère environ 2,5 molécules d'ATP, tandis que chaque molécule de FADH₂ en produit environ 1,5. Le bilan énergétique total de la dégradation complète d'une molécule de glucose s'élève ainsi à 32 ATP. Ce calcul comprend :

- Glycolyse : 2 ATP et 2 NADH (équivalents à 5 ATP),
- Conversion des 2 molécules de pyruvate en 2 acétyl-CoA : 2 NADH (5 ATP),
- Cycle de Krebs : 2 GTP (ou ATP), 6 NADH (15 ATP) et 2 FADH₂ (3 ATP).

2.1.1.4. Transporteurs de Glucose

Les transporteurs de glucose dans le cerveau jouent un rôle clé dans de nombreuses fonctions cérébrales en condition saine comme pathologique. Chez l'adulte, la forte demande énergétique du SNC est principalement satisfaite par l'apport en glucose du sang, grâce aux transporteurs de glucose

présents sur les capillaires et les cellules cérébrales (Koepsell, 2020). Il existe plusieurs isoformes de transporteurs du glucose dans notre corps mais nous discuterons uniquement de ceux jouant un rôle dans le transport du glucose du sang au cerveau, à savoir **GLUT1, GLUT3 et GLUT5**.

- GLUT1 est un transporteur du glucose qui est principalement et fortement exprimé dans la membrane des cellules endothéliales avec une masse moléculaire apparente de 55 kDa et dans les pieds astrocytaires avec une masse moléculaire de 45 kDa (S. J. Vannucci et al., 1998). Ce transporteur possède une très forte affinité pour le D-glucose (Alvarez et al., 2013). De plus, les oligodendrocytes expriment le transporteur GLUT1, permettant au glucose d'entrer dans la cellule et de contribuer à la synthèse des lipides, soit comme précurseur, soit en produisant de l'ATP lors de la glycolyse (Fünfschilling et al., 2012; Saab et al., 2016).
- GLUT3, une autre isoforme des transporteurs de glucose, est majoritairement exprimé par les neurones. Des études ont révélé la présence de ce transporteur dans diverses structures cérébrales, telles que le cortex cérébral, l'hippocampe et le cervelet (Mantych et al., 1992; Apelt et al., 1999; Moroo & Yamada, 1994).
- GLUT5 est principalement localisé dans les cellules microgliales (Maher et al., 1994; Payne et al., 1997).

Il est important de noter que le métabolisme du glucose dans le cerveau immature diffère de celui de l'adulte, avec un taux d'utilisation du glucose relativement faible, ne représentant que 10 % de la valeur observée chez l'adulte, durant les premières semaines postnatales (Nehlig et al., 1988; R. C. Vannucci et al., 1994). Des études ont montré que les nouveau-nés, tant chez les humains que chez les rongeurs, peuvent facilement utiliser d'autres substrats énergétiques, tels que les corps cétoniques (voir **2.1.2.**), pour satisfaire leurs besoins énergétiques cérébraux (Edmond et al., 1985; Nehlig & Pereira de Vasconcelos, 1993). De plus, les niveaux d'expression des transporteurs de glucose GLUT sont bas durant les premières semaines postnatales. Les expressions de GLUT1 et 3 augmentent progressivement au cours du mois qui suit la naissance pour atteindre des niveaux comparables à ceux de l'adultes (S. J. Vannucci, 1994). Cela suggère que le métabolisme cérébral du glucose serait limité par sa capacité de transport chez le nouveau-né (Brekke et al., 2017; S. J. Vannucci et al., 1994).

2.1.1.5. Profils métaboliques des astrocytes et des neurones

Les différents types de cellules du SNC présentent des profils métaboliques distincts, qui ont été particulièrement caractérisés pour les neurones et les astrocytes. L'idée d'un métabolisme prédominant différencié entre les neurones et les cellules gliales a émergé dès la fin des années 50 grâce à des études neurochimiques de Hydén. En effet, ses travaux ont révélé que les neurones produisaient du CO₂ à un taux supérieur à celui de la « neuroglie ». En explorant l'activité enzymatique, notamment celle de la succinoydase (utilisée dans le cycle de Krebs), Hydén a montré un caractère oxydatif des neurones, qui augmentait après stimulation (du système vestibulaire) et qui n'était pas observé pour la neuroglie ; Hydén & Lange, 1962).

Les astrocytes sont localisés entre les vaisseaux sanguins et les neurones. Leurs pieds astrocytaires entourent les capillaires sanguins, participant au maintien de la BHE. De par leur situation privilégiée, ils sont idéalement placés pour absorber le glucose via le transporteur GLUT1. Une autre caractéristique métabolique des astrocytes est qu'ils disposent de réserves de glycogène, qui peuvent être mobilisées pour former du glucose-6-phosphate (G6P). Bien qu'une fraction du glucose puisse être utilisée par la voie des pentoses phosphates (PPP) (Camandola & Mattson, 2017), la majorité du glucose est métabolisée par la glycolyse dans les astrocytes, ce qui aboutit à sa conversion en lactate, qui est ensuite libéré dans le milieu extracellulaire (Itoh et al., 2003; Pellerin & Magistretti, 1994). La prédominance du métabolisme glycolytique chez les astrocytes, ainsi que leur tendance à produire du lactate, s'explique par un profil d'expression génique spécifique impliquant des enzymes et des transporteurs travaillant en synergie [**Figure 8a**]. Un des éléments moléculaires clé de ce métabolisme est l'expression réduite du complexe promoteur d'anaphase/cyclosome (APC/C) -Cdh1, une ubiquitine ligase qui cible l'enzyme glycolytique 6-phosphofructokinase-2,6-bisphosphatase-3 (PFKFB3) pour la dégrader. PFKFB3 est une enzyme responsable de la génération de fructose-2,6-bisphosphate

(fructose-2,6BP), activateur allostérique de la phosphofructokinase (PFK), étape limitante de la glycolyse. Cette faible expression de l'APC/C-Cdh1 chez les astrocytes permet une forte expression de la PFKFB3, ce qui favorise un taux élevé de la glycolyse chez ces cellules (Camandola & Mattson, 2017). Une autre caractéristique, au niveau de la mitochondrie cette fois, est la faible expression du transporteur aspartate/glutamate (AGC), un composant de la navette malate-aspartate qui contrôle le transfert de molécules à caractère réducteur (comme le NADH) du cytosol vers la mitochondrie (Berkich et al., 2007; Ramos et al., 2003). Dans ces conditions, la conversion du pyruvate, provenant de la glycolyse, en lactate dans le cytosol fournit un moyen de maintenir un rapport $NAD^+ / NADH$ élevé, essentiel en tant que substrat pour la réaction catalysée par la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase et contribue au maintien d'un taux glycolytique élevé (Pellerin & Magistretti, 2004; Hirrlinger & Dringen, 2010). De plus, la conversion du pyruvate en lactate dans les astrocytes peut également être favorisée par la faible activité (Laughton et al., 2007) de la pyruvate déshydrogénase (PDH), une enzyme clé qui régule l'entrée du pyruvate dans le cycle de Krebs, en raison de sa phosphorylation via la pyruvate déshydrogénase kinase (PDK) (Halim et al., 2010; Camandola & Mattson, 2017; Itoh et al., 2003).

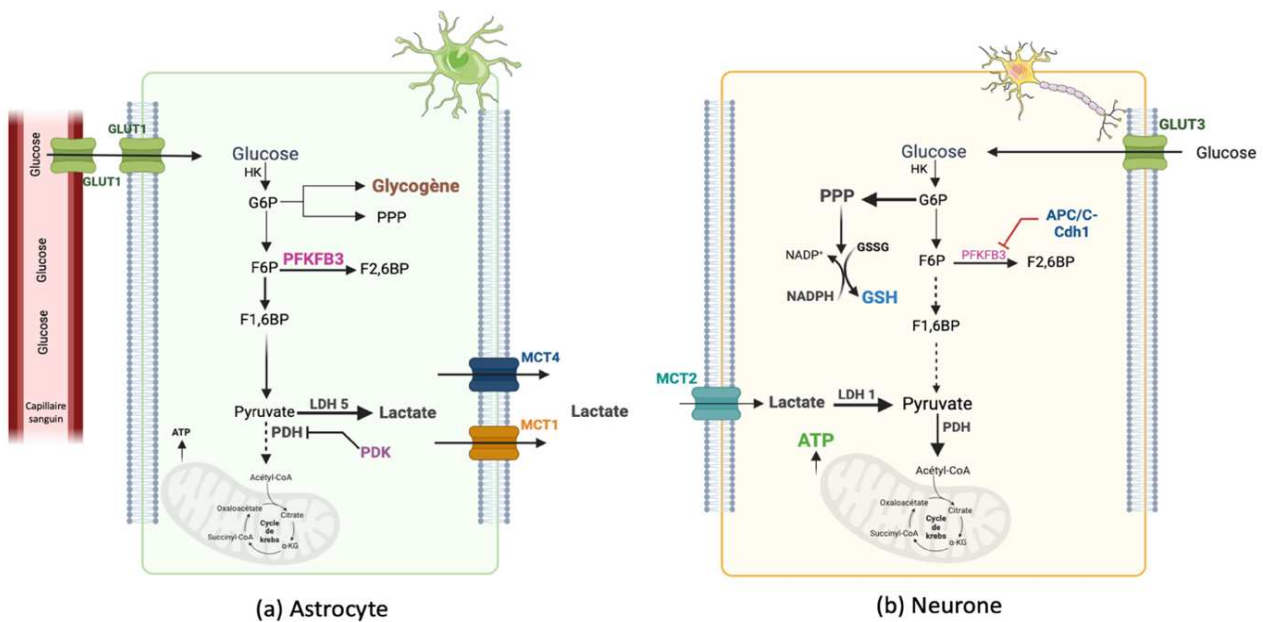


Figure 8 : Profils métaboliques des astrocytes et neurones, adaptée de Camandola & Mattson, 2017.

ATP: adénosine triphosphate ; Acétyl-CoA : acétyl coenzyme A ; APC/C-Cdh1 : complexe promoteur d'anaphase/cyclosome ; α -KG : α -Cétoglutarate ; NAD^+ : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate ; $NADPH$: nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit ; G6P : glucose-6-phosphate ; GSH : glutathion réduit ; GSSG : glutathion oxydé ; F6P : fructose-6-phosphate ; F2,6BP: fructose-2,6-biphosphate ; F1,6BP: fructose-1,6-biphosphate ; PPP: Voie des pentoses phosphates ; HK: hexokinase ; GLUTs : transporteurs de glucose ; MCTs : transporteurs aux monocarboxylates ; LDH: lactate déshydrogénase ; PDH : pyruvate déshydrogénase ; PDK : PDH kinase ; PFKFB3 : 6-phosphofructokinase-2,6-bisphosphatase-3.

Contrairement aux astrocytes glycolytiques, les neurones ont un métabolisme plutôt oxydatif [Figure 8b] via le cycle de Krebs pour répondre à leurs besoins énergétiques élevés (Boumezbeur et al., 2010; Lebon et al., 2002). Des études ont permis de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à ces caractéristiques. Il a été démontré que l'enzyme PFKFB3 est absente dans les neurones corticaux en raison de sa dégradation continue par le complexe APC/C-Cdh1 (Herrero-Mendez et al., 2009). La régulation positive de PFKFB3, soit par réduction de l'expression d'APC/C-Cdh1, soit par surexpression de PFKFB3 dans les neurones corticaux, a conduit à l'activation de la glycolyse neuronale, entraînant ainsi un stress oxydatif et une apoptose. Cela suggère que les neurones ne peuvent tolérer un taux élevé de glycolyse (Herrero-Mendez et al., 2009). Par ailleurs, une augmentation du flux de glucose via la glycolyse entraîne une diminution du métabolisme par la voie des pentoses phosphates, réduisant

ainsi la production de NADPH. Cette baisse affecte le maintien du glutathion, un tripeptide qui joue un rôle clé non seulement en tant qu'antioxydant cellulaire, mais qui a également été proposé comme réservoir de glutamate (Koga et al., 2011). Bien que les contributions exactes de la voie des pentoses phosphates et de la glycolyse restent à clarifier, l'équilibre entre ces deux voies est essentiel pour permettre aux neurones de répondre à leurs besoins énergétiques tout en maintenant le pool de glutathion, deux facteurs cruciaux pour leur survie (Gavillet et al., 2008; Bolaños et al., 2010).

2.1.1.6. Utilisation du glucose par les oligodendrocytes

Les oligodendrocytes ont pour principale fonction la formation de gaine de myéline autour des axones et maintiennent l'intégrité axonale à long terme (Griffiths et al., 1998). La myéline est constituée de 30 % de protéines et de 70 % de lipides. Ainsi, pour constituer ces protéines et lipides, des intermédiaires du métabolisme énergétique sont utilisés (comme l'acétyl-CoA, précurseur des lipides). De ce fait, les oligodendrocytes utilisent préférentiellement la glycolyse pour générer de l'ATP plutôt que la phosphorylation oxydative (Fünfschilling et al., 2012; Narine & Colognato, 2022).

2.1.1.7. Utilisation du glucose par les microglies

Les microglies jouent un rôle central dans la défense immunitaire du SNC. Cependant, malgré leur importance, les recherches sur leur profil métabolique restent limitées. Des études réalisées *in vitro* ont montré que ces cellules peuvent adopter différents profils métaboliques en fonction de leurs réponses phénotypiques (Lauro & Limatola, 2020; Devanney et al., 2020). En état de repos ou lorsqu'elles adoptent un phénotype anti-inflammatoire, les microglies répondent à leurs besoins énergétiques principalement par la dégradation complète du glucose et ont donc un profil métabolique qui semblerait oxydatif. En revanche, lorsqu'elles basculent vers un phénotype pro-inflammatoire, leur métabolisme devient glycolytique et elles augmentent leur production de lactate (Devanney et al., 2020; Yang et al., 2021) [Figure 9].

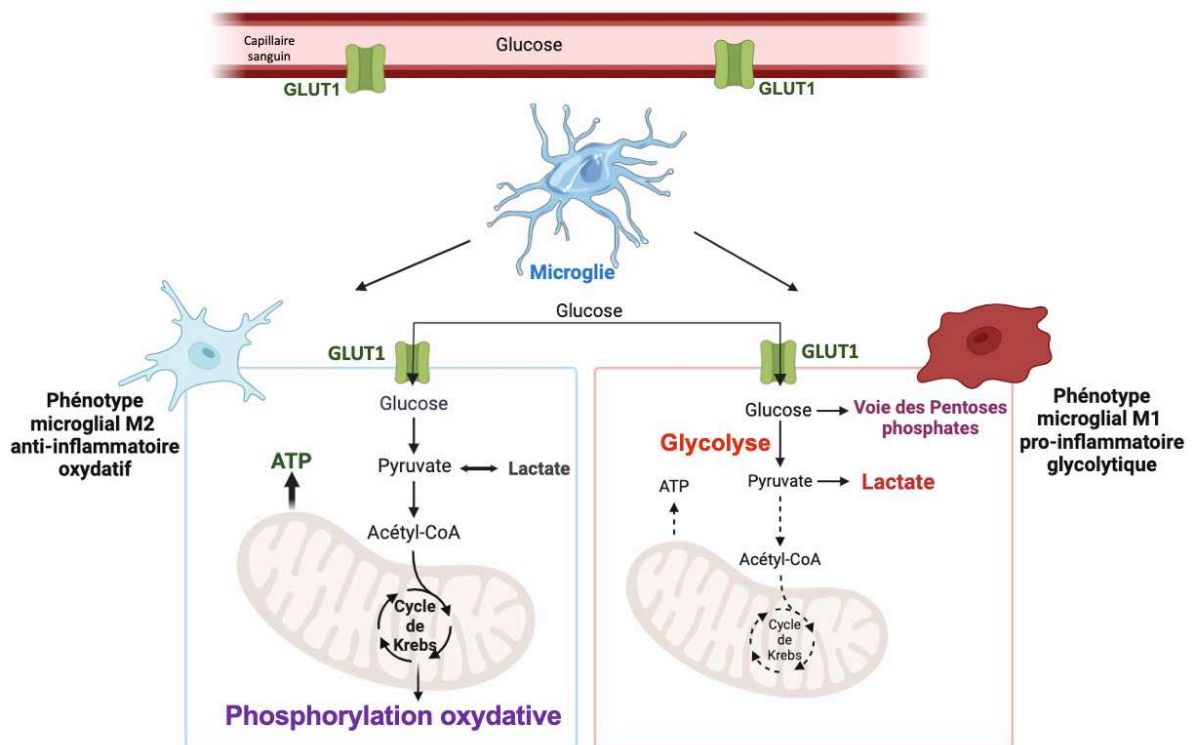


Figure 9 : Switches métabolique et phénotypique des phénotypes des microglies, adaptée de (Devanney et al., 2020). GLUTs : transporteurs de glucose ; MCTs : transporteurs aux monocarboxylates ; Acétyl-CoA : acétyl coenzyme A ; ATP : adénosine triphosphate.

2.1.2. Corps cétoniques

Les corps cétoniques sont les principaux carburants alternatifs au glucose générés par la dégradation des acides gras (AG) et synthétisés par les hépatocytes (Watanabe et al., 2020). Ils servent de source d'énergie pour tous les organes, y compris le cerveau, à l'exception du foie, lorsque l'apport en glucose est limité ou insuffisant, notamment en période de jeûne et les régimes pauvres en glucides (Owen et al., 1967; Courchesne-Loyer et al., 2017).

Pendant le jeûne, les réserves de glycogène sont les premières épuisées, avec pour conséquence un métabolisme glycolytique ne pouvant donc plus répondre aux besoins énergétiques. L'énergie est alors apportée par les corps cétoniques produits à partir de l'oxydation des acides gras mobilisés par les adipocytes. Les corps cétoniques sont ensuite distribués via la circulation vers les tissus métaboliquement actifs où ils sont convertis en acétyl-CoA. Le terme corps cétoniques désigne trois molécules : l'**acétoacétate** (AcAc), le **β -hydroxybutyrate** (β HB) et l'**acétone**. Cependant, l'acétone n'est pas converti en acétyl-CoA et est éliminé dans les urines ou lors de l'expiration.

Les corps cétoniques peuvent traverser la BHE via les transporteurs aux monocarboxylates (MCTs) présents sur les cellules endothéliales (Pierre & Pellerin, 2005). En condition physiologique, les concentrations de corps cétoniques circulants sont généralement faibles (< 0,5 mM) et contribuent à moins de 5 % au métabolisme cérébral (Cunnane et al., 2016). Cependant, pendant un jeûne d'une courte durée ou d'un effort intense, les concentrations de corps cétoniques dans le sang augmentent, pouvant atteindre 1-2 mM (Cahill et al., 1966), voire 6-8 mM en cas de jeûne prolongé (Cahill, 2006; Owen et al., 1969), et sont capables de contribuer à près de 60 % des besoins énergétiques du cerveau, remplaçant ainsi le glucose comme carburant principal (Owen et al., 1967; Plourde et al., 2024). Le régime cétogène (pauvre en glucides et riche en lipides) a été développé dans les années 1920 comme traitement de l'épilepsie en raison des premières observations d'un effet anticonvulsivant (Kossoff & Wang, 2013). Au cours de la dernière décennie, l'intérêt pour les régimes cétogènes a augmenté rapidement, et les corps cétoniques sont désormais considérés comme une nouvelle stratégie thérapeutique potentielle dans le vieillissement (Suissa, Flachon, et al., 2020) et dans de nombreuses pathologies telles que le cancer, le diabète, les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives, notamment la maladie d'Alzheimer (Han et al., 2020; Møller, 2020).

Les MCTs sont des protéines transmembranaires (famille de 14 membres) codées par des gènes du groupe SLC16A et certains sont connus pour transporter les corps cétoniques. Ils se trouvent dans divers tissus, y compris le cerveau où principalement trois isoformes, MCT1, MCT2 et MCT4, ont été identifiées (MCT3 n'est présent que dans la rétine). Des études sur les modèles de rongeurs ont montré que dans le cerveau, l'expression des MCTs est assez distincte selon les types cellulaires, l'isoforme MCT1 est exprimé par les cellules endothéliales (Pellerin et al., 1998), les astrocytes (Pellerin et al., 2005; Nijland et al., 2014), les microglies (Moreira et al., 2009; Nijland et al., 2014) et les oligodendrocytes (Morrison et al., 2013; Y. Lee et al., 2012). L'expression de MCT4 dans le SNC est principalement sur les astrocytes, mais aussi dans les microglies (Monsorno et al., 2023; Rosafio & Pellerin, 2014). En revanche, l'isoforme MCT2 est exprimée principalement par les neurones (Pierre et al., 2000, 2002). Son expression est colocalisée dans les structures de densité post-synaptiques riches en mitochondries (Bergersen et al., 2005), ce qui suggère que ce transporteur pourrait jouer un rôle dans la transmission synaptique (Pierre & Pellerin, 2005).

Les affinités (Km) de ces isoformes ne sont pas identiques. En effet, MCT2 possède une affinité plus importante que MCT1 pour les corps cétoniques. Ainsi, pour MCT2, le Km pour le β -hydroxybutyrate est de 1,2 mM alors que celui pour l'acétoacétate est de 0,8 mM (Bröer et al., 1999). En comparaison, le Km pour le β -hydroxybutyrate pour MCT1 est de 12,5 mM et de 5,5 mM pour l'acétoacétate (Bröer et al., 1998). Quant à MCT4, son affinité est relativement très faible pour ces substrats (Halestrap, 2012).

Il est important de souligner que ces transporteurs MCTs sont plus abondants dans le cerveau néonatal que dans le cerveau adulte, contrairement aux transporteurs du glucose (Leino et al., 1999). Il a été

rapporté que les corps cétoniques fournissent une proportion significative de carburant métabolique cérébral au cours des deux premières semaines postnatales (Nehlig & Pereira de Vasconcelos, 1993; S. J. Vannucci & Hagberg, 2004), et les niveaux d'expression des MCTs, en particulier de MCT1 au niveau de la BHE, sont très élevés, ce qui reflète leur utilisation préférentielle (S. J. Vannucci & Hagberg, 2004). De plus, deux études menées par Krebs et ses collègues ont montré que les concentrations sanguines de corps cétoniques chez les nouveau-nés de rats étaient 6 à 10 fois plus élevées que chez les adultes. Les taux d'enzymes impliquées dans leur métabolisme sont également trois fois plus élevés chez les juvéniles ; Page et al., 1971). Ces adaptations métaboliques sont en grande partie liées à l'allaitement, car le lait maternel est particulièrement riche en lipides, précurseurs des corps cétoniques. Par ailleurs, des études ont montré que le cerveau néonatal peut consommer jusqu'à 60 % des besoins énergétiques totaux de l'organisme (Steiner, 2019), contre 25 % pour le cerveau adulte (Bélanger et al., 2011). Pour le nouveau-né, les corps cétoniques constituent donc une source d'énergie essentielle au cerveau en développement. Ainsi, le cerveau immature se distingue par une capacité élevée de transport des corps cétoniques (S. J. Vannucci & Hagberg, 2004).

Une fois transportés dans le cerveau, les corps cétoniques sont convertis en acétyl-CoA dans les mitochondries, qui entre alors dans le cycle de Krebs. Cette conversion est réalisée par l'action des enzymes telles que la succinyl-CoA:3-cétoacide coenzyme A transférase (SCOT), qui est présent dans tous les tissus, à l'exception du foie, ce qui explique que le foie est incapable d'utiliser les corps cétoniques comme substrat énergétique (Fukao et al., 1997) [Figure 10].

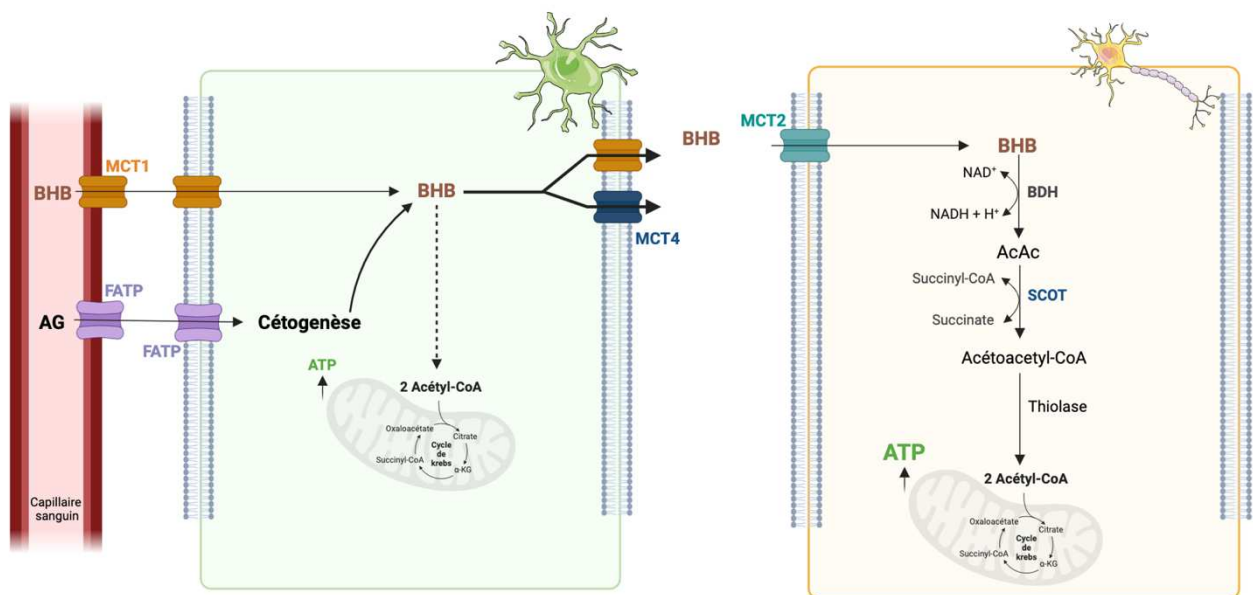


Figure 10 : Schéma illustrant le métabolisme des corps cétoniques dans le cerveau. Les astrocytes sont les principaux sites d'oxydation des acides gras dans le cerveau (Edmond et al., 1998). Ces cellules ont la capacité non seulement d'absorber le β -hydroxybutyrate de la circulation sanguine, mais également de le synthétiser via la cétogenèse et de le transférer aux neurones, où il est utilisé comme substrat énergétique (Le Foll & Levin, 2016), adaptée de (Jensen et al., 2020). AcAc : acétoacétate ; Acétyl-CoA : acétyl coenzyme A ; BHB : β -hydroxybutyrate ; BHD : β -hydroxybutyrate déshydrogénase ; AG : acides gras ; FATP : Transporteur des acides gras ; MCT : transporteur au monocarboxylate ; NAD⁺ : Nicotinamide Adénine Dinucléotide ; NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide réduit ; SCOT : succinyl-CoA :3-cétoacide coenzyme A transférase ; α -KG : α -Cétoglutarate ; ATP : adénosine triphosphate.

Des études *in vitro* sur des cultures primaires ont montré que les neurones privilégient l'utilisation des corps cétoniques dans le métabolisme oxydatif pour répondre à leurs besoins énergétiques, tandis que les astrocytes favorisent le transfert de ces substrats vers les neurones plutôt que de les utiliser eux-mêmes (Edmond et al., 1987). De plus, les astrocytes sont capables de produire des corps cétoniques en dégradant les acides gras, qui peuvent traverser la BHE (Guzmán & Blázquez, 2001). La production

de corps cétoniques par les astrocytes est régulée par l'activité de la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK), qui sert de capteur énergétique des cellules. Cette protéine est stimulée par le 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucléotide (AICAR) (Blázquez et al., 1999) et la metformine (Westhaus et al., 2017) qui régulent la cétogenèse dans les astrocytes en condition d'hypoxie (Blázquez et al., 1999) et/ou d'hypoglycémie (Takahashi, 2020).

2.1.2.1. Utilisation des corps cétoniques par les oligodendrocytes

Les oligodendrocytes semblent utiliser les corps cétoniques comme substrat pour la synthèse de la myéline. L'étude d'Edmond *et al.* a démontré que ces substrats alternatifs jouent un rôle essentiel dans le SNC lors de la myélinisation, non seulement en tant que sources d'énergie, mais également pour la biosynthèse des lipides. Ces résultats suggèrent l'existence d'une voie métabolique directe des corps cétoniques vers la formation de cholestérol, un processus particulièrement actif au sein des oligodendrocytes (Edmond, 1974).

2.1.2.2. Utilisation des corps cétoniques par les microglies

Les cellules microgliales sont également capables d'utiliser les corps cétoniques comme substrats énergétiques alternatifs pour la production d'ATP (Bernier et al., 2020). L'entrée de ces substrats est facilitée par le transporteur MCT1 exprimé dans ces cellules. Des études ont suggéré que les corps cétoniques peuvent moduler le métabolisme microglial lors de leur activation, en les orientant vers des états métaboliques moins pro-inflammatoires. En effet, l'étude de Benito *et al.* a utilisé des microglies en culture, stimulées par du lipopolysaccharide (LPS), puis traitées avec du β -hydroxybutyrate (BHB). Ce traitement a entraîné une accumulation de certains métabolites clés (α -cétoglutarate et fumarate) générés par le cycle de Krebs, favorisant ainsi la phosphorylation oxydative et induisant un phénotype anti-inflammatoire chez les microglies (Benito et al., 2020). D'autres études ont également révélé que, dans des conditions de neuroinflammation ou de troubles neurodégénératifs, le BHB modifie la morphologie des microglies vers une forme ramifiée, en reprogrammant le phénotype de ces cellules vers un état de surveillance tissulaire et anti-inflammatoire. Ces résultats suggèrent que le BHB pourrait avoir un effet neuroprotecteur dans le cas de lésions cérébrales associées à de la neuroinflammation, via la reprogrammation du métabolisme microglial (Shippy et al., 2020; Huang et al., 2018).

2.1.3. Lactate

Bien que le glucose soit la principale source d'énergie du cerveau, le lactate peut servir de substrat énergétique alternatif, voire principal, dans diverses circonstances.

2.1.3.1. La navette lactate astrocyte-neurone (ANLS)

Longtemps considéré comme un simple déchet métabolique produit par les cellules, le lactate est aujourd'hui reconnu comme un substrat énergétique important. Sa mauvaise réputation vient du fait qu'il est souvent associé à des conditions pathologiques, telles que le cancer ou l'hypoxie, où il reflète une souffrance cellulaire liée à un manque d'oxygène. Au niveau cérébral, il y a une trentaine d'années, une hypothèse a été émise par Luc Pellerin et Pierre Magistretti sur la base d'études *in vitro* dans laquelle le lactate a été proposé comme substrat énergétique neuronal (Pellerin & Magistretti, 1994). Ils ont montré que lorsque du glutamate est ajouté dans le milieu de culture de cellules astrocytaires, ces dernières augmentent leur consommation de glucose et leur production de lactate, libéré dans le milieu. Sur la base de ces observations, ils ont proposé le concept de la navette lactate entre astrocytes et neurones (ANLS, pour *astrocyte-neuron lactate shuttle*). L'hypothèse de ce concept est que lors de l'activation neuronale, le glutamate, libéré comme neurotransmetteur dans la fente synaptique, est rapidement recapté par les astrocytes voisins via des transporteurs au glutamate, appelés EAAT (excitatory amino acid transporter : EAAT1 ou glutamate/aspartate transporter 1 : GLAST, et EAAT2 ou glutamate transporter 1 : GLT1, qui dépendent du sodium (1 glutamate entre avec 3 Na⁺)). La recapture du glutamate par l'astrocyte entraîne alors une entrée de Na⁺, qui va ensuite activer la pompe

sodium/potassium ATP-dépendante (Na^+/K^+ -ATPase) afin de rétablir l'équilibre ionique. L'activation de cette pompe consomme de l'ATP, qui sera régénéré par la glycolyse transformant le glucose en pyruvate. Le pyruvate est ensuite converti en lactate par la lactate déshydrogénase (LDH5), exporté par les astrocytes et transféré aux neurones via des transporteurs MCTs où il sera utilisé comme substrat oxydatif, après sa reconversion en pyruvate (Pellerin & Magistretti, 1994) [Figure 11].

Par ailleurs, le glutamate recapté par les astrocytes est « recyclé ». Il est métabolisé en glutamine grâce à la glutamine synthétase, une enzyme spécifiquement astrocytaire (Rose et al., 2013; Sandhu et al., 2021). La glutamine est ensuite transportée via les transporteurs de glutamine (transporteurs d'acides aminés solutés neutres : SNAT) vers les neurones, où elle est reconvertie en glutamate et stockée dans les vésicules en attente de la prochaine activation neuronale. Ce processus est connu sous le nom de cycle glutamate-glutamine.

Au fil des années, plusieurs partenaires clés de l'ANLS, notamment des isoformes spécifiques d'enzymes et de transporteurs, ont été identifiés. Pour certains, leur compartimentation cellulaire, et/ou leurs caractéristiques et constantes enzymatiques, appuient l'hypothèse d'un échange de lactate de l'astrocyte vers le neurone :

- Les transporteurs du lactate, les **MCTs** : les principales isoformes retrouvées dans le cerveau sont MCT1, MCT2 et MCT4 (présentées au paragraphe 2.1.2.), MCT2 étant principalement neuronal, alors que l'astrocyte exprime les isoformes 1 & 4. Tout comme pour les corps cétoniques, les affinités de ces isoformes pour le lactate ne sont pas identiques. En effet, MCT2 présente la plus forte affinité pour le lactate, avec un $K_m \sim 0,7$ mM, tandis que MCT1 et MCT4 affichent des K_m d'environ 3,5 mM et 28 mM, respectivement (bien que le K_m de MCT4 soit discuté et réévalué aux alentours de celui de MCT1) (Pellerin et al., 2005; Petersen et al., 2017). Ces différences sont proposées pour expliquer la distribution spécifique de ces transporteurs dans les tissus qui utilisent le lactate comme substrat énergétique (par exemple, MCT2 dans les neurones) ou qui en produisent de grandes quantités en raison de leur métabolisme glycolytique élevé (par exemple, MCT4 dans les astrocytes). MCT1, quant à lui, est largement distribué, étant trouvé aussi bien dans les tissus producteurs de lactate (par exemple, les astrocytes) que dans ceux qui en consomment (comme les oligodendrocytes ou les microglies) (Deng et al., 2023).
- Un second acteur clé est la **LDH**, une enzyme permettant la transformation du pyruvate en lactate, et inversement. Elle est constituée de deux sous-unités : **LDHa** et **LDHb**, formant une structure tétramérique. Selon la composition en sous-unités, cinq isoformes sont possibles : LDH1 (formée de 4 LDHb), LDH2 (3 LDHb + 1 LDHa), LDH3 (2 LDHb + 2 LDHa), LDH4 (1 LDHb + 3 LDHa) et LDH5 (4 LDHa) (Markert et al., 1975). La distribution relative de ces sous-unités varie selon les types cellulaires et contribue à définir leur profil métabolique. Les cellules à profil glycolytique, comme celles des fibres de type II du muscle, expriment principalement LDHa ou 5, favorisant ainsi la conversion du pyruvate en lactate. À l'inverse, les cellules à profil oxydatif, telles que celles du cœur, expriment davantage LDHb ou 1, privilégiant la conversion du lactate en pyruvate (Magistretti & Allaman, 2018). Une étude a révélé que les astrocytes présentent une concentration importante d'isoformes enrichies en LDHa, favorisant la conversion du pyruvate en lactate. À l'inverse, les neurones expriment de manière prédominante l'isoforme LDHb, qui favorise la conversion du lactate en pyruvate, reflétant ainsi un profil métabolique de consommateur plutôt que de producteur de lactate (Bittar et al., 1996).
- Les transporteurs de glutamate astrocytaires (**GLAST** et **GLT1**) sont un troisième acteur clé. Cette recapture du glutamate s'accompagne d'une entrée de trois ions Na^+ , ce qui active la Na^+/K^+ ATPase. La consommation d'ATP et la production d'ADP va stimuler la glycolyse et entraîner la production de lactate (Chatton et al., 2000; Pellerin & Magistretti, 1997).
- Le glycogène astrocytaire : Les astrocytes, situés entre les neurones et les capillaires sanguins, sont idéalement placés pour capter le glucose provenant de la circulation sanguine. Ils présentent également la plus grande réserve de glycogène cérébral (Magistretti & Pellerin, 1996). Lors d'une activité cérébrale soutenue, ce glycogène est rapidement mobilisé, et est

converti en lactate (Magistretti & Allaman, 2018; Xue et al., 2022). Ainsi, l'ANLS peut fonctionner soit via un échange de lactate issu du glycogène astrocytaire, soit par un export de lactate nouvellement synthétisé dans l'astrocyte à partir du glucose circulant [Figure 11].

- Le régulation de la **PFKFB3** : Cette enzyme qui active la PFK, étape limitante de la glycolyse, est présente dans les astrocytes mais dégradée dans les neurones (voir 2.1.1.5.).

Les spécificités décrites ci-dessus sont en faveur d'un transfert de lactate de l'astrocyte, « source de lactate », vers le neurone, « consommateur de lactate ».

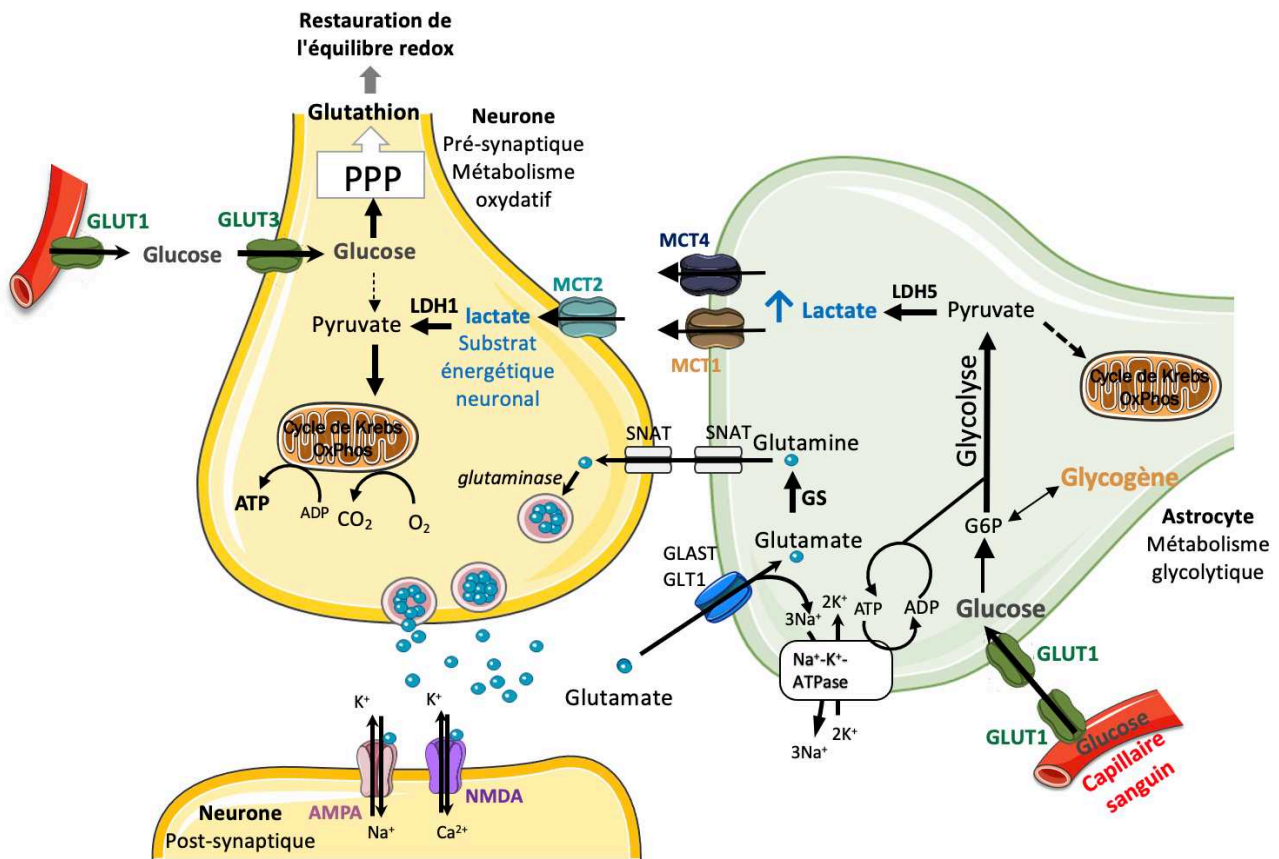


Figure 11 : ANLS (Astrocyte-Neuron Lactate Shuttle ou Navette lactate astrocyte-neurone) et ses partenaires clés, adaptée de (Dumont et al., 2019). ADP : adénosine diphosphate ; AMPA : α - amino-3-hydroxy-5-méthylisoazole-4-propionique ; ATP : adénosine triphosphate ; Ca²⁺ : calcium ; CO₂ : dioxyde de carbone ; G6P : glucose-6-phosphate ; GLAST : glutamate aspartate transporter ; GLUTs : transporteurs de glucose ; GLT-1 : glutamate transporter 1 ; GS : glutamine synthétase ; K⁺ : potassium ; LDH : lactate déshydrogénase ; MCTs : transporteurs aux monocarboxylates ; Na⁺ : sodium ; Na⁺/K⁺ ATPase : pompe ATPases ; NMDA : acide N-méthyl-D-aspartate ; O₂ : oxygène ; OxPhos : phosphorylation oxydative ; PPP : voie des pentoses phosphates ; SNAT : transporteurs d'acides aminés solutés neutres.

Ce concept de cette navette a néanmoins fait l'objet critiques et a été remis en question, en partie à cause des résultats contradictoires obtenus dans différents contextes expérimentaux, ainsi que de l'absence d'une méthode consensuelle permettant de suivre en temps réel la dynamique métabolique à l'échelle cellulaire. Pour illustrer le débat autour de cette thématique, il est possible de consulter des articles de revue écrits par des partisans et des opposants à l'ANLS, tels que ceux de Barros et Bak dans leurs discussions croisées (Bak & Walls, 2018; Barros & Weber, 2018). Plusieurs études dont les résultats sont en faveur de l'ANLS ont été menées par Bouzier-Sore *et al.*, au cours de ces 20 dernières années. Les premières études *in vitro*, sur des cultures primaires de neurones, sont basées sur des

compétitions entre glucose et lactate. En marquant alternativement ces substrats avec du carbone 13, il a pu être montré que les neurones privilégiaient le lactate pour leur métabolisme oxydatif (Bouzier-Sore et al., 2003, 2006). À l'opposé, d'autres études soutiennent que les neurones utilisent préférentiellement le glucose, et que son métabolisme est étroitement lié à l'activité synaptique, suggérant que les neurones peuvent répondre directement à leurs besoins énergétiques par l'utilisation du glucose, remettant ainsi en question le rôle privilégié du lactate comme substrat énergétique pour le neurone actif (Tang, 2018). Malgré de nouvelles données obtenues *in vivo* (décrites dans le paragraphe suivant), cette navette demeure encore un sujet de débat à ce jour (Vavříčka et al., 2024).

2.1.3.2. Utilisation du lactate par les oligodendrocytes

Les oligodendrocytes, via MCT1, peuvent utiliser le lactate comme source d'énergie afin de former la myéline autour des axones (Rinholm & Bergersen, 2014). Ils peuvent également fournir du lactate aux axones ou directement aux neurones, contribuant ainsi à leur métabolisme énergétique (Riske et al., 2017; Véga et al., 1998). De plus, dans des états pathologiques, le lactate exogène constitue un substrat énergétique efficace pour favoriser la remyélinisation axonale, contribuant ainsi à l'amélioration de la fonction somatosensorielle et de la coordination motrice (Brown et al., 2003; Tekkök et al., 2005) [Figure 12].

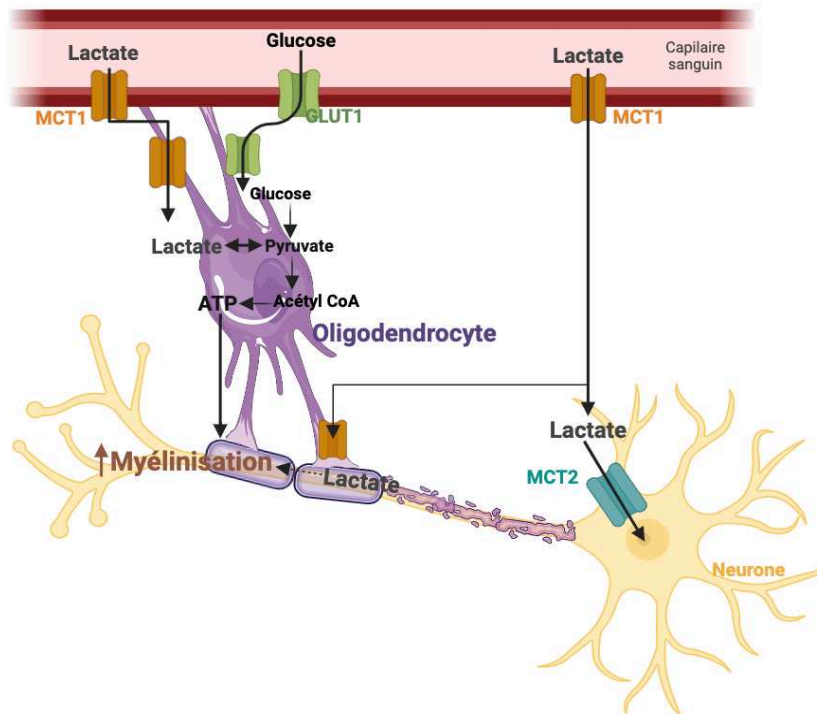


Figure 12 : Rôle du lactate dans les oligodendrocytes, adaptée de (Deng et al., 2023). Le lactate sert de substrat énergétique pour les oligodendrocytes, favorisant ainsi la remyélinisation axonale et contribuant à l'amélioration des fonctions cérébrales après une lésion cérébrale. Acétyl-CoA : acétyl coenzyme A ; ATP : adénosine triphosphate ; GLUTs : transporteurs de glucose ; MCTs : transporteurs aux monocarboxylates.

2.1.3.3. Utilisation du lactate par les microglies

Les microglies sont capables de métaboliser efficacement le lactate grâce à la forte expression de la sous-unité LDHb ou LDH1 (Monsorno et al., 2022) et de plusieurs isoformes de MCTs (1, 2 & 4). Une étude menée par Kong *et al.* sur la souris a montré que l'administration intracérébroventriculaire de LPS induit une polarisation des microglies vers un phénotype pro-inflammatoire de type M1. Cette polarisation s'accompagne d'une augmentation de la glycolyse, car il a été montré que le LPS induisait une augmentation de l'activité PFK, liée à une augmentation de l'expression de la PFKFB3 (Holland et

al., 2018). De plus, leurs résultats indiquent que **l'inactivation de MCT1 réduit considérablement** la polarisation microgliale induite par le LPS vers le phénotype M1, suggérant que MCT1 est impliqué dans l'activation des microglies vers un phénotype M1 dans des conditions de neuro-inflammation. Néanmoins, l'injection de lactate exogène bloque la neuroinflammation médiée par MCT1 (Kong et al., 2019). Une autre étude a suggéré que lors d'une ischémie cérébrale, les microglies sont activées et s'accumulent autour de la zone cérébrale lésée, ce qui entraîne une augmentation de l'expression des protéines MCT1 et MCT2, améliorant ainsi l'absorption du lactate par ces cellules et soutenant leurs fonctions de phagocytose, de migration et de réparation pendant la phase de récupération post-ischémique (Moreira et al., 2009) [Figure 13].

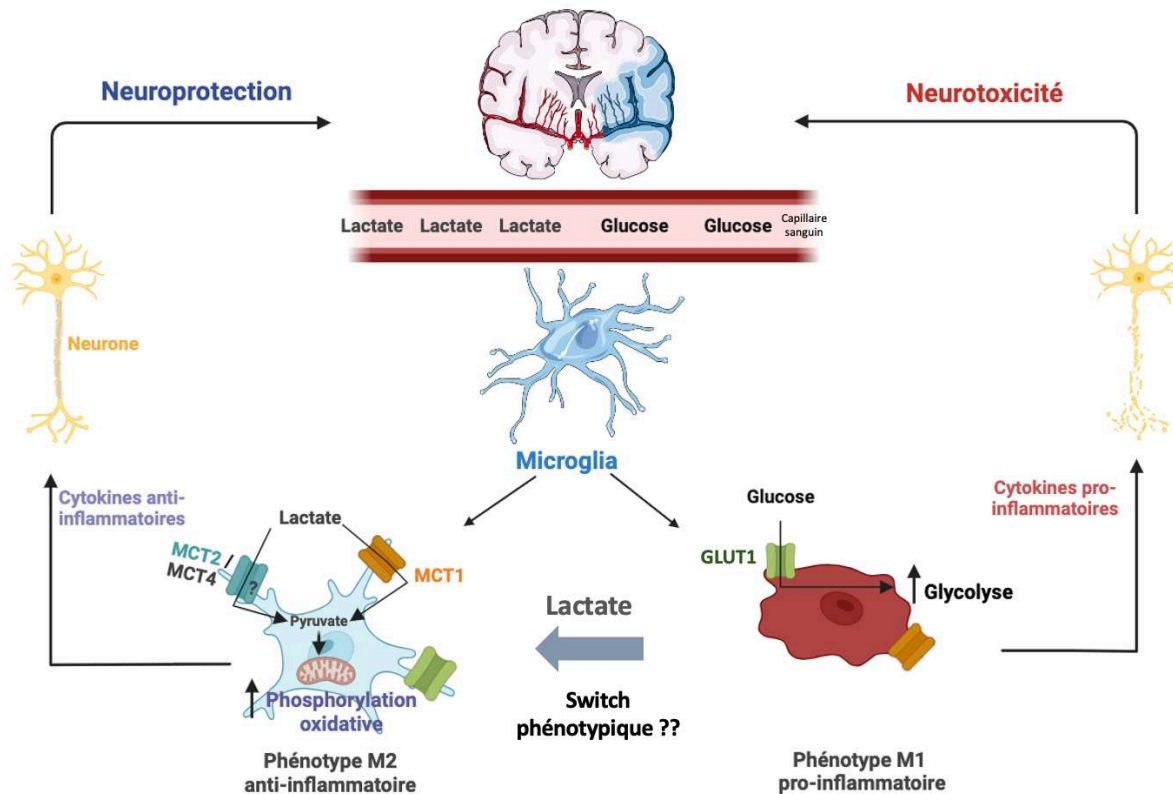


Figure 13 : Rôle du lactate dans les microglies, adaptée de (Deng et al., 2023). Le lactate exerce un effet neuroprotecteur en modulant le phénotype des microglies, inhibant le phénotype pro-inflammatoire M1 tout en favorisant le phénotype anti-inflammatoire M2 après une lésion cérébrale. GLUTs : transporteurs de glucose ; MCTs : transporteurs aux monocarboxylates.

Paolicelli *et al.* ont étudié le rôle du transporteur MCT4 dans la modulation de la fonction microgliale et ont démontré que l'absence de MCT4 dans les microglies altère leurs capacités phagocytaires ainsi que leur capacité d'élagage synaptique (« pruning »). Ces perturbations ont des répercussions durables sur la fonction synaptique et le comportement des souris (Monsorno et al., 2023). Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre le rôle des transporteurs MCTs et le rôle du lactate dans la microglie, en particulier dans un contexte pathologique, ainsi que le mécanisme par lequel ce substrat exerce ses effets anti-inflammatoires.

Dans ce projet, nous étudierons l'impact du lactate sur la modulation phénotypique des microglies et, par conséquent, sur leur métabolisme. Les résultats de cette étude seront exposés en détail dans le Chapitre 4 de cette thèse.

2.1.3.4. Rôle de l'ANLS dans l'apprentissage et la mémoire

La perception selon laquelle « le lactate est un déchet métabolique » a évolué au cours des trente dernières années, notamment avec l'introduction du concept de navette lactate (Brooks, 1985; Brooks, 2009).

En plus de son rôle de substrat métabolique, le lactate apparaît comme essentiel à certaines fonctions cérébrales, malgré la présence de glucose. Plusieurs études ont notamment mis en évidence l'importance de l'ANLS dans les processus d'apprentissage et de mémoire. Lors d'une activité neuronale intense, les astrocytes dégradent le glycogène en glucose (un processus appelé glycolyse) grâce à l'enzyme astrocytaire "glycogène phosphorylase", afin de fournir des nutriments aux neurones. Le blocage de ce mécanisme métabolique dans les astrocytes a été lié à des déficits de mémoire (Gibbs et al., 2006). Une autre étude a confirmé le rôle crucial du lactate astrocytaire dans la formation de la mémoire, en révélant une augmentation de l'expression hippocampique des protéines impliquées dans le transport et l'utilisation du lactate au niveau astrocytaire et neuronal, telles que les MCTs, la LDHa et la LDHb (Tadi et al., 2015). Ils ont également montré dans cette étude que la downrégulation du transporteur MCT2 pourrait altérer la formation de la mémoire à long terme chez la souris. L'étude de Suzuki et ses collaborateurs a montré que la réduction de l'expression de MCT1 et MCT4 dans l'hippocampe perturbait la formation de la mémoire à long terme sans affecter la mémoire à court terme. En utilisant un inhibiteur de la glycolyse, ils ont également montré le rôle clé du glycogène dans la mémoire à long terme. De façon intéressante, la perte de fonction cognitive a été restaurée par l'injection de L-lactate, montrant l'importance de la navette lactate dans la formation de la mémoire (Suzuki et al., 2011).

Très récemment, notre équipe a montré *in vivo* l'importance de cette navette lactate pour l'activation cérébrale en utilisant des rats pour lesquels l'expression des MCTs a été spécifiquement réprimée, soit dans les astrocytes (Knockdown MCT4, ou « KD-MCT4 »), soit dans les neurones (Knockdown MCT2, ou « KD-MCT2 ») dans le cortex somatosensoriel (S1BF ou région des tonneaux). Cette région corticale est impliquée dans l'exploration de l'environnement à l'aide des vibrisses et a permis d'étudier *in vivo* l'impact de la navette lactate sur les couplages neurovasculaires et neurométaboliques. Les réponses métaboliques et hémodynamiques à la stimulation des vibrisses ont été mesurées par spectroscopie de résonance magnétique fonctionnelle (SRMf) et imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (IRMf) après répression de l'expression de MCT2 dans les neurones ou de MCT4 dans les astrocytes du cortex somatosensoriel de rats. Les résultats ont montré une perte totale du couplage neurovasculaire (perte de l'activation de la zone S1BF en IRMf) et du couplage neurométabolique (perte de l'augmentation de lactate dans la zone S1BF liée à la stimulation de vibrisses). De façon intéressante, la capacité des rats KD-MCT2 à reconnaître et distinguer un nouvel objet à l'aide de leurs vibrisses est également complètement perdue. En ce qui concerne les rats KD-MCT4, les pertes de couplage neurovasculaire et neurométabolique ne sont apparus que pour 50 % des animaux, et 1 rat KD-MCT4 sur 2 échouait également dans le test de reconnaissance du nouvel objet texturé nécessitant l'utilisation des vibrisses. En revanche, contrairement aux rats KD-MCT2, l'administration de lactate (intrapéritonéale) a permis de restaurer un signal positif en IRMf. Ces résultats indiquent que malgré la présence de glucose et de ses transporteurs, l'échange du lactate via les MCTs entre astrocytes et neurones est essentiel pour assurer les couplages neurovasculaires et neurométaboliques associés à l'activité cérébrale. Le lactate s'avère donc être un substrat nécessaire pour les fonctions cognitives du cortex (Roumes, Jollé, et al., 2021). Des résultats similaires ont été obtenus chez la souris dans l'hippocampe (Netzahualcoyotzi & Pellerin, 2020).

Enfin, il est à noter que les connexines 43, principalement exprimées par les astrocytes et qui facilitent l'échange de métabolites, peuvent également avoir un rôle dans la consolidation de la mémoire à court terme et la plasticité synaptique (Murphy-Royal et al., 2020; Pannasch & Rouach, 2013).

2.1.4. Importance du concept de navette lactate dans la physiopathologie

2.1.4.1. Traumatisme crânien

Dans le contexte du traumatisme crânien, des études ont montré que le lactate pouvait être neuroprotecteur chez le rongeur. Par exemple, Holloway *et al.* ont démontré, *in vivo*, qu'une perfusion intraveineuse de 100 mM de lactate (pendant 3 h à un débit de 0,65 ml/h) après un traumatisme cérébral favorisait la régénération d'ATP et améliorait les fonctions cognitives (Holloway *et al.*, 2007). Plus récemment, une autre étude a exploré l'effet préventif du lactate dans un modèle de traumatisme cérébral chez le rat. Ils ont administré une dose de 500 mg/kg de lactate par injection intrapéritonéale 30 min avant le traumatisme et ont observé une amélioration des déficits neurologiques ainsi qu'une augmentation des niveaux d'expression de certaines protéines liées à la plasticité neuronale telles que PSD95, GAP43 et BDNF, ainsi que l'expression du MCT2 (Zhai *et al.*, 2020). Il a été également rapporté que le récepteur membranaire au lactate GPR81 pourrait également participer au processus pathologique du traumatisme cérébral. Les données montrent que l'augmentation de l'expression du gène GPR81 dure au moins 28 jours après une lésion cérébrale traumatique dans les zones lésées du cortex cérébral et de l'hippocampe chez la souris (Zhou *et al.*, 2017). Les résultats de cette étude ont suggéré que le lactate peut non seulement être le carburant du cerveau, mais aussi une molécule de signalisation qui peut interagir avec le récepteur pour activer ou inhiber les signaux moléculaires en aval pour la neuroprotection dans le traumatisme cérébral.

En clinique, Bouzat *et al.* ont été les premiers à examiner l'effet neuroprotecteur d'une supplémentation en lactate de sodium sur le métabolisme énergétique cérébral chez des patients ayant subi un traumatisme crânien sévère (Bouzat *et al.*, 2014). Une solution de lactate (5 mM) a été perfusée environ 33 h après le traumatisme. Leurs résultats ont montré que le lactate exogène était préférentiellement utilisé comme substrat énergétique par le cerveau, permettant d'économiser le glucose, qui pourrait alors être métabolisé préférentiellement dans la voie des pentoses phosphates pour lutter contre les ROS. Il a également été observé une réduction des niveaux de glutamate (et donc de l'excitotoxicité) et une baisse de la pression intracrânienne (Bouzat *et al.*, 2014). Le lactate pourrait ainsi avoir des effets neuroprotecteurs en servant de substrat alternatif après un traumatisme crânien sévère (Glenn *et al.*, 2015).

2.1.4.2. Accidents vasculaires cérébraux

Dans le cadre des accidents vasculaires cérébraux (AVC), il a été démontré chez les rongeurs que le lactate possède des propriétés neuroprotectrices après une ischémie cérébrale. Berthet *et al.* ont montré, *in vivo*, qu'une administration de lactate (2 µL d'une solution à 100 mM, injectée par voie intracérébroventriculaire) après une occlusion de l'artère cérébrale moyenne (MCAO : Middle Cerebral Artery Occlusion ; modèle d'AVC) chez la souris entraînait une réduction significative des volumes lésionnels et une amélioration des déficits neurologiques (Berthet *et al.*, 2009). Des résultats similaires ont été obtenus avec une dose de lactate (1 µmol/g de poids corporel) administrée par voie intraveineuse chez la souris après une MCAO (Berthet *et al.*, 2012). Une autre étude a révélé un effet bénéfique du lactate lorsqu'il est administré 1 h après le début de l'ischémie, réduisant ainsi la taille de la lésion et améliorant les résultats neurologiques chez les souris MCAO (Buscemi *et al.*, 2020). Plus récemment, Geiseler *et al.* ont observé chez des souris MCAO que l'administration de lactate par voie intrapéritonéale, 24 h et 48 h après l'ischémie, réduisait les volumes lésionnels et augmentait l'angiogenèse. Ces effets n'ont pas été constatés chez les souris dépourvues du GPR81 (Geiseler *et al.*, 2024). Leurs résultats ont suggéré que les effets neuroprotecteurs du lactate observés après un AVC pourraient être modulés par l'activation du récepteur au lactate GPR81 (Geiseler *et al.*, 2024). Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre ce double rôle du lactate, à la fois en tant que substrat énergétique et molécule de signalisation, dans le cadre des ischémies cérébrales (AVC et traumatisme crânien).

Actuellement, une étude clinique est en cours pour évaluer l'efficacité du lactate administré après un AVC. Intitulée « **Exploring the effect of lactate administration after ischemic stroke on brain**

metabolism (LacAVC) », cette étude est dirigée par le professeur Lorenz Hirt (MD, 2021). L'objectif de cet essai clinique est de démontrer les effets bénéfiques de la perfusion de lactate chez des patients victimes d'AVC, en comparant l'administration de lactate à un placebo (Résultats en 04/2026).

Enfin, après un AVC, il a été montré que l'hyperglycémie est délétère (Suissa, Panicucci, et al., 2020). Ainsi, le lactate, en tant que substrat, représente une cible prometteuse pour la recherche de nouvelles thérapies (Plourde et al., 2024).

Étant donné que le lactate est un substrat énergétique essentiel pour les neurones et qu'il a démontré des effets neuroprotecteurs chez l'adulte, notamment lors de traumatismes crâniens et d'AVC, et en tenant compte de la surexpression des MCTs chez les nouveau-nés par rapport aux adultes, pourrait-il jouer un rôle neuroprotecteur après une hypoxie-ischémie néonatale ? C'est à cette question que je tenterai de répondre dans le Chapitre 4 de cette thèse.

3. Hypoxie-ischémie néonatale

Cette partie décrit en détail les mécanismes impliqués dans l'hypoxie-ischémie néonatale, l'approche actuelle de prise en charge et présente les différentes thérapies envisagées aux niveaux préclinique et clinique.

3.1. Généralités, Épidémiologie et Étiologie sur l'hypoxie-ischémie des nouveau-nés

L'hypoxie-ischémie (HI) néonatale (HIN) représente une cause majeure de morbidité périnatale et d'incapacités chroniques chez les nouveau-nés à terme. Son incidence varie de 1 à 6 cas pour 1000 naissances vivantes dans les pays développés et de 2,3 à 26,5 pour 1 000 naissances dans les pays en voie de développement. L'HIN touche entre 0,7 à 1,2 millions de nouveau-nés par an et est responsable de 23 % de la mortalité infantile dans le monde (Gaston-Breton et al., 2023) [Figure 14].

L'HIN est caractérisée par une diminution du flux sanguin au niveau du cerveau du nouveau-né entraînant une réduction des apports en oxygène (O₂) et en substrats énergétiques. Malgré les progrès des soins intensifs néonataux, environ 15 à 20 % des nouveau-nés ayant subi un accident d'HIN meurent pendant la période néonatale et 25 % des nourrissons qui y survivent présentent des lésions cérébrales graves ayant des répercussions irréversibles et durables sur les fonctions motrices et cognitives (retard mental, épilepsie, paralysie cérébrale) (Marques et al., 2024; Millar et al., 2017).

Les causes de l'HIN sont multiples et peuvent être d'origine :

- **Maternelle** : telle que l'hypertension qui provoque une altération du flux sanguin maternel vers le placenta
- **Fœtale** : telle que l'hémorragie fœto-maternelle
- **Annexielle** : un prolapsus du cordon ombilical, un décollement placentaire, une rupture utérine, un placenta prævia (placenta inséré à un autre endroit que le fond de l'utérus), un accouchement par le siège, des stades tardifs prolongés du travail.

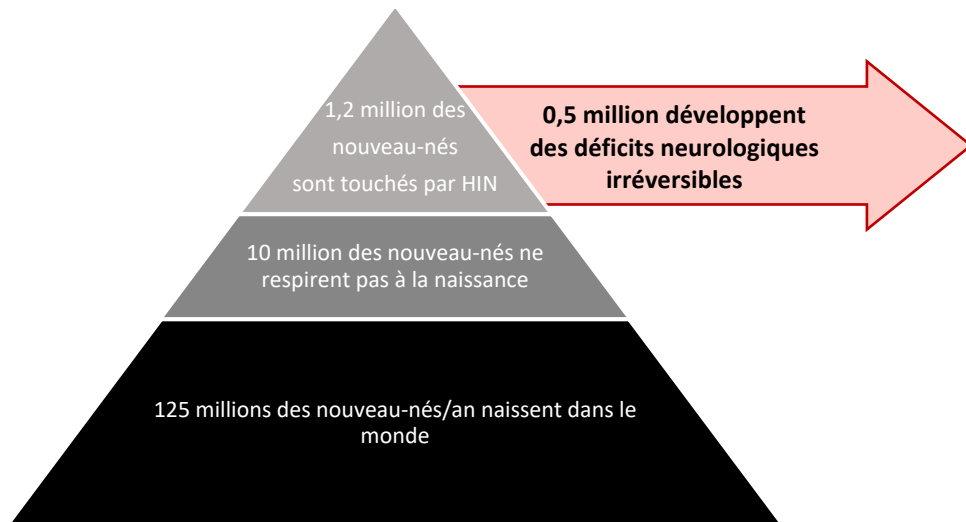


Figure 14 : Nombre de nouveau-nés touchés par l'HIN, chaque année dans le monde par rapport au nombre de naissances, adaptée de (Millar et al., 2017).

3.2. Physiopathologie de l'hypoxie-ischémie néonatale

Les études précliniques et cliniques ont mis en évidence que l'HIN n'est pas un événement unique mais un continuum de cascades d'évènements que l'on peut séquencer en plusieurs phases : une phase primaire, une phase de latence, une phase secondaire de mort neuronale retardée et une phase tertiaire de réparation cérébrale (Babbo et al., 2024) [Figure 15].

La phase primaire, aussi appelée (**phase de défaillance énergétique primaire**) survient dans les 0 à 6 h post-HI et se traduit par une diminution du flux sanguin au niveau du cerveau du nouveau-né entraînant une réduction des apports en oxygène (O_2) et en substrats énergétiques. Cette réduction entraîne un passage du métabolisme aérobie au métabolisme anaérobie, ce qui induit une déplétion rapide de la production d'ATP et une accumulation de lactate. La chute drastique de la production d'ATP conduit à une défaillance de la pompe Na^+/K^+ ATPase et une entrée massive de Na^+ dans les cellules. L'excès de Na^+ intracellulaire entraîne une dépolarisation cellulaire induisant à son tour la libération de glutamate par les neurones. Ce glutamate, à forte concentration, devient toxique pour le devenir des cellules : c'est le **phénomène d'excitotoxicité**. Il se lie à ses récepteurs, notamment NMDA, et provoque une entrée massive de Ca^{2+} . Ces afflux importants de Ca^{2+} intracellulaire sont délétères et conduisent à la formation d'un œdème cérébral cytotoxique et la mort cellulaire primaire des neurones. La durée et la sévérité de cette phase sont déterminantes pour le devenir de la cellule.

L'étape de reperfusion fait suite après la phase primaire. Cette étape est caractérisée par une restauration du débit sanguin cérébral, un rétablissement du métabolisme oxydatif, une résolution de l'œdème cytotoxique, une diminution des acides aminés excitateurs et une formation importante d'espèces réactives de l'oxygène (EROs ou ROS). Elle dure 30 à 60 min (Ranjan & Gulati, 2023). L'absence de l'étape de reperfusion présente un mauvais pronostic. La durée de cette phase dépendrait de la sévérité de l'épisode d'HI : plus l'HI est sévère, plus la période est courte. Survient alors **la phase latente** (6h - 15h) avec une normalisation du pH, une activation des processus apoptotiques et une réaction inflammatoire avec une production de cytokines. C'est durant cette fenêtre temporelle que les interventions thérapeutiques telles que l'hypothermie thérapeutique peuvent être initiées afin de prévenir l'évolution de la lésion cérébrale. Elle est suivie par une phase de défaillance énergétique secondaire (Cotten & Shankaran, 2010).

La phase secondaire (connue sous le nom de **phase de déficit énergétique secondaire**) survient entre 6 et 72 h après l'épisode d'HIN. Elle est caractérisée par un excès de neurotransmetteurs extracellulaires, en particulier le glutamate, tout comme lors de la phase de déficit énergétique primaire, qui stimule ses récepteurs induisant à nouveau un influx massif de Ca^{2+} dans la cellule. L'accumulation du Ca^{2+} intracellulaire entraîne la formation d'un œdème secondaire, un stress oxydatif, l'activation microgliale et une inflammation, conduisant à une mort cellulaire retardée.

La phase tertiaire survient environ 72 h après l'accident d'HIN. Elle peut durer entre plusieurs jours et plusieurs mois. En fonction de la sévérité de l'HIN et de la réponse à la prise en charge thérapeutique, deux issues sont possibles : (1) une récupération peut avoir lieu, les tissus cérébraux entrent dans un processus de réparation, les cellules neuronales préservées commencent à se différencier et de nouvelles reconnections synaptiques des neurones survivants se régénèrent ; (2) en cas d'épisode sévère, les tissus endommagés continuent à se détériorer, l'inflammation persiste par la libération progressive des cytokines pro-inflammatoires, stimulant ainsi le processus d'apoptose et aboutissant à une perte neuronale prolongée en dépit du rétablissement du flux sanguin cérébral (Babbo et al., 2024; Davidson et al., 2015; Gaston-Breton et al., 2023; Ranjan & Gulati, 2023).

Après une lésion hypoxique-ischémique, des cascades d'événements se produisent dans le cerveau du nouveau-né aux niveaux cellulaire et biochimique, comprenant l'excitotoxicité, le stress oxydatif, l'inflammation, et la mort cellulaire (nécrose/ apoptose) (Northington, Chavez-Valdez, & Martin, 2011) [Figure 15].

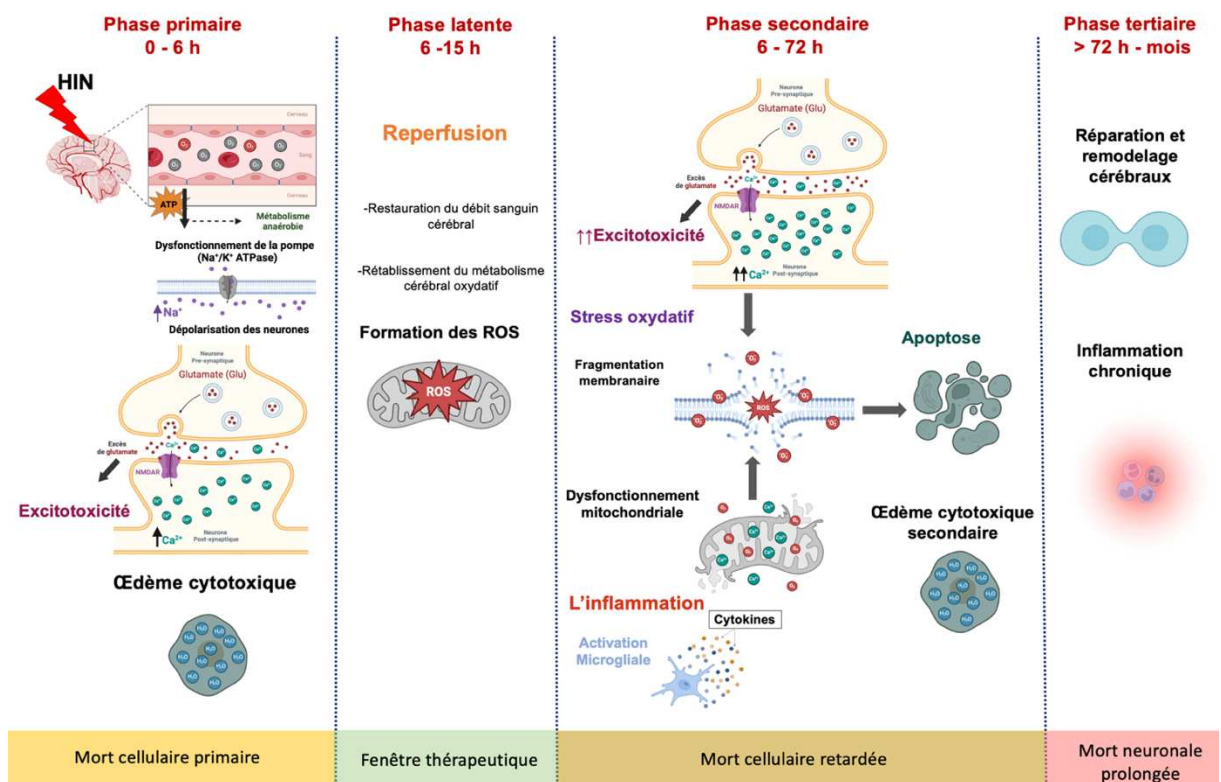


Figure 15 : Physiopathologie l’HIN et ses 4 phases, adaptée de (Deng et al., 2023) .

3.2.1. Excitotoxicité

Le glutamate est le principal neurotransmetteur de type acides aminés excitateurs (AAE) du cerveau, et la plupart des neurones et de nombreuses cellules gliales possèdent des récepteurs pour le glutamate (Johnston, 2005). Les voies neuronales qui utilisent le glutamate sont omniprésentes, assurant la médiation de la vision, de la mémoire, de l'apprentissage et des fonctions somatosensorielles ; Johnston & Coyle, 1981).

Lorsque l'équilibre est rompu et que le glutamate s'accumule dans la fente synaptique, il entraîne une excitotoxicité. Le terme excitotoxicité désigne la toxicité, l'altération et la destruction des neurones par l'hyperactivation du glutamate et permet d'expliquer la propagation des lésions cérébrales après une HIN. L'excitotoxicité est médiée par l'activation excessive des récepteurs ionotropiques glutamatergiques tels que les récepteurs NMDA et les canaux ioniques voltage-dépendants. L'entrée massive du Ca^{2+} dans la cellule entraîne l'activation des protéases de calcium-dépendantes, des protéines kinases/phosphatases, des phospholipases et de l'oxyde nitrique synthase (NOS). Tous ces éléments sont responsables de la dégradation des membranes, de l'ADN et des protéines (Northington, Chavez-Valdez, Graham, et al., 2011).

3.2.2. Stress oxydatif

Lorsque les tissus cérébraux du nouveau-né sont reperfusés après une HIN, ils ne parviennent pas à s'adapter à la nouvelle condition aérobie (Ranjan & Gulati, 2023). Lors de la reperfusion, la production d'EROs et d'ERA (espères réactives à l'azote) en excès sont induites, submergeant les défenses antioxydantes et provoquant ainsi un stress oxydatif. Les EROs comprennent l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle ($\cdot OH$), tandis que les ERA comprennent le NO et ses dérivés (Ranjan & Gulati, 2023). Le stress oxydatif est particulièrement délétère pour le cerveau des nouveau-nés (Buonocore & Groenendaal, 2007) en raison de la faible concentration en antioxydants à cet âge et de la forte consommation d'oxygène induite par le passage de la vie fœtale à la vie néonatale (Ferriero, 2004). Les nouveau-nés présentent également une forte concentration d'acides gras insaturés qui sont des précurseurs de radicaux libres. De plus, le fer lié aux protéines est libéré sous forme de Fe^{2+} et réagit avec les peroxydes pour former des radicaux libres augmentant ainsi les dommages causés aux tissus neuronaux (Buonocore & Groenendaal, 2007).

Les défenses antioxydantes ont pour rôle de retarder ou inhiber ces processus d'oxydation. Les antioxydants peuvent être classés en deux groupes : les antioxydants enzymatiques, comprenant la superoxyde dismutase (SOD), le glutathion peroxydase (GPX) et la catalase, et les antioxydants non enzymatique comme le glutathion réduit (GSH), les vitamines (C, E et A) et les oligoéléments (zinc, cuivre et manganèse - cofacteurs du SOD, sélénium - cofacteur du GPX).

3.2.3. Inflammation

L'un des principaux facteurs pathogènes de l'HIN est l'inflammation induite par l'activation du système immunitaire central (glie, constituée principalement d'astrocytes et de microglies) et périphérique (macrophages, monocytes et mastocytes). Au niveau du système immunitaire central, la gliose réactionnelle pourrait être impliquée dans l'inflammation ; Sen & Levison, 2006), cependant, son rôle dans l'évolution des lésions cérébrales ischémiques, en particulier chez les nouveau-nés, est controversé puisque les astrocytes réactifs limiteraient l'inflammation en libérant des médiateurs anti-inflammatoires préservant ainsi le tissu neuronal environnant (Sofroniew, 2015). La réponse inflammatoire délétère dans l'HIN serait donc principalement due aux cellules microgliales. Dans les conditions physiologiques, les microglies sont caractérisées par un phénotype particulier : une forme ramifiée avec des prolongements, ayant un rôle de surveillance pour assurer un suivi dynamique du microenvironnement et contribuer à l'homéostasie cérébrale (Nimmerjahn et al., 2005). Dans un contexte de lésion cérébrale, tel que dans l'HIN, les microglies deviennent réactives, changeant leur forme ramifiée pour une forme amiboïde ; ces microglies activées migrent vers le site lésé, se

multiplient et changent leur phénotype en devenant pro-inflammatoire, déclenchant ainsi la réponse inflammatoire. Ces cellules produisent au niveau du site de la lésion des cytokines majoritairement pro-inflammatoires telles que des interleukines (IL-1 β et IL-6), du facteur de Nécrose Tumorale alpha (Tumor Necrosis Factor ou TNF α), des chimiokines, des EROs et des métalloprotéases matricielles qui induisent la mort neuronale. Cette mort neuronale affecte le développement cérébral et est responsable de troubles neuronaux et mentaux à long terme ; Dommergues et al., 2003). Il a été démontré que la diminution de l'activation microgliale induite par l'HIN est associée à une diminution des lésions cérébrales (Dommergues et al., 2003) ; cependant, une inhibition totale de cette activité, par une injection intracérébrale de clodronate, chez des rats âgés de 7 jours (P7, 7^{ème} jour post-natal), pourrait être responsable de lésions cérébrales plus étendues, dans un contexte d'HIN (Faustino et al., 2011). La présence de deux phénotypes microgliaux pro- et anti-inflammatoires serait donc nécessaire à la récupération cérébrale post-HIN. En effet, les cellules au phénotype anti-inflammatoire présentent des propriétés immunosuppressives et neuroprotectrices via la libération de facteurs anti-inflammatoires et neurotrophiques qui stimulent le remodelage tissulaire et la réparation neuronale (Ekdahl et al., 2009). La microglie pro-inflammatoire quant à elle, présente également des propriétés neuroprotectrices en éliminant les débris induits par l'apoptose neuronale et en aidant à la réparation des tissus. Si l'inflammation dérégulée s'avère délétère pour le cerveau du nouveau-né, ensemble, ces deux phénotypes seraient, à l'équilibre, impliqués dans la neuroprotection post-HIN. Ces deux phénotypes ne sont pas figés et une cellule microgliale peut, selon son microenvironnement, passer d'une forme à l'autre, via un switch phénotypique qui s'accompagne d'un switch métabolique. En effet, la microglie au phénotype inflammatoire présenterait plutôt un métabolisme glycolytique couplé à une augmentation de l'activité de l'hexokinase et de la lactate déshydrogénase ainsi qu'à une augmentation du transporteur de glucose GLUT1 (Gimeno-Bayón et al., 2014). À l'inverse, la microglie anti-inflammatoire serait plutôt oxydative (Voloboueva et al., 2013). La modulation de ce switch métabolique pourrait moduler le switch phénotypique, diminuant la mort neuronale et préservant ainsi les fonctions cognitives.

3.2.4. La mort neuronale

Lors d'une lésion cérébrale, plusieurs cascades de mort cellulaire s'activent, notamment l'apoptose, la nécrose, la nécroptose, l'autophagie, chacune présentant des signatures histologiques et biochimiques distinctes (Zhang et al., 2022). Dans le cadre de l'HIN, les processus de mort cellulaire sont généralement classés en deux catégories distinctes : la **nécrose** (mort prématurée) et l'**apoptose** (mort programmée), selon la sévérité et la durée de l'HIN.

La nécrose est le principal processus de mort cellulaire dans le cerveau après une HIN chez le raton (Carloni et al., 2007) et également constaté chez la souris (Northington, Chavez-Valdez, Graham, et al., 2011) et le porcelet (Martin et al., 2000). La nécrose est caractérisée par un gonflement cytoplasmique et une dissolution nucléaire. Elle est principalement causée par un déficit énergétique rapide et une défaillance du maintien de l'homéostasie cellulaire, notamment du contrôle du volume cellulaire. Les processus de nécrose induisent des dommages à l'intégrité structurelle et fonctionnelle de la membrane cellulaire, des enzymes associées (par exemple la pompe Na⁺/K⁺ ATPase, un afflux massif, une surcharge d'ions (Na⁺ et Ca²⁺), une entrée d'eau ainsi qu'un dysfonctionnement mitochondrial (Golden et al., 2001). L'inhibition métabolique et le stress oxydatif des ERO sont les principaux responsables du déclenchement de la nécrose (Northington, Chavez-Valdez, & Martin, 2011).

L'**apoptose** est un processus de mort cellulaire programmée, énergie dépendante. Contrairement à la nécrose, les cellules en apoptose sont démantelées de l'intérieur de manière organisée, minimisant les dommages et les perturbations des cellules voisines. L'apoptose survient dans les zones présentant une lésion ischémique légère à modérée, souvent plusieurs jours après l'HIN (Nakajima et al., 2000). Le processus d'apoptose est souvent régulé par les mitochondries (Broughton et al., 2009). L'apoptose est activée par deux principales voies : la **voie intrinsèque** et la **voie extrinsèque**.

- La voie intrinsèque de l'apoptose est induite par une entrée massive de Ca^{2+} dans le milieu intracellulaire qui active les calpaïnes, responsables du clivage de BID (un membre de la famille des *B-cell lymphoma 2* - Bcl-2) en sa forme activée (tBID). tBID transloque vers les mitochondries lorsque la cellule reçoit un signal de mort et ainsi permet la libération des protéines pro-apoptotiques (Bax) et anti-apoptotiques (Bcl-2) dans le cytoplasme. Les protéines Bax facilitent la libération du cytochrome c mitochondrial, qui déclenche ensuite le clivage et l'activation de la **caspase 3**, une molécule pro-apoptotique. Ce processus entraîne la fragmentation de l'ADN et la mort cellulaire (Broughton et al., 2009).
- La voie extrinsèque de l'apoptose implique des récepteurs de mort appartenant à la superfamille des récepteurs au **TNF- α** qui sont responsables du clivage et donc l'activation du **caspase 3** (Broughton et al., 2009).

3.3. Outils pronostiques et diagnostiques

L'HIN est l'une des pathologies les plus critiques en médecine néonatale. Les nourrissons atteints de cette pathologie souffrent de séquelles neurologiques (de Vries & Jongmans, 2010; Shah & Perlman, 2009). Plusieurs études ont mis en évidence différents facteurs prédictifs de l'évolution neurodéveloppementale chez les nouveau-nés atteints d'HIN (Polat et al., 2013; Thoresen et al., 2012). L'évaluation pronostique neurologique de ces nouveau-nés est primordiale mais demeure difficile pour présenter une valeur pronostic suffisamment solide. Cette évaluation se repose sur des examens spécifiques comme les données cliniques de Sarnat, le score d'APGAR, l'électroencéphalogramme (EEG), l'imagerie par résonance magnétique (IRM) ou la spectroscopie (N. Natarajan & Pardo, 2017). Les données cliniques clés dans l'évaluation d'un nouveau-né avec une encéphalopathie sont retrouvées dans les scores cliniques suivants.

3.3.1. Score de Sarnat

L'une des premières évaluations cliniques se repose sur la classification de Sarnat qui est réalisée durant les premières heures de vie, afin de s'aligner sur la fenêtre thérapeutique de la phase de latence après l'épisode d'HIN (El-Dib et al., 2019). Cette classification est ainsi utilisée comme référence dans de nombreux centres hospitaliers pour sélectionner les candidats à l'hypothermie thérapeutique (HT). Elle se divise en trois stades de sévérité (Sarnat et al., 2020; Sarnat & Sarnat, 1976) (**Tableau 1**) :

- Le **stade I** correspond à une encéphalopathie légère avec hypertonie, hyperexcitabilité et absence de convulsion. Le pronostic est favorable.
- Le **stade II** correspond à une encéphalopathie modérée avec des troubles de la conscience et une hypotonie associée ou non à des convulsions. Le pronostic est réservé.
- Le **stade III** correspond à une encéphalopathie sévère, marqué par un coma, une abolition des réflexes du tronc et des convulsions. Son pronostic est péjoratif parce qu'il est étroitement lié à un risque de développement neurologique défavorable (Meyer-Witte et al., 2008).

3.3.2. Score d'APGAR

Le score d'APGAR est un autre outil pronostique largement utilisé dans toutes les situations pour évaluer la vitalité d'un nouveau-né. Il repose sur cinq critères : la fréquence cardiaque, la respiration, la coloration de la peau, le tonus musculaire et la réactivité. Le nom APGAR correspond à : A = Apparence (coloration), P = Pouls (fréquence cardiaque), G = Grimace (réactivité aux stimuli), A = Activité (tonus musculaire) et R = Respiration (efforts respiratoires). Chaque critère est noté de 0 à 2 points en fonction des observations, pour un score total allant de 0 à 10. Il est étroitement lié au devenir neurologique des nouveau-nés post-HIN. Des études ont montré qu'un score d'APGAR inférieur à 7 à 5 minutes de vie est associé à un risque augmenté de décès néonatal et/ou d'handicap neurologique, incluant la paralysie cérébrale, l'épilepsie et les troubles cognitifs (Ehrenstein, 2009; Ehrenstein et al., 2006). Dans l'étude de Ruth et Raivio, 80 % des nouveau-nés ayant un score inférieur

ou égal à 7 à 5 minutes avaient une évolution favorable à 1 an (Ruth & Raivio, 1988). Une autre étude a montré qu'un enfant sur 5 ayant un score de 0 à 10 minutes survivait jusqu'à l'âge scolaire sans séquelle modérée ou sévère (G. Natarajan et al., 2013).

Cependant, le côté subjectif du score d'APGAR entraîne une importante variabilité inter-observateur et sa valeur pronostique sur la sévérité de l'HIN à long terme reste limitée (Ehrenstein, 2009).

Caractéristiques cliniques	Stade I : Normal	Stade II : Modérée	Stade III : Sévère
Niveau de conscience	Bébé bien présent, quand ouvre les yeux : regarde, fixe, suit la cible	Bébé peu présent, si ouvre les yeux : regard dans le vague	Comateux
Activité motrice globale	Harmonieuse, variée	Pauvre ou agitation	Absente
Rythme cardiaque	Normal modulé	Lent	Variable
Rythme respiratoire	Normal	Périodique ou hyperventilation	Apnée
Succion	Efficace	Faible ou absente	Absente
Posture	Normale, flexion des membres	Extension des membres, flexion distale	Décérébration intermittente, enroulements des membres supérieurs
Tonus musculaire	Normale	Hypotonie légère	Flaccide
Tonus périphériques	Bonne ouverture des mains	Mains et pieds crispés	Flaccide
Réflexes du tronc	Présents	Présents	Absents
Réponse olfactive	Présente, bien préservée	Faible	Absente
Convulsions	Absentes	+/- Présentes	+/- Présentes

Tableau 1 : Classification de Sarnat et Sarnat. Examen neurologique normal et signes cliniques d'hypoxie-ischémie modérée ou sévère.

3.3.3. Électroencéphalogramme (EEG)

L'EEG permet l'enregistrement de l'activité électrique cérébrale à l'aide d'une centaine d'électrodes positionnées autour du cerveau tel un casque. Cette méthode aide à évaluer le degré de sévérité de l'atteinte cérébrale et prédire le pronostic (Sarnat et al., 2020; Jarreau et al., 2016; Mandel et al., 2002). Cet examen doit être réalisé, si possible, avant la mise sous hypothermie, puis quotidiennement, jusqu'à la phase de réchauffement complet. Cependant cette technique a des limites. Elle ne permet pas d'évaluer précisément l'étendue des lésions cérébrales mais elle reste un outil indispensable pour confirmer le caractère épileptique des crises des celles non épileptiques qui sont souvent difficiles à distinguer sur la seule base clinique. Cette distinction est importante pour limiter l'administration inutile de médicaments antiépileptiques qui peuvent présenter des effets secondaires (Sarnat et al., 2020).

3.3.4. Imagerie par Résonance Magnétique (IRM)

L'IRM cérébrale est une méthode non-invasive et le mode d'imagerie privilégié chez les nouveau-nés atteints d'HIN (Chau et al., 2014). Réalisée durant la première semaine de vie, elle permet d'évaluer la présence et la localisation de lésions cérébrales et de prédire l'évolution neurologique à long terme, y compris après l'hypothermie thérapeutique (Thoresen et al., 2021). Grâce en particulier à l'IRM de diffusion, on peut réaliser une **cartographie ADC** (apparent diffusion coefficient, paramètre qui mesure la vitesse de déplacement de molécules d'eau en mm²/s), permettant de différencier un œdème cytotoxique (restriction de diffusion) d'un œdème vasogénique (augmentation du coefficient de diffusion), ou encore de détecter une maturation anormale (augmentation de l'ADC). L'ADC évalue la sévérité de l'œdème cytotoxique : plus l'œdème est sévère, plus les cellules sont gonflées, plus le

milieu extracellulaire est restreint et plus les molécules d'eau extracellulaires ont une faible vitesse de déplacement. Cette cartographie ADC permet alors de visualiser la lésion cérébrale avant même l'apparition des phénomènes de nécrose ou d'apoptose. De par son caractère non-invasif, l'IRM est une technique spécifiquement adaptée pour faire un suivi longitudinal, à la fois en clinique et en préclinique.

3.3.5. Spectroscopie par Résonance Magnétique (SRM)

La SRM est également utilisée pour prédire le pronostic neurodéveloppemental à long terme des nouveau-nés atteints d'HIN (Thayyil et al., 2010). Elle permet une quantification relative de certains métabolites (Sarnat & Sarnat, 1976) dans une région d'intérêt (en cas d'HIN ou d'altérations du métabolisme cérébral) pour évaluer la récupération du métabolisme oxydatif et donc de la fonction mitochondriale cérébrale (Stevenson et al., 2017). Le N-Acétyl-Aspartate (NAA) est un marqueur de souffrance ou de mort neuronale. La choline est un précurseur et un produit de dégradation des membranes cellulaires. La créatine est un marqueur du métabolisme énergétique, et sert de pic de référence car, étant le plus constant. Le lactate (Lac) témoigne d'une glycolyse anaérobie. Il a été montré que la diminution du ratio NAA/choline, NAA/créatine ou l'augmentation du ratio lactate/NAA était fortement prédictive d'une évolution défavorable après une HIN (de Vries & Groenendaal, 2010; Roelants-Van Rijn et al., 2001).

3.4. Prise en charge thérapeutique de l'HIN : l'hypothermie thérapeutique (HT)

L'HT est le seul traitement proposé en clinique pour lutter contre les lésions liées à l'HIN.

3.4.1. Mécanismes d'actions de l'HT

Les mécanismes d'action de l'HT sont multifactoriels. Un des plus connus est la diminution du métabolisme énergétique cérébral de 5 à 8 % par degré de chute de la température corporelle (Erecinska et al., 2003). Elle réduit l'accumulation des excito-toxines et radicaux libres, la réponse inflammatoire, la défaillance de l'activité mitochondriale, la mort cellulaire programmée et préserve la BHE (Thoresen et al., 1997; Wassink et al., 2014; Baumann et al., 2009). Elle permet ainsi de limiter l'œdème cytotoxique secondaire (Srinivasakumar et al., 2013), la perte neuronale et l'extension des lésions cérébrales (Thoresen et al., 1997) (**Figure 16**). Pour une neuroprotection optimale, les études ont montré que l'hypothermie modérée (**entre 33 et 34 °C**) devait être initiée le plus tôt possible durant la phase de latence, soit dans les 6 premières heures post-HIN, avant la défaillance secondaire, et être poursuivie tout au long de la phase secondaire, jusqu'à 72 h (Drury et al., 2014). Une étude clinique a montré que l'HT à 32°C, au-delà de 72 h post-HIN, ne semblait pas donner de meilleurs résultats cliniques. Une température rectale ou œsophagienne de 33 °C avec un maintien de cette température sur plus de 72 h (exemple 120 h) auraient des effets délétères (Shankaran et al., 2014).

<p style="text-align: center;"><u>Excitotoxicité</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Retarde la dépolarisation membranaire • Limite le flux de calcium (Ca²⁺) intracellulaire • ↓ l'accumulation des glutamates dans la fente synaptique 	<p style="text-align: center;"><u>Stress oxydatif et BHE</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • ↓ la production des NO • ↓ la production des O₂. • Préserve la barrière hémato-encéphalique
<p style="text-align: center;"><u>Inflammation</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • ↓ la production des cytokines pro-inflammatoires (TNFα et IL – 1β) • ↓ l'activation microgliale 	<p style="text-align: center;"><u>Mort Cellulaire</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • ↓ l'expression de caspase-3 • ↓ la libération de cytochrome C dans le cytoplasme • ↓ l'apoptose

Figure 16 : Effets thérapeutiques de l'hypothermie sur les différents mécanismes de dommages cérébraux , adaptée de (Cánovas-Ahedo & Alonso-Alconada, 2019). O₂ : anion superoxyde, NO : oxyde nitrique (NO), IL-1β : interleukine 1 bêta ; TNFα : facteurs de nécrose tumorale alpha.

En clinique, il existe deux principales méthodes de refroidissement (Saliba et al., 2010) :

- **Le refroidissement sélectif de la tête**, qui est réalisé grâce à un casque de refroidissement placé sur la tête du nouveau-né, en vue de maintenir la température rectale à **34,0 ± 0,5 °C** et celle des fontanelles inférieures à 30 °C. Ce système est coûteux, exige beaucoup de travail et peut provoquer des lésions cutanées, sans compter qu'il est également plus difficile de maintenir la température rectale et que l'accès aux électrodes d'EEG est limité.
- **Le refroidissement corporel global** des nourrissons peut être obtenu par divers outils : refroidissement passif grâce à des blocs réfrigérants, ou encore couverture ou gilet de refroidissement actifs (type CRITICOOL[®] ou encore TECOTHERM[®]) (Akula et al., 2015). Le refroidissement corporel global est préconisé parce qu'il est plus facile à préparer et à utiliser et il est moins coûteux. De plus, il donne un meilleur accès à l'EEG. La température rectale est fixée à **33,5 ± 0,5°C** en cas d'utilisation d'une hypothermie globale et elle est maintenue pour une durée de 72 h. Le réchauffement est ensuite réalisé, de manière très progressive (moins de 0,2-0,4°C par heure) et régulière. Malgré l'efficacité prouvée de cette thérapie, il a été montré dans la littérature que pendant cette période de réchauffement les nouveau-nés atteints d'HIN peuvent présenter des crises convulsives associées à des risques accrus de mortalité ou d'invalidité à l'âge de 2 ans (Chalak et al., 2021).

La supériorité de l'une des deux méthodes n'est pas prouvée ; à l'âge de 12 mois aucune différence n'a pu être mise en évidence entre des nourrissons traités par l'une ou l'autre méthode (Souza et al., 2023). Des essais cliniques plus vastes ont montré que l'HT est efficace pour réduire le risque de décès ou de graves incapacités neurodéveloppementales à long terme chez les nouveau-nés atteints d'HIN modérée ou grave, que l'on utilise le refroidissement sélectif de la tête ou le refroidissement corporel global, lorsque chacune des méthodes est comparée à un groupe témoin (Tagin et al., 2012).

3.4.2. Limites de l'hypothermie thérapeutique

L'HT est désormais bien établie comme le seul traitement standard pour les nourrissons atteints d'HIN mais présente cependant plusieurs limites. Tout d'abord, ce traitement est uniquement restreint aux nouveau-nés ayant une HIN modérée ou sévère et doit être mise en place dans les 6 premières heures de leurs vies. Il n'y a, à ce jour, pas de traitement pour les nouveau-nés présentant une HIN légère et les nouveau-nés moribonds, ceux ayant une anomalie congénitale génétique majeure ou des manifestations de grave traumatisme crânien. De plus, les prématurés de moins de 36 semaines aménorrhée (SA) ne peuvent bénéficier de cette prise en charge.

À la suite d'une HT, des essais cliniques rapportent une hypertension artérielle, une bradycardie sinusale (fréquence cardiaque < 80 battements/min), une thrombocytopénie légère, mais sans majoration des complications hémorragiques, ainsi qu'une modification métabolique (hypoglycémie modérée). Ce traitement représente en outre un stress néonatal important, puisqu'il implique une séparation des parents et nécessite des procédures invasives (cathéters centraux, ventilation mécanique, administration de sédatifs et d'inotropes) (Jacobs et al., 2013; Gluckman et al., 2005).

L'HT doit être mis en place avec rigueur, d'autant plus que les essais cliniques actuels suggèrent que 44 à 53 % des nourrissons qui reçoivent une HT décèdent ou souffrent de séquelles neurologiques modérées à sévères (Wu & Gonzalez, 2015). Concernant les risques à long terme, des études ont montré que l'HT réduit le taux de décès mais n'apporte aucune amélioration chez les survivants, notamment sur le retard intellectuel, le dysfonctionnement attentionnel, exécutif ou encore visuo-spatial (Shankaran et al., 2012). Récemment, une méta-analyse a mis en évidence que des enfants de 2 ans atteints d'HIN légère ont des scores cognitifs composites plus bas par rapport à un groupe témoin sain, et que ces scores sont identiques à ceux d'enfants atteints d'HIN modérée à la naissance et traitée par l'HT. Ces résultats suggèrent donc que les enfants ayant eu une HIN modérée et traités par hypothermie thérapeutique gardent des troubles neurodéveloppementaux (Finder et al., 2020). Dans une autre étude portant sur 68 nourrissons atteints d'HIN, 22 % sont décédés au cours de la période néonatale. Chez les survivants, 36 % souffraient de paralysie cérébrale, 15 % présentaient des

dysfonctionnements neurologiques mineurs et/ou des difficultés perceptivo-motrices et 2 % souffraient uniquement de déficience cognitive (Barnett et al., 2002). Enfin, 13 % des nouveau-nés qui avaient survécu à une HIN modérée à grave et qui avaient été traités par une HT présentaient une épilepsie infantile, parmi lesquels 7 % prenaient encore des antiépileptiques à l'âge scolaire (Liu et al., 2017).

Ainsi, il est urgent de mettre au point de nouvelles thérapies neuroprotectrices complémentaires à celle existante pour réduire le taux de gravité des troubles neurologiques provoqués par l'HIN. Cependant, pour toute nouvelle thérapie qui sera développée, il faudra tester son efficacité combinée à l'hypothermie, seul traitement actuel en clinique. Le protocole d'hypothermie n'étant pas disponible au laboratoire, j'ai dû, dans un premier temps, le mettre au point. Ceci fait l'objet du Chapitre 3 de ce manuscrit.

3.4.3. Stratégies thérapeutiques couplées à l'HT dans le cadre de l'HIN

Comme détaillé ci-dessus, l'efficacité de l'HT en clinique étant limitée, des études précliniques ont été réalisées sur plusieurs composés chez des modèles de rongeurs et de porcelets, permettant d'identifier des thérapies potentielles pour le traitement de l'HIN (Sabir et al., 2023). Bien que ces composés aient démontré une efficacité dans ces études précliniques, il est encore nécessaire de poursuivre les recherches afin d'assurer une neuroprotection optimale dans les cas d'HIN. Plusieurs approches thérapeutiques, telles que le xénon inhalé, l'allopurinol, la mélatonine, les cellules souches, l'érythropoïétine, sont en cours d'essai clinique ou ont déjà été testées chez les nouveau-nés humains [Figure 17].

3.4.3.1. Xénon

Le xénon est un gaz noble inodore couramment utilisé comme anesthésique par inhalation chez les adultes. Plusieurs études précliniques ont montré son potentiel neuroprotecteur à des concentrations sous-anesthésiques de 50 % de xénon (Anna et al., 2020; Rüegger et al., 2018). Le xénon pourrait réduire considérablement les lésions cérébrales dans les modèles animaux d'HIN (Rüegger et al., 2018). Diverses concentrations allant de 40 % (**Xe40 %**) à 70 % (**Xe70 %**) ont été utilisées ; cependant, le moment, la dose et la durée optimaux de ce traitement n'ont pas encore été déterminés. Au niveau moléculaire, le xénon agissant comme un antagoniste du récepteur NMDA, il préviendrait l'excitotoxicité médiée par le glutamate (Franks et al., 1998). Ses propriétés neuroprotectrices ont été montrées *in vitro* (Petzelt et al., 2003) ainsi que dans des modèles d'HIN chez les rongeurs et les porcelets (Chakkarapani et al., 2010; Dingley et al., 2008; Hobbs et al., 2008). Il peut activer les cascades des kinases pro-survie telles que la p-AKT ainsi que le facteur anti-apoptotique Bcl2 (Lobo et al., 2013). Le xénon exerce la majeure partie de la neuroprotection dans les phases primaire et secondaire post-HIN en inhibant les récepteurs NMDA et en réduisant la mort cellulaire (Faulkner et al., 2011; Sabir et al., 2013).

Un essai clinique a testé l'efficacité du xénon couplé à l'HT sur des nouveau-nés atteints d'HIN. Ces bébés ont été refroidis à une température rectale cible de 33,5 °C et traités avec 30 % de xénon pendant 24 h. Les résultats n'ont montré aucun effet neuroprotecteur du xénon par rapport à l'HT seule (Azzopardi et al., 2016). En outre, le xénon est relativement rare dans l'atmosphère terrestre (0,0087 ppm dans l'air), ce qui rend difficile son utilisation dans le milieu clinique. De plus, il coûte très cher et nécessite un circuit fermé d'administration et un système de recyclage (Rüegger et al., 2018). Cependant, des études supplémentaires évaluant les effets à long terme seront nécessaires pour mieux comprendre les résultats neurologiques lorsque ce traitement est couplé à l'HT.

3.4.3.2. Allopurinol

L'allopurinol [4-hydroxy-pyrazole(3,4-d) pyrimidine], un inhibiteur de la xanthine oxydase (XO) (B. E. Lee et al., 2009), a montré des effets neuroprotecteurs après un accident ischémique. L'inhibition de la XO a entraîné une réduction de la production de ROS et du stress oxydatif (Kostić et al., 2015) ; par

conséquent, il est suggéré comme traitement pour les maladies cardiovasculaires. Il est connu pour traverser facilement la BHE et participer à la protection des cellules neuronales (Marro et al., 2006). En inhibant la surproduction de ROS, il diminue les expressions de molécules pro-inflammatoires dans le cerveau après une lésion cérébrale. Des études ont montré, chez des rats P7 (modèle Rice-Vannucci), que l'administration d'allopurinol après une HIN pouvait réduire l'œdème cérébral ainsi que la mort neuronale (Kaya et al., 2022; Palmer et al., 1993). Cet effet neuroprotecteur serait attribué à sa capacité à inhiber la XO, empêchant ainsi la dégradation de la purine, notamment de l'adénosine, pendant l'HIN (Palmer et al., 1993). Sur le même modèle, une autre étude a montré que la combinaison d'allopurinol et d'HT a permis de diminuer le volume des lésions cérébrales et de restaurer les fonctions cognitives (Rodríguez-Fanjul et al., 2017).

À l'heure actuelle, il existe une étude clinique en cours qui évalue l'efficacité et l'innocuité de l'allopurinol administré immédiatement après l'HIN et combiné à l'HT. Les détails de cette étude sur l'allopurinol sont les suivants : [NCT03162653: Effect of Allopurinol for Hypoxic-ischemic Brain Injury on Neurocognitive Outcome](#). Cet essai clinique vise à mettre en évidence les effets bénéfiques de la perfusion d'allopurinol chez les nouveau-nés atteints d'HIN, en comparant l'allopurinol au mannitol (un complément des soins standard, anti-œdémateux) et en se concentrant sur les résultats à long terme tels que le développement des troubles cognitifs ou le décès à deux ans. Cette étude devrait s'achever en janvier 2026.

3.4.3.3. Mélatonine

La mélatonine, également appelée N-acétyl-5-méthoxytryptamine, est une hormone bien connue pour réguler le rythme circadien, et elle est principalement produite par la glande pinéale (Cipolla-Neto & Amaral, 2018). En plus de son rôle dans le rythme circadien, la mélatonine est également reconnue pour ses propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires (Chitimus et al., 2020). Elle peut traverser la BHE et accéder aux compartiments intracellulaires, favorisant ainsi le maintien de l'intégrité mitochondriale et la régulation positive des enzymes antioxydantes, ce qui empêche efficacement l'apoptose (Cardinali, 2019; Tarocco et al., 2019). La production de mélatonine par la glande pinéale est encore peu développée à la naissance, ce qui rend les nouveau-nés vulnérables aux lésions cérébrales après un épisode d'HIN (Tarocco et al., 2019).

De plus, en tant qu'antioxydant direct, elle peut activer les récepteurs de la mélatonine MT1, MT2 (récepteurs transmembranaires), MT3 (récepteurs cytosoliques) ainsi que des récepteurs nucléaires, jouant ainsi un rôle protecteur contre les ROS (Tarocco et al., 2019). Elle offre également des effets bénéfiques à différentes étapes de la physiopathologie de l'HIN, incluant les phases latentes, secondaires et tertiaires (Cardinali, 2019; Paprocka et al., 2019). Les essais précliniques menés sur des modèles animaux ont montré que la combinaison de la mélatonine avec l'hypothermie offrait une neuroprotection significativement supérieure par rapport à l'hypothermie seule chez des porcelets atteints d'HIN. Cette approche combinée a permis d'améliorer le métabolisme énergétique cérébral et de réduire la mort cellulaire (Robertson et al., 2013). Une autre étude menée par Robertson *et al.* a cependant montré que la mélatonine avait une fenêtre thérapeutique limitée, allant de seulement 10 min à 2 h après l'événement d'HIN (Robertson et al., 2019). Cela signifie qu'une administration rapide de mélatonine après l'accident ischémique est cruciale pour atteindre des niveaux thérapeutiques efficaces en vue de la neuroprotection (Robertson et al., 2013, 2019). À ce jour, aucun protocole d'administration de la mélatonine n'a été établi ; toutefois, les données précliniques recommandent une dose de 20 à 30 mg/kg administrée rapidement au nouveau-né (Pang et al., 2021). Des études cliniques sont actuellement en cours pour évaluer l'efficacité et l'innocuité de l'administration de mélatonine après un épisode d'HIN en combinaison avec l'HT. L'étude d'Aly *et al.* est la première à tester cette combinaison chez des nouveau-nés souffrant d'HIN modérée à sévère. Ils ont administré de la mélatonine par voie entérale (10 mg/kg pendant cinq jours) en association avec l'HT et ont comparé les résultats à un groupe traité uniquement par l'HT. Ils ont observé une réduction de la taille des lésions de la substance blanche, de la concentration de NO et de l'activité de la SOD dans le groupe ayant reçu les deux thérapies. Cependant, en ce qui concerne les données d'IRM et d'EEG, aucune

différence significative n'a été constatée entre les deux groupes. De plus, la nombre des patients par groupe était faible, et les données de suivi neurodéveloppemental se limitaient à une période de six mois uniquement après HIN (Aly et al., 2015).

Une autre étude clinique a évalué l'effet de la perfusion de mélatonine (5 mg/kg pendant 3 jours) combinée à l'HT chez des nouveau-nés souffrant d'HIN. Bien que cette étude ait inclus un nombre limité de patients par groupe, elle a montré une amélioration significative du développement cognitif (composante cognitive du test Bayley III) à 18 mois dans le groupe ayant reçu les deux thérapies par rapport au groupe traité uniquement par HT (Jerez-Calero et al., 2020). Cependant, aucune différence statistiquement significative n'a été observée dans le score composite de ce test à 6 mois, ni dans d'autres composantes neurologiques, telles que le langage et les fonctions motrices, ni sur les IRM ou les enregistrements d'EEG entre les deux groupes (Jerez-Calero et al., 2020).

Plus récemment, une étude clinique américaine en cours évalue l'effet de la mélatonine associée à l'HT après un épisode d'HIN. Intitulée **Melatonin as a Neuroprotective Therapy in Neonates With HIE Undergoing Hypothermia** (NCT02621944), cet essai clinique teste l'efficacité de cette combinaison sur trente nouveau-nés atteints d'HIN et vise à déterminer la dose thérapeutique optimale de mélatonine à administrer en complément de l'HT. Un suivi du développement cognitif sera réalisé entre 18 et 22 mois. L'effet de la mélatonine sur la cascade inflammatoire, le stress oxydatif, la production de radicaux libres et les biomarqueurs sériques de lésions cérébrales sera également examiné. Les résultats de cette étude sont attendus pour mars 2026.

3.4.3.4. Cellules souches

Au cours de la dernière décennie, l'intérêt pour l'utilisation de cellules souches ou progénitrices pour booster la récupération après une HIN s'est accru. Les études précliniques ont été majoritairement réalisées sur des modèles de rat et de souris. Les effets de différentes préparations de cellules souches/progénitrices administrées après une HIN sont très variables (Bennet et al., 2012), reflétant des différences considérables dans le type cellulaire, la dose et la fenêtre temporelle de la transplantation des cellules souches après l'accident ischémique.

De manière prometteuse, l'étude de Park *et al.* a utilisé des cellules souches mésenchymateuses (CSM) combinées à l'hypothermie dans le traitement de l'HIN chez le rat (modèle de Rice-Vannucci) (Park et al., 2015). Dans cet essai, une réduction des lésions cérébrales et une restauration des fonctions sensorimotrices, meilleures avec le traitement combiné a été montré comme mesuré par IRM et les tests comportementaux. De plus, cette thérapie combinée pourrait exercer également des effets anti-apoptotiques et anti-inflammatoires (Park et al., 2015).

En clinique, l'innocuité et l'efficacité des CSM chez les nouveau-nés atteints d'HIN ont été testées. Les enfants ont reçu deux doses de CSM par voie intraveineuse. La première dose a été perfusée pendant le traitement à l'HT et la deuxième dose après (Cotten et al., 2023). Les résultats ont montré que la perfusion intraveineuse de CSM chez les nourrissons atteints d'HIN modérée et sévère était sûre et faisable. Tous les bébés après les traitements ont survécu et ont eu des scores d'atteinte neurologique faibles pour les âges compris entre 12 et 17 mois (Cotten et al., 2023).

Cependant, un suivi longitudinal à long terme pour la faisabilité de perfusion de ces cellules est nécessaire pour mieux comprendre les résultats neurologiques lorsque ce traitement est couplé à l'HT.

3.4.3.5. Érythropoïétine

L'érythropoïétine (EPO) joue un rôle central dans l'érythropoïèse et est couramment utilisée comme traitement de l'anémie chez le nouveau-né prématuré (Ohlsson & Aher, 2014). Il existe de plus en plus de preuves cliniques et précliniques selon lesquelles l'EPO humaine recombinante (**rhEPO**) pourrait être neuroprotectrice après une HIN, en se liant au récepteur de l'EPO (**EPOR**) exprimé sur les neurones et les cellules gliales. Dans le cerveau des nouveau-nés, l'EPO peut favoriser l'expression des gènes anti-apoptotiques, inhiber l'activation des caspases, atténuer les radicaux libres de l'oxygène et la réponse inflammatoire et augmenter la neurogenèse (Robertson et al., 2012). Les effets

neuroprotecteurs de rhEPO ont déjà été évalués chez les rongeurs à la suite d'un épisode d'HIN. Une étude a montré qu'une injection de rhEPO à une dose de 1000 U/kg par voie intrapéritonéale (i.p.) chez des rats P7 après l'épisode d'HIN, a permis de diminuer les volumes lésionnels cérébraux (Kumral et al., 2003). Des résultats similaires ont été observés avec une dose de 3000 U/kg de rhEPO, administrée également par voie i.p., chez des rats ayant subi un accident d'HIN (Brissaud et al., 2010). Lorsque l'EPO a été couplée à l'HT, une récupération de 26 % des fonctions sensorimotrices a été mesurée, mais uniquement chez les rats mâles (Fan et al., 2013).

Deux études cliniques ont utilisé l'EPO dans le traitement de l'HIN. La première étude de Zhu *et al.* a montré que l'administration d'une faible dose de rhEPO (300 ou 500 U/kg) était associée à une réduction de mortalité et une amélioration des résultats à long terme chez les nourrissons à terme atteints d'HIN modérée (Zhu et al., 2009). Ces résultats n'ont pas été retrouvés dans le contexte d'une HIN sévère. La seconde étude a mis en évidence que l'administration d'une dose élevée d'EPO (2500 U/kg) dans les 48 h suivant la naissance, a restauré le développement neurologique des nouveau-nés à terme atteints d'HIN légère et modérée et a été associée à une réduction significative de l'activité épileptique et à une diminution des séquelles neurologiques à 6 mois (Elmahdy et al., 2010). De plus, la combinaison de l'HT et de l'EPO après une HIN a donné de meilleurs résultats moteurs à 12 mois que l'HT seule (Wu et al., 2016). L'EPO seule ou l'EPO combinée à l'HT sembleraient avoir des résultats prometteurs après une HIN.

Toutefois, une troisième étude a montré que la perfusion d'une dose d'EPO (1000 U/kg) à des nouveau-nés atteints d'HIN et soumis à l'HT dans les 26 h suivant la naissance, puis à 2, 3, 4 et 7 jours d'âge, n'a pas réduit le risque de décès ou de déficience neurodéveloppementale à l'âge de 22 à 36 mois par rapport au groupe ayant reçu une combinaison de placebo et d'HT. De plus, la combinaison d'EPO et d'HT a été associée à un taux élevé d'effets indésirables graves chez les nouveau-nés atteints d'HIN. Des études supplémentaires seront nécessaires pour déterminer la dose et la fenêtre optimales d'administration d'EPO aux nouveau-nés soumis à l'HT, afin d'évaluer son efficacité et son innocuité après un épisode d'HIN (Wu et al., 2022).

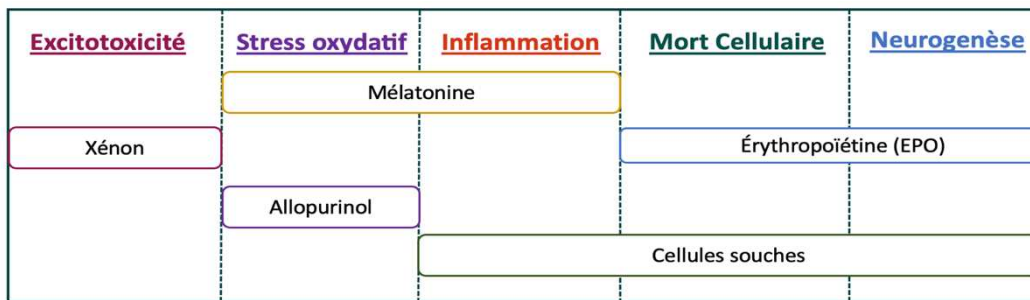


Figure 17 : Approches thérapeutiques couplées à l'HT dans le cadre d'HIN, adaptée de (Cánovas-Ahedo, 2019).

3.4.3.6. Rôle du lactate dans le cadre de l'HIN

Bien que le glucose soit considéré comme le principal substrat énergétique du cerveau, il existe des différences de métabolisme énergétique cérébral entre le cerveau d'un adulte et celui d'un nouveau-né. Le cerveau de nourrisson a en effet une plus faible capacité de transport du glucose en raison d'un faible taux d'expression des GLUTs. En revanche, par rapport aux adultes, il présente une expression plus élevée des MCTs, qui permettent l'utilisation de substrats alternatifs au glucose, tels que **le lactate et les corps cétoniques**, en adaptation à l'allaitement (S. J. Vannucci & Vannucci, 1998). Comme la physiopathologie de l'HIN est associée à une défaillance énergétique (Davidson et al., 2015), l'apport d'un substrat métabolique pourrait être une stratégie intéressante afin d'améliorer ou de prévenir les dommages causés par l'HIN. Le lactate, qui entre dans le cerveau par les mêmes transporteurs MCT que les corps cétoniques, et qui a été montré comme un bon substrat neuronal, est donc un excellent candidat pour le nouveau-né (Schurr et al., 1997). Cette hypothèse a été testée sur un modèle d'HIN

chez le raton (P7, modèle Rice-Vannucci). Notre équipe a montré un effet neuroprotecteur de l'administration de lactate, dans le cadre de l'HIN (Roumes, Dumont, et al., 2021). Trois injections consécutives de lactate (**534 mM, 4 µl/g** en intra-péritonéale (i.p.) à 3 h, 24 h et 48 h post-ligature) ont permis de réduire les volumes lésionnels cérébraux et de récupérer les fonctions motrices et cognitives. Les données d'IRM ont montré une réduction de 25 % du volume des lésions cérébrales dans les 30 min suivant son injection ainsi qu'une diminution de la sévérité de l'œdème cytotoxique. De plus, la co-injection d'oxamate (un inhibiteur de la LDH, enzyme qui converti le lactate en pyruvate, empêchant son utilisation métabolique) a abolit la neuroprotection du lactate. L'étude a ainsi pu mettre en évidence que l'effet neuroprotecteur du lactate serait, en partie, due à une utilisation métabolique du lactate, comme substrat énergétique). Étonnamment, cette neuroprotection n'a pas été observée après injection de glucose ou de pyruvate (un autre substrat énergétique). Ces données démontrent que l'administration de lactate est une thérapie prometteuse chez les nouveau-nés atteints d'HIN. Ces données ont été confirmés par d'autres travaux publiés plus récemment (Tassinari et al., 2024).

⇒ **À ce jour, aucune étude préclinique ni clinique n'a été menée pour évaluer la combinaison du lactate à l'HT dans le cadre de l'HIN.**

La question est de déterminer si l'administration de lactate serait compatible avec l'HT après un accident d'HIN chez le rat, et de comparer les effets de la combinaison de ces deux thérapies à ceux de l'hypothermie seule ou du lactate seul. Ces résultats seront exposés dans le Chapitre 4 de ma thèse.

OBJECTIFS DU PROJET

Les objectifs de ma thèse étaient multiples :

- Mettre en place le protocole d'hypothermie sur le modèle d'HIN chez le raton et déterminer les conditions optimales de neuroprotection - Chapitre 3
- Évaluer le potentiel thérapeutique des injections de lactate couplées à l'hypothermie, *in vivo*, sur un modèle d'HIN - Chapitre 4
- Définir la fenêtre optimale d'administration du lactate après HIN lorsqu'il est couplé à l'hypothermie - Chapitre 4
- Décrypter les mécanismes de la neuroprotection du lactate - Chapitre 4
- Mettre en évidence l'impact du lactate sur la modulation phénotypique des microglies et leur réponse pro-inflammatoire induit par l'HIN - Chapitre 4
- Obtenir des données chez le nouveau-né concernant l'innocuité de la perfusion du lactate de sodium en vue d'un éventuel transfert de ces résultats vers la clinique - Chapitre 5

4. Références

- Akula, V. P., Joe, P., Thusu, K., Davis, A. S., Tamaresis, J. S., Kim, S., Shimotake, T. K., Butler, S., Honold, J., Kuzniewicz, M., DeSandre, G., Bennett, M., Gould, J., Wallenstein, M. B., & Van Meurs, K. (2015). A randomized clinical trial of therapeutic hypothermia mode during transport for neonatal encephalopathy. *The Journal of Pediatrics*, *166*(4), 856-861.e1-2. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2014.12.061>
- Alvarez, J. I., Katayama, T., & Prat, A. (2013). Glial influence on the blood brain barrier. *Glia*, *61*(12), 1939-1958. <https://doi.org/10.1002/glia.22575>
- Aly, H., Elmahdy, H., El-Dib, M., Rowisha, M., Awny, M., El-Gohary, T., Elbatch, M., Hamisa, M., & El-Mashad, A.-R. (2015). Melatonin use for neuroprotection in perinatal asphyxia : A randomized controlled pilot study. *Journal of Perinatology: Official Journal of the California Perinatal Association*, *35*(3), 186-191. <https://doi.org/10.1038/jp.2014.186>
- Anna, R., Rolf, R., & Mark, C. (2020). Update of the organoprotective properties of xenon and argon : From bench to bedside. *Intensive Care Medicine Experimental*, *8*. <https://doi.org/10.1186/s40635-020-0294-6>
- Apelt, J., Mehlhorn, G., & Schliebs, R. (1999). Insulin-sensitive GLUT4 glucose transporters are colocalized with GLUT3-expressing cells and demonstrate a chemically distinct neuron-specific localization in rat brain. *Journal of Neuroscience Research*, *57*(5), 693-705.
- Atıcı, A., Çelik, Y., Gülaşı, S., Turhan, A. H., Okuyaz, Ç., & Sungur, M. A. (2015). Comparison of selective head cooling therapy and whole body cooling therapy in newborns with hypoxic ischemic encephalopathy : Short term results. *Turkish Archives of Pediatrics/Türk Pediatri Arşivi*, *50*(1), 27-36. <https://doi.org/10.5152/tpa.2015.2167>
- Azzopardi, D., Robertson, N. J., Bainbridge, A., Cady, E., Charles-Edwards, G., Deierl, A., Fagiolo, G., Franks, N. P., Griffiths, J., Hajnal, J., Juszczak, E., Kapetanakis, B., Linsell, L., Maze, M., Omar, O., Strohm, B., Tusor, N., & Edwards, A. D. (2016). Moderate hypothermia within 6 h of birth plus inhaled xenon versus moderate hypothermia alone after birth asphyxia (TOBY-Xe) : A proof-of-concept, open-label, randomised controlled trial. *The Lancet. Neurology*, *15*, 145-153. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)00347-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)00347-6)
- Babbo, C. C.-R., Mellet, J., van Rensburg, J., Pillay, S., Horn, A. R., Nakwa, F. L., Velaphi, S. C., Kali, G. T. J., Coetzee, M., Masemola, M. Y. K., Ballot, D. E., & Pepper, M. S. (2024). Neonatal encephalopathy due to suspected hypoxic ischemic encephalopathy : Pathophysiology, current, and emerging treatments. *World Journal of Pediatrics: WJP*. <https://doi.org/10.1007/s12519-024-00836-9>
- Bachiller, S., Jiménez-Ferrer, I., Paulus, A., Yang, Y., Swanberg, M., Deierborg, T., & Boza-Serrano, A. (2018). Microglia in Neurological Diseases : A Road Map to Brain-Disease Dependent-Inflammatory Response. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *12*, 488. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00488>
- Bak, L. K., & Walls, A. B. (2018). CrossTalk opposing view : Lack of evidence supporting an astrocyte-to-neuron lactate shuttle coupling neuronal activity to glucose utilisation in the brain. *The Journal of Physiology*, *596*(3), 351. <https://doi.org/10.1113/JP274945>
- Bak, L. K., Walls, A. B., Schousboe, A., Ring, A., Sonnewald, U., & Waagepetersen, H. S. (2009). Neuronal glucose but not lactate utilization is positively correlated with NMDA-induced neurotransmission and fluctuations in cytosolic Ca²⁺ levels. *Journal of Neurochemistry*, *109 Suppl 1*, 87-93. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.05943.x>
- Barnett, A., Mercuri, E., Rutherford, M., Haataja, L., Frisone, M. F., Henderson, S., Cowan, F., & Dubowitz, L. (2002). Neurological and perceptual-motor outcome at 5 - 6 years of age in children with neonatal encephalopathy : Relationship with neonatal brain MRI. *Neuropediatrics*, *33*(5), 242-248. <https://doi.org/10.1055/s-2002-36737>
- Barros, L. F., & Weber, B. (2018). CrossTalk proposal : An important astrocyte-to-neuron lactate shuttle couples neuronal activity to glucose utilisation in the brain. *The Journal of Physiology*, *596*(3), 347. <https://doi.org/10.1113/JP274944>
- Baumann, E., Preston, E., Slinn, J., & Stanimirovic, D. (2009). Post-ischemic hypothermia attenuates loss of the vascular basement membrane proteins, agrin and SPARC, and the blood-brain barrier disruption after global cerebral ischemia. *Brain Research*, *1269*, 185-197. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.02.062>
- Bélanger, M., Allaman, I., & Magistretti, P. J. (2011). Brain energy metabolism : Focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell Metabolism*, *14*(6), 724-738. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.08.016>
- Benito, A., Hajji, N., O'Neill, K., Keun, H. C., & Syed, N. (2020). β-Hydroxybutyrate Oxidation Promotes the Accumulation of Immunometabolites in Activated Microglia Cells. *Metabolites*, *10*(9), 346. <https://doi.org/10.3390/metabo10090346>

- Bennet, L., Tan, S., Van den Heuvel, L., Derrick, M., Groenendaal, F., van Bel, F., Juul, S., Back, S. A., Northington, F., Robertson, N. J., Mallard, C., & Gunn, A. J. (2012). Cell therapy for neonatal hypoxia-ischemia and cerebral palsy. *Annals of Neurology*, *71*(5), 589-600. <https://doi.org/10.1002/ana.22670>
- Bergersen, L. H., Magistretti, P. J., & Pellerin, L. (2005). Selective Postsynaptic Co-localization of MCT2 with AMPA Receptor GluR2/3 Subunits at Excitatory Synapses Exhibiting AMPA Receptor Trafficking. *Cerebral Cortex*, *15*(4), 361-370. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhh138>
- Berkich, D. A., Ola, M. S., Cole, J., Sweatt, A. J., Hutson, S. M., & LaNoue, K. F. (2007). Mitochondrial transport proteins of the brain. *Journal of Neuroscience Research*, *85*(15), 3367-3377. <https://doi.org/10.1002/jnr.21500>
- Bernier, L.-P., York, E. M., Kamyabi, A., Choi, H. B., Weillinger, N. L., & MacVicar, B. A. (2020). Microglial metabolic flexibility supports immune surveillance of the brain parenchyma. *Nature Communications*, *11*(1), 1559. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15267-z>
- Berthet, C., Castillo, X., Magistretti, P. J., & Hirt, L. (2012). New evidence of neuroprotection by lactate after transient focal cerebral ischaemia : Extended benefit after intracerebroventricular injection and efficacy of intravenous administration. *Cerebrovascular Diseases (Basel, Switzerland)*, *34*(5-6), 329-335. <https://doi.org/10.1159/000343657>
- Berthet, C., Lei, H., Thevenet, J., Gruetter, R., Magistretti, P. J., & Hirt, L. (2009). Neuroprotective role of lactate after cerebral ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, *29*(11), 1780-1789. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2009.97>
- Bittar, P. G., Charnay, Y., Pellerin, L., Bouras, C., & Magistretti, P. J. (1996). Selective distribution of lactate dehydrogenase isoenzymes in neurons and astrocytes of human brain. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, *16*(6), 1079-1089. <https://doi.org/10.1097/00004647-199611000-00001>
- Blázquez, C., Woods, A., de Ceballos, M. L., Carling, D., & Guzmán, M. (1999). The AMP-activated protein kinase is involved in the regulation of ketone body production by astrocytes. *Journal of Neurochemistry*, *73*(4), 1674-1682. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1999.731674.x>
- Bolaños, J. P., Almeida, A., & Moncada, S. (2010). Glycolysis : A bioenergetic or a survival pathway? *Trends in Biochemical Sciences*, *35*(3), 145-149. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2009.10.006>
- Boumezbeur, F., Mason, G. F., de Graaf, R. A., Behar, K. L., Cline, G. W., Shulman, G. I., Rothman, D. L., & Petersen, K. F. (2010). Altered brain mitochondrial metabolism in healthy aging as assessed by in vivo magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, *30*(1), 211-221. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2009.197>
- Bouzat, P., Sala, N., Suys, T., Zerlauth, J.-B., Marques-Vidal, P., Feihl, F., Bloch, J., Messerer, M., Levivier, M., Meuli, R., Magistretti, P. J., & Oddo, M. (2014). Cerebral metabolic effects of exogenous lactate supplementation on the injured human brain. *Intensive Care Medicine*, *40*(3), 412-421. <https://doi.org/10.1007/s00134-013-3203-6>
- Bouzier-Sore, A.-K., Voisin, P., Bouchaud, V., Bezancón, E., Franconi, J.-M., & Pellerin, L. (2006). Competition between glucose and lactate as oxidative energy substrates in both neurons and astrocytes : A comparative NMR study. *The European Journal of Neuroscience*, *24*(6), 1687-1694. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.05056.x>
- Bouzier-Sore, A.-K., Voisin, P., Canioni, P., Magistretti, P. J., & Pellerin, L. (2003). Lactate is a preferential oxidative energy substrate over glucose for neurons in culture. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, *23*(11), 1298-1306. <https://doi.org/10.1097/01.WCB.0000091761.61714.25>
- Brekke, E., Berger, H. R., Widerøe, M., Sonnewald, U., & Morken, T. S. (2017). Glucose and Intermediary Metabolism and Astrocyte-Neuron Interactions Following Neonatal Hypoxia-Ischemia in Rat. *Neurochemical Research*, *42*(1), 115-132. <https://doi.org/10.1007/s11064-016-2149-9>
- Brissaud, O., Villega, F., Pieter Konsman, J., Sanchez, S., Raffard, G., Franconi, J.-M., Chateil, J.-F., & Bouzier-Sore, A.-K. (2010). Short-Term Effect of Erythropoietin on Brain Lesions and Aquaporin-4 Expression in a Hypoxic-Ischemic Neonatal Rat Model Assessed by Magnetic Resonance Diffusion Weighted Imaging and Immunohistochemistry. *Pediatric Research*, *68*(2), 123-127. <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e3181e67d02>
- Bröer, S., Bröer, A., Schneider, H. P., Stegen, C., Halestrap, A. P., & Deitmer, J. W. (1999). Characterization of the high-affinity monocarboxylate transporter MCT2 in *Xenopus laevis* oocytes. *Biochemical Journal*, *341*(Pt 3), 529-535.

- Bröer, S., Schneider, H. P., Bröer, A., Rahman, B., Hamprecht, B., & Deitmer, J. W. (1998). Characterization of the monocarboxylate transporter 1 expressed in *Xenopus laevis* oocytes by changes in cytosolic pH. *The Biochemical Journal*, 333 (Pt 1)(Pt 1), 167-174. <https://doi.org/10.1042/bj3330167>
- Brooks, G. A. (1985). Lactate:Glycolytic End Product and Oxidative Substrate During Sustained Exercise in Mammals—The “Lactate Shuttle”. In R. Gilles (Éd.), *Circulation, Respiration, and Metabolism* (p. 208-218). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-70610-3_15
- Brooks, G. A. (2009). Cell-cell and intracellular lactate shuttles. *The Journal of Physiology*, 587(Pt 23), 5591-5600. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.178350>
- Broughton, B. R. S., Reutens, D. C., & Sobey, C. G. (2009). Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke*, 40(5), e331-339. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.108.531632>
- Brown, A. M., Tekkök, S. B., & Ransom, B. R. (2003). Glycogen regulation and functional role in mouse white matter. *The Journal of Physiology*, 549(Pt 2), 501-512. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.042416>
- Buonocore, G., & Groenendaal, F. (2007). Anti-oxidant strategies. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*, 12(4), 287-295. <https://doi.org/10.1016/j.siny.2007.01.020>
- Buscemi, L., Blochet, C., Magistretti, P. J., & Hirt, L. (2021). Hydroxycarboxylic Acid Receptor 1 and Neuroprotection in a Mouse Model of Cerebral Ischemia-Reperfusion. *Frontiers in Physiology*, 12, 689239. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.689239>
- Buscemi, L., Blochet, C., Price, M., Magistretti, P. J., Lei, H., & Hirt, L. (2020). Extended Preclinical Investigation of Lactate for Neuroprotection after Ischemic Stroke. *Clinical and Translational Neuroscience*, 4(1), Article 1. <https://doi.org/10.1177/2514183x20904571>
- Cahill, G. F. (2006). Fuel metabolism in starvation. *Annual Review of Nutrition*, 26, 1-22. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.26.061505.111258>
- Cahill, G. F., Herrera, M. G., Morgan, A. P., Soeldner, J. S., Steinke, J., Levy, P. L., Reichard, G. A., & Kipnis, D. M. (1966). Hormone-fuel interrelationships during fasting. *Journal of Clinical Investigation*, 45(11), 1751-1769.
- Camandola, S., & Mattson, M. P. (2017). Brain metabolism in health, aging, and neurodegeneration. *The EMBO Journal*, 36(11), 1474-1492. <https://doi.org/10.15252/embj.201695810>
- Cánovas-Ahedo, M., & Alonso-Alconada, D. (2019). [Combined therapy in neonatal hypoxic-ischaemic encephalopathy]. *Anales De Pediatría*, 91(1), 59.e1-59.e7. <https://doi.org/10.1016/j.anpedi.2019.04.007>
- Cardinali, D. P. (2019). An Assessment of Melatonin’s Therapeutic Value in the Hypoxic-Ischemic Encephalopathy of the Newborn. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 11, 34. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2019.00034>
- Cardozo, P. L., de Lima, I. B. Q., Maciel, E. M. A., Silva, N. C., Dobransky, T., & Ribeiro, F. M. (2019). Synaptic Elimination in Neurological Disorders. *Current Neuropharmacology*, 17(11), 1071-1095. <https://doi.org/10.2174/1570159X17666190603170511>
- Carloni, S., Carnevali, A., Cimino, M., & Balduini, W. (2007). Extended role of necrotic cell death after hypoxia-ischemia-induced neurodegeneration in the neonatal rat. *Neurobiology of Disease*, 27(3), 354-361. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2007.06.009>
- Chakkarapani, E., Dingley, J., Liu, X., Hoque, N., Aquilina, K., Porter, H., & Thoresen, M. (2010). Xenon enhances hypothermic neuroprotection in asphyxiated newborn pigs. *Annals of Neurology*, 68(3), 330-341. <https://doi.org/10.1002/ana.22016>
- Chalak, L. F., Pappas, A., Tan, S., Das, A., Sánchez, P. J., Laptook, A. R., Van Meurs, K. P., Shankaran, S., Bell, E. F., Davis, A. S., Heyne, R. J., Pedroza, C., Poindexter, B. B., Schibler, K., Tyson, J. E., Ball, M. B., Bara, R., Grisby, C., Sokol, G. M., ... Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. (2021). Association Between Increased Seizures During Rewarming After Hypothermia for Neonatal Hypoxic Ischemic Encephalopathy and Abnormal Neurodevelopmental Outcomes at 2-Year Follow-up: A Nested Multisite Cohort Study. *JAMA Neurology*, 78(12), 1484-1493. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2021.3723>
- Chatton, J. Y., Marquet, P., & Magistretti, P. J. (2000). A quantitative analysis of L-glutamate-regulated Na⁺ dynamics in mouse cortical astrocytes : Implications for cellular bioenergetics. *The European Journal of Neuroscience*, 12(11), 3843-3853. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2000.00269.x>
- Chau, V., Poskitt, K. J., Dunham, C. P., Henderson, G., & Miller, S. P. (2014). Magnetic resonance imaging in the encephalopathic term newborn. *Current Pediatric Reviews*, 10(1), 28-36. <https://doi.org/10.2174/157339631001140408120336>
- Chitimus, D. M., Popescu, M. R., Voiculescu, S. E., Panaitescu, A. M., Pavel, B., Zagrean, L., & Zagrean, A.-M. (2020). Melatonin’s Impact on Antioxidative and Anti-Inflammatory Reprogramming in Homeostasis and Disease. *Biomolecules*, 10(9), 1211. <https://doi.org/10.3390/biom10091211>

- Cipolla-Neto, J., & Amaral, F. G. do. (2018). Melatonin as a Hormone : New Physiological and Clinical Insights. *Endocrine Reviews*, 39(6), 990-1028. <https://doi.org/10.1210/er.2018-00084>
- Colonna, M., & Butovsky, O. (2017). Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. *Annual Review of Immunology*, 35, 441-468. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-051116-052358>
- Cotten, C. M., Fisher, K., Malcolm, W., Gustafson, K. E., Cheatham, L., Marion, A., Greenberg, R., & Kurtzberg, J. (2023). A Pilot Phase I Trial of Allogeneic Umbilical Cord Tissue-Derived Mesenchymal Stromal Cells in Neonates With Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *Stem Cells Translational Medicine*, 12(6), 355-364. <https://doi.org/10.1093/stcltm/szad027>
- Cotten, C. M., & Shankaran, S. (2010). Hypothermia for hypoxic-ischemic encephalopathy. *Expert Review of Obstetrics & Gynecology*, 5(2), 227-239. <https://doi.org/10.1586/eog.10.7>
- Courchesne-Loyer, A., Croteau, E., Castellano, C.-A., St-Pierre, V., Hennebelle, M., & Cunnane, S. C. (2017). Inverse relationship between brain glucose and ketone metabolism in adults during short-term moderate dietary ketosis : A dual tracer quantitative positron emission tomography study. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 37(7), 2485-2493. <https://doi.org/10.1177/0271678X16669366>
- Cunnane, S. C., Courchesne-Loyer, A., Vandenberghe, C., St-Pierre, V., Fortier, M., Hennebelle, M., Croteau, E., Bocti, C., Fulop, T., & Castellano, C.-A. (2016). Can Ketones Help Rescue Brain Fuel Supply in Later Life? Implications for Cognitive Health during Aging and the Treatment of Alzheimer's Disease. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 9, 53. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2016.00053>
- Davidson, J. O., Wassink, G., van den Heuvel, L. G., Bennet, L., & Gunn, A. J. (2015). Therapeutic Hypothermia for Neonatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy—Where to from Here? *Frontiers in Neurology*, 6, 198. <https://doi.org/10.3389/fneur.2015.00198>
- De Wispelaere, L. A., Ouwehand, S., Olsthoorn, M., Govaert, P., Smit, L. S., de Jonge, R. C., Lequin, M. H., Reiss, I. K., & Dudink, J. (2019). Electroencephalography and brain magnetic resonance imaging in asphyxia comparing cooled and non-cooled infants. *European Journal of Paediatric Neurology: EJPN: Official Journal of the European Paediatric Neurology Society*, 23(1), 181-190. <https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2018.09.001>
- Deng, Q., Wu, C., Liu, T. C.-Y., Duan, R., & Yang, L. (2023). Exogenous lactate administration : A potential novel therapeutic approach for neonatal hypoxia-ischemia. *Experimental Neurology*, 367, 114450. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2023.114450>
- Devanney, N. A., Stewart, A. N., & Gensel, J. C. (2020). Microglia and macrophage metabolism in CNS injury and disease : The role of immunometabolism in neurodegeneration and neurotrauma. *Experimental Neurology*, 329, 113310. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2020.113310>
- de Vries, L. S., & Groenendaal, F. (2010). Patterns of neonatal hypoxic-ischaemic brain injury. *Neuroradiology*, 52(6), 555-566. <https://doi.org/10.1007/s00234-010-0674-9>
- de Vries, L. S., & Jongmans, M. J. (2010). Long-term outcome after neonatal hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition*, 95(3), F220-224. <https://doi.org/10.1136/adc.2008.148205>
- Dingley, J., Hobbs, C., Ferguson, J., Stone, J., & Thoresen, M. (2008). Xenon/hypothermia neuroprotection regimes in spontaneously breathing neonatal rats after hypoxic-ischemic insult : The respiratory and sedative effects. *Anesthesia and Analgesia*, 106(3), 916-923, table of contents. <https://doi.org/10.1213/ane.0b013e3181618669>
- Dommergues, M.-A., Plaisant, F., Verney, C., & Gressens, P. (2003). Early microglial activation following neonatal excitotoxic brain damage in mice : A potential target for neuroprotection. *Neuroscience*, 121(3), 619-628. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(03\)00558-x](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(03)00558-x)
- Drury, P. P., Gunn, E. R., Bennet, L., & Gunn, A. J. (2014). Mechanisms of hypothermic neuroprotection. *Clinics in Perinatology*, 41(1), 161-175. <https://doi.org/10.1016/j.clp.2013.10.005>
- Dumont, U., Sanchez, S., Olivier, B., Chateil, J.-F., Pellerin, L., Beauvieux, M.-C., Bouzier-Sore, A.-K., & Roumes, H. (2019). Maternal consumption of piceatannol : A nutritional neuroprotective strategy against hypoxia-ischemia in rat neonates. *Brain Research*, 1717, 86-94. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.04.012>
- Edmond, J. (1974). Ketone bodies as precursors of sterols and fatty acids in the developing rat. *The Journal of Biological Chemistry*, 249(1), 72-80.
- Edmond, J., Auestad, N., Robbins, R. A., & Bergstrom, J. D. (1985). Ketone body metabolism in the neonate : Development and the effect of diet. *Federation Proceedings*, 44(7), 2359-2364.

- Edmond, J., Higa, T. A., Korsak, R. A., Bergner, E. A., & Lee, W.-N. P. (1998). Fatty Acid Transport and Utilization for the Developing Brain. *Journal of Neurochemistry*, 70(3), 1227-1234. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1998.70031227.x>
- Edmond, J., Robbins, R. A., Bergstrom, J. D., Cole, R. A., & de Vellis, J. (1987). Capacity for substrate utilization in oxidative metabolism by neurons, astrocytes, and oligodendrocytes from developing brain in primary culture. *Journal of Neuroscience Research*, 18(4), 551-561. <https://doi.org/10.1002/jnr.490180407>
- Ehrenstein, V. (2009). Association of Apgar scores with death and neurologic disability. *Clinical Epidemiology*, 1, 45-53. <https://doi.org/10.2147/cep.s4782>
- Ehrenstein, V., Sørensen, H. T., Pedersen, L., Larsen, H., Holsteen, V., & Rothman, K. J. (2006). Apgar score and hospitalization for epilepsy in childhood : A registry-based cohort study. *BMC Public Health*, 6, 23. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-6-23>
- Ekdahl, C. T., Kokaia, Z., & Lindvall, O. (2009). Brain inflammation and adult neurogenesis : The dual role of microglia. *Neuroscience*, 158(3), 1021-1029. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.06.052>
- El-Dib, M., Inder, T. E., Chalak, L. F., Massaro, A. N., Thoresen, M., & Gunn, A. J. (2019). Should therapeutic hypothermia be offered to babies with mild neonatal encephalopathy in the first 6 h after birth? *Pediatric Research*, 85(4), 442-448. <https://doi.org/10.1038/s41390-019-0291-1>
- Elmahdy, H., El-Mashad, A.-R., El-Bahrawy, H., El-Gohary, T., El-Barbary, A., & Aly, H. (2010). Human recombinant erythropoietin in asphyxia neonatorum : Pilot trial. *Pediatrics*, 125(5), e1135-1142. <https://doi.org/10.1542/peds.2009-2268>
- Erbsloh, F., Bernsmeier, A., & Hillesheim, H. (1958). [The glucose consumption of the brain & its dependence on the liver]. *Archiv Fur Psychiatrie Und Nervenkrankheiten, Vereinigt Mit Zeitschrift Fur Die Gesamte Neurologie Und Psychiatrie*, 196(6), 611-626. <https://doi.org/10.1007/BF00344388>
- Erecinska, M., Thoresen, M., & Silver, I. A. (2003). Effects of hypothermia on energy metabolism in Mammalian central nervous system. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 23(5), 513-530. <https://doi.org/10.1097/01.WCB.0000066287.21705.21>
- Fan, X., van Bel, F., van der Kooij, M. A., Heijnen, C. J., & Groenendaal, F. (2013). Hypothermia and erythropoietin for neuroprotection after neonatal brain damage. *Pediatric Research*, 73(1), 18-23. <https://doi.org/10.1038/pr.2012.139>
- Fatemi, A., Wilson, M. A., & Johnston, M. V. (2009). Hypoxic-ischemic encephalopathy in the term infant. *Clinics in Perinatology*, 36(4), 835-858, vii. <https://doi.org/10.1016/j.clp.2009.07.011>
- Faulkner, S., Bainbridge, A., Kato, T., Chandrasekaran, M., Kapetanakis, A. B., Hristova, M., Liu, M., Evans, S., De Vita, E., Kelen, D., Sanders, R. D., Edwards, A. D., Maze, M., Cady, E. B., Raivich, G., & Robertson, N. J. (2011). Xenon augmented hypothermia reduces early lactate/N-acetylaspartate and cell death in perinatal asphyxia. *Annals of Neurology*, 70(1), 133-150. <https://doi.org/10.1002/ana.22387>
- Faustino, J. V., Wang, X., Johnson, C. E., Klibanov, A., Derugin, N., Wendland, M. F., & Vexler, Z. S. (2011). Microglial cells contribute to endogenous brain defenses after acute neonatal focal stroke. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 31(36), 12992-13001. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2102-11.2011>
- Ferriero, D. M. (2004). Neonatal Brain Injury. *New England Journal of Medicine*, 351(19), 1985-1995. <https://doi.org/10.1056/NEJMra041996>
- Finder, M., Boylan, G. B., Twomey, D., Ahearne, C., Murray, D. M., & Hallberg, B. (2020). Two-Year Neurodevelopmental Outcomes After Mild Hypoxic Ischemic Encephalopathy in the Era of Therapeutic Hypothermia. *JAMA Pediatrics*, 174(1), 48-55. <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2019.4011>
- Franks, N. P., Dickinson, R., de Sousa, S. L. M., Hall, A. C., & Lieb, W. R. (1998). How does xenon produce anaesthesia? *Nature*, 396(6709), 324-324. <https://doi.org/10.1038/24525>
- Fukao, T., Song, X. Q., Mitchell, G. A., Yamaguchi, S., Sukegawa, K., Orii, T., & Kondo, N. (1997). Enzymes of ketone body utilization in human tissues : Protein and messenger RNA levels of succinyl-coenzyme A (CoA):3-ketoacid CoA transferase and mitochondrial and cytosolic acetoacetyl-CoA thiolases. *Pediatric Research*, 42(4), 498-502. <https://doi.org/10.1203/00006450-199710000-00013>
- Fünfschilling, U., Supplie, L. M., Mahad, D., Boretius, S., Saab, A. S., Edgar, J., Brinkmann, B. G., Kassmann, C. M., Tzvetanova, I. D., Möbius, W., Diaz, F., Meijer, D., Suter, U., Hamprecht, B., Sereda, M. W., Moraes, C. T., Frahm, J., Goebbels, S., & Nave, K.-A. (2012). Glycolytic oligodendrocytes maintain myelin and long-term axonal integrity. *Nature*, 485(7399), 517-521. <https://doi.org/10.1038/nature11007>
- Gaston-Breton, R., Maïza Letrou, A., Hamoudi, R., Stonestreet, B. S., & Mabondzo, A. (2023). Brain organoids for hypoxic-ischemic studies : From bench to bedside. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 80(11), 318. <https://doi.org/10.1007/s00018-023-04951-0>

- Gavillet, M., Allaman, I., & Magistretti, P. J. (2008). Modulation of astrocytic metabolic phenotype by proinflammatory cytokines. *Glia*, *56*(9), 975-989. <https://doi.org/10.1002/glia.20671>
- Geiseler, S. J., Hadzic, A., Lambertus, M., Forbord, K. M., Sajedi, G., Liesz, A., & Morland, C. (2024). L-Lactate Treatment at 24 h and 48 h after Acute Experimental Stroke Is Neuroprotective via Activation of the L-Lactate Receptor HCA1. *International Journal of Molecular Sciences*, *25*(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/ijms25021232>
- Gibbs, M. E., Anderson, D. G., & Hertz, L. (2006). Inhibition of glycogenolysis in astrocytes interrupts memory consolidation in young chickens. *Glia*, *54*(3), 214-222. <https://doi.org/10.1002/glia.20377>
- Gimeno-Bayón, J., López-López, A., Rodríguez, M. J., & Mahy, N. (2014). Glucose pathways adaptation supports acquisition of activated microglia phenotype. *Journal of Neuroscience Research*, *92*(6), 723-731. <https://doi.org/10.1002/jnr.23356>
- Glenn, T. C., Martin, N. A., Horning, M. A., McArthur, D. L., Hovda, D. A., Vespa, P., & Brooks, G. A. (2015). Lactate : Brain fuel in human traumatic brain injury: a comparison with normal healthy control subjects. *Journal of Neurotrauma*, *32*(11), 820-832. <https://doi.org/10.1089/neu.2014.3483>
- Gluckman, P. D., Wyatt, J. S., Azzopardi, D., Ballard, R., Edwards, A. D., Ferriero, D. M., Polin, R. A., Robertson, C. M., Thoresen, M., Whitelaw, A., & Gunn, A. J. (2005). Selective head cooling with mild systemic hypothermia after neonatal encephalopathy : Multicentre randomised trial. *Lancet (London, England)*, *365*(9460), 663-670. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)17946-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)17946-X)
- Golden, W. C., Brambrink, A. M., Traystman, R. J., & Martin, L. J. (2001). Failure to sustain recovery of Na,K-ATPase function is a possible mechanism for striatal neurodegeneration in hypoxic-ischemic newborn piglets. *Brain Research. Molecular Brain Research*, *88*(1-2), 94-102. [https://doi.org/10.1016/s0169-328x\(01\)00032-8](https://doi.org/10.1016/s0169-328x(01)00032-8)
- Griffiths, I., Klugmann, M., Anderson, T., Yool, D., Thomson, C., Schwab, M. H., Schneider, A., Zimmermann, F., McCulloch, M., Nadon, N., & Nave, K. A. (1998). Axonal swellings and degeneration in mice lacking the major proteolipid of myelin. *Science (New York, N.Y.)*, *280*(5369), 1610-1613. <https://doi.org/10.1126/science.280.5369.1610>
- Guzmán, M., & Blázquez, C. (2001). Is there an astrocyte-neuron ketone body shuttle? *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, *12*(4), 169-173. [https://doi.org/10.1016/s1043-2760\(00\)00370-2](https://doi.org/10.1016/s1043-2760(00)00370-2)
- Hagberg, H., Gressens, P., & Mallard, C. (2012). Inflammation during fetal and neonatal life : Implications for neurologic and neuropsychiatric disease in children and adults. *Annals of Neurology*, *71*(4), 444-457. <https://doi.org/10.1002/ana.22620>
- Halestrap, A. P. (2012). The monocarboxylate transporter family—Structure and functional characterization. *IUBMB Life*, *64*(1), 1-9. <https://doi.org/10.1002/iub.573>
- Halim, N. D., Mcfate, T., Mohyeldin, A., Okagaki, P., Korotchikina, L. G., Patel, M. S., Jeoung, N. H., Harris, R. A., Schell, M. J., & Verma, A. (2010). Phosphorylation status of pyruvate dehydrogenase distinguishes metabolic phenotypes of cultured rat brain astrocytes and neurons. *Glia*, *58*(10), 1168-1176. <https://doi.org/10.1002/glia.20996>
- Hamberger, A., & Hyden, H. (1963). Inverse enzymatic changes in neurons and glia during increased function and hypoxia. *The Journal of Cell Biology*, *16*(3), 521-525. <https://doi.org/10.1083/jcb.16.3.521>
- Han, Y.-M., Ramprasath, T., & Zou, M.-H. (2020). β -hydroxybutyrate and its metabolic effects on age-associated pathology. *Experimental & Molecular Medicine*, *52*(4), 548-555. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0415-z>
- Harris, J. J., Jolivet, R., & Attwell, D. (2012). Synaptic energy use and supply. *Neuron*, *75*(5), 762-777. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.08.019>
- Hasselbalch, S. G., Knudsen, G. M., Jakobsen, J., Hageman, L. P., Holm, S., & Paulson, O. B. (1994). Brain metabolism during short-term starvation in humans. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, *14*(1), 125-131. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.1994.17>
- Hawkins, R. A., Williamson, D. H., & Krebs, H. A. (1971). Ketone-body utilization by adult and suckling rat brain in vivo. *The Biochemical Journal*, *122*(1), 13-18. <https://doi.org/10.1042/bj1220013>
- Herculano-Houzel, S. (2009). The Human Brain in Numbers : A Linearly Scaled-up Primate Brain. *Frontiers in Human Neuroscience*, *3*, 31. <https://doi.org/10.3389/neuro.09.031.2009>
- Herculano-Houzel, S. (2014). The glia/neuron ratio : How it varies uniformly across brain structures and species and what that means for brain physiology and evolution. *Glia*, *62*(9), 1377-1391. <https://doi.org/10.1002/glia.22683>
- Herrero-Mendez, A., Almeida, A., Fernández, E., Maestre, C., Moncada, S., & Bolaños, J. P. (2009). The bioenergetic and antioxidant status of neurons is controlled by continuous degradation of a key

- glycolytic enzyme by APC/C-Cdh1. *Nature Cell Biology*, 11(6), 747-752. <https://doi.org/10.1038/ncb1881>
- Hirrlinger, J., & Dringen, R. (2010). The cytosolic redox state of astrocytes : Maintenance, regulation and functional implications for metabolite trafficking. *Brain Research Reviews*, 63(1-2), 177-188. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2009.10.003>
- Hobbs, C., Thoresen, M., Tucker, A., Aquilina, K., Chakkarapani, E., & Dingley, J. (2008). Xenon and hypothermia combine additively, offering long-term functional and histopathologic neuroprotection after neonatal hypoxia/ischemia. *Stroke*, 39(4), 1307-1313. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.107.499822>
- Holland, R., McIntosh, A. L., Finucane, O. M., Mela, V., Rubio-Araiz, A., Timmons, G., McCarthy, S. A., Gun'ko, Y. K., & Lynch, M. A. (2018). Inflammatory microglia are glycolytic and iron retentive and typify the microglia in APP/PS1 mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, 68, 183-196. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.10.017>
- Holloway, R., Zhou, Z., Harvey, H. B., Levasseur, J. E., Rice, A. C., Sun, D., Hamm, R. J., & Bullock, M. R. (2007). Effect of lactate therapy upon cognitive deficits after traumatic brain injury in the rat. *Acta Neurochirurgica*, 149(9), 919-927; discussion 927. <https://doi.org/10.1007/s00701-007-1241-y>
- Huang, C., Wang, P., Xu, X., Zhang, Y., Gong, Y., Hu, W., Gao, M., Wu, Y., Ling, Y., Zhao, X., Qin, Y., Yang, R., & Zhang, W. (2018). The ketone body metabolite β -hydroxybutyrate induces an antidepressant-associated ramification of microglia via HDACs inhibition-triggered Akt-small RhoGTPase activation. *Glia*, 66(2), 256-278. <https://doi.org/10.1002/glia.23241>
- Hyden, H., & Lange, P. W. (1962). A kinetic study of the neuroglia relationship. *The Journal of Cell Biology*, 13(2), 233-237. <https://doi.org/10.1083/jcb.13.2.233>
- Hyder, F., Rothman, D. L., & Bennett, M. R. (2013). Cortical energy demands of signaling and nonsignaling components in brain are conserved across mammalian species and activity levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(9), 3549-3554. <https://doi.org/10.1073/pnas.1214912110>
- Itoh, Y., Esaki, T., Shimoji, K., Cook, M., Law, M. J., Kaufman, E., & Sokoloff, L. (2003). Dichloroacetate effects on glucose and lactate oxidation by neurons and astroglia in vitro and on glucose utilization by brain in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(8), 4879-4884. <https://doi.org/10.1073/pnas.0831078100>
- Jacobs, S. E., Berg, M., Hunt, R., Tarnow-Mordi, W. O., Inder, T. E., & Davis, P. G. (2013). Cooling for newborns with hypoxic ischaemic encephalopathy. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2013(1), CD003311. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD003311.pub3>
- Jäkel, S., & Dimou, L. (2017). Glial Cells and Their Function in the Adult Brain : A Journey through the History of Their Ablation. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11, 24. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00024>
- Jarreau, P.-H., Baud, O., Casper, C., Mitancher, D., Picaud, J.-C., & Storme, L. (Éds.). (2016). Index*. In *Réanimation et Soins Intensifs en Néonatalogie* (p. 729-743). Elsevier Masson. <https://doi.org/10.1016/B978-2-294-73997-2.09988-0>
- Jensen, N. J., Wodschow, H. Z., Nilsson, M., & Rungby, J. (2020). Effects of Ketone Bodies on Brain Metabolism and Function in Neurodegenerative Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22), 8767. <https://doi.org/10.3390/ijms21228767>
- Jerez-Calero, A., Salvatierra-Cuenca, M. T., Benitez-Feliponi, Á., Fernández-Marín, C. E., Narbona-López, E., Uberos-Fernández, J., & Muñoz-Hoyos, A. (2020). Hypothermia Plus Melatonin in Asphyctic Newborns : A Randomized-Controlled Pilot Study. *Pediatric Critical Care Medicine: A Journal of the Society of Critical Care Medicine and the World Federation of Pediatric Intensive and Critical Care Societies*, 21(7), 647-655. <https://doi.org/10.1097/PCC.0000000000002346>
- Johnston, M. V. (2005). Excitotoxicity in perinatal brain injury. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, 15(3), 234-240. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2005.tb00526.x>
- Johnston, M. V., & Coyle, J. T. (1981). Development of central neurotransmitter systems. *Ciba Foundation Symposium*, 86, 251-270. <https://doi.org/10.1002/9780470720684.ch12>
- Johnstone, L. T., Karlsson, E. M., & Carey, D. P. (2021). Left-Handers Are Less Lateralized Than Right-Handers for Both Left and Right Hemispheric Functions. *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)*, 31(8), 3780-3787. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhab048>
- Kaya, D., Micili, S. C., Kizmazoglu, C., Mucuoglu, A. O., Buyukcoban, S., Ersoy, N., Yilmaz, O., & Isik, A. T. (2022). Allopurinol attenuates repeated traumatic brain injury in old rats : A preliminary report. *Experimental Neurology*, 357, 114196. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2022.114196>
- Koepsell, H. (2020). Glucose transporters in brain in health and disease. *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology*, 472(9), 1299-1343. <https://doi.org/10.1007/s00424-020-02441-x>

- Koga, M., Serritella, A. V., Messmer, M. M., Hayashi-Takagi, A., Hester, L. D., Snyder, S. H., Sawa, A., & Sedlak, T. W. (2011). Glutathione is a physiologic reservoir of neuronal glutamate. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 409(4), 596-602. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.04.087>
- Kong, L., Wang, Z., Liang, X., Wang, Y., Gao, L., & Ma, C. (2019). Monocarboxylate transporter 1 promotes classical microglial activation and pro-inflammatory effect via 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2, 6-biphosphatase 3. *Journal of Neuroinflammation*, 16(1), 240. <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1648-4>
- Kossoff, E. H., & Wang, H.-S. (2013). Dietary therapies for epilepsy. *Biomedical Journal*, 36(1), 2-8. <https://doi.org/10.4103/2319-4170.107152>
- Kostić, D. A., Dimitrijević, D. S., Stojanović, G. S., Palić, I. R., Đorđević, A. S., & Ickovski, J. D. (2015). Xanthine Oxidase : Isolation, Assays of Activity, and Inhibition. *Journal of Chemistry*, 2015(1), 294858. <https://doi.org/10.1155/2015/294858>
- Krebs, H. A. (1940). The citric acid cycle and the Szent-Györgyi cycle in pigeon breast muscle. *Biochemical Journal*, 34(5), 775-779.
- Kumral, A., Ozer, E., Yilmaz, O., Akhisaroglu, M., Gokmen, N., Duman, N., Ulukus, C., Genc, S., & Ozkan, H. (2003). Neuroprotective effect of erythropoietin on hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Biology of the Neonate*, 83(3), 224-228. <https://doi.org/10.1159/000068926>
- Lalancette-Hébert, M., Gowing, G., Simard, A., Weng, Y. C., & Kriz, J. (2007). Selective ablation of proliferating microglial cells exacerbates ischemic injury in the brain. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(10), 2596-2605. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5360-06.2007>
- Laughton, J. D., Bittar, P., Charnay, Y., Pellerin, L., Kovari, E., Magistretti, P. J., & Bouras, C. (2007). Metabolic compartmentalization in the human cortex and hippocampus : Evidence for a cell- and region-specific localization of lactate dehydrogenase 5 and pyruvate dehydrogenase. *BMC Neuroscience*, 8(1), 35. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-8-35>
- Lauro, C., & Limatola, C. (2020). Metabolic Reprograming of Microglia in the Regulation of the Innate Inflammatory Response. *Frontiers in Immunology*, 11, 493. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00493>
- Le Foll, C., & Levin, B. E. (2016). Fatty acid-induced astrocyte ketone production and the control of food intake. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 310(11), R1186-1192. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00113.2016>
- Lebon, V., Petersen, K. F., Cline, G. W., Shen, J., Mason, G. F., Dufour, S., Behar, K. L., Shulman, G. I., & Rothman, D. L. (2002). Astroglial Contribution to Brain Energy Metabolism in Humans Revealed by ¹³C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy : Elucidation of the Dominant Pathway for Neurotransmitter Glutamate Repletion and Measurement of Astrocytic Oxidative Metabolism. *The Journal of Neuroscience*, 22(5), 1523-1531. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-05-01523.2002>
- Lee, B. E., Toledo, A. H., Anaya-Prado, R., Roach, R. R., & Toledo-Pereyra, L. H. (2009). Allopurinol, xanthine oxidase, and cardiac ischemia. *Journal of Investigative Medicine: The Official Publication of the American Federation for Clinical Research*, 57(8), 902-909. <https://doi.org/10.2310/JIM.0b013e3181bca50c>
- Lee, Y., Morrison, B. M., Li, Y., Lengacher, S., Farah, M. H., Hoffman, P. N., Liu, Y., Tsingalia, A., Jin, L., Zhang, P.-W., Pellerin, L., Magistretti, P. J., & Rothstein, J. D. (2012). Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration. *Nature*, 487(7408), 443-448. <https://doi.org/10.1038/nature11314>
- Leino, R. L., Gerhart, D. Z., & Drewes, L. R. (1999). Monocarboxylate transporter (MCT1) abundance in brains of suckling and adult rats : A quantitative electron microscopic immunogold study. *Brain Research. Developmental Brain Research*, 113(1-2), 47-54. [https://doi.org/10.1016/s0165-3806\(98\)00188-6](https://doi.org/10.1016/s0165-3806(98)00188-6)
- Liu, X., Jary, S., Cowan, F., & Thoresen, M. (2017). Reduced infancy and childhood epilepsy following hypothermia-treated neonatal encephalopathy. *Epilepsia*, 58(11), 1902-1911. <https://doi.org/10.1111/epi.13914>
- Lobo, N., Yang, B., Rizvi, M., & Ma, D. (2013). Hypothermia and xenon : Novel noble guardians in hypoxic-ischemic encephalopathy? *Journal of Neuroscience Research*, 91(4), 473-478. <https://doi.org/10.1002/jnr.23178>
- Magistretti, P. J., & Allaman, I. (2018). Lactate in the brain : From metabolic end-product to signalling molecule. *Nature Reviews Neuroscience*, 19(4), 235-249. <https://doi.org/10.1038/nrn.2018.19>
- Magistretti, P. J., & Pellerin, L. (1996). Cellular bases of brain energy metabolism and their relevance to functional brain imaging : Evidence for a prominent role of astrocytes. *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)*, 6(1), 50-61. <https://doi.org/10.1093/cercor/6.1.50>
- Maher, F., Vannucci, S. J., & Simpson, I. A. (1994). Glucose transporter proteins in brain. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 8(13), 1003-1011. <https://doi.org/10.1096/fasebj.8.13.7926364>

- Mandel, R., Martinot, A., Delepoulle, F., Lamblin, M.-D., Laureau, E., Vallee, L., & Leclerc, F. (2002). Prediction of outcome after hypoxic-ischemic encephalopathy : A prospective clinical and electrophysiologic study. *The Journal of Pediatrics*, *141*(1), 45-50. <https://doi.org/10.1067/mpd.2002.125005>
- Manning Fox, J. E., Meredith, D., & Halestrap, A. P. (2000). Characterisation of human monocarboxylate transporter 4 substantiates its role in lactic acid efflux from skeletal muscle. *The Journal of Physiology*, *529 Pt 2*(Pt 2), 285-293. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2000.00285.x>
- Mantych, G. J., James, D. E., Chung, H. D., & Devaskar, S. U. (1992). Cellular localization and characterization of Glut 3 glucose transporter isoform in human brain. *Endocrinology*, *131*(3), 1270-1278. <https://doi.org/10.1210/endo.131.3.1505464>
- Markert, C. L., Shaklee, J. B., & Whitt, G. S. (1975). Evolution of a gene. Multiple genes for LDH isozymes provide a model of the evolution of gene structure, function and regulation. *Science (New York, N.Y.)*, *189*(4197), 102-114. <https://doi.org/10.1126/science.1138367>
- Marques, K. L., Rodrigues, V., Balduci, C. T. N., Montes, G. C., Barradas, P. C., & Cunha-Rodrigues, M. C. (2024). Emerging therapeutic strategies in hypoxic-ischemic encephalopathy : A focus on cognitive outcomes. *Frontiers in Pharmacology*, *15*, 1347529. <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1347529>
- Marro, P. J., Mishra, O. P., & Delivoria-Papadopoulos, M. (2006). Effect of allopurinol on brain adenosine levels during hypoxia in newborn piglets. *Brain Research*, *1073-1074*, 444-450. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.11.061>
- Martin, L. J., Brambrink, A. M., Price, A. C., Kaiser, A., Agnew, D. M., Ichord, R. N., & Traystman, R. J. (2000). Neuronal death in newborn striatum after hypoxia-ischemia is necrosis and evolves with oxidative stress. *Neurobiology of Disease*, *7*(3), 169-191. <https://doi.org/10.1006/nbdi.2000.0282>
- Martinez-Biarge, M., Bregant, T., Wusthoff, C. J., Chew, A. T. M., Diez-Sebastian, J., Rutherford, M. A., & Cowan, F. M. (2012). White matter and cortical injury in hypoxic-ischemic encephalopathy : Antecedent factors and 2-year outcome. *The Journal of Pediatrics*, *161*(5), 799-807. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2012.04.054>
- Martinez-Biarge, M., Diez-Sebastian, J., Rutherford, M. A., & Cowan, F. M. (2010). Outcomes after central grey matter injury in term perinatal hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Early Human Development*, *86*(11), 675-682. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2010.08.013>
- Masuda, T., Sankowski, R., Staszewski, O., & Prinz, M. (2020). Microglia Heterogeneity in the Single-Cell Era. *Cell Reports*, *30*(5), 1271-1281. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.01.010>
- McTigue, D. M., & Tripathi, R. B. (2008). The life, death, and replacement of oligodendrocytes in the adult CNS. *Journal of Neurochemistry*, *107*(1), 1-19. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05570.x>
- Meyer-Witte, S., Brissaud, O., Brun, M., Lamireau, D., Bordessoules, M., & Chateil, J.-F. (2008). Apport pronostique de la résonance magnétique cérébrale dans l'encéphalopathie hypoxique-ischémique du nouveau-né à terme : Score d'imagerie, spectroscopie. Étude de 26 cas. *Archives De Pédiatrie - ARCHIVES PÉDIATRIE*, *15*, 9-23. <https://doi.org/10.1016/j.arcped.2007.08.027>
- Millar, L. J., Shi, L., Hoerder-Suabedissen, A., & Molnár, Z. (2017). Neonatal Hypoxia Ischaemia : Mechanisms, Models, and Therapeutic Challenges. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *11*, 78. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00078>
- Møller, N. (2020). Ketone Body, 3-Hydroxybutyrate : Minor Metabolite - Major Medical Manifestations. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *105*(9), dgaa370. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgaa370>
- Monsorno, K., Buckinx, A., & Paolicelli, R. C. (2022). Microglial metabolic flexibility : Emerging roles for lactate. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, *33*(3), 186-195. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2021.12.001>
- Monsorno, K., Ginggen, K., Ivanov, A., Buckinx, A., Lalive, A. L., Tchenio, A., Benson, S., Vendrell, M., D'Alessandro, A., Beule, D., Pellerin, L., Mameli, M., & Paolicelli, R. C. (2023). Loss of microglial MCT4 leads to defective synaptic pruning and anxiety-like behavior in mice. *Nature Communications*, *14*(1), 5749. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-41502-4>
- Moreira, T. J. T. P., Pierre, K., Maekawa, F., Repond, C., Cebere, A., Liljequist, S., & Pellerin, L. (2009). Enhanced cerebral expression of MCT1 and MCT2 in a rat ischemia model occurs in activated microglial cells. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, *29*(7), 1273-1283. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2009.50>
- Moroo, I., & Yamada, T. (1994). [Immunohistochemistry using antibody to the glucose transporter 3 in human brainstem and cerebellar tissues]. *No to Shinkei = Brain and Nerve*, *46*(11), 1039-1043.
- Morrison, B. M., Lee, Y., & Rothstein, J. D. (2013). Oligodendroglia : Metabolic supporters of axons. *Trends in Cell Biology*, *23*(12), 644-651. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.07.007>

- Murphy-Royal, C., Johnston, A. D., Boyce, A. K. J., Diaz-Castro, B., Institoris, A., Peringod, G., Zhang, O., Stout, R. F., Spray, D. C., Thompson, R. J., Khakh, B. S., Bains, J. S., & Gordon, G. R. (2020). Stress gates an astrocytic energy reservoir to impair synaptic plasticity. *Nature Communications*, *11*(1), 2014. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15778-9>
- Nakajima, W., Ishida, A., Lange, M. S., Gabrielson, K. L., Wilson, M. A., Martin, L. J., Blue, M. E., & Johnston, M. V. (2000). Apoptosis has a prolonged role in the neurodegeneration after hypoxic ischemia in the newborn rat. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *20*(21), 7994-8004. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-21-07994.2000>
- Narine, M., & Colognato, H. (2022). Current Insights Into Oligodendrocyte Metabolism and Its Power to Sculpt the Myelin Landscape. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *16*, 892968. <https://doi.org/10.3389/fncel.2022.892968>
- Natarajan, G., Shankaran, S., Laptook, A. R., Pappas, A., Bann, C. M., McDonald, S. A., Das, A., Higgins, R. D., Hintz, S. R., Vohr, B. R., & Extended Hypothermia Subcommittee of the Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. (2013). Apgar scores at 10 min and outcomes at 6-7 years following hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition*, *98*(6), F473-479. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2013-303692>
- Natarajan, N., & Pardo, A. C. (2017). Challenges in neurologic prognostication after neonatal brain injury. *Seminars in Perinatology*, *41*(2), 117-123. <https://doi.org/10.1053/j.semperi.2016.11.008>
- Nehlig, A., de Vasconcelos, A. P., & Boyet, S. (1988). Quantitative autoradiographic measurement of local cerebral glucose utilization in freely moving rats during postnatal development. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *8*(7), 2321-2333. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.08-07-02321.1988>
- Nehlig, A., & Pereira de Vasconcelos, A. (1993). Glucose and ketone body utilization by the brain of neonatal rats. *Progress in Neurobiology*, *40*(2), 163-221. [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(93\)90022-k](https://doi.org/10.1016/0301-0082(93)90022-k)
- Netzahualcoyotzi, C., & Pellerin, L. (2020). Neuronal and astroglial monocarboxylate transporters play key but distinct roles in hippocampus-dependent learning and memory formation. *Progress in Neurobiology*, *194*, 101888. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2020.101888>
- Nijland, P. G., Michailidou, I., Witte, M. E., Mizee, M. R., van der Pol, S. M. A., van Het Hof, B., Reijerkerk, A., Pellerin, L., van der Valk, P., de Vries, H. E., & van Horssen, J. (2014). Cellular distribution of glucose and monocarboxylate transporters in human brain white matter and multiple sclerosis lesions. *Glia*, *62*(7), 1125-1141. <https://doi.org/10.1002/glia.22667>
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., & Helmchen, F. (2005). Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science (New York, N.Y.)*, *308*(5726), 1314-1318. <https://doi.org/10.1126/science.1110647>
- Northington, F. J., Chavez-Valdez, R., Graham, E. M., Razdan, S., Gauda, E. B., & Martin, L. J. (2011). Necrostatin decreases oxidative damage, inflammation, and injury after neonatal HI. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, *31*(1), 178-189. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2010.72>
- Northington, F. J., Chavez-Valdez, R., & Martin, L. J. (2011). Neuronal cell death in neonatal hypoxia-ischemia. *Annals of Neurology*, *69*(5), 743-758. <https://doi.org/10.1002/ana.22419>
- Ohlsson, A., & Aher, S. M. (2014). Early erythropoietin for preventing red blood cell transfusion in preterm and/or low birth weight infants. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, *4*, CD004863. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD004863.pub4>
- Ouweland, S., Smidt, L. C. A., Dudink, J., Benders, M. J. N. L., de Vries, L. S., Groenendaal, F., & van der Aa, N. E. (2020). Predictors of Outcomes in Hypoxic-Ischemic Encephalopathy following Hypothermia : A Meta-Analysis. *Neonatology*, *117*(4), 411-427. <https://doi.org/10.1159/000505519>
- Owen, O. E., Felig, P., Morgan, A. P., Wahren, J., & Cahill, G. F. (1969). Liver and kidney metabolism during prolonged starvation. *The Journal of Clinical Investigation*, *48*(3), 574-583. <https://doi.org/10.1172/JCI106016>
- Owen, O. E., Morgan, A. P., Kemp, H. G., Sullivan, J. M., Herrera, M. G., & Cahill, G. F. (1967). Brain metabolism during fasting. *The Journal of Clinical Investigation*, *46*(10), 1589-1595. <https://doi.org/10.1172/JCI105650>
- Page, M. A., Krebs, H. A., & Williamson, D. H. (1971). Activities of enzymes of ketone-body utilization in brain and other tissues of suckling rats. *The Biochemical Journal*, *121*(1), 49-53. <https://doi.org/10.1042/bj1210049>

- Palmer, C., Towfighi, J., Roberts, R. L., & Heitjan, D. F. (1993). Allopurinol administered after inducing hypoxia-ischemia reduces brain injury in 7-day-old rats. *Pediatric Research*, 33(4 Pt 1), 405-411. <https://doi.org/10.1203/00006450-199304000-00018>
- Panatier, A., Vallée, J., Haber, M., Murai, K. K., Lacaille, J.-C., & Robitaille, R. (2011). Astrocytes are endogenous regulators of basal transmission at central synapses. *Cell*, 146(5), 785-798. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.022>
- Pang, R., Avdic-Belltheus, A., Meehan, C., Martinello, K., Mutshiya, T., Yang, Q., Sokolska, M., Torrealdea, F., Hristova, M., Bainbridge, A., Golay, X., Juul, S. E., & Robertson, N. J. (2021). Melatonin and/or erythropoietin combined with hypothermia in a piglet model of perinatal asphyxia. *Brain Communications*, 3(1), fcaa211. <https://doi.org/10.1093/braincomms/fcaa211>
- Pannasch, U., & Rouach, N. (2013). Emerging role for astroglial networks in information processing : From synapse to behavior. *Trends in Neurosciences*, 36(7), 405-417. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2013.04.004>
- Papadatou-Pastou, M., Ntolka, E., Schmitz, J., Martin, M., Munafò, M. R., Ocklenburg, S., & Paracchini, S. (2020). Human handedness : A meta-analysis. *Psychological Bulletin*, 146(6), 481-524. <https://doi.org/10.1037/bul0000229>
- Paprocka, J., Kijonka, M., Rzepka, B., & Sokół, M. (2019). Melatonin in Hypoxic-Ischemic Brain Injury in Term and Preterm Babies. *International Journal of Endocrinology*, 2019, 9626715. <https://doi.org/10.1155/2019/9626715>
- Park, W. S., Sung, S. I., Ahn, S. Y., Yoo, H. S., Sung, D. K., Im, G. H., Choi, S. J., & Chang, Y. S. (2015). Hypothermia augments neuroprotective activity of mesenchymal stem cells for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *PLoS One*, 10(3), e0120893. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120893>
- Payne, J., Maher, F., Simpson, I., Mattice, L., & Davies, P. (1997). Glucose transporter Glut 5 expression in microglial cells. *Glia*, 21(3), 327-331. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-1136\(199711\)21:3<327::aid-glia7>3.0.co;2-1](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-1136(199711)21:3<327::aid-glia7>3.0.co;2-1)
- Pellerin, L., Bergersen, L. H., Halestrap, A. P., & Pierre, K. (2005). Cellular and subcellular distribution of monocarboxylate transporters in cultured brain cells and in the adult brain. *Journal of Neuroscience Research*, 79(1-2), 55-64. <https://doi.org/10.1002/jnr.20307>
- Pellerin, L., Bouzier-Sore, A.-K., Aubert, A., Serres, S., Merle, M., Costalat, R., & Magistretti, P. J. (2007). Activity-dependent regulation of energy metabolism by astrocytes : An update. *Glia*, 55(12), 1251-1262. <https://doi.org/10.1002/glia.20528>
- Pellerin, L., & Magistretti, P. J. (1994). Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis : A mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(22), 10625-10629. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.22.10625>
- Pellerin, L., & Magistretti, P. J. (1997). Glutamate uptake stimulates Na⁺,K⁺-ATPase activity in astrocytes via activation of a distinct subunit highly sensitive to ouabain. *Journal of Neurochemistry*, 69(5), 2132-2137. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1997.69052132.x>
- Pellerin, L., & Magistretti, P. J. (2004). Neuroenergetics : Calling upon astrocytes to satisfy hungry neurons. *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry*, 10(1), 53-62. <https://doi.org/10.1177/1073858403260159>
- Pellerin, L., Pellegrini, G., Martin, J.-L., & Magistretti, P. J. (1998). Expression of monocarboxylate transporter mRNAs in mouse brain : Support for a distinct role of lactate as an energy substrate for the neonatal vs. adult brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(7), 3990-3995.
- Pelvig, D. P., Pakkenberg, H., Stark, A. K., & Pakkenberg, B. (2008). Neocortical glial cell numbers in human brains. *Neurobiology of Aging*, 29(11), 1754-1762. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2007.04.013>
- Petersen, C., Nielsen, M. D., Andersen, E. S., Basse, A. L., Isidor, M. S., Markussen, L. K., Viuff, B. M., Lambert, I. H., Hansen, J. B., & Pedersen, S. F. (2017). MCT1 and MCT4 Expression and Lactate Flux Activity Increase During White and Brown Adipogenesis and Impact Adipocyte Metabolism. *Scientific Reports*, 7(1), 13101. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13298-z>
- Petzelt, C., Blom, P., Schmehl, W., Müller, J., & Kox, W. J. (2003). Prevention of neurotoxicity in hypoxic cortical neurons by the noble gas xenon. *Life Sciences*, 72(17), 1909-1918. [https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(02\)02439-6](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(02)02439-6)
- Pierre, K., Magistretti, P. J., & Pellerin, L. (2002). MCT2 is a major neuronal monocarboxylate transporter in the adult mouse brain. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International*

- Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 22(5), 586-595. <https://doi.org/10.1097/00004647-200205000-00010>
- Pierre, K., & Pellerin, L. (2005). Monocarboxylate transporters in the central nervous system : Distribution, regulation and function. *Journal of Neurochemistry*, 94(1), 1-14. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03168.x>
- Pierre, K., Pellerin, L., Debernardi, R., Riederer, B. M., & Magistretti, P. J. (2000). Cell-specific localization of monocarboxylate transporters, MCT1 and MCT2, in the adult mouse brain revealed by double immunohistochemical labeling and confocal microscopy. *Neuroscience*, 100(3), 617-627. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(00\)00294-3](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(00)00294-3)
- Plourde, G., Roumes, H., Suissa, L., Hirt, L., Doche, É., Pellerin, L., Bouzier-Sore, A.-K., & Quintard, H. (2024). Neuroprotective effects of lactate and ketone bodies in acute brain injury. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 44(7), 1078-1088. <https://doi.org/10.1177/0271678X241245486>
- Polat, M., Simşek, A., Tansuğ, N., Sezer, R. G., Ozkol, M., Başpınar, P., & Tekgöl, H. (2013). Prediction of neurodevelopmental outcome in term neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy. *European Journal of Paediatric Neurology: EJPN: Official Journal of the European Paediatric Neurology Society*, 17(3), 288-293. <https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2012.11.004>
- Rabinowitz, J. D., & Enerbäck, S. (2020). Lactate : The ugly duckling of energy metabolism. *Nature Metabolism*, 2(7), 566-571. <https://doi.org/10.1038/s42255-020-0243-4>
- Ramos, M., del Arco, A., Pardo, B., Martínez-Serrano, A., Martínez-Morales, J. R., Kobayashi, K., Yasuda, T., Bogónez, E., Bovolenta, P., Saheki, T., & Satrústegui, J. (2003). Developmental changes in the Ca²⁺-regulated mitochondrial aspartate-glutamate carrier aralar1 in brain and prominent expression in the spinal cord. *Brain Research. Developmental Brain Research*, 143(1), 33-46. [https://doi.org/10.1016/s0165-3806\(03\)00097-x](https://doi.org/10.1016/s0165-3806(03)00097-x)
- Ranjan, A. K., & Gulati, A. (2023). Advances in Therapies to Treat Neonatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *Journal of Clinical Medicine*, 12(20), 6653. <https://doi.org/10.3390/jcm12206653>
- Rinholm, J. E., & Bergersen, L. H. (2014). White matter lactate—Does it matter? *Neuroscience*, 276, 109-116. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.10.002>
- Riske, L., Thomas, R. K., Baker, G. B., & Dursun, S. M. (2017). Lactate in the brain : An update on its relevance to brain energy, neurons, glia and panic disorder. *Therapeutic Advances in Psychopharmacology*, 7(2), 85-89. <https://doi.org/10.1177/2045125316675579>
- Robertson, N. J., Faulkner, S., Fleiss, B., Bainbridge, A., Andorka, C., Price, D., Powell, E., Lecky-Thompson, L., Thei, L., Chandrasekaran, M., Hristova, M., Cady, E. B., Gressens, P., Golay, X., & Raivich, G. (2013). Melatonin augments hypothermic neuroprotection in a perinatal asphyxia model. *Brain: A Journal of Neurology*, 136(Pt 1), 90-105. <https://doi.org/10.1093/brain/aws285>
- Robertson, N. J., Martinello, K., Lingam, I., Avdic-Belltheus, A., Meehan, C., Alonso-Alconada, D., Ragab, S., Bainbridge, A., Sokolska, M., Tachrount, M., Middleton, B., Price, D., Hristova, M., Golay, X., Soliani Raschini, A., Aquino, G., Pelizzi, N., & Facchinetti, F. (2019). Melatonin as an adjunct to therapeutic hypothermia in a piglet model of neonatal encephalopathy : A translational study. *Neurobiology of Disease*, 121, 240-251. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2018.10.004>
- Robertson, N. J., Tan, S., Groenendaal, F., Bel, F. van, Juul, S. E., Bennet, L., Derrick, M., Back, S. A., Valdez, R. C., Northington, F., Gunn, A. J., & Mallard, C. (2012). Which Neuroprotective Agents are Ready for Bench to Bedside Translation in the Newborn Infant? *The Journal of Pediatrics*, 160(4), 544. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2011.12.052>
- Rodríguez-Fanjul, J., Durán Fernández-Feijóo, C., Lopez-Abad, M., Lopez Ramos, M. G., Balada Caballé, R., Alcántara-Horillo, S., & Camprubí Camprubí, M. (2017). Neuroprotection with hypothermia and allopurinol in an animal model of hypoxic-ischemic injury : Is it a gender question? *PLoS One*, 12(9), e0184643. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184643>
- Roelants-Van Rijn, A. M., van der Grond, J., de Vries, L. S., & Groenendaal, F. (2001). Value of (1)H-MRS using different echo times in neonates with cerebral hypoxia-ischemia. *Pediatric Research*, 49(3), 356-362. <https://doi.org/10.1203/00006450-200103000-00009>
- Rosafio, K., & Pellerin, L. (2014). Oxygen tension controls the expression of the monocarboxylate transporter MCT4 in cultured mouse cortical astrocytes via a hypoxia-inducible factor-1 α -mediated transcriptional regulation. *Glia*, 62(3), 477-490. <https://doi.org/10.1002/glia.22618>
- Rose, C. F., Verkhatsky, A., & Parpura, V. (2013). Astrocyte glutamine synthetase : Pivotal in health and disease. *Biochemical Society Transactions*, 41(6), 1518-1524. <https://doi.org/10.1042/BST20130237>

- Roumes, H., Dumont, U., Sanchez, S., Mazuel, L., Blanc, J., Raffard, G., Chateil, J.-F., Pellerin, L., & Bouzier-Sore, A.-K. (2021). Neuroprotective role of lactate in rat neonatal hypoxia-ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 41(2), 342-358. <https://doi.org/10.1177/0271678X20908355>
- Roumes, H., Jollé, C., Blanc, J., Benkhaled, I., Chatain, C. P., Massot, P., Raffard, G., Bouchaud, V., Biran, M., Pythoud, C., Déglon, N., Zimmer, E. R., Pellerin, L., & Bouzier-Sore, A.-K. (2021). Lactate transporters in the rat barrel cortex sustain whisker-dependent BOLD fMRI signal and behavioral performance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(47), e2112466118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2112466118>
- Rüegger, C. M., Davis, P. G., & Cheong, J. L. (2018). Xenon as an adjuvant to therapeutic hypothermia in near-term and term newborns with hypoxic-ischaemic encephalopathy. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 8(8), CD012753. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD012753.pub2>
- Ruth, V. J., & Raivio, K. O. (1988). Perinatal brain damage : Predictive value of metabolic acidosis and the Apgar score. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 297(6640), 24-27. <https://doi.org/10.1136/bmj.297.6640.24>
- Saab, A. S., Tzvetavona, I. D., Trevisiol, A., Baltan, S., Dibaj, P., Kusch, K., Möbius, W., Goetze, B., Jahn, H. M., Huang, W., Steffens, H., Schomburg, E. D., Pérez-Samartín, A., Pérez-Cerdá, F., Bakhtiari, D., Matute, C., Löwel, S., Griesinger, C., Hirrlinger, J., ... Nave, K.-A. (2016). Oligodendroglial NMDA Receptors Regulate Glucose Import and Axonal Energy Metabolism. *Neuron*, 91(1), 119-132. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.05.016>
- Sabir, H., Bishop, S., Cohen, N., Maes, E., Liu, X., Dingley, J., & Thoresen, M. (2013). Neither xenon nor fentanyl induces neuroapoptosis in the newborn pig brain. *Anesthesiology*, 119(2), 345-357. <https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e318294934d>
- Sabir, H., Maes, E., Zweyer, M., SchleeHuber, Y., Imam, F. B., Silverman, J., White, Y., Pang, R., Pasca, A. M., Robertson, N. J., Maltepe, E., & Bernis, M. E. (2023). Comparing the efficacy in reducing brain injury of different neuroprotective agents following neonatal hypoxia-ischemia in newborn rats : A multi-drug randomized controlled screening trial. *Scientific Reports*, 13(1), 9467. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-36653-9>
- Saliba, E., Norbert, K., & Cantagrel, S. (2010). Neuroprotection par hypothermie de l'encéphalopathie hypoxique-ischémique du nouveau-né à terme. *Réanimation*, 19(7), 655-664. <https://doi.org/10.1016/j.reaurg.2010.10.001>
- Sandhu, M. R. S., Gruenbaum, B. F., Gruenbaum, S. E., Dhaher, R., Deshpande, K., Funaro, M. C., Lee, T.-S. W., Zaveri, H. P., & Eid, T. (2021). Astroglial Glutamine Synthetase and the Pathogenesis of Mesial Temporal Lobe Epilepsy. *Frontiers in Neurology*, 12, 665334. <https://doi.org/10.3389/fneur.2021.665334>
- Sarnat, H. B., Flores-Sarnat, L., Fajardo, C., Leijser, L. M., Wusthoff, C., & Mohammad, K. (2020). Sarnat Grading Scale for Neonatal Encephalopathy after 45 Years : An Update Proposal. *Pediatric Neurology*, 113, 75-79. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2020.08.014>
- Sarnat, H. B., & Sarnat, M. S. (1976). Neonatal encephalopathy following fetal distress. A clinical and electroencephalographic study. *Archives of Neurology*, 33(10), 696-705. <https://doi.org/10.1001/archneur.1976.00500100030012>
- Scemes, E., & Giaume, C. (2006). Astrocyte Calcium Waves : What They Are and What They Do. *Glia*, 54(7), 716. <https://doi.org/10.1002/glia.20374>
- Schurr, A. (2006). Lactate : The ultimate cerebral oxidative energy substrate? *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 26(1), 142-152. <https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600174>
- Schurr, A., Payne, R. S., Miller, J. J., & Rigor, B. M. (1997). Brain lactate, not glucose, fuels the recovery of synaptic function from hypoxia upon reoxygenation : An in vitro study. *Brain Research*, 744(1), 105-111. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(96\)01106-7](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(96)01106-7)
- Sen, E., & Levison, S. W. (2006). Astrocytes and developmental white matter disorders. *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews*, 12(2), 97-104. <https://doi.org/10.1002/mrdd.20106>
- Shah, P. S., & Perlman, M. (2009). Time courses of intrapartum asphyxia : Neonatal characteristics and outcomes. *American Journal of Perinatology*, 26(1), 39-44. <https://doi.org/10.1055/s-0028-1095185>
- Shank, R. P., Bennett, G. S., Freytag, S. O., & Campbell, G. L. (1985). Pyruvate carboxylase : An astrocyte-specific enzyme implicated in the replenishment of amino acid neurotransmitter pools. *Brain Research*, 329(1-2), 364-367. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(85\)90552-9](https://doi.org/10.1016/0006-8993(85)90552-9)
- Shankaran, S., Laptook, A. R., Pappas, A., McDonald, S. A., Das, A., Tyson, J. E., Poindexter, B. B., Schibler, K., Bell, E. F., Heyne, R. J., Pedroza, C., Bara, R., Van Meurs, K. P., Grisby, C., Huitema, C. M. P., Garg, M., Ehrenkranz, R. A., Shepherd, E. G., Chalak, L. F., ... Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child

- Health and Human Development Neonatal Research Network. (2014). Effect of depth and duration of cooling on deaths in the NICU among neonates with hypoxic ischemic encephalopathy : A randomized clinical trial. *JAMA*, 312(24), 2629-2639. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.16058>
- Shankaran, S., Pappas, A., McDonald, S. A., Vohr, B. R., Hintz, S. R., Yolton, K., Gustafson, K. E., Leach, T. M., Green, C., Bara, R., Petrie Huitema, C. M., Ehrenkranz, R. A., Tyson, J. E., Das, A., Hammond, J., Peralta-Carcelen, M., Evans, P. W., Heyne, R. J., Wilson-Costello, D. E., ... Eunice Kennedy Shriver NICHD Neonatal Research Network. (2012). Childhood outcomes after hypothermia for neonatal encephalopathy. *The New England Journal of Medicine*, 366(22), 2085-2092. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1112066>
- Sherman, D. L., & Brophy, P. J. (2005). Mechanisms of axon ensheathment and myelin growth. *Nature Reviews Neuroscience*, 6(9), 683-690. <https://doi.org/10.1038/nrn1743>
- Shippy, D. C., Wilhelm, C., Viharkumar, P. A., Raife, T. J., & Ulland, T. K. (2020). β -Hydroxybutyrate inhibits inflammasome activation to attenuate Alzheimer's disease pathology. *Journal of Neuroinflammation*, 17(1), 280. <https://doi.org/10.1186/s12974-020-01948-5>
- Sofroniew, M. V. (2015). Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation. *Nature Reviews Neuroscience*, 16(5), 249-263. <https://doi.org/10.1038/nrn3898>
- Souza, G. R. e, Zambeli, L. de O., Ruela, V. P., Silveira, A. C. B., Maia, M. E. D., Freitas, G. M. de, Vieira, J. M., & Alvim, V. F. (2023). Comparison between selective head cooling and whole-body cooling in neonatal therapeutic hypothermia. *ABCS Health Sci*, e023301-e023301. <https://doi.org/10.7322/abcshs.2021015.1742>
- Srinivasakumar, P., Zempel, J., Wallendorf, M., Lawrence, R., Inder, T., & Mathur, A. (2013). Therapeutic hypothermia in neonatal hypoxic ischemic encephalopathy : Electrographic seizures and magnetic resonance imaging evidence of injury. *The Journal of Pediatrics*, 163(2), 465-470. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2013.01.041>
- Steiner, P. (2019). Brain Fuel Utilization in the Developing Brain. *Annals of Nutrition & Metabolism*, 75 Suppl 1, 8-18. <https://doi.org/10.1159/000508054>
- Stevenson, D. K., Benitz, W. E., Sunshine, P., Hintz, S. R., & Druzin, M. L. (Éds.). (2017). *Fetal and Neonatal Brain Injury* (5^e éd.). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/9781316275498>
- Suissa, L., Flachon, V., Guignonis, J.-M., Olivieri, C.-V., Burel-Vandenbos, F., Guglielmi, J., Ambrosetti, D., Gérard, M., Franken, P., Darcourt, J., Pellerin, L., Pourcher, T., & Lindenthal, S. (2020). Urinary ketone body loss leads to degeneration of brain white matter in elderly SLC5A8-deficient mice. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 40(8), 1709-1723. <https://doi.org/10.1177/0271678X19873662>
- Suissa, L., Panicucci, E., Perot, C., Romero, G., Gazzola, S., Laksiri, N., Rey, C., Doche, E., Mahagne, M.-H., Pelletier, J., Faivre, A., & Robinet-Borgomano, E. (2020). Effect of hyperglycemia on stroke outcome is not homogeneous to all patients treated with mechanical thrombectomy. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 194, 105750. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2020.105750>
- Sullivan, S. M., Björkman, S. T., Miller, S. M., Colditz, P. B., & Pow, D. V. (2010). Morphological changes in white matter astrocytes in response to hypoxia/ischemia in the neonatal pig. *Brain Research*, 1319, 164-174. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.01.010>
- Suzuki, A., Stern, S. A., Bozdagi, O., Huntley, G. W., Walker, R. H., Magistretti, P. J., & Alberini, C. M. (2011). Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation. *Cell*, 144(5), 810-823. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.018>
- Tadi, M., Allaman, I., Lengacher, S., Grenningloh, G., & Magistretti, P. J. (2015). Learning-Induced Gene Expression in the Hippocampus Reveals a Role of Neuron -Astrocyte Metabolic Coupling in Long Term Memory. *PLOS ONE*, 10(10), e0141568. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141568>
- Tagin, M. A., Woolcott, C. G., Vincer, M. J., Whyte, R. K., & Stinson, D. A. (2012). Hypothermia for neonatal hypoxic ischemic encephalopathy : An updated systematic review and meta-analysis. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine*, 166(6), 558-566. <https://doi.org/10.1001/archpediatrics.2011.1772>
- Takahashi, S. (2020). Metabolic compartmentalization between astroglia and neurons in physiological and pathophysiological conditions of the neurovascular unit. *Neuropathology*, 40(2), 121-137. <https://doi.org/10.1111/neup.12639>
- Tang, B. L. (2018). Brain activity-induced neuronal glucose uptake/glycolysis : Is the lactate shuttle not required? *Brain Research Bulletin*, 137, 225-228. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2017.12.010>
- Tardy, M. (1991). The astrocytes as a hallmark for neuronal function. *Medecine/Sciences*, 7(8), 799-804. Scopus. <https://doi.org/10.4267/10608/4458>
- Tarocco, A., Carocchia, N., Morciano, G., Wieckowski, M. R., Ancora, G., Garani, G., & Pinton, P. (2019). Melatonin as a master regulator of cell death and inflammation : Molecular mechanisms and clinical implications for newborn care. *Cell Death & Disease*, 10(4), 317. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1556-7>

- Tassinari, I. D., Zang, J., Ribeiro, N. H., Martins, B. B., Tauffer, J. V. M., Nunes, R. R., Sanches, E. F., Sizonenko, S., Netto, C. A., Paz, A. H., & de Fraga, L. S. (2024). Lactate administration causes long-term neuroprotective effects following neonatal hypoxia-ischemia. *Experimental Neurology*, 381, 114929. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2024.114929>
- Tekkök, S. B., Brown, A. M., Westenbroek, R., Pellerin, L., & Ransom, B. R. (2005). Transfer of glycogen-derived lactate from astrocytes to axons via specific monocarboxylate transporters supports mouse optic nerve activity. *Journal of Neuroscience Research*, 81(5), 644-652. <https://doi.org/10.1002/jnr.20573>
- Thau, L., Reddy, V., & Singh, P. (2024). Anatomy, Central Nervous System. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK542179/>
- Thayyil, S., Chandrasekaran, M., Taylor, A., Bainbridge, A., Cady, E. B., Chong, W. K. K., Murad, S., Omar, R. Z., & Robertson, N. J. (2010). Cerebral magnetic resonance biomarkers in neonatal encephalopathy : A meta-analysis. *Pediatrics*, 125(2), e382-395. <https://doi.org/10.1542/peds.2009-1046>
- Thoresen, M., Jary, S., Walløe, L., Karlsson, M., Martinez-Biarge, M., Chakkarapani, E., & Cowan, F. M. (2021). MRI combined with early clinical variables are excellent outcome predictors for newborn infants undergoing therapeutic hypothermia after perinatal asphyxia. *EClinicalMedicine*, 36, 100885. <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2021.100885>
- Thoresen, M., Liu, X., Jary, S., Brown, E., Sabir, H., Stone, J., Cowan, F., & Karlsson, M. (2012). Lactate dehydrogenase in hypothermia-treated newborn infants with hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Acta Paediatrica (Oslo, Norway: 1992)*, 101(10), 1038-1044. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2012.02778.x>
- Thoresen, M., Satas, S., Puka-Sundvall, M., Whitelaw, A., Hallström, A., Løberg, E. M., Ungerstedt, U., Steen, P. A., & Hagberg, H. (1997). Post-hypoxic hypothermia reduces cerebrocortical release of NO and excitotoxins. *Neuroreport*, 8(15), 3359-3362. <https://doi.org/10.1097/00001756-199710200-00033>
- Thoresen, M., & Whitelaw, A. (2000). Cardiovascular changes during mild therapeutic hypothermia and rewarming in infants with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics*, 106(1 Pt 1), 92-99. <https://doi.org/10.1542/peds.106.1.92>
- van Laerhoven, H., de Haan, T. R., Offringa, M., Post, B., & van der Lee, J. H. (2013). Prognostic tests in term neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy : A systematic review. *Pediatrics*, 131(1), 88-98. <https://doi.org/10.1542/peds.2012-1297>
- Vannucci, R. C., Yager, J. Y., & Vannucci, S. J. (1994). Cerebral glucose and energy utilization during the evolution of hypoxic-ischemic brain damage in the immature rat. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 14(2), 279-288. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.1994.35>
- Vannucci, S. J. (1994). Developmental expression of GLUT1 and GLUT3 glucose transporters in rat brain. *Journal of Neurochemistry*, 62(1), 240-246. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1994.62010240.x>
- Vannucci, S. J., Clark, R. R., Koehler-Stec, E., Li, K., Smith, C. B., Davies, P., Maher, F., & Simpson, I. A. (1998). Glucose transporter expression in brain : Relationship to cerebral glucose utilization. *Developmental Neuroscience*, 20(4-5), 369-379. <https://doi.org/10.1159/000017333>
- Vannucci, S. J., & Hagberg, H. (2004). Hypoxia-ischemia in the immature brain. *The Journal of Experimental Biology*, 207(Pt 18), 3149-3154. <https://doi.org/10.1242/jeb.01064>
- Vannucci, S. J., Seaman, L. B., Brucklacher, R. M., & Vannucci, R. C. (1994). Glucose transport in developing rat brain : Glucose transporter proteins, rate constants and cerebral glucose utilization. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 140(2), 177-184. <https://doi.org/10.1007/BF00926756>
- Vannucci, S. J., & Vannucci, R. C. (1998). Brain Metabolism in the Fetus and Neonate. In R. M. Cowett (Éd.), *Principles of Perinatal—Neonatal Metabolism* (p. 537-550). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-1642-1_26
- Vavříčka, J., Brož, P., Follprecht, D., Novák, J., & Kroužecký, A. (2024). Modern Perspective of Lactate Metabolism. *Physiological Research*, 73(4), 499-514.
- Véga, C., Poitry-Yamate, C. L., Jirounek, P., Tscopoulos, M., & Coles, J. A. (1998). Lactate is released and taken up by isolated rabbit vagus nerve during aerobic metabolism. *Journal of Neurochemistry*, 71(1), 330-337. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1998.71010330.x>
- Verkhatsky, A., & Butt, A. M. (2018). The History of the Decline and Fall of the Glial Numbers Legend. *Neuroglia*, 1(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/neuroglia1010013>
- Voloboueva, L. A., Emery, J. F., Sun, X., & Giffard, R. G. (2013). Inflammatory response of microglial BV-2 cells includes a glycolytic shift and is modulated by mitochondrial glucose-regulated protein 75/mortalin. *FEBS Letters*, 587(6), 756-762. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.01.067>

- Wassink, G., Gunn, E. R., Drury, P. P., Bennet, L., & Gunn, A. J. (2014). The mechanisms and treatment of asphyxial encephalopathy. *Frontiers in Neuroscience*, *8*, 40. <https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00040>
- Watanabe, M., Tozzi, R., Risi, R., Tuccinardi, D., Mariani, S., Basciani, S., Spera, G., Lubrano, C., & Gnessi, L. (2020). Beneficial effects of the ketogenic diet on nonalcoholic fatty liver disease : A comprehensive review of the literature. *Obesity Reviews: An Official Journal of the International Association for the Study of Obesity*, *21*(8), e13024. <https://doi.org/10.1111/obr.13024>
- Westhaus, A., Blumrich, E. M., & Dringen, R. (2017). The Antidiabetic Drug Metformin Stimulates Glycolytic Lactate Production in Cultured Primary Rat Astrocytes. *Neurochemical Research*, *42*(1), 294-305. <https://doi.org/10.1007/s11064-015-1733-8>
- Wu, Y. W., Comstock, B. A., Gonzalez, F. F., Mayock, D. E., Goodman, A. M., Maitre, N. L., Chang, T., Van Meurs, K. P., Lampland, A. L., Bendel-Stenzel, E., Mathur, A. M., Wu, T.-W., Riley, D., Mietzsch, U., Chalak, L., Flibotte, J., Weitkamp, J.-H., Ahmad, K. A., Yanowitz, T. D., ... HEAL Consortium. (2022). Trial of Erythropoietin for Hypoxic-Ischemic Encephalopathy in Newborns. *The New England Journal of Medicine*, *387*(2), 148-159. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2119660>
- Wu, Y. W., & Gonzalez, F. F. (2015). Erythropoietin : A novel therapy for hypoxic-ischaemic encephalopathy? *Developmental Medicine and Child Neurology*, *57 Suppl 3*, 34-39. <https://doi.org/10.1111/dmcn.12730>
- Wu, Y. W., Mathur, A. M., Chang, T., McKinstry, R. C., Mulkey, S. B., Mayock, D. E., Van Meurs, K. P., Rogers, E. E., Gonzalez, F. F., Comstock, B. A., Juul, S. E., Msall, M. E., Bonifacio, S. L., Glass, H. C., Massaro, A. N., Dong, L., Tan, K. W., Heagerty, P. J., & Ballard, R. A. (2016). High-Dose Erythropoietin and Hypothermia for Hypoxic-Ischemic Encephalopathy : A Phase II Trial. *Pediatrics*, *137*(6), e20160191. <https://doi.org/10.1542/peds.2016-0191>
- Xu, H., Zhang, H., Zhang, J., Huang, Q., Shen, Z., & Wu, R. (2016). Evaluation of neuron-glia integrity by in vivo proton magnetic resonance spectroscopy : Implications for psychiatric disorders. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *71*, 563-577. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.09.027>
- Xue, X., Liu, B., Hu, J., Bian, X., & Lou, S. (2022). The potential mechanisms of lactate in mediating exercise-enhanced cognitive function : A dual role as an energy supply substrate and a signaling molecule. *Nutrition & Metabolism*, *19*(1), 52. <https://doi.org/10.1186/s12986-022-00687-z>
- Yang, S., Qin, C., Hu, Z.-W., Zhou, L.-Q., Yu, H.-H., Chen, M., Bosco, D. B., Wang, W., Wu, L.-J., & Tian, D.-S. (2021). Microglia reprogram metabolic profiles for phenotype and function changes in central nervous system. *Neurobiology of Disease*, *152*, 105290. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2021.105290>
- Zhai, X., Li, J., Li, L., Sun, Y., Zhang, X., Xue, Y., Lv, J., Gao, Y., Li, S., Yan, W., Yin, S., & Xiao, Z. (2020). L-lactate preconditioning promotes plasticity-related proteins expression and reduces neurological deficits by potentiating GPR81 signaling in rat traumatic brain injury model. *Brain Research*, *1746*, 146945. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2020.146945>
- Zhang, Q., Jia, M., Wang, Y., Wang, Q., & Wu, J. (2022). Cell Death Mechanisms in Cerebral Ischemia–Reperfusion Injury. *Neurochemical Research*, *47*(12), 3525-3542. <https://doi.org/10.1007/s11064-022-03697-8>
- Zhou, J., Burns, M. P., Huynh, L., Villapol, S., Taub, D. D., Saavedra, J. M., & Blackman, M. R. (2017). Temporal Changes in Cortical and Hippocampal Expression of Genes Important for Brain Glucose Metabolism Following Controlled Cortical Impact Injury in Mice. *Frontiers in Endocrinology*, *8*, 231. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00231>
- Zhu, C., Kang, W., Xu, F., Cheng, X., Zhang, Z., Jia, L., Ji, L., Guo, X., Xiong, H., Simbruner, G., Blomgren, K., & Wang, X. (2009). Erythropoietin improved neurologic outcomes in newborns with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics*, *124*(2), e218-226.

Chapitre 2 : Les méthodes utilisées

1. Le modèle classique d'HIN de Rice-Vannucci

La plupart des études publiées qui modélisent l'HIN chez les rongeurs ont utilisé le modèle de Rice-Vannucci. Ce modèle est caractérisé par une ligature unilatérale de l'artère carotide commune, suivie d'une période de récupération avec la mère dans la cage ou sur une plaque chauffante. Toutefois, la ligature unilatérale de la carotide de l'hémisphère ipsilatéral ne provoque pas à elle seule une réduction du débit sanguin suffisante pour entraîner des lésions cérébrales. Le flux sanguin collatéral via le polygone de Willis compense et assure l'irrigation de l'ensemble du cerveau. Pour induire des lésions cérébrales, il est nécessaire d'exposer les rats à une atmosphère contenant 8 % d'oxygène (O₂; contre 21 % dans l'atmosphère) pendant 1 à 3 h, tout en maintenant leur température rectale à 37 °C.

Cette procédure induit la formation de lésions cérébrales (Rice et al., 1981) résultant de la combinaison de ces deux événements: (1) la réduction du flux sanguin cérébral (**ischémie**) associée à (2) une diminution de l'oxygène (**hypoxie**). Des études ont montré une sensibilité sélective de la substance grise à la nécrose neuronale, avec des lésions touchant l'intégrité du cortex ipsilatéral, de l'hippocampe et des noyaux gris centraux ipsilatéraux (Rice et al., 1981; ; Vannucci et al., 1999). Ce phénomène a également été observé chez les nouveau-nés humains souffrant d'HIN, avec des lésions affectant le cortex (Barkovich et al., 1995; Chau et al., 2008; Miller et al., 2005; Rutherford et al., 2004), les noyaux gris centraux et le thalamus (Chau et al., 2008; Cowan et al., 2003; Kaufman et al., 2003; Miller et al., 2005). Des lésions de la substance blanche sont également observées, dont l'étendue est corrélée avec la durée de l'exposition à l'hypoxie (Liu et al., 2002; Ness et al., 2001). La littérature rapporte également des atteintes de la substance blanche cérébrale après un épisode d'HIN chez les nouveau-nés humains (Craig et al., 2003; Inder et al., 1999), en particulier au niveau de la substance blanche sous-corticale (Neil et al., 2002; Vermeulen et al., 2003). Bien que ce modèle ait été initialement décrit chez le rat (Rice et al., 1981), il a été adapté avec succès chez la souris entre les âges postnataux P7 et P10, produisant des effets anatomiques et comportementaux similaires (Ferriero et al., 1996; Sheldon et al., 1998).

Le modèle Rice-Vannucci présente plusieurs avantages : (1) l'hémisphère controlatéral, exposé à l'hypoxie sans l'ischémie semble normal (R. C. Vannucci & Yager, 1992), il fournit un hémisphère de contrôle au sein de l'expérimentation, (2) des analyses comportementales approfondies ont mis en évidence les conséquences à long terme de ce modèle sur les fonctions motrices et cognitives (Arteni et al., 2003; Lubics et al., 2005). La littérature indique que, parmi les patients survivants à une HIN, 5 à 10 % des nourrissons présentent des déficits moteurs persistants, et 20 à 50 % présentent des anomalies sensorielles ou cognitives persistant jusqu'à l'adolescence (Hack et al., 1992; Lee et al., 2013; Vohr et al., 2000; Volpe, 2001, 2012). Son troisième avantage réside dans son utilisation généralisée qui permet des comparaisons directes avec de nombreuses études déjà publiées (Yager et al., 1993).

L'inconvénient majeur de ce modèle est la grande variabilité interindividuelle des volumes et de la gravité des lésions cérébrales, ce qui complique les comparaisons entre les expérimentateurs (R. C. Vannucci & Vannucci, 2005). Par ailleurs, une étude a montré que la ligature unilatérale de la carotide du côté droit chez des rats P7 entraîne des lésions cérébrales plus étendues que celles causées par une ligature du côté gauche (Sanchez et al., 2015). Les limites de ce modèle, ainsi que les solutions proposées pour y remédier, sont présentées dans le paragraphe suivant.

1.1. Animaux

Toutes les expérimentations sur les animaux ont été menées conformément aux directives concernant l'expérimentation animale du Conseil des Communautés Européennes du 24 novembre 1986 (86/609/CEE). Les protocoles respectant les règles éthiques du ministère de l'Agriculture et des Forêts ont été approuvés par le comité d'éthique local (Bordeaux, autorisation n° 37955). Les expériences ont été réalisées sur des rats issus de rates Wistar gestantes (Janvier Labs « modèle : RjHan » - France), réceptionnées au laboratoire, à 16 j de gestation. Les animaux ont été maintenus sous un cycle d'alternance jour/nuit 12 h / 12 h, dans des cages avec une litière à base de peuplier (granulométrie adaptée au bien-être animal des rats). L'eau de boisson et des croquettes (A03 pour les femelles gestantes ou allaitantes ou A04 pour les animaux après sevrage) ont été données *ad libitum*.

1.2. Protocole d'HIN

L'HIN a été induite chez des rats à l'âge postnatal de 7 jours (P7 ; poids $15,2 \pm 1,8$ g), conformément au modèle de Rice-Vannucci. Cet âge (P7) correspond au stade de maturation cérébrale d'un nouveau-né humain à terme (Rice et al., 1981; Romijn et al., 1991). Ce modèle consiste en **une ligature de l'artère carotide commune gauche** selon le protocole initialement décrit par Rice et al. (Rice et al., 1981), suivie d'une période **d'une récupération de 30 min**, elle-même suivie de **2 h dans une chambre hypoxique**.

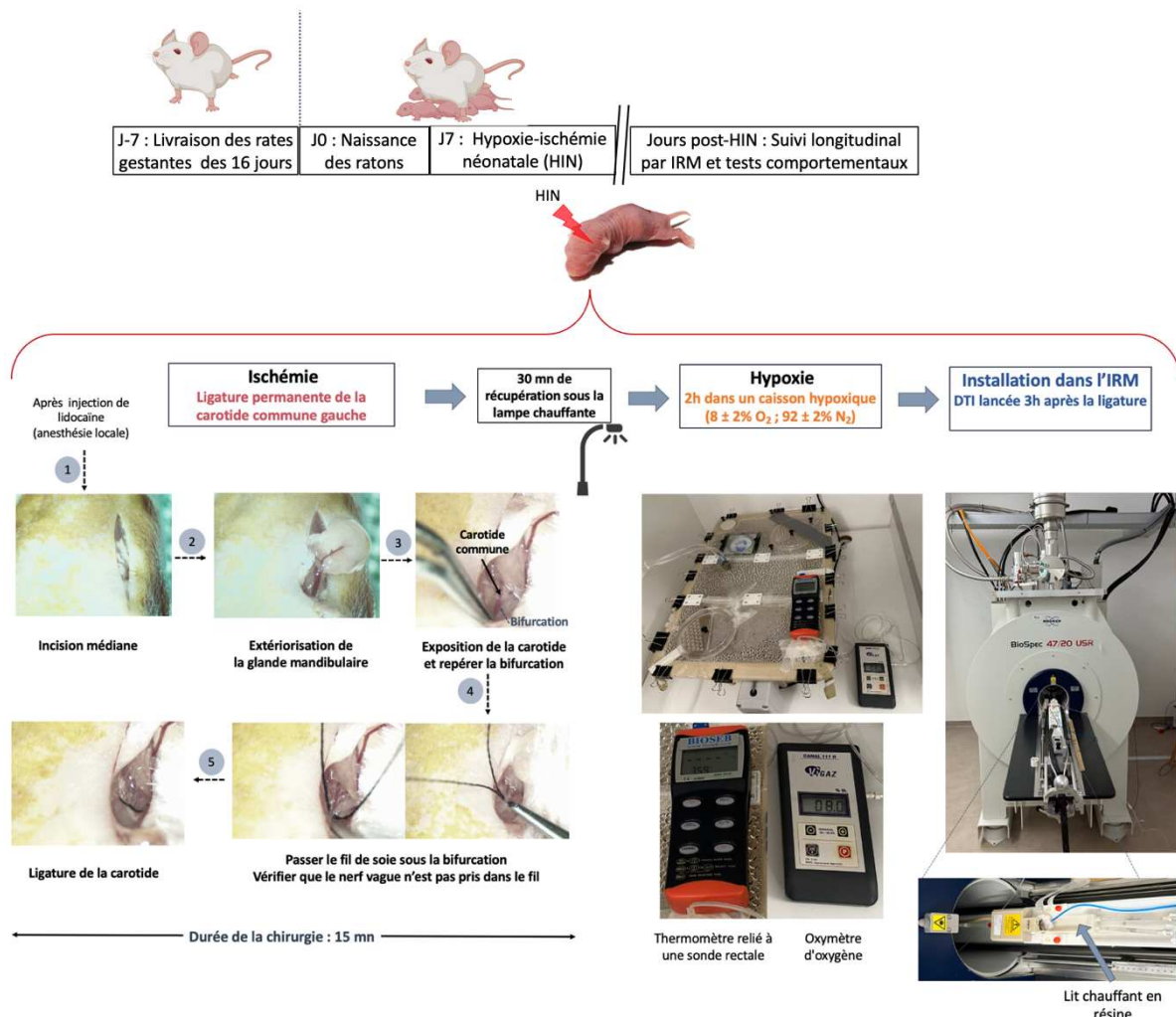


Figure 18 : Schéma descriptif du protocole d'HIN. Déroulement de l'induction de l'HIN pour chaque raton : ligature de l'artère carotide commune gauche suivie de 2 h d'hypoxie à 8 % d'O₂, puis réalisation d'une IRM. L'IRM de diffusion a toujours été effectuée 3 h après la ligature.

1.2.1. Description du protocole chirurgical

Pour la chirurgie, les rats ont été anesthésiés sous isoflurane (4 % pour l'induction et 1,5 % pour le maintien de l'anesthésie). Une injection de lidocaïne à 0,5 % a été administrée en injection sous-cutanée dans la région ventrale du cou, préalablement désinfectée à la chlorhexidine puis à la Bétadine, avant l'incision médiane. Après extériorisation de la glande mandibulaire gauche, l'artère carotide commune a été exposée, isolée du nerf vague et des autres structures, puis ligaturée de manière permanente à l'aide d'un fil de soie chirurgical non résorbable (7.0) [Figure 18]. La glande mandibulaire a ensuite été remise en place. Les tissus ont été réhydratés avec une solution saline et la plaie suturée avec le même fil de soie. La procédure chirurgicale n'a pas duré plus de 15 min, et la température des rats a été maintenue à $35,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$ à l'aide d'un tapis chauffant, relié à une sonde rectale (CMA/Microdialysis AB, Phymep, Paris). Après 30 min de récupération dans une cage posée sur une plaque chauffante, les animaux ont été placés dans une chambre hypoxique (enceinte d'environ 840 cm^2 ; Intensive Care Unit Warmer, Harvard Apparatus, France) pendant 2 h dans une atmosphère à $8,0 \pm 0,2\%$ d' O_2 et $92,0 \pm 0,2\%$ de N_2 , avec une humidité de 80 % et à une température de 35°C , permettant de maintenir une température rectale de $35,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Les taux d'oxygène (O_2) dans le caisson étaient contrôlés toutes les 5 min à l'aide d'un oxymètre (Vigaz, France). À la fin de la période d'hypoxie, les rats ont été anesthésiés de nouveau à l'isoflurane et placés dans un appareil d'IRM pré-clinique Bruker 4,7 T [Figure 18].

1.2.2. Limites du modèle et optimisation de son protocole

Il existe des nombreux paramètres physiologiques susceptibles d'affecter la reproductibilité du modèle d'HIN. Ci-après, nous présentons certains de ces paramètres ainsi que les solutions que nous avons mises en place pour optimiser l'induction de l'HIN.

- Un premier paramètre à prendre en compte dans ce modèle est liée à la mise-bas des rates. En effet, la durée de gestation varie d'une rate à l'autre, allant de 21 à 22 jours. Il est également difficile de déterminer précisément l'heure de la mise-bas, celle-ci pouvant avoir lieu le soir, la nuit ou tôt le matin, ce qui peut entraîner une variation de 10 h entre les portées. Or, il a été montré dans la littérature que la réalisation de l'HIN à P6 ou P8 peut influencer la taille des lésions (Brégère et al., 2022; R. C. Vannucci & Vannucci, 2005). Plus l'HI est effectuée tôt, moins les risques de lésions cérébrales sont importants (Towfighi et al., 1997), et plus certaines structures peuvent être épargnées, comme par exemple l'hippocampe (Brégère et al., 2022). À l'inverse, plus elle est réalisée tardivement, plus les risques de lésions graves et de déficits comportementaux augmentent (R. C. Vannucci & Vannucci, 2005). Pour atténuer cette variabilité temporelle les mises-bas retardées de plus de 12 h ont conduit à reporter les expérimentations de 24 h.
- Un autre paramètre à prendre en compte est le nombre de rats par portée, qui varie généralement autour de douze, mais peut atteindre jusqu'à 17. Un nombre élevé de rats peut affecter l'accès à l'allaitement, car les rates ne possèdent que 12 tétines. Cela complique l'alimentation lorsque la portée dépasse ce nombre. Or, des études ont montré que le régime alimentaire maternel pourrait affecter la neuroplasticité néonatale, influençant la récupération fonctionnelle des rats après un accident d'HIN. Il a notamment été montré que la restriction calorique avait un effet neuroprotecteur dans le contexte de l'HI néonatale (Ef et al., 2012). Puisque le nombre de rats par portée peut moduler la prise alimentaire, ce facteur peut affecter la robustesse de notre modèle d'HIN. Ainsi, les portées ont été limitées à 12 rats maximum (les rats excédentaires étant en général utilisés dans d'autres protocoles expérimentaux, comme la culture primaire de microglie, pour respecter au maximum la règle des 3R). Avant chaque intervention chirurgicale, la présence de lait dans les estomacs des rats était vérifiée, car leur peau fine permettait sa visualisation facile par transparence. Enfin, l'évolution du poids des rats, mesurée quotidiennement après l'HIN, servait également d'indicateur de leur bonne alimentation.

- Un troisième paramètre crucial est la température, qui a un impact direct sur la taille des lésions cérébrales dans notre modèle d'HIN. En effet, l'hypothermie est neuroprotectrice dans le cadre de l'HIN (Bona et al., 1998), tandis que l'hyperthermie est délétère (Wood et al., 2018). Une étude préclinique menée chez des rats P7 a montré qu'une augmentation de 2°C après l'HIN peut entraîner une mortalité de 50 % et des déficits comportementaux exacerbés (Wood et al., 2018). Dans notre étude, lors de canicules ou de pannes de climatisation, une élévation de quelques degrés a été observée dans la salle de la chambre hypoxique et celle de l'IRM. Nous avons également constaté qu'une hausse de température dans le caisson hypoxique influait sur la taille des lésions cérébrales dans notre modèle. Pour remédier à ces variations, deux solutions ont été mises en place :
 - Une chambre hypoxique à double paroi remplie d'eau a été installée pour assurer une stabilité optimale de la température à l'intérieur de l'enceinte.
 - À l'intérieur de la chambre hypoxique, les variations de température ont été suivies avec deux thermomètres, et la température du bain-marie du caisson a été ajustée selon les besoins pour maintenir une température constante de l'atmosphère du caisson à 35°C, température nécessaire pour stabiliser la température rectale des rats à $35,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$, qui était elle aussi mesurée à l'aide d'une sonde rectale.

1.2.3. Mise en place de l'hypothermie thérapeutique et suivi des températures corporelles

Pour les conditions nécessitant la mise en place d'une hypothermie thérapeutique (HT), les rats ont été déposés dans des bécards individuels, placés dans un bain-marie Thermo Fisher Scientific à température stabilisée de 31,5 °C, afin de maintenir une température rectale de $32,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Les rats ont atteint cette température rectale environ 15 min après l'initiation de l'HT [Figures 19 et 20]. Sur la base de la littérature, différentes durées d'HT ont été testées : 2 h, 3 h et 5 h (Jatana et al., 2006; Sabir et al., 2012). Pour les conditions en normothermie, les rats ont été déposés dans des bécards individuels, placés dans un bain-marie Thermo Fisher Scientific à température stabilisée de 36,5 °C, pendant 2 h afin de maintenir une température rectale de $36,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ [Figure 20].



Figure 19 : Bain-marie servant au contrôle des températures post-HIN.

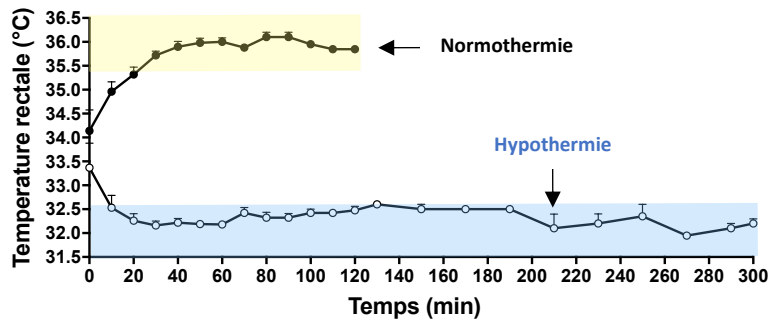


Figure 20 : Suivi des températures rectales des rats post-HIN. En noir : Température rectale des rats en normothermie (35,5 - 36,5 °C) et en blanc : Température rectale des rats en hypothermie (31,5 - 32,5 °C).

1.2.4. Groupes expérimentaux

- Pour la détermination des meilleures conditions d'hypothermie, les groupes suivants ont été considérés :

Groupe Sham : pas d'HIN à P7 + 1 injection intrapéritonéale (i.p.) de sérum physiologique (NaCl) à P7 + 2 h de normothermie débutant 3,5 h post-ligature (n = 13)

Groupe HIC : HIN à P7 + 1 injection de NaCl par voie i.p. à P7 (juste après la sortie du caisson hypoxique) + 2 h de normothermie débutant 3,5 h post-ligature (n = 14)

Groupes HIH2, HIH3 et HIH5 : HIN à P7 + 1 injection de NaCl par voie i.p. à P7 (juste après la sortie du caisson hypoxique) + 2 h, 3 h ou 5 h d'hypothermie débutant 3,5 h post-ligature (n = 11/ groupe)

Groupe HIH2Im : HIN à P7 + 1 injection de NaCl par i.p. et de 2 h d'hypothermie immédiatement après la sortie du caisson hypoxique (soit 2,5 h post-ligature) (n = 7).

- Pour l'évaluation du potentiel thérapeutique des injections de lactate couplées à l'HT, les groupes suivants ont été réalisés :

Groupe Sham : pas d'HIN à P7 + 1 injection intrapéritonéale (i.p.) de sérum physiologique (NaCl) à P7 + 2 h de normothermie débutant 3,5 h post-ligature (n = 13)

Groupe HIC : HIN à P7 + 1 injection de NaCl par voie i.p. à P7 (juste après la sortie du caisson hypoxique) + 2 h de normothermie débutant 3,5 h post-ligature (n = 14)

Groupe HI3L : HIN à P7 + 3 injections de lactate (juste à la sortie du caisson hypoxique (P7), puis à 24 h après HIN (P8) et à 48 h après HIN (P9)) et 2 h de normothermie débutant 3,5 h post-ligature (n = 12)

Groupe HIH2 : HIN à P7 + 1 injection de NaCl par voie i.p. à P7 (juste après la sortie du caisson hypoxique) + 2 h d'hypothermie débutant 3,5 h post-ligature (n = 11)

Groupe HI3L+2H : HIN à P7 + 3 injections de lactate par voie i.p. (juste à la sortie du caisson d'hypoxie et avant l'hypothermie (P7), puis à P8 et à P9) et 2 h d'hypothermie, débutant 3,5 h post-ligature (n = 13)

Groupe HI2H+3L : HIN à P7 + 2 h d'hypothermie, débutant 3,5 h post-ligature et 3 injections de lactate par voie i.p. (à la sortie de l'hypothermie (P7), puis P8 et P9) (n = 12).

2. Imagerie par Résonance Magnétique (IRM)

L'IRM est une technique diagnostique de radiologie médicale, non-invasive qui produit des images anatomiques, paramétriques ou fonctionnelles. Elle permet la détection des lésions cérébrales et le suivi de l'efficacité des traitements. Elle est un outil de référence depuis des années pour le diagnostic de l'HIN.

2.1. Historique et principe de l'IRM

L'IRM est apparue au début des années 1970. En 1973, Lauterbur a rapporté la première reconstruction d'une carte de densité de spin de protons à partir du phénomène de résonance magnétique nucléaire (RMN) (Lauterbur, 1973). La même année, Mansfield et Grannell ont indépendamment démontré la relation de Fourier entre la densité de spin et le signal RMN acquis en présence d'un gradient de champ magnétique (Mansfield & Grannell, 1973). Suite à ces premières études, l'IRM s'est rapidement développée pour devenir une modalité d'imagerie incontournable, permettant de générer des images de tissus vivants de manière non invasive et non destructive (Edelstein et al., 1980; Mansfield, 1977).

L'IRM repose sur le principe de la RMN. Elle est fondée sur des propriétés magnétiques de certains atomes, comme par exemple les atomes d'hydrogènes de l'eau. L'eau constitue environ 70 % du corps humain et le proton (H^+) est naturellement abondant. Le noyau de l'atome d'hydrogène est composé d'un unique proton (chargé positivement) et possède un moment magnétique, dit de spin. La rotation de cette charge positive sur elle-même induit une aimantation ; les H^+ peuvent ainsi être considérés comme des petits aimants microscopiques. Une expérience de RMN comprend trois étapes successives : la polarisation, la résonance et la relaxation. Durant la première phase de polarisation, les tissus du corps humain sont soumis à une induction magnétique intense (B_0) durant laquelle tous les protons qu'ils contiennent (initialement orientés de manière aléatoire dans toutes les directions de l'espace) se figent dans deux orientations privilégiées : une orientation parallèle dans la direction et dans le sens de B_0 (pour un tout petit peu plus de la moitié) ou antiparallèle dans la direction et dans le sens opposé à l'induction B_0 . Ces deux états de l'aimantation correspondent à deux niveaux d'énergie distincts. Cette polarisation est donc accompagnée par une quantification réduite des orientations possibles. La résultante de la somme des vecteurs d'aimantations microscopiques est alors une aimantation macroscopique de très faible amplitude car il n'existe qu'un très faible excès de vecteurs dans la direction et dans le sens de B_0 . Par ailleurs, chaque proton subit un mouvement de précession dont la fréquence dépend de l'intensité de l'induction magnétique appliquée : si B_0 augmente, la fréquence de précession augmente, et vice-versa. La vitesse de cette fréquence est calculée par la formule suivante : $\omega = \gamma \cdot B_0$, où ω est la vitesse angulaire et γ est le rapport gyromagnétique. Pendant la seconde phase de résonance, les protons sont excités par une onde électromagnétique se situant dans la zone des radiofréquences du spectre électromagnétique (RF, B_1). Pour satisfaire les conditions de résonance, l'onde RF (radiofréquence) doit respecter deux conditions : la direction de propagation doit être perpendiculaire à B_0 (condition géométrique) et à une fréquence rigoureusement égale à la fréquence de précession des protons dans l'induction magnétique (condition énergétique). Le vecteur d'aimantation créée par la polarisation adopte alors un mouvement de rotation autour de la direction de propagation de l'onde. Il peut faire un quart de tour (impulsion de 90°), ou un demi-tour (impulsion de 180°). Lorsque l'onde RF est interrompue, les protons retournent à leur état d'équilibre et le système entre alors dans la troisième étape, dite de relaxation. L'aimantation longitudinale dans la direction de B_0 est restaurée et l'aimantation transversale dans le plan perpendiculaire au champ B_0 disparaît. Ces deux transformations sont réalisées par des mécanismes différents et avec des constantes de temps qui dépendent de l'état de

l'eau dans les tissus observés. De plus, la rotation du vecteur aimantation transversale devant une bobine induit la circulation d'un courant électrique de très faible intensité dans ce capteur. Ce courant est le signal de résonance magnétique. Après sa localisation spatiale grâce à un système de gradients et un post-traitement, cette acquisition donne une image dépendante de la densité du tissu en protons ou des caractéristiques des protons dans différents tissus, les temps de relaxation.

En effet, les tissus sont caractérisés par deux temps de relaxation différents : **T1** et **T2**. Le temps de relaxation longitudinale T1 est la constante de temps (exprimée en ms) qui détermine la vitesse à laquelle les protons excités reviennent à l'état d'équilibre et suit une courbe exponentielle croissante dans l'axe de B_0 . Le temps de relaxation transversale T2 est la constante de temps (exprimée en ms) qui détermine la vitesse à laquelle les protons excités atteignent l'équilibre ou se déphasent les uns par rapport aux autres et suit une courbe exponentielle décroissante. Ces deux temps dépendent de la nature des tissus. C'est à partir de ce différentiel que l'on peut obtenir deux images de contraste différent des différents tissus. Ces images sont appelées images pondérées T1 et T2.

⇒ Visualisation des phénomènes décrits : <https://www.youtube.com/watch?v=jLnuPKhKXVM>

L'IRM a connu de nombreux développements et un progrès important au cours des années, elle est donc devenue une technique puissante dans le domaine de l'imagerie médicale grâce à ses différentes séquences permettant non seulement de faire de l'imagerie anatomique, mais également de l'imagerie paramétrique. Dans le cadre de ce projet, nous avons principalement utilisé l'imagerie de diffusion qui est une imagerie paramétrique (chaque pixel reflète une valeur de vitesse de diffusion de l'eau en mm^2/s). Elle apporte des informations complémentaires et quantitatives par rapport aux séquences d'imagerie anatomique et permet en particulier de visualiser l'œdème qui se forme très rapidement (quelques min) après un accident d'hypoxie ischémie néonatal.

2.2. L'imagerie de diffusion

L'imagerie de diffusion est une technique d'IRM qui étudie la manière dont les molécules d'eau extracellulaires diffusent au sein d'un tissu. Dans un liquide, comme le liquide céphalorachidien (LCR) par exemple, la diffusion de ces molécules est libre et identique dans toutes les directions de l'espace, on appelle cette situation : **diffusion isotrope**. A l'opposé, cette diffusion peut être restreinte lorsqu'elle s'effectue de façon préférentielle dans une direction donnée, ce qui est le cas pour des molécules d'eau situées dans ou à proximité des axones. On observe alors ce qu'on appelle **une diffusion anisotrope [Figure 21]**. Pour mieux comprendre ce phénomène d'anisotropie on peut imaginer des spaghettis dans une casserole d'eau. Les molécules d'eau à proximité des spaghettis sont contraintes de suivre les longues formes des pattes, se déplaçant **le long de ces longues pâtes**, mais pas à travers elles (ou alors beaucoup moins vite !). Les spaghettis agissent ici comme des fibres nerveuses, guidant le déplacement des molécules d'eau principalement dans une direction. C'est l'anisotropie, où la diffusion est dirigée et limitée par la structure environnante.

L'IRM de diffusion est obtenue par une séquence SE-EPI (Echo-Planar Imaging) en écho de spin, où deux gradients de diffusion (un gradient de déphasage et un gradient de rephasage) de même amplitude et de même durée sont appliqués de part et d'autre d'une impulsion RF à 180 degrés qui caractérise l'écho de spin. Le facteur de pondération en diffusion b exprimé en s/mm^2 est la résultante de l'intensité et la durée de ces gradients (le facteur de diffusion b a été fixé à $1000 \text{ s}/\text{mm}^2$ dans notre étude) (Le Bihan & Breton, 1985). L'application du premier gradient va modifier le signal des spins de l'eau extracellulaire pendant la durée de son application. Après leur basculement à 180° par l'impulsion

RF, si les molécules d'eau n'ont pas bougé, elles vont donc subir le second gradient, identique au premier, et revenir à leur point initial. Il n'y aura donc pas de perte de signal [Figure 22]. Par contre, si les molécules d'eau bougent pendant l'application de gradient ou durant le temps séparant les deux gradients, les phases des protons mobiles et stationnaires sont différentes. L'application du second gradient après le 180° ne permet pas de rephaser le déphasage induit par l'application du premier gradient. On observe alors une diminution du signal des protons mobiles. Ainsi, plus les molécules d'eau diffusent rapidement, plus le signal sera atténué, apparaissant ainsi en **hyposignal** (en noir) ; c'est le cas du LCR où les mouvements des molécules d'eau sont importants et rapides. À l'inverse, lors d'une ischémie, la pompe sodium-potassium s'arrête et le sodium s'accumule dans le milieu intracellulaire. Afin de rétablir l'équilibre osmotique, on observe une entrée d'eau dans la cellule qui va se gonfler, c'est l'œdème cérébral. L'espace extracellulaire se trouve réduit, limitant ainsi la mobilité des molécules d'eau. L'intensité de signal des tissus contenant ces molécules à mobilité restreinte sera alors moins diminuée par la séquence d'IRM de diffusion, et l'œdème cérébral apparaîtra donc en **hypersignal**.

⇒ En résumé, l'IRM de diffusion permet d'appréhender les mouvements microscopiques des molécules d'eau extracellulaire dans les tissus biologiques. Cette mesure est exprimée à travers un paramètre quantitatif appelé le coefficient de diffusion apparent (CDA ou ADC en anglais) donc l'échelle est en mm²/s.

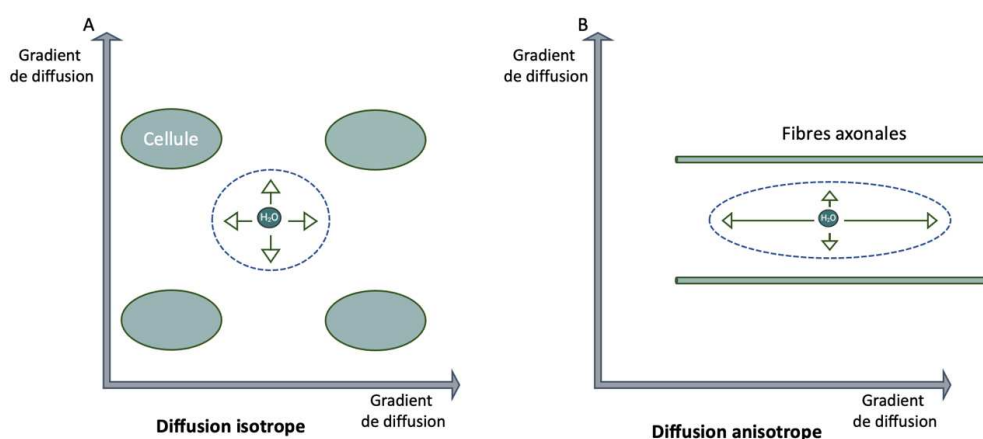


Figure 21 : Diffusions isotrope et anisotrope Diffusions isotrope et anisotrope. La diffusion moléculaire est isotrope lorsqu'elle est identique dans toutes les directions de l'espace, ce qui est le cas, par exemple, de l'eau dans le LCR (A). En revanche, pour la substance blanche, la diffusion des molécules d'eau est facilitée le long des fibres axonales mais fortement réduite perpendiculairement aux fibres : on dit que la diffusion moléculaire est anisotrope (B). Adaptée du manuel « Comprendre l'IRM » (Vetter et al., 2018).

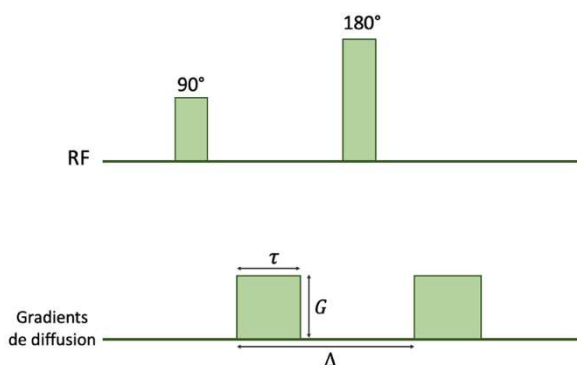


Figure 22 : Séquence d'IRM de diffusion.

Les gradients de diffusion sont appliqués de part et d'autre de l'impulsion RF de 180° dans une séquence de type EPI-SE. Avec $b = (\gamma G \tau)^2 \cdot (\Delta - \tau/3)$, où γ = rapport gyromagnétique du proton (constante), G = amplitude du gradient, τ = durée d'application du gradient, et Δ = temps séparant l'application des deux gradients de diffusion. Adaptée du manuel « comprendre l'IRM » (Vetter et al., 2018).

2.2.1 Coefficient de Diffusion Apparent (ADC)

L'ADC est un paramètre mesurable en imagerie de diffusion qui permet de mesurer la vitesse de diffusion des molécules d'eau extracellulaires dans un tissu biologique. L'ADC s'exprime en mm^2/s (unité opposée à celle de b). Après une lésion cérébrale aiguë provoquant un œdème cytotoxique (comme après un accident d'HIN) le mouvement des molécules d'eau extracellulaire est réduit car les cellules gonflent : plus l'œdème est sévère, plus les cellules sont gonflées, plus le milieu extracellulaire est restreint et plus les molécules d'eau extracellulaires ont une faible vitesse de déplacement. Cela entraîne alors une diminution de la valeur de l'ADC. Dans notre étude, l'ADC a été mesuré au niveau du cortex, de l'hippocampe et du striatum [Figure 23] (côtés ipsilatéral et controlatéral) et nous a permis d'évaluer la sévérité de l'œdème cytotoxique.

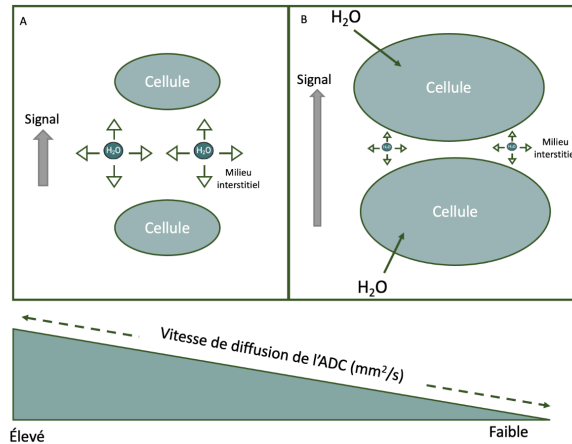


Figure 23 : Modification de la vitesse de diffusion des molécules d'eau dans l'ischémie cérébrale aiguë. (A) Milieu sans obstacle : les molécules d'eau circulent dans l'espace interstitiel (ADC élevé). (B) Après une ischémie, la diffusion des molécules d'eau est restreinte en raison de l'augmentation de volumes des cellules, entraînant une réduction de l'espace extracellulaire (ADC réduit). Adaptée du manuel « **Comprendre l'IRM** » (Vetter et al., 2018). La lésion apparaîtra alors soit en hyposignal sur les cartes d'ADC, soit en hypersignal sur l'IRM de diffusion (image dite « de trace »), le signal des molécules d'eau de mobilité restreinte ayant été moins atténué par les gradients de diffusion. Pour la quantification, des images de « traces inversées » sont souvent utilisées car la délimitation des lésions en est facilitée [Figure 24].

2.2.2. Données IRM/ volumes lésionnels

Afin de réaliser un suivi des volumes lésionnels, des acquisitions IRM ont été réalisées 2,5 h après la ligature de l'artère carotide commune (volumes lésionnels à P7), 48 h (P9) et 23 j (P30) post-HIN, grâce à un aimant 4,7 T Biospec 47/50 (Bruker Biospec, Allemagne). Pour les deux premiers temps, les images ont été acquises à l'aide d'une antenne volumique de souris (P7 et P9) alors qu'une antenne surfacique dédiée à l'imagerie de la tête de rat adulte a été utilisée pour le temps P30, car ces rats étaient trop volumineux pour loger dans l'antenne volumique de souris. Les rats, anesthésiés sous isoflurane (4 % pour l'induction et 1,5 % pour le maintien), ont été placés dans l'aimant sur un lit chauffant en résine conçu au laboratoire à l'aide d'une imprimante 3D [Figure 18] et relié à un bain-marie préalablement allumé pour stabiliser la température du lit. Cela nous a permis de maintenir leur température rectale entre 35 et 36 °C pendant l'IRM, tandis que leur respiration était surveillée par un capteur ventral. Chaque acquisition IRM était composée (1) d'une séquence rapide permettant de valider le positionnement de l'animal dans l'IRM, (2) d'une IRM anatomique (séquence pondérée en T2) permettant la visualisation des différentes structures cérébrales d'intérêt : cortex, hippocampe et striatum et (3) d'une IRM de diffusion (**DTI : Diffusion Tensor Imaging**). Elle est systématiquement démarrée 3 h après la ligature de la carotide. Le détail des 2 dernières séquences est donné ci-après :

- **T2 turbo RARE** : IRM anatomique (pondérée T2) TE/TR 50/3000 ms, 20 coupes jointives de 0,7 mm d'épaisseur, facteur rare 8, FOV 2,5 x 2,5 cm, matrice 128 x128 correspondant à un temps d'acquisition total de 4 min 48 s.

- **DTI_EPI_seg 30 directions** : IRM paramétrique de diffusion TE/TR 24/2000 ms, 20 coupes jointives de 0,7 mm d'épaisseur, 30 directions, matrice 128 x 128, FOV 18 x 18 cm, $b = 1000 \text{ s/mm}^2$, $\Delta=8,11 \text{ ms}$ et $\delta= 2,5 \text{ ms}$ correspondant à un temps d'acquisition total de 17 min 04 s.

La quantification des volumes lésionnels ainsi que les valeurs d'ADC ont été mesurées en utilisant le logiciel **Paravision 6.0.1**. Pour chaque raton, 20 coupes jointives de 0,7 mm d'épaisseur ont permis d'imager l'ensemble du cerveau. Sur chacune des coupes, on a procédé manuellement à la délimitation 1- de la lésion et 2- de la surface totale du cerveau [Figure 24]. On a ainsi pu déterminer le volume total de la zone lésée ainsi que celui du cerveau. Le volume lésionnel cérébral a finalement été exprimé en pourcentage de lésion par rapport au volume total du cerveau pour chacun des ratons. L'ADC a été mesuré à P7 dans les trois principales structures lésées dans notre modèle : le cortex, l'hippocampe et le striatum (voir [Figure 25]). Il a été rapporté dans la littérature que ces trois structures sont affectées après une lésion d'HIN (Brègère et al., 2022; Ten et al., 2003).

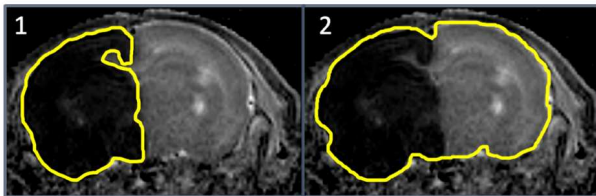


Figure 24 : Représentation des régions d'intérêts (ROI) pour la quantification des lésions. Exemple d'un raton ayant eu un HI néonatale à P7 : (1) ROI de la lésion et (2) ROI du cerveau. Cette délimitation a été faite manuellement sur chacune des 20 coupes. Chaque coupe, jointive, est d'une épaisseur de 0,7 mm et permet de calculer le volume lésionnel (%).

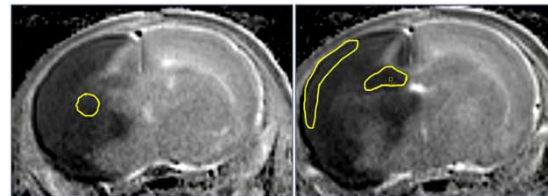


Figure 25 : Représentation des ROIs pour l'acquisition des valeurs d'ADC. Illustration des deux coupes et des ROIs associés aux structures analysées : à gauche, ROI pour les valeurs d'ADC du striatum, et à droite, ROIs pour les valeurs d'ADC de l'hippocampe et du cortex.

2.2.3. Angiographie

En l'absence de lésion cérébrale, une autre séquence d'IRM a été utilisée afin de valider la présence de la ligature et donc de valider l'inclusion des ratons dans l'étude. La séquence TOF-3D-FLASH est une séquence d'angiographie qui permet de visualiser en hypersignal les vaisseaux sanguins en 3D, avec les caractéristiques suivantes : TE/TR 2,2/13 ms, angle de bascule : 15°, FOV 20 x 15 x 20, matrice 256 x 256 x 80, averages 3, épaisseur de la coupe 20 mm, correspondant à un temps d'acquisition total de 10 min 59 s. L'imagerie par résonance magnétique (IRM) angiographique repose sur la détection du signal des protons dans le sang en mouvement, notamment du flux sanguin non saturé. En effet, cette séquence IRM va saturer le signal des protons dans l'ensemble du volume cérébral, entraînant une diminution ou absence de signal dans les tissus environnants. En revanche, les protons circulant dans le sang, qui pénètrent dans la coupe sans avoir subi les impulsions de saturation, conservent une magnétisation longitudinale maximale, permettant de visualiser les gros vaisseaux en hypersignal par rapport aux tissus environnants. [Figure 26].

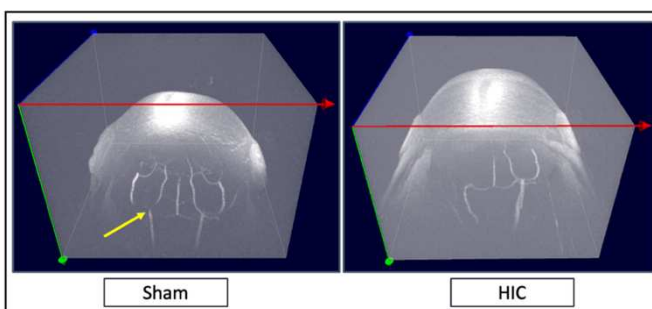


Figure 26 : AngioIRM. Exemple d'un raton HIC (ayant eu un HI néonatale à P7) montrant un arrêt de la circulation sanguine après la ligature de l'artère carotide commune gauche. La flèche jaune correspond à l'artère carotide commune gauche (emplacement de la ligature de la carotide) toujours visible chez le raton non ligaturé (Sham).

3. Tests de comportements

Dans le cadre de ce projet, nous avons exploité le caractère non invasif de l'IRM pour assurer un suivi longitudinal des animaux, non seulement par imagerie, mais aussi à travers divers tests comportementaux afin d'évaluer les capacités motrices et cognitives des rats. Cela nous a permis de comparer les effets neuroprotecteurs de la combinaison des injections de lactate et d'HT par rapport à l'HT seule ou aux injections de lactate seules. Cela nous a également permis de vérifier s'il existait une correspondance entre les structures lésées observées à l'IRM et les résultats de certains tests.

3.1. Réflexes précoces (P8, P10, P12)

L'évaluation des réflexes précoces est considérée comme un indicateur fiable du développement postnatal, ce qui permet de faire une comparaison entre les différents groupes. Le cortex et le striatum sont impliqués dans le contrôle de la motricité ce qui justifie l'utilisation du test des réflexes précoces pour détecter d'éventuelles altérations motrices suite aux lésions de ces structures. De plus, ces deux régions sont principalement touchées lors du modèle d'HI de type Rice-Vannucci (Lubics et al., 2005). Trois tests ont permis de caractériser les déficits de motricité des rats : le test du redressement, la géotaxis négative et la locomotion. Ces tests ont été réalisés à P8, P10 et P12.

3.1.1. Test de redressement

Le test de redressement a permis d'évaluer essentiellement les atteintes corticales ; Dumont et al., 2021). Lors de ce test, le temps nécessaire aux rats, placés sur le dos, pour se retourner sur leurs quatre pattes a été mesuré à l'aide d'un chronomètre. Pour chaque rat, la valeur retenue correspondait à la moyenne de trois essais.

3.1.2. Test de géotaxie négative

Les rats ont été placés tête en bas sur une planche inclinée à 45° mesurant 30 cm. Leurs membres postérieurs ont été positionnés au centre de la planche. Le temps pour se retourner et grimper jusqu'à ce que leurs membres antérieurs atteignent le bord supérieur a été mesuré (temps maximum du test : 60 secondes). L'exercice a été réalisé une fois.

3.1.3. Test de la locomotion

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

3.2. Modified Neurological Severity Score (P24)

À P24, le modified Neurological Severity Score (mNSS) a permis d'évaluer les déficits neurologiques des rats sur le plan cortical et striatal, à travers 4 types de tests : moteurs, sensoriels, réflexes et d'équilibre. Dans le test moteur, les rats ont été suspendus par la queue pour pouvoir évaluer la réponse motrice (flexion des pattes avant et arrière controlatérale, mouvement de la tête par rapport à un axe vertical). Le test sensoriel a été évalué grâce au

test de placement (stimulation des vibrisses controlatérales du rat par approche à une surface solide) ; et au test proprioceptif (application d'une pression du côté controlatéral des pattes avant sur la surface d'une table). Les réflexes de l'animal ont été évalués au moyen d'un coton tige approché au niveau de l'œil et de l'oreille. Le sursaut de l'animal a été évalué par le claquement de main. Enfin, le test d'équilibre a été mesuré à l'aide d'une poutre chez les rats. Dans ce test, des points ont été attribués à chaque fois que l'animal échouait pour la tâche demandée. Tous les animaux ont été évalués à l'aide de l'échelle de scorage (0 = pas de handicap ; 1-6 = handicap moyen ; 7-12 = handicap modéré ; 13-18 = handicap sévère). Ainsi, plus le score était élevé, plus les fonctions sensori-motrices étaient altérées (**Tableau 2**) (Chen et al., 2001; Yu et al., 2019).

Tests moteurs	
Rat suspendu la queue (/6)	Points marqués
Réponse normale, suspension équilibré	0
Pas de flexion patte avant controlatérale	1
Pas de flexion patte arrière controlatérale	2
Déplacement de la tête > 10° par rapport à l'axe verticale en 30 secondes	3
Rat par terre	
Réponse normale, marche droit	0
Incapacité à marcher droit	1
Déficit moteur ipsilatéral ou déplacement en cercle	2
Paralysie du côté ipsilatéral	3
Tests sensoriels	
Test de visuel et tactile :	Points marqués
Rat à côté du bord de la table avec les vibrisses controlatérales touchant le bord (/2)	
Réponse normale, patte avant sur la table	0
Aucun placement de la patte avant sur la table	1
Test de proprioceptif :	
Sensation profonde , pousser les pattes contre le bord de la table pour stimuler les muscles	
Réponse normale, résistance à la pression	0
Pas de résistance	1
Équilibre sur la poutre	
Rat placé sur une poutre de 100 cm de large pendant 60 secondes (/6)	Points marqués
Réponse normale, posture équilibrée	0
Saisit le côté de la poutre	1
Étreint la poutre et 1 membre tombe	2
Étreint la poutre et 2 membres tombent	3
Tente de tenir l'équilibre mais chute > 40,59 secondes	4
Tente de tenir l'équilibre mais chute < 20,39 secondes	5
Aucune tentative d'équilibre : chute < 20 secondes	6
Réflexes absents et mouvement anormaux	
Réflexes du pavillon de l'oreille : coton-tige dans le canal auditif (/4)	Points marqués
Réponse normale, secouage de la tête	0
Pas de réflexe	1
Réflexes cornéens : coton-tige sur la cornée	
Réponse normale, fermeture des yeux	0
Pas de réflexe	1
Claquement de mains	
Réponse normale: reflexe de sursaut	0
Pas de réflexe	1
Observation quotidienne de 5 minutes	
Réponse normale : aucun comportement moteur inhabituel	0
convulsion,myoclonie, myodytonie	1

Tableau 2 : Test du mNSS. Récapitulatif des différents tests du mNSS avec les points marqués en fonction de réponse de l'animal.

3.3. Test du labyrinthe en croix (P38)

Le test du labyrinthe en croix surélevé a été décrit pour la première fois en 1985 dans l'étude de Pellow pour évaluer les états anxieux des rongeurs (Pellow et al., 1985). Il a permis de tester l'aversion naturelle des rats pour l'exploration des espaces ouverts. L'état fonctionnel du striatum (structure impliquée dans les comportements aversifs) et de l'amygdale (structure contenant les réseaux neuronaux impliqués dans la mémoire émotionnelle) a pu être mesuré. Le labyrinthe est disposé à 100 cm du sol et est composé de 2 bras ouverts et de 2 bras fermés. L'ensemble de la structure est de couleur noire. L'animal est placé au centre de la croix et libre de ses mouvements. Durant l'exploration, plusieurs paramètres ont été mesurés : temps passé en activité (i) dans le bras ouvert, (ii) dans le bras fermé, (iii) au centre, (iv) nombre d'entrées dans les bras ouverts et fermés. Dans ce test, plus le rat passe de temps dans les bras ouverts, moins il présente un état anxieux. Le test est réalisé à P38 et dure 5 min.

3.4. Test de reconnaissance du nouvel objet (P42-P45)

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

Dans le cadre de notre étude, le test de reconnaissance du nouvel objet était représentatif de la mémoire à long terme des rats directement reliée sur le plan anatomique à l'hippocampe, puisque le temps de rappel était de 24 h. Le test a été réalisé sur des rats adultes à P45 et a duré 4 j. Le 1^{er} jour, à P42, les rats ont été placés dans un openfield blanc sans aucun objet, pour s'habituer à l'environnement. Les deux jours suivants (P43 et P44), deux objets identiques ont été placés dans 2 coins de l'openfield (temps d'exploration 5 min). Le 4^{ème} jour, un des anciens objets a été remplacé par un nouveau. Une caméra, placée au-dessus de l'enceinte, a permis de mesurer le temps passé sur chaque objet et calculer l'indice de discrimination comme suit :

$$\frac{(\text{Temps passés avec le nouvel objet}) - (\text{Temps passés avec l'objet familier})}{(\text{Temps total d'exploration})}$$

(Temps total d'exploration)

Le rat ayant étant curieux de nature, s'il se souviens du 1^{er} objet, il passera plus de temps à explorer le nouvel objet. Ainsi, plus cet indice est bas, plus la mémoire à long terme des rats est affectée, suggérant une altération de l'hippocampe.

3.5. Test de restriction alimentaire (P51)

Lors de l'HIN, diverses structures cérébrales peuvent être lésées. Le test de la restriction alimentaire a permis d'évaluer la fonctionnalité du striatum (structure impliquée dans le comportement motivé via la libération de dopamine) et du cortex (structure impliquée dans la perception sensorielle). Ce test a pour but d'évaluer la dépression/baisse de motivation des rats (Blasco-Serra et al., 2017), car des troubles de l'humeur sont fréquemment observés à l'enfance et l'adolescence après un accident d'HIN (Álvarez-García et al., 2022). Ce test a été réalisé à P51 et a duré 4 j. Durant le 1^{er} et 2^{ème} jour (P48-P49), la ration alimentaire quotidienne a été diminuée de 20 %. Au 3^{ème} jour (P50), elle a été diminuée

de 80 %. Au 4^{ème} jour (P51), des croquettes imbibées d'une solution de sucrose 50 % préalablement préparée (solution favorisant la palatabilité des croquettes A04) ont été mis dans une boîte de pétri. La boîte a été placée sur un cercle blanc au centre d'un openfield aux murs et sol noirs. Les rats ont été individuellement placés dans l'openfield et ont pu explorer librement leur environnement durant une période maximale de 10 min. Plusieurs paramètres ont été mesurés : (i) le nombre de fois où le rat s'est positionné sur les pattes arrière sans toucher les bords, (ii) le nombre de fois où le rat a approché et senti les croquettes sans les manger, (iii) l'absence ou la présence de bruxisme (signe de l'anxiété), (iv) le temps pour manger les croquettes. Le test est arrêté dès que le rat a mangé une croquette. Ainsi, plus l'état dépressif de l'animal était prononcé, plus le temps nécessaire pour consommer les croquettes imbibées de saccharose augmentait.

4. Prélèvements des cerveaux

Les cerveaux de certains rats ont été prélevés à P9 pour réaliser des colorations pour l'histologie et de l'immunohistochimie. Ces analyses ont permis de mettre en évidence ou d'envisager l'implication de certains mécanismes dans les différentes stratégies de neuroprotection étudiées.

4.1. Histologie

Après anesthésie gazeuse à l'isoflurane (4 %, 5 min), les rats ont reçu une injection en i.p. d'un mélange de Kétamine (Imalgene à 100 mg/kg) / Xylazine (Paxman à 20 mg/kg) afin de réaliser une sédation profonde, couplée à une analgésie. Les rats ont été positionnés sur le dos. Une incision en boutonnière a été réalisée au niveau de la peau et l'abdomen a été ouvert. Le diaphragme a été perforé afin de visualiser le cœur. Le cœur doit continuer de battre afin d'assurer une bonne perfusion. Un cathéter a été placé dans le ventricule gauche et l'oreillette droite a été perforée pour permettre au perfusat de s'écouler. Une **solution de tampon phosphate salin** a été perfusée (PBS 1X, 18ml/h, 10 min) à l'aide d'une pompe péristaltique. Une bonne perfusion induit un jaunissement du foie et un blanchissement des poumons. Le cerveau a ensuite été fixé grâce à la perfusion d'une **solution de paraformaldéhyde** (PFA 4 %, 18 ml/h, 10 min). Le PFA crée des liaisons covalentes entre les protéines ce qui entraîne la fixation du tissu, permettant une conservation de la localisation des protéines et stoppant également le métabolisme. Les cerveaux ont ensuite été extraits et incubés sur la nuit dans du PFA, (4 %, à 4 °C) puis dans une solution de sucrose 20 % pendant 48 à 72 h pour protéger l'intégrité des structures lors de la congélation. Les cerveaux ont ensuite été congelés dans les vapeurs d'azote, enveloppés avec de l'aluminium et conservés à -80 °C.

4.2. Coloration au crésyl violet

À P9, les cerveaux des rats (n = 3 par condition) ont été prélevés après une perfusion trans-cardiaque (PBS suivi de PFA 4 %) et cryocongelés. Des coupes de 16 µm ont été réalisées au cryostat et ont été trempées dans un bain de 100 %, 95 % et 70 % d'éthanol pendant 2 min chacun et rincées avec de l'eau distillée. Les coupes ont ensuite été colorées avec une solution 0,5 % de crésyl violet (Sigma-Aldrich, France) pendant 10 min puis rincées avec de l'eau distillée. Les coupes ont ensuite été déshydratées dans 70, 95 et 100 % d'éthanol pendant 2 min et dégraissées par un bain de xylène pendant 5 min. Les lames ont été montées avec un milieu de montage (mounting medium, Sigma-Aldrich, Allemagne). Les coupes ont finalement été observées avec un microscope optique Leica microsystem au niveau des structures du cortex, du striatum et de l'hippocampe [Figure 27]. Des images à un grossissement 20 X (taille du champ 50 µm) ont permis un comptage manuel des noyaux et donc du nombre de cellules.

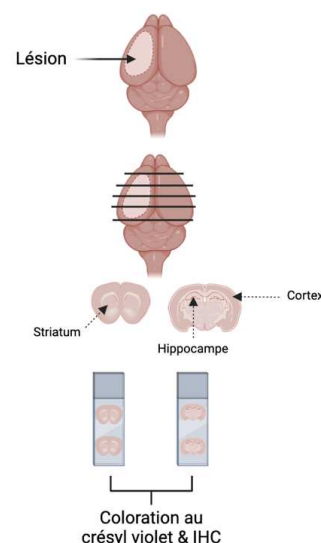


Figure 27 : Schéma des coupes.

La coloration au crésyl violet, également appelée coloration de Nissl, permet de visualiser spécifiquement les corps cellulaires des neurones en marquant l'ARN présent dans le cytoplasme et le nucléole, facilitant ainsi l'observation des structures neuronales. Elle est fréquemment employée pour identifier les zones de lésions cérébrales, où les neurones altérés ou morts montrent une affinité réduite pour le colorant, servant ainsi d'indicateur de mort cellulaire (Cui et al., 2012; Hadass et al., 2013).

4.3. Immunohistochimie (IHC)

La technique d'immunohistochimie repose sur l'utilisation d'anticorps ciblant des déterminants antigéniques, encore appelés épitopes, propres à une protéine d'intérêt. Ces anticorps sont combinés à un procédé enzymatique permettant de révéler leur présence par une coloration visible au microscope. Un anticorps est une immunoglobuline que l'organisme produit en réponse à la détection d'une molécule étrangère. Les immunoglobulines ont un domaine constant et un domaine variable, ce dernier étant responsable de la spécificité de l'anticorps pour un épitope. Les anticorps peuvent être monoclonaux ou polyclonaux. Un anticorps monoclonal ne reconnaît qu'un seul épitope d'un antigène, ce qui le rend très spécifique, mais peu sensible. En revanche, un anticorps polyclonal reconnaît plusieurs épitopes d'un même antigène, ce qui le rend plus sensible, mais moins spécifique.

Lors de la réalisation de cette technique, les coupes de cerveaux à analyser doivent préalablement subir différents traitements permettant de rendre les épitopes accessibles. Les étapes sont détaillées de la manière suivante : Après décongélation pendant 15 min à température ambiante, les coupes ont été lavées avec du PBS 1X 6 fois pendant 30 min puis saturées dans un tampon de PBS 1X, 3 % SAB w/v, 0,3 % v/v Triton™ X-100 pendant 1 h 30 min à température ambiante. Les anticorps primaires dilués dans le tampon de saturation (PBS 1X, 3 % SAB w/v, 0,3 % v/v Triton™ X-100) ont été déposés sur les coupes et incubés à 4°C durant une nuit (**Tableau 3**). Les anticorps anti-CD86, anti-CD206 et anti-Caspase 3 ont été détectés à l'aide de l'anticorps secondaire (Donkey anti-rabbit IgG H&L (Alexa Fluor 568) (**Tableau 4**), tandis que l'anticorps anti-IBA1 a été identifié avec l'anticorps secondaire (Donkey Anti-Goat IgG H&L (Alexa Fluor 488) (**Tableau 4**). Les coupes ont ensuite été rincées 6 fois pendant 30 min avec une solution du PBS 1X. Les anticorps secondaires ont été dilués au 1/500 dans le tampon de saturation (**Tableau 4**), déposés sur les coupes, incubés pendant 1 h à température ambiante et protégés de la lumière. Les coupes ont ensuite été lavées 6 fois pendant 30 min avec du PBS 1X puis, ont été fixées sur des lames avec un milieu de montage Vectashield (vector laboratories Inc, Burlingame, CA 94010), milieu contenant le fluorophore DAPI (4',6- diamidino-2-phénylindole) colorant les noyaux. Les coupes ont été stockées à l'abri de la lumière avant d'être observées au microscope à fluorescence (Nikon Eclipse 90i), à un grossissement 20 X et 40 X.

L'acquisition d'images des coupes cérébrales a été réalisée avec le logiciel NIS Element 4.30. Le traitement des images a été réalisé avec le logiciel ImageJ. Dans un premier temps, deux images de fluorescence ont été obtenues, l'une dans le canal de fluorescence du DAPI et l'autre dans le canal de fluorescence de la Cyanine 3, un fluorophore couramment utilisé en biologie pour le marquage fluorescent, avec une longueur d'onde d'excitation approximative de 550 nm et une émission centrée autour de 570 nm. Une quantification de l'intensité de fluorescence des marqueurs a été réalisée sur 3 coupes du côté lésé et les valeurs moyennes ont été calculées par condition à l'aide d'ImageJ.

Hôte / Anticorps primaires	Fabricant	Identification du type cellulaire	Type d'anticorps	Dilution
Chèvre/Anti-IBA1 (Goat anti-Ionized Calcium-binding Adapter molecule 1)	Abcam	Microglie	Monoclonal	1/1000
Lapin /Anti-CD86	Proteintech	M1 microglie	Polyclonal	1/4000
Lapin/ Anti-Mannose receptor (CD206)	Abcam	M2 microglie	Polyclonal	1/10000
Lapin/ Anti-Caspase 3	Abcam	Apoptose	Polyclonal	1/500

Tableau 3 : Liste des différents anticorps primaires utilisés dans notre étude.

Hôte / Anticorps secondaires	Fabricant/ Référence	Dilution pour IHC	Dilution pour culture primaire	Longueur d'onde
Donkey Anti-Goat IgG H&L (Alexa Fluor 488)	Abcam/ ab150129	1/500	1/500	Excitation : 488 nm Émission : 519 nm
Donkey anti-rabbit IgG H&L (Alexa Fluor 568)	Abcam / ab175470	1/500	1/250	Excitation : 578 nm Émission : 603 nm

Tableau 4 : Liste des différents anticorps secondaires utilisés dans notre étude.

5. Western blot

Dans cette étude, la technique de Western blot (WB) a été employée pour analyser l'expression de certaines protéines, dans le but de mieux comprendre les mécanismes neuroprotecteurs de l'administration de lactate après une HIN. Ces analyses ont été réalisées par une plateforme et les différents anticorps utilisés sont répertoriés dans le **tableau 5**.

5.1. Extraction protéique

Les échantillons ont été lysés dans une solution de RIPA (D4641 Sigma-Aldrich). Les lysats ont été soniqués et centrifugés à 300 g pendant 10 min pour isoler les protéines solubles dans le surnageant. Les échantillons ont été conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

5.2. Dosage protéique

La quantification des protéines a été réalisée selon la méthode BCA « Bicinchoninic Acid kit for Protein Determination » (A53225 – Thermo Fisher Scientific). Ce kit colorimétrique de haute sensibilité permet de mesurer une large gamme de concentrations protéiques (20 à 2000 µg/ml). En milieu basique, les ions cuivriques (Cu²⁺) sont réduits en présence de liaisons peptidiques, générant des ions cuivre monovalents (Cu⁺). Ces ions Cu⁺ se complexent ensuite avec le réactif BCA (acide bicinchoninique), formant une coloration violette dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en protéines. Cette coloration est mesurée par spectrophotométrie à 562 nm, puis comparée à une courbe étalon obtenue avec une protéine de référence, telle que la BSA (albumine sérique bovine), afin de déterminer la concentration en protéines dans les échantillons.

5.3. Les différentes étapes du WB [Figure 28]

5.3.1. Migration protéique

Après la décongélation des extraits protéiques, les échantillons (20 µg de protéines totales) ont été mélangés à un tampon Laemmli (Biorad 1610747) contenant 5 % de β-mercaptoéthanol et exposés à une température de 65°C pendant 5 min pour assurer la dénaturation. Ensuite, les extraits protéiques ont été déposés dans des gels pré-coulés TGX Stain-Free contenant du polyacrylamide dans une plage de 4 à 16% (Biorad 4568086), et un tampon d'électrophorèse contenant du Tampon Tris-Glycine et du sodium dodécyl sulfate (2,5 mM de Tris/19,2 mM de Glycine / 0,01% de SDS) a été utilisé pour faciliter la migration des protéines. Les gels ont été activés par UV à l'aide d'un système ChemiDoc (Biorad) pour visualiser le contenu total en protéines (Stain-Free, Biorad).

5.3.2. Transfert sur membrane de nitrocellulose

Toutes les expérimentations ont été réalisées en utilisant des membranes de nitrocellulose, via un système de transfert à sec (Trans-Blot® Turbo Transfer System, Bio-Rad). Les protéines, chargées

négativement, migrent vers l'anode (pôle +) et adhèrent ainsi à la membrane. Le transfert des protéines du gel vers la membrane a été effectué pendant 7 min à une tension de 25 V et un courant de 2,5 A.

5.3.3. Incubation des anticorps primaires et secondaires

L'utilisation d'anticorps permet de cibler spécifiquement une protéine d'intérêt. Les membranes ont d'abord été bloquées pendant 1 h dans une solution de PBS 1x avec 0,005 % de Tween 20 et 5 % de BSA, puis incubées pendant 16 h avec des anticorps primaires dilués au 1/1000 dans la même solution. Ensuite, les membranes ont été lavées trois fois avec du PBS 1x contenant 0,05 % de Tween 20, puis incubées pendant 1 h avec un anticorps secondaire dilué au 1/8000 dans du PBS 1x + 0,005 % de Tween 20 + 5 % de BSA.

5.3.4. Révélation des protéines

Après trois lavages avec du PBS 1x + 0,05 % de Tween 20, la détection des protéines a été effectuée par fluorescence à l'aide du système ChemiDoc (Biorad), en utilisant la protéine totale comme contrôle de charge.

5.3.5. Quantification

La quantification a été réalisée avec le logiciel ImageJ, en l'intensité et le nombre de pixels pour chaque bande visible. Ces valeurs ont été exprimées en pourcentage par rapport au groupe Sham.

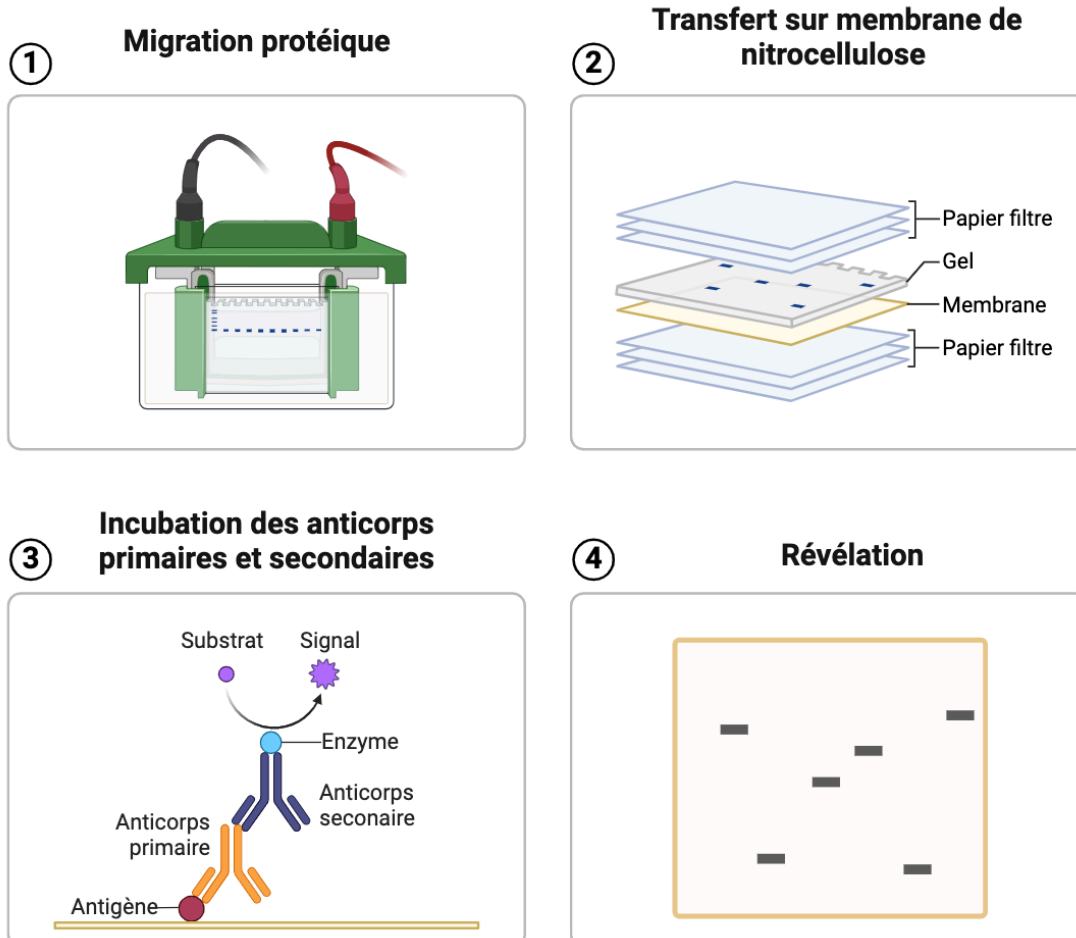


Figure 28 : Schéma récapitulatif des différentes étapes du WB.

Hôte / Anticorps primaires	Fabricant	Type d'anticorps
Lapin/Anti-BDNF	Abcam (ab108319)	Monoclonal
Lapin/Anti-EAAT1	Abcam (ab416)	Polyclonal
Lapin/Anti-G6PDH	Abcam (ab226964)	Polyclonal
Souris/Anti-MCT2	Santa Cruz (sc-166925)	Monoclonal
Souris/Anti-MCT4	Santa Cruz (sc-376140)	Monoclonal
Lapin/Anti-SOD2	Abcam (ab13533)	Polyclonal

Tableau 5 : Liste des anticorps utilisés pour le Western blot.

6. Cultures primaires de cellules microgliales

L'impact du lactate sur la modulation phénotypique microgliale a été évaluée sur des cultures primaires, après activation avec du lipopolysaccharide (LPS) qui est un modèle classique d'inflammation.

6.1. Protocole de culture primaire de cellules microgliales

Les microglies ont été obtenues à partir du cortex des cerveaux de rats Wistar âgés de 1 à 3 jours (P1-P3). Après décapitation, conformément aux lignes directrices sur l'expérimentation animale de la directive du Conseil des Communautés européennes du 24 novembre 1986 (86/609/CEE), les méninges ont été retirés, les deux hémisphères ont été isolés et dispersés mécaniquement avec une pince Dumont, dans le milieu DMEM (Dulbecco's Modified Milieu d'Eagle), (Gibco 15313165, Fischer Scientific). Les tissus corticaux ont été digérés par la trypsine 2,5 % (Fischer scientifique), DNase I (60 µg/mL) (GRADII Sigma Aldrich) pendant 15 min à 37°C. Un milieu DMEM supplémenté de 10 % de SVF, de pénicilline 100 U/mL et de streptomycine 100 µg/mL (Gibco, 15240062, Fischer Scientific) a été ajouté pour stopper la réaction (Vay et al., 2018). Le milieu a été pipeté de haut en bas 30 fois avec une pipette de 5 mL, puis 20 fois avec une pipette de 2 mL. L'homogénat a été centrifugé à 500 g pendant 5 min. La solution a de nouveau été pipetée de haut en bas 20 fois avec une pipette de 1 mL, puis 20 fois avec une pipette de 200 µL. L'homogénat a de nouveau été centrifugé à 500 g pendant 5 min. Le culot a été repris dans 10 ml de milieu (DMEM, 10 % de SVF, pénicilline 100 U/mL et 100 µg/mL de streptomycine) et les cellules ont étéensemencées, un cerveau par boîte de Petri (100 mm de diamètre, FisherScientific), préalablement traitées avec de la poly-L-lysine (100 µg/mL, 24 h, Sigma-Aldrich). Les boîtes de Petri ont été placées dans une étuve à 37°C et dans une atmosphère humide contenant 5 % de CO₂. Le milieu de culture a été changé tous les 5 jours. Après 12 jours d'ensemencement, les microglies ont été détachées, par une agitation de la boîte grâce à un shaker orbital (37°C, 1 h, 160 rpm; Milićević et al., 2022). Les microglies flottantes ont été aspirées délicatement à l'aide d'une pipette, comptées, puisensemencées à 2×10^5 cellules par puits dans une plaque de 24 puits contenant des lamelles préalablement recouvertes de poly-L-lysine et placées dans l'incubateur.

6.2. Étude des marqueurs phénotypiques par immunofluorescence

Les microglies primaires ont étéensemencées à 200×10^3 cellules par puits (1 mL) dans une plaque 24 puits (Corning®, 3512) contenant des lamelles (ThermoScientific ; diamètre : 16 mm, Gerhard Menzel, Braunschweig, Allemagne), préalablement stérilisées à l'alcool 70 % (2 h, sous PSM). Les cellules ont été cultivées en milieu DMEM, 10 % v/v de SVF, pénicilline 100 U/mL et 100 µg/mL de streptomycine. Le surnageant des différentes conditions de cultures microgliales a été centrifugé à 1300 rpm pendant 10 min et conservé à -20 °C. Les puits, contenant chacun une lamelle, ont été rincés avec 1 ml de PBS

1X. Les cellules ont ensuite été fixées avec 800 µL de solution de PFA 4 % pendant 30 min à température ambiante. Après un rinçage avec 1 ml de PBS 1X, une saturation d'1 h avec le tampon PBS-SAB 1 % w/v a été réalisée, à température ambiante. Les cellules ont de nouveau été rincées avec 1 ml de PBS 1X. La pureté des cellules microgliales a été évaluée par un double marquage d'immunofluorescence avec le marqueur microglial IBA1 et le marqueur astrocytaire GFAP (**Tableau 6**).

Les anticorps anti-CD86 et anti-CD206 ont été utilisés pour identifier les phénotypes de microglies M1 (**pro-inflammatoire**) et M2 (**anti-inflammatoire**), respectivement. Les anticorps primaires (100 µL ; 5 µg/mL) dilués dans du PBS 1X, 0,01 % SAB w/v, 0,01% v/v Triton™ X-100 ont été déposés et incubés à 4°C, durant une nuit (**Tableau 6**). Les lamelles ont ensuite été rincées 3 fois avec une solution de PBS-SAB 0,1 % w/v, Triton 0,05 % v/v. Concernant les anticorps anti-GFAP, anti-CD86 et anti-CD206, 100 µL d'anticorps secondaire (Donkey anti-rabbit IgG H&L) (**Tableau 4**) ont été déposés et incubés pendant 1 h à températures ambiante et protégés de la lumière. L'anticorps secondaire pour révéler l'anti-Iba1 (Donkey Anti-Goat IgG H&L) a été utilisé (**Tableau 4**). Les lamelles ont ensuite été rincées 3 fois avec une solution de PBS-SAB 0,1 % w/v, Triton 0,05 % v/v. Les cellules ont été fixées sur la lamelle avec le milieu de montage Vectashield contenant le fluorophore DAPI. Les lamelles ont été stockées à l'abri de la lumière avant d'être observées au microscope à fluorescence à un grossissement 20 X.

Le même protocole d'analyse des images que celui décrit ci-avant a été suivi.

Hôte / Anticorps primaires	Fabricant	Identification du type cellulaire	Type d'anticorps	Dilution
Chèvre/Anti-IBA1 (Goat anti-Ionized Calcium-binding Adapter molecule 1)	Abcam	Microglie	Monoclonal	1/100
Lapin/ Anti-GFAP (glial fibrillary acidic protein)	Proteintech	Astrocyte	Polyclonal	1/280
Lapin/ Anti-Mannose receptor (CD206)	Abcam	M2 microglie	Polyclonal	1/200
Lapin /Anti-CD86	Proteintech	M1 microglie	Polyclonal	1/200

Tableau 6 : Liste des différents anticorps primaires utilisés pour l'immunohistochimie.

6.3. Dosage des cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires par ELISA

Les microglies primaires ont été cultivées dans les différentes conditions détaillées au Chapitre 4. Les surnageants des cellules ont été centrifugés (1300 rpm/10 min/ 20°C). Les cytokines pro-inflammatoires (**TNF-α** et **IL-1β**) ont été dosées par ELISA avec les kits (Rat TNF alpha Uncoated ELISA, 88-7340, Invitrogen et Rat IL-1β Mini ABTS ELISA Development Kit, 900-M91, PeproTech). Les cytokines anti-inflammatoires (Interleukine **IL-10** et le facteur de croissance transformant **TGF-β**) ont été dosées par ELISA avec les kits (Murine IL-10 Mini ABTS ELISA Development Kit, 900-M53, PeproTech et TGF-β1 Rat Uncoated ELISA Kit, 88-50680, Invitrogen).

Nous avons déposé 100 µL de l'anticorps de capture (AC) à 2 µg/mL dans les puits d'une plaque à 96 puits (Costar TM 3590, Dutcher) et laissé incuber pendant une nuit, à 4°C. Après 2 rinçages avec le tampon PBS-SAB 0,1 % w/v, Tween 0,05 % v/v (Sigma-Aldrich), une saturation des sites non spécifiques a été réalisée avec le tampon PBS-SAB 1 % w/v, pendant 1 h, à température ambiante. Après un lavage, une gamme étalon dépendante des concentrations de cytokines a été déposée en duplicata : les concentrations étaient comprises pour TNF-α entre 12 et 2000 pg/ml, pour IL-1β entre 63 et 4000 pg/mL, pour IL-10 entre 39 et 5000 pg/mL et pour TGF-β entre 0,019 et 1,20 ng/mL. Les surnageants, dilués au demi, avec du PBS-SAB 0,1 % w/v, Tween 0,05 % v/v, ont été ajoutés en duplicata.

Après 2 h d'incubation et 4 rinçages, un anticorps biotinylé (anti-cytokine, 0,5 µg/mL) a été ajouté et incubé pendant 2 h à température ambiante. Quatre lavages ont été effectués puis l'Avidin-HRP Conjugate (1/2000) a été ajouté et incubé pendant 30 min. Les plaques ont été lavées 3 fois. Enfin, 100 µl de la solution de révélation (3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine ou TMB) a été ajoutée pendant 15 min, à température ambiante et à l'abri de la lumière. La TMB est un substrat de la peroxydase de raifort. Elle forme un produit final de couleur bleue soluble qui peut être mesuré entre 370 nm ou 655 nm. La réaction a été stoppée avec 100 µl d'acide sulfurique (H₂SO₄) et l'absorbance a été mesurée à 450 nm avec un lecteur de microplaque (SpectraMax, Molecular Devices, San Jose, CA 95134, États Unis).

7. Analyse statistique des résultats

Les analyses statistiques ainsi que les graphiques ont été réalisés en utilisant le logiciel GraphPad Prism 7.00. Les résultats ont été exprimés sous la forme de moyenne ± erreur standard à la moyenne. Les différences statistiquement significatives entre les groupes et les intra-groupes ont été mises en évidence en utilisant une ANOVA à un facteur suivi du test post-hoc LSD de Fischer. Les comparaisons ♂/♀ dans les études préclinique et clinique ont été évaluées à l'aide à l'aide du test t de Student Unpaired. La signification statistique a été définie pour p < 0,05 (* p < 0,05 ; ** p < 0,01 ; *** p < 0,001 et **** p < 0,0001).

8. Références

- Álvarez-García, M., Cuellar-Flores, I., Sierra-García, P., & Martínez-Orgado, J. (2022). Mood disorders in children following neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *PloS One*, *17*(1), e0263055. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0263055>
- Andiné, P., Thordstein, M., Kjellmer, I., Nordborg, C., Thiringer, K., Wennberg, E., & Hagberg, H. (1990). Evaluation of brain damage in a rat model of neonatal hypoxic-ischemia. *Journal of Neuroscience Methods*, *35*(3), 253-260. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(90\)90131-x](https://doi.org/10.1016/0165-0270(90)90131-x)
- Arteni, N. S., Salgueiro, J., Torres, I., Achaval, M., & Netto, C. A. (2003). Neonatal cerebral hypoxia-ischemia causes lateralized memory impairments in the adult rat. *Brain Research*, *973*(2), 171-178. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(03\)02436-3](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(03)02436-3)
- Barkovich, A. J., Westmark, K., Partridge, C., Sola, A., & Ferriero, D. M. (1995). Perinatal asphyxia : MR findings in the first 10 days. *American Journal of Neuroradiology*, *16*(3), 427-438.
- Blasco-Serra, A., González-Soler, E. M., Cervera-Ferri, A., Teruel-Martí, V., & Valverde-Navarro, A. A. (2017). A standardization of the Novelty-Suppressed Feeding Test protocol in rats. *Neuroscience Letters*, *658*, 73-78. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.08.019>
- Bona, E., Hagberg, H., Løberg, E. M., Bågenholm, R., & Thoresen, M. (1998). Protective effects of moderate hypothermia after neonatal hypoxia-ischemia : Short- and long-term outcome. *Pediatric Research*, *43*(6), 738-745. <https://doi.org/10.1203/00006450-199806000-00005>
- Brègère, C., Schwendele, B., Radanovic, B., & Guzman, R. (2022). Microglia and Stem-Cell Mediated Neuroprotection after Neonatal Hypoxia-Ischemia. *Stem Cell Reviews and Reports*, *18*(2), 474-522. <https://doi.org/10.1007/s12015-021-10213-y>
- Cai, Z., Pang, Y., Xiao, F., & Rhodes, P. G. (2001). Chronic ischemia preferentially causes white matter injury in the neonatal rat brain. *Brain Research*, *898*(1), 126-135. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(01\)02180-1](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(01)02180-1)
- Chau, V., Clément, J.-F., Robitaille, Y., D'Anjou, G., & Vanasse, M. (2008). Congenital Axonal Neuropathy and Encephalopathy. *Pediatric Neurology*, *38*(4), 261-266. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2007.11.005>
- Chen, J., Li, Y., Wang, L., Zhang, Z., Lu, D., Lu, M., & Chopp, M. (2001). Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Stroke*, *32*(4), 1005-1011. <https://doi.org/10.1161/01.str.32.4.1005>
- Cowan, F., Rutherford, M., Groenendaal, F., Eken, P., Mercuri, E., Bydder, G. M., Meiners, L. C., Dubowitz, L. M., & Vries, L. S. de. (2003). Origin and timing of brain lesions in term infants with neonatal encephalopathy. *The Lancet*, *361*(9359), 736-742. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)12658-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12658-X)
- Craig, A., Ling Luo, N., Beardsley, D. J., Wingate-Pearse, N., Walker, D. W., Hohimer, A. R., & Back, S. A. (2003). Quantitative analysis of perinatal rodent oligodendrocyte lineage progression and its correlation with human. *Experimental Neurology*, *181*(2), 231-240. [https://doi.org/10.1016/S0014-4886\(03\)00032-3](https://doi.org/10.1016/S0014-4886(03)00032-3)
- Cui, J., Chen, S., Zhang, C., Meng, F., Wu, W., Hu, R., Hadass, O., Lehmidi, T., Blair, G. J., Lee, M., Chang, M., Mobashery, S., Sun, G. Y., & Gu, Z. (2012). Inhibition of MMP-9 by a selective gelatinase inhibitor protects neurovasculature from embolic focal cerebral ischemia. *Molecular Neurodegeneration*, *7*, 21. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-7-21>
- Edelstein, W. A., Hutchison, J. M., Johnson, G., & Redpath, T. (1980). Spin warp NMR imaging and applications to human whole-body imaging. *Physics in Medicine and Biology*, *25*(4), 751-756. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/25/4/017>
- Ef, S., Ns, A., C, S., F, M., Ir, S., Ml, P., & Ca, N. (2012). Effects of pre- and postnatal protein malnutrition in hypoxic-ischemic rats. *Brain Research*, *1438*. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.12.024>
- Ennaceur, A., & Delacour, J. (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1 : Behavioral data. *Behavioural Brain Research*, *31*(1), 47-59. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(88\)90157-x](https://doi.org/10.1016/0166-4328(88)90157-x)
- Ferriero, D. M., Holtzman, D. M., Black, S. M., & Sheldon, R. A. (1996). Neonatal mice lacking neuronal nitric oxide synthase are less vulnerable to hypoxic-ischemic injury. *Neurobiology of Disease*, *3*(1), 64-71. <https://doi.org/10.1006/nbdi.1996.0006>
- Hack, M., Breslau, N., Aram, D., Weissman, B., Klein, N., & Borawski-Clark, E. (1992). The Effect of Very Low Birth Weight and Social Risk on Neurocognitive Abilities at School Age. *Journal of Developmental & Behavioral Pediatrics*, *13*(6), 412.
- Hadass, O., Tomlinson, B. N., Gooyit, M., Chen, S., Purdy, J. J., Walker, J. M., Zhang, C., Giritharan, A. B., Purnell, W., Christopher R Robinson, I. I., Shin, D., Schroeder, V. A., Suckow, M. A., Simonyi, A., Sun, G. Y.,

- Mobashery, S., Cui, J., Chang, M., & Gu, Z. (2013). Selective Inhibition of Matrix Metalloproteinase-9 Attenuates Secondary Damage Resulting from Severe Traumatic Brain Injury. *PLoS ONE*, *8*(10), e76904. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076904>
- Inder, T. E., Huppi, P. S., Warfield, S., Kikinis, R., Zientara, G. P., Barnes, P. D., Jolesz, F., & Volpe, J. J. (1999). Periventricular white matter injury in the premature infant is followed by reduced cerebral cortical gray matter volume at term. *Annals of Neurology*, *46*(5), 755-760. [https://doi.org/10.1002/1531-8249\(199911\)46:5<755::AID-ANA11>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/1531-8249(199911)46:5<755::AID-ANA11>3.0.CO;2-0)
- Jatana, M., Singh, I., Singh, A. K., & Jenkins, D. (2006). Combination of Systemic Hypothermia and N-acetylcysteine Attenuates Hypoxic-Ischemic Brain Injury in Neonatal Rats. *Pediatric Research*, *59*(5), 684-689. <https://doi.org/10.1203/01.pdr.0000215045.91122.44>
- Kaufman, S. A., Miller, S. P., Ferriero, D. M., Glidden, D. H., Barkovich, A. J., & Partridge, J. C. (2003). Encephalopathy as a predictor of magnetic resonance imaging abnormalities in asphyxiated newborns. *Pediatric Neurology*, *28*(5), 342-346. [https://doi.org/10.1016/S0887-8994\(03\)00015-8](https://doi.org/10.1016/S0887-8994(03)00015-8)
- Lauterbur, P. C. (1973). Image Formation by Induced Local Interactions : Examples Employing Nuclear Magnetic Resonance. *Nature*, *242*, 190-191. <https://doi.org/10.1038/242190a0>
- Le Bihan, D., & Breton, E. (1985). Imagerie de diffusion in-vivo par résonance magnétique nucléaire. *Comptes-Rendus de l'Académie des Sciences*, *93*(5), 27-34.
- Lee, A. C. C., Kozuki, N., Blencowe, H., Vos, T., Bahalim, A., Darmstadt, G. L., Niermeyer, S., Ellis, M., Robertson, N. J., Cousens, S., & Lawn, J. E. (2013). Intrapartum-related neonatal encephalopathy incidence and impairment at regional and global levels for 2010 with trends from 1990. *Pediatric Research*, *74* Suppl 1(Suppl 1), 50-72. <https://doi.org/10.1038/pr.2013.206>
- Lee, B. S., Woo, C.-W., Kim, S.-T., & Kim, K.-S. (2010). Long-Term Neuroprotective Effect of Postischemic Hypothermia in a Neonatal Rat Model of Severe Hypoxic Ischemic Encephalopathy : A Comparative Study on the Duration and Depth of Hypothermia. *Pediatric Research*, *68*(4), 303-308. <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e3181ef3007>
- Lin, L., Desai, R., Wang, X., Lo, E. H., & Xing, C. (2017). Characteristics of primary rat microglia isolated from mixed cultures using 2 different methods. *Journal of Neuroinflammation*, *14*(1), 101. <https://doi.org/10.1186/s12974-017-0877-7>
- Liu, Y., Silverstein, F. S., Skoff, R., & Barks, J. D. E. (2002). Hypoxic-ischemic oligodendroglial injury in neonatal rat brain. *Pediatric Research*, *51*(1), 25-33. <https://doi.org/10.1203/00006450-200201000-00007>
- Lubics, A., Reglodi, D., Tamás, A., Kiss, P., Szalai, M., Szalontay, L., & Lengvári, I. (2005). Neurological reflexes and early motor behavior in rats subjected to neonatal hypoxic-ischemic injury. *Behavioural Brain Research*, *157*(1), 157-165. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2004.06.019>
- Mansfield, P. (1977). Multi-planar image formation using NMR spin echoes. *Journal of Physics C: Solid State Physics*, *10*(3), L55. <https://doi.org/10.1088/0022-3719/10/3/004>
- Mansfield, P., & Grannell, P. K. (1973). NMR « diffraction » in solids? *Journal of Physics C: Solid State Physics*, *6*(22), L422. <https://doi.org/10.1088/0022-3719/6/22/007>
- Miličević, K., Korenić, A., Milošević, M., & Andjus, P. R. (2022). Primary Cultures of Rat Astrocytes and Microglia and Their Use in the Study of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, *184*. <https://doi.org/10.3791/63483>
- Millar, L. J., Shi, L., Hoerder-Suabedissen, A., & Molnár, Z. (2017). Neonatal Hypoxia Ischaemia : Mechanisms, Models, and Therapeutic Challenges. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *11*, 78. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00078>
- Miller, S. P., Ramaswamy, V., Michelson, D., Barkovich, A. J., Holshouser, B., Wycliffe, N., Glidden, D. V., Deming, D., Partridge, J. C., Wu, Y. W., Ashwal, S., & Ferriero, D. M. (2005). Patterns of brain injury in term neonatal encephalopathy. *The Journal of Pediatrics*, *146*(4), 453-460. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2004.12.026>
- Neil, J., Miller, J., Mukherjee, P., & Hüppi, P. S. (2002). Diffusion tensor imaging of normal and injured developing human brain—A technical review. *NMR in Biomedicine*, *15*(7-8), 543-552. <https://doi.org/10.1002/nbm.784>
- Ness, J. K., Romanko, M. J., Rothstein, R. P., Wood, T. L., & Levison, S. W. (2001). Perinatal hypoxia-ischemia induces apoptotic and excitotoxic death of periventricular white matter oligodendrocyte progenitors. *Developmental Neuroscience*, *23*(3), 203-208. <https://doi.org/10.1159/000046144>
- Pellow, S., Chopin, P., File, S. E., & Briley, M. (1985). Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, *14*(3), 149-167. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(85\)90031-7](https://doi.org/10.1016/0165-0270(85)90031-7)

- Rice, J. E., Vannucci, R. C., & Brierley, J. B. (1981). The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Annals of Neurology*, *9*(2), 131-141. <https://doi.org/10.1002/ana.410090206>
- Rocha-Ferreira, E., Vincent, A., Bright, S., Peebles, D. M., & Hristova, M. (2018). The duration of hypothermia affects short-term neuroprotection in a mouse model of neonatal hypoxic ischaemic injury. *PLOS ONE*, *13*(7), e0199890. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199890>
- Romijn, H. J., Hofman, M. A., & Gramsbergen, A. (1991). At what age is the developing cerebral cortex of the rat comparable to that of the full-term newborn human baby? *Early Human Development*, *26*(1), 61-67. [https://doi.org/10.1016/0378-3782\(91\)90044-4](https://doi.org/10.1016/0378-3782(91)90044-4)
- Roumes, H., Dumont, U., Sanchez, S., Mazuel, L., Blanc, J., Raffard, G., Chateil, J.-F., Pellerin, L., & Bouzier-Sore, A.-K. (2021). Neuroprotective role of lactate in rat neonatal hypoxia-ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, *41*(2), 342-358. <https://doi.org/10.1177/0271678X20908355>
- Roumes, H., Sanchez, S., Benkhaled, I., Fernandez, V., Goudeneche, P., Perrin, F., Pellerin, L., Guillard, J., & Bouzier-Sore, A.-K. (2022). Neuroprotective Effect of Eco-Sustainably Extracted Grape Polyphenols in Neonatal Hypoxia-Ischemia. *Nutrients*, *14*(4), 773. <https://doi.org/10.3390/nu14040773>
- Rutherford, M., Counsell, S., Allsop, J., Boardman, J., Kapellou, O., Larkman, D., Hajnal, J., Edwards, D., & Cowan, F. (2004). Diffusion-Weighted Magnetic Resonance Imaging in Term Perinatal Brain Injury: A Comparison With Site of Lesion and Time From Birth. *Pediatrics*, *114*(4), 1004-1014. <https://doi.org/10.1542/peds.2004-0222>
- Sabir, H., Scull-Brown, E., Liu, X., & Thoresen, M. (2012). Immediate hypothermia is not neuroprotective after severe hypoxia-ischemia and is deleterious when delayed by 12 hours in neonatal rats. *Stroke*, *43*(12), 3364-3370. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.112.674481>
- Sanches, E. F., Arteni, N., Nicola, F., Aristimunha, D., & Netto, C. A. (2015). Sexual dimorphism and brain lateralization impact behavioral and histological outcomes following hypoxia-ischemia in P3 and P7 rats. *Neuroscience*, *290*, 581-593. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.12.074>
- Sheldon, R. A., Sedik, C., & Ferriero, D. M. (1998). Strain-related brain injury in neonatal mice subjected to hypoxia-ischemia. *Brain Research*, *810*(1-2), 114-122. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(98\)00892-0](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(98)00892-0)
- Ten, V. S., Bradley-Moore, M., Gingrich, J. A., Stark, R. I., & Pinsky, D. J. (2003). Brain injury and neurofunctional deficit in neonatal mice with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Behavioural Brain Research*, *145*(1), 209-219. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(03\)00146-3](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(03)00146-3)
- Thoresen, M., Bågenholm, R., Løberg, E. M., Apricena, F., & Kjellmer, I. (1996). Posthypoxic cooling of neonatal rats provides protection against brain injury. *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition*, *74*(1), F3-9. <https://doi.org/10.1136/fn.74.1.f3>
- Towfighi, J., Mauger, D., Vannucci, R. C., & Vannucci, S. J. (1997). Influence of age on the cerebral lesions in an immature rat model of cerebral hypoxia-ischemia: A light microscopic study. *Brain Research. Developmental Brain Research*, *100*(2), 149-160. [https://doi.org/10.1016/S0165-3806\(97\)00036-9](https://doi.org/10.1016/S0165-3806(97)00036-9)
- Vannucci, R. C., Connor, J. R., Mauger, D. T., Palmer, C., Smith, M. B., Towfighi, J., & Vannucci, S. J. (1999). Rat model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *Journal of Neuroscience Research*, *55*(2), 158-163. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4547\(19990115\)55:2<158::AID-JNR3>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(19990115)55:2<158::AID-JNR3>3.0.CO;2-1)
- Vannucci, R. C., & Vannucci, S. J. (2005). Perinatal hypoxic-ischemic brain damage: Evolution of an animal model. *Developmental Neuroscience*, *27*(2-4), 81-86. <https://doi.org/10.1159/000085978>
- Vannucci, R. C., & Yager, J. Y. (1992). Glucose, lactic acid, and perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *Pediatric Neurology*, *8*(1), 3-12. [https://doi.org/10.1016/0887-8994\(92\)90045-z](https://doi.org/10.1016/0887-8994(92)90045-z)
- Vannucci, S. J., & Hagberg, H. (2004). Hypoxia-ischemia in the immature brain. *The Journal of Experimental Biology*, *207*(Pt 18), 3149-3154. <https://doi.org/10.1242/jeb.01064>
- Vay, S. U., Flitsch, L. J., Rabenstein, M., Rogall, R., Blaschke, S., Kleinhaus, J., Reinert, N., Bach, A., Fink, G. R., Schroeter, M., & Rueger, M. A. (2018). The plasticity of primary microglia and their multifaceted effects on endogenous neural stem cells in vitro and in vivo. *Journal of Neuroinflammation*, *15*(1), 226. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1261-y>
- Vermeulen, R. J., Fetter, W. P. F., Hendriks, L., Schie, P. E. M. V., Knaap, M. S. van der, & Barkhof, F. (2003). Diffusion-Weighted MRI in Severe Neonatal Hypoxic Ischaemia: The White Cerebrum. *Neuropediatrics*, *34*, 72-76. <https://doi.org/10.1055/s-2003-39599>
- Vetter, D., Kastler, B., & Patay, Z. (2018). Chapitre 14—Imagerie de diffusion, de perfusion et IRM fonctionnelle. In B. Kastler & D. Vetter (Éds.), *Comprendre L'irm (Huitième Édition)* (p. 315-336). Elsevier Masson. <https://doi.org/10.1016/B978-2-294-75371-8.00014-1>
- Vohr, B. R., Wright, L. L., Dusick, A. M., Mele, L., Verter, J., Steichen, J. J., Simon, N. P., Wilson, D. C., Broyles, S., Bauer, C. R., Delaney-Black, V., Yolton, K. A., Fleisher, B. E., Papile, L.-A., & Kaplan, M. D. (2000).

- Neurodevelopmental and Functional Outcomes of Extremely Low Birth Weight Infants in the National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network, 1993–1994. *Pediatrics*, 105(6), 1216-1226. <https://doi.org/10.1542/peds.105.6.1216>
- Volpe, J. J. (2012). Neonatal encephalopathy : An inadequate term for hypoxic–ischemic encephalopathy. *Annals of Neurology*, 72(2), 156-166. <https://doi.org/10.1002/ana.23647>
- Wood, T., Hobbs, C., Falck, M., Brun, A. C., Løberg, E. M., & Thoresen, M. (2018). Rectal temperature in the first five hours after hypoxia–ischemia critically affects neuropathological outcomes in neonatal rats. *Pediatric Research*, 83(2), 536-544. <https://doi.org/10.1038/pr.2017.51>
- Yager, J., Towfighi, J., & Vannucci, R. C. (1993). Influence of Mild Hypothermia on Hypoxic-Ischemic Brain Damage in the Immature Rat. *Pediatric Research*, 34(4), 525-529. <https://doi.org/10.1203/00006450-199310000-00029>
- Yu, J., Moon, J., Jang, J., Choi, J. I., Jung, J., Hwang, S., & Kim, M. (2019). Reliability of behavioral tests in the middle cerebral artery occlusion model of rat. *Laboratory Animals*, 53(5), 478-490. <https://doi.org/10.1177/0023677218815210>

Chapitre 3 : Mise en place du protocole d'hypothermie

1. Introduction

Aujourd'hui, l'unique approche thérapeutique interventionnelle reconnue pour améliorer le pronostic des nouveau-nés ayant subi un accident d'hypoxie-ischémie (HI) est l'hypothermie modérée, appelée **hypothermie thérapeutique (HT)** (Saliba & Debillon, 2010). Dans notre équipe, des résultats préliminaires ont montré que l'administration de lactate après un accident d'HIN (hypoxie-ischémie néonatale) présente un effet neuroprotecteur. Cependant, avant d'envisager une éventuelle application clinique, il est crucial de vérifier si cette approche thérapeutique est compatible avec l'HT, et d'évaluer si l'administration de lactate, combinée à l'HT (qui sera de toute façon utilisée en clinique), conserve son effet neuroprotecteur.

Le modèle d'HT chez le raton n'étant pas disponible dans notre laboratoire, j'ai dû commencer par mettre en place ce protocole. En consultant la littérature, on observe une grande hétérogénéité dans les conditions d'application de l'hypothermie dans les études précliniques. En se concentrant sur les recherches effectuées chez le rat, modèle animal le plus couramment utilisé pour évaluer les stratégies thérapeutiques, les durées principales d'HT dans le cadre de l'HIN sont de **2 h** (Jatana et al., 2006), **3 h** (Trescher et al., 1997; C et al., 2008; Fan et al., 2013), ou **5 h** (Fabres et al., 2022; Sabir et al., 2012; T. Wood et al., 2016, 2018; T. R. Wood et al., 2020). Malheureusement, ces différentes durées ont été testées dans des études distinctes, chacune avec des variables expérimentales différentes. Mon objectif était donc de déterminer la durée optimale de l'HT, capable de maximiser les effets bénéfiques tout en minimisant la douleur, la souffrance et le stress chez les animaux. Cette optimisation visait également à promouvoir le bien-être animal, en accord avec les nouvelles directives expérimentales basées sur les principes des 3R (Remplacement, Réduction et Raffinement). Il était donc essentiel de définir précisément la durée idéale de l'HT. De plus, en lien avec le troisième principe, celui du raffinement, le fait que toutes les expériences destinées à déterminer ce seuil aient été menées dans des conditions homogènes d'HIN constitue un atout pour la standardisation des méthodes. Par ailleurs, bien que les résultats des études précliniques explorant de nouvelles approches thérapeutiques aient paru prometteurs, ces traitements se sont souvent révélés inefficaces chez l'humain. Cet échec peut en partie être attribué à une fenêtre d'étude trop courte dans ces études. Afin de surmonter cette limitation, notre travail suit la recommandation n°4 du consortium STAIR (Stroke Therapy Academic Industry Roundtable), qui préconise que « les mesures des résultats doivent inclure à la fois le volume de l'infarctus et des évaluations fonctionnelles à court et long terme dans les études animales » (Stroke Therapy Academic Industry Roundtable (STAIR), 1999). Nous avons donc pris parti du caractère non invasif de l'IRM pour faire un suivi longitudinal, en imagerie mais également en utilisant plusieurs tests de comportement, du nouveau-né au jeune adulte.

Les objectifs de cette étude sont : (i) de mettre en place le protocole d'HT pré-clinique, (ii) d'identifier la durée optimale de l'HT dans le modèle standard Rice-Vannucci d'HIN, et (iii) de déterminer le meilleur délai après l'accident d'HIN pour la mise en place de l'HT.

Pour ce faire, nous avons comparé trois durées différentes d'HT (2 h, 3 h et 5 h) et étudié leurs effets neuroprotecteurs chez des ratons P7 après un épisode d'HIN. Nous avons également comparé deux temps différents de mise en place de l'HT : à la sortie du caisson d'hypoxie, ou bien 1 h après. L'évaluation de l'effet neuroprotecteur a été réalisée à l'aide d'un suivi longitudinal permettant la mesure des volumes lésionnels cérébraux par IRM et l'évaluation des fonctions cognitives et motrices grâce à des tests comportementaux.

2. Méthodes

Le modèle de Rice et Vannucci a été utilisé pour reproduire l'HIN chez des ratons P7 (cf chapitre 2 ; 1.2). La température rectale des ratons a été maintenue à $32 \pm 0,5$ °C en condition d'hypothermie et à $36,0 \pm 0,5$ °C en condition de normothermie (cf **Figure 20**, Chapitre 2).

Six groupes expérimentaux ont été définis :

- **Groupe Sham** : pas d'HIN à P7 + 1 injection intrapéritonéale (i.p.) de sérum physiologique (NaCl) à P7 + 2 h de normothermie débutant 3,5 h post-ligature (soit 1 h après la sortie du caisson d'hypoxie)
- **Groupe HIC** : HIN à P7 + 1 injection de NaCl par voie i.p. à P7 (juste après la sortie du caisson hypoxique) + 2 h de normothermie débutant 3,5 h post-ligature,
- Groupes **HIH2, HIH3 et HIH5** : HIN à P7 + 1 injection de NaCl par voie i.p. à P7 (juste après la sortie du caisson hypoxique) + 2 h, 3 h, 5 h d'hypothermie débutant 3,5 h post-ligature, respectivement.
- Groupe **HIH2Im** : HIN à P7 + 1 injection de NaCl par i.p. et de 2 h d'hypothermie immédiatement après la sortie du caisson hypoxique (soit 2,5 h post-ligature).

L'IRM, en tant que méthode non invasive, a permis (i) de mesurer à court terme le volume des lésions cérébrales et de suivre longitudinalement l'évolution de ces volumes chez les ratons, y compris après traitement par HT (évaluations à P7, P9 et P30). Parallèlement, les fonctions cognitives et motrices ont été évaluées à l'aide de divers tests comportementaux, sensorimoteurs et de mémoire, réalisés entre P8 et P51 (P8, P10, P12 : test du redressement ; P24 : test du mNSS ; P45 : test de reconnaissance du nouvel objet ; P51 : test de restriction alimentaire). L'intégralité des tests est décrite dans la **figure 29**. À P9, les cerveaux des groupes Sham, HIC, HIH2, HIH3 et HIH5 (comprenant le cortex, l'hippocampe et le striatum des hémisphères lésés et non lésés) ont été prélevés et analysés par des techniques d'histologie et d'immunohistochimie (IHC).

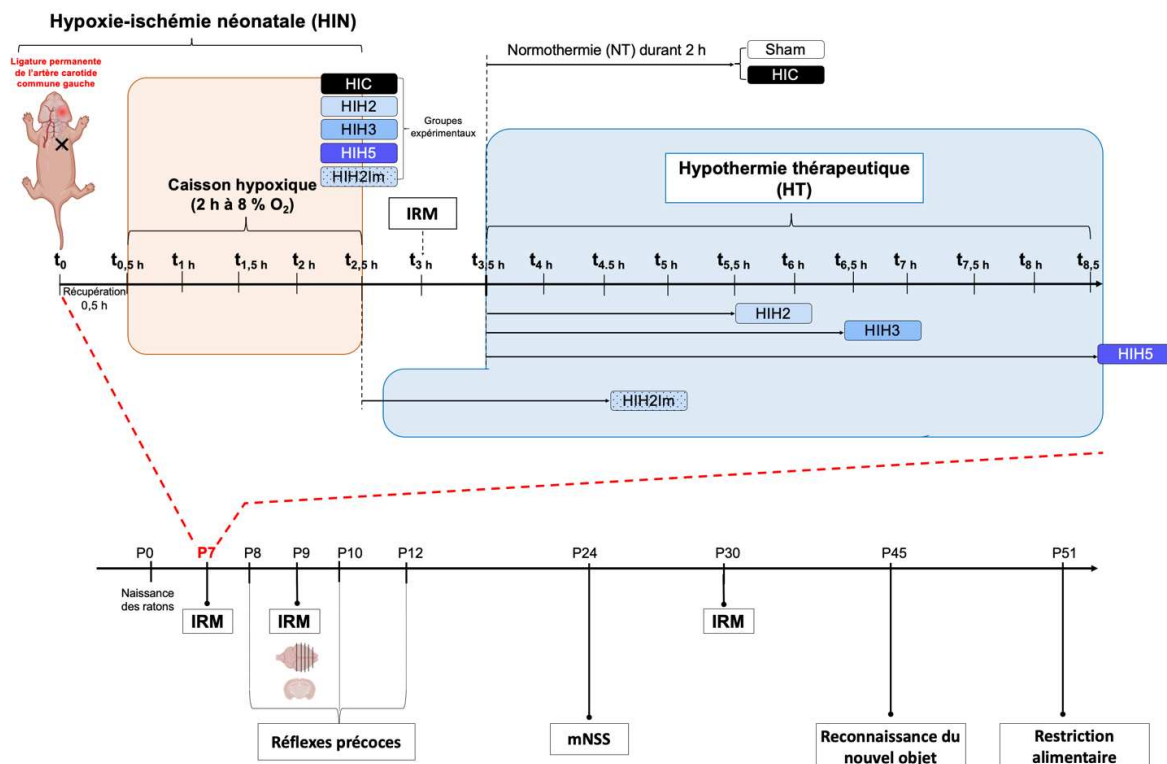


Figure 29 : Schéma expérimental résumant l'ensemble des méthodes utilisées sur les différents groupes de ratons.

3. Résultats

3.1. Hypothermie et neuroprotection à court terme

Le modèle classique de Rice et Vannucci est un modèle reproductible d'HIN modérée à sévère, qui a permis, dans notre étude, d'obtenir des lésions de $44 \pm 2\%$ du volume lésionnel du cerveau total. Ces dommages cérébraux sont en accord avec les lésions typiques rapportées dans la littérature pour ce modèle d'HIN chez les rats nouveau-nés P7 (Ashwal et al., 2007; Dumont et al., 2021; Roumes et al., 2021). De plus, l'HIN provoque une réduction d'environ 40 % de l'ADC dans chaque région affectée, avec une diminution de 43 % dans le cortex, 42 % dans l'hippocampe et 37 % dans le striatum [Figure 30]. Une étude a rapporté que les valeurs moyennes de l'ADC mesurées dans le cortex chez un raton normal (Sham) et un raton HIC ayant subi une HIN, étaient respectivement de $1,075 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ et $0,625 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ (Rumpel et al., 1997). Ces valeurs peuvent varier en fonction des conditions expérimentales. Les valeurs d'ADC sont corrélées à la sévérité de l'œdème : plus l'œdème est sévère, plus les valeurs d'ADC sont basses, indiquant une restriction marquée de la diffusion des molécules d'eau extracellulaires.

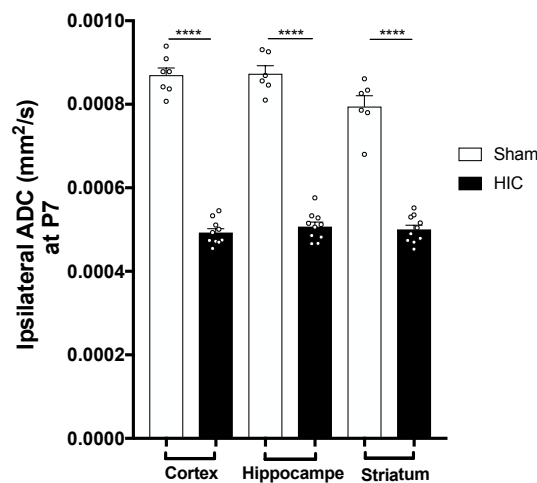


Figure 30 : Valeurs d'ADC ipsilatérales en mm^2/s pour les groupes Sham et HIC dans le cortex, l'hippocampe et le striatum.

L'effet neuroprotecteur à court terme des trois différentes durées d'HT a été évaluée par IRM de diffusion grâce au suivi des volumes lésionnels cérébraux ainsi qu'au réflexe de redressement pour l'évaluation fonctionnelle chez les ratons [Figure 31]. L'IRM de diffusion a été réalisée à P7 et P9 [Figure 31 A et B]. Sur l'IRM réalisée à P7, aucun raton n'a encore été traité par l'HT ; aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les groupes et le volume lésionnel moyen est de $44 \pm 2\%$ [Figure 31 B]. À P9, les ratons du groupe HIH2 présentaient des volumes de lésions cérébrales plus faibles par rapport à ceux du groupe contrôle HIC (volumes des lésions cérébrales : $29 \pm 2\%$ pour le groupe HIH2 contre $39 \pm 2\%$ pour le groupe HIC) et du groupe HIH5 ($29 \pm 2\%$ pour le groupe HIH2 contre $35 \pm 2\%$ pour le groupe HIH5). Aucune différence significative n'a pu être démontrée entre le groupe HIC et les deux autres durées d'HT (HIC vs. HIH3 et HIH5) [Figure 31 B]. Le taux de récupération 48 h après l'épisode d'HIN a été calculé selon la formule suivante : $[(\text{Taille des lésions à P7} - \text{Taille des lésions à P9}) / \text{Taille des lésions à P7}] \times 100$. De manière intéressante, le groupe HIH2 a montré un meilleur taux de récupération 48 h après l'épisode d'HIN comparé aux autres groupes traités par HT ainsi que le groupe HIC (taux de récupération : $35 \pm 4\%$; $23 \pm 2\%$; $22 \pm 3\%$; $17 \pm 2\%$ respectivement pour les groupes HIH2, HIH3, HIH5 et HIC) [Figure 31 C]. Le test de redressement a été réalisé à P8, P10 et P12 [Figure 31 D]. À P8, quel que soit le groupe considéré, à l'exception du groupe Sham, tous les ratons ont montré les mêmes performances. À P10, les trois groupes traités par HT avaient des performances similaires, supérieures à celles du groupe HIC mais inférieures à celles du groupe Sham.

À P12, bien que n'atteignant pas les performances du groupe Sham, le groupe HIH2 présentait de meilleures aptitudes que les deux autres groupes traités par HT ainsi que le groupe HIC [Figure 31 D]. Par ailleurs, aucune différence spécifique au sexe n'a été observée entre tous les groupes, ni pour les lésions cérébrales à P9, ni pour le test de redressement (cf les figures supplémentaires de l'article).

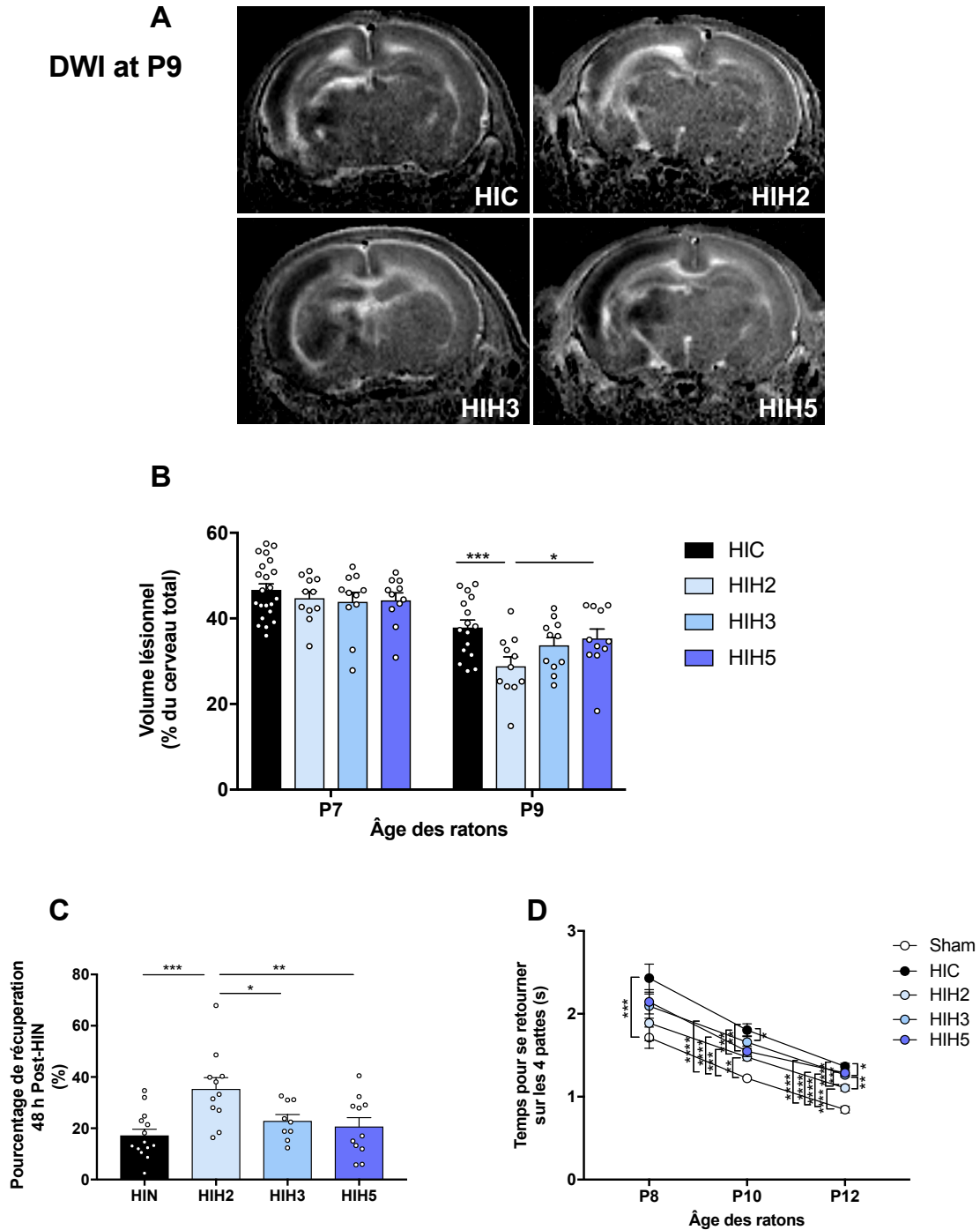


Figure 31 :Détermination optimale de la durée de l'HT pour une neuroprotection à court terme.(A) Imagerie de diffusion (trace inversée) à P9 pour les rats 48 h après la ligation de l'artère carotide commune gauche. (B) Quantification des volumes lésionnels cérébraux, exprimée en pourcentage (%) par rapport au volume total du cerveau, pour les différents groupes en fonction du temps (P7, P9). (C) Taux de récupération 48 h après une lésion HIN, exprimé en % pour les différents groupes. (D) Test de redressement à P8, P10, P12, pour les différents groupes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ et **** $p < 0,0001$.

3.2. Hypothermie et neuroprotection à long terme

À long terme (P30), seul le groupe HIH2 a présenté des volumes lésionnels cérébraux significativement plus faibles que ceux du groupe HIC ($17 \pm 4 \%$ pour HIC contre $5 \pm 3 \%$ pour HIH2) [Figure 32 B]. De plus, le groupe HIH2 a montré des volumes lésionnels plus petits que le groupe HIH5 ($5 \pm 3 \%$ pour HIH2 contre $19 \pm 5 \%$ pour HIH5). Aucune différence significative n'a été observée entre les groupes HIH2 et HIH3. Le score mNSS, qui évalue la sévérité des déficits neurologiques, a montré que ni le groupe HIC, ni les groupes traités par différentes durées d'HT n'ont atteint des performances comparables à celles du groupe Sham [Figure 32 C].

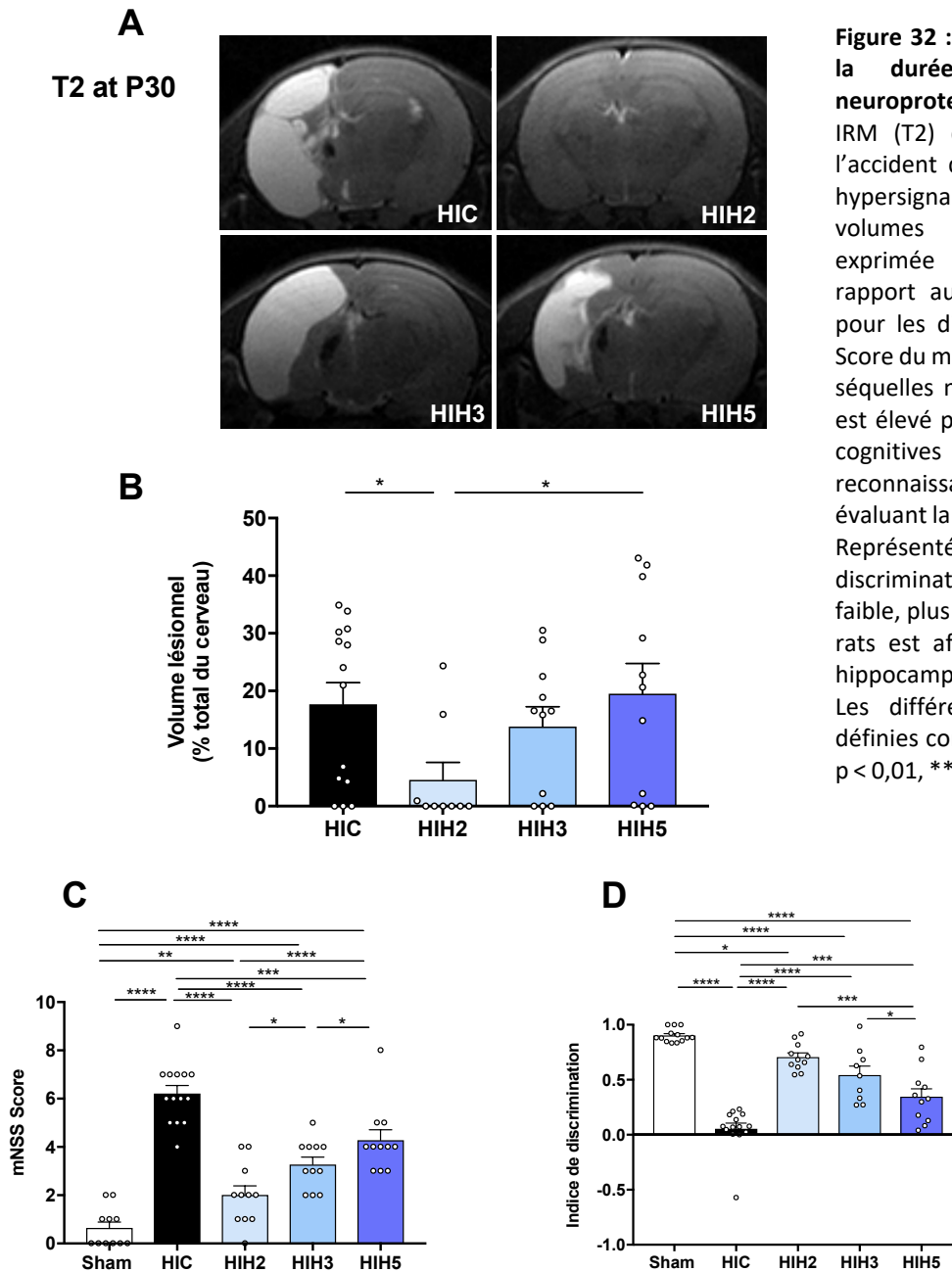


Figure 32 : Détermination optimale de la durée de l'HT pour une neuroprotection à long terme. (A) IRM (T2) des lésions 23 jours après l'accident d'HIN montrant la lésion en hypersignal. (B) Quantification des volumes lésionnels cérébraux, exprimée en pourcentage (%) par rapport au volume total du cerveau, pour les différents groupes à P30. (C) Score du mNSS permettant d'estimer les séquelles neurologiques ; plus le score est élevé plus les fonctions motrices et cognitives sont altérées. (D) Test de reconnaissance du nouvel objet évaluant la mémoire à long terme à P45. Représenté par l'indice de discrimination (I) ; plus cet indice est faible, plus la mémoire à long terme des rats est affectée et plus les atteintes hippocampiques des rats sont sévères. Les différences statistiques ont été définies comme $p < 0,05$ (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

Cependant, tous les groupes traités par HT ont obtenu de meilleurs scores que le groupe HIC, traduisant des déficits neurologiques plus importants pour le groupe HIC (mNSS : $6,2 \pm 0,3$ pour HIC ; $2 \pm 0,4$ pour HIH2 ; $3,3 \pm 0,3$ pour HIH3 ; et $4,3 \pm 0,4$ pour HIH5) [Figure 32 C]. Parmi les groupes traités par HT, le groupe HIH2 a obtenu les meilleurs résultats, significativement supérieures à ceux des groupes HIH3 et HIH5. L'effet neuroprotecteur de l'HT sur la mémoire à long terme a été évalué à P45 à l'aide du test de reconnaissance du nouvel objet [Figure 32 D]. L'HIN a provoqué une altération de la mémoire à long terme, mesurée par l'indice de discrimination (I) [Figure 32 D]. Le groupe HIC a présenté l'indice de discrimination le plus faible par rapport au groupe Sham et aux groupes traités par HT ($0,05 \pm 0,05$ pour HIC contre $0,90 \pm 0,02$ pour Sham ; $0,71 \pm 0,04$ pour HIH2 ; $0,54 \pm 0,1$ pour HIH3 ; et $0,34 \pm 0,1$ pour HIH5), montrant une récupération partielle des fonctions mnésiques dans les groupes traités par HT. En outre, l'indice de discrimination du groupe HIH2 était significativement meilleur que ceux des groupes HIH3 et HIH5. Par ailleurs, aucune différence spécifique au sexe n'a été observée entre tous les groupes, ni pour les lésions cérébrales à P30, ni pour les tests de comportements (cf les figures supplémentaires de l'article).

L'effet protecteur de l'HT sur les neurones a été évalué par coloration au crésyl violet. Dans le cortex cérébral et l'hippocampe du groupe Sham, les noyaux cellulaires présentaient des morphologies typiques et homogènes. Dans l'hémisphère controlatéral, l'HIN n'a pas entraîné de modifications significatives au niveau du cortex et de l'hippocampe (cf les figures supplémentaires de l'article). En revanche, dans l'hémisphère ipsilatéral, des altérations morphologiques importantes ont été observées dans le groupe HIC, particulièrement dans le cortex et la région CA1 de l'hippocampe, où une désorganisation cellulaire et une mort neuronale massive ont été observées. Dans ce chapitre, nous avons concentré notre attention sur la région CA1 de l'hippocampe ipsilatéral. Dans cette région, le nombre de noyaux colorés au crésyl violet était significativement réduit dans le groupe HIC par rapport au groupe Sham ($36 \pm 4\%$ contre $100 \pm 5\%$) [Figure 33 A et B], témoignant une mort neuronale importante induite par l'HIN. Chez les groupes traités par HT, la préservation des noyaux colorés au crésyl violet dans la région CA1 n'a été observée que dans les groupes HIH2 et HIH3, bien que ces niveaux n'aient pas atteint ceux du groupe Sham [Figure 33 B]. En revanche, le groupe HIH5 a montré une réduction des noyaux colorés similaire à celle observée dans le groupe HIC [Figure 33 B].

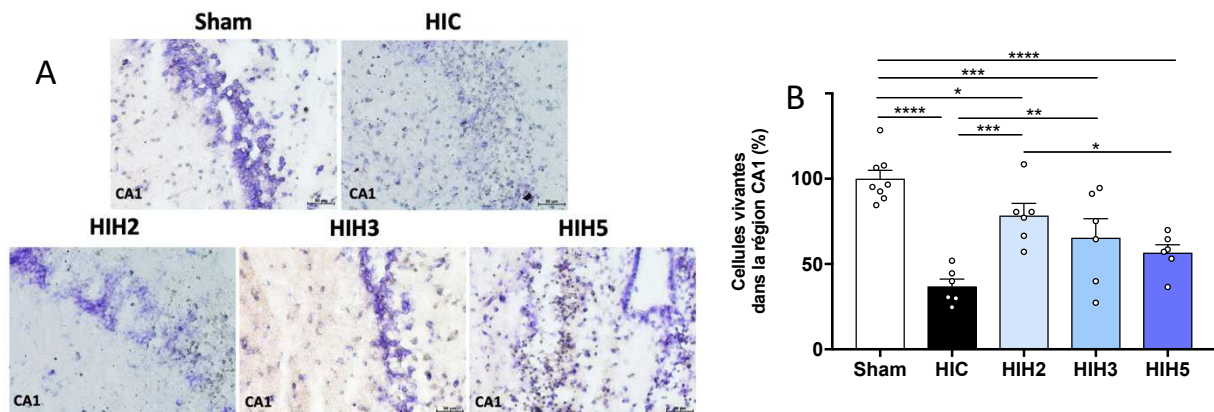


Figure 33 : Histologie. (A) Coloration au crésyl violet des hippocampes, région CA1 (ipsilatéral) 48h après l'HIN pour les groupes Sham, HIC, HIH2, HIH3 et HIH5. Échelle 50 μ m. (B) Pourcentage des cellules vivantes dans la région CA1 pour les différents groupes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ et **** $p < 0,0001$.

L'ensemble des données obtenues montre que le groupe HIH2 a présenté la meilleure neuroprotection, tant à court terme qu'à long terme, par rapport aux groupes HIH3 et HIH5. Ce groupe a donc été sélectionné pour l'analyse immunohistochimique visant à étudier l'effet de l'HT sur l'activation de la microglie après un accident d'HIN.

3.3. Effet neuroprotecteur de l'hypothermie sur la microglie

Nous avons évalué l'effet du traitement par HT sur l'activation globale de la microglie en réalisant une immunohistochimie pour Iba-1 dans la région CA1 de l'hippocampe ipsilatéral. Le groupe HIC a montré une augmentation de l'intensité de la fluorescence d'Iba-1 dans cette région par rapport au groupe Sham, tandis que le groupe traité par HT (HIH2) a présenté une réduction de la fluorescence d'Iba-1 comparée à celle observée dans le groupe HIC [Figure 34].

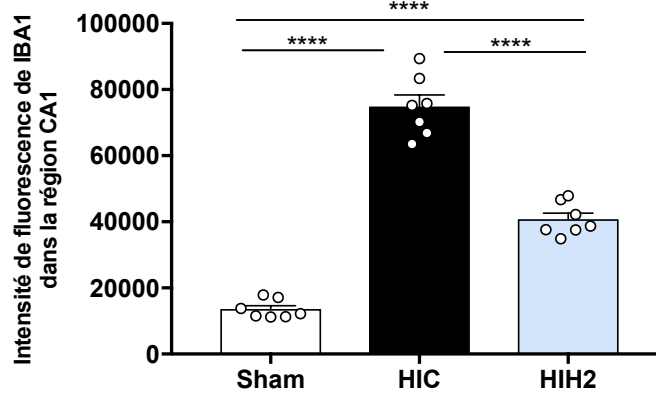


Figure 34 : Immunohistologie.Quantification de l'intensité de fluorescence IBA1 dans la région CA1 de l'hippocampe (n=6). **** p < 0,0001.

3.4. Effets d'un retard dans l'initiation de l'hypothermie

Pour déterminer si une initiation immédiate de l'HT après un épisode d'HIN améliorerait la neuroprotection, les données du groupe HIH2 ont été comparées à celles d'un groupe dans lequel l'HT est mise en place dès la sortie du caisson, le groupe HIH2Im [Figure 35]. À P9, les volumes de lésions cérébrales mesurés par IRM de diffusion étaient plus faibles dans le groupe HIH2Im comparativement au groupe HIH2 (volumes des lésions à P9 : 29 ± 2 % pour HIH2 et 21 ± 2 % pour HIH2Im), bien qu'aucune différence ne soit observée à P30 [Figure 35 A et B]. Aucune différence n'a été observée entre les deux groupes dans le test du réflexe de redressement ou le mNSS [Figure 35 C et D]. En revanche, lors du test de reconnaissance du nouvel objet, le groupe HIH2Im a présenté un indice de discrimination supérieur à celui du groupe HIH2 [Figure 35 E].

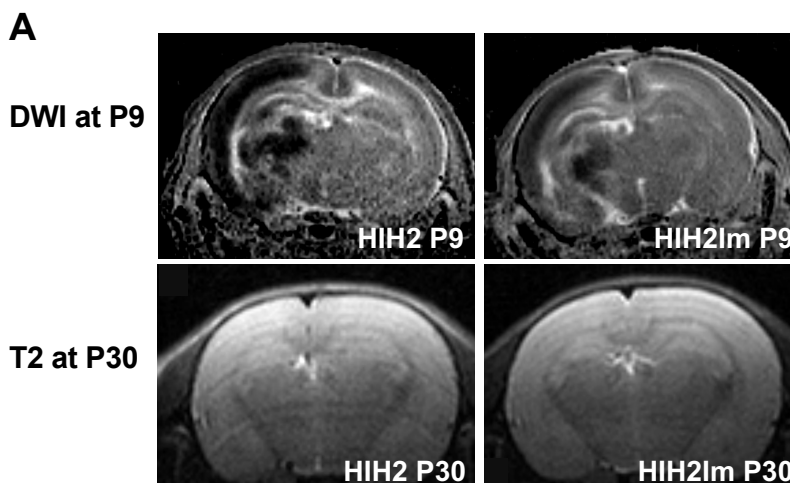


Figure 35 : Effets d'un retard de l'initiation de l'HT. (A) Images DWI et T2 acquises à P9 et P30 respectivement après l'HIN.

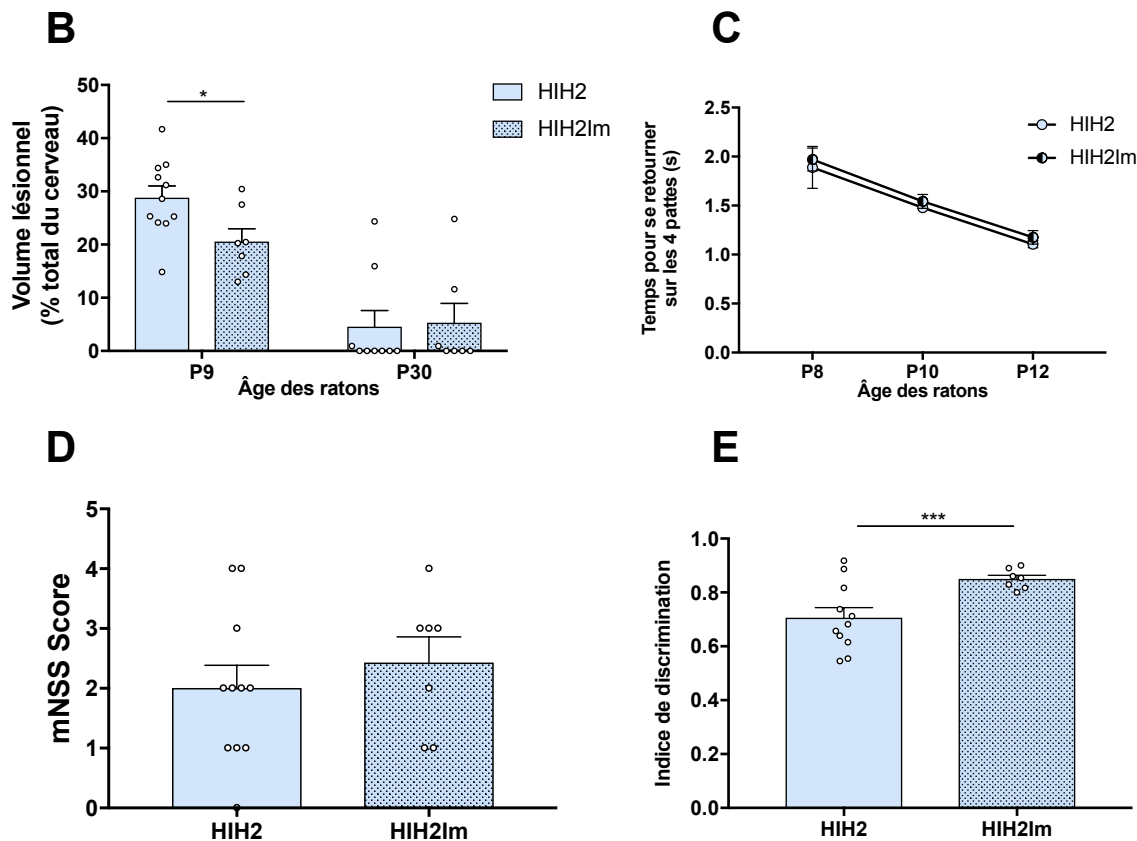


Figure 35 : Effets d'un retard de l'initiation de l'HT. (B) Quantification des volumes lésionnels cérébraux, exprimée en pourcentage (%) par rapport au volume total du cerveau, pour les deux groupes à P9 et P30). (C) Test de redressement à P8, P10, P12, pour les 2 groupes. Taux de récupération 48 h après une lésion HIN, exprimé en % pour les différents groupes. (D) Score du mNSS pour les 2 groupes. (E) Test de reconnaissance du nouvel objet évaluant la mémoire à long terme à P45, représenté par l'indice de discrimination (I). * $p < 0,05$ et *** $p < 0,001$.

4. Discussion

L'HIN est une cause majeure de mortalité chez les nouveau-nés (1-6 % des nourrissons). Les mécanismes induits par l'HIN sont bien décrits dans la littérature et impliquent de nombreuses cascades biochimiques ayant des effets délétères sur le cerveau, notamment par le biais du stress oxydatif, de l'inflammation et de la mort cellulaire, en raison de la défaillance énergétique qu'elle induit (Kohlhauser et al., 1999).

À ce jour, la seule intervention thérapeutique disponible pour atténuer les conséquences de l'HIN est l'hypothermie modérée contrôlée. Néanmoins, cette approche présente des limites, car elle s'applique essentiellement aux nouveau-nés de plus de 36 semaines de gestation ayant subi une HIN modérée à sévère. De plus, des incertitudes persistent quant au protocole de refroidissement optimal, ainsi qu'aux effets secondaires potentiels, en particulier en présence de comorbidités (Shankaran et al., 2014; Thoresen, 2015). Malgré le traitement, entre 44 % et 53 % des nouveau-nés atteints d'HIN décèdent ou développent des séquelles neurologiques graves (Rogers et al., 2014). Les objectifs de cette étude étaient de définir les protocoles d'HT les plus appropriés pour la recherche préclinique en neuroprotection dans le contexte d'HIN. Les températures rectales ont été fixées à $36,0 \pm 0,5$ °C pour la normothermie et à $32,0 \pm 0,5$ °C pour l'hypothermie. La température en normothermie a été choisie sur la base de mesures séquentielles effectuées chez des rats P7 dans leur nid. Bien qu'inférieure à

la valeur empirique de 37 °C souvent utilisée dans d'autres études précliniques (Bona et al., 1998; Conklin & Heggeness, 1971; Williams et al., 1997), elle correspond aux températures plus basses enregistrées chez des rats sains par Wood et al. (T. Wood et al., 2016). La température d'hypothermie de 32 °C a été retenue en fonction de la littérature (Bona et al., 1998; Dalen et al., 2012; Hobbs et al., 2008; Patel et al., 2015), tout en restant en dehors de la plage de normothermie observée chez les rats P7 élevés et maintenus dans des conditions de laboratoire modernes (entre 33,5 °C et 36 °C) (T. Wood et al., 2016). En général, la plage optimale pour l'HT est considérée comme étant de 2 à 6 °C en dessous de la normothermie (Gunn & Thoresen, 2006). Dans cette étude, l'écart de 4 °C entre les températures normothermiques et hypothermiques se situe dans cette plage, comparable à une plage de 33 ± 1 °C pour les nouveau-nés, basée sur une température normothermique de 37 °C.

Compte tenu de la grande variabilité des durées d'hypothermie rapportées dans les études précliniques, variant de 2 à 5 heures, cette étude avait pour objectif d'évaluer les effets des durées les plus couramment utilisées dans des conditions environnementales constantes et avec le même modèle d'HIN. En plus de mesurer l'impact des différentes durées de traitement, ce travail visait à identifier la durée optimale de l'HT pour maximiser les effets neuroprotecteurs tout en minimisant les effets secondaires sur le bien-être animal, conformément au troisième principe des 3R (Remplacement, Réduction, Raffinement).

Une autre force de cette étude réside dans les méthodologies employées. L'IRM a été utilisée comme outil non invasif, permettant un suivi longitudinal des volumes de lésions cérébrales à différents moments (P7, P9 et P30). L'intégration des analyses d'IRM avec des évaluations comportementales sur les mêmes sujets s'aligne également sur le deuxième principe des 3R, axé sur la réduction. La combinaison de l'IRM et des tests comportementaux a permis une évaluation globale des effets de l'HT à court terme (IRM à P7 et P9, tests comportementaux à P8, P10 et P12) et à long terme (IRM à P30 et tests comportementaux jusqu'à P51), couvrant les aspects structurels, moteurs et cognitifs. Cette approche longitudinale est également en accord avec les recommandations du consortium STAIR, en particulier le point 4 (Stroke Therapy Academic Industry Roundtable (STAIR), 1999), qui souligne l'importance de telles études, car les marqueurs neuropathologiques précoces ne prédisent pas toujours les résultats à long terme (Dumont et al., 2020; Burnsed et al., 2015).

Dans cette étude, nous avons montré qu'une hypothermie contrôlée modérée de 2 heures, avec une température rectale maintenue à 32 °C, suffisait à offrir une neuroprotection après une lésion hypoxique-ischémique néonatale. Prolonger la durée de l'hypothermie, dans les mêmes conditions, n'a pas amélioré cette neuroprotection et a même montré des effets délétères lorsque l'hypothermie durait 5 h. Une hypothermie de 2 h a permis une réduction des volumes de lésions cérébrales à court et à long terme. Des résultats similaires ont été observés dans un modèle de rats P7 Sprague Dawley, traités par 2 h d'hypothermie à une température inférieure de $30,0 \pm 0,5$ °C (Jatana et al., 2006). Cette conclusion est confirmée par les tests de comportement. Le test de redressement a révélé que 2 heures d'hypothermie amélioraient significativement les performances fonctionnelles. Ce groupe a également montré des scores mNSS plus bas, traduisant un moindre dommage neurologique, ainsi qu'une meilleure préservation de la mémoire à long terme.

Bien que certaines études précliniques menées sur des rats P7 aient observé des différences liées au sexe après un accident d'HIN (Fabres et al., 2022; T. R. Wood et al., 2020), nous n'avons observé aucune différence significative entre les sexes, que ce soit au niveau des volumes lésionnels ou des performances dans les différents tests comportementaux dans les différents groupes. D'autres études réalisées sur le modèle Rice-Vannucci chez le rat nouveau-né ont rapporté les mêmes résultats (Dalen et al., 2012; Fang et al., 2013). Par ailleurs, une autre étude chez des porcelets n'a également pas constaté de dimorphisme sexuel dans les lésions cérébrales suite à un accident d'HIN (Garde et al., 2019). Il faut tout de même souligner que des recherches cliniques ont montré que les nourrissons de sexe masculin semblent plus vulnérables aux lésions cérébrales et présentent des déficits

neurologiques à long terme plus marqués que les nourrissons de sexe féminin après l'accident d'HIN (Mirza et al., 2015; Hill & Fitch, 2012). En conclusion, bien que certaines données précliniques et cliniques suggèrent un dimorphisme sexuel dans les réponses aux lésions hypoxiques-ischémiques, ces différences ne sont pas toujours constatées dans les modèles animaux, ce qui souligne la nécessité de poursuivre les recherches afin de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents et leur pertinence pour la neuroprotection spécifique au sexe.

La suppression de l'activité microgliale est considérée comme un marqueur favorable (Hagberg et al., 2015) et un mécanisme clé par lequel l'HT exerce ses effets neuroprotecteurs après un épisode d'HIN (Wassink et al., 2014). Dans cette étude, nous avons démontré que 2 h de traitement hypothermique entraînaient une réduction de l'intensité de la fluorescence IBA1 dans la région CA1 de l'hippocampe, indiquant une diminution de l'activation microgliale.

Pour finir, cette étude compare les effets neuroprotecteurs de l'initiation de l'HT soit immédiatement après la sortie du caisson hypoxique (HIH2Im), soit avec un retard d'une heure (HIH2). À court terme, l'initiation immédiate de l'hypothermie (HIH2Im) a permis une réduction plus importante des volumes de lésions cérébrales par rapport à l'initiation retardée (HIH2). Toutefois, à long terme, cette différence s'efface, et les volumes de lésions des deux groupes ne sont pas statistiquement différents. En outre, le délai dans l'initiation de l'hypothermie n'a pas influencé la neuroprotection des fonctions sensori-motrices, aucune différence significative n'ayant été observée entre les deux groupes dans le test de redressement ni dans le score neurologique (mNSS). Cependant, l'hypothermie immédiate a conduit à de meilleures performances dans le test de reconnaissance du nouvel objet, qui évalue la mémoire à long terme. Ces résultats sont cohérents avec les travaux de Sabir et al., qui ont montré une diminution progressive de la neuroprotection avec un retard croissant dans l'initiation de l'hypothermie chez des rats P7 souffrant d'HIN (Sabir et al., 2012). Ces résultats concordent avec les essais cliniques qui démontrent que les nouveau-nés ayant subi des lésions hypoxiques-ischémiques présentent de meilleurs résultats lorsque le refroidissement commence dans les trois heures suivant l'événement, par rapport à ceux pour qui ce traitement est initié entre 3 et 6 h après l'HIN (Thoresen et al., 2013).

Bien que l'initiation précoce de l'HT maximise l'effet neuroprotecteur, des études cliniques soulignent les difficultés à commencer ce traitement dans la fenêtre thérapeutique optimale (moins de 6 h après l'événement hypoxique-ischémique) (Gunn & Thoresen, 2006). De plus, bien que l'hypothermie soit le traitement clinique standard pour les nouveau-nés atteints d'HIN modérée à sévère, les technologies avancées pour la délivrer et le suivi complet des nourrissons affectés sont souvent inaccessibles à de nombreux hôpitaux dans les pays à revenu faible ou intermédiaire (Enweronu-Laryea et al., 2019). Par exemple, bien que la majorité des pédiatres en Afrique du Sud reconnaissent que l'HT est efficace pour réduire les déficits neurologiques liés à l'HIN, moins de la moitié sont en mesure de l'offrir comme option thérapeutique (Joolay et al., 2012). Il est donc urgent de trouver de nouvelles pistes thérapeutiques. Cela fera l'objet du chapitre suivant.

Ce qu'il faut retenir :

- Une HT de 2 h offre une meilleure neuroprotection que celle de 5 h, en réduisant les volumes lésionnels et en améliorant les fonctions motrices et cognitives.
- Cette durée de traitement a permis de diminuer l'activation microgliale après l'accident d'HIN.
- L'initiation de l'HT une heure après l'épisode d'HIN représente une fenêtre optimale pour observer les effets neuroprotecteurs de l'HT.

La question qui se pose est de savoir si la neuroprotection observée après administration de lactate serait compatible avec l'HT dans notre modèle d'HIN chez le raton.

5. Références

- Ashwal, S., Tone, B., Tian, H. R., Chong, S., & Obenaus, A. (2007). Comparison of Two Neonatal Ischemic Injury Models Using Magnetic Resonance Imaging. *Pediatric Research*, *61*(1), 9-14.
- Bona, E., Hagberg, H., Løberg, E. M., Bågenholm, R., & Thoresen, M. (1998). Protective effects of moderate hypothermia after neonatal hypoxia-ischemia : Short- and long-term outcome. *Pediatric Research*, *43*(6), 738-745. <https://doi.org/10.1203/00006450-199806000-00005>
- Burnsed, J. C., Chavez-Valdez, R., Hossain, M. S., Kesavan, K., Martin, L. J., Zhang, J., & Northington, F. J. (2015). Hypoxia-ischemia and therapeutic hypothermia in the neonatal mouse brain—A longitudinal study. *PLoS One*, *10*(3), e0118889. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118889>
- Conklin, P., & Heggeness, F. W. (1971). Maturation of temperature homeostasis in the rat. *The American Journal of Physiology*, *220*(2), 333-336. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1971.220.2.333>
- Dalen, M. L., Liu, X., Elstad, M., Løberg, E. M., Saugstad, O. D., Rootwelt, T., & Thoresen, M. (2012). Resuscitation with 100% oxygen increases injury and counteracts the neuroprotective effect of therapeutic hypothermia in the neonatal rat. *Pediatric Research*, *71*(3), 247-252. <https://doi.org/10.1038/pr.2011.43>
- Dumont, U., Sanchez, S., Olivier, B., Chateil, J.-F., Deffieux, D., Quideau, S., Pellerin, L., Beauvieux, M.-C., Bouzier-Sore, A.-K., & Roumes, H. (2020). Maternal alcoholism and neonatal hypoxia-ischemia : Neuroprotection by stilbenoid polyphenols. *Brain Research*, *1738*, 146798. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2020.146798>
- Dumont, U., Sanchez, S., Repond, C., Beauvieux, M.-C., Chateil, J.-F., Pellerin, L., Bouzier-Sore, A.-K., & Roumes, H. (2021). Neuroprotective Effect of Maternal Resveratrol Supplementation in a Rat Model of Neonatal Hypoxia-Ischemia. *Frontiers in Neuroscience*, *14*, 616824. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.616824>
- Enweronu-Laryea, C., Martinello, K. A., Rose, M., Manu, S., Tann, C. J., Meek, J., Ahor-Essel, K., Boylan, G. B., & Robertson, N. J. (2019). Core temperature after birth in babies with neonatal encephalopathy in a sub-Saharan African hospital setting. *The Journal of Physiology*, *597*(15), 4013-4024. <https://doi.org/10.1113/JP277820>
- Fabres, R. B., Nunes, R. R., de Medeiros de Mattos, M., Andrade, M. K. G., Martini, A. P. R., Tassinari, I. D., Sanches, E. F., de Fraga, L. S., & Netto, C. A. (2022). Therapeutic hypothermia for the treatment of neonatal hypoxia-ischemia : Sex-dependent modulation of reactive astrogliosis. *Metabolic Brain Disease*, *37*(7), 2315-2329. <https://doi.org/10.1007/s11011-022-01030-4>
- Fan, X., van Bel, F., van der Kooij, M. A., Heijnen, C. J., & Groenendaal, F. (2013). Hypothermia and erythropoietin for neuroprotection after neonatal brain damage. *Pediatric Research*, *73*(1), 18-23.
- Fang, A. Y., Gonzalez, F. F., Sheldon, R. A., & Ferriero, D. M. (2013). Effects of combination therapy using hypothermia and erythropoietin in a rat model of neonatal hypoxia-ischemia. *Pediatric Research*, *73*(1), 12-17. <https://doi.org/10.1038/pr.2012.138>
- Garde, R. P. L., Cheung, P.-Y., Yaskina, M., Lee, T.-F., O'Reilly, M., & Schmölzer, G. M. (2019). Sex Differences Between Female and Male Newborn Piglets During Asphyxia, Resuscitation, and Recovery. *Frontiers in Pediatrics*, *7*, 290. <https://doi.org/10.3389/fped.2019.00290>
- Gunn, A. J., & Thoresen, M. (2006). Hypothermic neuroprotection. *NeuroRx: The Journal of the American Society for Experimental Neurotherapeutics*, *3*(2), 154-169. <https://doi.org/10.1016/j.nurx.2006.01.007>
- Hagberg, H., Mallard, C., Ferriero, D. M., Vannucci, S. J., Levison, S. W., Vexler, Z. S., & Gressens, P. (2015). The role of inflammation in perinatal brain injury. *Nature Reviews. Neurology*, *11*(4), 192-208. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2015.13>
- Hill, C. A., & Fitch, R. H. (2012). Sex Differences in Mechanisms and Outcome of Neonatal Hypoxia-Ischemia in Rodent Models : Implications for Sex-Specific Neuroprotection in Clinical Neonatal Practice. *Neurology Research International*, *2012*, 867531. <https://doi.org/10.1155/2012/867531>
- Hobbs, C., Thoresen, M., Tucker, A., Aquilina, K., Chakkarapani, E., & Dingley, J. (2008). Xenon and hypothermia combine additively, offering long-term functional and histopathologic neuroprotection after neonatal hypoxia/ischemia. *Stroke*, *39*(4), 1307-1313. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.107.499822>
- Jatana, M., Singh, I., Singh, A. K., & Jenkins, D. (2006). Combination of Systemic Hypothermia and N-acetylcysteine Attenuates Hypoxic-Ischemic Brain Injury in Neonatal Rats. *Pediatric Research*, *59*(5), 684-689. <https://doi.org/10.1203/01.pdr.0000215045.91122.44>
- Joolay, Y., Harrison, M. C., & Horn, A. R. (2012). Therapeutic hypothermia and hypoxic ischemic encephalopathy : Opinion and practice of pediatricians in South Africa. *Journal of Perinatal Medicine*, *40*(4), 447-453. <https://doi.org/10.1515/jpm-2011-0292>

- Kohlhauser, C., Kaehler, S., Mosgoeller, W., Singewald, N., Kouvelas, D., Prast, H., Hoeger, H., & Lubec, B. (1999). Histological changes and neurotransmitter levels three months following perinatal asphyxia in the rat. *Life Sciences*, *64*(23), 2109-2124. [https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(99\)00160-5](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(99)00160-5)
- Mirza, M. A., Ritzel, R., Xu, Y., McCullough, L. D., & Liu, F. (2015). Sexually dimorphic outcomes and inflammatory responses in hypoxic-ischemic encephalopathy. *Journal of Neuroinflammation*, *12*(1), 32. <https://doi.org/10.1186/s12974-015-0251-6>
- Patel, S. D., Pierce, L., Ciardiello, A., Hutton, A., Paskewitz, S., Aronowitz, E., Voss, H. U., Moore, H., & Vannucci, S. J. (2015). Therapeutic Hypothermia and Hypoxia-Ischemia in the Term-equivalent Neonatal Rat : Characterization of a Translational Pre-clinical Model. *Pediatric Research*, *78*(3), 264.
- Rogers, E. E., Bonifacio, S. L., Glass, H. C., Juul, S. E., Chang, T., Mayock, D. E., Durand, D. J., Song, D., Barkovich, A. J., Ballard, R. A., & Wu, Y. W. (2014). Erythropoietin and hypothermia for hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatric Neurology*, *51*(5), 657-662.
- Roumes, H., Dumont, U., Sanchez, S., Mazuel, L., Blanc, J., Raffard, G., Chateil, J.-F., Pellerin, L., & Bouzier-Sore, A.-K. (2021). Neuroprotective role of lactate in rat neonatal hypoxia-ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, *41*(2), 342-358. <https://doi.org/10.1177/0271678X20908355>
- Rumpel, H., Nedelcu, J., Aguzzi, A., & Martin, E. (1997). Late Glial Swelling after Acute Cerebral Hypoxia-Ischemia in the Neonatal Rat : A Combined Magnetic Resonance and Histochemical Study. *Pediatric Research*, *42*(1), 54-59. <https://doi.org/10.1203/00006450-199707000-00009>
- Sabir, H., Scull-Brown, E., Liu, X., & Thoresen, M. (2012). Immediate hypothermia is not neuroprotective after severe hypoxia-ischemia and is deleterious when delayed by 12 hours in neonatal rats. *Stroke*, *43*(12), 3364-3370. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.112.674481>
- Saliba, E., & Debillon, T. (2010). [Hypothermia for hypoxic-ischemic encephalopathy in fullterm newborns]. *Archives De Pediatrie: Organe Officiel De La Societe Francaise De Pediatrie*, *17 Suppl 3*, S67-77. [https://doi.org/10.1016/S0929-693X\(10\)70904-0](https://doi.org/10.1016/S0929-693X(10)70904-0)
- Shankaran, S., Laptook, A. R., Pappas, A., McDonald, S. A., Das, A., Tyson, J. E., Poindexter, B. B., Schibler, K., Bell, E. F., Heyne, R. J., Pedroza, C., Bara, R., Van Meurs, K. P., Grisby, C., Huitema, C. M. P., Garg, M., Ehrenkranz, R. A., Shepherd, E. G., Chalak, L. F., ... Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. (2014). Effect of depth and duration of cooling on deaths in the NICU among neonates with hypoxic ischemic encephalopathy : A randomized clinical trial. *JAMA*, *312*(24), 2629-2639. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.16058>
- Stroke Therapy Academic Industry Roundtable (STAIR). (1999). Recommendations for standards regarding preclinical neuroprotective and restorative drug development. *Stroke*, *30*(12), 2752-2758.
- Thoresen, M. (2015). Who should we cool after perinatal asphyxia? *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*, *20*(2), 66-71. <https://doi.org/10.1016/j.siny.2015.01.002>
- Thoresen, M., Tooley, J., Liu, X., Jary, S., Fleming, P., Luyt, K., Jain, A., Cairns, P., Harding, D., & Sabir, H. (2013). Time is brain : Starting therapeutic hypothermia within three hours after birth improves motor outcome in asphyxiated newborns. *Neonatology*, *104*(3), 228-233. <https://doi.org/10.1159/000353948>
- Trescher, W. H., Ishiwa, S., & Johnston, M. V. (1997). Brief post-hypoxic-ischemic hypothermia markedly delays neonatal brain injury. *Brain & Development*, *19*(5), 326-338.
- Wassink, G., Gunn, E. R., Drury, P. P., Bennet, L., & Gunn, A. J. (2014). The mechanisms and treatment of asphyxial encephalopathy. *Frontiers in Neuroscience*, *8*, 40. <https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00040>
- Williams, G. D., Dardzinski, B. J., Buckalew, A. R., & Smith, M. B. (1997). Modest hypothermia preserves cerebral energy metabolism during hypoxia-ischemia and correlates with brain damage : A 31P nuclear magnetic resonance study in unanesthetized neonatal rats. *Pediatric Research*, *42*(5), 700-708. <https://doi.org/10.1203/00006450-199711000-00024>
- Wood, T., Hobbs, C., Falck, M., Brun, A. C., Løberg, E. M., & Thoresen, M. (2018). Rectal temperature in the first five hours after hypoxia-ischemia critically affects neuropathological outcomes in neonatal rats. *Pediatric Research*, *83*(2), 536-544. <https://doi.org/10.1038/pr.2017.51>
- Wood, T., Osredkar, D., Puchades, M., Maes, E., Falck, M., Flatebø, T., Walløe, L., Sabir, H., & Thoresen, M. (2016). Treatment temperature and insult severity influence the neuroprotective effects of therapeutic hypothermia. *Scientific Reports*, *6*, 23430. <https://doi.org/10.1038/srep23430>
- Wood, T. R., Gundersen, J. K., Falck, M., Maes, E., Osredkar, D., Løberg, E. M., Sabir, H., Walløe, L., & Thoresen, M. (2020). Variability and sex-dependence of hypothermic neuroprotection in a rat model of neonatal hypoxic-ischaemic brain injury : A single laboratory meta-analysis. *Scientific Reports*, *10*(1), 10833. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67532-2>

Optimizing therapeutic hypothermia conditions in a translational preclinical model of neonatal hypoxia-ischemia in rats

Ifrah Omar Ibrahim¹, Pierre Goudeneche¹, Stéphane Sanchez¹, Luc Pellerin², Jean-François Chateil¹, H el ene Roumes¹, & Anne-Karine Bouzier-Sore^{1,*}.

¹ Univ. Bordeaux, CNRS, CRMSB, UMR 5536, F-33000 Bordeaux, France

² IRMETIST, U1313, University of Poitiers and CHU of Poitiers, F-86021 Poitiers, France

* Corresponding author: Anne-Karine Bouzier-Sore, Univ. Bordeaux, CNRS, CRMSB, UMR 5536, F-33000 Bordeaux, France. Tel: +33 (0) 5 47 30 44 24. Fax: +33 (0) 5 57 57 45 56. E-mail:

akb@rmsb.u-bordeaux.fr

<https://orcid.org/0000-0002-3470-0940>

Abstract

Our study aims to determine the optimal duration of therapeutic hypothermia for neonatal hypoxia-ischemia in 7-day-old postnatal (P7) rat pups. We compared hypothermia durations of 2, 3, and 5 hours. Short-term results demonstrated that 2 hours of hypothermia significantly reduced brain lesion size and improved functional recovery compared to the 3- and 5-hour durations, as well as the non-treated group. Long-term assessments at P30 confirmed that the 2-hour hypothermia continued to be more effective, resulting in significantly smaller lesion volumes and better neurological scores. At P45, cognitive function tests, including novel object recognition, showed superior neuroprotection in the 2-hour hypothermia group, as evidenced by improved cognitive performance relative to the other groups. Histological analysis further revealed that 2-hour hypothermia provided greater preservation of neurons and reduced microglial activation, with lower levels of apoptosis and neuroinflammation markers. Additionally, the immediate initiation of hypothermia post-HI modestly enhanced neuroprotection, particularly by reducing brain lesion volumes and improving certain cognitive outcomes. These findings suggest that a 2-hour hypothermia duration offers the most effective neuroprotection in this preclinical model, emphasizing the critical role of both timing and duration in optimizing therapeutic outcomes.

Introduction

The perinatal period is a stage of life marked by extreme vulnerability. Following prematurity, neonatal hypoxia-ischemia (NHI) stands as the leading cause of perinatal mortality (6 % births in

developed countries and up to 26 % in developing countries) [1, 2]. This condition is responsible for approximately 600,000 newborn deaths annually, with at least an equal number developing severe motor and cognitive impairments [3]. Neonatal hypoxia-ischemia is characterized by a strong reduction in cerebral blood flow, resulting in a failure to deliver oxygen and energy sources (glucose and ketone bodies). This event is followed by two energetic deficit periods separated by a latency phase, which corresponds to the therapeutic window. The only neuroprotective intervention that may improve the outcome for neonates after an hypoxic-ischemic event is therapeutic hypothermia [4], even if its application is limited to moderate to severe hypoxic-ischemic episodes and to neonates older than 36 weeks of gestational age (due to a high risk of collateral damages such as intracerebral haemorrhages) [5]. It must be also noted that this therapy is effective only after acute perinatal events, such as placental abruption or umbilical cord prolapse, and does not improve the prognostic if the hypoxic-ischemic insult occurred during the antenatal period or is due to chronic insults [6]. This procedure can be performed either through whole-body cooling or selective head cooling ($33 \pm 1^\circ\text{C}$, for 72 hours, followed by slow and gradual rewarming of the infant over 6 to 12 hours [7, 8]). Both methods are used in clinical settings without preference, as neither has demonstrated superior

outcomes [9, 10]. While whole-body cooling might be more in achieving deep brain cooling [11], selective head cooling can limit the adverse effects of systemic cooling [12], even though these effects are reversible and generally moderate compared to the benefits. Among the side effects of hypothermia, sinus bradycardia (a decrease in heart rate of 14 beats per minute per degree below 37 °C), arterial hypotension due to hypovolemia, which may require the administration of inotropes, haematological abnormalities (mild thrombocytopenia), and pulmonary hypertension are frequently reported [13]. Although the side effects of therapeutic hypothermia are reversible, this treatment has limitations in eligible neonates, as 44-53% do not respond favorably [14].

The mechanisms involved in the neuroprotective effects of hypothermia are multifactorial. In a preclinical model of NHI in lambs, it was first demonstrated that neuroprotection of therapeutic hypothermia acts by preventing secondary cytotoxic edema and reducing neuronal loss [15]. When cooling down the baby, one of the primary benefits is a reduction in brain energetic metabolism by 5 to 8 % per °C lost [16]. This decrease in oxidative metabolism during the reperfusion period has been associated with a reduction of free radical production, as well as a decrease in membrane lipid peroxidation [17]. Moreover, during the latency phase (around 6 hours post-hypoxia-ischemia), therapeutic hypothermia has been shown to decrease the pro-apoptotic caspase-3 activity, thereby limiting neuronal death [18]. Reducing brain temperature also helps mitigate neuroinflammatory reactions, thus protecting mitochondrial oxidative phosphorylation [19]. Numerous studies have since demonstrated the neuroprotective role of hypothermia in the context of neonatal hypoxia-ischemia. In P7 (7 days post-natal) rat pups subjected to a hypoxic-ischemic event, moderate hypothermia (31 to 34 °C) reduced cortical brain damage [20], as well as damage in the hippocampus, basal ganglia and thalamus [21], which was associated with the recovery of sensorimotor abilities [22]. Similar results have

been reported in lambs [23] and piglets [24], two species more closely related to human in terms of neurodevelopment [25, 26]. Although most preclinical data have demonstrated the neuroprotective role of hypothermia, the decrease in brain temperature (- 2 °C) could induce physiological stress, leading to prolonged elevation of circulating cortisol levels and ultimately increased neuronal loss, as demonstrated in lambs [27, 28].

Significant variability exists in the conditions for implementing hypothermia in all preclinical studies. Focusing on studies involving rats, which are the most commonly used animal model for evaluating therapeutic strategies, the primary duration for hypothermia in the context of neonatal hypoxia-ischemia are 2 hours [29], 3 hours [30-32], or 5 hours [33-38]. Unfortunately, these various durations were tested in separate studies, each involving different experimental variables, making it difficult to directly compare the studies or determine the optimal duration of therapeutic hypothermia. Consequently, it remains unclear which hypothermia application time provides the most effective neuroprotection. Moreover, in accordance with the new standards of animal experimentation, which emphasize compliance with the 3Rs (Replacement, Reduction, and Refinement), the present work aims at defining the threshold of hypothermia that allows for the measurement of beneficial effects, while minimizing potential pain, suffering, or distress, thereby enhancing animal welfare. Finally, the present work adheres to point No. 4 of the STAIR consortium recommendations (Stroke Therapy Academic Industry Roundtable): *“Outcome measures should include both infarct volume and functional assessment in both acute and long-term phase animal studies”* [39]. The effect of therapeutic hypothermia was therefore evaluated from the neonatal stage (P7) to adulthood (P51), at the anatomical level by non-invasive measurement of brain hypoxic-ischemic lesion volumes, as well as at the functional level through the analysis of behavioral tests (early reflexes, modified

Neurological Severity Score, novel object recognition, anxiety and depression).

Materials and methods

Experimental design and groups are presented in Figure 1. For this study, 6 groups of rat pups were considered, depending of the hypoxia-ischemia event and the duration of the therapeutic hypothermia. For sham group, the left common carotid artery was only exposed, without hypoxia-ischemia insult or hypothermia and was kept in normothermia during 2 h after the surgery. HIN group underwent the hypoxic-ischemic event, MRI exam and was kept in

normothermia during 2 h after the MRI sequence. HIH2, HIH3, and HIH5 groups underwent the hypoxic-ischemic event as well as MRI exam and then were kept in therapeutic hypothermia for 2 h, 3 h, and 5 h respectively. The HIH2Im group underwent hypoxia-ischemia and were immediately kept in hypothermia for 2 h, after leaving the hypoxic chamber (without MRI at P7).

Animals

All animal procedures were conducted in accordance with the Animal Experimentation Guidelines of the

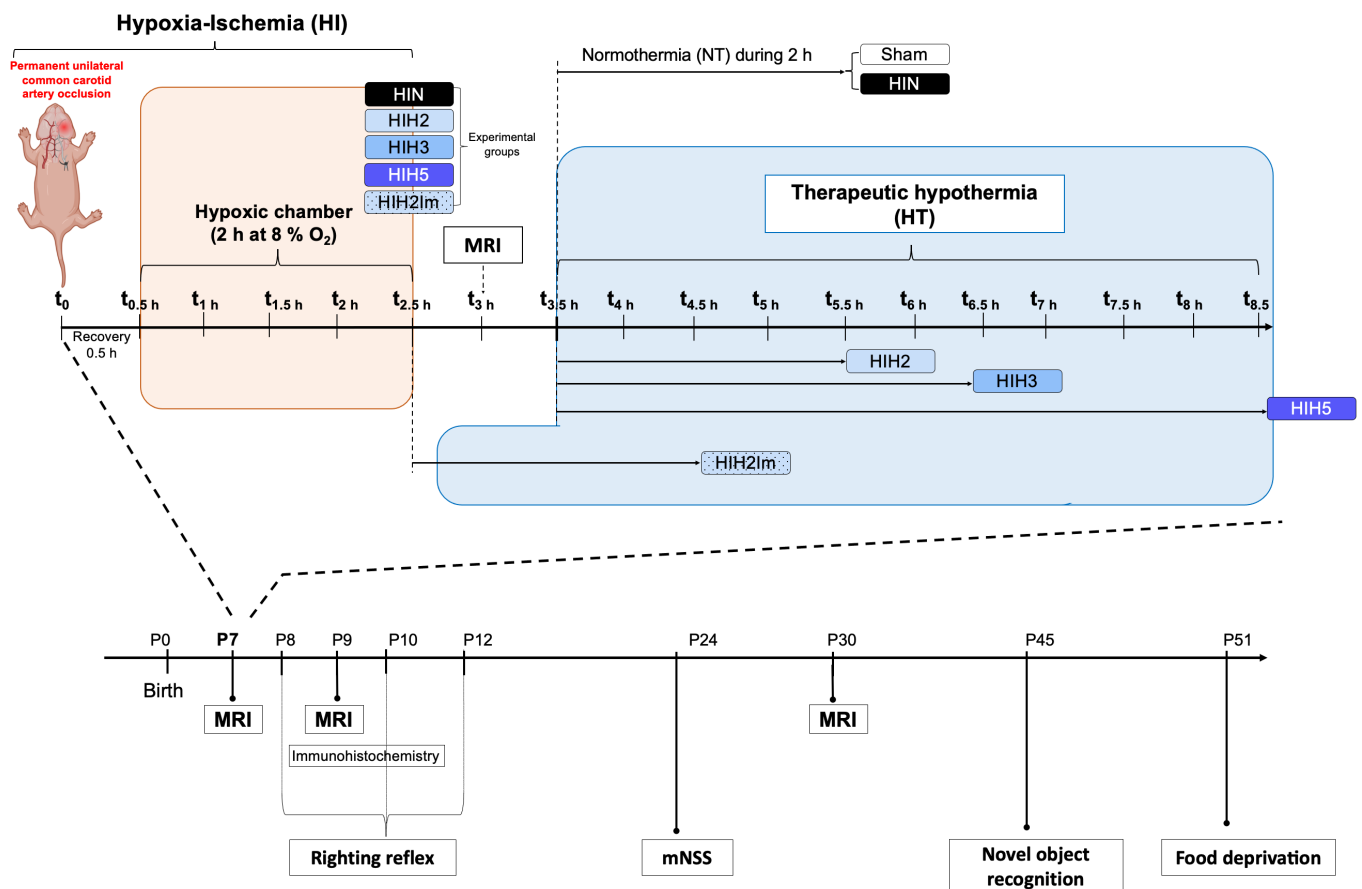


Figure 1: Experimental design and groups. P7 Wistar pups ($n = 67$) were randomly divided into 6 groups: sham operated pups (exposition of the left common carotid artery, without any ligation) without any hypoxia-ischemia, followed by controlled normothermia for 2 h (sham, $n = 13$); hypoxic-ischemic control group underwent to the hypoxic-ischemic event (ligation of the left common carotid artery and 2 h at 8% of O_2), MRI 3 h after the surgery, followed by controlled normothermia for 2 h (HIN, $n = 14$); hypoxic-ischemic 2 h-treated group undergone the hypoxic-ischemic event (ligation of the left common carotid artery and 2 h at 8% of O_2), MRI 3 h after the surgery, followed by controlled therapeutic hypothermia for 2 h (HIH2 = 11); hypoxic-ischemic 3 h-treated group undergone the hypoxic-ischemic event (ligation of the left common carotid artery and 2 h at 8% of O_2), MRI 3 h after the surgery, followed by controlled therapeutic hypothermia for 3 h (HIH3 = 11); hypoxic-ischemic 5 h-treated group undergone the hypoxic-ischemic event (ligation of the left common carotid artery and 2 h at 8% of O_2), MRI 3 h after the surgery, followed by controlled therapeutic hypothermia for 3 h (HIH5 = 11); immediately treated group undergone the hypoxic-ischemic event (ligation of the left common carotid artery and 2 h at 8% of O_2) immediately followed by controlled therapeutic hypothermia for 2 h (HIH2Im = 7). Longitudinal evolution of the brain lesion volume was assessed by MRI at P9 and P30. For behavioral aptitudes, righting reflex was evaluated at P8,

P10 and P12. The mNSS test was performed at P24. Cognition abilities of the pups was evaluated at P45 for the memory and P51 for the anxiety and the depressive states.

European Communities Council Directive of the 24 November 1986 (86/609/EEC). Protocols met the ethical guidelines of the French Ministry of Agriculture and Forest and the ARRIVE guidelines and were approved by the Bordeaux ethical committee for animal research, n°C2EA-50 (authorization n°37955). Pregnant Wistar RJ-HAN females (Charles River, France) were received on gestational day 16 and housed in standard conditions (12:12h light:dark cycle, food and water *ad libitum*).

Model of neonatal hypoxic-ischemic brain injury The neonatal hypoxic-ischemic event was conducted according to previously outlined procedures [40]. Ischemia was induced by permanently ligating the left common carotid artery under anaesthesia with 4% isoflurane for induction and 1.5% for maintenance. Throughout the procedure, the physiological temperature of the pups was maintained constant using a rectal probe connected to a heating mat, with surgery duration not exceeding 14 minutes per pup. Following surgery, the pups were subjected to a 30-minute period in a heated environment for recovery. Hypoxia was induced for 2 hours in a hypoxic chamber containing $8\% \pm 0.2$ O₂ and 92% N₂ with the chamber temperature set at 33°C to maintain a rectal temperature of the pups at $36.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ and 80% humidity. For the sham group, only the left common carotid artery was exposed without the hypoxia-ischemia insult. After a 30-minute recovery period, the pups were kept separated from the mother in a heated environment ($33 \pm 1^\circ\text{C}$) for 2 hours.

Optimal duration of hypothermia treatment

The most commonly used hypothermia durations in the literature 2 h, 3 h, and 5 h were tested. For all treated groups, except the HIH2Im group, pups were individually placed in a 400-ml beaker within a refrigerated water bath with circulating water, 3.5 hours after ligation of the common carotid artery. Rectal temperatures were recorded every 10

minutes over the total duration of the hypothermia period (Figure 2A). The targeted rectal temperature was $32.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ during the 2, 3, or 5 hours of hypothermia. This temperature was reached within the first 20 minutes. For the HIH2Im group, pups were immediately placed in the beaker located in the refrigerated water bath for 2 hours after exiting the hypoxic chamber. In the normothermia condition (HIN and sham groups), pups were placed individually in a 400-ml beaker within a water bath at 36.5°C (rectal temperature was monitored,

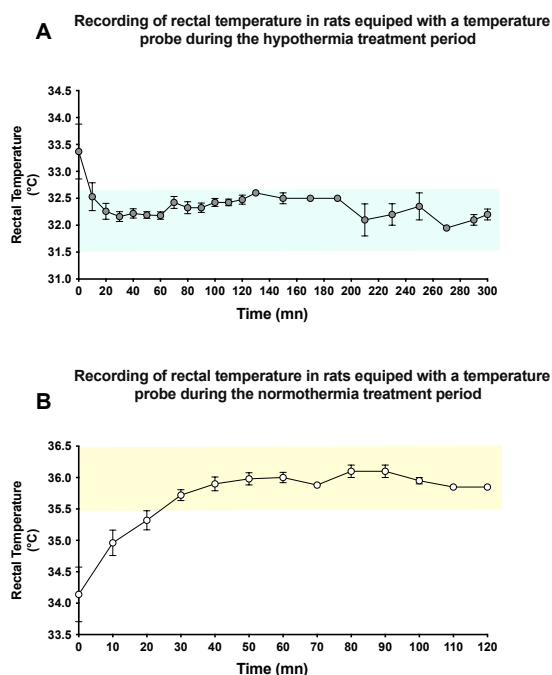


Figure 2: Monitoring of rectal temperature during hypothermia (A) or normothermia (B) procedure. targeted temperature was $36.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ for 2 hours before returning to their dams. The rectal temperature for normothermia was determined based on serial temperature measurements from P7 nesting pups (Figure 2B).

In vivo MRI acquisitions and analysis

MRI scans were conducted using a horizontal 4.7T Biospec 47/50 system (Bruker, Ettlingen, Germany) equipped with a 12-cm BGA12S gradient system (660 mT/m). The first magnetic resonance diffusion-weighted imaging (DWI) was systematically acquired three hours after the common carotid artery ligation at P7. Two additional DWI were performed, one 48 hours after the hypoxic-ischemic insult (P9) and the other 23 days later (P30). Throughout all acquisitions, the pups were

anesthetized with isoflurane (4% for induction and 1.5% for maintenance). Respiration was monitored by a ventral pressure sensor, and body temperature was maintained at $35.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ using a water-heated MRI bed. Anatomical T2-weighted images of the brain were obtained using a Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement (RARE) sequence (20 axial slices, 0.7 mm thick, echo time (TE) 50 ms, repetition time (TR) 3000 ms, total duration 4 min 48 s). Brain lesions were assessed using DWI. DWI was performed using the following parameters: 20 continuous axial slices of 0.7 mm, b-value 1000 s/mm^2 , TE 24 ms, TR 2 s, 30 directions, $\Delta = 8.11 \text{ ms}$, $\delta = 2.5 \text{ ms}$, total duration 17 min 04 s. Measurements were performed using Paravision 6.0.1 software (Bruker BioSpin, Karlsruhe, Germany). Lesion volumes were measured at P7, P9, and P30 on the diffusion-weighted images. For each rat, for each slice, and across the 20 adjacent slices per rat, regions of interest (ROI) were manually delineated to encompass the global brain area and injured area, respectively. Volumes were then calculated by considering the thickness of each slice (0.7 mm). Lesion volumes were expressed as a percentage of the total brain volume.

Behavioral tests

The cognitive-sensory-motor functions of pups were assessed by a series of behavioral tests from P8 to P51. [40-42].

Righting reflex (P8, P10, P12): This test was conducted to examine the early motor coordination of pups after exposure to HI. Pups were placed on the back and the time required to turn over on their 4 paws was recorded in seconds (sec). Each pup was given three trials and the mean time to perform the reflex was calculated.

mNSS (modified Neurological Severity score) (P24): This test was performed to assess neurological function of the pups. It allows the evaluation of motor, sensory, equilibrium and reflex aptitudes of the juvenile pups. The rats were assessed individually through different tasks. Any unsuccessful task was penalized with points. The sum of all the points scored gives each rat a score and evaluates its neurological impairment: mNSS < 1: no impairment; 1–6: middle impairment; 7–12: moderate impairment and > 13: severe impairment.

Novel object recognition (P42-P45) [43]: Long-term, hippocampal-dependent memory was evaluated utilizing the novel object recognition test,

conducted over a period of 4 days. On the first day, a habituation period occurred in an open field measuring 50 cm x 50 cm, lasting for 5 minutes. On the second and third days, the pups were provided with the opportunity to freely explore two identical objects for 5 minutes each day. On the final day of the test, one of the familiar objects was substituted with a visually distinct new object. Pups were allowed to freely explore the objects for 5min. This procedure was video-recorded. Three index were defined as parameters for evaluation: the discrimination index, which evaluates the additional time the animal spends on the new object; varies from -1 (the animal only explores the old object) to 1 (the animal only explores the new object): $([\text{time spent exploring the new object} - \text{time spent exploring the familiar object}] / [\text{time spent exploring the new object} + \text{time spent exploring the familiar object}])$; the recognition index, which evaluates the proportion of time the animal spends on the new object: $(\text{time spent exploring the new object}) / (\text{time spent exploring new the object} + \text{time spent exploring the familiar object})$ and the exploration index, which evaluates the total exploration time: $(\text{time spent exploring new the object} + \text{time spent exploring the familiar object})$.

Food deprivation test (P51): The depressive state of adult rats was assessed utilizing the food deprivation test, which lasted a duration of 4 days. In the week preceding the test, the daily consumption of food by the rats was measured. On the first and second days of the test, the food ration provided to the rats was reduced by 20%, while on the third day, it was decreased by 80%. On the fourth day, the rats were placed within an open field with black flooring and walls. Within the center of the open field, a Petri dish containing pellets previously soaked in 50% sucrose water was placed. The following parameters were measured: (1) times per minute the animal is positioned on its hind legs without touching the edges; (2) times per minute the animal smelled and touched, but did not eat, food; (3) time to eat the pellets. Once the animal has eaten a pellet, the test is stopped. Bruxism was also noted and was considered a symptom of depression and anxiety.

Brain removal for histology and immunochemistry

Postnatal day 9 pups (n = 3 per group) were deeply anesthetized with a mixture of Ketamine Xylazine, an intracardiac perfusion of PBS (phosphate buffer saline during 10 min, 50 ml) followed by perfusion of PFA (paraformaldehyde during 10 min, 50 ml) was performed. The brains were then extracted and incubated overnight in PFA at 4°C before incubation in a PBS 1X- sucrose 30% (48 h, 4°C). The brains were frozen with nitrogen vapors and kept at -80°C until they were cut into sections with a cryostat.

Nissl Staining

Nissl staining was performed to estimate and compare cell death between the different conditions as previously described [42]. In summary, 16 µm thick brain sections at P9 were stained with cresyl violet (0.5%, Sigma-Aldrich, France) for a duration of 10 min and washed in distilled water for 10 s. Subsequently, the sections underwent dehydration in 70%, 95% and 100% ethanol (2 min each), defatting in xylene and were mounted on coverslips. Only intact neurons with a clearly defined cell body and nucleus were counted

Immunohistochemistry

For evaluation of cellular degeneration, microglia activation and polarization, 16 µm cryostat sections taken at the hippocampal and cortex levels were used. Briefly, brain sections were thawed at 37°C for 15 min, washed in phosphate-buffered saline (PBS) six times over a period of 30 min, and then incubated in blocking buffer (PBS containing 3% BSA and 0.3% Triton X-100, Sigma) for 1 ½ hour at room temperature (RT). Subsequently, the sections were incubated with primary antibodies (Table 1) overnight at 4°C in blocking buffer. Following incubation, they were rinsed six times in PBS over a 30-minute period and then incubated for 1 hour at room temperature (RT) with secondary antibodies conjugated with Alexa Fluor directed against goat (1:500; Alexa Fluor 488, #Ab150129) and rabbit (1:500; Alexa Fluor 568, #Ab175470). After six additional washes in PBS, slides were mounted in VECTASHIELD mounting medium containing 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Vector Laboratories, Eurobio, France) and stained for the nuclei. Images were captured using 20x and 40x objective with Eclipse 90i (Nikon) microscope.

Host/ antibody	Primary	Producer	Anticorps Type	Dilution
Goat/ Anti-IBA1		Abcam	Monoclonal	1:1000
Rabbit/Anti-CD86		Proteintech	Polyclonal	1:4000
Rabbit/ Anti-Mannose receptor (CD206)		Abcam	Polyclonal	1:10000

Rabbit/ Caspase 3	Anti-	Abcam	Polyclonal	1:500
-------------------	-------	-------	------------	-------

Table 1: Primary antibodies used for stainings.

Quantification of cell loss, microglia activation and polarization

Image acquisition of the brain sections was performed using NIS Elements 4.30 software. Image processing was conducted with ImageJ software. Initially, three fluorescence images were obtained: the first in the DAPI fluorescence channel, the second in the FITC fluorescence channel, and the third in the Cyanine 3 fluorescence channel. A quantification of the fluorescence intensity of the markers was performed on three brain sections from the ipsilateral hemisphere. Cellular loss was evaluated in Caspase3-stained tissue sections, while microglia activation and polarization were assessed in tissue sections stained with Iba1 and CD86/CD206. The average values were then calculated for each condition using this equation: Integrated density – (Area of selected cell X Mean fluorescence of background readings).

Statistical analysis

Except for bruxism, all data are presented as mean ± s.e.m. For Bruxism, data are presented as mean with range. Except for the comparisons between the HIH2 and HIH2Im groups, as well as between the males and females within each group, statistical analyses were performed with GraphPad Prism v7 using ANOVA non-parametric test (one-way analysis of variance, multiple comparisons followed by Fisher's LSD test). Comparison between HIH2 and HIH2Im groups and between the males and females were performed using Student Unpaired t-test. A p < 0.05 was considered statistically significant.

Results

Optimal hypothermia duration for short-term neuroprotection

The short-term neuroprotection of the different durations of therapeutic hypothermia was evaluated by diffusion MRI for monitoring cerebral lesion volume and by the righting reflex for functional evaluation in newborns (Figure 3). Diffusion MRI was performed at P7 and P9 and brain lesions volumes were measured on DWI (Figure 3A). At P7, on the day of the hypoxic-ischemic event, during MRI acquisitions, no pup has yet been treated with therapeutic hypothermia; no

significant difference was thus found for this time point (Figure 3B). At P9, pups in the HIH2 group exhibited smaller brain lesion volumes compared to those in the HIN group (brain lesion volumes: $29 \pm 2\%$ for the HIH2 group versus $39 \pm 2\%$ for the HIN group) and the HIH5 group (brain lesion volumes: $29 \pm 2\%$ for the HIH2 group versus $35 \pm 2\%$ for the HIH5 group). No significant difference in the brain lesion volumes could be demonstrated between the HIN group and the other therapeutic hypothermia duration (HIN vs. HIH3 and HIH5; Figure 3B). Moreover, pups in the HIH2 group presented a better recovery rate 48 h after HI than the pups in the other groups (recovery rate: $35 \pm 4\%$; $23 \pm 2\%$; $22 \pm 3\%$; $17 \pm 2\%$ for HIH2, HIH3, HIH5 and HIN groups respectively) (Figure 3C). Righting reflex was performed from P8 to P12 (Figure 3D). At P8, whatever the considered group except, the sham group, all pups showed the same performance in this early reflex test. At P10, the groups treated with therapeutic hypothermia presented the same performance, which was better than the HIN group even not as good as the sham group. At P12, the HIH2 group presented better aptitudes than the HIN group as well as the other groups treated with therapeutic hypothermia, even if it did not reach the same level of performance measured in the sham group. Furthermore, we observed no sex-specific difference between all groups neither for brain lesions at P9 nor for early reflex test (Suppl Figures 1 et 3).

Optimal hypothermia duration for long-term neuroprotection

Diffusion MRI at P30 allowed to evaluate the long-term lesion volumes (Figure 4A). Only the HIH2 group presented lesion volumes significantly smaller than those of the HIN group (brain lesion volumes: $17 \pm 4\%$ vs. $5 \pm 3\%$, for HIN and HIH2, respectively) (Figure 4B). Additionally, the HIH2 group exhibited smaller lesion volumes compared to the HIH5 group (brain lesion volumes: $5 \pm 3\%$ vs. $19 \pm 5\%$, for HIH5 and HIH2, respectively). Furthermore, the HIH2 presented a better recovery rate compared to HIH5 as well as the HIN group (Recovery rate: $91 \pm 6\%$; $58 \pm 11\%$; $63 \pm 7\%$ for HIH2, HIH5 and HIN groups respectively) (Figure 4C). No significant difference in brain lesion volumes and recovery rate were observed between the HIH2 and HIH3 groups. For each experimental group, no sex differences in brain lesion volumes were observed (Supplementary Figure 2). These data were completed by behavioral tests, using the mNSS (Figure 4D). Neither the HIN group nor the groups treated with the different durations of therapeutic hypothermia managed to perform as well as the sham group. All the treated groups with hypothermia showed better aptitudes for the mNSS compared to HIN group (mNSS: 6.2 ± 0.3 ; 2 ± 0.4 ; 3.3 ± 0.3 ; 4.3 ± 0.4 , for the HIN, HIH2, HIH3 and HIH5 groups, respectively) (Figure 4D). No sex differences were evidence in the mNSS (Supplementary Figure 4).

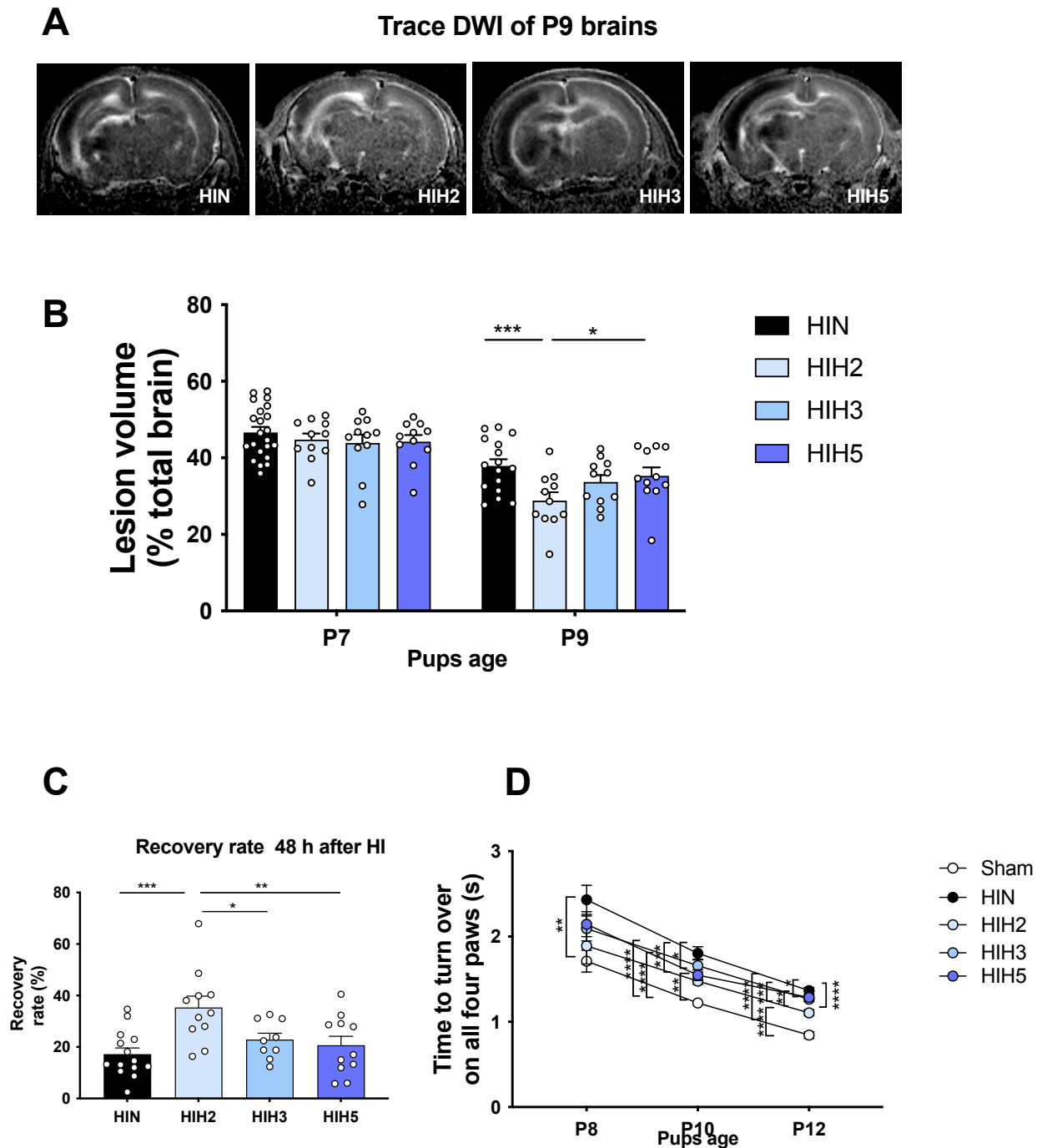


Figure 3: Evaluation of different therapeutic hypothermia durations for short-term neuroprotection. (A) DWI of P9-pup brains, acquired 3 h after the surgery for the HIN, HIH2, HIH3, and HIH5 groups. (B) Quantifications of brain lesion volumes, express in % relative to total brain volume, for the different groups. (C) Recovery rate (between P7 and P9) after HI injury, express in %, for the different groups. (D) Righting reflex test at P8, P10, P12, for the different groups. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$.

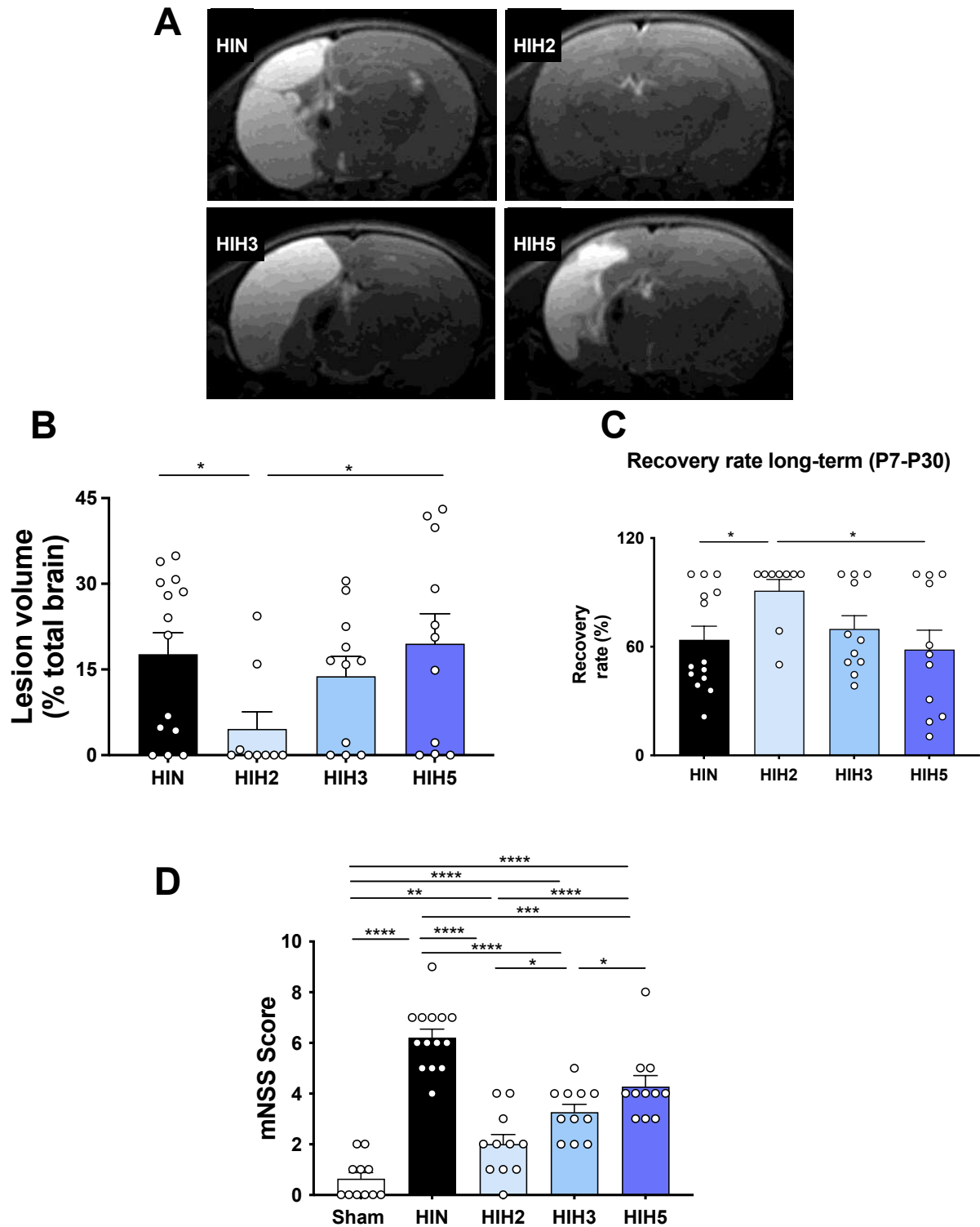


Figure 4: Evaluation of different therapeutic hypothermia durations for long term neuroprotection. (A) T2-RARE MRI of P30 pup brains, acquired 23 days after the HI event for the HIC, HIH2, HIH3, and HIH5 groups. (B) Quantifications of brain lesion volumes, express in % relative to total brain volume, for the different groups. (C) Recovery rate after HI injury (between P7 and P30), express in %, for the different groups. (D) mNSS at P24, for the different groups. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ and **** $p < 0.0001$.

Among the therapeutic hypothermia-treated groups, the HIH2 group performed the best, with a significantly better score than the HIH3 and the HIH5 groups.

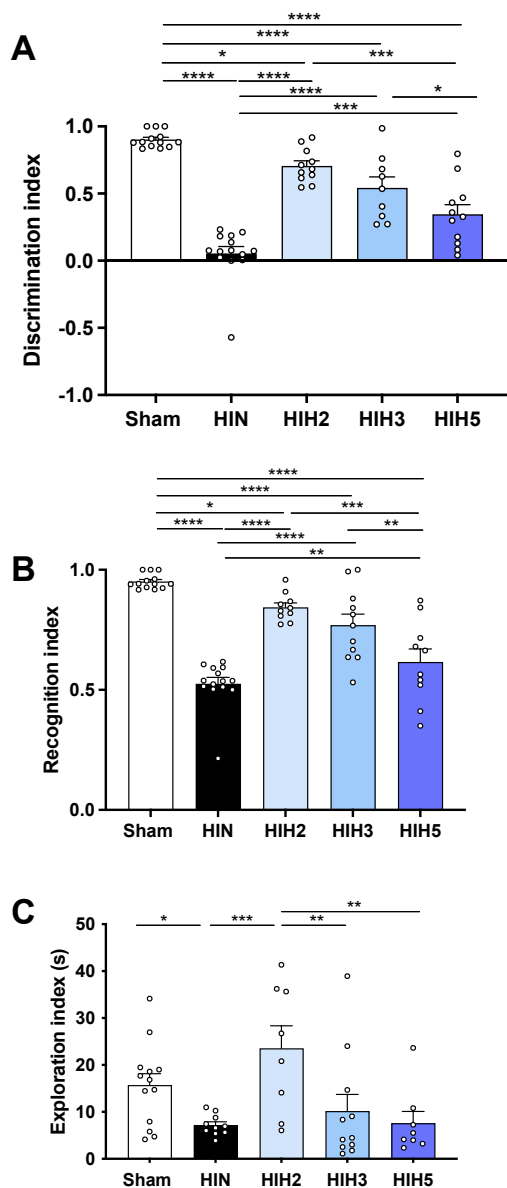


Figure 5: Evaluation of the different therapeutic hypothermia durations on long-term memory impairment (P45). (A) Discrimination index. (B) Recognition index. (C) Exploration index. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$.

Optimal hypothermia duration for cognitive function preservation

Since neonatal hypoxia-ischemia is responsible for an impairment of cognitive functions, the neuroprotective effects of therapeutic hypothermia on long-term memory were first evaluated using the novel object recognition test at P45 (Figure 5). Compared to the sham group, the discrimination index

was the worst for the HIN group (0.90 ± 0.02 vs. 0.05 ± 0.05 , respectively). For all the hypothermia-treated groups, the discrimination index was higher (0.71 ± 0.04 ; 0.54 ± 0.1 and 0.34 ± 0.1 , for HIH2, HIH3, and HIH5 groups, respectively). Moreover, the discrimination index of the HIH2 group was significantly better than that of the HIH5 group. No sex differences were found between experimental groups for the discrimination index (Supplementary Figure 5). The sham group displayed also the best recognition index, while the worst was measured in the HIN group. Hypothermia allowed to increase this value (recognition index: 0.95 ± 0.01 vs. 0.52 ± 0.03 ; 0.84 ± 0.02 ; 0.77 ± 0.04 ; 0.62 ± 0.05 , for the sham group vs. HIN, HIH2, HIH3, and HIH5 groups, respectively) (Figure 5B). Finally, the highest exploration index was measured both for the sham and the HIH2 groups (15.74 ± 2.43 s and 23.55 ± 4.81 s vs. 7.2 ± 0.70 s; 10.18 ± 3.54 s; 7.6 ± 2.5 s, for the sham and HIH2 groups vs. HIN, HIH3 and HIH5 groups, respectively) (Figure 5C).

As cognitive functions are involved in the processes of emotional regulation, the depressive and anxious states of the rats were evaluated at P51 using the food restriction test (Figure 6). Two hours of therapeutic hypothermia (HIH2) allowed the pups to perform as well as the sham group regarding latency to eat after the food restriction, compared to the HIH3 and HIH5 groups (latency to eat: 147 ± 12 ; 214 ± 38 ; 408 ± 53 ; 362 ± 60 , 438 ± 69 , for the sham, HIH2, HIN, HIH3, and HIH5 groups, respectively) (Figure 6A). No significant differences in latency to eat were observed between HIN, HIH3 and HIH5 groups. Additionally, the HIH2 group significantly smelled or touched food more frequently in the center compared to the HIH5 group. (Figure 6B). Furthermore, during this test, 46% of the HIN rats exhibited bruxism, whereas 0%, 9%, 18%, and 27% of the sham, HIH2, HIH3 and HIH5, respectively, did so (Figure 6C). These data indicate that the HIN group displayed an anxious state compared to the hypothermia-treated groups. No sex-specific differences were observed among the groups (Supplementary Figure 6).

Effect of the optimal hypothermia duration (2h) on neuronal death

The protective effect of hypothermia on neurons was assessed via Nissl staining. In the cerebral cortex and hippocampus, cell nuclei in the sham group displayed typical and homogenous morphologies. In the contralateral hemisphere, hypoxia-ischemia did not lead to significant cortical and hippocampal modifications of Nissl staining (Supplementary Figure

7). In the ipsilateral hemisphere, several neuro-

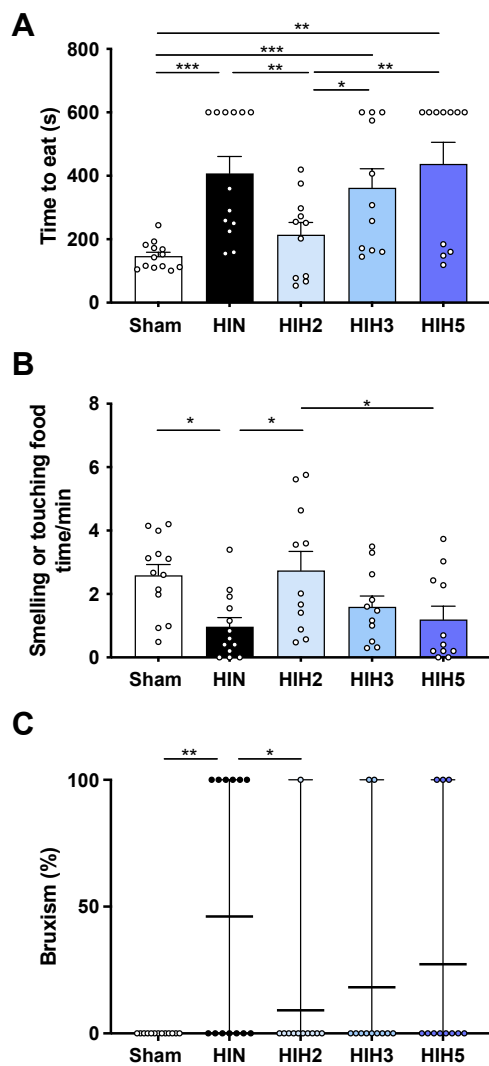


Figure 6: Evaluation of therapeutic hypothermia on anxiety and depressive status induced by neonatal hypoxia-ischemia (P51). (A) Time to eat the pellet during the food restrictive test. (B) Time to smell or touch food during the test. (C) Proportion of bruxism. ** $p < 0.01$.

morphological changes were observed after the hypoxic-ischemic event in the HIN group, especially in the cerebral cortex and hippocampus (CA1 area). The cellular architecture was disrupted, and a significant proportion of neurons exhibited cell death (Figure 7A). Moreover, the number of Nissl-stained nuclei was significantly reduced in the HIN group within both the injured cortex and the damaged CA1 region of the hippocampus ($28 \pm 4\%$ and $36 \pm 4\%$, in the damaged cortex and CA1 area, respectively) compared to sham group ($99 \pm 4\%$ and $100 \pm 5\%$, in cortex and CA1 area, respectively) (Figure 7B-C).

The hypothermia treated groups exhibited better preservation of neuronal architecture and Nissl

substance in the ipsilateral cortex compared to HIN group but not as well as sham group (except for HIH2) (Figure 7B). However, in the ipsilateral hippocampus (CA1 area), the number of Nissl-stained nuclei was preserved only in the HIH2 and HIH3 groups compared to the HIH5 and HIN groups, although not to the same extent as observed in the sham group (Figure 7C). Furthermore, the HIH2 group demonstrated better preservation of neuronal architecture and Nissl bodies than the HIH5 group in both the ipsilateral cortex and hippocampus (CA1 area) ($88 \pm 6\%$ and $78 \pm 7\%$, in the damaged cortex and CA1 area, respectively). No significant difference was observed between the HIH2 and HIH3 groups in terms of Nissl staining.

Impact of a 2h-hypothermia treatment after NHI on microglia activation and apoptosis

First, we evaluated the impact of hypothermia treatment on overall microglia activation by performing immunohistochemistry for Iba-1 in the ipsilateral cortex and hippocampus (CA1 area) (Figure 8). The HIN group exhibited an increase in Iba-1 fluorescence intensity in both regions as compared to the sham group, while the hypothermia treatment group (HIH2) showed a reduction in Iba-1 fluorescence relative to the HIN group in both regions (Figure 8B-C). Additionally, to characterize myeloid cells in HI-injured brains more specifically, we assessed the expression of two typical marker proteins associated with classical M1 and alternative M2 activation, namely CD86 and CD206, respectively, in the ipsilateral cortex and hippocampus (CA1 area). We observed an increase of CD86 fluorescence intensity after HI in the HIN group, resulting in a significant difference compared to sham-operated control pups in both regions (Figure 8D-F). In contrast, hypothermia-treated animals revealed a decline in CD86 fluorescence in both regions as compared to pups in the HIN group, aligning with the levels observed in the sham group (Figure 8D-F). In parallel, the fluorescence of CD206 rapidly increased in HIH2 animals in both regions and decreased in the HIN group (Figure 8G-I).

We further measured caspase-3 activation 48 h after HI injury to examine the effects of HI and hypothermia on neuronal apoptosis. Immunofluorescent staining in the hippocampus (CA1 area) and cortex revealed more caspase signals in HIN group when compared to the sham (Figure 9A-C). However, caspase 3 was reduced in HIH2 group versus the HIN group (Figure 9A-C).

Effects of delays in initiating therapeutic hypothermia

To assess whether immediate initiation of hypothermia after HI enhances neuroprotection, data from the HIH2

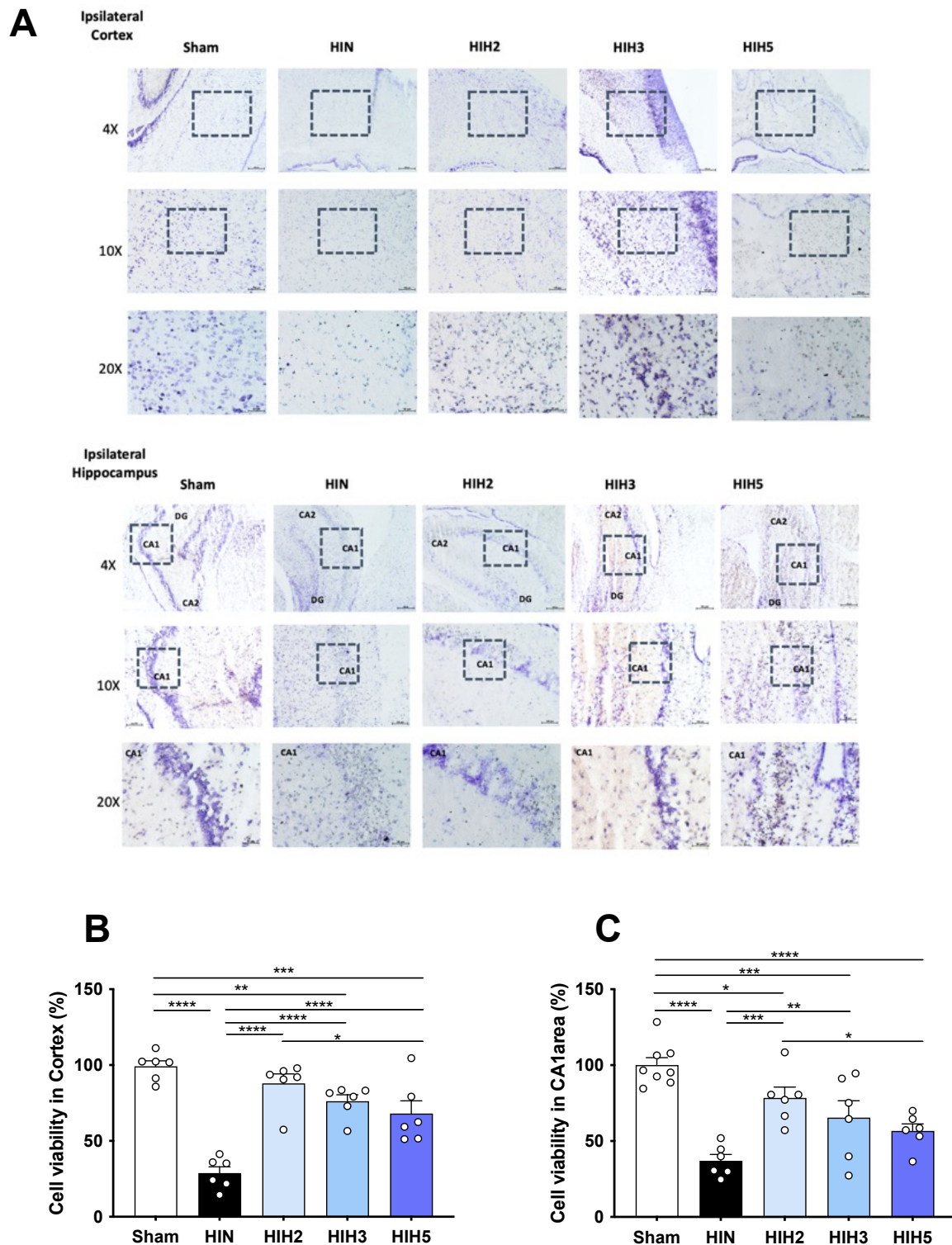


Figure 7: Histology 48h after neonatal hypoxia-ischemia. (A) Representative image of Nissl staining in the cortex, hippocampus CA1 region. Scale bars represent 250 μ m in the images of 4X; 100 μ m in the images of 10X; 50 μ m in the images of 20X and 20 μ m in the images of 40X. (B) Percentage of cell loss, based on the density of Nissl-stained nuclei, for sham, HIN, HIH2, HIH3 and HIH5 groups in ipsilateral cortex ($n = 6$). (C) Percentage of cell loss, based on the density of Nissl-stained nuclei, for sham, HIN, HIH2, HIH3 and HIH5 groups in hippocampus CA1 area ($n = 6$). Results are mean values \pm SEM, one-way analysis of variance (ANOVA) with Fisher's LSD *post hoc* test. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$.

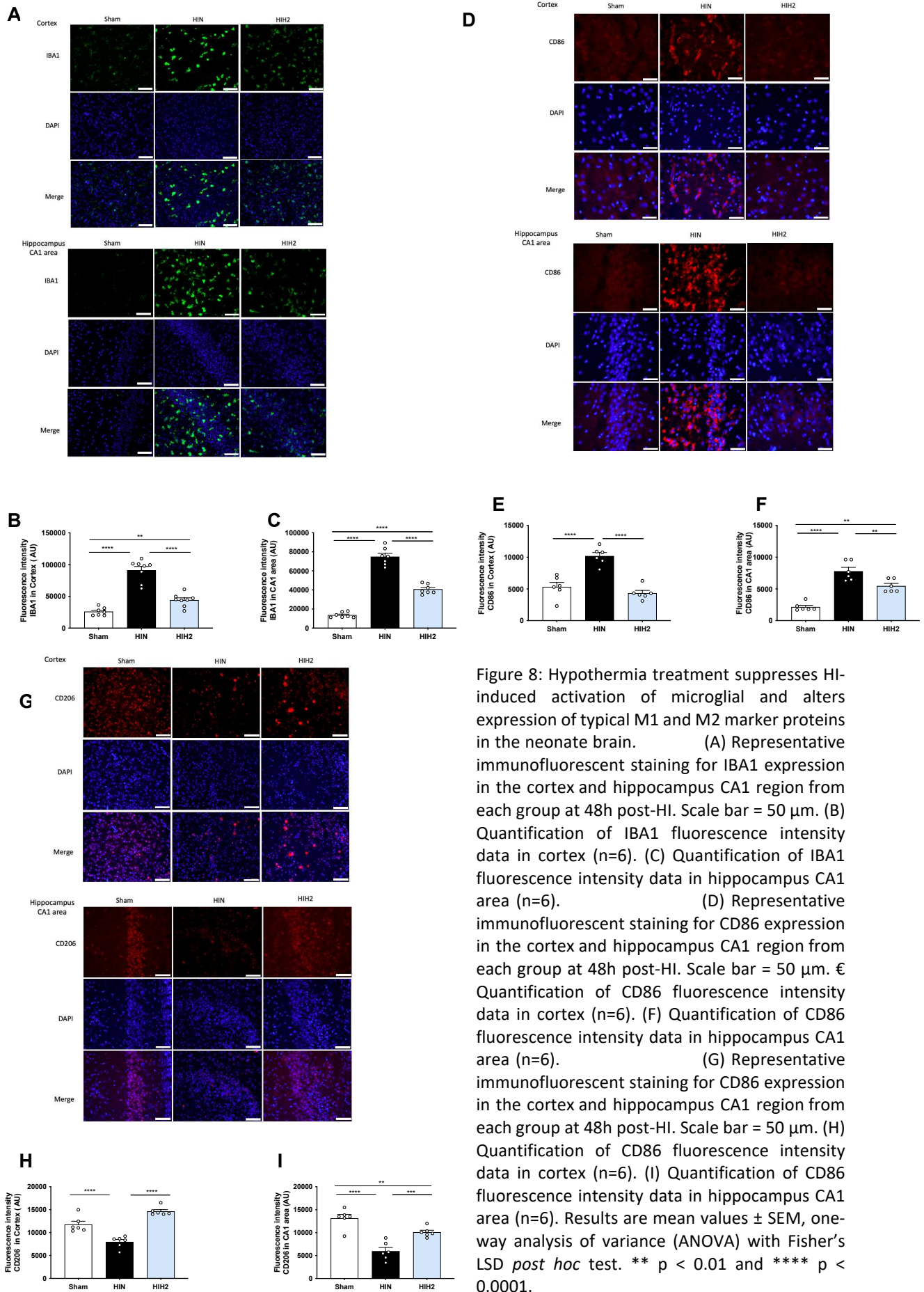


Figure 8: Hypothermia treatment suppresses HI-induced activation of microglial and alters expression of typical M1 and M2 marker proteins in the neonate brain.

(A) Representative immunofluorescent staining for IBA1 expression in the cortex and hippocampus CA1 region from each group at 48h post-HI. Scale bar = 50 μ m. (B) Quantification of IBA1 fluorescence intensity data in cortex (n=6). (C) Quantification of IBA1 fluorescence intensity data in hippocampus CA1 area (n=6). (D) Representative immunofluorescent staining for CD86 expression in the cortex and hippocampus CA1 region from each group at 48h post-HI. Scale bar = 50 μ m. (E) Quantification of CD86 fluorescence intensity data in cortex (n=6). (F) Quantification of CD86 fluorescence intensity data in hippocampus CA1 area (n=6). (G) Representative immunofluorescent staining for CD206 expression in the cortex and hippocampus CA1 region from each group at 48h post-HI. Scale bar = 50 μ m. (H) Quantification of CD206 fluorescence intensity data in cortex (n=6). (I) Quantification of CD206 fluorescence intensity data in hippocampus CA1 area (n=6). Results are mean values \pm SEM, one-way analysis of variance (ANOVA) with Fisher's LSD *post hoc* test. ** p < 0.01 and **** p < 0.0001.

group were compared with those from the HIH2Im group, in which therapeutic hypothermia was induced immediately upon exiting the hypoxic chamber (Figure 10). At P9, but not at P30, brain lesion volumes measured by diffusion MRI were smaller in the HIH2Im group compared to the HIH2 group (brain lesion volumes at P9: $29 \pm 2\%$ and $21 \pm 2\%$ for the HIH2 and HIH2Im groups, respectively) (Figure 10A). No differences were observed between the two groups in the righting reflex test or the mNSS (Figure 8B-C). However, in the novel object recognition test, the HIH2Im group demonstrated a higher discrimination index and recognition index compared to the HIH2 group (Figure 10D-E), while the exploration index was similar between the two groups (Figure 10F). There were no significant differences among the groups regarding the effects of hypothermia initiation on the depressive state of the rats (Figure 10G-H).

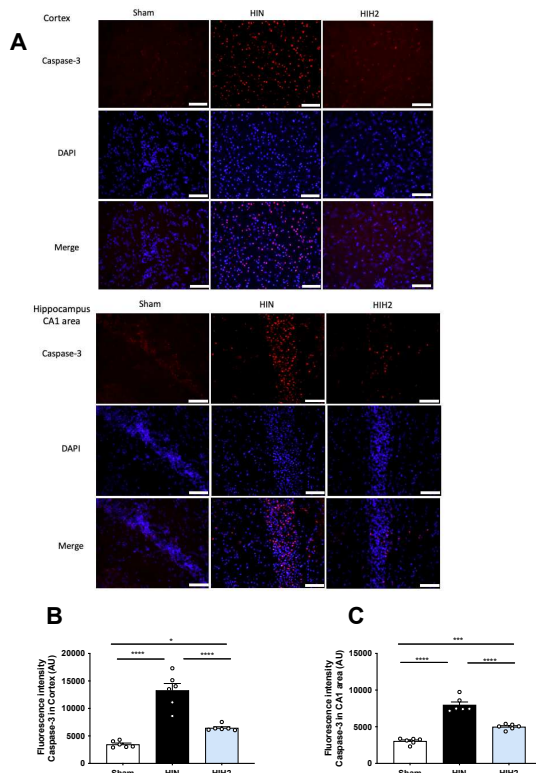


Figure 9: Hypothermia treatment prevents activation of caspase-3 48h after HI injury. (A) Representative immunofluorescent staining for Caspase-3 expression in the cortex and hippocampus CA1 region from each group. Scale bar = 50 μ m. (B) Quantification of Caspase-3 fluorescence intensity data in cortex (n=6). (C) Quantification of Caspase-3 fluorescence intensity data in hippocampus CA1 area (n=6). Results are

mean values \pm SEM, one-way analysis of variance (ANOVA) with Fisher's LSD *post hoc* test. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$.

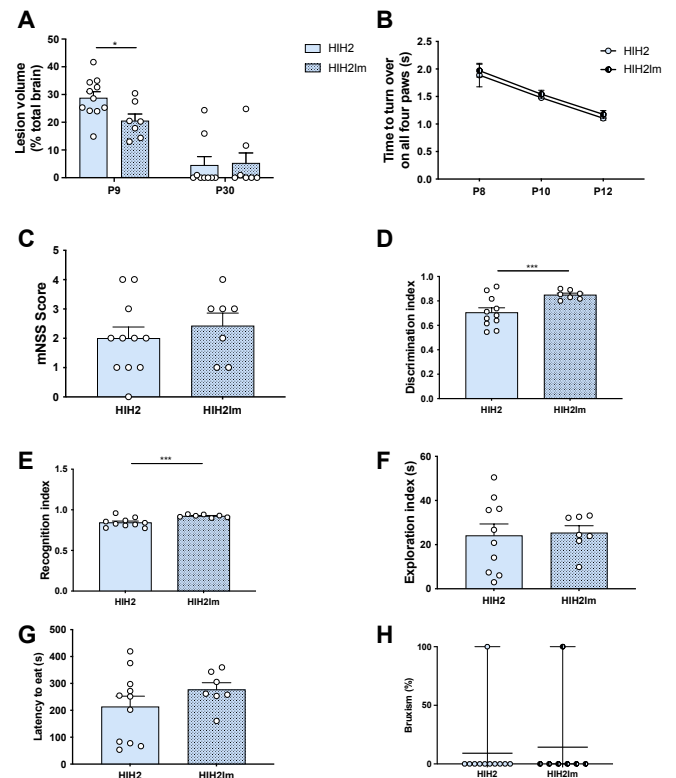


Figure 10: Impact of delays in initiating therapeutic hypothermia. (A) Quantifications of brain lesion volumes, at P9 and P30, express in % relative to the total brain volume, for the different groups. (B) Righting reflex test at P8, P10, P12, for the different groups. (C) mNSS at P24, for the different groups. (D) Novel object recognition, discrimination index. (E) Novel object recognition, recognition index. (F) Novel object recognition, exploration index. (G) Time to eat the pellet during the food restrictive test. (H) Proportion of bruxism. * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$.

Discussion

The only interventional therapeutic strategy currently available to mitigate the harmful effects of neonatal hypoxia-ischemia is controlled and moderate hypothermia. However, alongside its application limitations—such as its suitability primarily for cases of moderate to severe hypoxia-ischemia and for neonates older than 36 weeks of gestational age—there remain questions regarding the optimal cooling protocol and potential adverse effects, particularly in the presence of certain comorbidities [5, 7]. Additionally, between 44% and 53% of treated neonates either die or suffer significant

neurological disabilities [14]. The objectives of this study were to establish the most appropriate therapeutic hypothermia procedures applicable to preclinical research focused on neuroprotection in the context of neonatal hypoxia-ischemia. For this study, rectal temperatures were set at $36.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ for normothermia and $32.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ for hypothermia. The normothermic temperature was selected based on serial temperature measurements from P7 nesting pups, which, while lower than the empiric 37°C often used in other preclinical studies [22, 44-46], aligns with lower temperatures recorded from nesting healthy pups by Wood et al. [32]. The hypothermia temperature of 32°C was chosen based on existing literature [22, 31, 47, 48] and to remain outside the normothermia range observed in P7 rat pups bred and housed under modern laboratory conditions (between 33.5°C and 36°C) [33]. The ideal temperature for therapeutic hypothermia is considered to be between 2°C and 6°C below normothermia [49]. In this study, the temperatures tested for normothermia and hypothermia differed by 4°C , which is centered within the optimal range, comparable to a $33 \pm 1^\circ\text{C}$ range for neonates, based on a normothermic baseline of 37°C .

Given the significant variability in the duration of hypothermia reported in preclinical studies, which ranges from 2 to 5 hours, this study aimed to evaluate the effects of the most commonly used durations under consistent environmental conditions and within the same hypoxia-ischemia model. Beyond assessing the impact of different treatment durations, this research sought to identify the optimal hypothermia duration to achieve neuroprotective effects, while minimizing side effects related to animal welfare, thereby addressing the third principle of the 3Rs (Replacement, Reduction, Refinement).

An additional strength of this study lies in the methodologies employed. Magnetic Resonance Imaging (MRI) was utilized as a non-invasive investigative tool, allowing for a longitudinal monitoring of lesion volumes at various time points (P7, P9, and P30). The integration of imaging analyses with behavioral assessments within the same subjects aligns

with the second principle of the 3Rs, focusing on reduction. The combined use of MRI and behavioral testing allowed for a comprehensive evaluation of the effects of therapeutic hypothermia, ranging from short-term (MRI at P7 and P9; behavioral tests at P8, P10, and P12) to long-term effects (MRI at P30 and behavioral tests until P51), encompassing structural, motor, and cognitive domains. This longitudinal approach adheres to the STAIR consortium's recommendations, particularly point 4 [39], highlighting the importance of such studies, as early neuropathological markers do not consistently predict long-term outcomes [50, 51].

In this study, we demonstrated that a controlled and moderate hypothermia of 2 hours, maintaining a rectal temperature of 32°C , was sufficient to provide neuroprotection following a neonatal hypoxic-ischemic injury. Moreover, extending the duration of hypothermia under the same hypoxic-ischemic conditions did not enhance neuroprotection and even exhibited deleterious effects. The 2-hour therapeutic hypothermia led to a reduction of brain lesion volumes in both the short and long term. Similar findings were observed in a P7 Sprague Dawley model of neonatal hypoxia-ischemia treated with 2 hours of hypothermia at a lower set temperature of $30.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ [29]. In that study, early reflexes were assessed using the geotaxis and cliff aversion tests during the week following the hypoxic-ischemic event. The authors concluded that therapeutic hypothermia could mitigate the detrimental effects of the injury on the reflexes of neonatal rats. In our study, using the righting reflex test, we demonstrated that 2 hours of therapeutic hypothermia led to the most significant recovery in performance. This group also exhibited lower mNSS scores, reflecting lesser neurological impairment. Furthermore, as in previous studies, a 2-hour hypothermic treatment provided neuroprotection for cognitive functions, enhancing long-term memory and reducing depressive and anxious behaviors in the rats.

The suppression of microglial activity is recognized as a favorable marker [52] and a critical mechanism by which therapeutic

hypothermia exerts its neuroprotective effects [53]. In the present study, we demonstrated that the optimal hypothermia duration treatment (2h) led to a decrease in IBA1 fluorescence intensity in the cortex and the CA1 area, indicating a reduction in microglial activation. Additionally, two hours of hypothermia reversed the microglial phenotype from pro-inflammatory (CD86 fluorescence) to anti-inflammatory (CD206 fluorescence).

Furthermore, we evaluated the effects of hypothermia on caspase-3 activation in a neonatal hypoxia-ischemia (HI) model. Consistent with previous reports [54,55], caspase-3 activation was observed in the ipsilateral hemispheres of the control group (HIN, Fig10). However, we found that 2h of therapeutic hypothermia significantly suppressed caspase-3 activation at 48 hours following HI. These findings suggest that moderate hypothermia decreases apoptosis after NHI.

Finally, this study also compared the neuroprotective effects of initiating therapeutic hypothermia either immediately after exiting the hypoxic chamber (HIH2Im) or one hour later (HIH2). In the short term, immediate hypothermia leads to a greater reduction in lesion volumes compared to hypothermia initiated with a one-hour delay; however, this difference diminishes over time, and the lesion volumes in both groups become comparable in the long term. The delay in initiating hypothermia did not impact the neuroprotection of reflex and motor functions, as no significant differences were observed between the groups in either the righting reflex test or the modified Neurological Severity Score. Nevertheless, immediate hypothermia resulted in better performance in the novel object recognition test, which assesses long-term memory, although it did not lead to improvements in measures of anxiety and depression. These findings regarding the neuroprotection of long-term memory align with previous research by Sabir et al., which reported a linear decrease in neuroprotection with increasing delay in the initiation of hypothermia in a P7 hypoxic-ischemic pup model [36].

Although initiating therapeutic hypothermia earlier yields a stronger neuroprotective effect, clinical studies highlight the challenges of starting hypothermia treatment within the optimal therapeutic window (less than six hours after the hypoxic-ischemic event) [49]. A limitation of this study is the use of an animal model; however, rat physiology is considered to be more comparable to human physiology than that of mice.

Regardless of whether therapeutic hypothermia was initiated immediately after exiting the hypoxic chamber or delayed by one hour, neuroprotection was observed in both motor and cognitive functions in the model of moderate neonatal hypoxia-ischemia. These findings are consistent with clinical trials indicating that newborns experiencing hypoxic-ischemic insults had better outcomes when cooling began within three hours post-event, compared to those in whom it was initiated between three- and six-hours post-hypoxia-ischemia [56].

The current study is critical in the pursuit of new neuroprotection strategies for neonatal hypoxia-ischemia. It allows researchers (i) to determine the optimal conditions for combining hypothermia with other neuroprotective approaches, balancing their benefits and minimizing potential side effects, and (ii) to directly compare hypothermia as a stand-alone treatment with other therapeutic strategies. This latter point is particularly significant. Indeed, although hypothermia is the standard clinical care for newborns with moderate-to-severe hypoxia-ischemia in high-income countries, advanced technologies for delivering hypothermia and comprehensive monitoring of affected infants are often unavailable in many hospitals in low- and middle-income countries [57]. For instance, while the majority of pediatricians in South Africa recognize the effectiveness of hypothermia in reducing neurological deficits in neonatal hypoxia-ischemia, fewer than half are able to offer it as a treatment option [58]. This highlights the urgent need to develop new treatments, which will need to be compared to hypothermia.

References

1. Lawn, J.E., H. Blencowe, S. Oza, D. You, A.C. Lee, P. Waiswa, M. Lalli, Z. Bhutta, A.J. Barros, P. Christian, C. Mathers, S.N. Cousens, and G. Lancet Every Newborn Study, *Every Newborn: progress, priorities, and potential beyond survival*. Lancet, 2014. 384(9938): p. 189-205.
2. Kurinczuk, J.J., M. White-Koning, and N. Badawi, *Epidemiology of neonatal encephalopathy and hypoxic-ischaemic encephalopathy*. Early Hum Dev, 2010. 86(6): p. 329-38.
3. Walas, W., M. Wilinska, M. Bekiesinska-Figatowska, Z. Halaba, and R. Smigiel, *Methods for assessing the severity of perinatal asphyxia and early prognostic tools in neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy treated with therapeutic hypothermia*. Adv Clin Exp Med, 2020. 29(8): p. 1011-1016.
4. Saliba, E. and T. Debillon, [*Hypothermia for hypoxic-ischemic encephalopathy in fullterm newborns*]. Arch Pediatr, 2010. 17 Suppl 3: p. S67-77.
5. Thoresen, M., *Who should we cool after perinatal asphyxia?* Semin Fetal Neonatal Med, 2015. 20(2): p. 66-71.
6. Nelson DB, Lucke AM, McIntire DD, Sánchez PJ, Leveno KJ, Chalak LF. Obstetric antecedents to body-cooling treatment of the newborn infant. Am J Obstet Gynecol. 2014 Aug;211(2):155.e1-6.
7. Shankaran, S., A.R. Laptook, A. Pappas, S.A. McDonald, A. Das, J.E. Tyson, B.B. Poindexter, K. Schibler, E.F. Bell, R.J. Heyne, C. Pedroza, R. Bara, K.P. Van Meurs, C. Grisby, C.M. Huitema, M. Garg, R.A. Ehrenkranz, E.G. Shepherd, L.F. Chalak, S.E. Hamrick, A.M. Khan, A.M. Reynolds, M.M. Laughon, W.E. Truog, K.C. Dysart, W.A. Carlo, M.C. Walsh, K.L. Watterberg, R.D. Higgins, H. Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child, and N. Human Development Neonatal Research, *Effect of depth and duration of cooling on deaths in the NICU among neonates with hypoxic ischemic encephalopathy: a randomized clinical trial*. JAMA, 2014. 312(24): p. 2629-39.
8. Battin, M., L. Bennet, and A.J. Gunn, *Rebound seizures during rewarming*. Pediatrics, 2004. 114(5): p. 1369.
9. Celik, Y., A. Atici, S. Gulasi, C. Okuyaz, K. Makharoblidze, and M.A. Sungur, *Comparison of selective head cooling versus whole-body cooling*. Pediatr Int, 2016. 58(1): p. 27-33.
10. Tagin, M.A., C.G. Woolcott, M.J. Vincer, R.K. Whyte, and D.A. Stinson, *Hypothermia for neonatal hypoxic ischemic encephalopathy: an updated systematic review and meta-analysis*. Arch Pediatr Adolesc Med, 2012. 166(6): p. 558-66.
11. Gunn, A.J. and T.R. Gunn, *The 'pharmacology' of neuronal rescue with cerebral hypothermia*. Early Hum Dev, 1998. 53(1): p. 19-35.
12. Van Leeuwen, G.M., J.W. Hand, J.J. Lagendijk, D.V. Azzopardi, and A.D. Edwards, *Numerical modeling of temperature distributions within the neonatal head*. Pediatr Res, 2000. 48(3): p. 351-6.
13. Azzopardi, D., B. Strohm, A.D. Edwards, H. Halliday, E. Juszczak, M. Levene, M. Thoresen, A. Whitelaw, P. Brocklehurst, G. Steering, and T.C.R. participants, *Treatment of asphyxiated newborns with moderate hypothermia in routine clinical practice: how cooling is managed in the UK outside a clinical trial*. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 2009. 94(4): p. F260-4.
14. Rogers, E.E., S.L. Bonifacio, H.C. Glass, S.E. Juul, T. Chang, D.E. Mayock, D.J. Durand, D. Song, A.J. Barkovich, R.A. Ballard, and Y.W. Wu, *Erythropoietin and hypothermia for hypoxic-ischemic encephalopathy*. Pediatr Neurol, 2014. 51(5): p. 657-62.
15. Gunn, A.J., T.R. Gunn, M.I. Gunning, C.E. Williams, and P.D. Gluckman, *Neuroprotection with prolonged head cooling started before postischemic seizures in fetal sheep*. Pediatrics, 1998. 102(5): p. 1098-106.
16. Erecinska, M., M. Thoresen, and I.A. Silver, *Effects of hypothermia on energy metabolism in Mammalian central nervous system*. J Cereb Blood Flow Metab, 2003. 23(5): p. 513-30.
17. Lei, B., X. Tan, H. Cai, Q. Xu, and Q. Guo, *Effect of moderate hypothermia on lipid peroxidation in canine brain tissue after cardiac arrest and resuscitation*. Stroke, 1994. 25(1): p. 147-52.
18. Edwards, A.D., X. Yue, M.V. Squier, M. Thoresen, E.B. Cady, J. Penrice, C.E. Cooper, J.S. Wyatt, E.O. Reynolds, and H. Mehmet, *Specific inhibition of apoptosis after cerebral hypoxia-ischaemia by moderate post-insult hypothermia*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. 217(3): p. 1193-9.
19. Thoresen, M., S. Satas, M. Puka-Sundvall, A. Whitelaw, A. Hallstrom, E.M. Loberg, U. Ungerstedt, P.A. Steen, and H. Hagberg, *Post-hypoxic hypothermia reduces cerebrocortical release of NO and excitotoxins*. Neuroreport, 1997. 8(15): p. 3359-62.
20. Yager, J., J. Towfighi, and R.C. Vannucci, *Influence of mild hypothermia on hypoxic-ischemic brain damage in the immature rat*. Pediatr Res, 1993. 34(4): p. 525-9.
21. Thoresen, M., R. Bagenholm, E.M. Loberg, F. Apricena, and I. Kjellmer, *Posthypoxic cooling of neonatal rats provides protection against brain injury*. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 1996. 74(1): p. F3-9.
22. Bona, E., H. Hagberg, E.M. Loberg, R. Bagenholm, and M. Thoresen, *Protective effects of moderate hypothermia after neonatal hypoxia-ischemia: short- and long-term outcome*. Pediatr Res, 1998. 43(6): p. 738-45.
23. Gunn, A.J., T.R. Gunn, H.H. de Haan, C.E. Williams, and P.D. Gluckman, *Dramatic neuronal rescue with prolonged selective head cooling after ischemia in fetal lambs*. J Clin Invest, 1997. 99(2): p. 248-56.
24. Haaland, K., E.M. Loberg, P.A. Steen, and M. Thoresen, *Posthypoxic hypothermia in newborn piglets*. Pediatr Res, 1997. 41(4 Pt 1): p. 505-12.

25. Dobbing, J. and J. Sands, *Comparative aspects of the brain growth spurt*. *Early Hum Dev*, 1979. 3(1): p. 79-83.
26. Dickerson, J.W. and J. Dobbing, *Prenatal and postnatal growth and development of the central nervous system of the pig*. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 1967. 166(1005): p. 384-95.
27. Davidson, J.O., M. Fraser, A.S. Naylor, V. Roelfsema, A.J. Gunn, and L. Bennet, *Effect of cerebral hypothermia on cortisol and adrenocorticotropic hormone responses after umbilical cord occlusion in preterm fetal sheep*. *Pediatr Res*, 2008. 63(1): p. 51-5.
28. Koome, M.E., J.O. Davidson, P.P. Drury, S. Mathai, L.C. Booth, A.J. Gunn, and L. Bennet, *Antenatal dexamethasone after asphyxia increases neural injury in preterm fetal sheep*. *PLoS One*, 2013. 8(10): p. e77480.
29. Jatana, M., I. Singh, A.K. Singh, and D. Jenkins, *Combination of systemic hypothermia and N-acetylcysteine attenuates hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats*. *Pediatr Res*, 2006. 59(5): p. 684-9.
30. Trescher, W.H., S. Ishiwa, and M.V. Johnston, *Brief post-hypoxic-ischemic hypothermia markedly delays neonatal brain injury*. *Brain Dev*, 1997. 19(5): p. 326-38.
31. Hobbs, C., M. Thoresen, A. Tucker, K. Aquilina, E. Chakkarapani, and J. Dingley, *Xenon and hypothermia combine additively, offering long-term functional and histopathologic neuroprotection after neonatal hypoxia/ischemia*. *Stroke*, 2008. 39(4): p. 1307-13.
32. Fan, X., F. van Bel, M.A. van der Kooij, C.J. Heijnen, and F. Groenendaal, *Hypothermia and erythropoietin for neuroprotection after neonatal brain damage*. *Pediatr Res*, 2013. 73(1): p. 18-23.
33. Wood, T., D. Osredkar, M. Puchades, E. Maes, M. Falck, T. Flatebo, L. Walloe, H. Sabir, and M. Thoresen, *Treatment temperature and insult severity influence the neuroprotective effects of therapeutic hypothermia*. *Sci Rep*, 2016. 6: p. 23430.
34. Fabres, R.B., R.R. Nunes, M. de Medeiros de Mattos, M.K.G. Andrade, A.P.R. Martini, I.D. Tassinari, E.F. Sanches, L.S. de Fraga, and C.A. Netto, *Therapeutic hypothermia for the treatment of neonatal hypoxia-ischemia: sex-dependent modulation of reactive astrogliosis*. *Metab Brain Dis*, 2022. 37(7): p. 2315-2329.
35. Wood, T., C. Hobbs, M. Falck, A.C. Brun, E.M. Loberg, and M. Thoresen, *Rectal temperature in the first five hours after hypoxia-ischemia critically affects neuropathological outcomes in neonatal rats*. *Pediatr Res*, 2018. 83(2): p. 536-544.
36. Sabir, H., E. Scull-Brown, X. Liu, and M. Thoresen, *Immediate hypothermia is not neuroprotective after severe hypoxia-ischemia and is deleterious when delayed by 12 hours in neonatal rats*. *Stroke*, 2012. 43(12): p. 3364-70.
37. Wood, T.R., J.K. Gundersen, M. Falck, E. Maes, D. Osredkar, E.M. Loberg, H. Sabir, L. Walloe, and M. Thoresen, *Variability and sex-dependence of hypothermic neuroprotection in a rat model of neonatal hypoxic-ischaemic brain injury: a single laboratory meta-analysis*. *Sci Rep*, 2020. 10(1): p. 10833.
38. Zang, J., A.C.M. Colucci, I.D. Tassinari, R.R. Nunes, M.K.G. Andrade, F.F. Spies, M.R. de Oliveira, L.E. Duran-Carabali, P. Rigon, C.A. Netto, A.H. Paz, and L.S. de Fraga, *Short-term effects of therapeutic hypothermia following hypoxia-ischemia in neonatal male and female rats*. *Int J Dev Neurosci*, 2022.
39. Stroke Therapy Academic Industry, R., *Recommendations for standards regarding preclinical neuroprotective and restorative drug development*. *Stroke*, 1999. 30(12): p. 2752-8.
40. Roumes, H., U. Dumont, S. Sanchez, L. Mazuel, J. Blanc, G. Raffard, J.F. Chateil, L. Pellerin, and A.K. Bouzier-Sore, *Neuroprotective role of lactate in rat neonatal hypoxia-ischemia*. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2021. 41(2): p. 342-358.
41. Dumont, U., S. Sanchez, B. Olivier, J.F. Chateil, L. Pellerin, M.C. Beauvieux, A.K. Bouzier-Sore, and H. Roumes, *Maternal consumption of piceatannol: A nutritional neuroprotective strategy against hypoxia-ischemia in rat neonates*. *Brain Res*, 2019. 1717: p. 86-94.
42. Dumont, U., S. Sanchez, C. Repond, M.C. Beauvieux, J.F. Chateil, L. Pellerin, A.K. Bouzier-Sore, and H. Roumes, *Neuroprotective Effect of Maternal Resveratrol Supplementation in a Rat Model of Neonatal Hypoxia-Ischemia*. *Front Neurosci*, 2020. 14: p. 616824.
43. Roumes, H., S. Sanchez, I. Benkhaled, V. Fernandez, P. Goudeneche, F. Perrin, L. Pellerin, J. Guillard, and A.K. Bouzier-Sore, *Neuroprotective Effect of Eco-Sustainably Extracted Grape Polyphenols in Neonatal Hypoxia-Ischemia*. *Nutrients*, 2022. 14(4).
44. Vannucci, R.C., J.R. Connor, D.T. Mauger, C. Palmer, M.B. Smith, J. Towfighi, and S.J. Vannucci, *Rat model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage*. *J Neurosci Res*, 1999. 55(2): p. 158-63.
45. Williams, G.D., B.J. Dardzinski, A.R. Buckalew, and M.B. Smith, *Modest hypothermia preserves cerebral energy metabolism during hypoxia-ischemia and correlates with brain damage: a 31P nuclear magnetic resonance study in unanesthetized neonatal rats*. *Pediatr Res*, 1997. 42(5): p. 700-8.
46. Conklin, P. and F.W. Heggeness, *Maturation of temperature homeostasis in the rat*. *Am J Physiol*, 1971. 220(2): p. 333-6.
47. Dalen, M.L., X. Liu, M. Elstad, E.M. Loberg, O.D. Saugstad, T. Rootwelt, and M. Thoresen, *Resuscitation with 100% oxygen increases injury and counteracts the neuroprotective effect of therapeutic hypothermia in the neonatal rat*. *Pediatr Res*, 2012. 71(3): p. 247-52.
48. Patel, S.D., L. Pierce, A. Ciardiello, A. Hutton, S. Paskewitz, E. Aronowitz, H.U. Voss, H. Moore, and

S.J. Vannucci, *Therapeutic hypothermia and hypoxia-ischemia in the term-equivalent neonatal rat: characterization of a translational preclinical model*. *Pediatr Res*, 2015. 78(3): p. 264-71.

49. Gunn, A.J. and M. Thoresen, *Hypothermic neuroprotection*. *NeuroRx*, 2006. 3(2): p. 154-69.

50. Burnsed, J.C., R. Chavez-Valdez, M.S. Hossain, K. Kesavan, L.J. Martin, J. Zhang, and F.J. Northington, *Hypoxia-ischemia and therapeutic hypothermia in the neonatal mouse brain--a longitudinal study*. *PLoS One*, 2015. 10(3): p. e0118889.

51. Dumont, U., S. Sanchez, B. Olivier, J.F. Chateil, D. Deffieux, S. Quideau, L. Pellerin, M.C. Beauvieux, A.K. Bouzier-Sore, and H. Roumes, *Maternal alcoholism and neonatal hypoxia-ischemia: Neuroprotection by stilbenoid polyphenols*. *Brain Res*, 2020. 1738: p. 146798.

52. Hagberg H, Mallard C, Ferriero DM, Vannucci SJ, Levison SW, Vexler ZS, Gressens P. The role of inflammation in perinatal brain injury. *Nat Rev Neurol*. 2015 Apr;11(4):192-208.

53. Wassink G, Gunn ER, Drury PP, Bennet L, Gunn AJ. The mechanisms and treatment of asphyxial encephalopathy. *Front Neurosci*. 2014 Feb 27;8:40.

54. Han BH, D'Costa A, Back SA, Parsadanian M, Patel S, Shah AR, Gidday JM, Srinivasan A, Deshmukh M,

Holtzman DM. BDNF blocks caspase-3 activation in neonatal hypoxia-ischemia. *Neurobiol Dis*. 2000 Feb;7(1):38-53.

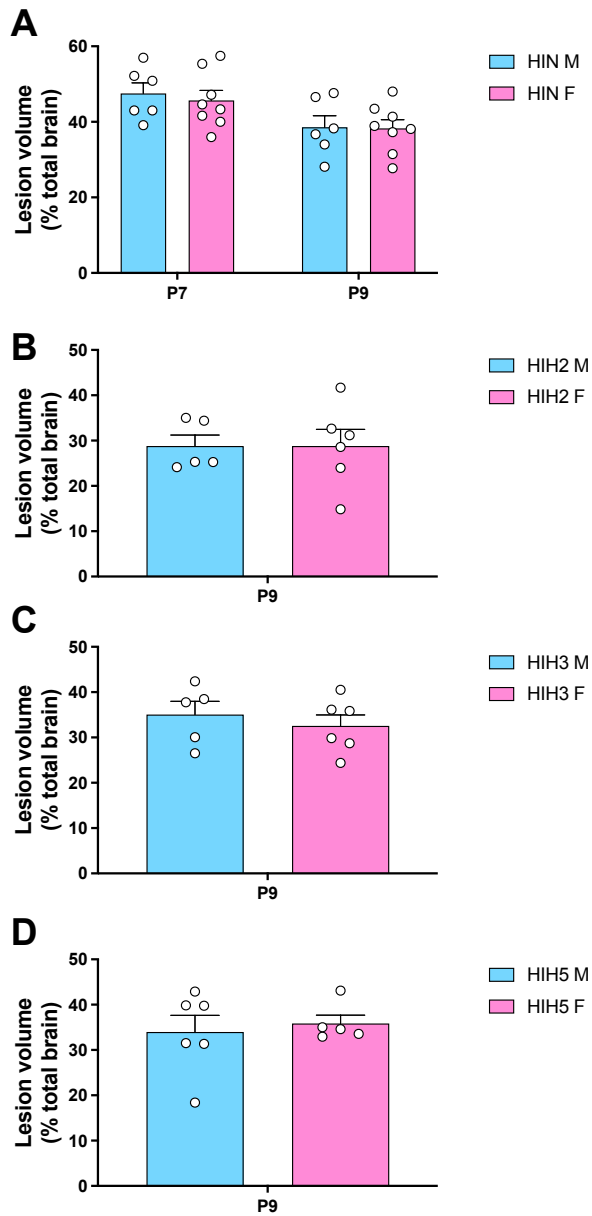
55. Hu BR, Liu CL, Ouyang Y, Blomgren K, Siesjö BK. Involvement of caspase-3 in cell death after hypoxia-ischemia declines during brain maturation. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2000 Sep;20(9):1294-300.

56. Thoresen, M., J. Tooley, X. Liu, S. Jary, P. Fleming, K. Luyt, A. Jain, P. Cairns, D. Harding, and H. Sabir, *Time is brain: starting therapeutic hypothermia within three hours after birth improves motor outcome in asphyxiated newborns*. *Neonatology*, 2013. 104(3): p. 228-33.

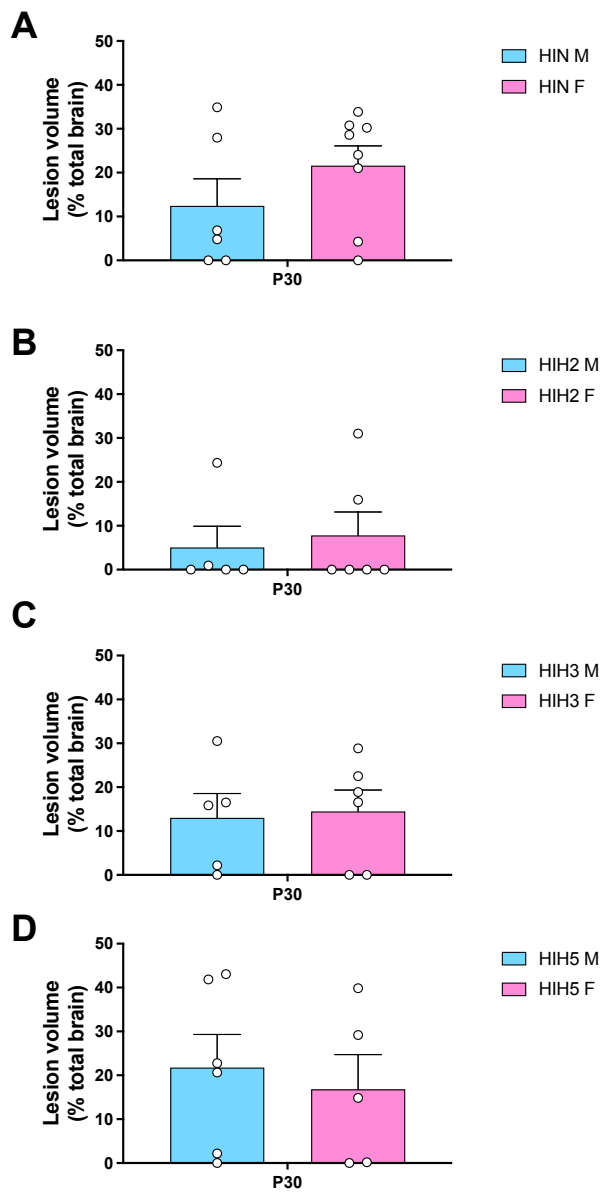
57. Enweronu-Laryea, C., K.A. Martinello, M. Rose, S. Manu, C.J. Tann, J. Meek, K. Ahor-Essel, G.B. Boylan, and N.J. Robertson, *Core temperature after birth in babies with neonatal encephalopathy in a sub-Saharan African hospital setting*. *J Physiol*, 2019. 597(15): p. 4013-4024.

58. Joolay, Y., M.C. Harrison, and A.R. Horn, *Therapeutic hypothermia and hypoxic ischemic encephalopathy: opinion and practice of pediatricians in South Africa*. *J Perinat Med*, 2012. 40(4): p. 447-53.

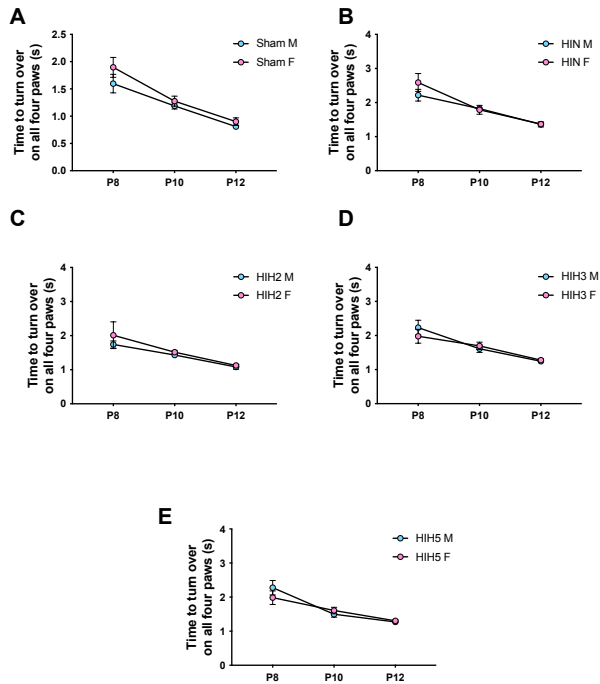
Supplementary data



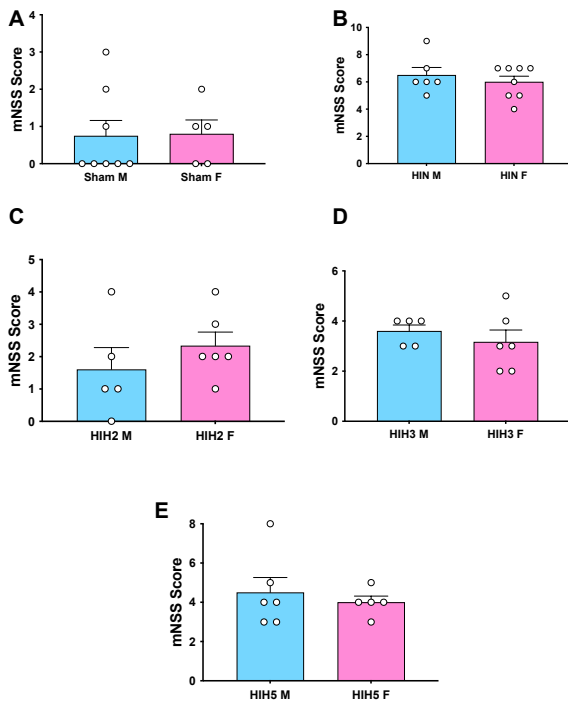
Suppl Figure 1: Sex-comparison of brain lesion volumes (A) In the HIC groups, at P7 and P9. (B) In the HIH2 group at P9. (C) In the HIH3 group at P9. (D) In the HIH5 group at P9.



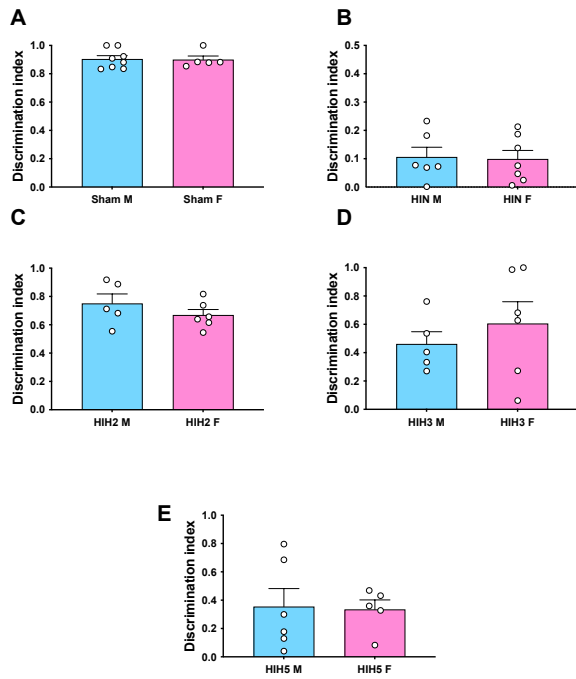
Suppl Figure 2: Sex-comparison of brain lesion volumes (A) In the HIC groups, at P30. (B) In the HIH2 group at P30. (C) In the HIH3 group at P30. (D) In the HIH5 group at P30.



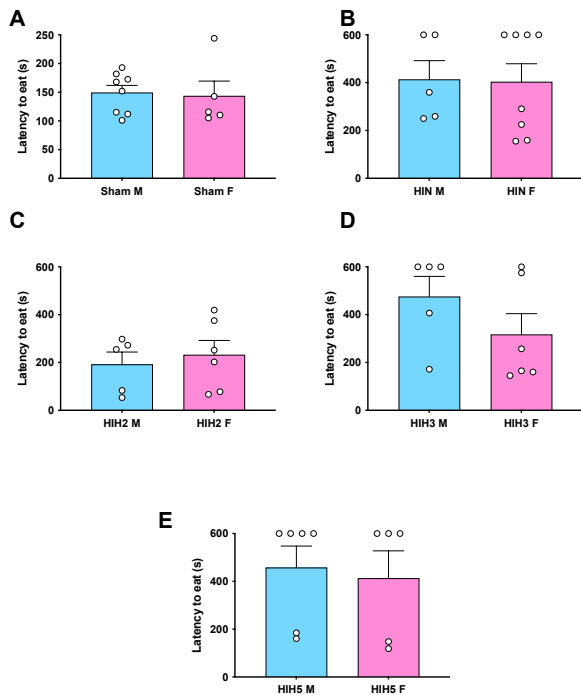
Suppl Figure 3: Sex-comparison for the early righting reflex test in the sham groups (A), in the HIN group (B), in the HIH2 group (C), in the HIH3 group (D) and in the HIH5 group (E).



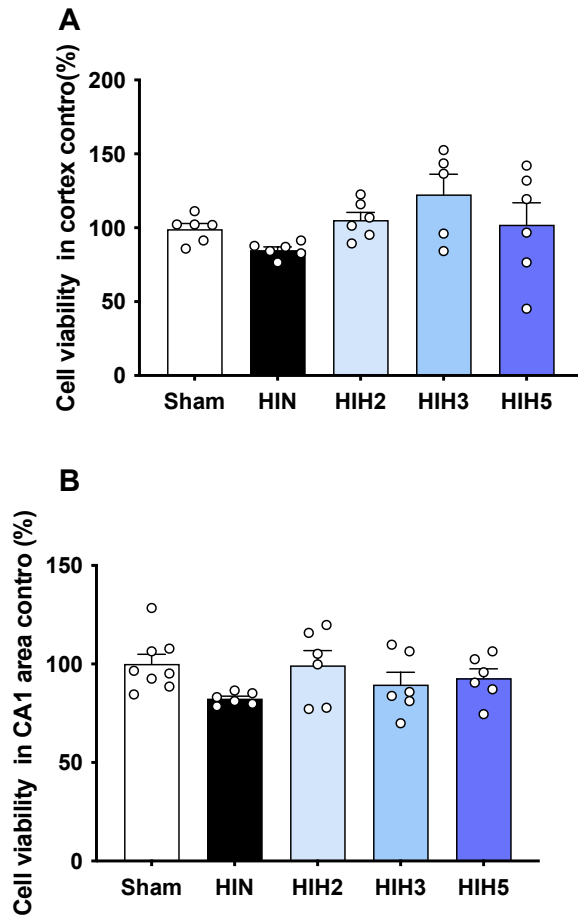
Suppl Figure 4: Sex-comparison for the modified neurological severity scores evaluated at P24 in the sham groups (A), in the HIN group (B), in the HIH2 group (C), in the HIH3 group (D) and in the HIH5 group (E).



Suppl Figure 5: Sex-comparison for the novel object recognition test performed at P45 in the sham groups (A), in the HIN group (B), in the HIH2 group (C), in the HIH3 group (D) and in the HIH5 group (E).



Suppl Figure 6: Sex-comparison for the food-restriction test performed at P51 in the sham groups (A), in the HIN group (B), in the HIH2 group (C), in the HIH3 group (D) and in the HIH5 group (E).



Suppl Figure 7: Histological evaluation of cell viability using cresyl violet staining in contralateral brain cortex (A) or hippocampus (B) in the sham, HIN, HIH2, HIH3 and HIH5 groups.

Chapitre 4 : Potentiel thérapeutique des injections de lactate couplées à l'hypothermie, *in vivo*, sur un modèle d'HIN

1. Introduction

Le lactate tend désormais à être reconnu comme un substrat énergétique essentiel pour le SNC (Berthet et al., 2012; Buscemi et al., 2020; Castillo et al., 2015), en particulier pour les neurones (Bouzier-Sore et al., 2003, 2006; Schurr et al., 1997). Comme décrit dans l'introduction, selon l'hypothèse de l'ANLS (Magistretti & Allaman, 2018; Pellerin & Magistretti, 1994), les astrocytes sont les principaux « producteurs » de lactate, lequel est transporté vers les neurones via les transporteurs MCTs. L'entrée du lactate dans les neurones permet son utilisation comme source d'énergie après conversion en pyruvate (Allaman et al., 2011). Le rôle crucial de cette ANLS dans l'activation cérébrale et les fonctions associées telles que la mémoire à long terme a été démontré *in vivo* (Netzahualcoyotzi & Pellerin, 2020; Roumes, Jollé, et al., 2021; Suzuki et al., 2011). Étant donné que le lactate constitue un substrat énergétique efficace pour les neurones, il est semblait judicieux de l'administrer dans des pathologies caractérisées par un déficit énergétique cérébral, telles que les AVC (Berthet et al., 2009, 2012; Buscemi et al., 2020) ou les traumatismes crâniens (Holloway et al., 2007; Quintard et al., 2016). De plus, l'expression des MCTs étant accrue dans le cerveau chez le nouveau-né, il nous est apparu comme pertinent de tester l'effet thérapeutique du lactate dans un modèle l'HIN. Nos travaux précédents ont pu mettre en évidence que trois injections de lactate (une par jour, sur les trois jours suivant l'accident d'HIN) étaient suffisantes pour diminuer les volumes lésionnels, et, surtout, récupérer toute les fonctions motrice et cognitives testées (Roumes, Dumont, et al., 2021).

L'hypothermie thérapeutique (HT) modérée demeure la seule prise en charge clinique qui permet de limiter les séquelles neurologiques induites par cette pathologie, mais près d'un nouveau-né sur deux n'y répond pas favorablement. Différentes approches thérapeutiques combinées à l'HT ont déjà été évaluées chez les rongeurs et les porcelets afin de renforcer les effets neuroprotecteurs de l'HT (Fan et al., 2013; Faulkner et al., 2011; Park et al., 2015; Robertson et al., 2013, 2019; Rodríguez-Fanjul, Durán Fernández-Feijóo, et al., 2017). Bien que ces approches combinées aient démontré une efficacité dans ces études précliniques, aucune n'a encore été validée pour une application en clinique. L'HIN reste à ce jour une des premières causes de mortalité néonatale et de handicaps de l'enfant. Il est donc nécessaire de continuer les recherches.

Le lactate est une molécule naturellement présente dans le corps humain, ce qui en fait une piste thérapeutique prometteuse pour le traitement de l'HIN. Contrairement aux nombreuses thérapies pharmacologiques qui, bien qu'efficaces chez le rat, n'ont pas réussi à montrer des résultats concluants chez l'homme, le lactate présente l'avantage d'être une molécule endogène. Cette caractéristique pourrait faciliter une translation clinique plus fiable et pertinente. Dans la perspective d'une application clinique future, il est essentiel d'évaluer l'effet neuroprotecteur du lactate en combinaison avec l'HT, dont les paramètres ont été définis dans le **Chapitre 3** précédent.

Les objectifs de cette étude sont les suivants :

- Évaluer la compatibilité de l'administration de lactate avec l'HT après un épisode d'HIN chez le rat
- Comparer les effets de la combinaison de ces deux thérapies à ceux de l'HT seule et du lactate seul
- Décrypter les mécanismes moléculaires sous-jacents à ces effets neuroprotecteurs
- Déterminer la fenêtre optimale pour l'administration du lactate
- Évaluer le rôle du lactate dans la modulation phénotypique des microglies *in vitro* afin de caractériser son impact sur la neuro-inflammation

2. Méthodes

2.1. Groupes d'animaux

Le modèle de Rice et Vannucci a été utilisé pour reproduire l'HIN chez des rats P7 (cf **Chapitre 2 ; 1.2.**). La température rectale des rats a été maintenue à $32,0 \pm 0,5$ °C en condition d'hypothermie et à $36,0 \pm 0,5$ °C en condition de normothermie (cf **Figure 20, Chapitre 2**). Dans cette étude, la durée de l'hypothermie ainsi que celle de la normothermie ont été fixées à **2 heures** (cf **Chapitre 3**).

Sept groupes expérimentaux ont été suivis :

- **Groupe Sham** : pas d'HIN à P7 + 1 injection intrapéritonéale (i.p.) de sérum physiologique (NaCl, 50 µl) à P7 + 2 h de normothermie débutant 3,5 h post-ligature (n = 13)
- **Groupe HIC** : HIN à P7 + 1 injection de NaCl (50 µl) en i.p. à P7 (juste après la sortie du caisson hypoxique) + 2 h de normothermie débutant 3,5 h post-ligature (n = 14)
- **Groupes HIH2** : HIN à P7 + 1 injection de NaCl en i.p. à P7 (juste après la sortie du caisson hypoxique) + 2 h d'hypothermie débutant 3,5 h post-ligature (n = 11)
- **Groupe HI3L** : HIN à P7 + 1 injection de lactate (1M, solution AP-HP 11,2 % (m/V) ; 4 µl/g) en i.p. à P7 + 2 h de normothermie débutant 3,5 h post-ligature + 2 injections supplémentaires de lactate 24 et 48 h post-HIN (n = 12)
- **Groupe HI3L+H2** : HI à P7 + 1 injection de lactate (1M, solution AP-HP 11,2 % (m/V) ; 4 µl/g) en i.p. à P7 + 2 h d'hypothermie débutant 3,5 h post-ligature + 2 injections supplémentaires de lactate 24 et 48 h post-HIN (n = 13)
- **Groupe HIH2+ 3L** : HI à P7 + 2 h d'hypothermie débutant 3,5 h post-ligature + 1 injection de lactate (1M, solution AP-HP 11,2 % (m/V) ; 4 µl/g) en i.p. immédiatement après la sortie de l'hypothermie + 2 injections supplémentaires de lactate 24 et 48 h post-HIN (n = 12)
- **Groupe Sham+Lactate** : Ce groupe n'a pas subi d'HIN à P7, mais a reçu une injection intrapéritonéale de lactate (4 µl/g) à P7 (n = 4)
- **Groupe HI+Lactate** : Ce groupe rassemble toutes les données des groupes HI3L et HI3L+H2, ayant reçu leur première injection de lactate immédiatement après la sortie du caisson hypoxique, suivie d'une IRM et avant traitement par hypothermie ou normothermie (n = 23).

L'IRM, en tant que méthode non-invasive, a permis :

- de mesurer à court terme le volume des lésions cérébrales
- de suivre longitudinalement l'évolution de ces volumes chez les rats, y compris après traitement par HT (P7, P9 et P30).

Parallèlement, les fonctions cognitives et motrices ont été évaluées à l'aide de divers tests comportementaux, sensorimoteurs et de mémoire, réalisés entre P8 et P51

- P8, P10, P12 : test du redressement
- P24 : test du mNSS
- P45 : test de reconnaissance du nouvel objet
- P51 : test de restriction alimentaire.

À P9, certains cerveaux des rats des groupes Sham, HIC, HIH2, HI3L et HI3L+H2 ont été prélevés en vue de décrypter les mécanismes neuroprotecteurs et ont été réalisés :

- des Western blots (n = 3 par groupe, prélèvement du cortex, de l'hippocampe et du striatum des hémisphères lésés et non lésés)
- de l'histologie et de l'immunohistochimie (IHC) (n = 3 par groupe).

L'intégralité des tests est décrite dans la **Figure 36**.

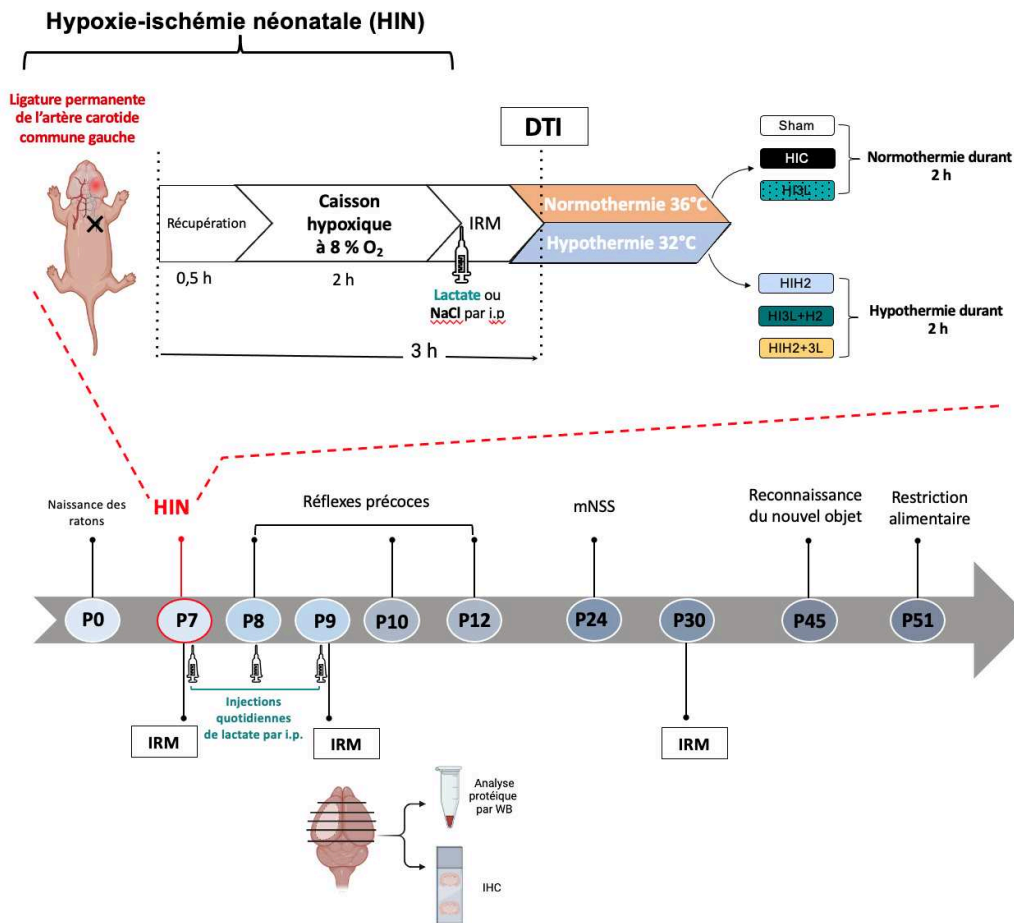


Figure 36 : Schéma expérimental résumant l'ensemble des méthodes utilisées sur les différents groupes de rats.

2.2. Culture *in vitro* de microglies primaires

Comme décrit dans le **Chapitre 2.6.1.**, les microglies ont été isolées à partir des cerveaux de rats nouveau-nés Wistar âgés d'un jour (P1), conformément aux directives européennes relatives à l'expérimentation animale. Après digestion enzymatique des tissus corticaux, les cellules ont été cultivées dans un milieu DMEM enrichi de 10 % de SVF, 1 % de pénicilline (100 U/mL) et de streptomycine (100 µg/mL). Après 12 jours de culture, les microglies ont été détachées par agitation à 37 °C pendant 1 h à 160 rpm, comptées, puis ensemencées. D'une part, 100×10^3 cellules par puits ont été placées dans une plaque de 24 puits, contenant des lamelles recouvertes de poly-L-lysine, afin d'évaluer la pureté des cellules microgliales via un double marquage en immunofluorescence avec le marqueur microglial IBA1 et le marqueur astrocytaire GFAP. D'autre part, 200×10^3 cellules par puits dans des plaques de 24 puits recouvertes de poly-L-lysine ont été utilisées pour les expériences sous condition LPS et pour les immunofluorescences avec les marqueurs phénotypiques microgliaux CD86 (pro-inflammatoire) et CD206 (anti-inflammatoire).

2.3. Viabilité cellulaire

La viabilité des cellules microgliales primaires a été évaluée à l'aide du réactif de prolifération cellulaire WST-1 (Sigma-Aldrich, réf. : 11644807001), selon le protocole du fabricant. En résumé, les cellules microgliales primaires ont été ensemencées dans des plaques à 96 puits à une densité de 100×10^3 cellules/puits. Après 48 h d'incubation, 10 µL du réactif WST-1 ont été ajoutés à chaque puits, puis les cellules ont été incubées à nouveau pendant 4 h à 37°C et 5 % de CO₂. L'absorbance de chaque puits a

été mesurée à 450 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques ELISA. La viabilité cellulaire a été exprimée en pourcentage par rapport au groupe contrôle.

2.4. Utilisation du LPS pour l'activation microgiale

Une concentration de 50 ng/mL de LPS a été utilisée pour induire un état d'activation inflammatoire des microglies (expériences préliminaires d'un Master 1). Des études ont montré que des concentrations de LPS inférieures à 100 ng/mL sont suffisantes et fiables pour altérer la morphologie et les fonctions des microglies *in vitro* (Lively & Schlichter, 2018; Town et al., 2005), tandis que des concentrations très élevées peuvent réduire leur viabilité (von Zahn et al., 1997)

Pour les expérimentations, les conditions suivantes ont été réalisées [Figure 37] :

- Condition **contrôle** : Absence de stimulation et de traitement
- Condition **lactate seul** : Les microglies ont été incubées avec du lactate pendant 24 h
- Condition **LPS seul** : Les microglies ont été stimulées avec du LPS pendant 24 h
- Condition **LPS-Post-milieu** : Les microglies ont été stimulées avec du LPS pendant 24 h, puis le milieu de culture a été remplacé par un milieu frais pendant 24 h
- Condition **LPS-Post-lactate** : Les microglies ont été stimulées avec du LPS pendant 24 h, puis le milieu de culture a été remplacé par un milieu frais contenant 5 mM de lactate et réincubées pendant 24 h
- Condition **Co-LPS-lactate** : Les microglies ont été simultanément stimulées avec du LPS et du lactate (5mM) pendant 24 h

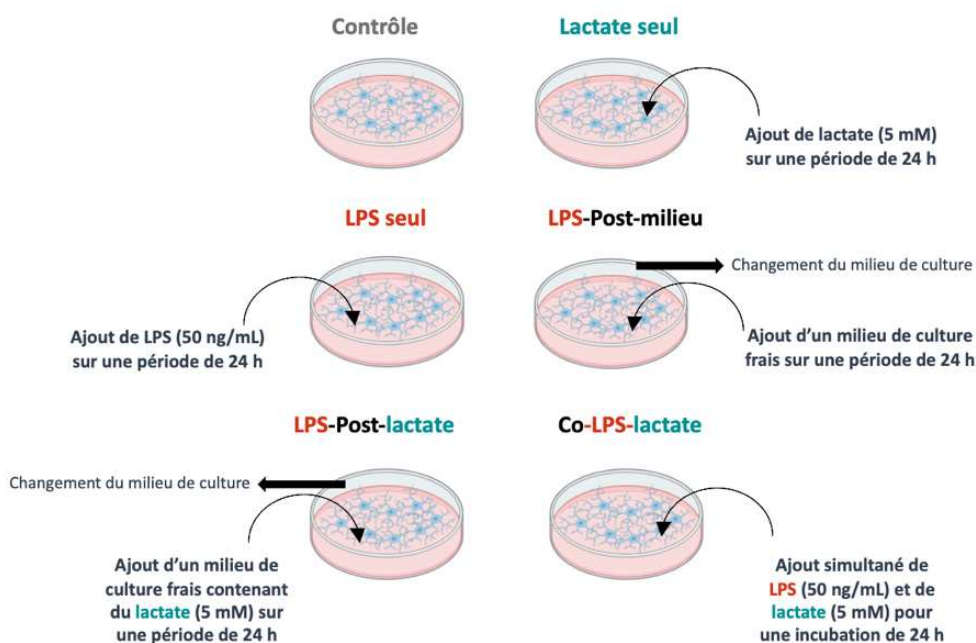


Figure 37 : Schéma récapitulant les différentes conditions de la culture des microglies primaires.

2.5. Dosage des concentrations de TNF- α dans le surnageant cellulaire

Les concentrations de TNF- α dans le surnageant du milieu de culture des microglies primaires ont été mesurées par un test immuno-enzymatique (ELISA), (protocole décrit dans le Chapitre 2).

2.6. Dosage du lactate

Les concentrations de lactate dans le surnageant du milieu de culture ont été quantifiées à l'aide de la lactate déshydrogénase (LDH) (LDH-provenant du cœur bovin, Sigma, réf. : L3916-2,5 mL). Ce protocole permet de mesurer des concentrations de lactate comprises entre 0,22 mmol/L et 13,3 mmol/L. Un

volume de 100 µL de surnageant, prélevé dans les différentes conditions expérimentales, a été utilisé pour l'analyse. Tous les échantillons ont été dilués au 1/10, à l'exception de la condition LPS-Post-milieu, diluée au 1/4. Après une incubation de 15 min à 37°C avec la LDH et du NAD⁺, l'absorbance du NADH a été mesurée à 340 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Une courbe standard a ensuite permis d'interpoler les concentrations de lactate dans les échantillons, exprimées en mmol/L.

3. Résultats

3.1. Effet neuroprotecteur immédiat de la première injection de lactate

À P7, les rats du groupe HI+Lactate (ayant reçu une première injection intrapéritonéale de lactate) présentaient des volumes de lésions cérébrales significativement réduits par rapport au groupe HIC (34 ± 1 % pour HI+Lactate contre 46 ± 1 % pour HIC) [Figure 38 A]. Rappelons que, pour ces mesures, les IRM de diffusion ont été réalisées systématiquement 3,5 h après la ligature de la carotide et 30 min après la sortie du caisson. Étant donné que les injections de lactate sont effectuées à la sortie du caisson, **il n'y a que 30 min de traitement d'écart entre les deux groupes, ce qui souligne l'effet neuroprotecteur à très court terme du lactate** (voir la figure 1 de l'annexe). À partir des IRM de diffusion, les valeurs d'ADC ont été extraites pour le cortex, l'hippocampe et le striatum. Une diminution des valeurs d'ADC est relevée dans le groupe HIC comparé au groupe Sham (réduction de 43 % dans le cortex, 42 % dans l'hippocampe et 37 % dans le striatum), reflétant une restriction de la diffusion de l'eau liée au gonflement cellulaire (œdème cytotoxique) dans ce groupe contrôle. Par rapport au groupe sham, une diminution des valeurs d'ADC est également observée dans le groupe HI+Lactate (réduction de 34 % dans le cortex, 22 % dans l'hippocampe et 15 % dans le striatum), mais celles-ci sont toutefois significativement plus élevées par rapport au groupe HIC [Figure 38 B]. Ces résultats suggèrent que l'injection de lactate après l'HIN a réduit non seulement le volume des lésions cérébrales, mais aussi la sévérité de l'œdème cytotoxique.

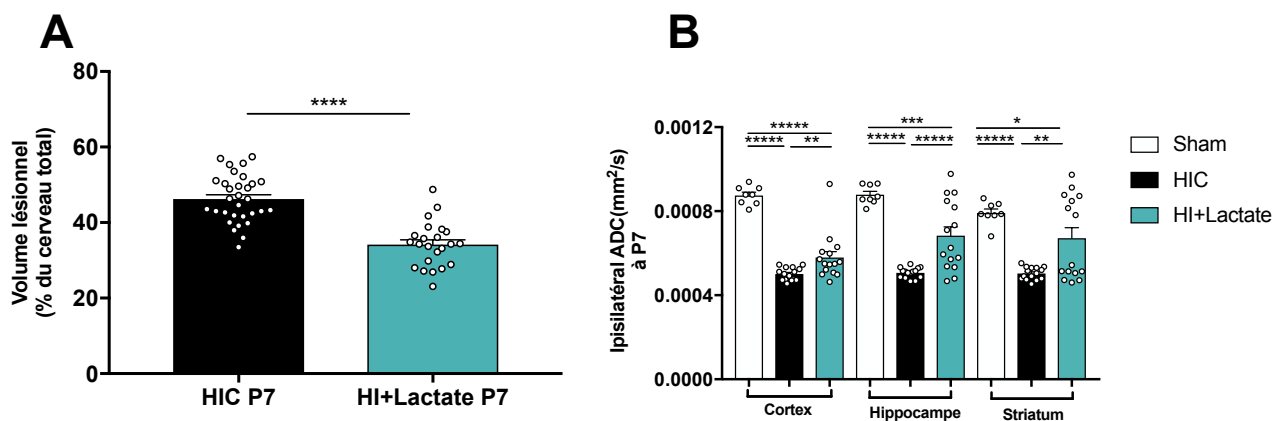


Figure 38 : Effet neuroprotecteur immédiat de la première injection de lactate. (A) Quantification des volumes lésionnels cérébraux, exprimée en pourcentage (%) par rapport au volume total du cerveau, pour les groupes HIC et HI+Lactate à P7. (B) : Valeurs ADC ipsilatérales en mm²/s pour les groupes Sham, HIC et HI+Lactate dans le cortex, l'hippocampe et le striatum. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 et **** p < 0,0001.

3.2. Évolution temporelle des lactatémies chez le raton P7

Les concentrations de lactate dans le sang du groupe Sham ayant reçu une injection de lactate ont été mesurées sur 2 h à partir d'une goutte de sang prélevée sur les pattes postérieures de l'animal et grâce à un lecteur portatif (Stat Strip Xpress², Nova Biomedical). Elles ont été comparées à celles du groupe Sham traité avec du NaCl. Comme montré dans la figure 39 A, les lactatémies ont augmenté rapidement après une injection unique de Na-lactate (concentration mesurée 5 min après l'injection : 5,2 mmol/L) et sont revenues aux valeurs normales entre 45 et 120 min après l'injection (concentration

moyenne : 1,8 mmol/L). En comparaison, les rats du groupe Sham traités avec du NaCl ont maintenu des lactatémies stables, autour de 1,6 mmol/L, tout au long de la période d'observation [Figure 39 A].

Les lactatémies ont ensuite été mesurées chez les rats du groupe HI+Lactate, et comparées à celles du groupe HIC (HI+NaCl), sur une période allant jusqu'à 24 h post-HIN. Comme illustré dans la figure 39 B, la lactatémie mesurée immédiatement à la sortie du caisson hypoxique était de 20 mmol/L dans les deux groupes. Elle a commencé à décroître 20 min après l'injection dans les deux groupes, mais la concentration est revenue plus rapidement à des valeurs normales dans le groupe HI+Lactate, atteignant 2,5 mmol/L à 300 min post-injection, contre 4,05 mmol/L pour le groupe HI+NaCl au même moment. Vingt-quatre heures après l'HIN, la concentration moyenne de lactate mesurée dans les deux groupes était d'environ 2 mmol/L [Figure 39 B].

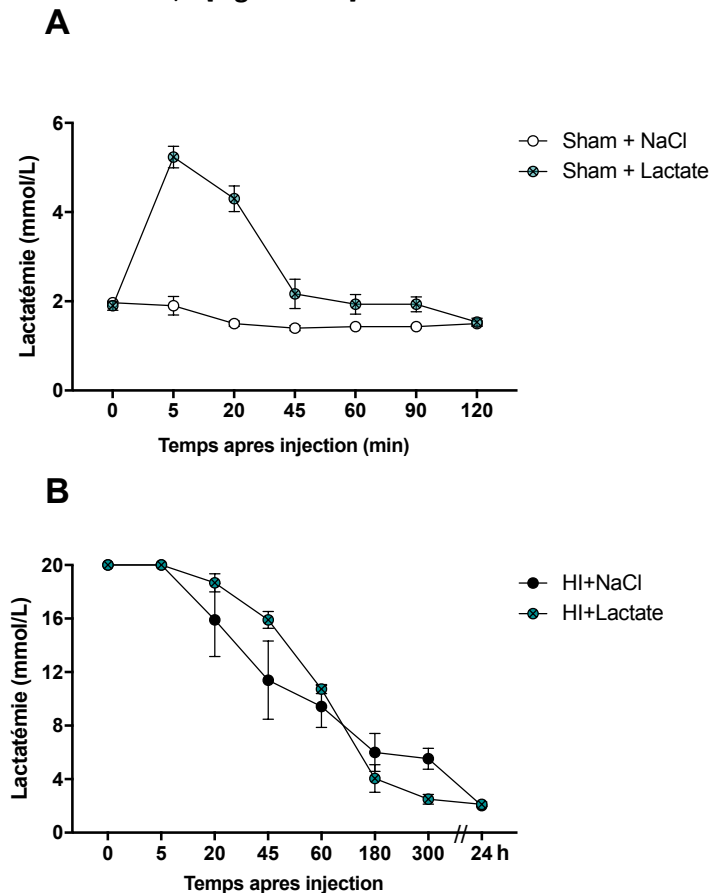


Figure 39 : Évolution temporelle des concentrations sanguines de lactate. (A) Les concentrations de lactate dans le sang ont été mesurées à 5, 20, 45, 60, 90, et 120 minutes après l'injection intrapéritonéale de lactate de sodium (1 M) ou de solution saline (NaCl) dans des rats du groupe Sham (n = 4 pour chaque condition/temps). (B) Les lactatémies ont également été suivies chez des rats de groupes soumis à une hypoxie-ischémie (n = 6) ayant reçu soit du Na-Lactate, soit du NaCl, aux intervalles de temps suivants : 5, 20, 45, 60, 180, 300 mn et 24 h post-HIN.

3.3. Effet neuroprotecteur de la combinaison lactate et hypothermie sur les volumes de lésions cérébrales

À P9, l'administration de lactate seule (groupe HI3L) ou combinée avec 2 h d'HT (groupe HI3L+H2) a entraîné une réduction plus rapide des volumes de lésions cérébrales par rapport aux groupes hypothermie seule (HIH2) et contrôle (HIC) (volumes lésionnels à P9 : $18 \pm 2\%$, $21 \pm 2\%$, $29 \pm 2\%$ et $39 \pm 2\%$ pour les groupes HI3L+H2, HI3L, HIH2 et HIC, respectivement [Figure 40 A et figure 2 de l'annexe]). Le groupe HIH2 présentait un volume lésionnel plus faible que le groupe HIC (ces résultats ont été présentés dans le Chapitre 3). Aucune différence significative n'a été observée entre les

groupes HI3L+H2 et HI3L en termes de volumes de lésions cérébrales. Le taux de récupération 48 h après l'épisode d'HIN a été calculé selon la formule suivante : $[(\text{Taille des lésions à P7} - \text{Taille des lésions à P9}) / \text{Taille des lésions à P7}] \times 100$. De manière intéressante, le groupe HI3L+H2 a montré un meilleur taux de récupération comparé aux groupes HIH2 et HI3L, ainsi qu'au groupe HIC (taux de récupération : $51 \pm 5 \%$, $35 \pm 5 \%$, $35 \pm 4 \%$ et $17 \pm 2 \%$ respectivement pour les groupes HI3L+H2, HI3L, HIH2 et HIC, [Figure 40 B]). Aucune différence statistiquement significative n'a été observée entre les groupes HI3L et HIH2, mais leurs taux de récupération étaient supérieurs à celui du groupe HIC.

À long terme (P30), une régression des volumes lésionnels a été observée pour tous les groupes, mais cette régression a été plus marquée dans les groupes HI3L+H2, HI3L et HIH2 comparativement au groupe HIC (volumes lésionnels : $2 \pm 2 \%$, $4 \pm 2 \%$, $5 \pm 3 \%$ et $17 \pm 4 \%$, pour les groupes HI3L+H2, HI3L, HIH2 et HIC respectivement, [Figure 40 C et figure 3 de l'annexe]). Le taux de récupération, calculé par la formule $[(\text{Taille des lésions à P7} - \text{Taille des lésions à P30}) / \text{Taille des lésions à P7}] \times 100$, a été comparé entre les groupes. Aucune différence statistiquement significative n'a été observée entre les groupes HI3L+H2, HI3L et HIH2, comparativement au groupe HIC, mais les valeurs des taux de récupération étaient meilleures pour ces groupes que celle du groupe HIC (Taux de récupération : $99 \pm 1 \%$, $84 \pm 6 \%$, $87 \pm 7 \%$ et $64 \pm 8 \%$ pour les groupes HI3L+H2, HI3L, HIH2 et HIC, respectivement).

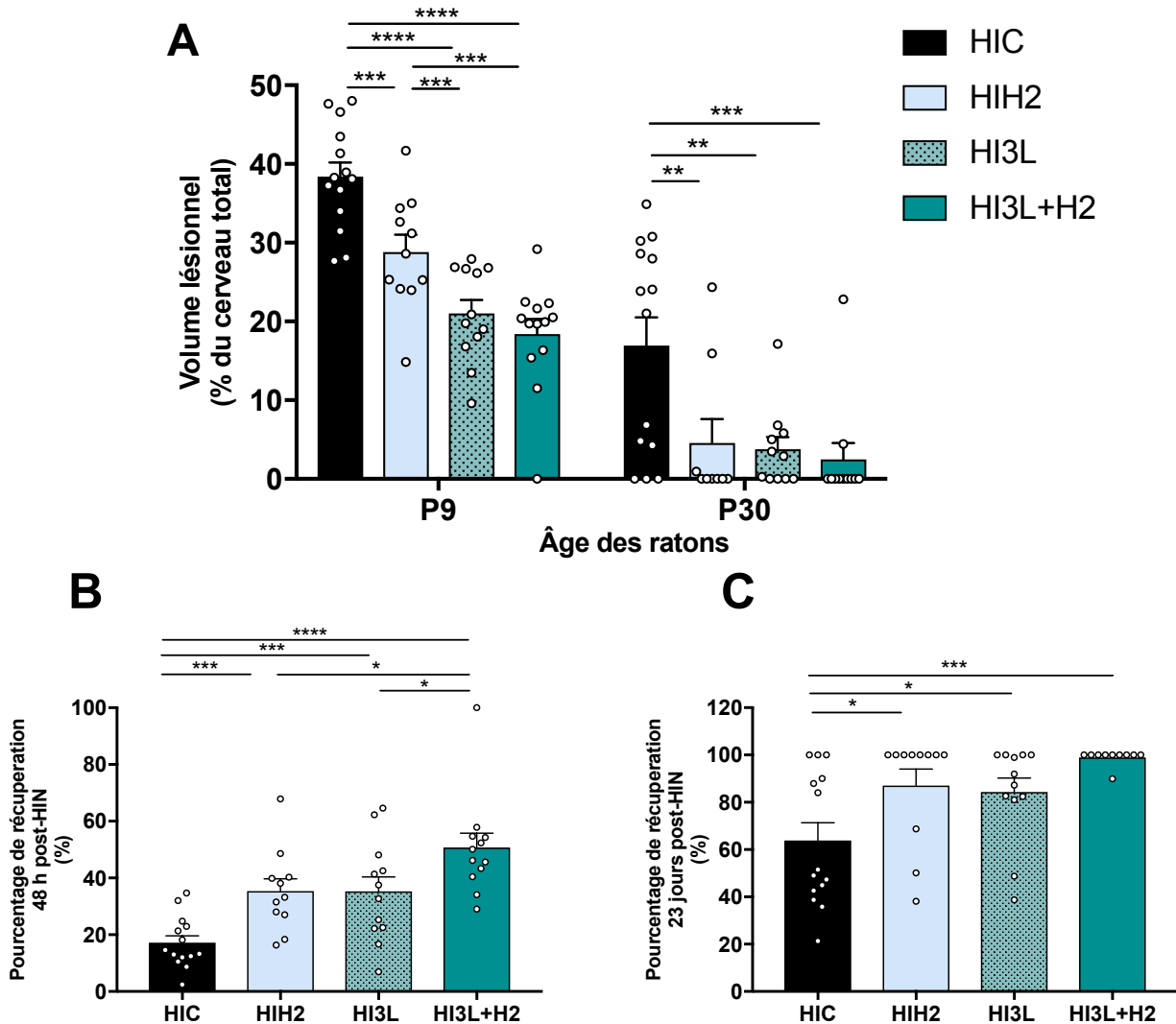


Figure 40 : Effet neuroprotecteur de la combinaison du lactate avec l'HT sur les volumes lésionnels.(A) Quantification des volumes lésionnels cérébrales, exprimée en pourcentage (%) par rapport au volume total du cerveau, pour les différents groupes en fonction du temps (P9, P30). (B) Taux de récupération 48 h après une lésion HIN, exprimé en % pour les différents groupes. (C) Taux de récupération 23 jours post-HIN exprimé en % pour les différents groupes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ et **** $p < 0,0001$.

3.4. Effet neuroprotecteur de la combinaison lactate et hypothermie sur les fonctions motrices et cognitives

Les tests de réflexes précoces réalisés à P8, P10 et P12 ont montré que les rats du groupe HIC présentaient les déficits les plus marqués par rapport aux autres groupes. Lors du test de redressement, les rats du groupe HIC n'ont pas amélioré leurs performances au cours du temps, contrairement à ceux des autres groupes. Aucune différence significative n'a été observée entre les performances des rats du groupe Sham et ceux du groupe HI3L [Figure 41 A]. À P8 et P10, les performances des rats des groupes HIH2 et HI3L+H2 étaient similaires, et supérieures à celles des rats du groupe HIC, mais inférieures à celles des rats des groupes Sham et HI3L [Figure 41 A]. À P12, tous les rats ayant reçu trois doses de lactate (groupes HI3L+H2 et HI3L) n'ont montré aucune atteinte de leur capacité de redressement, qui étaient identiques à celles des rats dans le groupe Sham, alors que les capacités de redressement des rats du groupe HIH2, bien que meilleur comparé à celle du groupe HIC, restaient légèrement atteintes [Figure 41 A].

Concernant le mNSS évalué à P24, seul le groupe HIC a obtenu un score significativement plus élevé, reflétant une atteinte neurologique plus importante induite par l'HIN (score mNSS : $0,6 \pm 0,2$; $6,2 \pm 0,3$; $2 \pm 0,4$; $1,3 \pm 0,1$ et $1,5 \pm 0,2$ pour les rats des groupes Sham, HIC, HIH2, HI3L et HI3L+H2, respectivement). Aucune différence significative n'a été observée entre les groupes Sham et HI3L, ni entre les groupes HIH2, HI3L et HI3L+H2 [Figure 41 B].

Le test de reconnaissance du nouvel objet a mis en évidence une altération de la mémoire à long terme des rats du groupe HIC. Ils ont en effet présenté un indice de discrimination significativement plus faible que tous les autres groupes (indice de discrimination : $0,90 \pm 0,02$; $0,05 \pm 0,05$; $0,71 \pm 0,04$; $0,83 \pm 0,03$ et $0,89 \pm 0,03$ pour les animaux des groupes Sham, HIC, HIH2, HI3L et HI3L+H2, respectivement) [Figure 41 C]. Aucune altération de la mémoire n'a été observée chez les rats ayant reçu trois injections de lactate (indice de discrimination similaires dans les groupes HI3L, HI3L+H2 et Sham). De plus, l'administration de lactate, seule ou en combinaison avec l'HT, a permis d'obtenir un indice de discrimination supérieur à celui des rats traités uniquement par HT après HIN.

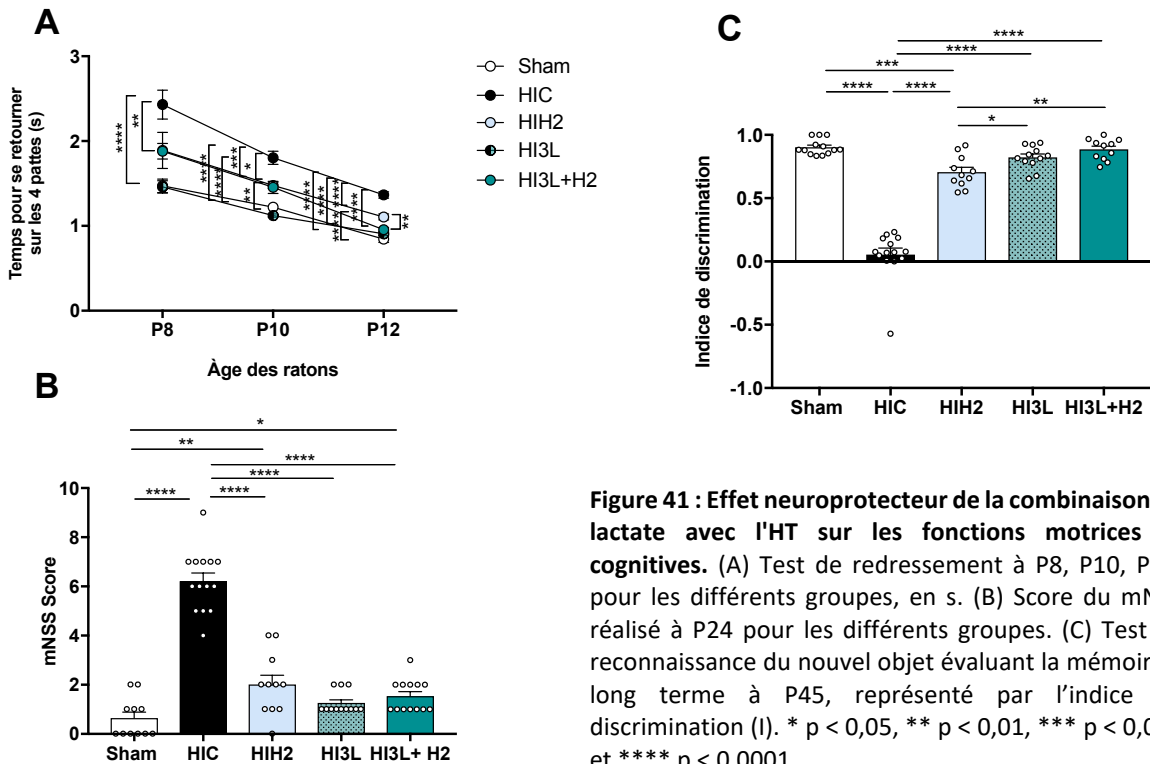


Figure 41 : Effet neuroprotecteur de la combinaison du lactate avec l'HT sur les fonctions motrices et cognitives. (A) Test de redressement à P8, P10, P12, pour les différents groupes, en s. (B) Score du mNSS réalisé à P24 pour les différents groupes. (C) Test de reconnaissance du nouvel objet évaluant la mémoire à long terme à P45, représenté par l'indice de discrimination (I). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ et **** $p < 0,0001$.

Des troubles de l'humeur sont fréquemment observés chez les enfants et adolescents ayant subi un accident d'HIN. En effet, ces enfants présentent un risque accru de développer des symptômes dépressifs, anxieux ou de l'irritabilité en grandissant, en raison des impacts potentiels sur les régions cérébrales liées à la régulation émotionnelle. Les états dépressifs des rats ont ainsi été évalués à P51 à l'aide du test de restriction alimentaire. Les animaux des groupes HIH2, HI3L et HI3L+H2 ont montré un temps de latence pour manger similaire à celui des animaux du groupe Sham, contrairement à ceux du groupe HIC (temps pour manger : 147 ± 12 s ; 408 ± 53 s ; 214 ± 39 s ; 223 ± 46 s et 133 ± 40 s, pour les animaux des groupes Sham, HIC, HIH2, HI3L et HI3L+H2, respectivement) [Figure 42 A]. De plus, lors de ce test, 46 % des rats du groupe HIC ont présenté du bruxisme contre 0 %, 9 %, 8 % et 9 % pour les animaux des groupes Sham, HIH2, HI3L et HI3L+H2, respectivement [Figure 42 B]. Dans un test de restriction alimentaire, le bruxisme (grincement des dents) est souvent interprété comme un indicateur d'anxiété, plus que de dépression. Ces résultats montrent donc que le groupe HIC présente un état dépressif et anxieux qui n'est pas retrouvé chez les animaux ayant été traité après l'HIN soit par injection de lactate seul, soit par HT seule, ou encore soit par la combinaison lactate et HT.

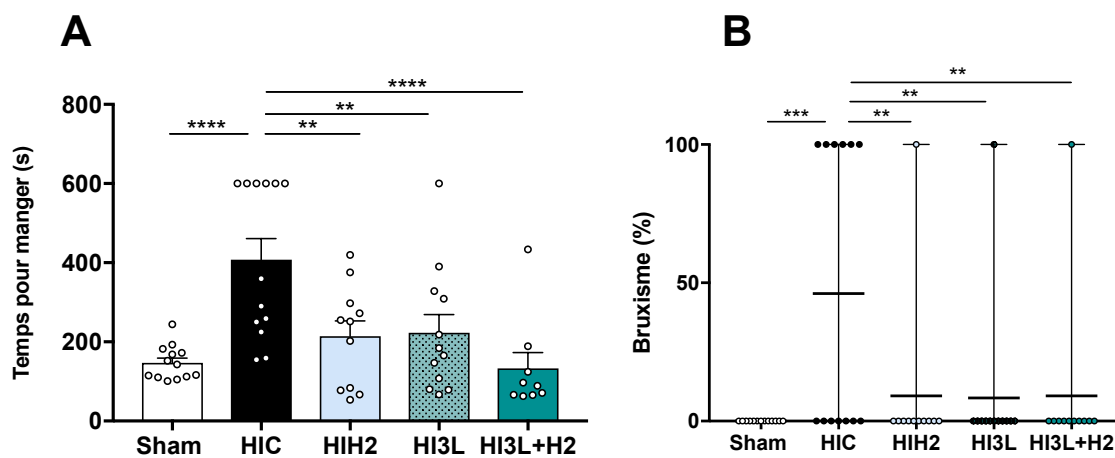


Figure 42 : Effet neuroprotecteur de la combinaison du lactate avec l'HT sur les fonctions motrices et cognitives. (A) Test de restriction alimentaire pour les différents groupes. Plus l'état dépressif de l'animal est prononcé, plus le temps nécessaire pour consommer les croquettes imbibées de sucrose augmente (B) Bruxisme exprimés en pourcentage pour les différents groupes. Les différences statistiques ont été définies comme $p < 0,05$ (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ et **** $p < 0,0001$).

3.5. Effet de la combinaison lactate et hypothermie sur la microglie

Nous avons évalué l'impact de l'administration de lactate (couplée ou non à l'HT) sur l'activation de la microglie, en réalisant une immunohistochimie pour IBA1. En effet, **IBA1 est particulièrement exprimé dans les microglies activées**, c'est-à-dire dans des lésions neuronales où les cellules microgliales répondant à des signaux inflammatoires. Le groupe HIC a montré une augmentation de l'intensité de fluorescence d'IBA1 dans le cortex et la région CA1 de l'hippocampe du côté ipsilatéral par rapport au groupe Sham [Figure 43 A et B et la figure 4 de l'annexe]. Cependant, comparé au groupe de rats non traités post HI, les traitements par HT seule, lactate seul, ou la combinaison des deux thérapies ont permis une réduction de l'intensité de fluorescence d'IBA1 dans les deux régions cérébrales. Cette réduction de fluorescence était particulièrement marquée dans l'hippocampe du groupe HI3L+H2, le signal de fluorescence couplé au marqueur IBA1 atteignant un niveau similaire à celui mesuré dans le groupe Sham [Figure 43 B].

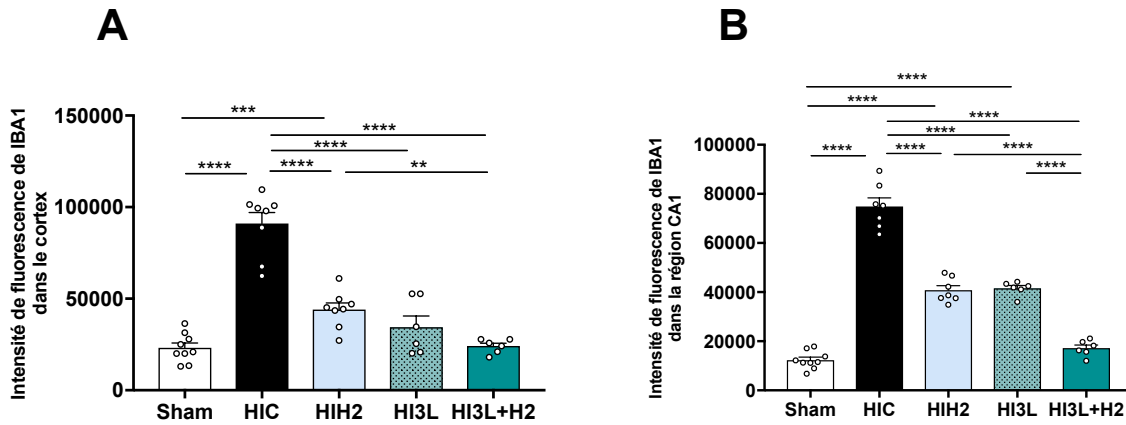


Figure 43 : Quantification de l'intensité de fluorescence du marqueur IBA1 dans le cortex et la région CA1 de l'hippocampe des hémisphères lésés (côtés ipsilatéraux) (n=6). * p < 0,01, *** p < 0,001 et **** p < 0,0001.

3.6. Impact de l'administration du lactate sur l'expression de protéines

Les mécanismes impliqués dans la neuroprotection à court terme induite par l'administration de lactate ont été évalués par Western Blot (WB) sur des échantillons corticaux de rats P9 du groupe HI3L et comparés aux valeurs des groupes Sham, HIC et HI3L+H2. Nous avons d'abord examiné l'expression protéique du Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF), un facteur neurotrophique essentiel pour la survie, le développement et la plasticité neuronales. Comme illustré dans la figure 44, les trois injections de lactate seules ont entraîné une augmentation significative de l'expression protéique du BDNF dans l'hémisphère cortical lésé (ipsilatéral) par rapport au groupe HIC, avec des valeurs moyennes de 273 ± 63 % pour le groupe HI3L contre 91 ± 5 % pour le groupe HIC [Figure 44 A]. Cependant, cette augmentation de l'expression de BDNF n'a pas été observée lorsque les injections de lactate étaient couplées à l'HT (valeurs d'expression de BDNF : 273 ± 63 % pour le groupe HI3L et 96 ± 17 % pour le groupe HI3L+H2) [Figure 44 A]. Cette augmentation de l'expression de BDNF a également été observée dans l'hémisphère controlatéral pour le groupe HI3L [Figure 44 B]. Les injections de lactate pourraient donc être neuroprotectrice en stimulant la neurogénèse.

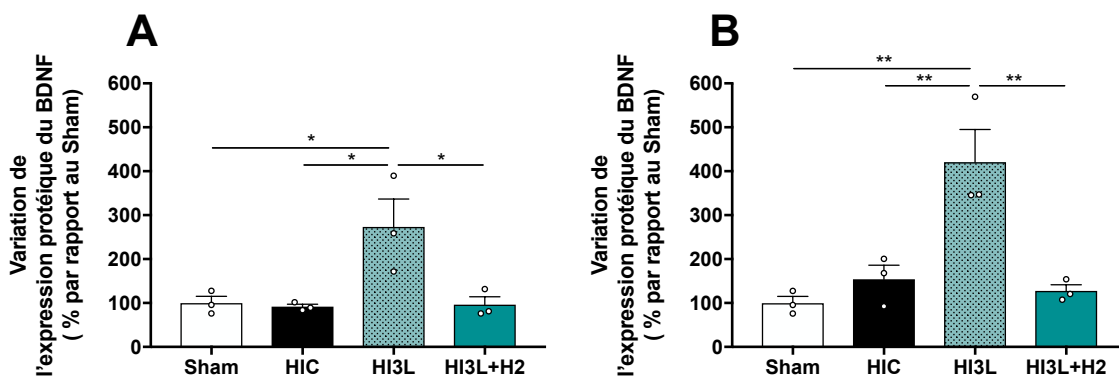


Figure 44 : Expression protéique du BDNF. WB réalisés à P9 sur les cortex lésés et non-lésés des groupes Sham, HIC, HI3L et HI3L+H2. (A) Coté ipsilatéral et (B) Coté controlatéral. *p<0,05 et **p<0,01.

Ensuite, nous avons évalué l'effet de l'administration de lactate sur l'expression de la protéine antioxydante SOD2, impliquée dans les processus de lutte contre les ROS. Comme illustré dans la **Figure 45**, une augmentation significative de l'expression de SOD2 a été mesurée dans le côté lésé ipsilatéral en présence de lactate, comparativement au groupe HIC (valeur d'expression de SOD2 : 624 ± 186 % pour le groupe HI3L et 162 ± 78 % pour le groupe HIC) [**Figure 45 A**]. Là encore, cette augmentation de l'expression de SOD2 n'a pas été observée lorsque les injections de lactate étaient couplées à l'HT (valeurs d'expression de SOD2 : 624 ± 186 % pour le groupe HI3L et 162 ± 71 % pour le groupe HI3L+H2) [**Figure 45 A**]. L'effet des injections de lactate seul sur l'expression de cette protéine a également été observé dans le côté controlatéral, mais n'a pas été détecté lorsque le lactate était combiné à l'HT [**Figure 45 B**]. Ces résultats suggèrent que les injections de lactate seules pourraient être neuroprotectrice via un effet antioxydant en stimulant l'expression de SOD2. Cependant, les effets à la fois sur la neurogénèse et la lutte contre les ROS semblent être inhibés lorsque les injections de lactate sont couplées à l'HT.

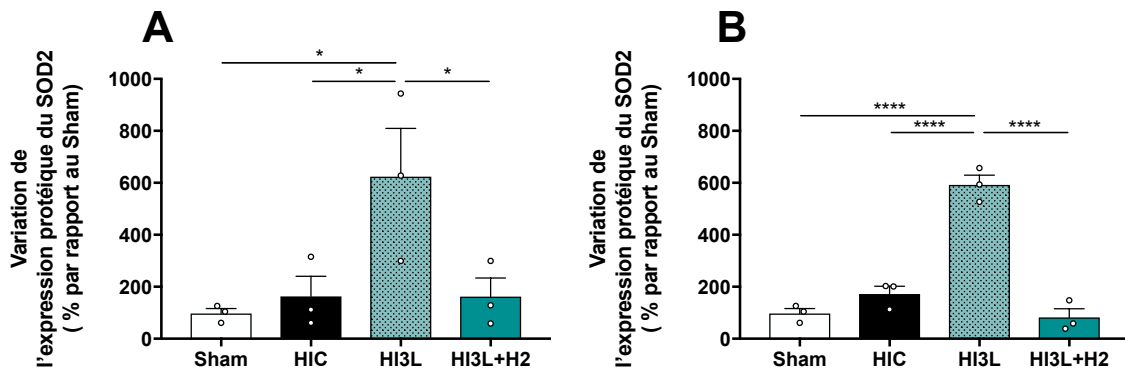


Figure 45 : Expression protéique du SOD2. WB réalisés à P9 sur les cortex lésés et non-lésés des groupes Sham, HIC, HI3L et HI3L+H2. (A) Coté ipsilatéral et (B) Coté controlatéral. * $p < 0,05$ et **** $p < 0,0001$.

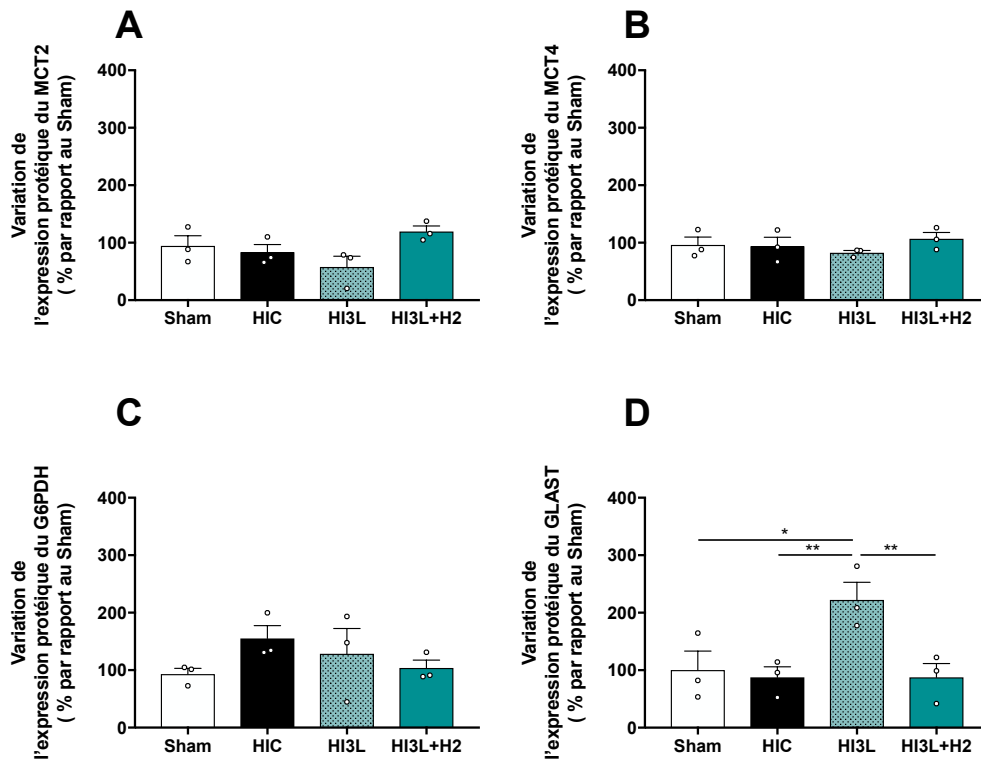


Figure 46 : Expression protéique du MCT2, MCT4, G6PDH (enzyme de la voie des pentoses phosphates) et **GLAST** (transporteur au glutamate astrocytaire). WB réalisés à P9 sur les cortex lésés des groupes Sham, HIC, HI3L et HI3L+H2. Les données présentées concernent uniquement le côté ipsilatéral. Les différences statistiques ont été définies comme $p < 0,05$.

Dans cette étude, nous avons également examiné l'impact de l'administration de lactate sur certains gènes liés à l'ANLS et à la voie des pentoses-phosphates. L'expression des gènes MCT4, MCT2, GLAST et G6PDH a été quantifiée.

Dans l'hémisphère lésé, aucune différence significative n'a été observée dans les expressions protéiques de MCT2, MCT4 et G6PDH entre les groupes Sham, HIC, HI3L et HI3L+H2 [Figure 46 A, B et C]. Seule l'expression de GLAST a été significativement augmentée par l'administration de lactate dans le côté lésé, comparativement aux groupes HIC et HI3L+H2 (expression de GLAST : 222 ± 31 % pour le groupe HI3L contre 87 ± 18 % pour le groupe HIC et 88 ± 24 % pour le groupe HI3L+H2) [Figure 46 D]. Dans l'hémisphère non lésé, le lactate seul a également induit une augmentation de l'expression de GLAST (voir figure 5 en annexe). Pour rappel, GLAST est le transporteur au glutamate astrocytaire qui permet la recapture du neurotransmetteur, limitant ainsi l'excitotoxicité.

3.7. Fenêtre optimale d'administration du lactate après une HIN en combinaison avec l'hypothermie

Afin de déterminer la meilleure fenêtre d'administration du lactate après l'HIN, lorsqu'elle est couplée à l'HT, les données du groupe HI3L+H2 ont été comparées à celles d'un nouveau groupe dans lequel les rats ont reçu la première injection de lactate **après** la phase d'hypothermie (groupe HIH2+3L). Les rats de ce groupe ont par la suite reçu de deux injections supplémentaires à 24 h et 48 h post-HIN tout comme ceux du groupe HI3L+H2 [Figure 36]. À P9, les volumes de lésions cérébrales mesurés par IRM de diffusion étaient plus faibles dans le groupe HI3L+H2 par rapport au groupe HIH2+3L (volumes lésionnels à P9 : 18 ± 2 % pour HI3L+H2 contre 30 ± 1 % pour HIH2+3L) [Figure 47 A et voir figure 6 A en annexe]. Ce résultat s'est également confirmé à P30, où le groupe HI3L+H2 présentait des lésions cérébrales de volume plus faible que le groupe HIH2+3L (volumes des lésions à P30 : 2 ± 2 % pour HI3L+H2 contre 23 ± 3 % pour HIH2+3L) [Figure 47 A et voir figure 6 B en annexe]. Sur la base de ces données obtenues par IRM, le groupe ayant reçu le plus tôt possible l'administration de lactate (HI3L+H2) semble bénéficier d'une meilleure neuroprotection.

Concernant les tests de comportement, le test de redressement n'a pu mettre en évidence aucune différence significative entre les deux groupes à P8 et P10. Cependant, à P12, le groupe HI3L+H2 a montré des meilleures performances par rapport au groupe HIH2+3L. [Figure 47 B]. À P24, l'évaluation des dommages neurologiques via le score mNSS a révélé que le groupe HI3L+H2 a obtenu de meilleurs résultats, significativement supérieurs à ceux du groupe HIH2+3L (score mNSS : $1,5 \pm 0,2$ pour HI3L+H2 contre $2,4 \pm 0,3$ pour HIH2+3L) [Figure 47 C]. Lors du test de reconnaissance d'un nouvel objet à P45, le groupe HI3L+H2 a présenté un indice de discrimination significativement supérieur à celui du groupe HIH2+3L (Indice de discrimination : $0,89 \pm 0,03$ pour HI3L+H2 et $0,57 \pm 0,07$ pour HIH2+3L) [Figure 47 D]. Enfin, à P51, le test de restriction alimentaire a montré un niveau de dépression plus faible chez les animaux du groupe HI3L+H2 (temps pour manger : 133 ± 40 s pour HI3L+H2 contre 382 ± 53 s pour HIH2+3L) [Figure 47 E] mais aucune différence significative concernant l'anxiété entre ces deux groupes (bruxisme : 9 % pour HI3L+H2 et 22 % pour HIH2+3L) [Figure 47 F].

L'ensemble de ces résultats démontre que les rats du groupe HI3L+H2 ont bénéficié d'une meilleure neuroprotection, tant à court qu'à long terme, par rapport au groupe HIH2+3L, en termes de fonctions motrices et cognitives. Ces données suggèrent que l'administration de lactate avant l'HT constitue la fenêtre optimale pour maximiser l'efficacité de la combinaison du lactate et de l'HT dans le cadre de l'HIN.

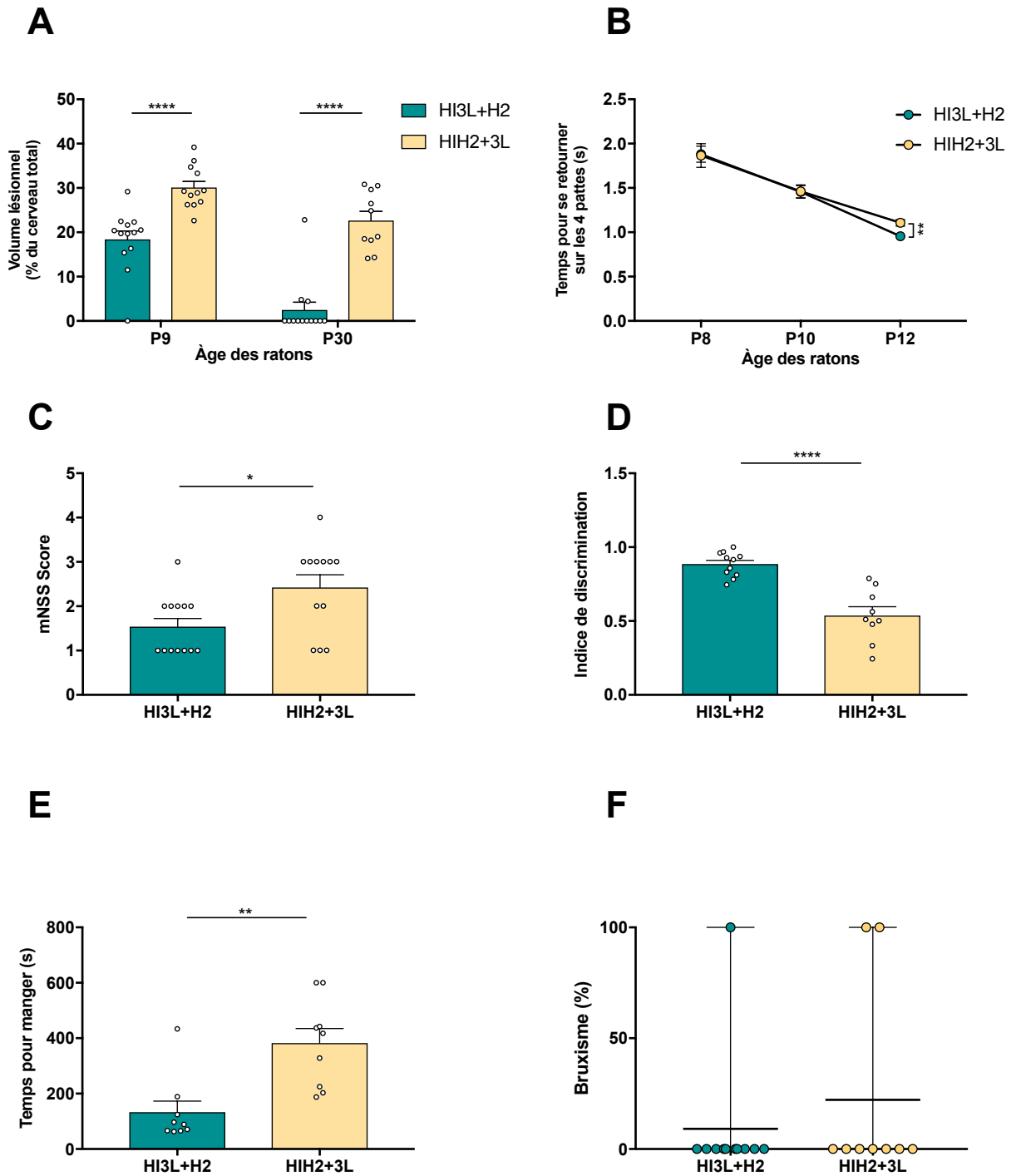


Figure 47 : Comparaison de deux fenêtres d'administration du lactate après une HIN en combinaison avec l'HT. La 1^{ère} injection de lactate a été injectée soit à la sortie du caisson et avant les 2 h d'hypothermie (groupe HI3L+H2), soit après les 2 h d'hypothermie (groupe HIH2+3L). Les 2 autres injections de lactate ont été faites à 24 et 48 h post-HIN dans les 2 groupes. (A) Quantification des volumes lésionnels cérébraux, exprimée en pourcentage (%) par rapport au volume total du cerveau, pour les 2 groupes à P9 et P30. (B) Test de redressement à P8, P10 et P12, pour les 2 groupes, en s. (C) Score du mNSS pour les 2 groupes. (D) Test de reconnaissance du nouvel objet évaluant la mémoire à long terme à P45, représenté par l'indice de discrimination (I). (E) Test de restriction alimentaire pour les 2 groupes. (F) Bruxisme, exprimés en pourcentage, pour les 2 groupes. Les différences statistiques ont été définies comme $p < 0,05$ (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et **** $p < 0,0001$).

3.8. Rôle du lactate sur la modulation phénotypique des microglies

3.8.1. Évaluation de la pureté de la culture primaire microgliale

La pureté de la culture primaire de microglies a été évaluée par double marquage, utilisant un marqueur spécifique des microglies (IBA1) et un marqueur des astrocytes (GFAP). Le comptage des cellules marquées par IBA1 et GFAP, ainsi que des noyaux totaux, a permis de déterminer le pourcentage de microglies et d'astrocytes présents. Ce comptage a été réalisé sur six champs de double marquage issus de sept expériences distinctes. La culture primaire contenait 91 ± 1 % de microglies et 6 ± 1 % d'astrocytes [Figure 48 et voir figure 7 en annexe], indiquant une pureté suffisante pour mener les expériences prévues.

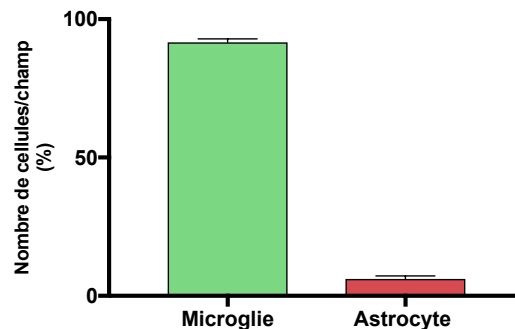


Figure 48 : Pourcentage (%) de cellules microgliales dans nos cultures primaires. Histogramme représentant le pourcentage de microglies et d'astrocytes, comptage réalisé sur six champs d'une lamelle du double marquage, n = 7.

3.8.2. Viabilité cellulaire

La cytotoxicité du lactate sur la microglie primaire a été évaluée à l'aide du réactif de prolifération cellulaire WST-1. Les cellules microgliales ont été exposées à différentes concentrations de lactate (5 à 20 mmol/L) pendant 24 h. Une exposition à des concentrations élevées de lactate (10 à 20 mmol/L) sur cette période a entraîné une diminution significative de la viabilité cellulaire, avec une réduction de 75 % observée à 20 mmol/L [Figure 49]. En revanche, aucune diminution significative de la viabilité n'a été constatée à 5 mmol/L. Par conséquent, nous avons sélectionné la dose de 5 mmol/L pour la réalisation des expériences suivantes. Cependant, ces résultats de viabilité ne sont basés que sur une seule expérience (4 puits/condition), soulignant la nécessité de réaliser des expériences supplémentaires afin de confirmer ces données. De plus, il serait pertinent d'examiner la viabilité cellulaire dans les conditions où le lactate (à différentes concentrations) est également en présence de LPS.

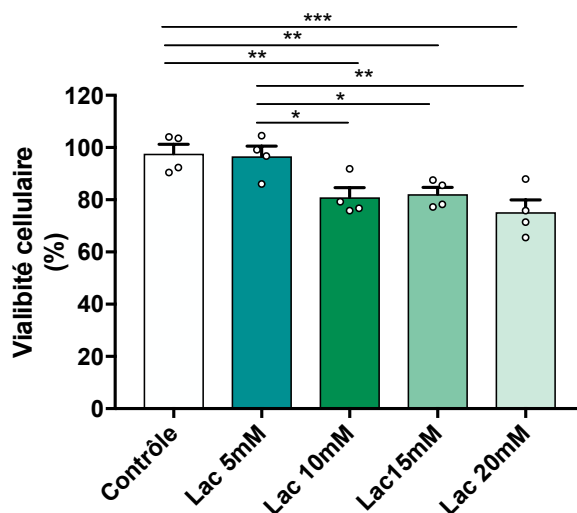


Figure 49 : Viabilité des microglies en présence de lactate. Les cellules microgliales ont été traitées avec différentes concentrations de lactate (5 mM, 10 mM, 15 mM et 20 mM). La viabilité cellulaire a été testée par le test du réactif de prolifération cellulaire WST-1. Les différences statistiques ont été définies comme $p < 0,05$ (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$).

3.8.3. Analyse de la sécrétion de TNF- α par les microglies en culture primaire

La sécrétion de TNF- α , une cytokine pro-inflammatoire, par les microglies activées a été mesurée en présence ou non de lactate. Dans les conditions contrôle et lactate seul (microglies non activées par le LPS) les niveaux de TNF- α étaient quasi indétectables. L'ajout de LPS (50 ng/mL) a induit une sécrétion de 677 ± 16 pg/mL de TNF- α [Figure 50]. Lorsque le milieu contenant du LPS a été remplacé par un nouveau milieu frais contenant du lactate, la sécrétion de TNF- α a été significativement réduite ($226,7 \pm 28,3$ pg/mL). Cependant, un résultat similaire a été observé dans la condition LPS-Post-milieu (209 ± 29 pg/mL) [Figure 50], c'est-à-dire lorsque les cellules ont été placées dans du milieu sans LPS (et sans lactate ajouté au milieu) après 24h d'exposition au LPS.

Dans la dernière condition, dans laquelle le lactate et le LPS sont ajoutés simultanément (Co-LPS-lactate) une réduction de la sécrétion de TNF- α par rapport à la condition LPS seul a également été mesurée bien (513 ± 10 pg/mL pour Co-LPS-lactate contre 677 ± 16 pg/mL pour LPS seul) [Figure 50].

Ces résultats suggèrent que la présence de lactate atténue les effets inflammatoires induits par le LPS.

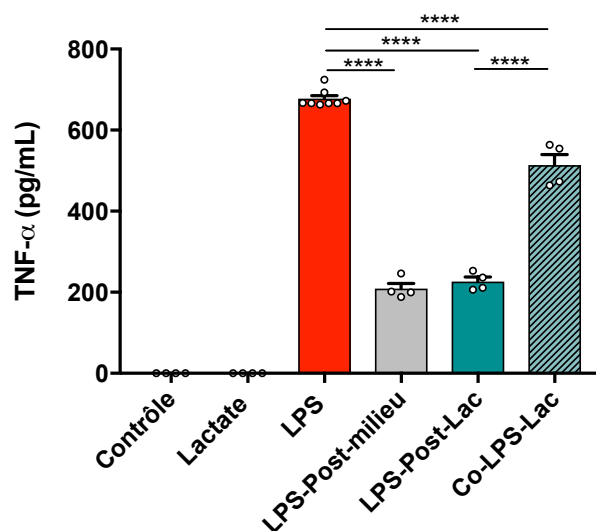


Figure 50 : Dosage de TNF- α par ELISA dans les surnageants de cultures primaires de microglies (200×10^3 cellules) sous différentes conditions : avec ou sans lactate, et avec ou sans LPS. Les différences statistiques ont été définies comme $p < 0,05$ (** $p < 0,0001$).**

Cependant, afin de comprendre pourquoi les baisses de TNF- α sont comparables entre les conditions LPS-Post-milieu et LPS-Post-Lac, nous avons mesuré les concentrations de lactate dans chacune des conditions testées, afin de déterminer s'il n'y aurait pas de production endogène de lactate qui pourrait biaiser nos résultats [Figure 51]. En condition contrôle, la concentration de lactate dans le milieu était d'environ 1 mmol/L. En condition Lactate (5mmol/L), la concentration de lactate au bout de 24h de culture était de 4,6 mmol/L. Cependant, lorsque du lactate a été ajouté au milieu de microglies préalablement activées par le LPS (LPS-Post-Lac), la concentration de lactate dans le milieu n'était que de 1,7 mmol/L [Figure 51]. De même, après traitement au LPS puis changement de milieu (ne contenant pas de lactate), une concentration quasiment similaire de lactate a été mesurée, confirmant ainsi la production endogène de lactate. Ainsi, aucune différence significative n'a été observée entre les conditions LPS-Post-milieu et LPS-Post-lactate, ce qui pourrait expliquer l'absence de différence sur les dosages de TNF- α entre ces deux conditions. Le même résultat a été constaté dans la condition Co-LPS-lactate, avec une concentration de lactate de 1,7 mmol/L [Figure 51]. Ces résultats suggèrent 1) que les 5 mM de lactate ajoutés au milieu ont été utilisés par les microglies pour atténuer leur état inflammatoire et 2) que les dosages du TNF- α reflètent plus la présence ou non de

LPS plutôt que l'impact de l'ajout de lactate dans le milieu. Pour valider cette hypothèse il manque toutefois la mesure du dosage de lactate en condition LPS seul.

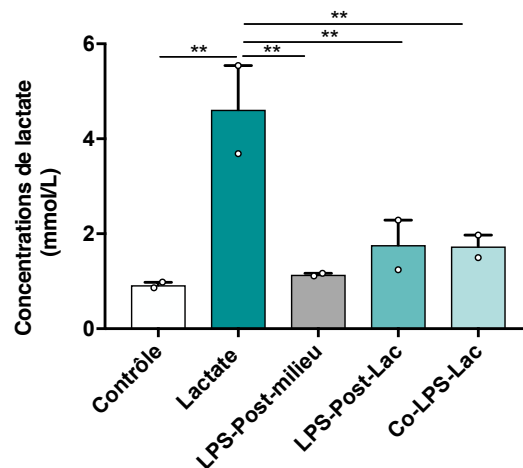


Figure 51 : Dosages de lactate. La mesure a été réalisée dans les surnageants de cultures primaires de microglies (200×10^3 cellules) ($n = 2$ /condition). Les différences statistiques ont été définies comme $p < 0,05$ (** $p < 0,01$).

Au niveau phénotypique, nous avons évalué l'intensité de fluorescence du marqueur microglial pro-inflammatoire (CD86) dans les différentes conditions expérimentales. En conditions contrôle et lactate seul, les intensités de fluorescence du marquage CD86 étaient respectivement de $14\,141 \pm 1\,822$ et $12\,515 \pm 1\,341$. L'intensité de fluorescence de ce marqueur a été significativement augmentée en présence de LPS ($57\,519 \pm 10\,869$) [Figure 52 et voir figure 8 en annexe]. Cependant, l'ajout de lactate, soit après la stimulation par le LPS (LPS-Post-lactate), soit simultanément avec le LPS (Co-LPS-lactate), a entraîné une diminution significative de l'immunomarquage CD86 par rapport à la condition LPS seul (intensité de fluorescence CD86 : $34\,416 \pm 4\,155$ pour LPS-Post-lactate et $24\,194 \pm 4\,836$ pour Co-LPS-lactate) [Figure 52]. Aucune différence significative n'a été observée entre les conditions LPS-Post-lactate et LPS-Post-milieu, ni entre Co-LPS-lactate et LPS-Post-milieu.

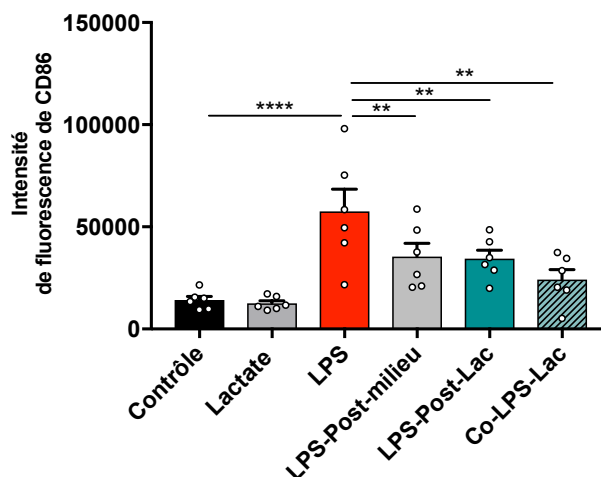


Figure 52 : Quantification de l'intensité de fluorescence du marqueur pro-inflammatoire CD86 des différentes conditions ($n = 1$, en dupliqua, 3 champs quantifiés par lamelle). ** $p < 0,01$ et **** $p < 0,0001$.

Concernant le marqueur phénotypique microglial anti-inflammatoire (CD206), les intensités de fluorescence en conditions contrôle et lactate seul étaient respectivement de $45\,693 \pm 5\,215$ et $48\,899 \pm 5\,283$. En condition LPS seul, l'intensité de fluorescence de ce marqueur a augmenté par rapport à la condition contrôle ($75\,236 \pm 13\,677$) [Figure 53 et voir figure 9 en annexe]. En revanche, l'ajout de

lactate, soit après la stimulation par le LPS (LPS-Post-lactate), soit simultanément avec le LPS (Co-LPS-lactate), a entraîné une augmentation significative de l'intensité de fluorescence du marqueur anti-inflammatoire par rapport aux conditions LPS seul et LPS-Post-milieu (intensité de fluorescence CD 206 : $141\,289 \pm 14\,804$ pour LPS-Post-lactate, et $103\,198 \pm 5\,228$ pour Co-LPS-lactate, contre $64\,400 \pm 6\,500$ pour LPS-Post-milieu) [Figure 53]. Ces résultats suggèrent que le lactate pourrait induire un changement phénotypique des microglies, en les reprogrammant vers un état anti-inflammatoire. Cela implique qu'en situation inflammatoire, le lactate pourrait reprogrammer le métabolisme microglial vers un phénotype anti-inflammatoire et oxydatif. Cette hypothèse demande cependant à être confirmée par des expériences complémentaires. En effet, nos résultats reposent sur une seule expérience (2 puits par condition), soulignant la nécessité de réaliser des expériences supplémentaires pour confirmer ces données. Il serait également pertinent d'évaluer l'effet du lactate sur le métabolisme de ces cellules en mesurant leur activité métabolique dans les différentes conditions à l'aide de techniques telles que le Seahorse ou la résonance Magnétique Nucléaire (RMN), sachant que les microglies de phénotype pro-inflammatoire sont plutôt glycolytique alors que celles étant plus anti-inflammatoire ont un métabolisme plus oxydatif.

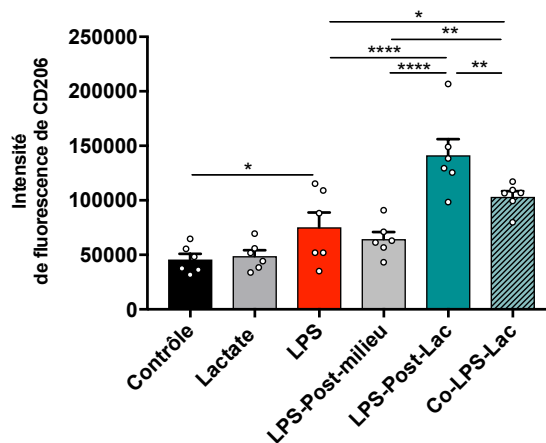


Figure 53 : Quantification de l'intensité de fluorescence du marqueur anti-inflammatoire CD206 des différentes conditions (n = 1, en dupliqua, 3 champs quantifiés par lamelle). ** p < 0,01 et **** p < 0,0001.

4. Discussion

De nombreuses études ont démontré le rôle potentiel du lactate comme thérapie dans différents modèles de lésions cérébrales, principalement grâce à son rôle en tant que substrat énergétique (Berthet et al., 2009, 2012; Jourdain et al., 2016; Roumes, Dumont, et al., 2021). Dans cette étude, nous avons évalué l'efficacité thérapeutique de l'administration de lactate combinée à l'HT après une HIN chez les rats P7. À notre connaissance, c'est la première étude à explorer cette combinaison.

L'HT est actuellement reconnue comme la seule thérapie efficace après un accident d'HIN. Ce procédé, induisant un état d'hibernation, permet de réduire le métabolisme, la libération excessive et toxique de glutamate, la formation d'espèces réactives de l'oxygène, ainsi que l'activation des cascades inflammatoires et apoptotiques (Drury et al., 2014). Bien que l'HT soit devenue un standard de soin dans de nombreuses unités cliniques pour traiter l'HIN (Jacobs et al., 2013), ce traitement n'assure pas une neuroprotection complète (Simbruner et al., 2010), soulignant la nécessité de poursuivre les recherches pour identifier des thérapies complémentaires susceptibles d'améliorer les résultats neurologiques (Chakkarapani et al., 2010; Hobbs et al., 2008; Jatana et al., 2006; Park et al., 2015; Robertson et al., 2013). Dans cette étude, l'HT a été appliquée une heure après l'induction de l'HIN, avec une température rectale cible de 32 °C maintenue pendant 2 h. **L'objectif était de comparer les volumes de lésions cérébrales et les capacités motrices et cognitives des rats ayant subi un accident d'HIN et soumis soit à ce protocole d'HT seul, soit à une combinaison d'HT et d'injections de lactate.**

Nos résultats ont montré qu'à court terme, l'administration de lactate combinée à l'HT réduisait les volumes lésionnels plus rapidement et de façon significative par rapport à l'HT seule. Un meilleur taux de récupération a été observé dans le groupe combiné HI3L+H2 comparé au groupe HIH2. À long terme, nous n'avons pas pu mettre en évidence de différence statistiquement significative concernant la régression des volumes de lésions cérébrales entre les groupes traités. Nous pouvons toutefois noter le taux de récupération le plus élevé dans le groupe HI3L+H2, avec un taux atteignant 99 % à P30. Sur la base uniquement des données IRM, nos résultats indiquent que l'administration de lactate pourrait être couplée à l'HT. Ils suggèrent également une potentielle synergie thérapeutique entre le lactate et l'hypothermie, au moins à court terme. Une augmentation de notre effectif serait nécessaire pour savoir si la combinaison lactate + HT offrirait une neuroprotection supérieure à celle de l'HT seule sur le long terme.

Sur le plan comportemental, les tests de réflexes précoces ainsi que les évaluations des capacités cognitives, comme la mémoire à long terme, ont montré que le groupe HI3L+H2 présentait des performances supérieures à celles du groupe traité uniquement par HT, et comparables à celles du groupe Sham. Cela confirme que la combinaison lactate et HT pourrait améliorer à la fois les fonctions motrices et cognitives.

Par ailleurs, nos résultats obtenus sur le groupe HI3L (lactate seul) viennent confirmer des travaux antérieurs qui ont démontrés que les injections de lactate après une HIN exercent des effets neuroprotecteurs, à la fois en réduisant les volumes lésionnels et en préservant les fonctions cognitivo-motrices (Roumes, Dumont, et al., 2021; Tassinari et al., 2020; Tassinari, Zang, et al., 2024). Il convient toutefois de noter qu'en comparaison avec notre première étude publiée en 2021, plusieurs tests comportementaux ont été ajoutés, en particulier pour évaluer l'anxiété et la dépression à long terme. Nos données confirment non seulement les premiers résultats publiés, mais montrent également que le lactate contribue à réduire l'anxiété et la dépression observées dans le groupe HIC. Cependant, aucune différence statistiquement significative n'a été relevée sur ces paramètres entre les différents groupes traités, car l'hypothermie seule, tout comme la combinaison HT + lactate, a également permis de diminuer les signes mesurés d'anxiété et de dépression.

L'activation microgliale est une réponse centrale dans la pathologie de l'HIN et joue un rôle crucial dans la neuroinflammation, la progression des lésions cérébrales et la modulation des processus de récupération. Selon leur activité phagocytaire, certaines microglies contribuent aux réponses pro-inflammatoires aiguës, aggravant ainsi les lésions cérébrales, tandis que d'autres participent aux réponses anti-inflammatoires tardives, offrant une certaine protection (Brégère et al., 2022). Il est généralement admis que, dans les phases initiales d'une lésion hypoxique-ischémique, les microglies deviennent réactives en adoptant une morphologie amiboïde à partir de leur forme ramifiée, migrent vers le site lésé, se multiplient et acquièrent un phénotype pro-inflammatoire (appelé M1), avant d'évoluer vers un phénotype anti-inflammatoire (appelé M2), bien qu'il existe en réalité un large éventail de phénotypes microgliaux (Brégère et al., 2022; Hagberg et al., 2015). Une étude a rapporté que la microglie de type M1 prédomine dans l'hémisphère ipsilatéral 3 h après une HIN, tandis qu'à 24 h post-HIN, les phénotypes M1 et M2 sont détectables, suggérant une évolution de l'état inflammatoire du cerveau (Bonestroo et al., 2013). Il a également été suggéré que la phagocytose des débris par les microglies est essentielle pour la réparation tissulaire durant la phase tardive suivant un AVC néonatal chez le rat (Faustino et al., 2011). Une autre étude a montré que l'inhibition du récepteur microglial CD36, impliqué dans la réparation tissulaire, aggrave les lésions cérébrales après un AVC néonatal chez les souris (Woo et al., 2012). L'ensemble de ces données confirme que les cellules microgliales peuvent adopter des phénotypes fonctionnels distincts au cours de la récupération après une HIN. Dans notre étude, nous avons montré que l'administration de lactate combinée à l'HT a induit une réduction significative de l'activation microgliale dans le cortex et l'hippocampe 48 h après HIN, comparativement à l'hypothermie seule. L'administration de lactate combinée à l'HT pourrait donc moduler la microglie en favorisant l'acquisition d'un phénotype anti-inflammatoire. Une réduction des lésions cérébrales après un accident d'HIN a été observée (même modèle animal que le nôtre) après

injection de molécules inhibant l'activation microgliale, telles que la chloroquine) (Dommergues et al., 2003). De plus, le lactate pourrait intervenir en modulant l'activité de phagocytose de la microglie, essentielle pour éliminer les débris cellulaires après un accident d'HIN. Des études récentes ont en effet montré que la répression du transporteur MCT4 dans les microglies affecte leur capacité phagocytaire, entraînant ainsi des altérations sur la fonction synaptique et le comportement des souris (Monsorno et al., 2023).

Étant donné que nos résultats indiquent un effet neuroprotecteur associé aux injections de lactate, il était essentiel de suivre l'évolution des niveaux de lactate dans le sang après ces administrations. Nos observations montrent qu'une injection intrapéritonéale de L-lactate de sodium à une concentration de 1 M (4 µL/g) chez les rats Sham entraîne une augmentation des concentrations sanguines de lactate d'environ cinq fois, atteignant un pic de 5,2 mmol/L dans les 5 min suivant l'injection, avant de redescendre aux valeurs de base (1,8 mmol/L en moyenne) entre 45 et 120 min après l'injection. En comparaison, les rats Sham traités avec une solution de NaCl maintenaient des concentrations sanguines de lactate stables, autour de 1,6 mmol/L, durant toute la période d'observation, valeurs cohérentes avec celles trouvées dans la littérature. En effet, des recherches menées par Alsami et al. ont révélé que chez les rats nouveau-nés, les taux de lactate sanguin étaient de $2,6 \pm 0,2$ mM à la naissance (P0) et de $1,4 \pm 0,1$ mM à P7 (Alsami et al., 1997).

Dans notre étude, un pic de lactate (lactatémie > 20 mmol/L, seuil de détection de l'appareil) a été mesuré immédiatement après la sortie du caisson hypoxique pour les groupes ayant subi une HIN (groupes HI+Lactate et HIC). Une diminution de la lactatémie a été mesurée à partir de 20 minutes dans ces deux groupes. Malgré l'administration de lactate, la concentration est revenue plus rapidement à des valeurs normales dans le groupe HI+Lactate, atteignant 2,5 mmol/L à 300 min post-injection, tandis que dans le groupe HIC, elle était de 4,05 mM à ce moment-là. Vingt-quatre heures après l'HIN, la concentration moyenne de lactate mesurée dans les deux groupes était d'environ 2 mmol/L. Ces résultats suggèrent une métabolisation rapide et plus importante du lactate dans le groupe HI+lactate.

Enfin, soulignons que dans notre étude *in vivo*, nous avons également examiné la fenêtre d'administration du lactate. Nous avons pu montrer que l'injection de lactate avant la phase d'hypothermie maximisait les effets neuroprotecteurs, en améliorant les performances motrices et cognitives, et en réduisant davantage les volumes lésionnels comparativement à une administration après la phase d'hypothermie. Cela suggère que l'administration précoce de lactate, avant la mise en place de l'hypothermie, pourrait constituer une fenêtre optimale pour la neuroprotection dans le cadre de l'HIN. D'autres études testant l'allopurinol (Rodríguez-Fanjul, Fernández-Feijóo, et al., 2017) et la mélatonine (Robertson et al., 2013, 2019) ont également montré que leur administration rapide, immédiatement après l'HIN et avant l'hypothermie, exerçait des effets neuroprotecteurs.

En ce qui concerne les analyses protéiques, les résultats décevants peuvent être expliqués par le nombre limité d'échantillons. Aucun effet de l'HIN n'a pu être montré. Des modifications dans l'expression des protéines n'ont été observées que dans la condition HI3L, où une augmentation de l'expression de BDNF et de SOD2 a pu être mise en évidence.

Le facteur neurotrophique BDNF régule de nombreuses fonctions neurologiques et soutient la plasticité synaptique, essentielle aux processus de mémoire et d'apprentissage (Lu et al., 2014). Il joue également un rôle crucial dans la récupération neuronale après une lésion cérébrale, notamment dans le contexte de l'HIN (Xiong et al., 2021). Il a également été démontré que l'expression de BDNF favorise l'angiogenèse (A. Chen et al., 2013), exerce une fonction anti-inflammatoire (A. Chen et al., 2013) et possède des effets anti-apoptotiques en inhibant l'activation de la caspase-3 après une HIN (Hee Han et al., 2000). En outre, il a également été observé que le BDNF favorise l'activation des enzymes antioxydantes telles que la glutathion peroxydase, la glutathion réductase et les SOD, dans les neurones corticaux en culture (Mattson et al., 1995), et joue un rôle dans la régulation de l'homéostasie énergétique (S.-D. Chen et al., 2017; Marosi & Mattson, 2014). Cependant, les

mécanismes de protection du BDNF en lien avec ses activités antioxydantes restent encore à élucider. Une étude antérieure a montré que l'hypothermie induite après un accident d'AVC pourrait stimuler l'expression de BDNF, entraînant ainsi une réduction de la taille des lésions (Berger et al., 2004). Cependant, dans le contexte de l'HIN chez la souris, il a été observé que l'hypothermie n'a pas d'effet significatif sur la modulation de l'expression de BDNF (Diaz et al., 2017), comme trouvé ici. Nos résultats suggèrent que seul le lactate pourrait exercer un effet neuroprotecteur par l'induction de BDNF, puisque cet effet n'est pas observé lorsque le lactate est combiné à l'HT. Des études complémentaires seront nécessaires pour confirmer ces observations, en augmentant le nombre d'animaux mais également pertinent en examinant la modulation de BDNF par le lactate à des temps plus long.

Les superoxydes dismutases (SOD) sont des enzymes antioxydantes spécifiques qui transforment l'anion superoxyde (O_2^-) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Il existe trois isoformes principales de SOD : la SOD à cuivre et zinc (CuZnSOD ou SOD1), la SOD à manganèse (MnSOD ou SOD2), et la SOD extracellulaire (ECSOD ou SOD3). La MnSOD SOD2 est une enzyme antioxydante mitochondriale avec un poids moléculaire de 88 kDa (Fujimura et al., 2005). Il a été rapporté qu'une inactivation complète de l'expression du gène SOD2 n'affecte pas le développement embryonnaire (Holley et al., 2011), mais entraîne une mort précoce chez la souris (Li et al., 1995). Une autre étude a montré qu'une réduction partielle de l'activité de SOD2 aggrave les lésions cérébrales post-AVC chez des souris mutantes hétérozygotes pour le gène SOD2 ($SOD2^{+/-}$) (Murakami et al., 1998). En revanche, la surexpression de SOD2 chez la souris a démontré une protection neuronale contre le stress oxydatif après un AVC (Keller et al., 1998). Par ailleurs, une autre étude a révélé que le prétraitement à l'acide chlorogénique pourrait exercer un effet antioxydant en augmentant l'expression de SOD2 via la modulation de la voie Nrf2 après un épisode d'HIN chez le rat (Zheng et al., 2022). Nos résultats indiquent que les injections de lactate augmentent l'expression de SOD2, et pourrait donc exercer un effet neuroprotecteur par une lutte plus efficace contre les ROS.

Concernant les protéines impliquées dans l'ANLS (Pellerin & Magistretti, 1994), nos résultats montrent que l'administration de lactate a entraîné une augmentation significative de l'expression de GLAST dans les deux hémisphères, suggérant que le lactate pourrait avoir un effet neuroprotecteur en augmentant la recapture du glutamate par l'astrocyte et donc en réduisant l'excitotoxicité. Cependant les administrations de lactate n'ont pas affecté l'expression ni de MCT2, ni de MCT4. Ces résultats sont étonnants, surtout en ce qui concerne MCT4, car des études antérieures ont démontré que l'expression de ce transporteur est augmentée en conditions d'hypoxie. Cela est dû à l'activation d'un élément de réponse à l'hypoxie sur lequel HIF1- α se lie à son promoteur, entraînant une augmentation de l'expression 48 h après l'exposition à l'hypoxie (Ullah et al., 2006).

Nous avons également étudié l'impact du lactate sur la voie des pentoses phosphates en mesurant l'expression de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH). Cette enzyme est la première de la voie des pentoses phosphates et catalyse l'oxydation du glucose-6-phosphate en 6-phosphoglucono- δ -lactone, générant du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit (NADPH), un cofacteur essentiel pour neutraliser les ROS et maintenir l'équilibre redox cellulaire. Nos résultats n'ont pas révélé d'induction de l'expression de G6PDH par l'administration de lactate. Cependant, Roumes et al. suggère que le lactate, administré après un accident d'HIN, pourrait être utilisé comme substrat oxydatif neuronal et ainsi « préserver » le glucose qui, au lieu de suivre la voie de la glycolyse neuronale, pourrait préférentiellement être métabolisé dans la voie des pentoses phosphates, favorisant ainsi la production de glutathion réduit pour combattre les ROS (Roumes, Dumont, et al., 2021). Là encore, nos résultats non concluant sur la G6PDH sont basés sur l'analyse par Western Blot de trois rats par condition, ce qui souligne la nécessité de réaliser des expériences complémentaires. Si les effets neuroprotecteurs du lactate ont surtout été discuté à travers son rôle de substrat énergétique, nous ne perdons pas de vue qu'ils pourraient également passer par son récepteur, le GPR81. Ces dernières années, les rôles du récepteur GPR81 dans le SNC ont suscité un intérêt croissant (Colucci et al., 2023). Même si sa localisation n'est pas encore complètement caractérisée, des études

ont montré que ce récepteur serait exprimé principalement dans les neurones (Deng et al., 2023). Son activation par le lactate permet de moduler l'activité synaptique (Bozzo et al., 2013), d'induire la neurogenèse (Lambertus et al., 2021), de protéger les astrocytes contre l'excitotoxicité (Ma et al., 2020) et de contribuer à la consolidation de la mémoire (Scavuzzo et al., 2020). Chaudhari et al. ont montré, en utilisant des souris knock-out pour GPR81, que ce récepteur joue un rôle crucial dans l'angiogenèse induite par le lactate après une HIN (Chaudhari et al., 2022). Par ailleurs, une autre étude a montré que, suite à l'HIN, ces souris knock-out présentaient également une diminution de l'expression des gènes liés à la prolifération et à la différenciation cellulaires, confirmant ainsi le rôle de GPR81 dans la réparation tissulaire via la stimulation des gènes de transcription concernés (Kennedy et al., 2022). Dans notre précédente étude (Roumes et al. 2021), une perte totale de la neuroprotection du lactate a été montrée après co-injection de lactate avec de l'oxamate, un inhibiteur de la LDH, démontrant ainsi que le métabolisme du lactate était essentiel dans la neuroprotection observée. Cependant, cette étude ne suivait pas les animaux sur le long terme comme dans notre étude, et il serait pertinent d'explorer en détail les mécanismes sous-jacents de la neuroprotection du lactate via GPR81, qui pourrait contribuer à la protection neuronale après ischémie sur le long terme.

Un autre aspect que nous n'avons pas exploré serait une neuroprotection conférée par le lactate médiée par la lactylation épigénétique des résidus de lysine sur les histones, un mécanisme qui permet de stimuler la transcription des gènes à partir de la chromatine. Découverte en 2019 (D. Zhang et al., 2019), la lactylation a été étudiée dans des macrophages dérivés de moelle osseuse de souris en culture cellulaire, activés avec du LPS pour induire un phénotype M1 pro-inflammatoire. Les résultats de cette étude montrent que la lactylation des histones n'est pas essentielle pour réguler les gènes pro-inflammatoires, mais qu'elle favorise l'expression des gènes homéostatiques associés aux macrophages de type M2, facilitant ainsi la réparation cellulaire à la fin de la phase inflammatoire. Les auteurs ont proposé l'existence d'une « horloge lactique » endogène dans les macrophages M1, capable d'activer les gènes homéostatiques et d'exercer un effet anti-inflammatoire (D. Zhang et al., 2019). D'autres chercheurs suggèrent que la lactylation des histones représente un nouveau mécanisme de rétroaction limitant l'activation des macrophages (D. Zhang et al., 2019) et permettant une régulation épigénétique du métabolisme et de l'immunité (Lee, 2021). Ce mécanisme pourrait ainsi offrir une compréhension approfondie des rôles du lactate dans divers contextes pathologiques (Lee, 2021). Cependant, aucune étude n'a exploré la lactylation dans le cadre de l'HIN. Il serait donc pertinent d'examiner ce processus dans le contexte de l'HIN pour identifier comment l'administration de lactate pourrait induire l'expression de gènes homéostatiques contribuant à la neuroprotection.

Concernant nos travaux *in vitro* utilisant des cultures primaires de microglies, nos résultats ont montré que le traitement par lactate a réduit la sécrétion de la cytokine pro-inflammatoire TNF- α , diminué l'intensité de fluorescence du marqueur pro-inflammatoire CD86, et favorisé l'expression du marqueur CD206 après stimulation par LPS. Ces données suggèrent que l'ajout de lactate dans le milieu cellulaire pourrait atténuer l'état inflammatoire des microglies, en les orientant vers un phénotype plutôt anti-inflammatoire. Cependant ces résultats sont à prendre avec précaution car ils sont issus d'une seule expérience, il est donc indispensable de réaliser des études supplémentaires afin de confirmer ces observations et de mieux comprendre le rôle du lactate sur les microglies, ainsi que les mécanismes sous-jacents à ses effets anti-inflammatoires. Ces résultats préliminaires vont toutefois dans le même sens que nos marquages obtenus en immunohistologie, qui indiquent une diminution du marqueur de microglie activée, IBA1, ainsi que d'autres résultats obtenus *in vitro* et trouvés dans la littérature. En effet, d'autres études ont montré, dans des lignées murines de cellules BV2 en co-culture avec des neurones primaires, que le traitement au lactate après une privation d'oxygène et de glucose exerçait un effet anti-inflammatoire en inhibant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, réduisait l'apoptose et augmentait la survie neuronale (Y. Zhang et al., 2023). Plus récemment, une autre étude a révélé que les microglies BV2 pourraient préférentiellement utiliser le lactate comme substrat énergétique pour assurer leur survie dans des conditions de privation d'oxygène et de glucose (Tassinari, Rodrigues, et al., 2024).

Ce qu'il faut retenir :

- Cette étude se distingue par l'évaluation du potentiel thérapeutique de la combinaison lactate et HT dans le cadre de l'HIN en combinant un suivi par IRM, des tests comportementaux et des analyses immunohistochimiques.
- La combinaison thérapeutique du lactate à l'HT de 2 h offre une meilleure neuroprotection que l'HT seule en réduisant les volumes lésionnels et en améliorant certaines fonctions motrices et cognitives, et en réduisant l'activation microgliales.
- L'administration précoce de lactate, avant l'induction de l'hypothermie, pourrait constituer une fenêtre optimale pour la neuroprotection dans le cadre de l'HIN.

Cette étude pré-clinique montre que le lactate est neuroprotecteur après un accident d'HIN. La question qui se pose alors : un transfert vers la clinique est-il possible ? Cette question sera abordée dans le Chapitre 5.

5. Références

- Alasmi, M. M., Pickens, W. L., & Hoath, S. B. (1997). Effect of Tactile Stimulation on Serum Lactate in the Newborn Rat. *Pediatric Research*, 41(6), 857-861. <https://doi.org/10.1203/00006450-199706000-00010>
- Allaman, I., Bélanger, M., & Magistretti, P. J. (2011). Astrocyte-neuron metabolic relationships : For better and for worse. *Trends in Neurosciences*, 34(2), 76-87. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2010.12.001>
- Berger, C., Schabitz, W.-R., Wolf, M., Mueller, H., Sommer, C., & Schwab, S. (2004). Hypothermia and brain-derived neurotrophic factor reduce glutamate synergistically in acute stroke. *Experimental Neurology*, 185(2), 305-312. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2003.10.008>
- Berthet, C., Castillo, X., Magistretti, P. J., & Hirt, L. (2012). New evidence of neuroprotection by lactate after transient focal cerebral ischaemia : Extended benefit after intracerebroventricular injection and efficacy of intravenous administration. *Cerebrovascular Diseases (Basel, Switzerland)*, 34(5-6), 329-335. <https://doi.org/10.1159/000343657>
- Berthet, C., Lei, H., Thevenet, J., Gruetter, R., Magistretti, P. J., & Hirt, L. (2009). Neuroprotective role of lactate after cerebral ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 29(11), 1780-1789. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2009.97>
- Bonestroo, H. J. C., Nijboer, C. H. A., van Velthoven, C. T. J., Kavelaars, A., Hack, C. E., van Bel, F., & Heijnen, C. J. (2013). Cerebral and hepatic inflammatory response after neonatal hypoxia-ischemia in newborn rats. *Developmental Neuroscience*, 35(2-3), 197-211. <https://doi.org/10.1159/000346685>
- Bouzier-Sore, A.-K., Voisin, P., Bouchaud, V., Bezancon, E., Franconi, J.-M., & Pellerin, L. (2006). Competition between glucose and lactate as oxidative energy substrates in both neurons and astrocytes : A comparative NMR study. *The European Journal of Neuroscience*, 24(6), 1687-1694. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.05056.x>
- Bouzier-Sore, A.-K., Voisin, P., Canioni, P., Magistretti, P. J., & Pellerin, L. (2003). Lactate is a preferential oxidative energy substrate over glucose for neurons in culture. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 23(11), 1298-1306. <https://doi.org/10.1097/01.WCB.0000091761.61714.25>
- Bozzo, L., Puyal, J., & Chatton, J.-Y. (2013). Lactate Modulates the Activity of Primary Cortical Neurons through a Receptor-Mediated Pathway. *PLOS ONE*, 8(8), e71721. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071721>
- Brégère, C., Schwendele, B., Radanovic, B., & Guzman, R. (2022). Microglia and Stem-Cell Mediated Neuroprotection after Neonatal Hypoxia-Ischemia. *Stem Cell Reviews and Reports*, 18(2), 474-522. <https://doi.org/10.1007/s12015-021-10213-y>
- Buscemi, L., Blochet, C., Price, M., Magistretti, P. J., Lei, H., & Hirt, L. (2020). Extended Preclinical Investigation of Lactate for Neuroprotection after Ischemic Stroke. *Clinical and Translational Neuroscience*, 4(1), Article 1. <https://doi.org/10.1177/2514183x20904571>
- Castillo, X., Rosafio, K., Wyss, M. T., Drandarov, K., Buck, A., Pellerin, L., Weber, B., & Hirt, L. (2015). A probable dual mode of action for both L- and D-lactate neuroprotection in cerebral ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 35(10), 1561-1569. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2015.115>
- Chakkarapani, E., Dingley, J., Liu, X., Hoque, N., Aquilina, K., Porter, H., & Thoresen, M. (2010). Xenon enhances hypothermic neuroprotection in asphyxiated newborn pigs. *Annals of Neurology*, 68(3), 330-341. <https://doi.org/10.1002/ana.22016>
- Chaudhari, P., Madaan, A., Rivera, J. C., Charfi, I., Habelrih, T., Hou, X., Nezhady, M., Lodygensky, G., Pineyro, G., Muanza, T., & Chemtob, S. (2022). Neuronal GPR81 regulates developmental brain angiogenesis and promotes brain recovery after a hypoxic ischemic insult. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 42(7), 1294-1308. <https://doi.org/10.1177/0271678x221077499>
- Chen, A., Xiong, L.-J., Tong, Y., & Mao, M. (2013). The neuroprotective roles of BDNF in hypoxic ischemic brain injury (Review). *Biomedical Reports*, 1(2), 167-176. <https://doi.org/10.3892/br.2012.48>
- Chen, S.-D., Wu, C.-L., Hwang, W.-C., & Yang, D.-I. (2017). More Insight into BDNF against Neurodegeneration : Anti-Apoptosis, Anti-Oxidation, and Suppression of Autophagy. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(3), 545. <https://doi.org/10.3390/ijms18030545>
- Colucci, A. C. M., Tassinari, I. D., Loss, E. da S., & de Fraga, L. S. (2023). History and Function of the Lactate Receptor GPR81/HCAR1 in the Brain : A Putative Therapeutic Target for the Treatment of Cerebral Ischemia. *Neuroscience*, 526, 144-163. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2023.06.022>

- Deng, Q., Wu, C., Liu, T. C.-Y., Duan, R., & Yang, L. (2023). Exogenous lactate administration : A potential novel therapeutic approach for neonatal hypoxia-ischemia. *Experimental Neurology*, 367, 114450. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2023.114450>
- Diaz, J., Abiola, S., Kim, N., Avaritt, O., Flock, D., Yu, J., Northington, F. J., & Chavez-Valdez, R. (2017). Therapeutic Hypothermia Provides Variable Protection against Behavioral Deficits after Neonatal Hypoxia-Ischemia : A Potential Role for Brain-Derived Neurotrophic Factor. *Developmental Neuroscience*, 39(1-4), 257-272. <https://doi.org/10.1159/000454949>
- Dommergues, M.-A., Plaisant, F., Verney, C., & Gressens, P. (2003). Early microglial activation following neonatal excitotoxic brain damage in mice : A potential target for neuroprotection. *Neuroscience*, 121(3), 619-628. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(03\)00558-x](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(03)00558-x)
- Drury, P. P., Gunn, E. R., Bennet, L., & Gunn, A. J. (2014). Mechanisms of hypothermic neuroprotection. *Clinics in Perinatology*, 41(1), 161-175. <https://doi.org/10.1016/j.clp.2013.10.005>
- Fan, X., van Bel, F., van der Kooij, M. A., Heijnen, C. J., & Groenendaal, F. (2013). Hypothermia and erythropoietin for neuroprotection after neonatal brain damage. *Pediatric Research*, 73(1), 18-23. <https://doi.org/10.1038/pr.2012.139>
- Faulkner, S., Bainbridge, A., Kato, T., Chandrasekaran, M., Kapetanakis, A. B., Hristova, M., Liu, M., Evans, S., De Vita, E., Kelen, D., Sanders, R. D., Edwards, A. D., Maze, M., Cady, E. B., Raivich, G., & Robertson, N. J. (2011). Xenon augmented hypothermia reduces early lactate/N-acetylaspartate and cell death in perinatal asphyxia. *Annals of Neurology*, 70(1), 133-150. <https://doi.org/10.1002/ana.22387>
- Faustino, J. V., Wang, X., Johnson, C. E., Klibanov, A., Derugin, N., Wendland, M. F., & Vexler, Z. S. (2011). Microglial Cells Contribute to Endogenous Brain Defenses after Acute Neonatal Focal Stroke. *The Journal of Neuroscience*, 31(36), 12992. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2102-11.2011>
- Fujimura, M., Tominaga, T., & Chan, P. H. (2005). Neuroprotective effect of an antioxidant in ischemic brain injury. *Neurocritical Care*, 2(1), 59-66. <https://doi.org/10.1385/NCC:2:1:059>
- Hagberg, H., Mallard, C., Ferriero, D. M., Vannucci, S. J., Levison, S. W., Vexler, Z. S., & Gressens, P. (2015). The role of inflammation in perinatal brain injury. *Nature Reviews. Neurology*, 11(4), 192. <https://doi.org/10.1038/nrneuro.2015.13>
- Hee Han, B., D'Costa, A., Back, S. A., Parsadanian, M., Patel, S., Shah, A. R., Gidday, J. M., Srinivasan, A., Deshmukh, M., & Holtzman, D. M. (2000). BDNF Blocks Caspase-3 Activation in Neonatal Hypoxia-Ischemia. *Neurobiology of Disease*, 7(1), 38-53. <https://doi.org/10.1006/nbdi.1999.0275>
- Hobbs, C., Thoresen, M., Tucker, A., Aquilina, K., Chakkarapani, E., & Dingley, J. (2008). Xenon and hypothermia combine additively, offering long-term functional and histopathologic neuroprotection after neonatal hypoxia/ischemia. *Stroke*, 39(4), 1307-1313. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.107.499822>
- Holley, A. K., Bakthavatchalu, V., Velez-Roman, J. M., & St. Clair, D. K. (2011). Manganese Superoxide Dismutase : Guardian of the Powerhouse. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(10), Article 10. <https://doi.org/10.3390/ijms12107114>
- Holloway, R., Zhou, Z., Harvey, H. B., Levasseur, J. E., Rice, A. C., Sun, D., Hamm, R. J., & Bullock, M. R. (2007). Effect of lactate therapy upon cognitive deficits after traumatic brain injury in the rat. *Acta Neurochirurgica*, 149(9), 919-927; discussion 927. <https://doi.org/10.1007/s00701-007-1241-y>
- Jacobs, S. E., Berg, M., Hunt, R., Tarnow-Mordi, W. O., Inder, T. E., & Davis, P. G. (2013). Cooling for newborns with hypoxic ischaemic encephalopathy. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2013(1), CD003311. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD003311.pub3>
- Jatana, M., Singh, I., Singh, A. K., & Jenkins, D. (2006). Combination of Systemic Hypothermia and N-acetylcysteine Attenuates Hypoxic-Ischemic Brain Injury in Neonatal Rats. *Pediatric Research*, 59(5), 684-689. <https://doi.org/10.1203/01.pdr.0000215045.91122.44>
- Jourdain, P., Allaman, I., Rothenfusser, K., Fiumelli, H., Marquet, P., & Magistretti, P. J. (2016). L-Lactate protects neurons against excitotoxicity : Implication of an ATP-mediated signaling cascade. *Scientific Reports*, 6(1), 21250. <https://doi.org/10.1038/srep21250>
- Keller, J. N., Kindy, M. S., Holtsberg, F. W., Clair, D. K. S., Yen, H.-C., Germeyer, A., Steiner, S. M., Bruce-Keller, A. J., Hutchins, J. B., & Mattson, M. P. (1998). Mitochondrial Manganese Superoxide Dismutase Prevents Neural Apoptosis and Reduces Ischemic Brain Injury : Suppression of Peroxynitrite Production, Lipid Peroxidation, and Mitochondrial Dysfunction. *The Journal of Neuroscience*, 18(2), 687. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-02-00687.1998>
- Kennedy, L., Glesaaen, E. R., Palibrk, V., Pannone, M., Wang, W., Al-Jabri, A., Suganthan, R., Meyer, N., Austbø, M. L., Lin, X., Bergersen, L. H., Bjørås, M., & Rinholm, J. E. (2022). Lactate receptor HCAR1 regulates neurogenesis and microglia activation after neonatal hypoxia-ischemia. *eLife*, 11, e76451. <https://doi.org/10.7554/eLife.76451>

- Lambertus, M., Øverberg, L. T., Andersson, K. A., Hjelden, M. S., Hadzic, A., Haugen, Ø. P., Storm-Mathisen, J., Bergersen, L. H., Geiseler, S., & Morland, C. (2021). L-lactate induces neurogenesis in the mouse ventricular-subventricular zone via the lactate receptor HCA1. *Acta Physiologica*, 231(3), e13587. <https://doi.org/10.1111/apha.13587>
- Lee, T.-Y. (2021). Lactate : A multifunctional signaling molecule. *Yeungnam University Journal of Medicine*, 38(3), 183. <https://doi.org/10.12701/yujm.2020.00892>
- Li, Y., Huang, T.-T., Carlson, E. J., Melov, S., Ursell, P. C., Olson, J. L., Noble, L. J., Yoshimura, M. P., Berger, C., Chan, P. H., Wallace, D. C., & Epstein, C. J. (1995). Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nature Genetics*, 11(4), 376-381. <https://doi.org/10.1038/ng1295-376>
- Lively, S., & Schlichter, L. C. (2018). Microglia Responses to Pro-inflammatory Stimuli (LPS, IFN γ +TNF α) and Reprogramming by Resolving Cytokines (IL-4, IL-10). *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12, 215. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00215>
- Lu, B., Nagappan, G., & Lu, Y. (2014). BDNF and synaptic plasticity, cognitive function, and dysfunction. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 220, 223-250. https://doi.org/10.1007/978-3-642-45106-5_9
- Ma, K., Ding, X., Song, Q., Han, Z., Yao, H., Ding, J., & Hu, G. (2020). Lactate enhances Arc/arg3.1 expression through hydroxycarboxylic acid receptor 1- β -arrestin2 pathway in astrocytes. *Neuropharmacology*, 171, 108084. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.108084>
- Magistretti, P. J., & Allaman, I. (2018). Lactate in the brain : From metabolic end-product to signalling molecule. *Nature Reviews Neuroscience*, 19(4), 235-249. <https://doi.org/10.1038/nrn.2018.19>
- Marosi, K., & Mattson, M. P. (2014). BDNF mediates adaptive brain and body responses to energetic challenges. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 25(2), 89-98. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2013.10.006>
- Mattson, M. P., Lovell, M. A., Furukawa, K., & Markesbery, W. R. (1995). Neurotrophic Factors Attenuate Glutamate-Induced Accumulation of Peroxides, Elevation of Intracellular Ca²⁺ Concentration, and Neurotoxicity and Increase Antioxidant Enzyme Activities in Hippocampal Neurons. *Journal of Neurochemistry*, 65(4), 1740-1751. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1995.65041740.x>
- Monsorno, K., Ginggen, K., Ivanov, A., Buckinx, A., Lalive, A. L., Tchenio, A., Benson, S., Vendrell, M., D'Alessandro, A., Beule, D., Pellerin, L., Marnett, M., & Paolicelli, R. C. (2023). Loss of microglial MCT4 leads to defective synaptic pruning and anxiety-like behavior in mice. *Nature Communications*, 14(1), 5749. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-41502-4>
- Murakami, K., Kondo, T., Kawase, M., Li, Y., Sato, S., Chen, S. F., & Chan, P. H. (1998). Mitochondrial Susceptibility to Oxidative Stress Exacerbates Cerebral Infarction That Follows Permanent Focal Cerebral Ischemia in Mutant Mice with Manganese Superoxide Dismutase Deficiency. *The Journal of Neuroscience*, 18(1), 205. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-01-00205.1998>
- Netzahualcoyotzi, C., & Pellerin, L. (2020). Neuronal and astroglial monocarboxylate transporters play key but distinct roles in hippocampus-dependent learning and memory formation. *Progress in Neurobiology*, 194, 101888. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2020.101888>
- Park, W. S., Sung, S. I., Ahn, S. Y., Yoo, H. S., Sung, D. K., Im, G. H., Choi, S. J., & Chang, Y. S. (2015). Hypothermia augments neuroprotective activity of mesenchymal stem cells for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *PloS One*, 10(3), e0120893. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120893>
- Pellerin, L., & Magistretti, P. J. (1994). Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis : A mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(22), 10625-10629. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.22.10625>
- Quintard, H., Patet, C., Zerlauth, J.-B., Suys, T., Bouzat, P., Pellerin, L., Meuli, R., Magistretti, P. J., & Oddo, M. (2016). Improvement of Neuroenergetics by Hypertonic Lactate Therapy in Patients with Traumatic Brain Injury Is Dependent on Baseline Cerebral Lactate/Pyruvate Ratio. *Journal of Neurotrauma*, 33(7), 681-687. <https://doi.org/10.1089/neu.2015.4057>
- Robertson, N. J., Faulkner, S., Fleiss, B., Bainbridge, A., Andorka, C., Price, D., Powell, E., Lecky-Thompson, L., Thei, L., Chandrasekaran, M., Hristova, M., Cady, E. B., Gressens, P., Golay, X., & Raivich, G. (2013). Melatonin augments hypothermic neuroprotection in a perinatal asphyxia model. *Brain: A Journal of Neurology*, 136(Pt 1), 90-105. <https://doi.org/10.1093/brain/aws285>
- Robertson, N. J., Martinello, K., Lingam, I., Avdic-Belltheus, A., Meehan, C., Alonso-Alconada, D., Ragab, S., Bainbridge, A., Sokolska, M., Tachrount, M., Middleton, B., Price, D., Hristova, M., Golay, X., Soliani Raschini, A., Aquino, G., Pelizzi, N., & Facchinetti, F. (2019). Melatonin as an adjunct to therapeutic

- hypothermia in a piglet model of neonatal encephalopathy : A translational study. *Neurobiology of Disease*, 121, 240-251. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2018.10.004>
- Rodríguez-Fanjul, J., Durán Fernández-Feijóo, C., Lopez-Abad, M., Lopez Ramos, M. G., Balada Caballé, R., Alcántara-Horillo, S., & Camprubí Camprubí, M. (2017). Neuroprotection with hypothermia and allopurinol in an animal model of hypoxic-ischemic injury : Is it a gender question? *PLoS One*, 12(9), e0184643. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184643>
- Rodríguez-Fanjul, J., Fernández-Feijóo, C. D., Lopez-Abad, M., Ramos, M. G. L., Caballé, R. B., Alcántara-Horillo, S., & Camprubí, M. C. (2017). Neuroprotection with hypothermia and allopurinol in an animal model of hypoxic-ischemic injury : Is it a gender question? *PLoS ONE*, 12(9), e0184643. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184643>
- Roumes, H., Dumont, U., Sanchez, S., Mazuel, L., Blanc, J., Raffard, G., Chateil, J.-F., Pellerin, L., & Bouzier-Sore, A.-K. (2021). Neuroprotective role of lactate in rat neonatal hypoxia-ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 41(2), 342-358. <https://doi.org/10.1177/0271678X20908355>
- Roumes, H., Jollé, C., Blanc, J., Benkhaled, I., Chatain, C. P., Massot, P., Raffard, G., Bouchaud, V., Biran, M., Pythoud, C., Déglon, N., Zimmer, E. R., Pellerin, L., & Bouzier-Sore, A.-K. (2021). Lactate transporters in the rat barrel cortex sustain whisker-dependent BOLD fMRI signal and behavioral performance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(47), e2112466118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2112466118>
- Scavuzzo, C. J., Rakotavao, I., & Dickson, C. T. (2020). Differential effects of L- and D-lactate on memory encoding and consolidation : Potential role of HCAR1 signaling. *Neurobiology of Learning and Memory*, 168, 107151. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2019.107151>
- Schurr, A., Payne, R. S., Miller, J. J., & Rigor, B. M. (1997). Brain lactate, not glucose, fuels the recovery of synaptic function from hypoxia upon reoxygenation : An in vitro study. *Brain Research*, 744(1), 105-111. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(96\)01106-7](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(96)01106-7)
- Simbruner, G., Mittal, R. A., Rohlmann, F., Muche, R., & neo.nEURO.network Trial Participants. (2010). Systemic hypothermia after neonatal encephalopathy : Outcomes of neo.nEURO.network RCT. *Pediatrics*, 126(4), e771-778. <https://doi.org/10.1542/peds.2009-2441>
- Suzuki, A., Stern, S. A., Bozdagi, O., Huntley, G. W., Walker, R. H., Magistretti, P. J., & Alberini, C. M. (2011). Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation. *Cell*, 144(5), 810-823. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.018>
- Tassinari, I. D., Andrade, M. K. G., da Rosa, L. A., Hoff, M. L. M., Nunes, R. R., Vogt, E. L., Fabres, R. B., Sanches, E. F., Netto, C. A., Paz, A. H., & de Fraga, L. S. (2020). Lactate Administration Reduces Brain Injury and Ameliorates Behavioral Outcomes Following Neonatal Hypoxia–Ischemia. *Neuroscience*, 448, 191-205. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.09.006>
- Tassinari, I. D., Rodrigues, F. da S., Bertram, C., Mendes-da-Cruz, D. A., Guedes, R. P., Paz, A. H., Bambini-Junior, V., & de Fraga, L. S. (2024). Lactate Protects Microglia and Neurons from Oxygen-Glucose Deprivation/Reoxygenation. *Neurochemical Research*, 49(7), 1762-1781. <https://doi.org/10.1007/s11064-024-04135-7>
- Tassinari, I. D., Zang, J., Ribeiro, N. H., Martins, B. B., Tauffer, J. V. M., Nunes, R. R., Sanches, E. F., Sizonenko, S., Netto, C. A., Paz, A. H., & de Fraga, L. S. (2024). Lactate administration causes long-term neuroprotective effects following neonatal hypoxia-ischemia. *Experimental Neurology*, 381, 114929. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2024.114929>
- Town, T., Nikolic, V., & Tan, J. (2005). The microglial « activation » continuum : From innate to adaptive responses. *Journal of Neuroinflammation*, 2(1), 24. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-2-24>
- Ullah, M. S., Davies, A. J., & Halestrap, A. P. (2006). The plasma membrane lactate transporter MCT4, but not MCT1, is up-regulated by hypoxia through a HIF-1alpha-dependent mechanism. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(14), 9030-9037. <https://doi.org/10.1074/jbc.M511397200>
- von Zahn, J., Möller, T., Kettenmann, H., & Nolte, C. (1997). Microglial phagocytosis is modulated by pro-and anti-inflammatory cytokines. *NeuroReport*, 8(18), 3851.
- Woo, M.-S., Wang, X., Faustino, J. V., Derugin, N., Wendland, M. F., Zhou, P., Iadecola, C., & Vexler, Z. S. (2012). Genetic deletion of CD36 enhances injury after acute neonatal stroke. *Annals of Neurology*, 72(6), 961-970. <https://doi.org/10.1002/ana.23727>
- Xiong, L.-L., Chen, J., Du, R.-L., Liu, J., Chen, Y.-J., Hawwas, M. A., Zhou, X.-F., Wang, T.-H., Yang, S.-J., & Bai, X. (2021). Brain-derived neurotrophic factor and its related enzymes and receptors play important roles after hypoxic-ischemic brain damage. *Neural Regeneration Research*, 16(8), 1453-1459. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.303033>

- Zhang, D., Tang, Z., Huang, H., Zhou, G., Cui, C., Weng, Y., Liu, W., Kim, S., Lee, S., Perez-Neut, M., Ding, J., Cxyz, D., Hu, R., Ye, Z., He, M., Zheng, Y. G., Shuman, H. A., Dai, L., Ren, B., ... Zhao, Y. (2019). Metabolic regulation of gene expression by histone lactylation. *Nature*, 574(7779), 575-580. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1678-1>
- Zhang, Y., Jia, P., Wang, K., Zhang, Y., Lv, Y., Fan, P., Yang, L., Zhang, S., Wang, T., Zhao, J., Lv, H., Chen, X., Liu, Y., Wei, H., & Zhang, P. (2023). Lactate modulates microglial inflammatory responses after oxygen-glucose deprivation through HIF-1 α -mediated inhibition of NF- κ B. *Brain Research Bulletin*, 195, 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2023.02.002>
- Zheng, Y., Li, L., Chen, B., Fang, Y., Lin, W., Zhang, T., Feng, X., Tao, X., Wu, Y., Fu, X., & Lin, Z. (2022). Chlorogenic acid exerts neuroprotective effect against hypoxia-ischemia brain injury in neonatal rats by activating Sirt1 to regulate the Nrf2-NF- κ B signaling pathway. *Cell Communication and Signaling*, 20(1), 84. <https://doi.org/10.1186/s12964-022-00860-0>

Chapitre 5 : Étude clinique rétrospective

1. Utilisation du L-lactate de sodium en néonatalogie

Pour les cliniciens, l'accumulation de lactate est considérée comme un déchet de la glycolyse anaérobie et un marqueur de souffrance associé à un mauvais pronostic. Cependant, au cours des deux dernières décennies, des preuves accumulées issues d'études *in vitro* (Bouzier-Sore et al., 2003; Bouzier-Sore et al., 2006), *ex vivo* (Bouzier et al., 2000) et *in vivo* (Roumes, Jollé, et al., 2021) ont mis en évidence que le lactate est un substrat énergétique préférentiellement consommé par les neurones. Ce changement de paradigme a transformé la perception du lactate, passant du statut de métabolite « poubelle » à celui de substrat énergétique cérébral soutenant la fonction cérébrale. Par conséquent, l'idée du lactate comme agent neuroprotecteur potentiel a émergé, offrant la possibilité d'être utilisé comme substrat énergétique alternatif dans les conditions caractérisées par des déficits du métabolisme énergétique. Sachant que 1) le lactate est un substrat essentiel pour les neurones et 2) que le métabolisme cérébral du nouveau-né diffère de celui de l'adulte avec notamment une surexpression des transporteurs MCTs, l'administration de lactate après un accident d'HIN a été testé. Les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence, et ce pour la première fois, l'effet neuroprotecteur du lactate sur un modèle d'HIN chez le rat (Roumes et al., 2021). Ces données ont par la suite été confirmées dans une seconde étude (Tassinari et al., 2024).

Depuis août 2022, dans l'équipe du Dr Olivier Tandonnet (Maternité, CHU Bordeaux), la solution de L-lactate de sodium AP-HP 11,2 % (m/V) est ajoutée au soluté de perfusion parentérale chez certains prématurés hospitalisés dans le service, majoritairement pour corriger les hyponatrémies (apport de Na⁺) tout en limitant les acidoses hyperchlorémiques (pas d'apport excessif de Cl⁻). Les acidoses hyperchlorémiques sont en effet fréquentes chez les prématurés et aussi favorisées par l'utilisation de chlorure de sodium 0,9 % en cas de compensation sodée devant une hyponatrémie. Des études menées dans le monde entier suggèrent que jusqu'à un tiers des nourrissons de très faible poids corporel à la naissance présentent une hyponatrémie, définie comme un taux de sodium inférieurs à 130 mEq/L, au cours de la première semaine suivant la naissance et de 25 % à 65 % par la suite (Day et al., 1976; Takahashi et al., 1994). L'hyponatrémie est due à une perte rénale de sel, avec une réabsorption déficiente au niveau du tubule proximal souvent combinée à une absorption intestinale limitée (Modi, 2004). L'hyponatrémie représente un facteur de risque de troubles neurologiques, en particulier moteurs, chez l'enfant (Baraton et al., 2009; Bassan et al., 2006; Vollmer et al., 2006).

La solution de sodium-L-lactate APHP 11,2 % (m/V) constitue donc une alternative intéressante au chlorure de sodium (NaCl 0,9 %) par son absence d'apport de chlore. Malgré cela, la plupart des cliniciens restent réticents à son utilisation, notamment dans des cas pathologiques où les concentrations de lactate dans le sang sont élevées. Nos travaux ont pu montrer que l'administration de sodium-L-lactate était neuroprotectrice après un accident d'HIN dans un modèle de rat. Dans l'optique de transférer ces résultats vers la clinique, il est nécessaire, dans un premier temps, de démontrer l'innocuité de l'administration de sodium-L-lactate à des nouveau-nés. L'objectif de ce dernier chapitre était d'étudier la cinétique de la lactatémie (ainsi que d'autres paramètres sanguins) lors de la perfusion d'une solution de sodium-L-lactate dans un groupe témoin. **Étant donné qu'il n'est pas possible d'obtenir ces données chez des nouveau-nés témoins, nous avons mené une étude clinique rétrospective monocentrique sur des prématurés. Cette étude a comparé les effets d'une supplémentation parentérale contenant ou non une solution de L-lactate de sodium et a évalué leur impact respectif sur les paramètres sanguins. Si ces travaux confortent l'idée de l'innocuité de la perfusion de L-lactate de sodium, ils pourraient ouvrir une piste thérapeutique potentielle dans le cadre de l'HIN, cause majeure de mortalité et de handicaps chez les nouveau-nés, et pour laquelle aucun traitement pharmacologique n'existe à l'heure actuelle.**

1.1. Design et population de l'étude

Il s'agissait d'une étude observationnelle descriptive monocentrique rétrospective qui s'étendait d'août 2022 (date de début d'utilisation du L-lactate de sodium) à mars 2023, dans le service de réanimation néonatale du CHU de Bordeaux. Cette étude a été approuvée et a suivi les règles du Comité d'Éthique Humaine de la Recherche de l'Hôpital de Bordeaux (CHUBX 2023/30). Des lettres d'information et de droit d'opposition ont été envoyées à tous les parents.

1.1.1. Critères de la cohorte

- Les critères d'inclusion étaient les suivants :
 - Nouveau-nés \geq 24 semaines d'aménorrhée (SA) avec poids de naissance \geq 500 g.
 - Nouveau-nés pris en charge à partir d'août 2022 et bénéficiant d'une perfusion de L-lactate de sodium AP-HP 11,2% (m/V) pour le groupe lactate, pris en charge avant cette date pour le groupe témoin.
 - Non-opposition des détenteurs de l'autorité parentale.
- Les critères d'exclusion étaient les suivants :
 - Infarctus artériel systématisé néonatal.
 - Maladies neuro-métaboliques congénitales.
 - Anomalies malformatives sévères.

1.1.2. Variables biologiques

Les variables biologiques mesurées comprenaient la glycémie (mmol/L), la lactatémie (mmol/L), le pH sanguin (unités pH), la natrémie (mmol/L), la chlorémie (mmol/L) et l'hémoglobine totale (g/dL). Les paramètres biologiques calculés étaient les bicarbonates (mmol/L) et l'excès de bases (mEq/L). Les biomarqueurs ont été analysés à partir d'échantillons de sang capillaire sur un GEM5000 Premier (Werfen, France) qui fait référence aux normes. Le lactate à la naissance a été mesuré dans le sang du cordon ombilical artériel, à proximité des salles de naissance, sur un appareil RL1260 sur lieu de soins (Siemens Healthiner, France). Dans tous les cas, les appareils ont été préalablement comparés à l'appareil du laboratoire central avec une validation de la concordance des résultats. Tous les appareils ont été soumis à des contrôles de qualité internes et externes. Tous les utilisateurs médicaux et paramédicaux ont été formés et habilités à réaliser des analyses dans l'application de la démarche qualité normative (NF ISO 15189).

Les critères d'évaluation principaux de la recherche étaient les cinétiques et les valeurs moyennes de pH, de lactatémie et de bicarbonates avant, pendant et après arrêt de la perfusion de L-lactate de sodium. Les critères d'évaluation secondaires étaient les valeurs moyennes des autres paramètres biologiques tels que : glycémie, natrémie, chlorémie, base Excess et hémoglobine avant, pendant et après arrêt de la perfusion du L-lactate de sodium.

1.1.3. Caractéristiques de la population

Au total, 60 prématurés dont 27 filles et 33 garçons, nés entre 24 et 31 semaines de gestation, ont été inclus dans notre cohorte. Le poids à la naissance variait de 590 à 1830 g. Tous les prématurés ont reçu une nutrition parentérale. Parmi eux, 30 prématurés nés entre août 2022 et mars 2023, ont reçu une perfusion de L-lactate de sodium (groupe Na-Lact) et le groupe contrôle est également composé de 30 prématurés nés avant août 2022 (date à partir de laquelle l'utilisation du L-lactate de sodium a été introduite pour améliorer l'équilibre acido-basique et restaurer la natrémie tout en évitant l'hyperchlorémie (Groh-Wargo et al., 1988) dans l'unité de soins intensifs néonataux du CHU de Bordeaux.

1.2. Administration L-lactate de sodium

Les prématurés du groupe contrôle ont reçu une nutrition parentérale avec une correction de la natrémie à l'aide d'une solution saline chlorée (0,9 % ; sodium : 154 mmol/L ; chlorure : 154 mmol/L ; osmolarité : 308 mOsm/L – groupe contrôle ; n = 30). Les patients du groupe Na-Lact ont reçu une nutrition parentérale avec une administration de solution hypertonique de L-lactate de sodium (AP-HP 11,2 % (m/V) ; sodium : 999 mmol/L ; lactate : 999 mmol/L ; osmolarité : 1998 mOsm/L ; n = 30). Les doses, les débits et les durées de perfusion étaient constamment adaptés et la durée moyenne de perfusion était de $110,7 \pm 9,7$ h. Afin de comparer les paramètres biologiques entre le groupe Na-Lact et le groupe contrôle, trois périodes distinctes ont été définies, en fonction des fenêtres de temps du groupe Na-Lact : (1) période avant la perfusion L-lactate de sodium (0 – 22 h après la naissance), (2) période pendant la perfusion L-lactate de sodium (22 h – 133 h après la naissance), et (3) période après la perfusion L-lactate de sodium (133 h – 377 h après la naissance). Pour le groupe contrôle, les moyennes des valeurs des paramètres sanguins collectées pendant ces mêmes fenêtres temporelles (0 – 22 h, 22 h – 133 h et 133 h – 377 h) ont été calculées et comparées aux moyennes mesurées dans le groupe Na-Lact.

1.3. Recueil des données

Les données étaient issues des dossiers médicaux des patients, recueillies par le biais de leurs dossiers médicaux papier et leurs dossiers informatisés sur le logiciel DxCare. La base de données a été réalisée sur le logiciel Excel sur un ordinateur sécurisé du CHU de Bordeaux. Les données ont été pseudonymisées : chaque patient inclus dans ces données avait un numéro à deux chiffres associés à un code confidentiel d'identification pour l'utilisation des données (3 premières lettres du nom de famille et première lettre du prénom).

1.4. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ainsi que les graphiques ont été réalisés en utilisant le logiciel GraphPad Prism 7.00. Les résultats ont été exprimés sous la forme de moyenne \pm erreur standard à la moyenne. Les différences statistiquement significatives entre les intra-groupes ont été mises en évidence en utilisant une ANOVA à un facteur suivi du test post-hoc LSD de Fischer. Les comparaisons ♂/♀ de l'étude clinique ont été évaluées à l'aide du test t de Student Unpaired. La signification statistique a été définie pour $p < 0,05$.

2. Résultats

2.1. Évolution des concentrations sanguines du lactate avant, pendant et après la perfusion de L-lactate de sodium 11,2 %

Pour chaque patient du groupe Na-Lact, nous avons calculé la moyenne des concentrations sanguines du lactate avant, pendant et après la perfusion de L-lactate de sodium 11,2%. Une diminution statistiquement significative de la lactatémie moyenne a été observée pendant la perfusion de L-lactate de sodium ($4,1 \pm 0,5$ mmol/L avant la perfusion contre $2,9 \pm 0,3$ mmol/L pendant la perfusion) [Figure 54 A]. À la fin de la perfusion, la lactatémie était de $1,9 \pm 0,2$ mmol/L. Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les temps « pendant » et « après » dans le groupe Na-Lact. En revanche, en comparant les lactatémies mesurées dans le groupe témoin aux mêmes périodes après la naissance, nous avons observé une diminution significative de la lactatémie entre chacun des temps, et donc une cinétique plus lente de normalisation que dans le groupe Na-Lact. Aucune différence statistiquement significative n'a été relevée entre les deux groupes concernant les valeurs de lactatémie à chacun des temps [Figure 54 A].

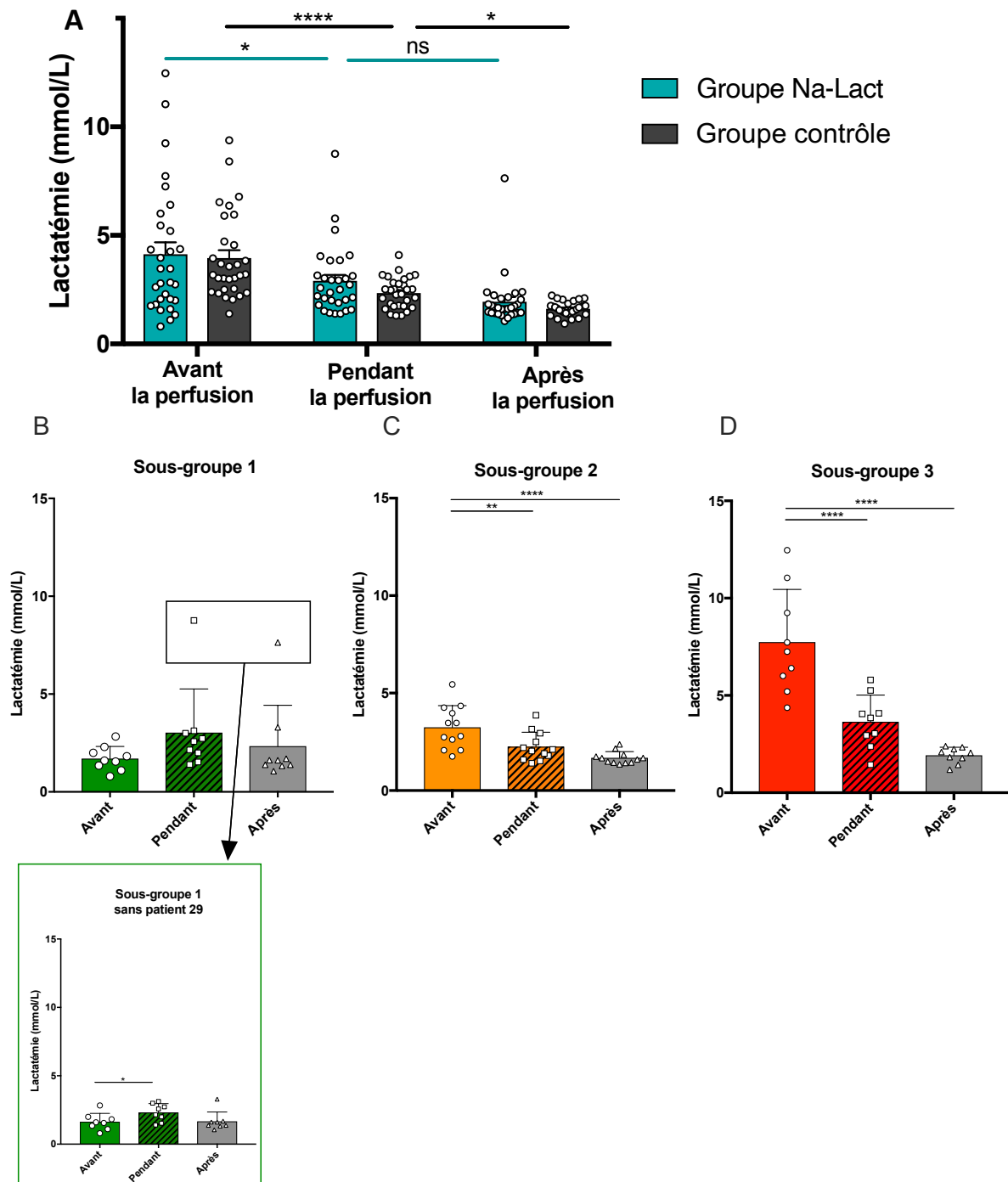


Figure 54 : Évolution de la lactatémie après la naissance. **A** : Trois périodes distinctes ont été définies : avant, pendant et après la perfusion de L-lactate de sodium. Les mêmes intervalles de temps après la naissance ont été utilisés pour analyser les données du groupe contrôle. * : $p < 0,05$, **** : $p < 0,0001$ et ns : non significatif. **B** : chez les nouveau-nés prématurés ayant une lactatémie physiologique à la naissance (sous-groupe 1, concentration de lactate sanguin < 2 mmol/L, $n = 9$). **C** : chez les nouveau-nés prématurés présentant une hyperlactatémie modérée à la naissance (sous-groupe 2, lactatémie comprise entre 2 et 5 mmol/L, $n = 12$). **D** : chez les nouveau-nés prématurés ayant une lactatémie élevée à la naissance (sous-groupe 3, lactatémie > 5 mmol/L, $n = 9$). ** : $p < 0,01$ et **** : $p < 0,0001$. Un choc septique a été diagnostiqué à 84h de vie chez le patient 29.

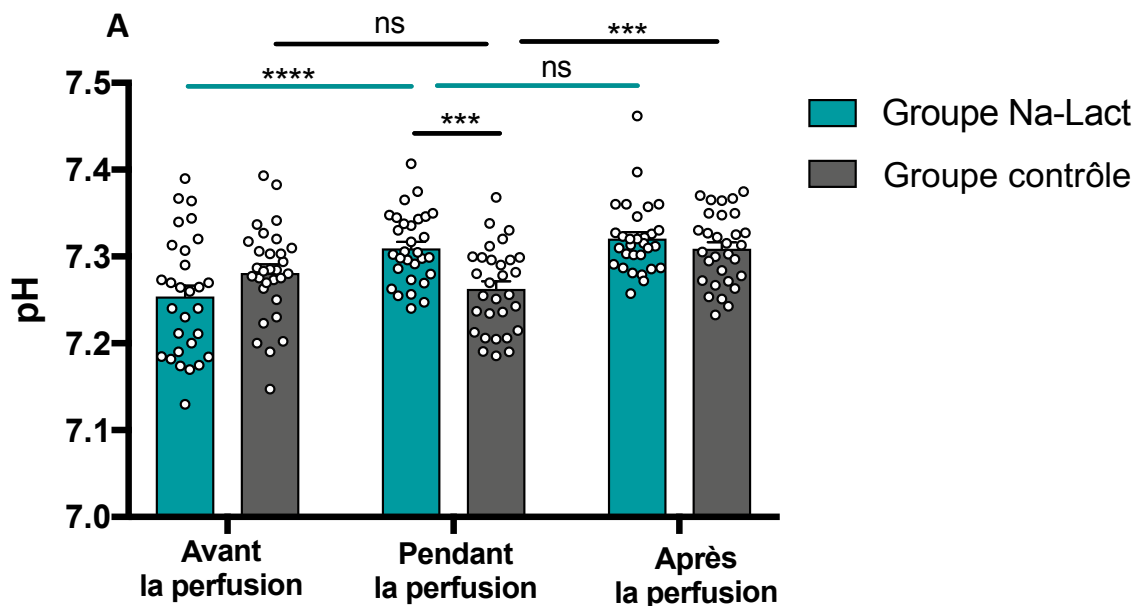
Pour affiner l'analyse, nous avons réparti les patients en trois sous-groupes en fonction de leur lactatémie à la naissance :

- **Sous-groupe 1** : patients présentant une lactatémie inférieure à 2 mmol/L à la naissance.
- **Sous-groupe 2** : patients présentant une lactatémie entre 2 et 5 mmol/L à la naissance.
- **Sous-groupe 3** : patients présentant une lactatémie supérieure à 5 mmol/L à la naissance.

Dans le sous-groupe 1, aucune variation de lactatémie avant, pendant et après la perfusion L-lactate de sodium n'a été constatée [Figure 54 B]. Une augmentation importante de la concentration sanguine du lactate a été relevée chez un seul patient, un prématuré diagnostiqué avec un choc septique à 84 h de vie (Figure 54 B, patient 29, carré). Dans les sous-groupes 2 et 3, une diminution statistiquement significative des valeurs moyennes de lactatémie a été observée entre les temps avant et pendant la perfusion de la solution de L-lactate de sodium 1M (la lactatémie passe de $3,2 \pm 0,3$ avant à $2,3 \pm 0,2$ mmol/L lors de l'administration de lactate dans le sous-groupe 2, et de $7,7 \pm 0,9$ à $3,6 \pm 0,5$ mmol/L dans le sous-groupe 3, Figures 54 C et 54 D). L'analyse des cinétiques de lactatémie pour chaque patient (à l'exception du patient 29 avec sepsis) montre que les niveaux de lactate sanguin ne dépassent pas la lactatémie initiale mesurée au début de la perfusion de L-lactate de sodium. Dans le sous-groupe 3, où les nouveau-nés avaient une lactatémie élevée à la naissance, l'administration de lactate de sodium entraîne une diminution de la lactatémie.

2.2. Évolution du pH avant, pendant et après la perfusion de lactate de sodium 11,2 %

Concernant le pH sanguin, les prématurés du groupe contrôle ont montré une normalisation des valeurs de pH sanguin passés les 133 h de vie. En revanche, dans le groupe Na-Lact, le pH sanguin se normalise plus vite, lors la période d'administration du lactate [Figure 55 A]. Aucune différence statistiquement significative n'a été observée entre les valeurs de pH pendant et après la perfusion dans le groupe Na-Lact ($7,31 \pm 0,01$ et $7,32 \pm 0,01$ respectivement). Si on analyse ces données à l'intérieur des sous-groupes définis ci-avant, aucune différence significative des valeurs de pH n'a été observée au cours des 3 périodes définies dans le sous-groupe 1 [Figure 55 B]. Dans le sous-groupe 2, les valeurs de pH sanguin se sont normalisées au cours de la perfusion de L-lactate de sodium [Figure 55 C], tout comme dans le sous-groupe 3, où les valeurs de pH étaient les plus basses durant les premières heures [Figure 55 D].



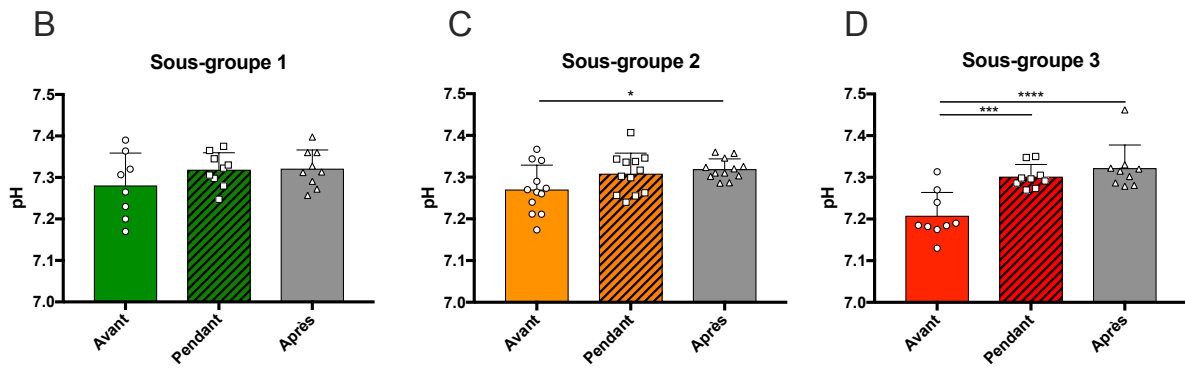


Figure 55 : Évolution du pH sanguin après la naissance. A : Trois périodes distinctes ont été définies : avant, pendant et après la perfusion de L-lactate de sodium. Les mêmes intervalles de temps après la naissance ont été utilisés pour analyser les données du groupe contrôle. *** : $p < 0,001$, **** : $p < 0,0001$ et ns : non significatif. B : Évolution du pH sanguin dans le sous-groupe 1 (lactatémie à la naissance < 2 mmol/L, $n = 9$). C : Évolution du pH sanguin dans le sous-groupe 2 (lactatémie à la naissance comprise entre 2 et 5 mmol/L, $n = 12$). D : Évolution du pH sanguin dans le sous-groupe 3 (lactatémie à la naissance > 5 mmol/L, $n = 9$). * : $p < 0,05$, *** : $p < 0,001$, **** : $p < 0,0001$ et ns : non significatif.

2.3. Évolution des concentrations sanguines en bicarbonates et en chlore avant, pendant et après la perfusion de lactate de sodium 11,2 %

Comparativement aux groupes témoins, les valeurs sanguines de bicarbonates se sont normalisées plus rapidement chez les prématurés ayant reçu du L-lactate de sodium que chez ceux ayant reçu une solution saline chlorée (les valeurs de bicarbonates étaient respectivement de 19,5, 22,6 et 25,0 mmol/L dans le groupe Na-Lact pour les périodes avant, pendant et après la perfusion de L-lactate de sodium, respectivement, contre 20,4, 19,9 et 24,9 mmol/L dans le groupe contrôle pour les trois périodes de temps correspondantes) [Figure 56].

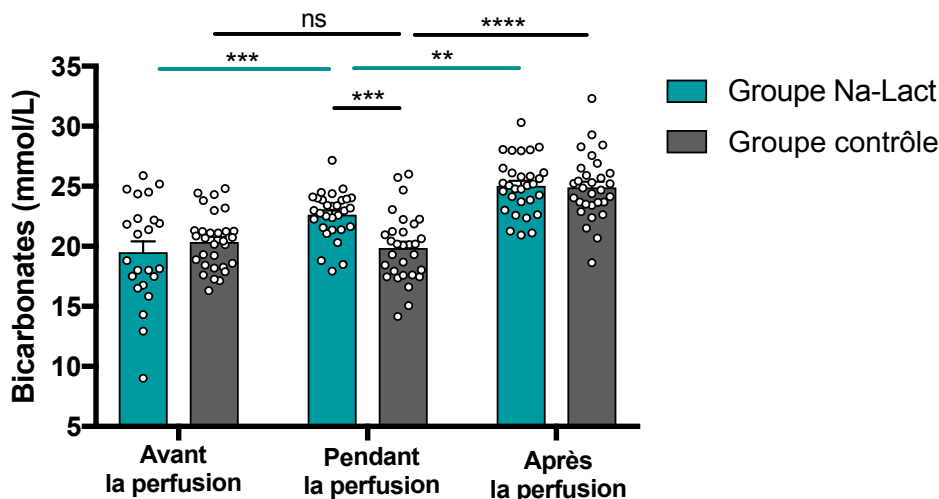


Figure 56 : Évolution des valeurs de bicarbonates après la naissance. ** : $p < 0,01$, *** : $p < 0,001$, **** : $p < 0,0001$ et ns : non significatif.

Concernant la chlorémie, dans le groupe Na-Lact, les valeurs étaient de 99,7, 102,3 et 99,8 mmol/L avant, pendant et après la perfusion de L-lactate de sodium, respectivement, tandis que dans le groupe contrôle, elles étaient de 101,0, 106,1 et 103,3 mmol/L aux périodes correspondantes. Contrairement au groupe contrôle, la perfusion de L-lactate de sodium a prévenu une hyperchlorémie chez les prématurés [Figure 57].

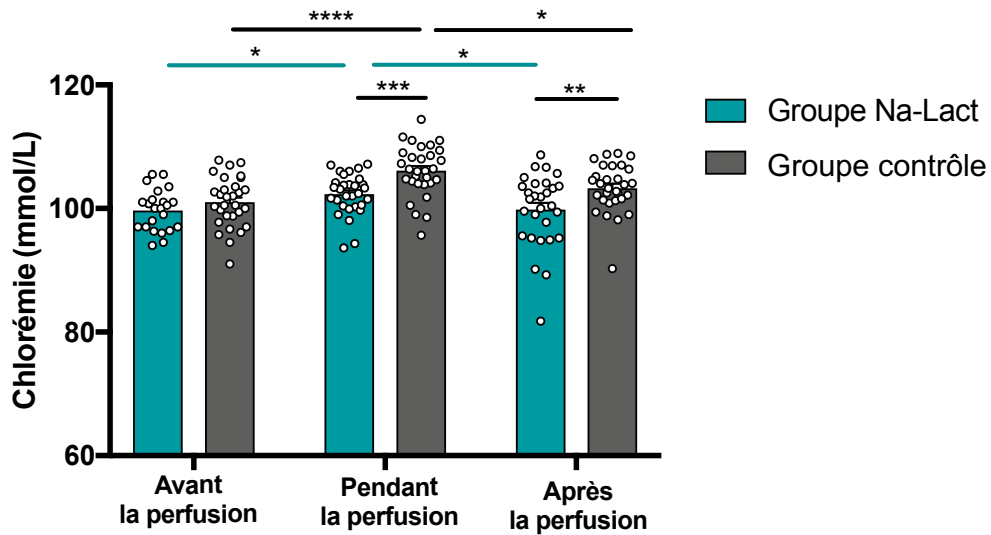


Figure 57 : Évolution des valeurs de chlore après la naissance. * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$, *** : $p < 0,001$ et **** : $p < 0,0001$.

3. Discussion

Dans cette étude, nous avons évalué l'impact de la perfusion de L-lactate de sodium 11,2 % sur un ensemble de paramètres sanguins chez le nouveau-né prématuré. À ce jour, aucune étude à notre connaissance n'a été publiée sur ce sujet. Les données récoltées et analysées ont révélé qu'en dépit de l'administration d'une perfusion de L-lactate de sodium à 1M, une diminution de la lactatémie était observée. En parallèle, cette perfusion a favorisé une normalisation plus rapide du pH sanguin et des bicarbonates, tout en évitant l'hyperchlorémie. En revanche, la solution saline standard a montré un retard dans la normalisation du pH sanguin comparé au L-lactate de sodium.

Lorsque le L-lactate de sodium est perfusé dans l'organisme, il est métabolisé en pyruvate, qui va alimenter le cycle de Krebs, dont un des sous-produits est le dioxyde de carbone. Le CO_2 diffuse à travers les membranes cellulaires vers le sang où il est ensuite absorbé par les érythrocytes et converti par l'anhydrase carbonique en bicarbonates, un tampon alcalin qui neutralise l'excès d'acidité sanguine (Duburcq et al., 2014). Ainsi, l'infusion de L-lactate de sodium améliore les niveaux de bicarbonates et contribue à l'équilibre acido-basique du sang. Cet équilibre se mesure classiquement par l'excès de bases, un concept introduit par Siggaard-Andersen en 1960 (Severinghaus, 1993; Severinghaus & Astrup, 1985). Il reflète la quantité d'acides ou de bases qu'il faut ajouter au sang pour ramener son pH à une valeur normale (7,4) à une température de 37°C et avec une pression partielle de dioxyde de carbone (PaCO_2) de 40 mmHg. Ainsi, un excès de bases (supérieur à 2 mmol/L) indique une alcalose métabolique alors qu'une **acidose métabolique** est diagnostiquée lorsque la valeur est inférieure à -2 mmol/L ce qui signifie qu'il y a un manque de bases dans le sang pour tamponner l'acidité. Des valeurs d'excès de bases comprises entre -2 et 2 mmol/L sont considérées comme normales. Dans notre étude, les analyses ont montré que le groupe témoin présentait une acidose métabolique plus importante dans les premières heures, avec un pH et un excès de bases inférieurs par rapport au groupe Na-Lact (pH de 7,26 contre 7,31 et excès de bases de -8,3 contre -3,8 [voir article]). Ces mesures, complémentaires aux mesures du pH et des bicarbonates, confirment un effet positif de l'administration de lactate de sodium sur les paramètres sanguins des prématurés de notre cohorte.

Ce qu'il faut retenir :

- L'étude rétrospective a porté sur 60 prématurés, dont 30 ont reçu une perfusion de L-lactate de sodium.
- L'utilisation de la solution de lactate de sodium à la place de du NaCl pour maintenir les taux de sodium prévient l'hyperchlorémie.
- L'administration de L-lactate de sodium favorise une normalisation plus rapide du pH sanguin.

Chez les nourrissons prématurés, l'infusion de L-lactate de sodium n'entraîne pas d'augmentation des taux de lactates sanguins, même chez ceux ayant une lactatémie élevée à la naissance.

Nos données obtenues chez les prématurés ouvrent des perspectives encourageantes pour l'administration de L-lactate de sodium dans d'autres contextes cliniques, tels que l'HIN. La prochaine étape consisterait à évaluer, chez des nouveau-nés atteints d'HIN, l'innocuité et l'efficacité de la perfusion de L-lactate de sodium, combinée à l'HT, après un épisode d'HIN. Une demande d'autorisation au comité d'éthique est actuellement en cours et un financement a été obtenu pour réaliser cette étude sur 14 nouveau-nés.

4. Références

- Baraton, L., Ancel, P. Y., Flamant, C., Orsonneau, J. L., Darmaun, D., & Rozé, J. C. (2009). Impact of changes in serum sodium levels on 2-year neurologic outcomes for very preterm neonates. *Pediatrics*, *124*(4), e655-661. <https://doi.org/10.1542/peds.2008-3415>
- Bassan, H., Benson, C. B., Limperopoulos, C., Feldman, H. A., Ringer, S. A., Veracruz, E., Stewart, J. E., Soul, J. S., Disalvo, D. N., Volpe, J. J., & du Plessis, A. J. (2006). Ultrasonographic features and severity scoring of periventricular hemorrhagic infarction in relation to risk factors and outcome. *Pediatrics*, *117*(6), 2111-2118. <https://doi.org/10.1542/peds.2005-1570>
- Bouzier, A. K., Thiaudiere, E., Biran, M., Rouland, R., Canioni, P., & Merle, M. (2000). The metabolism of [3-(13)C]lactate in the rat brain is specific of a pyruvate carboxylase-deprived compartment. *Journal of Neurochemistry*, *75*(2), 480-486. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0750480.x>
- Bouzier-Sore, A.-K., Voisin, P., Bouchaud, V., Bezancon, E., Franconi, J.-M., & Pellerin, L. (2006). Competition between glucose and lactate as oxidative energy substrates in both neurons and astrocytes: A comparative NMR study. *The European Journal of Neuroscience*, *24*(6), 1687-1694. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.05056.x>
- Bouzier-Sore, A.-K., Voisin, P., Canioni, P., Magistretti, P. J., & Pellerin, L. (2003). Lactate is a preferential oxidative energy substrate over glucose for neurons in culture. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, *23*(11), 1298-1306. <https://doi.org/10.1097/01.WCB.0000091761.61714.25>
- Day, G. M., Radde, I. C., Balfe, J. W., & Chance, G. W. (1976). Electrolyte abnormalities in very low birthweight infants. *Pediatric Research*, *10*(5), 522-526. <https://doi.org/10.1203/00006450-197605000-00003>
- Duburcq, T., Favory, R., Mathieu, D., Hubert, T., Mangalaboyi, J., Gmyr, V., Quintane, L., Maboudou, P., Pattou, F., & Jourdain, M. (2014). Hypertonic sodium lactate improves fluid balance and hemodynamics in porcine endotoxic shock. *Critical Care*, *18*(4), 467. <https://doi.org/10.1186/s13054-014-0467-3>
- Groh-Wargo, S., Ciaccia, A., & Moore, J. (1988). Neonatal metabolic acidosis: Effect of chloride from normal saline flushes. *JPEN. Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, *12*(2), 159-161. <https://doi.org/10.1177/0148607188012002159>
- Modi, N. (2004). Management of fluid balance in the very immature neonate. *Archives of Disease in Childhood Fetal and Neonatal Edition*, *89*(2), F108. <https://doi.org/10.1136/adc.2001.004275>
- Roumes, H., Dumont, U., Sanchez, S., Mazuel, L., Blanc, J., Raffard, G., Chateil, J.-F., Pellerin, L., & Bouzier-Sore, A.-K. (2021). Neuroprotective role of lactate in rat neonatal hypoxia-ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, *41*(2), 342-358. <https://doi.org/10.1177/0271678X20908355>
- Roumes, H., Jollé, C., Blanc, J., Benkhaled, I., Chatain, C. P., Massot, P., Raffard, G., Bouchaud, V., Biran, M., Pythoud, C., Déglon, N., Zimmer, E. R., Pellerin, L., & Bouzier-Sore, A.-K. (2021). Lactate transporters in the rat barrel cortex sustain whisker-dependent BOLD fMRI signal and behavioral performance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *118*(47), e2112466118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2112466118>
- Severinghaus, J. W. (1993). Siggaard-Andersen and the « Great Trans-Atlantic Acid-Base Debate ». *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation. Supplementum*, *214*, 99-104.
- Severinghaus, J. W., & Astrup, P. B. (1985). History of blood gas analysis. II. pH and acid-base balance measurements. *Journal of Clinical Monitoring*, *1*(4), 259-277. <https://doi.org/10.1007/BF02832819>
- Takahashi, N., Hoshi, J., & Nishida, H. (1994). Water balance, electrolytes and acid-base balance in extremely premature infants. *Acta Paediatrica Japonica: Overseas Edition*, *36*(3), 250-255. <https://doi.org/10.1111/j.1442-200x.1994.tb03173.x>
- Tassinari, I. D., Zang, J., Ribeiro, N. H., Martins, B. B., Tauffer, J. V. M., Nunes, R. R., Sanches, E. F., Sizonenko, S., Netto, C. A., Paz, A. H., & de Fraga, L. S. (2024). Lactate administration causes long-term neuroprotective effects following neonatal hypoxia-ischemia. *Experimental Neurology*, *381*, 114929. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2024.114929>
- Vollmer, B., Roth, S., Riley, K., O'Brien, F., Baudin, J., De Haan, M., Vargha Khadem, F., Neville, B. G. R., & Wyatt, J. S. (2006). Long-term neurodevelopmental outcome of preterm children with unilateral cerebral lesions diagnosed by neonatal ultrasound. *Early Human Development*, *82*(10), 655-661. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2005.12.011>

Positive impact of sodium L-lactate supplementation on blood biomarkers in preterm newborns.

Ifrah Omar Ibrahim^{1,#}, Chloé Perrot^{2,#}, Hélène Roumes^{1,#}, Marie-Christine Beauvieux^{1,3}, Olivier Brissaud⁴, Sophie Cramaregeas², Eric Dumas-de-la-Roque², Luc Pellerin⁵, Jean-François Chateil¹, Olivier Tandonnet² & Anne-Karine Bouzier-Sore^{1,*}.

¹ Univ. Bordeaux, CNRS, CRMSB, UMR 5536, F-33000 Bordeaux, France

² Neonatal intensive care unit, Maternity, Bordeaux University Hospital, F-33000 Bordeaux, France

³ Biochemistry department, Bordeaux University Hospital, F-33000 Bordeaux, France

⁴ Neonatal intensive care unit, Children's Hospital, Bordeaux University Hospital, F-33000 Bordeaux, France

⁵ IRMETIST, U1313, University of Poitiers and CHU of Poitiers, F-86021 Poitiers, France

#Same contribution

* Corresponding author: Anne-Karine Bouzier-Sore, Univ. Bordeaux, CNRS, CRMSB, UMR 5536, F-33000 Bordeaux, France. Tel: +33 (0) 5 47 30 44 24. Fax: +33 (0) 5 57 57 45 56. E-mail: akb@rmsb.u-bordeaux.fr

<https://orcid.org/0000-0002-3470-0940>

Keywords: Lactate, Neonate, Preterm infant.

Impact statement:

- Sodium L-lactate infusion does not increase blood lactate levels and restores normal pH in premature neonates.
- The study demonstrates that sodium L-lactate infusion avoids hyperchloremia while maintaining sodium levels, offering a safe alternative to sodium chloride.
- The findings support the feasibility of using sodium L-lactate infusion in clinical settings in neonatal care.

Statements and Declarations: Authors have no conflict of interest to declare.

Abstract

Preclinical studies have established that lactate is a crucial cerebral energy substrate, with sodium L-lactate administration significantly reducing brain lesion volumes and restoring motor and cognitive functions following neonatal hypoxia-ischemia in rat pups. Sodium L-lactate infusion is suggested to be neuroprotective due to its metabolic use by neurons, making it a promising candidate for treating newborns with hypoxia-ischemia encephalopathy, a condition for which hypothermia is the only current treatment. Before considering clinical trials, we retrospectively analyzed blood parameters in 60 premature neonates during their first days of life. Among them, 30 received sodium L-

lactate instead of sodium chloride to prevent hyperchloremic acidosis. We monitored pH, lactatemia, bicarbonates, glycemia, natremia, chloremia, base excess, and hemoglobin before, during, and after sodium L-lactate infusion. The results showed that sodium L-lactate infusion decreased blood lactate levels while increasing pH from 7.25 to 7.31 during the infusion. Upon stopping the infusion, lactatemia was 1.9 mM, and pH was 7.32 ± 0.01 . Sodium L-lactate supplementation effectively restored normal blood pH, maintained natremia, and avoided hyperchloremia. Most importantly, even with high initial lactatemia, lactate levels decreased during the infusion, highlighting its potential in neonatal clinical care.

Introduction

Premature birth represents a significant public health challenge.¹ The incidence of preterm birth is approximately 9% in Europe and exceeds 13% in Africa,² with survival rates being influenced by the quality of neonatal care provided.³ One specific parameter that has undergone scrutiny for its correlation with favorable or unfavorable outcomes is lactatemia, particularly during birth or within the initial three hours thereafter, with early elevated arterial lactate levels predicting adverse outcomes in preterm neonates.⁴

From a medical perspective, particularly within intensive care units, lactate has historically carried a negative connotation, often regarded as a deleterious waste product and a poor prognostic indicator.⁵ However, advances in our understanding of neuroenergetics increasingly challenge this conventional wisdom. The seminal proposal of an astrocyte-neuron lactate shuttle (ANLS) by Pellerin and Magistretti in 1994⁶ fundamentally altered the perception of lactate, a byproduct of carbohydrate metabolism. This model elucidated the critical role of astrocytes, situated at the interface between blood vessels and neurons, in capturing blood glucose and converting it into lactate through glycolysis. Subsequently, this astrocytic lactate is transported to neurons, where it undergoes reconversion into pyruvate, serving as a vital energy substrate through the Krebs cycle and mitochondrial oxidative phosphorylation.

Over the past two decades, accumulating evidence derived from *in vitro*,^{7,8} *ex vivo*⁹ and *in vivo*^{10,11} studies, has consistently highlighted the fact that glucose remains the primary cerebral energy substrate, while emphasizing that lactate is the preferred energy substrate by neurons. This paradigm shift has transformed lactate from being perceived as a harmful metabolite to a cerebral energy substrate that supports neuronal function. Consequently, the notion of lactate as a potential neuroprotective agent has emerged,

offering the promise to be used as an alternative substrate in conditions characterized by energy metabolism deficits.

In adults, the neuroprotective benefits of lactate administration are beginning to be documented, particularly in the context of traumatic brain injury.¹²⁻¹⁵ At birth, only two preclinical studies have demonstrated the neuroprotective potential of lactate in a rat model of neonatal hypoxia-ischemia.^{16,17} Evidence shows that lactate metabolism is crucial for neuroprotection, as blocking lactate dehydrogenase—an enzyme that converts lactate into pyruvate and is essential for its metabolism—results in the loss of lactate's protective effects.¹⁷ Despite these progresses, the correlation between hyperlactatemia and adverse prognosis remains firmly established in pediatric healthcare settings, while data regarding lactate administration in newborns are scarce.

The clinical interpretation of elevated blood lactate levels warrants reassessment, as hyperlactatemia may represent an adaptive response to cerebral energy metabolism deficits rather than being inherently deleterious.¹⁸ To elucidate the potential protective effects of lactate administration in the context of hypoxia-ischemia, it is essential to first investigate the kinetics of lactatemia (and other blood parameters) during the infusion of a sodium-L-lactate solution in a control group. However, as it is not feasible to obtain this data from a cohort of healthy newborns, we conducted a monocentric retrospective clinical study on preterm infants who received sodium-L-lactate solution infusions after birth to correct metabolic acidosis. This study compared the effects of sodium L-lactate solution supplementation with standard parenteral solutions alone on their blood parameters.

Materials and Methods

Study type

This retrospective single-center descriptive observational study was performed in the

neonatal intensive care unit at the maternity of Bordeaux University Hospital. This study was approved by and followed the rules of the Human Ethical Research Committee of Bordeaux Hospital (CHUBX 2023/30). Letters of information and opposition right were sent to all parents.

Cohort criteria

Inclusion criteria

Preterm neonates with gestational age at birth ≥ 24 weeks, birth weight ≥ 500 g, metabolic acidosis, non-opposition from holders of parental authority.

Exclusion criteria

Systematized neonatal arterial infarction, congenital neurometabolic disease, severe malformations, poor understanding of French among those with parental authority, with no possibility of correct translation.

Clinical variables

Clinical variables included age, gender, weight at birth, gestational age at birth, lactatemia at birth, Apgar score at 1, 5 and 10 min after birth, origin of prematurity (induced or spontaneous), presence of sepsis, ulcerative enterocolitis, bronchopulmonary dysplasia, surfactant deficiency, chorioamnionitis, obstructive shock due to pulmonary arterial hypertension, pulmonary hemorrhage, subependymal or intraventricular bleeding.

Biological variables

Measured biological variables included glycemia (mmol/L), lactatemia (mmol/L), blood pH (pH units), natremia (mmol/L), chloremia (mmol/L) and hemoglobin (g/dL). Calculated biological parameters were bicarbonates (mmol/L) and base excess (mEq/L). Biomarkers were analyzed using capillary blood samples on a point-of-care GEM5000 Premier (Werfen, France) that refers to standards. Lactate at birth has been measured in arterial umbilical cord blood, next to birth rooms, on a point-of-care RL1260 device (Siemens Healthiner, France). In all cases, devices have been previously compared to the central lab device with a validation of the result concordance. All devices have been

submitted to internal and external quality controls. All medical and paramedical users have been trained and authorized to perform analyses in the application of the normative quality approach (NF ISO 15189).

Sodium L-lactate infusion

Preterm neonates in the Na-Lact group received intravenous sodium L-lactate infusion (sodium L-lactate AP-HP 11.2% (m/V) solution; sodium = 999 mmol/L = 23 g/L and lactate = 999 mmol/L = 89 g/L). Infusion doses, rates and durations were permanently adapted. Doses ranged from 0.7 mEq/kg/day to 5.4 mEq/kg/day and rates from 0.1 to 0.3 mL/h. Mean time to start the infusion was 1317 ± 245 min after birth and mean time of infusion duration was 110.7 ± 9.7 h.

Patients

Sixty preterm neonates, 27 girls and 33 boys, born between 24 (1) and 31 (6) weeks (days) of gestation were included. Birth weights ranged from 590 to 1830 g. All babies were on parenteral nutrition. Among this cohort, thirty consecutive preterm infants born between August 2022 to March 2023 received sodium L-lactate infusion (Na-Lact group). The control group was composed of 30 preterm babies who were born before August 2022 (August 2022: starting date of the use of sodium L-lactate to improve the acid-base status and to restore natremia while avoiding hyperchloremia),¹⁹ in our neonatal intensive care unit. Characteristics of preterm newborns of the cohort are presented in **Table 1**.

Antenatal and medical histories of the cohort are summarized in **Table 2**. Chorioamnionitis was defined by maternal fever associated with elevated blood CRP in newborns (more or less associated with leukocytosis), with or without bacteriological documentation. Surfactant deficiency was defined by the presence of clinical signs of respiratory distress (based on the Silverman score), decreased oxygen saturation and the presence of radiological signs. Bronchopulmonary dysplasia was defined by an oxygen requirement or the need for ventilatory support beyond 36 weeks of amenorrhea. Obstructive shock due to

pulmonary arterial hypertension was defined by the need for treatment with nitric oxide and inotropic support. The classification of necrotizing enterocolitis was based on the modified Bell classification. Intraventricular hemorrhage was detected on transfontanellar ultrasound scans performed several times during hospitalization, and graded according to the Papille classification. Sepsis was defined by the presence of suggestive clinical signs associated with at least one positive blood culture between the 4th and 30th day of life. Early bacterial neonatal infections (less than 72 hours of life) were not taken into account. No death occurred during this study.

	Na-Lact group	Control group
Sex (n)	30	30
♀	13 (43%)	14 (47%)
♂	17 (57%)	16 (53%)
Gestational age at birth (week, day/7days a week) [min - max]	26 5/7 ± 2/7* [24 1/7 - 30 3/7]	27 6/7 ± 3/7* [24 1/7 - 31 4/7]
Birth weight (g) [min - max]	830.8 ± 35.0* [590 - 1300]	981.3 ± 53.7* [620 - 1830]
Apgar 1min [min - max]	4.7 ± 0.4 [1 - 8]	4.1 ± 0.5 [0 - 9]
Apgar 5min, [min - max]	7.2 ± 0.4 [2 - 10]	7.3 ± 0.5 [0 - 10]
Apgar 10min [min - max]	8.4 ± 0.3 [4 - 10]	8.5 ± 0.5 [0 - 10]
Lactatemia at birth (mmol/L) [n]	4.1 ± 0.6 [26]	4.6 ± 0.7 [30]
Starting of Na-Lactate 11.2% infusion (min after birth) [min - max]	1317 ± 245 [60 - 4860]	∅
Duration of Na-Lactate 11.2% infusion (h) [min - max]	110.7 ± 9.7 [25 - 227]	∅

Table 1: Summary of some characteristics and parameters of preterm neonates of the cohort. *: $p < 0.05$. Apgar: appearance, pulse, grimace, activity, and respiration.

Preterm neonates in the control group received parenteral nutrition with natremia corrected using chloride saline solution (0.9 %; sodium: 154 mmol/L; chloride: 154 mmol/L; osmolarity: 308 mOsm/L – control group; $n = 30$). Patients in the Na-Lact group had parenteral nutrition with hypertonic sodium L-lactate solution administration (AP-HP 11.2%; sodium: 999 mmol/L; lactate: 999 mmol/L; osmolarity: 1998 mOsm/L; $n = 30$). To compare biological parameters between the Na-Lact group and the control group (in which preterm neonates did not receive sodium L-lactate infusion), three distinct periods were distinguished, based on time windows of the Na-Lact group: (1) time window before sodium L-lactate infusion (0 – 22 h after birth), (2) time window of sodium L-lactate infusion (22 h – 133 h after birth), and (3) time window after sodium L-lactate infusion (133 h – 377 h after birth). For the control group, means of blood parameter values collected during the same time windows (0 – 22 h, 22 h – 133 h and 133 h – 377 h) were calculated and compared to the means measured in the Na-Lact group. Thereafter, to analyze deeper the impact of sodium L-lactate infusion on lactatemia, three subgroups were determined: subgroup 1 with blood lactate concentration at birth < 2 mmol/L; subgroup 2 with moderate hyperlactatemia at birth ($2 \leq$ lactatemia ≤ 5 mmol/L) and subgroup 3 with severe hyperlactatemia at birth (blood lactate concentration > 5 mmol/L). Mean times to start the infusion were 1019 ± 370 min, 1863 ± 438 min and 888 ± 392 min after birth and mean times of infusion duration were 137.4 ± 18.5 h, 95.2 ± 15.3 h and 104.6 ± 15.2 h, respectively in subgroups 1, 2 and 3. These parameters were also used to calculate means of blood parameter values collected during the corresponding time windows for each subgroup (1, 2 and 3) in the control group. Numbers of patients were 9 in subgroups 1 and 3, and 12 in subgroups 2, in each group.

Groups

Statistics

Data analyses were performed using GraphPad Prism7.00 software. Normal distribution data were expressed as mean \pm standard error of the mean. Statistical significance of the differences between the two groups were determined by student's t-test and for the multiple subgroup analyses, statistics were determined using One-Way ANOVA and Fischer's LSD post hoc test. A p-value < 0.05 was considered statistically significant.

Results

Cohort

Two groups were considered in this study, the control and the Na-Lact groups. In the Na-Lact group, 30 preterm neonates received infusion of a sodium L-lactate (1 M) solution. This new protocol was set up to administrate sodium while limiting chloride intake, which increase is deleterious in preterm neonates. Blood parameters were carefully and regularly controlled before, during and after sodium L-lactate administration. These values were compared with those measured in the control group, which consisted of 30 preterm neonates born before the establishment of this protocol. Gestational ages and weights at birth were slightly smaller in the Na-lact group compared to the control group. The mean week of amenorrhea age of the newborns in the Na-Lact group was 26 (5) weeks (days) \pm 2 days while it was 27 (6) weeks (days) \pm 3 days in the control group. Birth weight means were 830 ± 35 g and 981 ± 54 g in Na-Lact and control groups, respectively. However, sex ratio and, more importantly, lactatemia at birth were similar in both groups (**Table 1**). Blood lactate levels at birth were 4.1 ± 0.6 and 4.6 ± 0.7 mmol/L in Na-Lact and control groups, respectively (**Figure 1A**). Apgar (Appearance, Pulse, Grimace, Activity, and Respiration) scores were not statistically different between the two groups, neither at 1 min, nor at 5 min and nor at 10 min (**Table 1**). Moreover, except for chorioamnionitis and for sepsis, antenatal and clinical courses of patients were similar in the two groups (**Table 2**). In each group,

	Na-Lact group (n - %)	Control group (n - %)
IUGR $< 10^{\text{th}}$ percentile	7 - 23%	6 - 20%
Multiple pregnancy	13 - 43%	10 - 33%
Chorioamnionitis	13 - 43%	2 - 7%
Preeclampsia	3 - 10%	3 - 10%
Origin of prematurity		
Induced	10 - 33%	14 - 47%
Spontaneous	20 - 67%	16 - 53%
Antenatal corticotherapy	24 - 80%	24 - 80%
Surfactant deficiency	25 - 83%	25 - 83%
Bronchopulmonary dysplasia	23 - 77%	25 - 83%
Pulmonary hemorrhage	3 - 10%	4 - 13%
Necrotizing enterocolitis	3 - 10%	3 - 10%
Obstructive shock	14 - 47%	14 - 47%
Intraventricular hemorrhage	14 - 47%	7 - 23%
Sepsis	21 - 70%	10 - 33%

Table 2: Antenatal and medical histories of the cohort. IUGR: intrauterine growth retardation.

maternal status was characterized at 80% by antepartum corticosteroid therapy and at 10% by pre-eclampsia, resulting from a dysfunction of the placenta and characterized by high blood pressure and the presence of proteins in urine. At the pulmonary level, in both groups, 83% of newborns were affected by a defect in pulmonary surfactant and secondarily bronchopulmonary dysplasia due to pulmonary immaturity. Ulcerative-necrotizing enterocolitis, an inflammatory digestive disease that mainly affects premature newborns, was present in 10% of preterm newborns both in Na-Lact and control groups. Patients in the Na-Lact group also had slightly more intraventricular hemorrhages.

Lactatemia, pH, base excess (BE) and bicarbonates

For each patient in the Na-Lact group, we calculated the mean lactatemia before, during and after the infusion of a 11.2% sodium L-

lactate solution (**Figure 1B**). A statistically significant decrease in the mean value of lactatemia was observed while sodium L-lactate was infused (4.1 ± 0.5 mmol/L and 2.9 ± 0.3 mmol/L before and during the infusion, respectively, **Figure 1B** and **Suppl Figure 1A**). At the end of the infusion, lactatemia was 1.9 ± 0.2 mmol/L. When compared to the lactatemia measured in the control group during the same time periods after birth, no statistically significant difference was found (**Figure 1B**). In the Na-Lact group, no statistically significant difference was found in lactatemia values between genders (**Suppl Figure 1B**). Additionally, no impact of birth weight was detected (**Suppl Figure 1F and G**). In subgroup 1, in which preterm infants had a low lactatemia at birth, no difference in lactatemia before, during and after the infusion of a 11.2% sodium L-lactate solution was measured (**Suppl Figure 1C**). A strong increase in blood lactate concentration was measured in only one patient who was the sole preterm infant diagnosed with a septic shock at 84 h of life. (**Suppl Figure 1C**, patient 29, green square and **Suppl Figure 2**, patient 29). In subgroup 2 and 3, in which patients had a medium or high

lactatemia at birth, a statistically significant decrease in the mean lactatemia values was observed before and during 1M sodium L-lactate solution infusion (from 3.2 ± 0.3 to 2.3 ± 0.2 mM and from 7.7 ± 0.9 to 3.6 ± 0.5 mM, respectively, **Suppl Figure 1D and E**). All lactatemia values for each patient receiving sodium L-lactate are presented in **Suppl Figures 2, 3 and 4**, corresponding to preterm infants in subgroup 1, 2 and 3, respectively. Kinetics of lactatemia for each patient (excluding patient 29 with sepsis) indicate that blood lactate levels do not exceed the initial lactatemia measured at the start of sodium L-lactate infusion, even in the subgroup 3, in which newborns had high lactatemia at birth (**Suppl Figure 4**).

Concerning pH, preterm neonates in the control group had blood pH values that were normalized only during the late period after infusion. In contrast, an infusion of sodium L-lactate normalized blood pH during the infusion period itself (**Figure 1C**). No statistically significant difference was found between pH values during or after the infusion period in the Na-Lact group (7.31 ± 0.01 and 7.32 ± 0.01 , respectively).

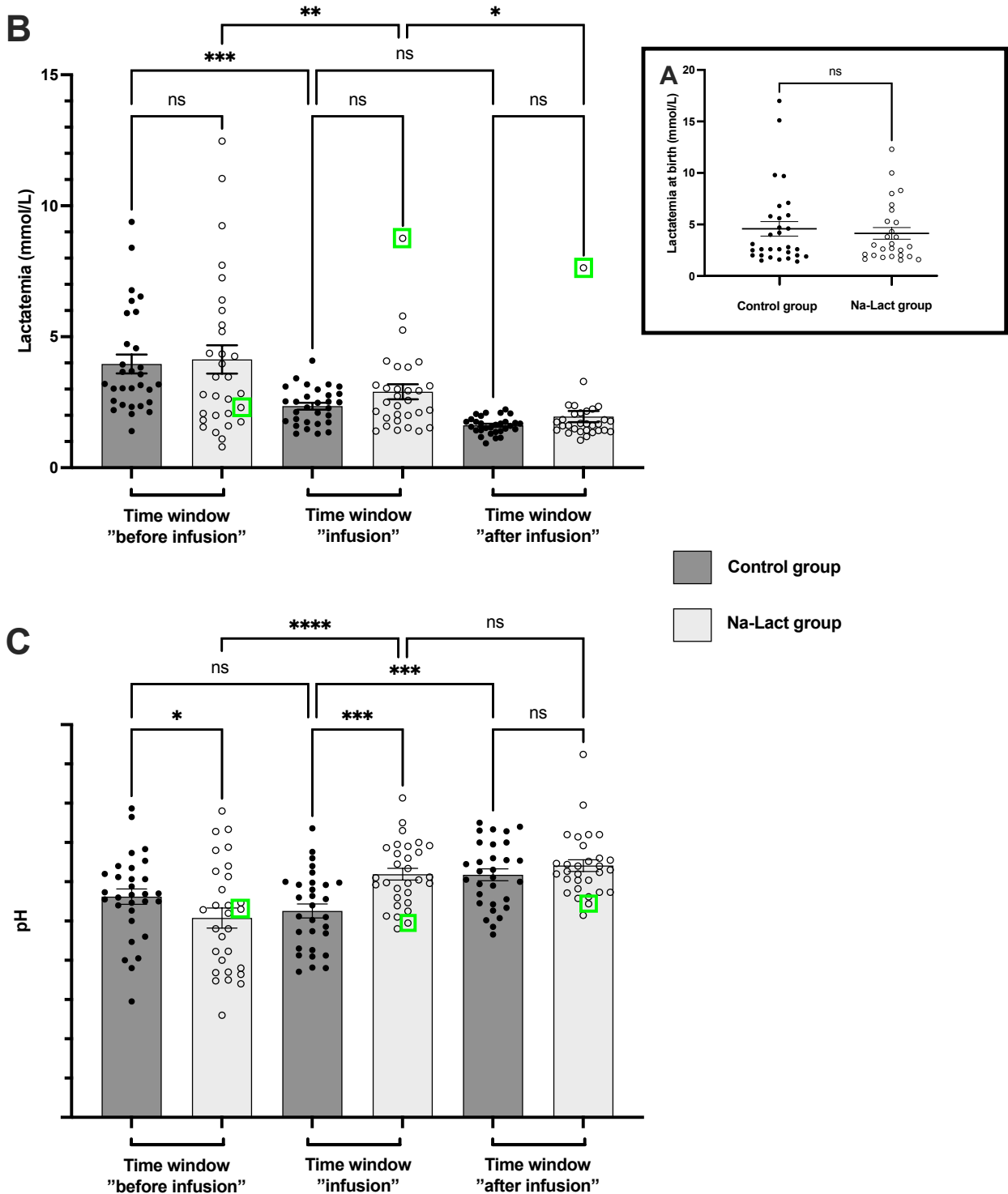


Figure 1: **A:** Lactatemia of the cohort at birth. **B:** Evolution of lactatemia after birth. Three different time windows after birth were determined: before, during and after sodium L-lactate infusion. The same time periods after birth were used to analyze the data of the control group. **C:** Evolution of blood pH after birth. Same time periods after birth than the one used in **B**. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ and ****: $p < 0.0001$. ns: not significant. Green square: data from patient number 29, who presented a major increase in lactatemia during and after the sodium L-lactate infusion, concomitantly with a hemodynamic deterioration in a context of septic shock at 3 ½ days of life.

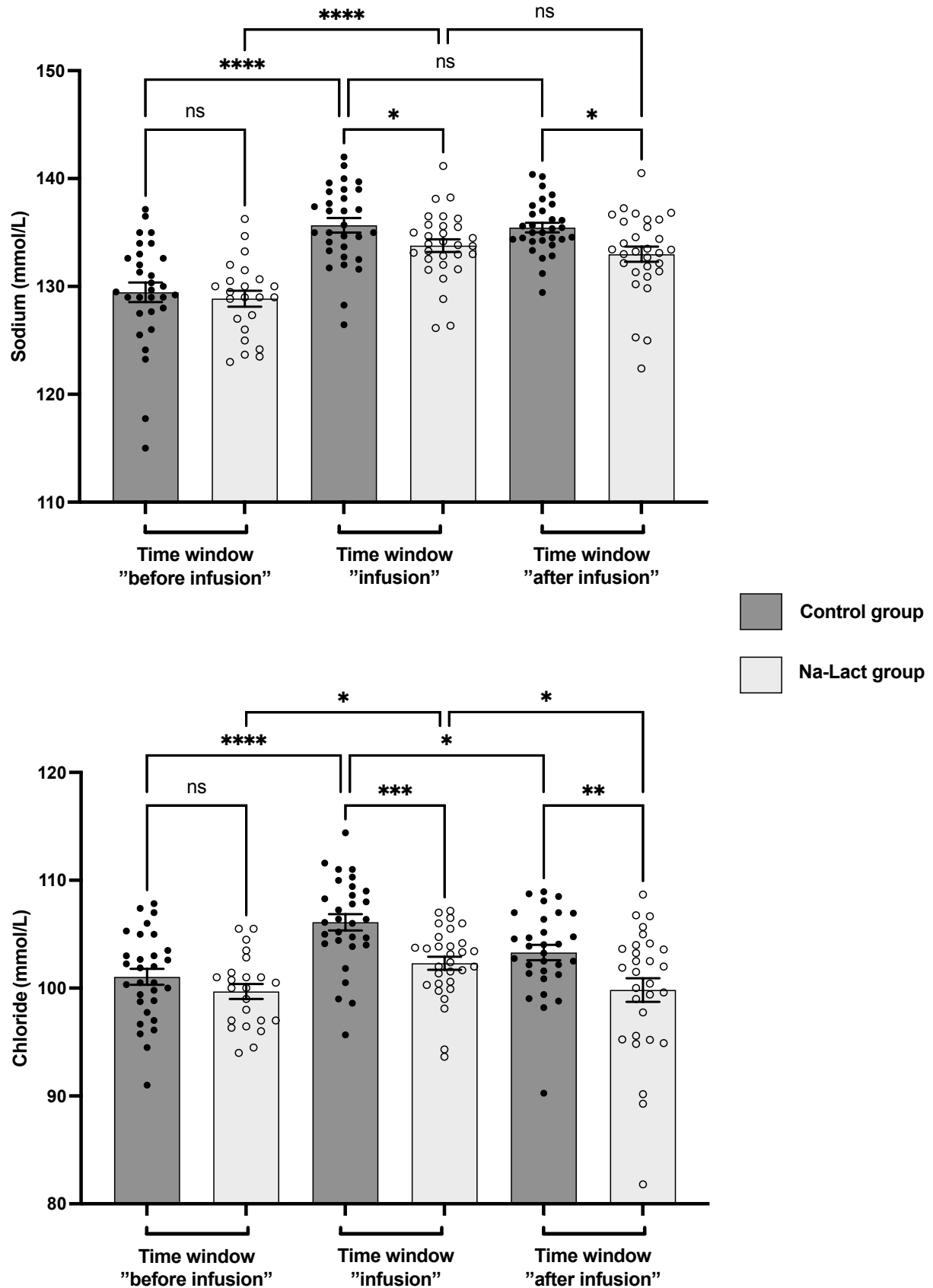


Figure 2: A: Evolution of natremia after birth. Three different time windows after birth were determined: before, during and after sodium L-lactate infusion. The same time periods after birth were used to analyze the data of the control group. **B:** Evolution of chloremia after birth (same time periods after birth than the one used in A). *Significantly different. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ and ****: $p < 0.0001$. ns: not significant.

Suppl Figure 6 shows pH values in the different subgroups for the Na-Lact group. In subgroup 3, in which pH values were the lowest in the first hours, sodium L-lactate infusion normalized blood pH during the infusion period itself. Bicarbonates and base excess values are presented in **Table 3** and in **Suppl Figures 7 and 8**, respectively. No gender difference was observed. Compared to control groups, bicarbonate and base excess levels were normalized faster when preterm neonates received sodium L-lactate (bicarbonate values were 19.5, 22.6 and 25.0 mmol/L in the Na-Lact group compared to 20.4, 19.9 and 24.9 mmol/L in the control group before, during and after infusion time periods, respectively, and base excess values were -7.95, -3.82 and -1.11 mEq/L in the Na-Lact group compared to -6.51, -7.27 and -1.48 mEq/L in the control group before, during and after infusion time periods, respectively).

Natremia and chloremia

Natremia and chloremia values before, during and after infusion time periods are presented **Figure 2A and B**, respectively, and in **Table 3**. In both groups, an increase in blood sodium levels was measured during the time window “infusion”. Subsequently, these values were upheld during the time window “after infusion”, in both groups. However, during and following the sodium L-lactate infusion periods, natremia was slightly lower in the Na-Lact group compared to values in the control group (133.8 and 133.0 mmol/L compared to 135.7 and 135.5 mmol/L, respectively).

Concerning chloremia, in the Na-Lact group, values were 99.7, 102.3 and 99.8 mmol/L before, during and after sodium L-lactate infusion whereas values were 101.0, 106.1 and 103.3 mmol/L during the corresponding time periods in the control group.

Discussion

Pre-clinical studies have demonstrated that lactate is an important cerebral energy

substrate and that administering sodium L-lactate solution significantly reduces brain lesion volumes and restores motor and cognitive functions following neonatal hypoxia-ischemia in rat pups.^{10,16,17,20} However, to elucidate the potential protective effects of lactate administration in the context of neonatal hypoxia-ischemia, it is necessary to first examine the kinetics of lactatemia and other blood parameters during the infusion of a sodium L-lactate solution in a control group. Since it is not feasible to obtain these data from a cohort of healthy newborns, we examined a set of blood parameters in 60 premature neonates during their first days of life, with 30 receiving standard parenteral nutrition (nutritional management of preterm infants is a major challenge for neonatologists)²¹ containing chloride saline solution and the remaining 30 receiving sodium L-lactate infusion as an alternative to sodium chloride to prevent detrimental hyperchloremic acidosis.

Birth initiates significant alterations in water and electrolyte levels. In preterm infants, disruptions of extracellular fluid and electrolyte balance are commonly observed, primarily due to the underdeveloped distal nephron, resulting in a diminished capacity to concentrate urine.²² Failure to manage water loss adequately places premature infants at risk of volume depletion and hyponatremia.²³ On the other hand, the immaturity of the proximal renal tubule in preterm infants can cause the decreased reabsorption of sodium and therefore hyponatremia.²⁴ Consequently, the management of fluid and electrolyte levels constitutes a crucial aspect of supportive care for preterm infants, typically administered through parenteral infusion. However, caution is warranted regarding the infusion of normal saline solution in premature infants, which contains equal concentrations of sodium and chloride. While chloride requirements are deemed equivalent to

sodium, the urinary excretion of chloride may be less efficient than that of sodium, thereby disrupting the acid-base balance and precipitating hyperchloremia-associated metabolic acidosis.^{25,26} Moreover, fluctuations in blood sodium levels have been correlated with increased morbidity and mortality rates among preterm infants, including incidents of intraventricular hemorrhage.²⁷⁻²⁹ Given these considerations, the potential therapeutic benefits of sodium L-lactate infusion for restoring fluid and electrolyte balance in preterm newborns have been investigated, comparing its characteristics with those of standard saline solution. While the management of natremia was comparable between the two groups, the use of sodium L-lactate avoided the increase in chloremia measured in the control groups, in which preterm newborns received sodium chloride in their parenteral nutrition. Since excess chloride is the primary cause of metabolic acidosis in neonates,¹⁹ replacing a portion of chloride with lactate in total parenteral nutrition has a positive impact on the blood parameters of preterm infants.

In our study, the perinatal clinical profiles of the cohort showed similarity between the two groups and were consistent with the prematurity state of newborns, encompassing conditions such as pre-eclampsia, intrauterine growth retardation, ulcerative necrotizing enterocolitis, surfactant deficiency, pulmonary hemorrhage, and bronchopulmonary dysplasia. Apgar scores at birth were initially low but rapidly surpassed 7 in both groups. Gender represents a significant variable in preterm outcomes, with male infants generally exhibiting poorer outcomes compared to females.³⁰ While the impact of sex on susceptibility to prematurity remains a topic of debate,³¹ sampling of participants was gender balanced in our study thus limiting bias. Moreover, data analysis was

conducted in a gender-balanced manner, revealing no significant differences in any parameters concerning sex. Given that a primary objective of this study was to monitor the kinetics of lactatemia during sodium L-lactate infusion, we carefully examined lactatemia levels at birth in our cohort, finding them to be similar between the two groups. Hyperlactatemia at birth, defined as blood lactate levels exceeding 2 mmol/l, was evident in 70% of the preterm infants in both groups. Among these, 30% exhibited moderate hyperlactatemia (blood lactate concentration between 2 and 5 mmol/L), and 40% exhibited severe hyperlactatemia (blood lactate concentration > 5 mmol/L). Subsequently, the impact of sodium L-lactate infusion on lactatemia and blood pH was meticulously monitored.

When comparing the Na-Lact and control groups, sodium L-lactate infusion facilitated the normalization of pH levels, along with enhancements in bicarbonate levels and base excess. When sodium lactate is infused into the body, it is metabolized into bicarbonate, an alkaline buffer that neutralizes excess acidity in the blood.³² In contrast, the standard saline solution was associated with a delay in pH normalization compared to sodium L-lactate. Sodium chloride contains 154 mEq/l of sodium and chloride, with a pH of 4.6. In contrast, sodium L-lactate 11.2% contains 999 mEq/l of sodium and lactate. This compound exerts an alkalinizing effect through the metabolism of lactate, which in turn reduces water dissociation and proton concentration.³² The improvement in blood bicarbonate levels following sodium L-lactate infusion contributed to pH elevation. Notably, bicarbonates in plasma and hemoglobin in erythrocytes constitute the two primary fetal and newborn buffering systems, each contributing approximately 35% to the total buffering capacity.³³ Carbon dioxide, a byproduct of the Krebs cycle (which can be fueled by lactate following its

conversion to pyruvate), diffuses across cell membranes into the blood. It is subsequently absorbed by erythrocytes and converted to H_2CO_3 and HCO_3^- , thereby buffering excess protons through blood bicarbonates. Base excess, a concept introduced by Siggaard-Andersen in 1960, serves as a respiratory-independent marker of metabolic acidosis/alkalosis and as an indicator of disorder severity.^{34,35} Values of base excess ranging from -2 to 2 mmol/L are considered as normal. Analyses indicated that the control group exhibited greater acidosis in the initial hours, with lower pH and base excess compared to the Na-Lact group (pH of 7.26 vs. 7.31 and base excess of -8.3 vs. -3.8).

Alternative infusion solutions have been explored in premature infants to circumvent chloride elevation and associated metabolic acidosis. Sodium bicarbonate infusion, though sparingly recommended due to adverse effects and limited efficacy evidence, has been utilized in select cases.³⁶ Sodium acetate has also been employed to reduce chloride intake and promote bicarbonate metabolism, addressing metabolic acidosis in preterm infants.³⁷⁻³⁹ In a randomized controlled trial, Peters et al. demonstrated that the chloride group exhibited greater acidosis with lower pH and base excess than the acetate group on day 5 of life (pH of 7.30 vs. 7.35 and BE of -5.7 vs. -2.1, respectively).³⁹ Therefore, based on our data following sodium L-lactate infusion, similar conclusions were drawn when comparing the use of sodium chloride in the parenteral nutrition to sodium acetate infusion. However, compared to these alternatives, sodium L-lactate presents distinct advantages. The therapeutic efficacy of sodium L-lactate has been substantiated across various clinical scenarios. Its utility has been demonstrated in the management of septic shock, wherein hyperosmolar sodium L-lactate resuscitation exhibited notable lactate clearance in severe pediatric sepsis

(intravenous bolus of 5 ml/kg, 10 min).⁴⁰ Additionally, sodium L-lactate has proven beneficial in cardiac post-surgery settings (intravenous infusion 2.5 ml/kg, 15 min)⁴¹ and traumatic brain injury cases (1.5 ml/kg, 15 min) ⁴². Moreover, preterm infants are prone to white matter brain injury, characterized by gliosis and white matter foci activation involving astrocytes and microglia.^{43,44} Glutamate excitotoxicity, a prominent feature in preterm newborn neuropathology, is implicated in this context.⁴⁴ Preliminary investigations in traumatic brain injury settings have indicated a favorable impact of hypertonic lactate on reducing both excitotoxicity and intracranial pressure.¹⁴ Finally, one major advantage to use sodium L-lactate relies on the potential role of lactate to serve as a cerebral energy substrate ^{6,11,45,46} and therefore as a potential neuroprotective agent.^{16,17,20,47,48} Exogenous lactate supply through sodium L-lactate infusion may serve as a preferential energy substrate for the premature brain, preserving cerebral glucose for the pentose phosphate pathway and enhancing the brain's redox equilibrium by sustaining glutathione levels. The contribution of sodium L-lactate infusion to cerebral energy metabolism maintenance and its role in oxidative stress regulation merit further investigation in prospective clinical studies.

Conclusion

The results of this retrospective clinical study indicate that, for premature infants, the infusion of sodium L-lactate does not lead to an increase in blood lactate levels, even in cases in which lactatemia was elevated at birth, while maintaining normal sodium levels. Instead, it facilitates a more rapid normalization of pH and prevents an increase in chloride levels. Furthermore, given the beneficial effects of lactate on brain metabolism, these findings suggest the potential for incorporating sodium L-lactate

infusion therapy into neonatal care practices. This opens promising avenues for its use in other clinical contexts, such as neonatal hypoxia-ischemia.

Acknowledgments

The present study was conducted in the context of the framework of the University of Bordeaux's IdEx 'Investments for the Future' program/RRR 'IMPACT.' This work received financial support from the French Agence Nationale de la Recherche (ANR) grant, BrainFuel reference (grant number ANR-21-CE44-0023 to A.K.B.S. and L.P.) and the Spark program. This work was also supported in part by the Fédération pour la Recherche sur le Cerveau (FRC) and by the Nouvelle Aquitaine region. The authors would like to thank Athénaïs Le Marchand for collecting the biological data, Aurore Capelli, clinical studies manager at the clinical research and innovation department of Bordeaux University Hospital, for her support in obtaining ethical clearance, and the entire team at the Bordeaux University Hospital Maternity Unit.

Fundings

This work received financial support from the French Agence Nationale de la Recherche (ANR) grant, BrainFuel reference (grant number ANR-21-CE44-0023 to A.K.B.S. and L.P.) and the Spark program. This work was also supported in part by the « Fédération pour la Recherche sur le Cerveau (FRC) and by the Nouvelle Aquitaine region.

Data availability

The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Author contributions

The first four authors and the last four authors contributed to the study conception and design. Data collection was performed by

Chloé Perrot and Marie-Christine Beauvieux. Analyses were performed by Ifrah Omar, Hélène Roumes and Anne-Karine Bouzier-Sore. The first draft of the manuscript was written by Hélène Roumes, Ifrah Omar and Anne-Karine Bouzier-Sore. All authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

Authors have no conflict of interest to declare.

Consent statement

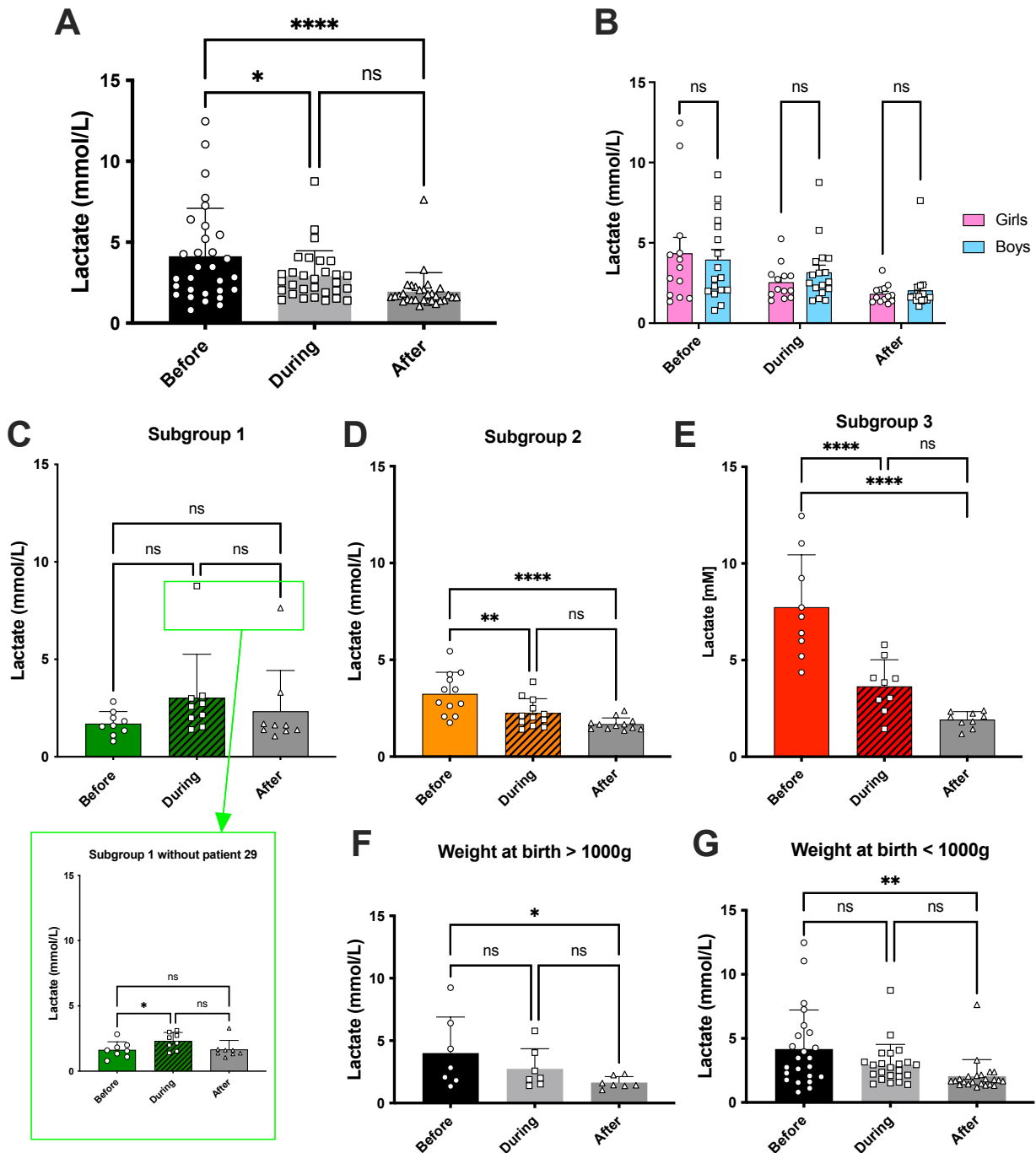
This study was approved by and followed the rules of the Human Ethical Research Committee of Bordeaux Hospital (CHUBX 2023/30, approval date May the 26th 2023). Letters of information and opposition right were sent to all parents.

References

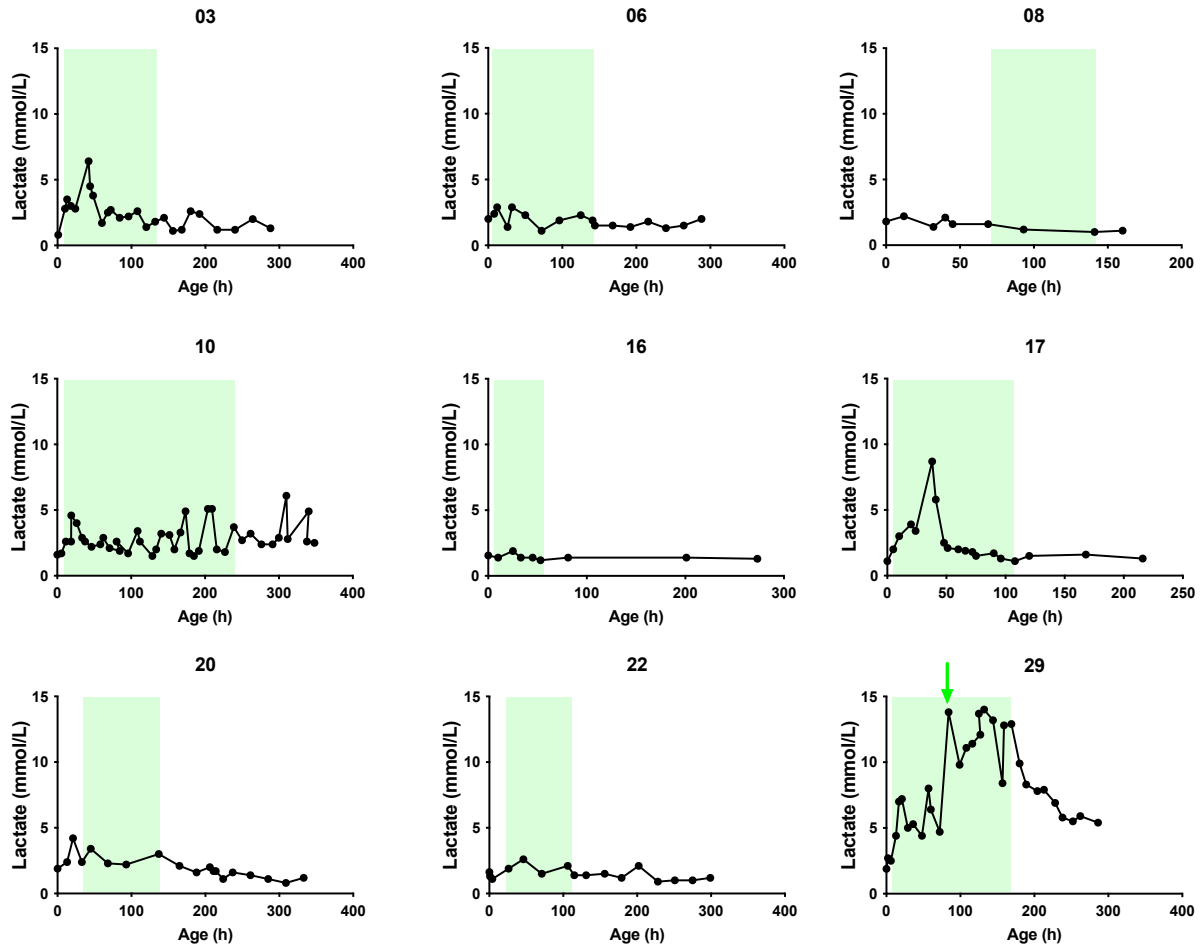
1. Vogel, J. P., Chawanpaiboon, S., Moller, A. B., Watananirun, K., Bonet, M. & Lumbiganon, P. The Global Epidemiology of Preterm Birth. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 52, 3-12 (2018).
2. Chawanpaiboon, S. et al. Global, Regional, and National Estimates of Levels of Preterm Birth in 2014: A Systematic Review and Modelling Analysis. *Lancet Glob Health* 7, e37-e46 (2019).
3. Symington, A. & Pinelli, J. Developmental Care for Promoting Development and Preventing Morbidity in Preterm Infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2006, CD001814 (2006).
4. Groenendaal, F., Lindemans, C., Uiterwaal, C. S. & de Vries, L. S. Early Arterial Lactate and Prediction of Outcome in Preterm Neonates Admitted to a Neonatal Intensive Care Unit. *Biol Neonate* 83, 171-176 (2003).
5. Zhu, W., Zhong, W., Qi, J., Yin, P., Wang, C. & Chang, L. Proton Magnetic Resonance Spectroscopy in Neonates with Hypoxic-Ischemic Injury and Its Prognostic Value. *Transl Res* 152, 225-232 (2008).
6. Pellerin, L. & Magistretti, P. J. Glutamate Uptake into Astrocytes Stimulates Aerobic Glycolysis: A Mechanism Coupling Neuronal Activity to Glucose Utilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 10625-10629 (1994).
7. Bouzier-Sore, A. K., Voisin, P., Canioni, P., Magistretti, P. J. & Pellerin, L. Lactate Is a Preferential Oxidative Energy Substrate over Glucose for Neurons in Culture. *J Cereb Blood Flow Metab* 23, 1298-1306 (2003).

8. Bouzier-Sore, A. K., Voisin, P., Bouchaud, V., Bezancon, E., Franconi, J. M. & Pellerin, L. Competition between Glucose and Lactate as Oxidative Energy Substrates in Both Neurons and Astrocytes: A Comparative Nmr Study. *Eur J Neurosci* 24, 1687-1694 (2006).
9. Bouzier, A. K., Thiaudiere, E., Biran, M., Rouland, R., Canioni, P. & Merle, M. The Metabolism of [3-(13)C]Lactate in the Rat Brain Is Specific of a Pyruvate Carboxylase-Deprived Compartment. *J Neurochem* 75, 480-486 (2000).
10. Roumes, H. et al. Lactate Transporters in the Rat Barrel Cortex Sustain Whisker-Dependent Bold Fmri Signal and Behavioral Performance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 118 (2021).
11. Roumes, H., Pellerin, L. & Bouzier-Sore, A. K. Astrocytes as Metabolic Suppliers to Support Neuronal Activity and Brain Functions. *Essays Biochem* 67, 27-37 (2023).
12. Patet, C. et al. Neuroenergetic Response to Prolonged Cerebral Glucose Depletion after Severe Brain Injury and the Role of Lactate. *J Neurotrauma* 32, 1560-1566 (2015).
13. Quintard, H. et al. Improvement of Neuroenergetics by Hypertonic Lactate Therapy in Patients with Traumatic Brain Injury Is Dependent on Baseline Cerebral Lactate/Pyruvate Ratio. *J Neurotrauma* 33, 681-687 (2016).
14. Bouzat, P. et al. Cerebral Metabolic Effects of Exogenous Lactate Supplementation on the Injured Human Brain. *Intensive care medicine* 40, 412-421 (2014).
15. Millet, A. et al. Hypertonic Sodium Lactate Reverses Brain Oxygenation and Metabolism Dysfunction after Traumatic Brain Injury. *Br J Anaesth* 120, 1295-1303 (2018).
16. Tassinari, I. D. & de Fraga, L. S. Potential Use of Lactate for the Treatment of Neonatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *Neural Regen Res* 17, 788-790 (2022).
17. Roumes, H. et al. Neuroprotective Role of Lactate in Rat Neonatal Hypoxia-Ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 41, 342-358 (2021).
18. Marikar, D., Babu, P. & Fine-Goulden, M. How to Interpret Lactate. *Arch Dis Child Educ Pract Ed* 106, 167-171 (2021).
19. Groh-Wargo, S., Ciaccia, A. & Moore, J. Neonatal Metabolic Acidosis: Effect of Chloride from Normal Saline Flushes. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 12, 159-161 (1988).
20. Tassinari, I. D. et al. Lactate Administration Reduces Brain Injury and Ameliorates Behavioral Outcomes Following Neonatal Hypoxia-Ischemia. *Neuroscience* 448, 191-205 (2020).
21. Iacobelli, S., Lapillonne, A., Boubred, F. & members, E. N. c. Early Postnatal Nutrition and Renal Consequences in Preterm Infants. *Pediatr Res* (2024).
22. Speller, A. M. & Moffat, D. B. Tubulo-Vascular Relationships in the Developing Kidney. *J Anat* 123, 487-500 (1977).
23. Iacobelli, S. & Guignard, J. P. Maturation of Glomerular Filtration Rate in Neonates and Infants: An Overview. *Pediatr Nephrol* 36, 1439-1446 (2021).
24. Hao, T. K. Prevalence and Risk Factors for Hyponatremia in Preterm Infants. *Open Access Maced J Med Sci* 7, 3201-3204 (2019).
25. Jochum, F. et al. Espghan/Espen/Espr/Cspen Guidelines on Pediatric Parenteral Nutrition: Fluid and Electrolytes. *Clin Nutr* 37, 2344-2353 (2018).
26. Iacobelli, S., Kermorvant-Duchemin, E., Bonsante, F., Lapillonne, A. & Gouyon, J. B. Chloride Balance in Preterm Infants During the First Week of Life. *Int J Pediatr* 2012, 931597 (2012).
27. Baraton, L., Ancel, P. Y., Flamant, C., Orsonneau, J. L., Darmaun, D. & Roze, J. C. Impact of Changes in Serum Sodium Levels on 2-Year Neurologic Outcomes for Very Preterm Neonates. *Pediatrics* 124, e655-661 (2009).
28. Dalton, J., Dechert, R. E. & Sarkar, S. Assessment of Association between Rapid Fluctuations in Serum Sodium and Intraventricular Hemorrhage in Hypertonic Preterm Infants. *Am J Perinatol* 32, 795-802 (2015).
29. Spath, C., Sjostrom, E. S., Ahlsson, F., Agren, J. & Domellof, M. Sodium Supply Influences Plasma Sodium Concentration and the Risks of Hyper- and Hyponatremia in Extremely Preterm Infants. *Pediatr Res* 81, 455-460 (2017).
30. O'Driscoll, D. N., McGovern, M., Greene, C. M. & Molloy, E. J. Gender Disparities in Preterm Neonatal Outcomes. *Acta Paediatr* (2018).
31. Christians, J. K. et al. Sex Differences in the Effects of Prematurity and/or Low Birthweight on Neurodevelopmental Outcomes: Systematic Review and Meta-Analyses. *Biol Sex Differ* 14, 47 (2023).
32. Duburcq, T. et al. Hypertonic Sodium Lactate Improves Fluid Balance and Hemodynamics in Porcine Endotoxic Shock. *Crit Care* 18, 467 (2014).
33. Olofsson, P. Umbilical Cord Ph, Blood Gases, and Lactate at Birth: Normal Values, Interpretation, and Clinical Utility. *Am J Obstet Gynecol* 228, S1222-S1240 (2023).
34. Langer, T., Brusatori, S. & Gattinoni, L. Understanding Base Excess (Be): Merits and Pitfalls. *Intensive Care Med* 48, 1080-1083 (2022).
35. Severinghaus, J. W. & Astrup, P. B. History of Blood Gas Analysis. II. Ph and Acid-Base Balance Measurements. *J Clin Monit* 1, 259-277 (1985).
36. Massenzi, L., Aufieri, R., Donno, S., Agostino, R., Dotta, A. & Neonatal Pharmacotherapy Study Group of the Italian Society of, N. Use of Intravenous Sodium Bicarbonate in Neonatal Intensive Care Units in Italy: A Nationwide Survey. *Ital J Pediatr* 47, 63 (2021).
37. Ekblad, H., Kero, P. & Takala, J. Slow Sodium Acetate Infusion in the Correction of Metabolic Acidosis in Premature Infants. *Am J Dis Child* 139, 708-710 (1985).
38. Richards, C. E., Drayton, M., Jenkins, H. & Peters, T. J. Effect of Different Chloride Infusion Rates on Plasma Base Excess During Neonatal Parenteral Nutrition. *Acta Paediatr* 82, 678-682 (1993).

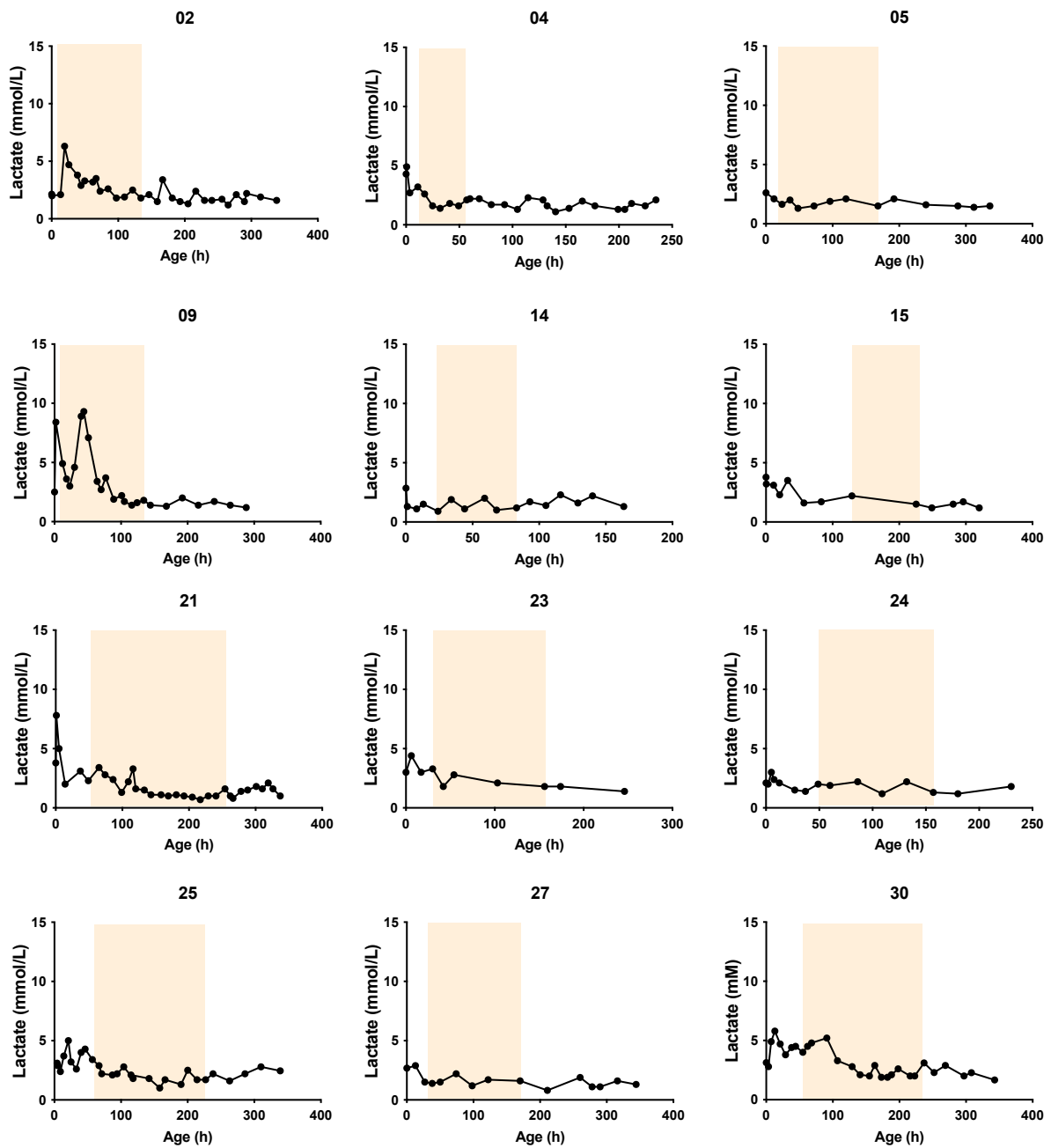
39. Peters, O., Ryan, S., Matthew, L., Cheng, K. & Lunn, J. Randomised Controlled Trial of Acetate in Preterm Neonates Receiving Parenteral Nutrition. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 77, F12-15 (1997).
40. Junarsa, N., Somasetia, D. & Sambas, D. Impact of Hyperosmolar Sodium-Lactate Resuscitation on Lactate Clearance in Pediatric Severe Sepsis. *American Journal of Epidemiology and infectious disease* 3, 76-79 (2015).
41. Mustafa, I. & Lerverve, X. M. Metabolic and Hemodynamic Effects of Hypertonic Solutions: Sodium-Lactate Versus Sodium Chloride Infusion in Postoperative Patients. *Shock* 18, 306-310 (2002).
42. Ichai, C. et al. Sodium Lactate Versus Mannitol in the Treatment of Intracranial Hypertensive Episodes in Severe Traumatic Brain-Injured Patients. *Intensive care medicine* 35, 471-479 (2009).
43. Banker, B. Q. & Larroche, J. C. Periventricular Leukomalacia of Infancy. A Form of Neonatal Anoxic Encephalopathy. *Arch Neurol* 7, 386-410 (1962).
44. Wisnowski, J. L. et al. Altered Glutamatergic Metabolism Associated with Punctate White Matter Lesions in Preterm Infants. *PLoS One* 8, e56880 (2013).
45. Karagiannis, A. et al. Lactate Is an Energy Substrate for Rodent Cortical Neurons and Enhances Their Firing Activity. *Elife* 10 (2021).
46. Wyss, M. T., Jolivet, R., Buck, A., Magistretti, P. J. & Weber, B. In Vivo Evidence for Lactate as a Neuronal Energy Source. *J Neurosci* 31, 7477-7485 (2011).
47. Plourde, G. et al. Neuroprotective Effects of Lactate and Ketone Bodies in Acute Brain Injury. *J Cereb Blood Flow Metab* in press (2024).
48. Buscemi, L., Blochet, C., Magistretti, P. J. & Hirt, L. Hydroxycarboxylic Acid Receptor 1 and Neuroprotection in a Mouse Model of Cerebral Ischemia-Reperfusion. *Front Physiol* 12, 689239 (2021).



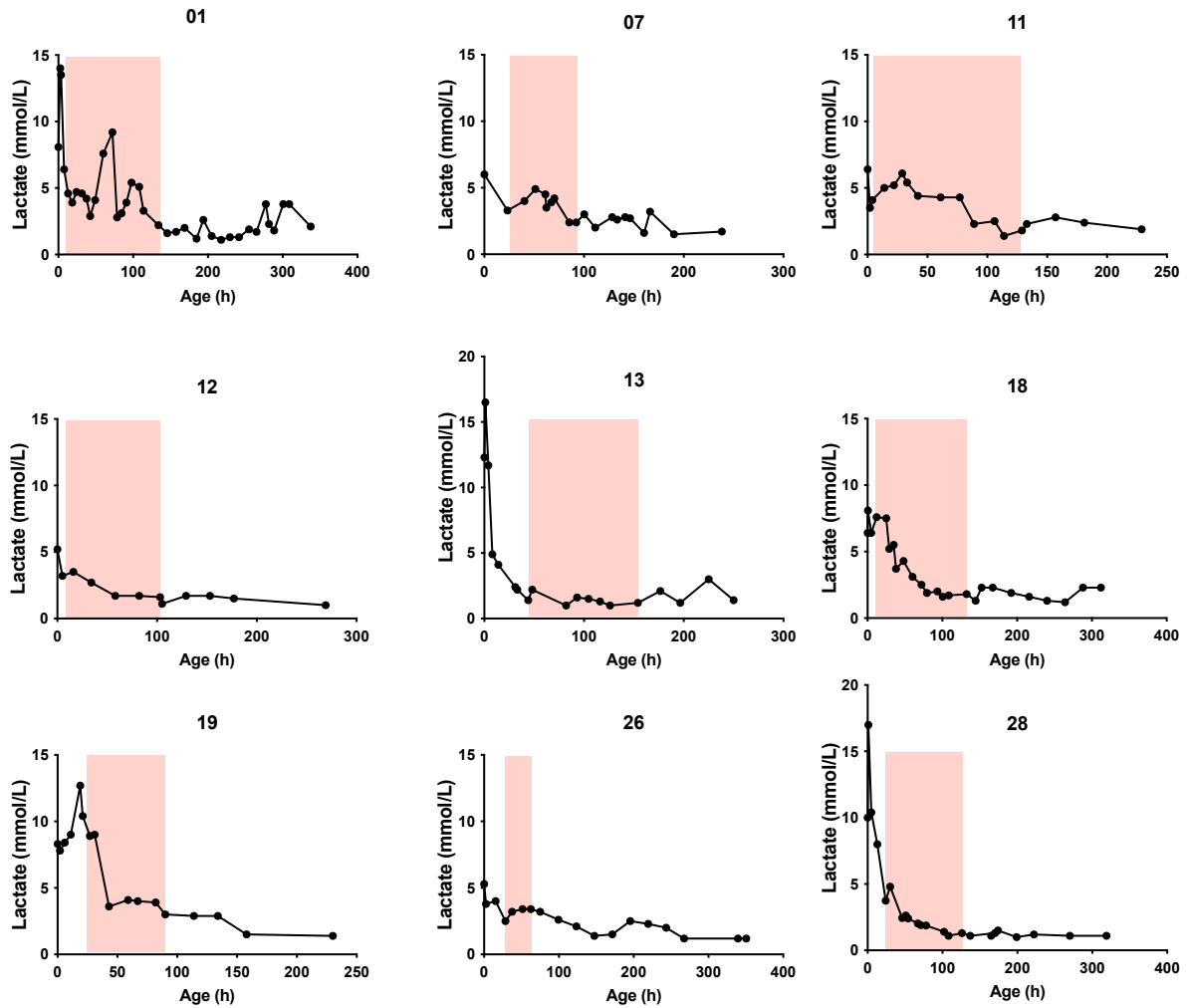
Supplementary Figure 1: Evolution of lactatemia before, during and after sodium L-lactate infusion for all preterm newborns who received sodium L-lactate (**A**, $n = 30$) or according to gender distribution (**B**). **C**: Evolution of lactatemia after birth before, during and after sodium L-lactate infusion for the preterm newborns with low lactatemia at birth (subgroup 1, blood lactate concentration < 2 mmol/L, $n = 9$). **D**: Evolution of lactatemia after birth before, during and after sodium L-lactate infusion for the preterm newborns with moderate hyperlactatemia at birth (subgroup 2, $2 \leq$ lactatemia ≤ 5 mmol/L, $n = 12$). **E**: Evolution of lactatemia after birth before, during and after sodium L-lactate infusion for the preterm newborns with high lactatemia at birth (subgroup 3, lactatemia > 5 mmol/L, $n = 9$). *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, and ****: $p < 0.0001$. ns: non significative. Green square: data from patient number 29, who presented a major increase in lactatemia during and after the sodium L-lactate infusion, concomitantly with a hemodynamic deterioration in a context of septic shock at 3 ½ days of life, were removed in the green framed graphic.



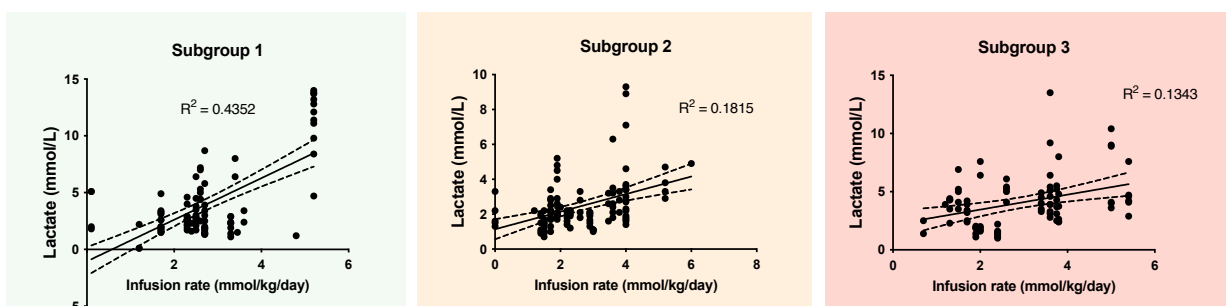
Supplementary Figure 2: Kinetics of lactatemia for each patient in the subgroup 1 of the Na-Lact group. The colored area corresponds to the time period during which sodium L-lactate was infused. Patient number is indicated above each graph. Green arrow: diagnosis of hemodynamic deterioration and septic shock in patient 29 at 84h of life



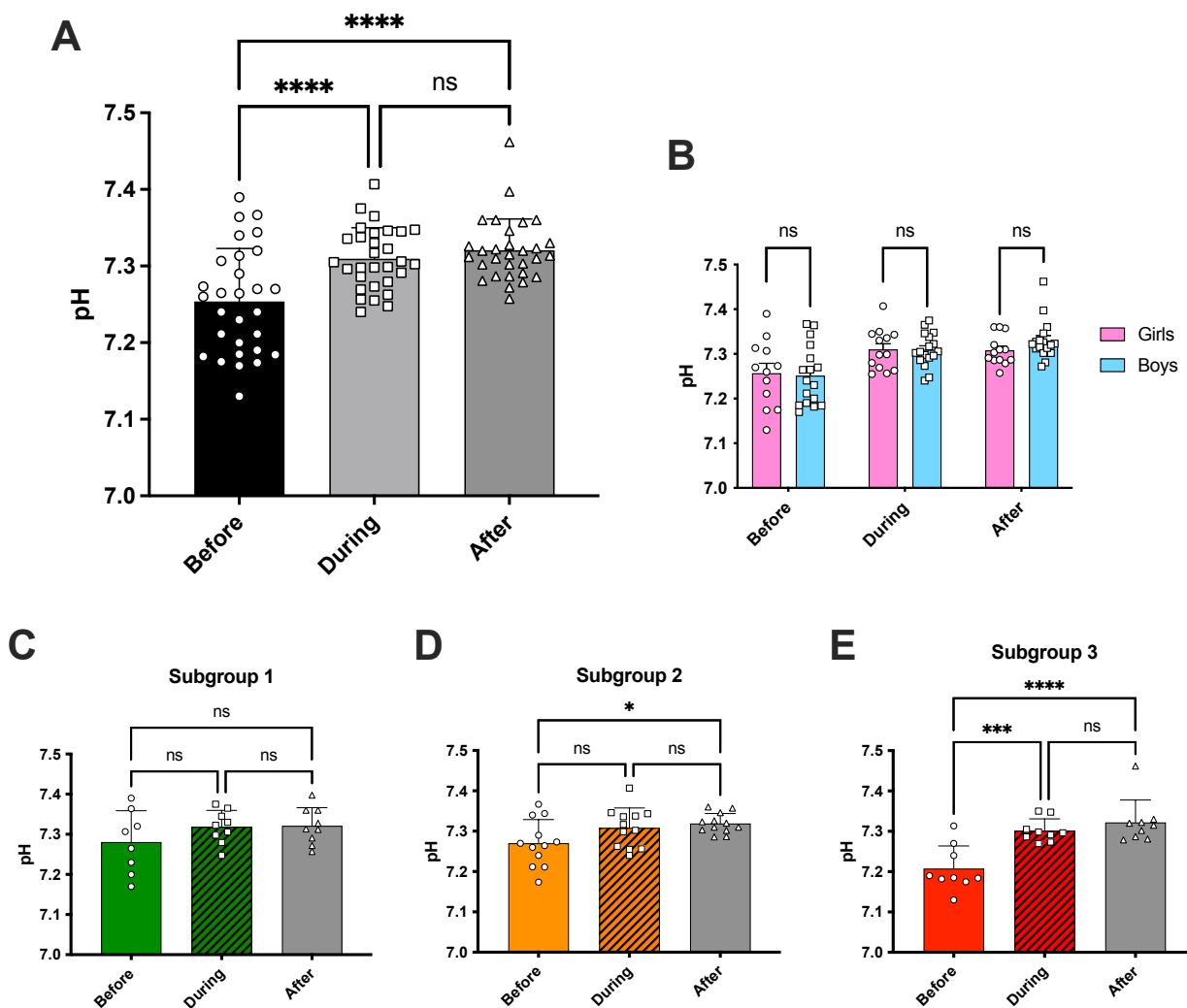
Supplementary Figure 3: Kinetics of lactatemia for each patient in the subgroup 2 of the Na-Lact group. The colored area corresponds to the time period during which sodium L-lactate was infused. Patient number is indicated above each graph.



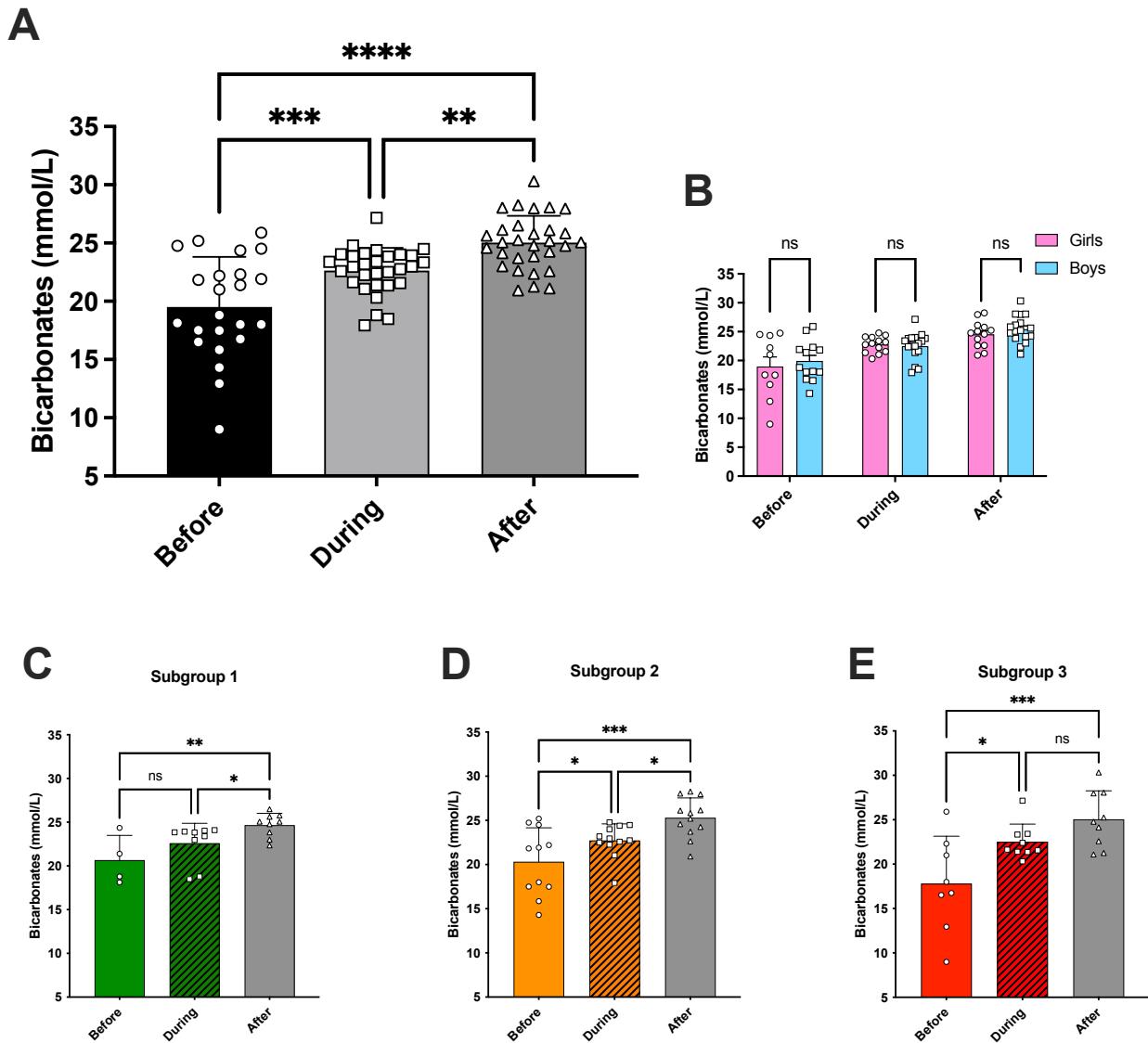
Supplementary Figure 4: Kinetics of lactatemia for each patient in the subgroup 3 of the Na-Lact group. The colored area corresponds to the time period during which sodium L-lactate was infused. Patient number is indicated above each graph.



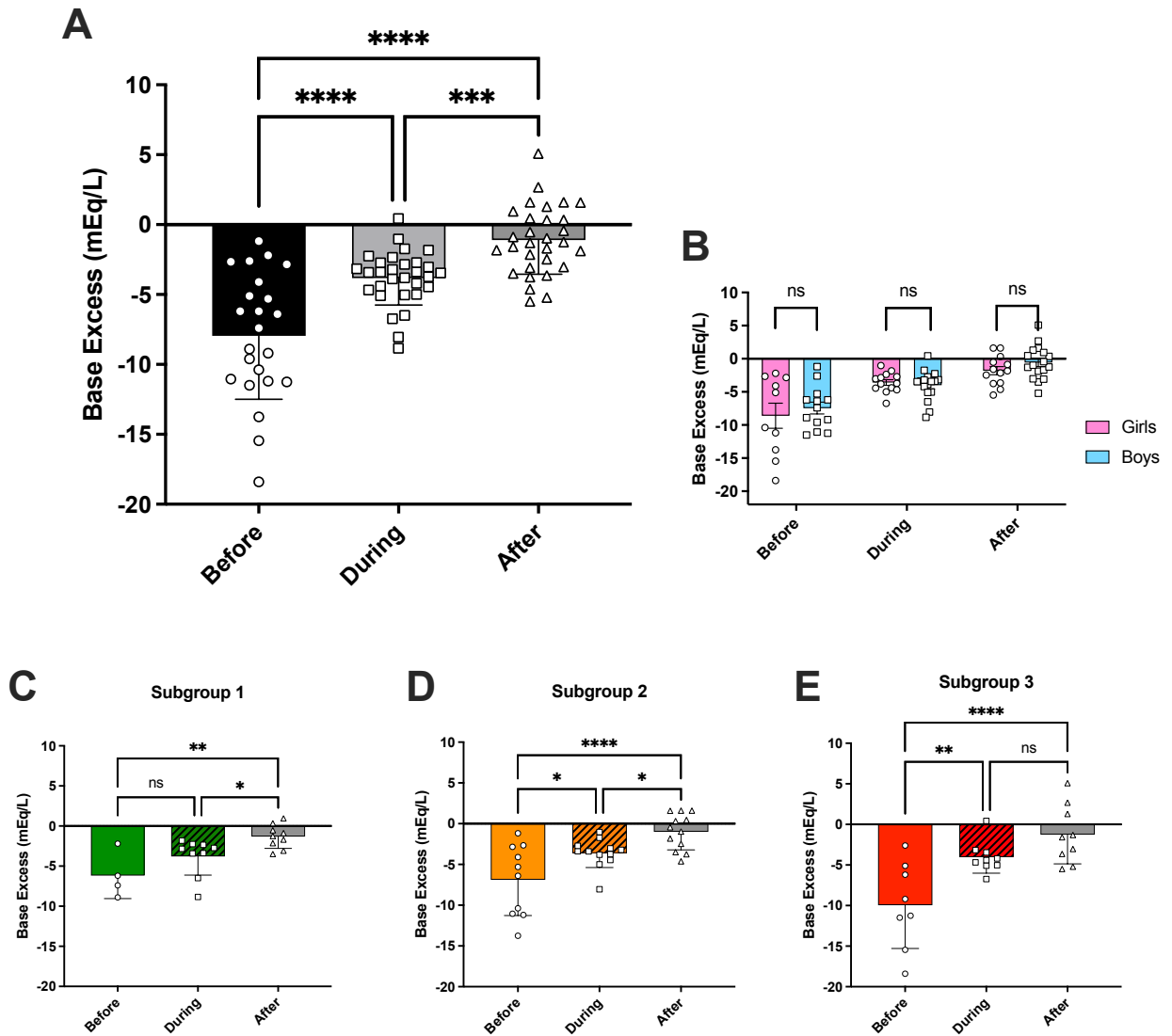
Supplementary Figure 5: Correlations between blood lactate concentrations (mmol/L) and infusion rates of the sodium L-lactate solution (mmol/kg/day) for each subgroup. Correlation coefficients are indicated on graphs.



Supplementary Figure 6: Evolution of blood pH before, during and after sodium L-lactate infusion for all preterm newborns who received sodium L-lactate (**A**, $n = 30$) or according to gender distribution (**B**). **C:** Evolution of blood pH after birth before, during and after sodium L-lactate infusion for the preterm newborns with low lactatemia at birth (subgroup 1, blood lactate concentration < 2 mmol/L, $n = 9$). **D:** Evolution of blood pH after birth before, during and after sodium L-lactate infusion for the preterm newborns with moderate hyperlactatemia at birth (subgroup 2, $2 \leq$ lactatemia ≤ 5 mmol/L, $n = 12$). **E:** Evolution of blood pH after birth before, during and after sodium L-lactate infusion for the preterm newborns with high lactatemia at birth (subgroup 3, lactatemia > 5 mmol/L, $n = 9$). *: $p < 0.05$, ***: $p < 0.001$, and ****: $p < 0.0001$. ns: not significant.



Supplementary Figure 7: Evolution of bicarbonates before, during and after sodium L-lactate infusion for all preterm newborns who received sodium L-lactate (**A**) or according to gender distribution (**B**). **C:** Evolution of bicarbonates after birth before, during and after sodium L-lactate infusion in the subgroup 1. **D:** Evolution of bicarbonates after birth before, during and after sodium L-lactate infusion in the subgroup 2. **E:** Evolution of bicarbonates after birth before, during and after sodium L-lactate infusion in the subgroup 3. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, and ****: $p < 0.0001$. ns: not significant.



Supplementary Figure 8: Evolution of base excess before, during and after sodium L-lactate infusion for all preterm newborns who received sodium L-lactate (**A**) or according to gender distribution (**B**). **C:** Evolution of base excess after birth before, during and after sodium L-lactate infusion in the subgroup 1. **D:** Evolution of base excess after birth before, during and after sodium L-lactate infusion in the subgroup 2. **E:** Evolution of base excess after birth before, during and after sodium L-lactate infusion in the subgroup 3. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, and ****: $p < 0.0001$. ns: not significant.

Chapitre 6 : Conclusion et perspectives

L'hypoxie-ischémie néonatale (HIN) représente un problème de santé publique majeur, avec une incidence de 1 à 6 pour 1 000 naissances, associée à une mortalité élevée et à des séquelles neurologiques significatives, notamment des troubles cognitifs et moteurs chez les nouveau-nés. Elle se caractérise par une réduction du flux sanguin cérébral, entraînant une diminution de l'apport en oxygène (O₂) et en nutriments énergétiques, ce qui entraîne excitotoxicité, stress oxydatif, défaillance des pompes ATP-dépendantes, et, en dernier ressort, mort cellulaire (Davidson et al., 2015).

Malgré les progrès en soins intensifs néonataux au cours des trente dernières années, l'incidence de l'HIN reste malheureusement stable. À ce jour, l'hypothermie thérapeutique (HT) modérée et contrôlée demeure la seule intervention permettant d'atténuer les effets de l'HIN. Bien que cette approche ait démontré un effet neuroprotecteur à court terme, en réduisant le métabolisme énergétique cérébral, l'excitotoxicité, la production de radicaux libres et l'œdème cytotoxique secondaire (Baumann et al., 2009; Erecinska et al., 2003; Srinivasakumar et al., 2013; Wassink et al., 2014), son efficacité à long terme reste limitée et 44 % et 53 % des nouveau-nés atteints d'HIN ne répondent pas favorablement à ce traitement (Wu & Gonzalez, 2015). Il est donc essentiel de développer de stratégies thérapeutiques complémentaires pour améliorer l'efficacité de l'HT et renforcer la neuroprotection chez les nouveau-nés atteints d'HIN.

Le lactate a longtemps été considéré comme un simple déchet de la glycolyse anaérobie. Cependant, au cours des trente dernières années, cette perception a évolué, et il est désormais reconnu comme un substrat énergétique essentiel pour le système nerveux central (SNC), en particulier pour les neurones. Des études ont montré que l'administration de lactate pourrait constituer une approche thérapeutique prometteuse dans des modèles d'accident vasculaire cérébral (Berthet et al., 2009; Buscemi et al., 2020) et de traumatismes crâniens (Holloway et al., 2007). Notre équipe a été la première à démontrer l'effet neuroprotecteur du lactate dans un modèle d'HIN chez le rat (Roumes et al., 2021). Nos résultats indiquent que trois injections successives de lactate (534 mM, 4 µl/g en intrapéritonéale (i.p.) à 3 h, 24 h et 48 h après l'HIN) réduisent les volumes lésionnels cérébraux et améliorent les fonctions motrices et cognitives (Roumes et al., 2021). Ces données ont ensuite été confirmées par deux autres études à court et long-terme (Tassinari et al., 2020, 2024).

À notre connaissance, aucune étude préclinique ni clinique n'avait encore évalué la combinaison du lactate avec l'HT dans le cadre de l'HIN.

L'objectif principal de cette étude était de déterminer si l'administration de lactate serait compatible avec l'HT après un accident d'HIN, chez le rat, et de comparer les effets de cette combinaison thérapeutique à ceux de l'HT seule.

Le modèle de Rice et Vannucci a été utilisé pour reproduire l'HIN de manière préclinique chez le rat. Ce modèle consiste à ligaturer l'artère carotide commune gauche des rats, puis à les exposer pendant 2 h dans une chambre hypoxique à 8 % d'O₂ (Rice et al., 1981). Fiable et reproductible, ce protocole est appliqué chez des rats âgés de 7 jours (P7), un stade de développement cérébral équivalent à celui d'un nouveau-né humain à terme. Les volumes lésionnels ont été mesurés aux stades P7, P9 et P30, et la sévérité de l'œdème a été évaluée à P7. Des tests comportementaux ont été menés pour évaluer les fonctions motrices et cognitives des rats entre P8 et P51, en complément des analyses d'imagerie. Des analyses par Western blot, histologie et immunohistochimie ont également été effectuées pour approfondir la compréhension des voies impliquées dans la neuroprotection. Enfin, l'impact de l'administration de lactate sur la neuro-inflammation a été évalué *in vitro* sur des cultures primaires de microglies.

Dans un premier temps, j'ai mis au point un protocole d'hypothermie dans un modèle d'HIN chez le rat afin de déterminer les conditions optimales de traitement. Pour cela j'ai comparé les effets de trois durées d'HT (2 h, 3 h, et 5 h) dans des conditions environnementales constantes, en utilisant le même modèle d'HIN. L'objectif de ce travail était d'identifier la durée d'hypothermie la plus efficace pour maximiser les effets neuroprotecteurs tout en minimisant les effets secondaires sur le bien-être animal.

Nos résultats ont montré que notre modèle d'HIN induit des lésions cérébrales importantes avec des déficits moteurs et cognitifs conséquents chez les groupes contrôles (HIC). Un traitement par HT modérée de 2 h (HIH2), avec une température rectale maintenue à 32 °C, a suffi pour induire une neuroprotection après une lésion hypoxique-ischémique néonatale. En effet, une hypothermie de 2 h a permis une réduction des volumes lésionnels cérébraux à court et à long terme, a amélioré les performances fonctionnelles par une diminution des dommages neurologiques et une préservation de la mémoire à long terme et a réduit l'activation microgliale après l'HIN. En revanche, une prolongation de l'hypothermie, dans les mêmes conditions, n'a pas renforcé cette neuroprotection et a même montré des effets délétères avec 5 h d'hypothermie. Nous avons également déterminé qu'initier l'hypothermie une heure après l'HIN constitue une fenêtre temporelle optimale pour observer ses effets neuroprotecteurs. L'ensemble des résultats obtenus dans la première partie de cette thèse a permis, pour la première fois, de comparer trois durées d'hypothermie dans des conditions environnementales identiques et sur le même modèle d'HIN.

⇒ Ce travail est présenté dans un article intitulé « Optimizing therapeutic hypothermia conditions in a translational preclinical model of neonatal hypoxia-ischemia in rats » actuellement soumis au journal *Neurotherapeutics*.

Dans un second temps, nous avons évalué le potentiel thérapeutique des injections de lactate couplées à 2 h d'HT dans le contexte de l'HIN, et comparé les effets de cette combinaison à ceux de l'HT seule.

Nos résultats montrent qu'à court terme (P9), la combinaison thérapeutique (groupe HI3L+H2) a entraîné des volumes lésionnels significativement plus faibles par rapport à l'HT seule (groupe HIH2). À long terme, cette réduction des lésions cérébrales était encore plus prononcée pour le groupe HI3L+H2. Sur le plan comportemental, les fonctions motrices et cognitives ont été préservées dans le groupe HI3L+H2. Nous n'avons pu mettre en évidence qu'une différence significative entre les différentes stratégies thérapeutiques pour le test de reconnaissance du nouvel objet, les animaux du groupe HI3L+H2 étant ceux qui récupéraient au mieux la mémoire. Nos résultats ont également montré que l'administration de lactate combinée à l'HT a induit une réduction significative de l'activation microgliale dans le cortex et l'hippocampe 48 h après HIN, comparativement à l'HT seule. Selon nos résultats in vitro, bien qu'encore préliminaires et à interpréter avec prudence, l'administration de lactate combinée à l'HT pourrait moduler les phénotypes microgliaux en favorisant l'acquisition d'un phénotype anti-inflammatoire et réparateur. Dans ce travail, nous avons également exploré la fenêtre optimale d'administration du lactate, montrant que son injection avant la phase d'hypothermie maximise les effets neuroprotecteurs en améliorant les performances motrices et cognitives et en réduisant les volumes lésionnels.

⇒ Nos résultats indiquent que l'administration de lactate combinée à l'HT conserve un effet neuroprotecteur et permet même de renforcer cette neuroprotection. Ces données feront l'objet d'un article.

Dans un troisième temps, et en vue de permettre un transfert vers la clinique, l'innocuité de l'administration de lactate sur les paramètres sanguins des nouveau-nés a été évaluée à travers une étude rétrospective chez des prématurés ayant reçu une perfusion de L-lactate de sodium.

Les résultats de cette étude clinique rétrospective ont montré que, chez les nourrissons prématurés dont les poids à la naissance allaient de 500 à 1000g, la perfusion de L-lactate de sodium n'augmente pas les taux sanguins de lactate, même en présence de lactatémie élevée à la naissance, tout en maintenant des niveaux de sodium dans les normes. En outre, comparé à l'utilisation classique de NaCl, la perfusion de L-lactate de sodium favorise une normalisation plus rapide du pH et empêche une augmentation des niveaux de chlorure sanguin. Bien que cette étude n'ait pas inclus d'imagerie cérébrale pour évaluer les effets potentiels du L-lactate sur le métabolisme cérébral des prématurés dans les périodes pré- et post-perfusion, cela n'exclut pas qu'en plus de son rôle de correcteur d'acidose métabolique, l'infusion de L-lactate de sodium puisse offrir des effets neuroprotecteurs sur le long terme pour ces grands prématurés, notamment une réduction de l'angoisse ou de la dépression, des symptômes souvent observée à l'adolescence chez les prématurés. Il faudrait bien entendu faire une étude clinique pour mettre ces effets en évidence.

⇒ L'inclusion de cette approche dans les pratiques de soins néonataux pourrait être envisagée et ouvre des perspectives prometteuses pour son application dans d'autres contextes cliniques, tels que l'HIN. Ce travail a fait l'objet d'un article intitulé « Positive impact of sodium L-lactate supplementation on blood biomarkers in preterm newborns » soumis et actuellement en cours de révision dans le journal *Pediatric Research*.

En conclusion : L'originalité de ma thèse réside, d'une part, sur la diversité et la complémentarité des techniques utilisées. En effet, l'association de l'IRM, des tests comportementaux, de l'analyse immunohistochimique et des expériences *in vitro* en culture cellulaire est peu fréquente dans la littérature. D'autre part, l'approche innovante de la combinaison thérapeutique du lactate et de l'HT pour traiter l'HIN a permis, grâce à l'ensemble de ces techniques, de démontrer pour la première fois l'efficacité de cette stratégie thérapeutique combinée.

La prochaine étape visera à évaluer l'innocuité et l'efficacité de la perfusion de L-lactate de sodium associée à l'HT chez des nouveau-nés ayant subi un épisode d'HIN. Une demande d'autorisation est en cours auprès du comité d'éthique, et un financement a été obtenu pour conduire cette étude sur 14 nouveau-nés.

Étant donné les difficultés d'accès à l'équipement pour la mise en œuvre de l'HT dans de nombreux hôpitaux des pays à faible et moyen revenu, il serait pertinent d'envisager l'innocuité et l'efficacité de la perfusion de L-lactate de sodium seule pour les nouveau-nés ayant subi une HIN dans ces contextes. L'évaluation de l'efficacité d'un traitement uniquement par injection de lactate est d'autant plus pertinente que la mise en place de l'HT doit être faite dans les 6 h après l'accident d'HIN, ce qui n'est pas toujours possible, même dans les pays développés ayant le matériel pour la mise en place de cette thérapie. Une étude approfondie avec un suivi longitudinal sera bien entendu nécessaire pour déterminer si la perfusion de L-lactate de sodium seule pourrait ainsi être envisagée comme une alternative thérapeutique à l'HT pour les nouveau-nés souffrant d'HIN dans les contextes à ressources limitées.

Enfin, des recherches complémentaires seront aussi nécessaires pour explorer les rôles variés du lactate dans le SNC, en conditions physiologiques comme pathologiques. Ces études devraient inclure non seulement les cas d'HIN et d'AVC, mais aussi des maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer. Les mécanismes d'action du lactate, notamment par l'intermédiaire de l'activation de son récepteur GPR81 ou la lactylation des histones, devront être clarifiés afin de mieux comprendre son mode d'action et d'envisager l'administration de lactate comme une approche thérapeutique potentielle dans divers contextes neurologiques.

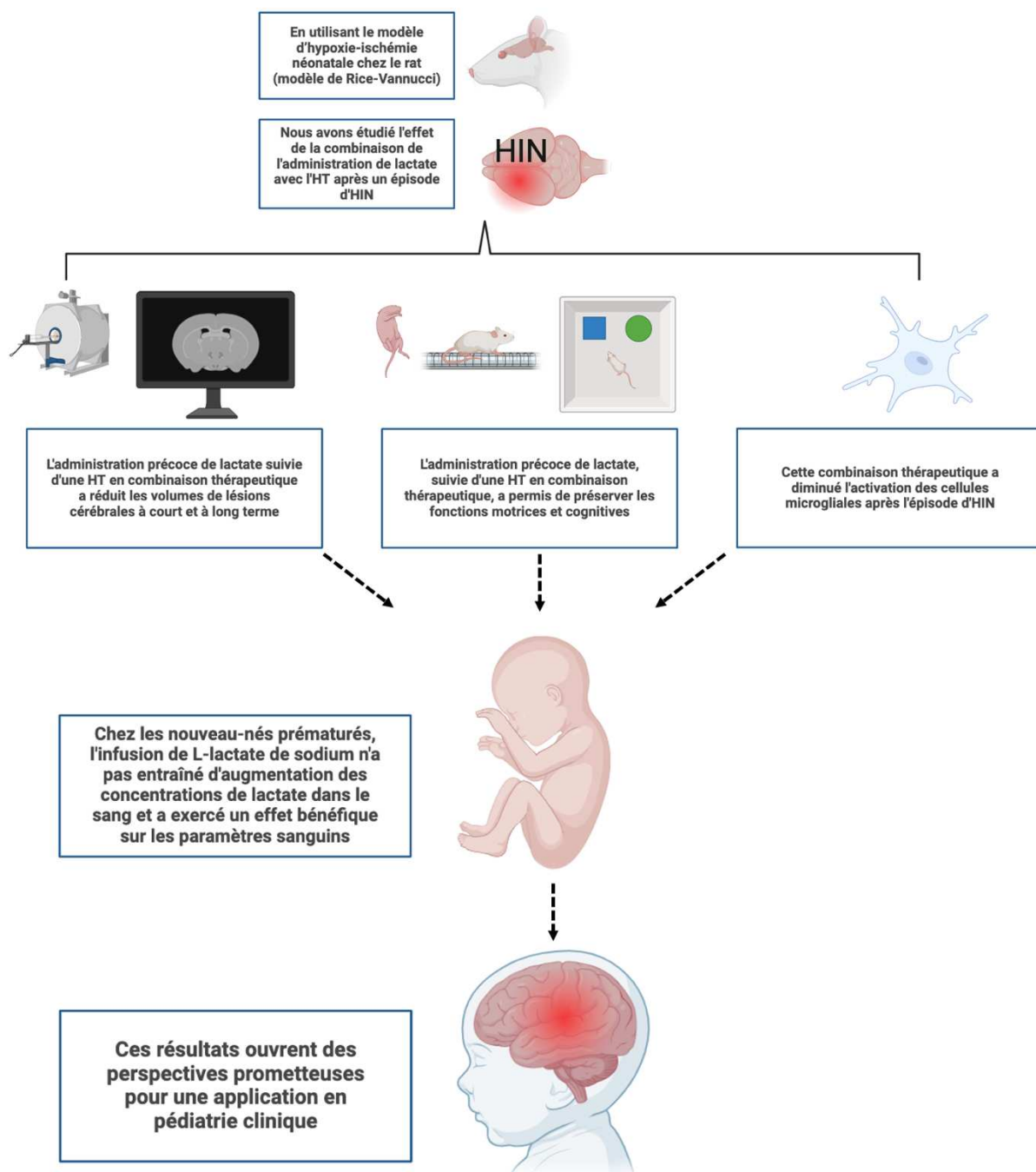


Figure 58 : Schéma de synthèse

HIN : Hypoxie-ischémie néonatale, HT : Hypothermie thérapeutique.

Références

- Baumann, E., Preston, E., Slinn, J., & Stanimirovic, D. (2009). Post-ischemic hypothermia attenuates loss of the vascular basement membrane proteins, agrin and SPARC, and the blood-brain barrier disruption after global cerebral ischemia. *Brain Research*, 1269, 185-197. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.02.062>
- Berthet, C., Lei, H., Thevenet, J., Gruetter, R., Magistretti, P. J., & Hirt, L. (2009). Neuroprotective role of lactate after cerebral ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 29(11), 1780-1789. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2009.97>
- Buscemi, L., Blochet, C., Price, M., Magistretti, P. J., Lei, H., & Hirt, L. (2020). Extended Preclinical Investigation of Lactate for Neuroprotection after Ischemic Stroke. *Clinical and Translational Neuroscience*, 4(1), Article 1. <https://doi.org/10.1177/2514183x20904571>
- Davidson, J. O., Wassink, G., van den Heuij, L. G., Bennet, L., & Gunn, A. J. (2015). Therapeutic Hypothermia for Neonatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy—Where to from Here? *Frontiers in Neurology*, 6, 198. <https://doi.org/10.3389/fneur.2015.00198>
- Erecinska, M., Thoresen, M., & Silver, I. A. (2003). Effects of hypothermia on energy metabolism in Mammalian central nervous system. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 23(5), 513-530. <https://doi.org/10.1097/01.WCB.0000066287.21705.21>
- Holloway, R., Zhou, Z., Harvey, H. B., Levasseur, J. E., Rice, A. C., Sun, D., Hamm, R. J., & Bullock, M. R. (2007). Effect of lactate therapy upon cognitive deficits after traumatic brain injury in the rat. *Acta Neurochirurgica*, 149(9), 919-927; discussion 927. <https://doi.org/10.1007/s00701-007-1241-y>
- Rice, J. E., Vannucci, R. C., & Brierley, J. B. (1981). The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Annals of Neurology*, 9(2), 131-141. <https://doi.org/10.1002/ana.410090206>
- Roumes, H., Dumont, U., Sanchez, S., Mazuel, L., Blanc, J., Raffard, G., Chateil, J.-F., Pellerin, L., & Bouzier-Sore, A.-K. (2021). Neuroprotective role of lactate in rat neonatal hypoxia-ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 41(2), 342-358. <https://doi.org/10.1177/0271678X20908355>
- Srinivasakumar, P., Zempel, J., Wallendorf, M., Lawrence, R., Inder, T., & Mathur, A. (2013). Therapeutic hypothermia in neonatal hypoxic ischemic encephalopathy : Electrographic seizures and magnetic resonance imaging evidence of injury. *The Journal of Pediatrics*, 163(2), 465-470. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2013.01.041>
- Tassinari, I. D., Andrade, M. K. G., da Rosa, L. A., Hoff, M. L. M., Nunes, R. R., Vogt, E. L., Fabres, R. B., Sanches, E. F., Netto, C. A., Paz, A. H., & de Fraga, L. S. (2020). Lactate Administration Reduces Brain Injury and Ameliorates Behavioral Outcomes Following Neonatal Hypoxia-Ischemia. *Neuroscience*, 448, 191-205. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.09.006>
- Tassinari, I. D., Zang, J., Ribeiro, N. H., Martins, B. B., Tauffer, J. V. M., Nunes, R. R., Sanches, E. F., Sizonenko, S., Netto, C. A., Paz, A. H., & de Fraga, L. S. (2024). Lactate administration causes long-term neuroprotective effects following neonatal hypoxia-ischemia. *Experimental Neurology*, 381, 114929. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2024.114929>
- Wassink, G., Gunn, E. R., Drury, P. P., Bennet, L., & Gunn, A. J. (2014). The mechanisms and treatment of asphyxial encephalopathy. *Frontiers in Neuroscience*, 8, 40. <https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00040>
- Wu, Y. W., & Gonzalez, F. F. (2015). Erythropoietin : A novel therapy for hypoxic-ischaemic encephalopathy? *Developmental Medicine and Child Neurology*, 57 Suppl 3, 34-39. <https://doi.org/10.1111/dmcn.12730>

ANNEXES

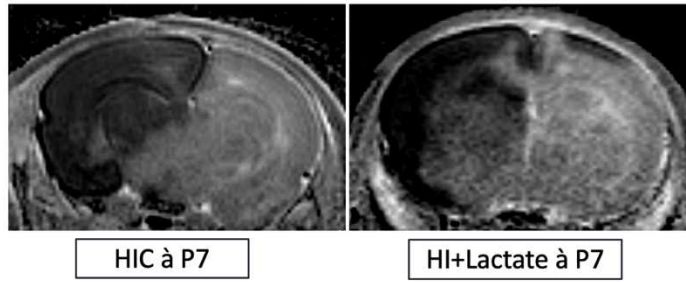


Figure 1 : Imagerie de diffusion (trace inversée) à P7 pour les rats 30 min après la ligature de l'artère carotide commune gauche.

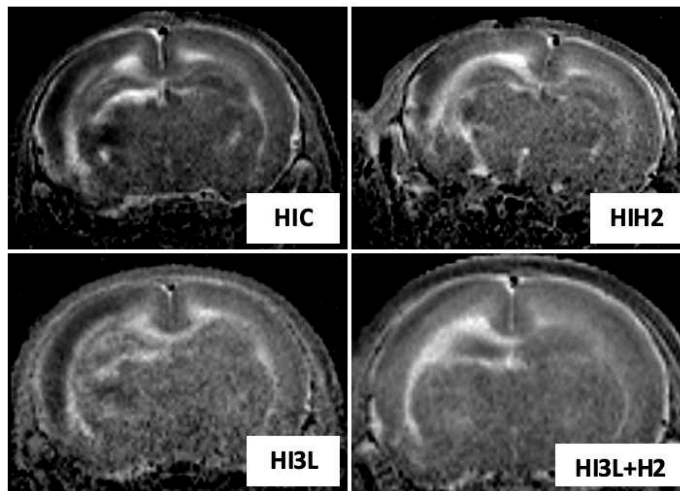


Figure 2 : Imagerie de diffusion (trace inversée) à P9 pour les rats 48 h après la ligature de l'artère carotide commune gauche.

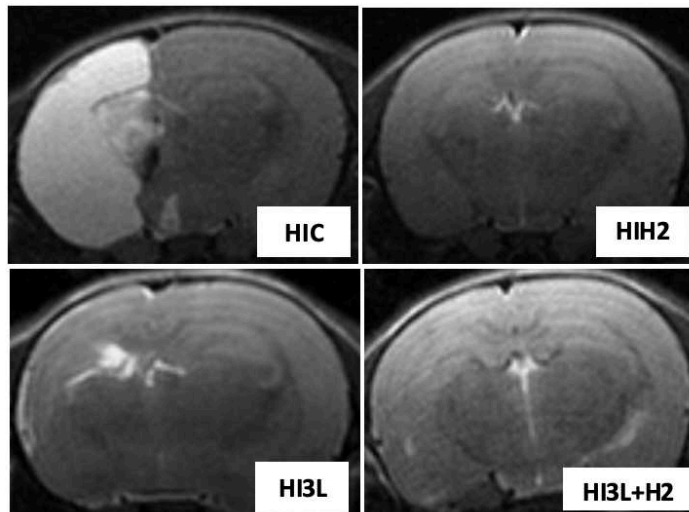


Figure 3 : IRM (T2) des lésions 23 jours après l'accident d'HIN montrant la lésion en hypersignal.

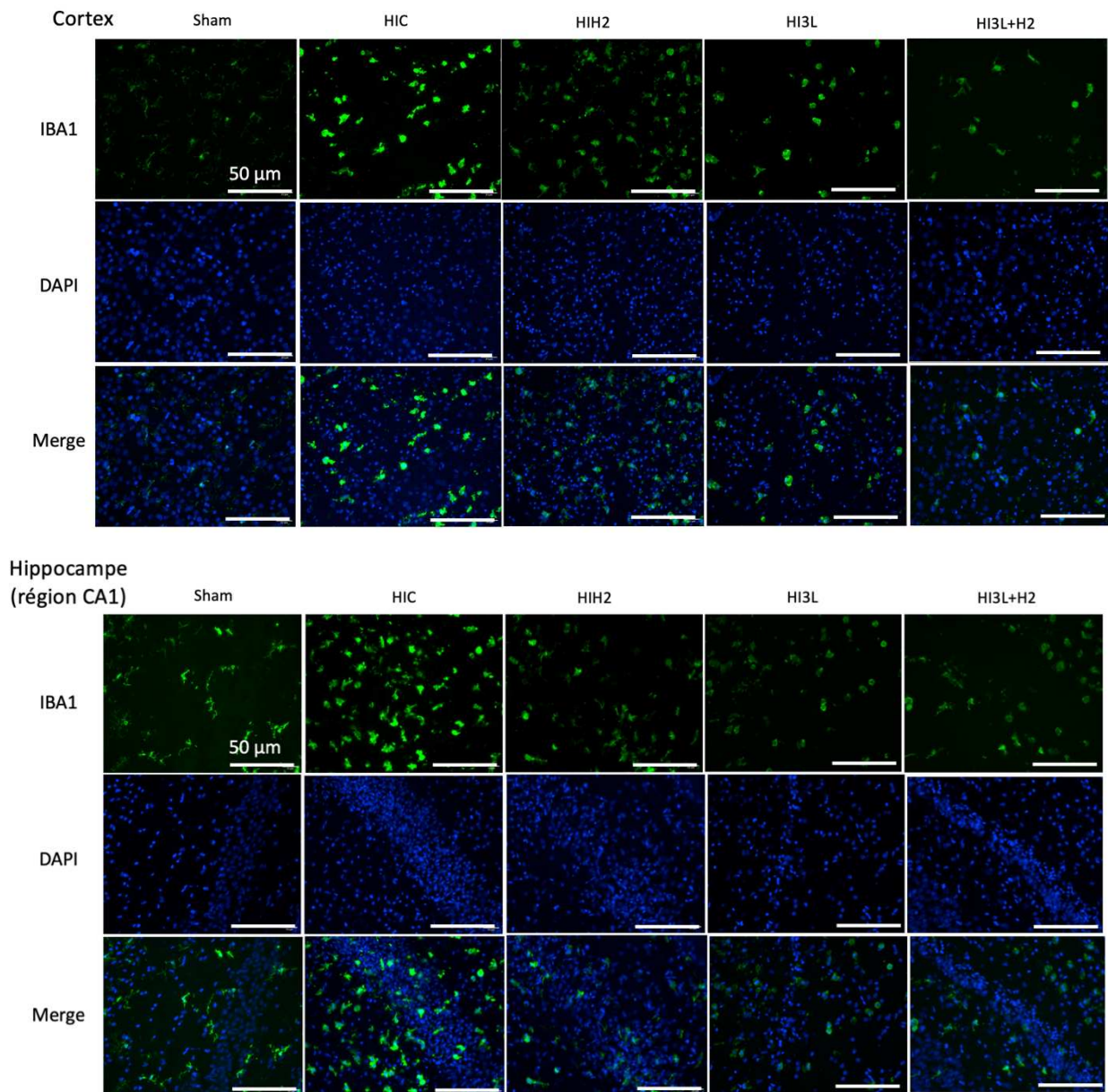


Figure 4 : Image d'immunofluorescence (20X) montrant l'expression d'IBA1 dans le cortex et la région CA1 de l'hippocampe pour chaque groupe, 48 heures après l'HIN. Marquage DAPI : les noyaux, Marquage IBA1 : Microglies, et l'image de merge : la superposition des deux. Échelle = 50 μ m.

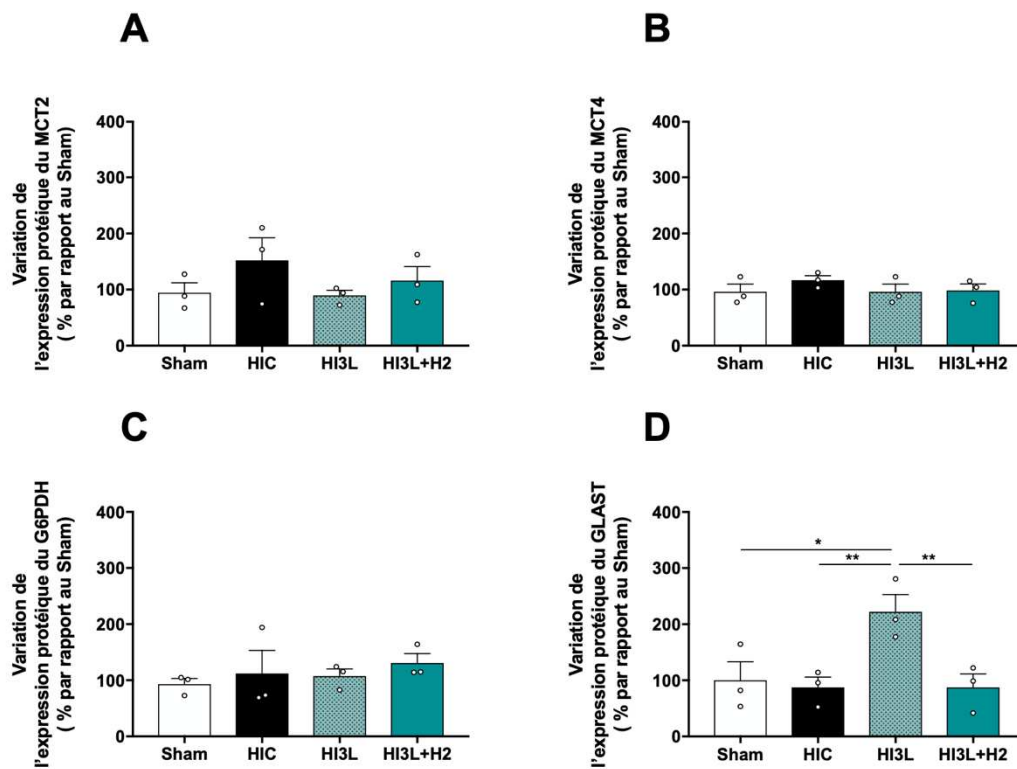


Figure 5 : Expression protéique du MCT2, MCT4, G6PDH (enzyme de la voie des pentoses phosphates) et GLAST (transporteur au glutamate astrocytaire). WB réalisés à P9 sur les cortex lésés des groupes Sham, HIC, HI3L et HI3L+H2. Les données présentées concernent uniquement le côté controlatéral. Les différences statistiques ont été définies comme $p < 0,05$.

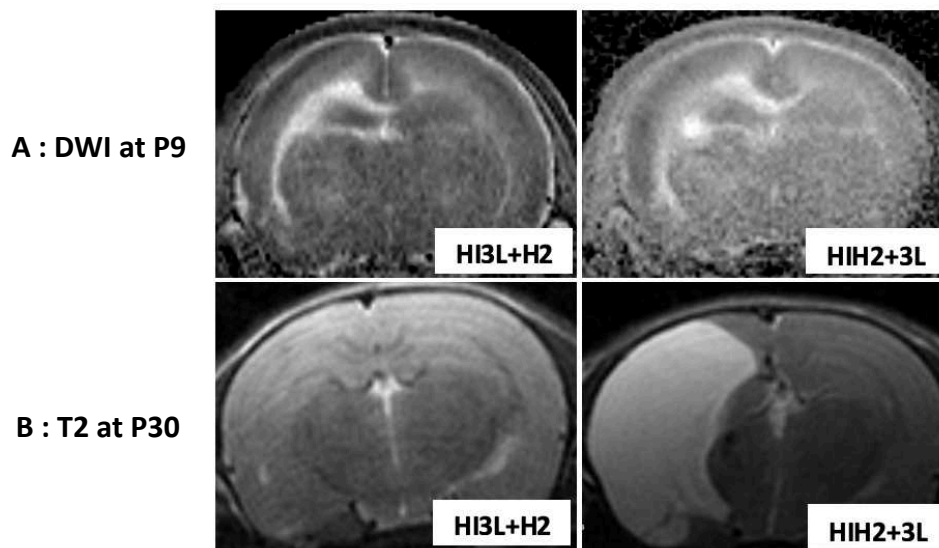


Figure 6 : (A) Imagerie de diffusion (trace inversée) à P9 pour les rats 48 h après la ligature de l'artère carotide commune gauche. (B) IRM (T2) des lésions 23 jours après l'accident d'HIN montrant la lésion en hypersignal.

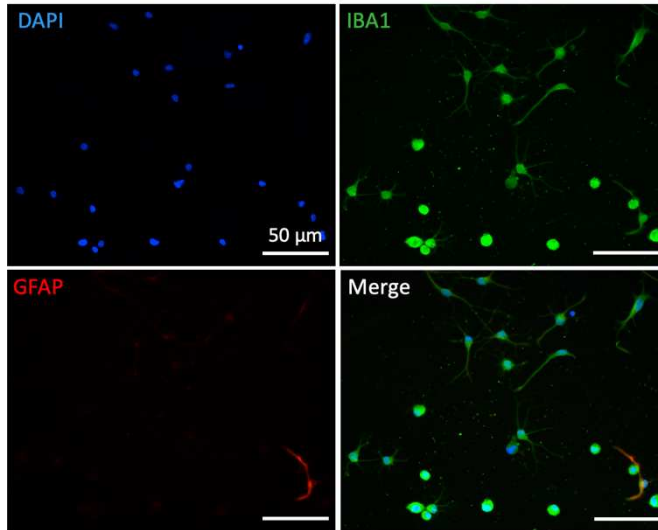


Figure 7 : Pureté de la culture des microglies primaires. Image d'immunofluorescence (20X) d'un champ. Marquage DAPI : les noyaux, Marquage IBA1 : Microglies, marquage GFAP : Astrocytes et l'image de merge : la superposition des trois. Échelle = 50 µm.

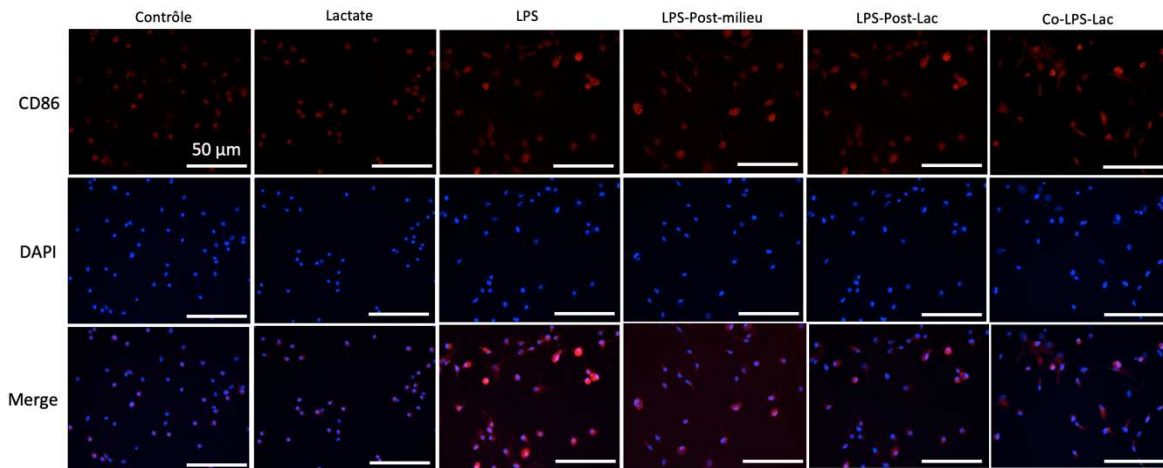


Figure 8 : Image d'immunofluorescence (20X) montrant l'expression de CD86 dans la culture de microglies primaires. Marquage DAPI : les noyaux, Marquage CD86 : Phénotype pro-inflammatoire des microglies, et l'image de merge : la superposition des deux. Échelle = 50 µm.

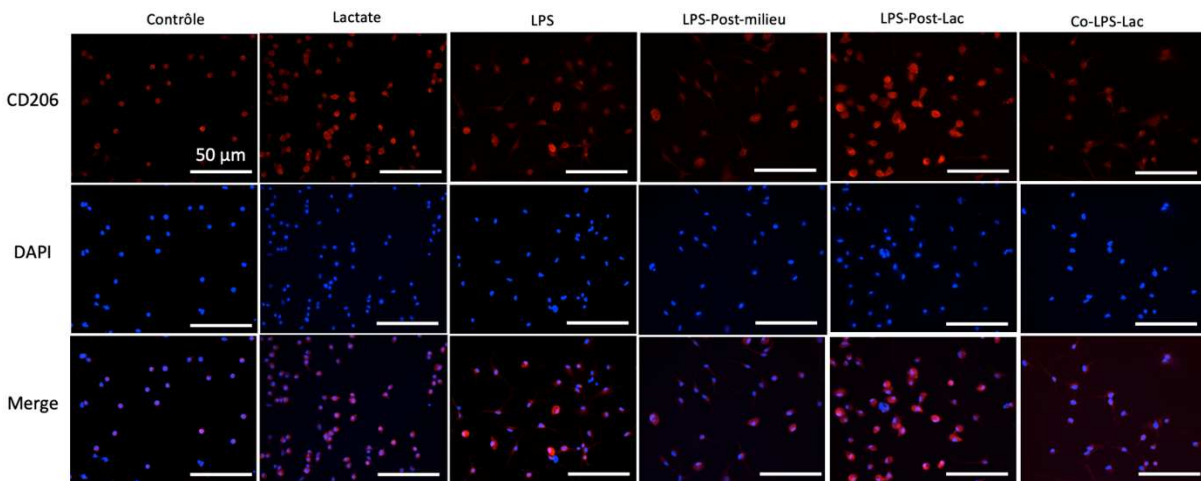


Figure 9 : Image d'immunofluorescence (20X) montrant l'expression de CD206 dans la culture de microglies primaires. Marquage DAPI : les noyaux, Marquage CD206 : Phénotype anti-inflammatoire des microglies, et l'image de merge : la superposition des deux. Échelle = 50 µm.

LISTES ABRÉVIATIONS

α -KG : α -Cétoglutarate	H ⁺ : Proton
AICAR : Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucléotide	HK : Hexokinase
AAE : Acides aminés excitateurs	HIN : Hypoxie-ischémie néonatale
AcAc : Acétoacétate	HT : Hypothermie thérapeutique
Acétyl-CoA : Acétyl coenzyme A	IBA1 : Ionized Calcium-binding Adapter molecule 1
ADC : Apparent Diffusion Coefficient	IHC : Immunohistochimie
ADN : Acide désoxyribonucléique	IL-1 β : Interleukine-1 β
ADP : Adénosine diphosphate	IL-6 : Interleukine-6
AGC : Transporteur aspartate/glutamate	IRM : Imagerie par résonance magnétique
AMPA : α -amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazole-4-propionique	IRMf : Imagerie par résonance magnétique fonctionnelle
AMPK : Protéine kinase activée par l'AMP	KD : Knockdown
ANLS : Astrocyte-neuron lactate shuttle	LCR : Liquide céphalorachidien
APC/C-Cdh1 : Complexe promoteur d'anaphase/cyclosome	LDH : Lactate déshydrogénase
ATP : Adénosine triphosphate	LPS : Lipopolysaccharide
AVC : Accidents vasculaires cérébraux	MCAO : Occlusion de l'artère cérébrale moyenne
B0 : champ magnétique statique	MCT : Transporteurs de monocarboxylate
B1 : Champ magnétique de radiofréquence B1	mNSS : Modified Neurological Severity Score
Bcl2 : B-cell lymphoma 2	MT : Récepteur de la mélatonine
BHB : β -hydroxybutyrate	NAA : N-Acétyl-Aspartate
BHE : Barrière hémato-encéphalique	Na ⁺ /K ⁺ -ATPase : Pompe sodium-potassium
BDNF : Brain-Derived Neurotrophic Factor	NAD : Nicotinamide Adénine Dinucléotide
Ca ²⁺ : Calcium	NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide réduit
CD86 : Cluster of Differentiation 86	NADP ⁺ : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
CD206 : Récepteur du mannose des macrophages	NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate réduit
Cl ⁻ : Ion chlorure	NMDA : Acide N-méthyl-D-aspartate
CO ₂ : Dioxyde de carbone	NO : Oxyde nitrique
CSM : Cellules souches mésenchymateuses	NOR : Novel Object Recognition test
Cu : Cuivre	NOS : Oxyde nitrique synthase
DAPI : 4',6- diamidino-2-phénylindole	O ₂ : Oxygène
DWI : Imagerie pondérée de diffusion	O ₂ ^{•-} : Anion superoxyde
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium	PaCO ₂ : Pression partielle de dioxyde de carbone
DTI : Diffusion Tensor Imaging (imagerie des tenseurs de diffusion)	PC : Pyruvate carboxylase
EEG : Électroencéphalogramme	PDH : Pyruvate déshydrogénase
ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay	PDK : Pyruvate déshydrogénase kinase
EPO : Érythropoïétine	PFK : Phosphofructokinase
ERA : Espèces réactives de l'azote	PFKFB3 : 6-phosphofructokinase-2,6-bisphosphate-3
ERO : Espèces réactives de l'oxygène	PPP : Voie des pentoses phosphates
F6P : Fructose-6-phosphate	PSD95 : Protéine postsynaptic density 95
F1,6BP : Fructose-1,6-bisphosphate	P : Postnatal Day
F2,6BP : Fructose-2,6-bisphosphate	RF : Onde de radiofréquence
FAD : Flavine Adénine Dinucléotide	RMN : Résonance magnétique nucléaire
FADH2 : Flavine Adénine Dinucléotide réduit	ROI : Régions d'intérêt
Fe : Fer	ROS : Espèces réactives de l'oxygène
G6P : Glucose-6-phosphate	SA : Semaines aménorrhée
G6PDH : Glucose-6-phosphate déshydrogénase	SCOT : Succinyl-CoA:3-cétoacide coenzyme A transférase
GABA : Acide γ -aminobutyrique	SNC : Système nerveux central
GAP43 : Growth Associated Protein 43	SNAT : Transporteurs d'acides aminés solutés neutres
GFAP : Glial Fibrillary Acidic Protein	SOD : Superoxyde dismutase
GLAST : Glutamate-aspartate transporter	SRMf : Spectroscopie de résonance magnétique fonctionnelle
GLT1 : Glutamate transporter 1	STAIR : Stroke Therapy Academic Industry Roundtable
GLUT : Transporteurs de glucose	T1 : Temps de relaxation longitudinale
GPX : Glutathion peroxydase	T2 : Temps de relaxation transversale
GPR81 : Récepteur du lactate	TNF- α : Facteur de nécrose tumorale alpha
GSH : Glutathion réduit	WB : Western Blot
GSSG : Glutathion oxydé	Xe : Xénon
GTP : Guanosine triphosphate	Zn : Zinc
H ₂ O ₂ : Peroxyde d'hydrogène	XO : Xanthine oxydase
