

Université de Montréal

**Développement d'une nouvelle stratégie neuroprotectrice  
efficace et d'une méthode de quantification précoce non  
invasive des lésions de la matière blanche cérébrale  
immature sur un modèle animal**

Par Wyston Chadwick Pierre

Département de pharmacologie et physiologie  
Faculté de médecine

Thèse présentée  
en vue de l'obtention du grade de *Philosophiae Doctor* (Ph. D.)  
en Pharmacologie  
option Cheminement libre

Août 2020

© Wyston Chadwick Pierre, 2020

Université de Montréal  
Département de pharmacologie et physiologie, Faculté de médecine

---

*Cette thèse intitulée :*

**Développement d'une nouvelle stratégie neuroprotectrice efficace et  
d'une méthode de quantification précoce non invasive  
des lésions de la matière blanche cérébrale immature sur un modèle animal**

*Présentée par :*

Wyston Chadwick Pierre

*A été évaluée par le jury suivant :*

**Dr Jonathan Brouillette**

Président-rapporteur

**Dr Gregory A. Lodygensky**

Directeur de recherche

**Dr Sylvain Chemtob**

Co-directeur

**Dr Alexander G. Weil**

Membre du Jury

**Dr Pascal M. Lavoie**

Examineur externe

## Résumé

Les grands prématurés sont particulièrement vulnérables aux lésions inflammatoires de la substance blanche (WMI) qui augmentent le risque de troubles cognitifs et neurodéveloppementaux à long terme dans cette population. L'utilisation de l'imagerie par résonance magnétique (IRM) dans cette population a permis une évaluation non invasive de la progression des WMI et une meilleure compréhension de la pathologie. Les WMI sont associées à une activation de la microglie et des astrocytes et la production de facteurs pro-inflammatoires, dont l'interleukine 1 (IL-1).

En utilisant un modèle de WMI induite par injection intracérébrale de lipopolysaccharides (LPS), nous avons évalué dans un premier temps les changements de méthylation de l'ADN durant la phase aiguë (24 h) et la phase chronique (21 jours) de l'inflammation. Par la suite, nous avons déterminé la capacité de l'IRM multimodale de détecter la lésion et la réponse thérapeutique à un antagoniste du récepteur de l'IL-1. Finalement, par le biais d'un antagoniste et d'un modulateur allostérique du récepteur à l'IL-1, nous avons évalué *in vitro* le rôle de la signalisation IL-1 durant la phase aiguë de la modulation de l'activation de la microglie et des astrocytes par le LPS.

Nous avons démontré la présence d'une altération du méthylome cérébral dans divers mécanismes liés au neurodéveloppement et à la réponse immunitaire. De plus, l'application de l'IRM multimodale dans notre modèle a permis d'évaluer *in vivo* la lésion et le début de la réponse thérapeutique durant la phase aiguë (24 h) de l'inflammation. L'évaluation à l'IRM corrèle aux changements observés par immunomarquage *post mortem*. *In vitro*, le LPS induit une réponse mixte de la microglie et des astrocytes qui évoluent dans le temps vers une réponse pro-inflammatoire et neurotoxique. Bien que l'IL-1 est hautement exprimée par la microglie et les astrocytes, son inhibition a un effet limité sur la modulation de l'activation gliale dû à la multitude de voies activées par le LPS durant la phase aiguë de l'inflammation.

**Mots-clés :** Antagoniste du récepteur à l'interleukine 1, Astrocyte, Imagerie par résonance magnétique, Leucomalacie périventriculaire, Lipopolysaccharides, Méthylation de l'ADN, Microglie

## Abstract

Very premature infants are particularly vulnerable to inflammatory white matter injury (WMI) which increases the risk of long-term cognitive and neurodevelopmental disorders in this population. The use of magnetic resonance imaging (MRI) in this population has allowed non-invasive assessment of the progression of WMI and a better understanding of the pathology. WMI is associated with activation of microglia and astrocytes and the production of pro-inflammatory mediators, including interleukin 1 (IL-1).

Using a model of inflammatory WMI induced by intracerebral injection of lipopolysaccharides (LPS), we first evaluated the changes in DNA methylation during the acute phase (24 h) and the chronic phase (21 days) of inflammation. We then determined the ability of multimodal MRI to detect the lesion and the therapeutic response to an IL-1 receptor antagonist. Finally, using an antagonist and an allosteric modulator of the IL-1 receptor, we evaluated *in vitro* the contribution of IL-1 signaling during the acute phase of the modulation of microglia and astrocytes activation by LPS.

We have shown the presence of persistent alteration DNA methylation profile in the brain that was associated with pathways involved in neurodevelopment and immune response. In addition, the application of multimodal MRI in our model made it possible to evaluate *in vivo* the lesion and the therapeutic response during the acute phase (24 h) of the inflammation. The changes at the MRI correlated to post-mortem evaluation by immunostaining. *In vitro*, LPS induce a mixed response of microglia and astrocytes which evolved over time toward a pro-inflammatory and neurotoxic phenotype. Although IL-1 is highly expressed by microglia and astrocytes, its inhibition has a limited effect on the modulation of glial activation due to the multitude of pathways activated by LPS during the acute phase of inflammation.

**Keywords** : Astrocyte, DNA methylation, Interleukin 1 receptor antagonist, Lipopolysaccharides, Magnetic resonance imaging, Microglia, Periventricular leukomalacia

# Table des matières

Résumé.....	1
Abstract.....	2
Table des matières.....	3
Liste des tableaux.....	8
Liste des figures .....	9
Liste des sigles .....	10
Liste des abréviations.....	11
Remerciements.....	15
Chapitre I : Introduction.....	16
1. La naissance prématurée .....	16
1.1. Définition et classification de la naissance prématurée .....	16
1.2 Comorbidités chez le prématuré à la naissance .....	17
1.2.1 Dysplasie bronchopulmonaire .....	18
1.2.2 Entérocolite nécrosante .....	18
1.2.3 Septicémie.....	19
1.2.4 Rétinopathie du prématuré.....	20
1.2.5 Atteintes cérébrales.....	20
1.2.4 Effets cumulatifs des comorbidités chez les prématurés .....	22
2. Le système nerveux central.....	22
2.1 Généralités .....	22
2.2 Rôles des cellules du système nerveux central .....	24
2.2.1 Neurones .....	24
2.2.2 Oligodendrocytes .....	25
2.2.3 Microglie.....	26
2.2.3.1 Origine et fonctions de la microglie.....	26
2.2.3.2 Activation et polarisation de la microglie.....	28
2.2.4 Astrocytes .....	29
2.2.4.1 Origine et fonctions des astrocytes .....	29
2.2.4.2 Activation et polarisation astrocytaire .....	30

2.3	Communication entre les astrocytes et la microglie durant l'activation gliale.....	31
3.	L'IRM : un outil d'évaluation non invasive des lésions cérébrales.....	33
3.1	Principe de base de l'imagerie par résonance magnétique .....	33
3.2	Techniques d'IRM utilisées chez le nouveau-né prématuré .....	34
3.2.1	IRM conventionnelle .....	34
3.2.2	Imagerie pondérée par la diffusion .....	35
3.2.3	Spectroscopie par résonance magnétique .....	37
3.3	L'IRM comme outil de détection chez le prématuré .....	38
3.4	Évaluation des WMI par IRM.....	40
3.4.1	Changement volumétrique à l'IRM conventionnelle.....	40
3.4.2	Altération de la microstructure de la substance blanche chez le prématuré .....	40
3.4.3	La MRS chez le prématuré .....	41
4.	Inflammation et WMI chez le prématuré.....	42
4.1	Le rôle de l'inflammation dans la WMI chez le prématuré .....	44
4.2	Lien entre l'inflammation et les WMI chez le prématuré.....	45
5.	Modèle animal de lésion de la substance blanche du prématuré .....	47
5.1	Signalisation cellulaire du LPS.....	48
5.2	La WMI induite par injection intracérébrale de LPS.....	50
5.3	Sensibilisation à long terme induite par l'inflammation néonatale .....	51
5.4	Limites du modèle de WMI par injection intracérébrale de LPS .....	52
6.	L'altération du méthylome dans la lésion de la substance blanche du prématuré .....	53
6.1	L'épigénétique .....	53
6.2	La méthylation de l'ADN .....	53
6.3	Les changements de la méthylation de l'ADN chez le prématuré.....	55
6.4	Autres changements épigénétiques chez le prématuré.....	56
6.4.1	Les modifications post-traductionnelles des histones.....	56
6.4.2	Les ARN non codants .....	58
6.4.2.1	Les miRNA .....	59
6.4.2.2	Les lncRNA .....	60
7.	Approche thérapeutique .....	60
7.1	Approches thérapeutiques expérimentales.....	61

7.1.1 Facteurs de croissance.....	61
7.1.2 Molécules antioxydantes.....	62
7.1.3 Molécules anti-inflammatoires .....	62
7.1.4 Les exosomes .....	63
7.2 Cibler l'IL-1 dans les lésions inflammatoires de la substance blanche .....	65
7.2.1 Le système à l'IL-1 .....	65
7.2.2 Signalisation des récepteurs à l'IL-1.....	67
7.2.3 Rôle physiologique de l'IL-1 dans le SNC.....	68
7.2.4 Production de l'IL dans l'inflammation.....	71
7.2.5 Comment bloquer l'IL-1 .....	71
Objectifs de la thèse .....	74
Chapitre II : Alteration of the brain methylation landscape following postnatal inflammatory injury in rat pups .....	76
Nonstandard Abbreviations .....	77
Abstract .....	78
1. Introduction.....	79
2. Materials and Methods.....	82
3. Results.....	85
4. Discussion.....	90
References.....	95
Table du chapitre II.....	106
Légende et figures du chapitre II .....	107
Matériels supplémentaires du chapitre II.....	114
Table supplémentaire du chapitre II .....	114
Figures supplémentaires du chapitre II.....	118
Chapitre III : Assessing therapeutic response non-invasively in a neonatal rat model of acute inflammatory white matter injury using high-field MRI .....	123
Abstract :.....	124
Highlights.....	125
1 Introduction.....	126
2. Methods.....	129

3. Results.....	135
4. Discussion.....	140
5. Conclusion .....	144
References.....	146
Tables du chapitre III.....	156
Légendes et figures du chapitre III .....	159
Chapitre IV : Modulatory effect of IL-1 inhibition following lipopolysaccharide-induced neuroinflammation in neonatal microglia and astrocytes .....	170
Abstract.....	171
1. Introduction.....	173
2. Materials and methods .....	175
3. Results.....	178
4. Discussion/conclusion.....	180
References.....	184
Tables du chapitre IV.....	191
Légendes et figures du chapitre IV .....	193
Matériels supplémentaires du chapitre IV .....	201
Chapitre V : Discussion et perspectives.....	204
5.1 Discussion.....	204
5.1.1 Changement du profil épigénétique.....	204
5.1.2 Détection de la lésion et de la réponse thérapeutique par IRM multimodale durant la phase aigüe de l'inflammation.....	206
5.1.3 La polarisation de la microglie et des astrocytes <i>in vitro</i> .....	208
5.1.4 Contribution de l'IL-1 durant la phase aigüe de la réponse inflammatoire induite par le LPS.....	209
5.2 Perspectives.....	210
5.2.1 Étude de l'impact de la WMI sur le méthylome cérébral .....	210
5.2.2 Étude de la polarisation astrocytaire et microgliale <i>in vivo</i> dans le modèle de WMI .....	211
5.2.3 Étude du rôle de l'IL-1 dans la réponse inflammatoire chronique <i>in vivo</i> dans le modèle de WMI .....	212



Conclusion .....	214
Bibliographie.....	215
Annexe 1 : Droit d’auteurs de l’article 1 .....	i
Annexe 2 : Droit d’auteurs de l’article 2 .....	ii

## Liste des tableaux

<b>Tableau I.</b>	<b>Marqueurs associés à l'activation astrocytaire .....</b>	<b>31</b>
<b>Tableau II.</b>	<b>Ligands et récepteurs de la famille de cytokines de l'IL-1.....</b>	<b>65</b>

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b>	<b>Ligne temporelle du neurodéveloppement périnatal chez l'humain.....</b>	<b>24</b>
<b>Figure 2.</b>	<b>Communication bidirectionnelle entre microglie et astrocytes activés.....</b>	<b>32</b>
<b>Figure 3.</b>	<b>Représentation de la diffusion isotropique et anisotropique .....</b>	<b>36</b>
<b>Figure 4.</b>	<b>Représentation de la leucomalacie périventriculaire cystique et non cystique sur une coupe coronale d'un cerveau de nouveau-né prématuré.....</b>	<b>43</b>
<b>Figure 5.</b>	<b>Illustration du lien entre inflammation et infection systémique et atteinte de la substance blanche chez le prématuré.....</b>	<b>46</b>
<b>Figure 6.</b>	<b>Signalisation du récepteur TLR4 .....</b>	<b>49</b>
<b>Figure 7.</b>	<b>La méthylation de l'ADN altère la transcription génique.....</b>	<b>54</b>
<b>Figure 8.</b>	<b>Modulation de la polarisation de la microglie.....</b>	<b>64</b>
<b>Figure 9.</b>	<b>Interaction entre les récepteurs et les ligands du système IL-1 .....</b>	<b>68</b>
<b>Figure 10.</b>	<b>Mode d'action des inhibiteurs ou modulateurs du système de l'IL-1 .....</b>	<b>72</b>

## **Liste des sigles**

FDA : Food and Drug Administration

OMS : Organisme mondial de la santé

## Liste des abréviations

AD : Diffusivité axiale

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

ASD : Trouble du spectre autistique

BBB : Barrière hématoencéphalique

BDNF : Facteur neurotrophique dérivé du cerveau

BPD : Dysplasie bronchopulmonaire

BSCI : Inhibiteurs large spectre des chimiokines

CpG : Cytosine suivie d'une guanine

CSF : Liquide cérobrospinal

DAMP : Motifs moléculaires associés au danger

DNMT : ADN méthyltransférase

DWI : Imagerie pondérée en diffusion

E. coli : Escherichia coli

EPO : Érythropoïétine

FA: Anisotropie fractionnelle

GFAP : Protéine acide fibrillaire gliale

HI : Hypoxie-ischémie

HIE : Encéphalopathie hypoxique-ischémique

IAIP : Protéines inhibitrices inter-alpha

IC : Intracérébrale

IFN: Interféron de type I

IGF-1 : Insulin-like growth factor-1

IL-1 : Interleukine 1

IL-10 : Interleukine 10

IL-1R : Récepteur de l'interleukine 1

IL-1Ra : Antagoniste du récepteur de l'interleukine 1

IL-1RAcP : Protéine accessoire du récepteur à l'interleukine 1

IL-6 : Interleukine 6

IRAK : Protéine kinase associée à l'IL-1R  
IRF3 : Régulateur de l'interféron 3  
IRM : Imagerie par résonance magnétique  
IVH : Hémorragie intraventriculaire  
LCN2 : Lipocaline 2  
lncRNA: Long ARN non-codant  
LPS : Lipopolysaccharides  
MAPK : « Mitogen-activated protein kinase »  
MD : Diffusivité moyenne  
MD2 : « Myeloid Differentiation factor 2 »  
miRNA : micro-ARN  
mRNA : ARN messenger  
MRS : Spectroscopie par résonance magnétique  
MyD88 : « Myeloid differentiation primary response 88 »  
NAA : N-acétylaspartate  
NEC : Entérocolite nécrosante  
NFκB : « nuclear factor κ light chain enhancer of activated B cells »  
NFIA : Facteur nucléaire 1 de type A  
NICU : Unité de soins intensifs néonataux  
NPC : Cellule précurseur neurale  
Nrf2 : « Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 »  
OPC : Cellule progénitrice des oligodendrocytes  
ORM2 : Orosomucoïde 2  
PAMP : Motifs moléculaires associés au pathogène  
PRR : Récepteur de reconnaissance de motifs moléculaires  
PTB : Naissance prématurée  
PVL : Leucomalacie périventriculaire  
RD : Diffusivité radiale  
ROP : Rétinopathie du prématuré  
SGZ : Zone sous-granulaire  
SNC : Système nerveux central

SVZ : Zone sous-ventriculaire

T : Tesla

TE : Temps d'écoute

TET1 : « Ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase 1 »

TFF3: Tacteur en trèfle 3

TGF $\beta$  : « Transforming growth factor beta »

TIR: « Toll/Interleukin 1 receptor domain »

TIRAP: « TIR domain containing adaptor protein »

TLR : « Toll-like receptor »

TNF- $\alpha$  : Facteur de nécrose tumorale alpha

TR : Temps de répétition

TRAF6 : Facteur associé aux récepteurs de TNF 6

TRAM : « Translocating chain-associated membrane protein »

TRIF : « TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$  »

VEGF : Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

WMI : Lésion de la substance blanche

*À la mémoire de mon père et de ma grand-mère Na.*



## Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier mon directeur de recherche le Dr Lodygensky de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et de m'avoir offert son soutien constant tout au long de mon doctorat. Merci de m'avoir poussé à repousser mes limites, d'apprendre à synthétiser ma pensée et à voir l'image d'ensemble plutôt qu'un aspect. Je tiens aussi à remercier le Dr Lodygensky de m'avoir montré l'importance de la collaboration dans le monde de la recherche. Ceci m'a permis de collaborer avec des chercheurs d'horizons différents tout au long de mon parcours académique. Finalement, je tiens à le remercier pour ses conseils tant sur le monde de la recherche que sur la vie en général et l'importance l'activité physique particulièrement le ski de fond durant les congrès.

Je tiens aussi à remercier le Dr Chemtob, mon co-directeur, et tous les membres de son laboratoire pour leur soutien tout au long de mon doctorat. Je remercie le Dr Chemtob de m'avoir accueilli dans son laboratoire durant mes études à la maîtrise et de m'avoir donné le gout de poursuivre au doctorat. Merci à Christiane pour ton aide sur le projet Rytvela. Je veux remercier Xin et Carlos pour leur aide lors de mes premiers essais avec les cultures de cellules primaires.

Je tiens à donner un merci spécial aux membres présents et passés du laboratoire du Dr Lodygensky qui ont su créer une bonne ambiance de vie au laboratoire. Merci à Irene pour ton dévouement et ton support tout au long des différents projets que nous avons effectués. Merci à Luis, Irene et Vicente d'avoir su rendre agréables nos longues journées à l'ICM que ce soit pour l'IRM ou l'IOI.

Merci à la Fondation du CHU Sainte-Justine et la Faculté des études supérieures et postdoctorales de l'Université de Montréal pour leur soutien financier durant mon doctorat.

Finalement, sur une note plus personnelle, je tiens à remercier grandement ma famille et mes amis de m'avoir supporté et encouragé tout au long de mon parcours universitaire. Plus particulièrement, je veux remercier ma mère et mes frères et sœurs d'avoir été là pour moi dans mes hauts et mes bas, pour me remonter le moral, me distraire et surtout me faciliter la vie durant ce parcours qu'est le doctorat. Il faut beaucoup d'amour et de compréhension pour avoir enduré les périodes où mon niveau de stress était au plafond.

# Chapitre I : Introduction

## 1. La naissance prématurée

### 1.1. Définition et classification de la naissance prématurée

Chez l'humain, une grossesse normale dure en moyenne 40 semaines à partir du premier jour du dernier cycle menstruel de la mère et une naissance à terme correspond à une naissance entre la 37<sup>e</sup> et la 42<sup>e</sup> semaine de grossesse (1, 2). Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), la naissance prématurée (PTB) se définit comme une naissance survenant avant la 37<sup>e</sup> semaine de gestation. La PTB représente environ 10 % des naissances dans le monde et 8 % des naissances au Canada (3-6). Les enfants nés prématurément peuvent être catégorisés selon l'âge gestationnel où survient la naissance soit : prématurité modérée à tardive (32 à <37 semaines), grande prématurité (28 à <32 semaines) et prématurité extrême (<28 semaines) (4). Outre cette classification, les enfants prématurés peuvent être séparés en fonction du poids à la naissance soit : naissance de faible poids (<2500 g), naissance de très faible poids (<1500 g) et naissance d'extrême faible poids (<1000 g) (7, 8). L'interdépendance de l'âge gestationnel et du poids à la naissance fait en sorte que ces deux classifications sont utilisées de manière interchangeable dans les études sur la prématurité. Il a été entendu que les niveaux de risques étaient similaires entre le duo grande prématurité et très faible poids à la naissance et le duo prématurité extrême et naissance d'extrême faible poids (7, 9, 10).

La PTB peut être induite ou spontanée et chacune représente respectivement 30 % et 70 % des naissances prématurées (11). La PTB induite ou dite iatrogène survient lorsque l'équipe médicale provoque l'accouchement ou effectue une césarienne avant la 37<sup>e</sup> semaine de grossesse due à des facteurs mettant en danger la vie de la mère ou du fœtus (3). Ces facteurs incluent des pathologies maternelles comme la prééclampsie, le diabète gestationnel et la placentation anormale ou bien des pathologies fœtales comme la restriction de croissance utérine et la souffrance fœtale (3, 11). La PTB spontanée est lorsque le travail débute avant terme. Il est établi que la PTB spontanée résulte de l'interaction entre différents facteurs incluant

les épisodes d'infection et d'inflammation, la distension ou le stress utérins et l'hémorragie ou l'ischémie utéroplacentaire qui causent une activation prématurée des tissus maternels et fœtaux (12-14). Bien que l'inflammation soit un processus crucial au déclenchement de l'accouchement, son activation précoce dans la PTB augmente les risques d'atteintes dans les organes en développement chez le nouveau-né (13, 15).

## **1.2 Comorbidités chez le prématuré à la naissance**

Durant les dernières décennies, les avancées des soins de santé à l'unité de soins intensifs néonataux (NICU) ont augmenté le taux de survie chez les prématurés particulièrement dans la catégorie de la prématurité extrême. Malgré cela, la PTB demeure un important facteur de risque de comorbidités périnatales et/ou de pathologies à long terme (10, 13). La prématurité est un facteur de risque d'environ 75 % de la mortalité périnatale et d'environ 50 % des comorbidités à long terme (3, 16). La PTB engendre des coûts importants sur le système de santé au Canada avec des coûts estimés à environ 8 milliards par an en 2005-2006 (17, 18). De plus, il a été démontré que le coût des dépenses par enfant augmentait exponentiellement avec la diminution de l'âge gestationnel chez les prématurés (19, 20). Par exemple, les coûts liés à un prématuré né avant la 28<sup>e</sup> semaine sont environ 85 fois plus élevés comparativement à ceux d'un enfant né à terme (17). De plus, la prématurité est associée à une augmentation de la durée moyenne d'hospitalisation particulièrement chez les prématurés extrêmes qui ont une durée d'hospitalisation atteignant jusqu'à 40 fois celle d'un enfant né à terme (17). Cette augmentation du coût et de la durée d'hospitalisation chez les prématurés reflète l'incidence plus élevée d'être atteint d'une ou plusieurs comorbidités dans cette population. Comparativement à la naissance à terme, la PTB augmente le risque de dysplasie bronchopulmonaire, d'entérocolite nécrosante, de septicémie, de rétinopathies du prématuré et d'atteintes cérébrales. La présence de ces comorbidités augmente le risque d'altérations et d'atteintes neurodéveloppementales (5).

### **1.2.1 Dysplasie bronchopulmonaire**

La dysplasie bronchopulmonaire (BPD) est une pathologie associée à la PTB. Un diagnostic est émis lorsqu'un prématuré a besoin d'assistance respiratoire après 28 jours de vie ou après la 36<sup>e</sup> semaine de gestation (21-23). L'augmentation du taux de survie chez les prématurés extrêmes a augmenté la prévalence de BPD jusqu'à une incidence d'environ 68 % (10, 24). Il a été démontré que la BPD est causée par un arrêt prématuré de la maturation et du développement pulmonaire qui sont induits par l'initiation de la ventilation mécanique et/ou de l'oxygène d'appoint chez les prématurés souffrant de troubles respiratoires (22, 23). La BPD augmente le risque d'épisodes d'hypoxie-ischémie (HI) cérébrale caractérisés par des périodes d'hypercapnie, d'hypoxie et d'acidose respiratoire (25, 26). De plus, la BPD est liée à l'inflammation systémique, des changements dans les échanges gazeux ou encore à l'utilisation de corticostéroïdes comme agent thérapeutique (26-30). Ces différents facteurs peuvent augmenter le risque de déficits neurodéveloppementaux. La BPD augmente la prévalence de troubles neuromoteurs, de paralysie cérébrale et de retard du développement cognitif (23, 26, 31). Il a été noté que les enfants atteints de BPD avaient une diminution du volume cérébrale et des changements de la microstructure de la substance blanche particulièrement dans le corps calleux (32-35). La prévalence de ces déficits augmente avec la sévérité de la BPD (26).

### **1.2.2 Entérocolite nécrosante**

Une autre comorbidité reliée à la prématurité est l'entérocolite nécrosante (NEC). La NEC est une affection touchant le tractus gastro-intestinal et est caractérisée par la présence d'ulcérations et de nécroses dans la muqueuse intestinale (36). Elle touche environ 5 % des grands prématurés et 10 % des prématurés extrêmes (37-39). Les prématurés atteints de NEC courent un risque plus élevé de souffrir d'atteintes psychomotrices, de paralysie cérébrale et de déficits cognitifs et sensoriels (40-42). La prévalence de ces déficits augmente avec le degré de sévérité de la NEC. La physiopathologie entre la NEC et les dommages cérébraux est encore peu comprise chez l'humain. Cependant, les études à l'aide de modèles animaux de NEC ont mis de l'avant l'hypothèse que les dommages cérébraux sont dus à une neuroinflammation secondaire à une activation de la réponse inflammatoire systémique induite par la NEC (40, 42-

44). Dans les modèles de NEC chez le porcelet prématuré et la souris néonatale, il a été démontré que les lésions intestinales augmentaient l'inflammation systémique et que ceci est parallèle à une altération de la barrière hématoencéphalique, l'activation de la microglie, une diminution de la myélinisation et des atteintes neuronales touchant particulièrement l'hippocampe (45-48).

### 1.2.3 Septicémie

Les enfants nés prématurément courent un plus grand risque de souffrir d'un ou de plusieurs épisodes de septicémie durant leur hospitalisation (49). Le risque d'avoir un épisode de septicémie augmente avec la diminution de l'âge gestationnel. Il a été reporté qu'environ 35 % des enfants de moins de 28 semaines étaient à risque d'avoir un épisode de septicémie et ce risque augmentait à 60 % pour les prématurés nés à moins de 25 semaines (50, 51). Les septicémies peuvent survenir précocement ( $\leq 3$  jours de vie) ou tardivement (plus de 3 jours de vie). Parmi les agents pathogènes, les infections à bactéries Gram négatif ont un taux plus élevé de mortalité et de risques d'atteintes neurodéveloppementales plus sévères comparativement à celles à bactéries Gram positif (52-56). Plus précisément, il a été dénoté que la bactérie *Escherichia coli* (E. coli), qui est Gram négatif, est parmi les agents pathogènes les plus fréquemment présents chez les prématurés souffrant de septicémie (57-59). Ces épisodes infectieux sont accompagnés de concentrations élevées de marqueurs inflammatoires dans le plasma et dans le liquide cébrospinal (CSF) incluant les cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine 1 bêta (IL-1 $\beta$ ) (60, 61).

Chez les prématurés, les infections et l'inflammation systémique augmentent le risque d'atteintes neurodéveloppementales. Chez les grands prématurés, les septicémies élèvent de deux fois le risque de déficits cognitifs, d'atteintes neuromotrices et de paralysie cérébrale entre 18 et 22 mois d'âge corrigé (52). Ces épisodes sont associés à un plus grand risque d'atteintes neurodéveloppementales à long terme tel qu'illustré par une incidence plus élevée de déficits moteurs, cognitifs et d'attention à l'âge de 9 ans (62). De plus, un niveau élevé de cytokines inflammatoires en circulation durant le premier mois de vie augmente l'incidence de déficits cognitifs à 2 ans et 10 ans chez les enfants nés avant la 28<sup>e</sup> semaine de grossesse (63, 64). Outre

cela, les septicémies et l'augmentation des niveaux systémiques de cytokines inflammatoires augmentent la prévalence d'anomalies de la substance blanche détectée par IRM à l'âge corrigé chez les prématurés (60, 65). Il a été émis que les épisodes d'infections/inflammations systémiques induisent un état neuroinflammatoire altérant le développement cérébral (66, 67). Ce lien sera discuté plus en détail dans la section 4 de ce chapitre.

#### **1.2.4 Rétinopathie du prématuré**

La rétinopathie du prématuré (ROP) est une pathologie touchant l'angiogenèse de la rétine ce qui cause des atteintes du système visuel pouvant aller jusqu'au détachement de la rétine et la cécité dans les cas les plus sévères (68). Dans les pays développés, environ 60 % des prématurés nés à moins de 1500 g sont à risque de souffrir de ROP (69). La physiopathologie de la ROP a été liée à la PTB, mais aussi à la supplémentation en oxygène dû à l'immatunité de la rétine chez les grands prématurés (68-70). Outre les atteintes visuelles, la ROP est aussi liée à des atteintes neurodéveloppementales chez les prématurés (71, 72). Les enfants nés prématurément souffrant de ROP ont une plus grande incidence de déficits cognitifs, moteurs et sensoriels comparativement au prématuré sans ROP et ce risque augmente avec la sévérité de la ROP (70, 71, 73-76). Les prématurés souffrants de ROP sont à plus grands risques d'atteintes de l'intégrité de la microstructure de la substance blanche particulièrement dans les faisceaux des radiations optiques, de la capsule interne et de la strie terminale (77-79). Différentes hypothèses ont été émises pour expliquer les liens entre les atteintes cérébrales et la ROP. Parmi celles-ci, on dénote l'hyperoxygénation induite par l'oxygène d'appoint, l'inflammation systémique et les altérations d'expression de facteurs de croissance dont le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) et l'« insulin-like growth factor 1 » (IGF-1) (68, 74).

#### **1.2.5 Atteintes cérébrales**

Les prématurés sont à grand risque d'atteintes cérébrales dont les principales formes sont l'hémorragie intraventriculaire (IVH) et les lésions de la substance blanche (WMI) (66).

Tout d'abord, l'IVH est décrit comme un saignement dans les ventricules cérébraux et/ou le tissu cérébral entourant les ventricules à la suite de la rupture des vaisseaux sanguins de la matrice germinale (80). Chez les grands prématurés ou ceux ayant un poids à la naissance  $\leq 1500\text{g}$ , l'incidence d'IVH est d'environ 15 à 25 % et cette incidence augmente avec la diminution de l'âge et/ou du poids à la naissance (81-83). L'IVH est induit par des changements hémodynamiques à la suite d'une période prolongée d'hypotension suivie d'une période d'hypertension ou encore une période d'hypertension prolongée induite par les crises épileptiques, l'intubation, l'alimentation parentérale par gavage, ou encore l'administration de surfactants (83). La sévérité de l'IVH peut être classifiée selon la classification de Papile qui se base sur la présence, la quantité et l'étendue de l'hémorragie et la présence de dilatation ventriculaire avec les stades I et II étant les moins sévères et les stades III et IV étant plus sévères (84). Chez le nouveau-né prématuré, le diagnostic d'IVH est associé à un risque plus élevé de troubles neurodéveloppementaux incluant des déficits cognitifs, des troubles moteurs ou encore des déficits d'attention (85). La présence d'IVH de stade I ou II chez les prématurés de moins de 28 semaines augmente d'environ deux fois l'incidence de déficits cognitifs, de surdité et de paralysie cérébrale à 2 ans d'âge corrigé et cette incidence augmente avec la sévérité de l'IVH (stade III et IV) (86, 87). De plus, l'IVH est associé à une diminution des performances scolaires à l'adolescence avec environ 50 % des prématurés (<28 semaines) ayant des difficultés d'apprentissage et environ 20 % ayant besoin d'éducation spécialisée (88). Donc, l'IVH augmente à long terme le risque de déficits neurodéveloppementaux chez les grands prématurés.

Une autre atteinte cérébrale fréquente chez les prématurés est la lésion de la matière blanche (WMI) dont la forme la plus connue est la leucomalacie périventriculaire (PVL) (89). La diminution de l'incidence d'IVH fait en sorte que les WMI sont la lésion cérébrale ayant un impact plus important sur le neurodéveloppement des prématurés avec un risque de 50 % d'être atteint de WMI (66, 90). Les causes principales du WMI du prématuré sont les épisodes d'hypoxie-ischémie et/ou d'infection/inflammation pré- et postnatale (91). Chez les grands prématurés atteints de WMI, jusqu'à 10 % courent le risque de souffrir de paralysie cérébrale et jusqu'à 50 % courent le risque d'avoir des problèmes cognitifs, comportementaux ou sociaux

(66, 92). La WMI est le sujet principal de cette thèse et sera discutée plus en détail dans la section 4 de ce chapitre.

### **1.2.4 Effets cumulatifs des comorbidités chez les prématurés**

Bien que ces différentes comorbidités aient été présentées séparément, les nouveau-nés prématurés sont à risque de souffrir de plus d'une de ces pathologies durant leur séjour au NICU (93, 94). En étudiant le risque de ROP, de BPD et d'atteintes cérébrales dans une cohorte de prématurés de poids extrêmement faible, l'étude de Schmidt *et al.* a démontré qu'environ 41 % de ces prématurés avaient une seule de ces atteintes et 16 % avaient plus de deux de ces comorbidités (93). Par ailleurs, il a été noté que la présence de plus d'une comorbidité chez les prématurés augmentait de manière additive le risque d'être atteint de déficits neurodéveloppementaux (93, 95, 96). Parmi les comorbidités présentées dans cette section, les lésions cérébrales seules ou en combinaison avec au moins une autre comorbidité représentaient le meilleur facteur de prédiction de déficits neurodéveloppementaux durant l'enfance (95, 97). L'effet cumulatif de ces différentes comorbidités pourrait découler en partie de la présence d'une composante inflammatoire qui rend le cerveau vulnérable aux insultes secondaires (98). Donc, le cerveau de l'enfant prématuré est plus vulnérable aux atteintes inflammatoires durant cette période cruciale du développement du cerveau.

## **2. Le système nerveux central**

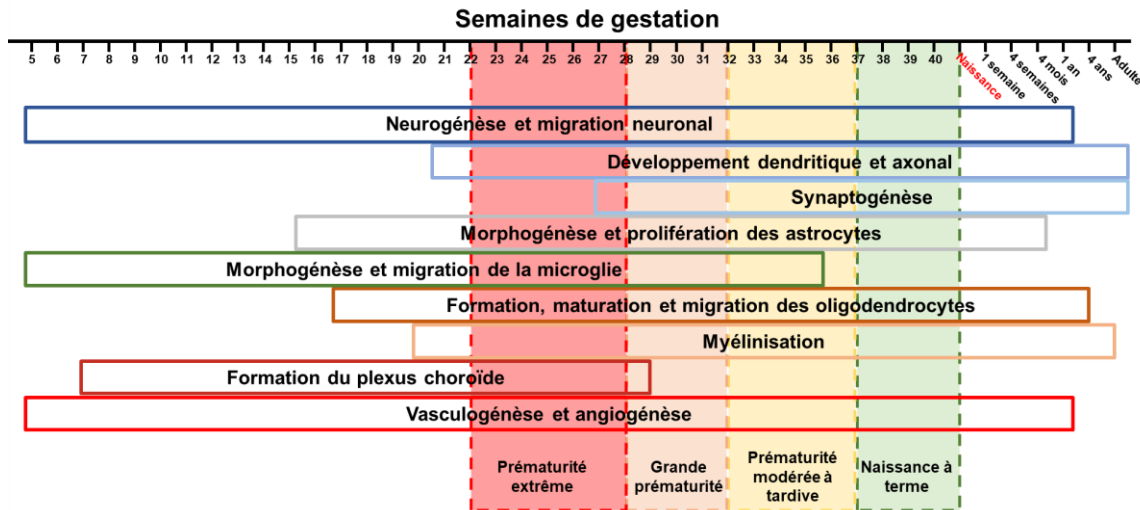
### **2.1 Généralités**

Le système nerveux central (SNC), de pair avec le système nerveux périphérique, coordonne le fonctionnement du corps humain par le biais des stimuli perçus, et des réactions ou adaptations en réponse à ces derniers. Le SNC est composé du cerveau, du cervelet, du tronc cérébral et de la moelle épinière. Le SNC est séparé en substance blanche et en substance grise. La substance blanche est composée principalement d'axones myélinisés, d'oligodendrocytes et d'astrocytes fibreux (99). Elle est localisée entre le cortex et les ganglions de la base et assure



le lien entre les différentes régions cérébrales (99, 100). La substance grise est composée principalement des corps cellulaires des neurones, des cellules gliales (microglie, astrocyte et oligodendrocyte), des axones non myélinisés et des capillaires. Dans le cerveau, la substance grise est distribuée dans le cortex cérébral et les ganglions de la base. La substance grise est responsable entre autres du contrôle des mouvements, de la mémoire et des émotions (101). La substance grise se développe rapidement durant les premières années de vie de l'enfant pour atteindre un plateau alors que la substance blanche continue d'augmenter de volume jusqu'à la fin de la quarantaine (101). Donc, le développement du système nerveux débute durant la période embryonnaire et se poursuit jusqu'à l'âge adulte.

Comme illustré sur la figure 1, une majorité des processus neurodéveloppementaux surviennent durant la période périnatale (102). Plus particulièrement, la naissance prématurée survient durant une période où le SNC est immature et vulnérable à différentes atteintes incluant l'inflammation. Les avancées dans les techniques d'imagerie ont permis de détecter chez les prématurés la présence d'atteintes de la substance blanche et la substance grise qui sont regroupées sous le terme d'encéphalopathie du prématuré (103-105). Ces lésions sont la conséquence d'une augmentation de la mort des cellules neuronales, une altération de la maturation des oligodendrocytes et une activation de la microglie et des astrocytes (66). Ceci altère la trajectoire normale du développement cérébral et peut amener des atteintes cognitives, motrices et comportementales (66). Dans la prochaine section, nous détaillerons le rôle de chacun de ces types cellulaires dans le développement normal du cerveau.



**Figure 1. Ligne temporelle du neurodéveloppement périnatal chez l'humain**

Les principales étapes du neurodéveloppement humain à partir de la 5<sup>e</sup> semaine de gestation sont illustrées. Les types de naissances sont mis en évidence pour démontrer les étapes à risque durant la naissance prématurée. Figure adaptée de Mottahedin *et al.* (102)

## 2.2 Rôles des cellules du système nerveux central

Le SNC est principalement composé des neurones et des cellules gliales qui englobent les oligodendrocytes, les astrocytes et la microglie. Chacun de ces types cellulaires joue des rôles importants durant le neurodéveloppement et présente une distribution différente selon la région à l'étude et des niveaux de vulnérabilité différente aux insultes (106, 107). Dans cette section, nous présenterons les grandes lignes du développement et des fonctions de ces types cellulaires en portant une attention particulière à la microglie et aux astrocytes.

### 2.2.1 Neurones

Tout d'abord, les neurones sont les cellules responsables de la réception, de l'intégration et de la transmission de l'influx nerveux. Durant le neurodéveloppement, l'établissement du réseau neuronal dans le SNC passe à travers différentes étapes hautement régulées qui incluent la neurogénèse, l'axonogénèse et la synaptogénèse (Fig. 1) (102). La neurogénèse débute dans

la zone ventriculaire où les cellules précurseurs neurales (NPC) se différencient en neurone (108). Les cellules souches neurales peuvent aussi donner naissance aux cellules gliales (astrocyte et oligodendrocyte). Par la suite, les neurones migrent vers leur destination sous le contrôle de différentes molécules, dont les molécules du cytosquelette, les molécules modifiant la glycosylation et la Reelin (108, 109). Une fois à leur destination, les neurones matures vont élonger leurs axones vers des neurones cibles pour former les synapses (108, 109). Durant ces processus, les neurones sont hautement vulnérables aux atteintes lésionnelles, dont l'inflammation, l'hypoxie-ischémie et l'excitotoxicité (102).

### **2.2.2 Oligodendrocytes**

Les oligodendrocytes sont les cellules responsables de la formation et de la réparation de la myéline dans le cerveau pour permettre une conduction neuronale rapide (110). Chez l'humain, la myélinisation est un processus hautement régulé qui débute durant la gestation et se poursuit jusqu'à l'âge adulte (111, 112). Les oligodendrocytes sont générés à partir des cellules précurseurs des oligodendrocytes (OPC) provenant des zones germinatives du cerveau, dont la zone sous-ventriculaire (SVZ) et la zone sous-granulaire (SGZ) (113). Les OPC prolifèrent dans les zones germinatives et puis elles migrent dans le cortex cérébral et passent à travers différents stades de différenciations incluant les préoligodendrocytes jusqu'à devenir des oligodendrocytes matures capables de former la gaine de myéline entourant les axones (113, 114). Outre leur rôle dans la myélinisation, les oligodendrocytes participent à la survie axonale par la production de lactate et des facteurs de croissance incluant le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF) et l'IGF-1 (115-119). La naissance prématurée survient dans une période développementale où il y a une grande population de préoligodendrocytes hautement vulnérables aux stimuli extrinsèques incluant l'inflammation qui peuvent induire la mort cellulaire et/ou un arrêt de la maturation des préoligodendrocytes (89, 120).

## 2.2.3 Microglie

### 2.2.3.1 Origine et fonctions de la microglie

Les cellules microgliales forment la défense immunitaire principale du SNC et sont la première population de cellule à répondre aux dommages cellulaires et à la présence de corps étrangers ou pathogènes dans le cerveau. La microglie dérive de la différenciation des précurseurs érythromyéloïde provenant du sac vitellin (121). Autour de la 5<sup>e</sup> semaine de gestation, la microglie envahit le cerveau par le plexus choroïde, les méninges et les ventricules et entre dans le parenchyme cérébral autour de la 10<sup>e</sup> semaine de gestation (122, 123). Une fois dans le parenchyme, la microglie migre vers les couches corticales superficielles, parallèlement au développement des faisceaux axonaux, et adopte une morphologie ramifiée similaire à la microglie adulte (123-125). La population de microglie mature se maintient durant le neurodéveloppement et à l'âge adulte par la prolifération et l'autorenouvellement des cellules microgliales sous le contrôle de l'interleukine 1 bêta (IL-1 $\beta$ ) (126-129). À l'état homéostatique, la microglie se trouve sous une forme ramifiée et surveille constamment l'environnement cellulaire et est rapidement activée en réponse à un agent pathogène ou des dommages tissulaires (130, 131).

La microglie est la cellule responsable de la réponse immunitaire innée dans le cerveau (132-134). Lorsque des dommages stériles ou infectieux surviennent, la microglie détecte les motifs moléculaires associés au pathogène (PAMP) et les motifs moléculaires associés au danger (DAMP) par le biais des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR) incluant les Toll Like receptors (TLR 1-9) (135, 136). L'activation de ces récepteurs enclenche des cascades de signalisations intracellulaires dans le but d'éliminer les agents pathogènes et/ou les cellules endommagées pour réinstaurer un état homéostatique (132). Chez les prématurés, l'immaturation de la réponse inflammatoire peut entraîner un état de suractivation causant à long terme des dommages cérébraux (137).

Outre son rôle connu dans la réponse immunitaire innée, la microglie participe aussi à différents processus neurodéveloppementaux incluant la synaptogénèse, la neurogenèse, la myélinisation et la vascularisation cérébrale (136, 138, 139).

Tout d'abord, la microglie joue un rôle dans la synaptogénèse en participant à l'élagage synaptique par l'activation du système du complément (140, 141). Il a été démontré que les synapses recouvertes des protéines C1q et C3 étaient phagocytées par la microglie après la reconnaissance du complément C3 par le récepteur CR3 qui est seulement exprimé par la microglie dans le SNC (136). La diminution ou l'augmentation de l'activation de la microglie durant la période néonatale altère la maturation des synapses, l'élagage synaptique et la connectivité cérébrale ce qui peut induire des changements comportementaux tels qu'une diminution des interactions sociales chez la souris à l'âge adulte (142-144).

La microglie participe au processus normal de neurogenèse et de maturation des neurones durant le neurodéveloppement par une communication bidirectionnelle entre les neurones et la microglie. D'une part, les NPC produisent des facteurs chémoattractants qui attirent la microglie dans la zone ventriculaire et la SVZ pour favoriser la phagocytose des NPC dans le but d'assurer le développement approprié de la taille des différentes structures du SNC (145-148). Chez la souris embryonnaire, l'absence de microglie a induit une augmentation du nombre de neurones glutamatergiques, une distribution anormale des interneurones et une augmentation de l'épaisseur et la défasciculation des faisceaux axonaux du corps calleux (149, 150). D'autre part, la microglie relâche des facteurs neurotrophiques, dont l'IGF-1 favorisant la survie des neurones de la couche 5 du néocortex et des NPC dans le SVZ (147, 151, 152). Donc, la microglie participe à la neurogenèse et la synaptogénèse par un contrôle entre les processus de survie neuronale et d'élimination des cellules et synapses inutiles.

Par ailleurs, la microglie participe à la myélinisation durant le neurodéveloppement et la remyélinisation à la suite de lésions cérébrales (153). Il a été démontré *in vivo* et *in vitro* chez le rat que la microglie stimulait la différenciation, la maturation et la survie des OPC par l'expression de différentes cytokines incluant l'IL-6 et l'IL-1 $\beta$  (151, 154). De plus, la microglie induit la production des composantes de la gaine de myéline et participe à la phagocytose des débris de myéline (155, 156). Finalement, la microglie participe à la vascularisation du cerveau et de la rétine en augmentant la complexité et la densité du réseau vasculaire. Chez la souris, la microglie est nécessaire à l'élimination des vaisseaux en excès et à l'alignement des cellules

endothéliales au cours de la fusion de vaisseaux sanguins (anastomose) durant le neurodéveloppement (157-159).

Somme toute, la microglie est une cellule multifonctionnelle jouant un rôle dans différents processus cruciaux au neurodéveloppement.

### 2.2.3.2 Activation et polarisation de la microglie

À l'état homéostatique, la microglie se trouve dans un état dit de repos où elle surveille constamment l'environnement tissulaire. Une fois qu'elle reconnaît un PAMP ou DAMP, la microglie est activée et sa morphologie change vers une forme amiboïde. La microglie activée se trouve sur un vaste spectre de polarisation dont les extrêmes sont dits microglie de type M1 (pro-inflammatoire) et microglie de type M2 (anti-inflammatoire) (160). La microglie M1 est liée à la réponse pro-inflammatoire/neurotoxique et la microglie M2 à la réparation tissulaire, l'immunorégulation et les réponses immunitaires de type II (161, 162).

La polarisation de la microglie est un phénomène hautement étudié *in vitro* où différents agents induisent un profil de microglie de type M1 ou de type M2 (162). Par exemple, l'exposition aux lipopolysaccharides (LPS) induit un profil de microglie de type M1 qui induit la mort neuronale, la mort et l'arrêt de la maturation des oligodendrocytes et une activation des astrocytes neurotoxiques (162-165). La stimulation de la microglie avec des cytokines comme l'IL-4 ou l'IL-13 induit un profil de microglie M2 diminuant l'expression de gènes pro-inflammatoires, et augmentant les gènes anti-inflammatoires et de la réparation tissulaire (164, 166-168).

Ce concept de polarisation a aussi été appliqué *in vivo* dans des modèles de neuropathologies néonatales. L'administration systémique de LPS suivie d'une période d'HI chez le rat néonatal induit une activation de la microglie de type M1 dans les 24 h suivant le début de la lésion (169). Similairement, l'induction d'IVH chez le rat par injection intraventriculaire de thrombine induit une augmentation de l'expression de gènes de la microglie M1 durant la période aigüe de l'inflammation (170). À l'opposé, des études utilisant la génomique, la transcriptomique et la protéomique ont mis de l'avant la présence de

phénotypes de microglies allant au-delà de la simple catégorisation M1 et M2 (171-173). De plus, il a été démontré *in vivo* que des sous-populations de microglie et de macrophages pouvaient exprimer simultanément des marqueurs associés à l'activation M1 et l'activation M2 dans divers modèles animaux incluant l'HI néonatale, les traumatismes craniocérébraux ou encore la maladie d'Alzheimer (174-177). Ces différences entre l'activation de la microglie *in vivo* et *in vitro* pourraient provenir de la complexité de la réponse inflammatoire et des interactions cellulaires présentes dans le SNC (136). Donc, la caractérisation en activation M1 ou M2 représente une simplification des différents états d'activation que la microglie peut acquérir *in vivo* (133, 136, 160, 171).

À la lumière des rôles de la microglie dans le neurodéveloppement, il est important de tenir compte l'impact de la modulation de l'activation de la microglie sur ces processus dans le traitement de la neuroinflammation.

## **2.2.4 Astrocytes**

### *2.2.4.1 Origine et fonctions des astrocytes*

Les astrocytes sont les cellules les plus nombreuses du SNC et tirent leur nom de leur forme étoilée (178, 179). Les astrocytes dérivent des NPC de la zone ventriculaire qui sous le contrôle des facteurs NFIA et Sox9 vont se différencier en cellules précurseurs des astrocytes et puis ces cellules migrent à travers le SNC à travers les prolongements des cellules gliales radiales (180-182). Une fois arrivées à destination, les cellules précurseurs des astrocytes vont proliférer et devenir des astrocytes matures exprimant la protéine acide fibrillaire gliale (GFAP) (183). Dans la substance blanche, les astrocytes adoptent une morphologie fibreuse et dans la substance grise, elles sont protoplasmiques (184, 185). Tant dans la substance blanche que la substance grise, les astrocytes occupent différentes fonctions essentielles au maintien de l'homéostasie dans le SNC dont le maintien de l'intégrité de la BBB, la synaptogénèse, la recapture des neurotransmetteurs, la production de facteurs trophiques supportant les neurones et les oligodendrocytes et le contrôle de la réponse immunitaire (179, 186-189).

#### 2.2.4.2 Activation et polarisation astrocytaire

En réponse à divers stimuli, les astrocytes deviennent activés et induisent des changements phénotypiques se trouvant sur un vaste spectre d'activation dont les extrêmes sont classifiés comme astrocyte de type A1 (neurotoxique) et astrocyte de type A2 (neuroprotecteur) (190). Jusqu'à présent, la majorité des études ayant évalué la polarisation des astrocytes ont été réalisées *in vitro* ou dans des modèles animaux matures (163, 190-192). L'étude de Zamanian *et al.* fut parmi les premières à démontrer, chez des souris âgées de 30 à 35 jours, qu'un épisode d'HI induisait les astrocytes A2 et l'exposition systémique au LPS induisait les astrocytes A1 (191). Dans cette étude, les astrocytes A1 exprimaient une forte proportion de gènes reliés à la réponse immunitaire dont les gènes de la cascade du complément et de présentation d'antigènes et les astrocytes A2 exprimaient des gènes liés au cycle cellulaire, aux facteurs de transcription et à l'activité métabolique (191). Par le biais d'expériences *in vivo* et *in vitro*, Liddelow *et al.* a démontré la présence de marqueurs spécifiques aux astrocytes A1, aux astrocytes A2 et des marqueurs panréactifs exprimés chez les astrocytes A1 et A2 (tableau I) (163). Les astrocytes A1 causent une augmentation de la mort cellulaire des neurones et des oligodendrocytes et perdent leur capacité de stimuler la survie neuronale, la synaptogénèse ainsi que la phagocytose des synapses et des débris de myéline (163). Les astrocytes A1 sont fortement exprimés durant la neurodégénérescence, l'inflammation systémique et les lésions traumatiques cérébrales (163, 192-194). Les astrocytes A2 présentent des actions neuroprotectrices en augmentant la réparation tissulaire, la survie des neurones et des oligodendrocytes et la formation de la cicatrice gliale astrocytaire, mais leur rôle est moins bien connu que celui des astrocytes A1 (190). Donc tout comme la microglie, l'activation astrocytaire peut jouer un rôle neuroprotecteur ou neurotoxique.



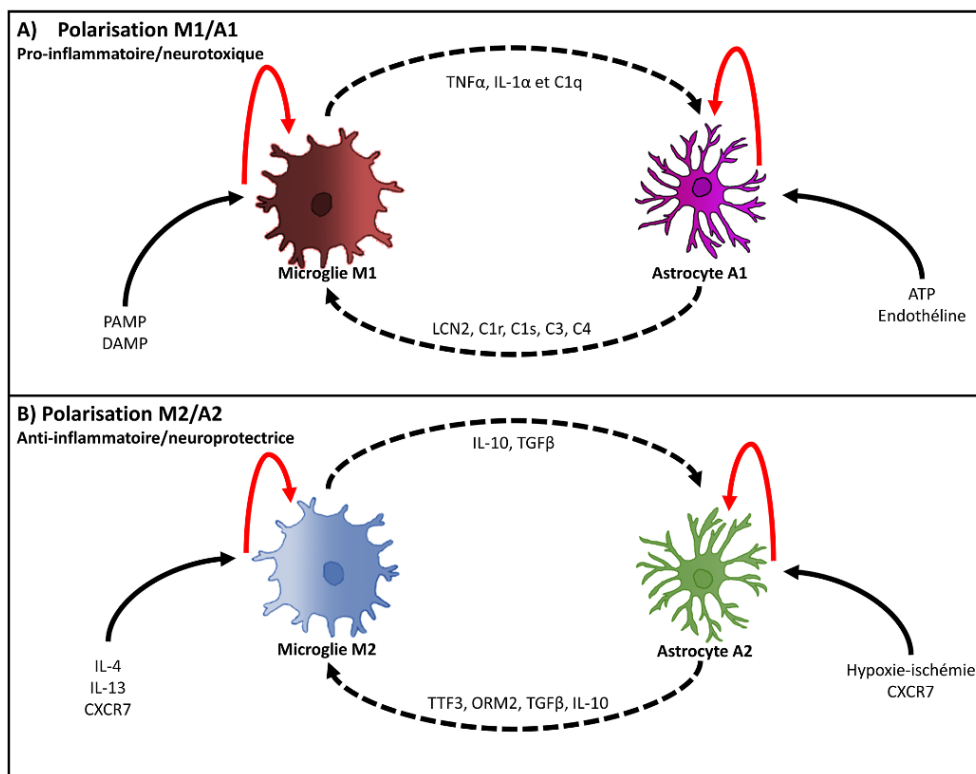
**Tableau I. Marqueurs associés à l'activation astrocytaire**

Type de marqueurs	Gènes
Pan réactif	<i>Aspg ; Cd44 ; Cp ; Cxcl10 ; Gfap ; Hsbp1 ; Lcn2 ; Osmr ; Slpr3 ; Serpina3n ; Steap4 ; Timp1 ; Vim</i>
Spécifique à A1	<i>Amigo2 ; Fbln5 ; Fkbp5 ; Gbp2 ; Ggta1 ; H2-D1 ; H2-T23 ; ligp1 ; Psmb8 ; Serping1 ; Srgn ; Ugt1a1</i>
Spécifique à A2	<i>B3gnt5 ; Clcf1 ; Cd109 ; Cd14 ; Emp1 ; Ptgs2 ; Ptx3 ; S100a10 ; Slc10a6 ; Sphk1 ; Tgm1 ; Tm4sf1</i>

### 2.3 Communication entre les astrocytes et la microglie durant l'activation gliale

À cause de la similarité des stades d'activations de ces deux cellules, il a été émis de manière générale que la réponse pro-inflammatoire/neurotoxique est associée à la microglie et aux astrocytes A1 et la réponse anti-inflammatoire à la microglie M2 et aux astrocytes A2 (Fig. 2) (195, 196). En réponse à un stimulus nocif, la microglie est la première cellule activée dans le SNC suivi par l'activation astrocytaire qui peut venir moduler la réponse microgliale et établir ainsi une boucle de rétroactions favorisant la réponse pro- ou anti-inflammatoire (197).

Tout d'abord, l'activation de la microglie M1 induit à la polarisation des astrocytes vers un profil A1 qui à leur tour peuvent amplifier la réponse microgliale et établir ainsi une boucle d'amplification de la réponse pro-inflammatoire (Fig. 2a). Dans l'étude de Lidellow *et al*, il a été démontré tant *in vivo* qu'*in vitro* que la microglie activée par le LPS induit un profil A1 chez les astrocytes par le biais de la sécrétion de l'IL-1 $\alpha$ , du TNF- $\alpha$  et de la protéine C1q (163). En retour, les astrocytes favorisent la polarisation de la microglie M1 par la production des protéines de la cascade du complément incluant le C3 (198, 199). Outre les facteurs du complément, les astrocytes A1 peuvent favoriser la microglie M1 en sécrétant la lipocaline 2 (LCN2) et le maintien de la polarisation A1 de façon autocrine et/ou paracrine (200-204).



**Figure 2. Communication bidirectionnelle entre microglie et astrocytes activés**

En réponse aux PAMP et DAMP, la microglie adopte un profil M1 qui peut induire l'activation d'astrocytes A1. À leur tour, les astrocytes A1 produisent des facteurs stimulant l'activation de la microglie M1 induisant ainsi une boucle de rétroaction amplifiant la réponse pro-inflammatoire et neurotoxique. Similairement, une boucle de rétroaction existe entre la microglie M2 et les astrocytes A2 pour favoriser la réponse anti-inflammatoire et la réparation tissulaire. Figure adaptée de Liu *et al.* (196)

Bien que le lien entre la microglie M2 et les astrocytes A2 soit moins connu, les études récentes ont démontré un effet synergique entre leur interaction (Fig. 2b). La production d'IL-10, une cytokine anti-inflammatoire, par la microglie M2 favorise l'établissement d'astrocytes A2 qui relâchent du TGF $\beta$  pouvant amplifier la réponse anti-inflammatoire microgliale (205). Parallèlement, les astrocytes peuvent sécréter des protéines favorisant un profil anti-inflammatoire et neuroprotecteur de la microglie (206-208). Parmi ces protéines, il a été démontré que la production d'IL-10 par les astrocytes diminue l'activation de la microglie

ce qui induit un effet neuroprotecteur (206, 209). Outre l'IL-10, le facteur en trèfle 3 (TFF3) et l'orosomucoïde 2 (ORM2) sont des facteurs produits par les astrocytes qui peuvent diminuer l'activation de la microglie (207, 208, 210).

Compte tenu de la dépendance des réponses M1/A1 et de M2/A2, la modulation de la réponse microgliale et astrocytaire est une cible thérapeutique intéressante pour diminuer l'impact de la neuroinflammation durant le développement cérébral chez le prématuré. L'approche devrait induire une diminution de la polarisation M1/A1 pro-inflammatoire et neurotoxique et une augmentation de la réponse M2/A2 anti-inflammatoire et neuroprotectrice.

### **3. L'IRM : un outil d'évaluation non invasive des lésions cérébrales**

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) a permis de mieux comprendre le développement cérébral à travers différents âges de la vie. Les études de l'IRM durant la période neurodéveloppementale ont permis une meilleure compréhension des différences dans la trajectoire développementale du cerveau chez l'enfant né prématurément par rapport à l'enfant né à terme. Cette section de l'introduction détaillera les principes de base de l'IRM et son utilisation chez les nouveau-nés prématurés.

#### **3.1 Principe de base de l'imagerie par résonance magnétique**

L'IRM se base sur les propriétés magnétiques intrinsèques des atomes ayant un nombre impair de protons et/ou de neutrons (211). Parmi ces atomes, l'hydrogène ( $^1\text{H}$ ) est le plus couramment utilisé lors d'IRM puisqu'elle se trouve en grande quantité dans les tissus humains qui sont composés de plus de 70 % d'eau. Les atomes ayant des propriétés magnétiques possèdent un moment magnétique ou spin. Lorsque ces atomes sont placés dans un champ magnétique élevé et homogène, ils s'alignent parallèlement au champ magnétique. Puis, une onde de radiofréquence (RF) est appliquée perpendiculairement au champ magnétique ce qui bascule l'orientation des spins. À l'arrêt de l'onde RF, les spins retournent à leur état de repos

ce qui induit un signal électromagnétique qui sera capté par les antennes de la machine d'IRM. Le retour à la position d'origine s'effectue par un phénomène de relaxation qui peut être séparé en deux composantes soient : la relaxation longitudinale (T1) et la relaxation transverse (T2). La relaxation longitudinale ou T1 réfère au temps requis pour que la magnétisation longitudinale (aimantation parallèle au champ magnétique) retourne au 2/3 de sa valeur au repos. La valeur T1 dépend de la mobilité des atomes d'hydrogène ou des molécules auxquels ils sont engagés, donc le T1 sera plus court si l'atome est lié à de grosses molécules. La relaxation transverse ou T2 représente le temps pour que la magnétisation transverse (aimantation perpendiculaire au champ magnétique) perde le 2/3 de sa valeur initiale (211). L'application d'une séquence d'IRM permet d'obtenir une image du tissu à l'étude. Cette séquence est composée de cycles d'impulsions d'ondes RF avec un temps de répétition (TR) et un temps d'écoute (TE) (212). Le temps de répétition est le temps entre 2 cycles consécutifs d'impulsion et le temps d'écoute est le temps entre l'émission de l'onde et la mesure du signal capté.

## **3.2 Techniques d'IRM utilisées chez le nouveau-né prématuré**

### **3.2.1 IRM conventionnelle**

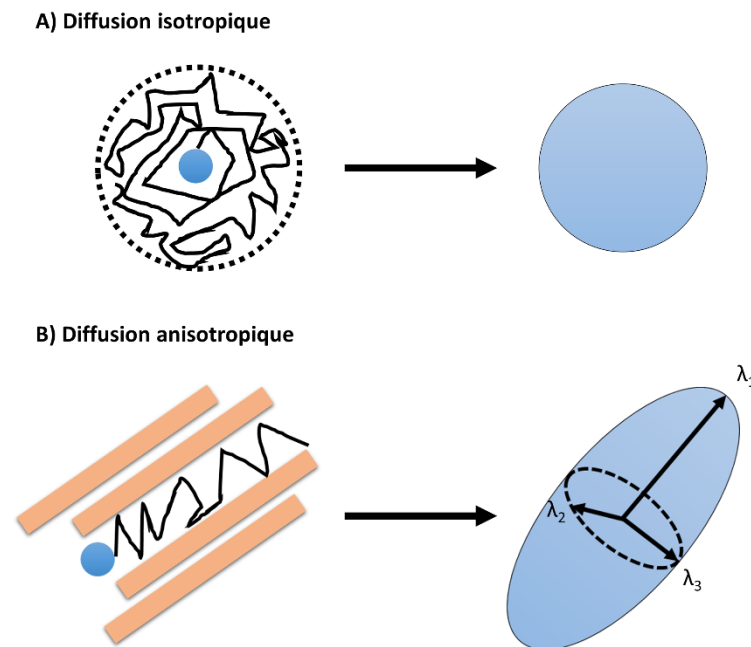
L'IRM conventionnelle est basée sur les constantes de relaxation T1 et T2 des atomes  $^1\text{H}$  de l'eau. La modulation du TR et du TE permet d'obtenir des images de contrastes différents à l'IRM conventionnelle. Un TR court accompagné d'un TE court est associé à une image pondérée en T1. Un TR long associé à un TE long permet d'obtenir une image pondérée en T2. Les images pondérées en T1 ou en T2 permettent de délimiter la substance grise de la substance blanche et aussi de séparer la substance blanche myélinisée et non myélinisée (212). La substance blanche non myélinisée apparaît sombre sur les images pondérées en T1 et brillantes sur les images pondérées T2 (213). À l'opposé, la substance blanche myélinisée est brillante sur les images pondérées en T1 et elle est sombre sur les images pondérées en T2 (213). Ces changements du signal dans la substance blanche sont concomitants à une augmentation du contraste entre la substance grise et la substance blanche (91, 214).

L'analyse de l'intensité des signaux en T1 ou en T2 dans la substance blanche permet d'identifier la présence de lésions dans le cerveau. La leucomalacie périventriculaire est représentée par une zone périventriculaire hypointense à l'image T1 et hyperintense à l'image T2 (215). Les lésions focales sont caractérisées par des signaux hyperintenses en T1 et souvent hypointenses en T2. La présence de zones diffuses de signaux hyperintenses en image T2 est reliée aux WMI diffuses (216, 217). La présence d'hémorragie est caractérisée par un signal élevé à l'image T1 et diminué en T2 (215). À partir de ces changements de signaux, différents systèmes de classification ont été développés pour évaluer la présence et la sévérité des lésions dans le cerveau des prématurés. La majorité de ces systèmes se basent sur le nombre, la taille et la localisation des changements d'intensité sur les images T1 et T2 des IRM effectués à l'âge équivalent au terme (218, 219). Ces classifications permettent de séparer la sévérité des atteintes de la substance blanche en quatre catégories : aucune, légère, modérée et sévère (219). Par ailleurs, la capacité de l'IRM conventionnelle de délimiter la substance blanche de la substance grise permet la mesure du volume de différentes régions du cerveau (212). Cette technique permet de comparer le développement des structures cérébrales chez le prématuré par rapport au développement chez les enfants nés à terme.

### **3.2.2 Imagerie pondérée par la diffusion**

L'imagerie pondérée en diffusion (DWI) est une technique d'IRM basée sur la mesure du mouvement brownien des molécules d'eau. La DWI est possible grâce à l'ajout d'une paire de gradients à la séquence d'IRM. Le premier gradient induit le déphasage des spins et le second rephase les spins. Les spins qui sont restés immobiles durant le déphasage et le rephasage préservent l'intensité de leur signal. Alors qu'un spin ayant eu un déplacement n'aura pas un rephasage complet et donc son signal sera atténué (220). La perte du signal à la suite du mouvement de l'eau est influencée par la microstructure du tissu qui inclut les cellules présentes, la gaine de myéline, la présence de microtubules et de neurofilaments (221). La présence de ces barrières limite la diffusion dans les tissus et donc, la diffusivité de l'eau dans le tissu est appelée diffusion apparente (212, 222). La diffusion peut être visualisée sous la forme d'une sphère pour la diffusion isotropique ou sous la forme d'un ellipsoïde pour la diffusion anisotropique (Fig. 3)

(221). La diffusion isotropique équivaut à une diffusion similaire dans toutes les directions et la diffusion anisotropique est une diffusion préférentielle dans une direction seulement (221). La diffusion isotropique est retrouvée principalement dans le CSF et la substance grise (221, 223). La diffusion est anisotropique dans la substance blanche due à la présence de la myéline et de l'organisation des faisceaux de substance blanche.



**Figure 3. Représentation de la diffusion isotropique et anisotropique**

A) La diffusion isotropique est représentée par une sphère. B) En présence de contraintes physiques, la diffusion est dite anisotropique et est représentée par un ellipsoïde.

L'application d'un tenseur de diffusion à l'image obtenu par DWI permet d'évaluer la diffusivité dans toutes les directions du voxel d'intérêt. La diffusion peut être quantifiée selon les trois axes principaux qui sont représentés par trois valeurs propres ( $\lambda_1$ ,  $\lambda_2$  et  $\lambda_3$ ) (Fig. 3). À partir du tenseur de diffusion, il est possible de dériver la valeur de la diffusivité axiale (AD), de la diffusivité radiale et de la diffusivité moyenne. La diffusivité axiale (AD) est la diffusion

dans l'axe parallèle à l'orientation de la fibre et est calculée à partir de la valeur  $\lambda_1$ . La diffusivité radiale (RD) est calculée à partir de la moyenne des valeurs propres  $\lambda_2$  et  $\lambda_3$  et représente la diffusion dans les axes perpendiculaires à l'orientation principale de la fibre. La diffusivité moyenne (MD) mesure la valeur moyenne de diffusion dans le voxel d'intérêt et est calculée par la moyenne des trois valeurs propres ( $\lambda_1$ ,  $\lambda_2$  et  $\lambda_3$ ). De plus, cette technique permet d'évaluer la valeur de l'anisotropie fractionnelle (FA). La FA mesure la restriction de la diffusion de l'eau dans une direction par rapport aux autres directions. La valeur de FA varie entre 0 et 1 où 0 est une diffusion isotropique et 1 est une diffusion anisotropique.

Les changements dans les valeurs de diffusivité peuvent corrélérer avec des atteintes de la microstructure de la substance blanche. Dans le cerveau mature, la valeur de la diffusivité axiale a été associée à l'intégrité axonale et la valeur de la diffusivité radiale à l'intégrité de la myéline (220, 224-228). Dans le cerveau néonatal où la myéline est peu présente, les changements de la diffusivité radiale peuvent découler d'une augmentation de la perméabilité membranaire, une diminution du diamètre axonale et l'activation astrocytaire (224, 229-231). Durant le développement du cerveau, la valeur des paramètres de la diffusivité (AD, RD et MD) diminue et la valeur de FA augmente à la suite de la maturation du cerveau et à la myélinisation (232-234).

### **3.2.3 Spectroscopie par résonance magnétique**

La spectroscopie par résonance magnétique (MRS) mesure dans un voxel la concentration de différents métabolites présents dans le tissu cérébral à l'étude. Cette technique d'imagerie permet d'évaluer l'état métabolique cérébrale à l'état physiologique et durant les neuropathologies (222). La MRS est basée sur les principes de base de l'IRM avec la combinaison du concept de déplacement chimique. Le déplacement chimique repose sur le concept qu'un même noyau nucléaire aura des fréquences de résonance différentes en fonction du nuage électronique de la molécule à laquelle elle appartient (212). Ce déplacement chimique est exprimé en partie par million (PPM). L'enregistrement de ces signaux permet de reconstruire des spectres de l'amplitude du signal en fonction de la fréquence. L'amplitude du signal dépend

de l'abondance de la molécule à l'étude. Parmi les noyaux nucléaires utilisés en MRS, on retrouve l'hydrogène ( $^1\text{H}$ ), le phosphore ( $^{31}\text{P}$ ), le carbone ( $^{13}\text{C}$ ) et le fluor ( $^{19}\text{F}$ ) (235). La MRS du  $^1\text{H}$  ou  $^1\text{H}$ -MRS est la forme la plus utilisée *in vivo* pour l'évaluation de la concentration de différents métabolites (236). Les métabolites mesurés par MRS dans le cerveau permettent d'évaluer différentes composantes, dont l'intégrité neuronale, la neurotransmission, le métabolisme énergétique, la myéline et l'intégrité membranaire (222). Parmi les métabolites évalués par MRS, la concentration en N-acétylaspartate (NAA) est la plus couramment évaluée et représente l'intégrité neuronale (237). La concentration en NAA augmente durant le neurodéveloppement et est un marqueur de la maturation neuronale (238, 239).

### **3.3 L'IRM comme outil de détection chez le prématuré**

Chez le nouveau-né prématuré, les lésions cérébrales peuvent être évaluées par trois méthodes d'imagerie soient : l'échographie crânienne, la tomodensitométrie et l'IRM.

L'échographie crânienne utilise l'ultrason pour créer les images du cerveau. Cette méthode est possible grâce à la présence des fontanelles qui permet d'imager le cerveau à travers celles-ci (240). L'échographie crânienne est une technique relativement sécuritaire, peu coûteuse et permet l'évaluation en série de la lésion chez le prématuré (241). L'échographie crânienne permet la détection et le suivi de l'évolution de l'IVH, de la dilatation des ventricules cérébraux, de la PVL cystique et de l'hémorragie du cervelet (242). Cependant, la PVL non cystique et les WMI diffuses sont moins bien détectées par l'échographie crânienne (219, 242). Outre cela, la qualité de l'image à l'échographie crânienne diminue jusqu'à ne plus être possible avec la maturation de la boîte crânienne et la fermeture des fontanelles (213).

La tomodensitométrie est une technique utilisant les rayons ionisants pour visualiser le tissu cérébral. La tomodensitométrie permet d'identifier des lésions similairement à l'échographie crânienne (91). L'utilisation de cette méthode d'imagerie est limitée chez le nouveau-né, car elle utilise des rayons ionisants, demande le déplacement du NICU et a une faible résolution spatiale (243). De plus, l'exposition répétée aux rayons ionisants peut affecter



la trajectoire développementale du cerveau et augmenter le risque de cancer de la tête et du cou dans cette population déjà à risque de cancers pédiatriques (213). La tomodensitométrie est surtout utilisée chez les nouveau-nés ayant un état trop instable pour être imagé par d'autres méthodes (240, 244). Donc, l'utilisation de la tomodensitométrie en clinique requiert une évaluation du rapport risque-bénéfice par l'équipe médicale (245).

Comparativement à l'échographie crânienne et la tomodensitométrie, l'IRM possède une plus grande résolution et permet de détecter les lésions diffuses cérébrales. L'étude de cas de Inder *et al.* fut la première à démontrer l'utilité de l'IRM dans la détection des lésions diffuse de la substance blanche chez les prématurés (246). Par la suite, la comparaison de la détection des lésions cérébrales entre l'IRM et l'échographie crânienne a démontré une supériorité de l'IRM pour évaluer, mais aussi suivre l'évolution des lésions cérébrales chez les enfants prématurés (217, 247-250). Bien que l'IRM permette d'obtenir des images de haute résolution et une meilleure détection des atteintes cérébrales chez le prématuré, elle possède certaines contraintes logistiques qui limitent son utilisation dans la population des nouveau-nés prématurés (213). Tout d'abord, l'IRM nécessite le transport du prématuré du NICU vers l'unité hospitalier où se trouve l'appareil d'IRM ce qui demande une coordination entre les équipes de ces unités (251). Outre cela, la taille des machines d'IRM fait en sorte qu'un incubateur IRM compatible est nécessaire pour imagier le nourrisson (251). De plus, l'accès au nouveau-né est limité dans l'appareil d'IRM. Ces contraintes pourraient être contournées grâce au développement de petits appareils d'IRM pouvant être utilisés directement dans le NICU (252). Ces appareils produisent des images cérébrales de haute qualité chez des nouveau-nés imagés entre 31 et 46 semaines de vie (253, 254). Ils ont aussi permis de suivre l'évolution de l'hydrocéphalie chez un prématuré et le diagnostic rapide d'atteintes ischémiques chez un nouveau-né à terme (255). Ces machines produisent un plus faible niveau de bruit acoustique que l'IRM adulte ce qui diminue le risque d'exposition à des niveaux de bruits dangereux (256). Le développement de ces nouveaux systèmes d'IRM supporte le potentiel de l'IRM dans l'étude des atteintes cérébrales chez les prématurés et permettrait éventuellement de suivre de façon sérieuse l'évolution de ces atteintes et potentiellement la réponse à des agents thérapeutiques.

### **3.4 Évaluation des WMI par IRM**

Chez le nouveau-né prématuré, l'application des techniques d'IRM a permis de mieux évaluer la présence des WMI et aussi de suivre l'évolution de ces lésions. De plus, ces recherches ont amené une meilleure compréhension du développement cérébral chez les prématurés et les enfants nés à terme.

#### **3.4.1 Changement volumétrique à l'IRM conventionnelle**

L'IRM conventionnelle peut aussi être utilisée pour mesurer le volume de différentes régions cérébrales. La naissance prématurée est associée à diminution des volumes de la substance blanche et de la substance grise et une augmentation du volume du CSF (257-259). La présence de WMI chez le prématuré augmente le risque d'altération du volume cérébral (259). Les changements volumiques observés à l'âge équivalent au terme augmentent le risque de déficits cognitifs et moteurs à l'âge de 2 ans et durant l'enfance (260-262). Il a été démontré que ces altérations persistaient chez les jeunes adultes nés prématurés (263). Plus particulièrement, la diminution du volume du corps calleux, du fornix et du thalamus présente un facteur de risque de déficit cognitif dans cette population (263). Bien que le volume de l'hippocampe démontre peu de changements à la naissance, cette structure subit une atrophie dont les signes sont apparents durant l'enfance (264-266). En résumé, l'IRM conventionnelle démontre une diminution du volume de la substance blanche et de la substance grise chez le prématuré qui persiste ou devient plus significative avec l'âge.

#### **3.4.2 Altération de la microstructure de la substance blanche chez le prématuré**

La DTI est utilisée en clinique pour évaluer la microstructure de la substance blanche durant le développement cérébral. Durant le développement normal du cerveau, il y a une diminution de la diffusivité moyenne (MD) et une augmentation de l'anisotropie fractionnelle (FA) (232). Comparativement à des enfants nés à terme, les prématurés présentent des valeurs plus élevées de MD et une diminution de la FA à l'âge équivalent au terme (267, 268). La diminution de la FA observé chez ces enfants était associée à un risque plus élevé d'avoir

souffert de septicémies et à des déficits durant les tests neurodéveloppementaux effectués à l'âge équivalent au terme (238, 269, 270). La présence d'altérations de la microstructure a été notée dans le corps calleux, la capsule interne et le centre semi-ovale (257, 268, 271). Chez le prématuré, la diminution de la valeur de la FA dans ces régions corrèle avec une diminution des scores cognitifs et moteurs à l'âge de 18 mois (272). Ces altérations sont encore présentes chez les jeunes adultes nés prématurément et sont associées à des déficits moteurs (273, 274).

### **3.4.3 La MRS chez le prématuré**

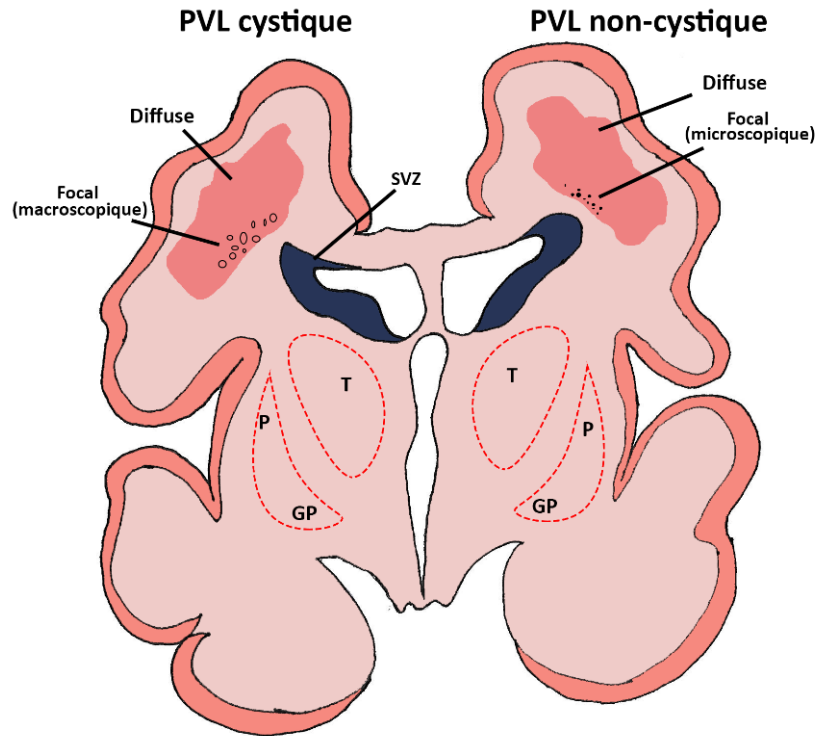
Le NAA est le métabolite le plus couramment mesuré dans le cerveau des enfants prématurés par MRS. La mesure des métabolites dans le cerveau est exprimée en ratio du NAA par rapport à d'autres métabolique incluant le lactate, la choline et la créatine (237). Parmi ces ratios, le ratio entre le lactate et le NAA a démontré la meilleure valeur prédictive du risque d'atteintes neurodéveloppementales à l'âge de 1 an (275). Les épisodes de septicémie chez les prématurés sont un facteur de risque de diminution du lactate (238). Chez les prématurés, on dénote une diminution de la concentration en NAA qui élève le risque de déficits cognitifs et neurodéveloppementaux à 2 ans (237, 276). De plus, cette diminution du NAA persiste à l'adolescence en parallèle à l'atrophie de l'hippocampe (277). Les grands prématurés présentent aussi une diminution de la concentration en créatine, en glutamine et glutamate et en macromolécules dans la substance blanche (267).

En résumé, l'application de différentes techniques en IRM permet d'avoir un portrait global de l'altération de la trajectoire développementale chez les prématurés. Ces changements sont accompagnés d'un risque accru de déficits cognitifs et moteurs pouvant perdurer jusqu'à l'âge adulte. La valeur prédictive des changements observés à l'IRM sur le risque d'atteintes neurodéveloppementales positionne l'IRM comme une technique de choix pour évaluer éventuellement la capacité neuroprotectrice d'agents thérapeutiques chez le prématuré.

## 4. Inflammation et WMI chez le prématuré

Les nouveau-nés prématurés, particulièrement ceux de moins de 32 semaines, courent un risque élevé de souffrir de WMI dont les formes principales sont la PVL cystique et la PVL non cystique (Fig. 4). La PVL cystique et non cystique présente chacune des lésions diffuses de la substance blanche caractérisées par une activation de la microglie et des astrocytes, une atteinte des préoligodendrocytes induisant à long terme une hypomyélinisation et la dilatation ventriculaire (66). De plus, la PVL cystique est caractérisée par la présence de foyers macroscopiques ( $> 1$  mm) de nécrose cellulaire qui peuvent former des cavités kystiques (66, 219). La PVL non cystique présente des foyers microscopiques ( $\leq 1$  mm de diamètre) de nécrose cellulaire évoluant vers la formation de cicatrices gliales (Fig. 4) (66, 105). Les améliorations dans les soins de santé prodigués au NICU ont diminué le taux de PVL cystique, ce qui fait en sorte que la forme non cystique et diffuse est la plus commune chez les prématurés. Actuellement chez les grands prématurés, jusqu'à 79 % sont à risque de présenter des lésions non cystiques de la substance blanche comparativement à une incidence de 3 % pour la PVL cystique (218).

Les lésions diffuses de la WMI sont caractérisées par une activation de la microglie et des astrocytes et une diminution de la myélinisation. Un des mécanismes mis de l'avant pour expliquer l'hypomyélinisation dans les WMI est un arrêt de la maturation des oligodendrocytes (66). Lors de la phase aigüe du WMI, il y a une mort des préoligodendrocytes qui est suivie d'une phase de prolifération (83). À la suite de cette phase, les préoligodendrocytes nouvellement formés perdent la capacité de devenir des oligodendrocytes matures capables de produire la myéline (83). Donc, cela induit une hypomyélinisation à long terme dans le cerveau.



**Figure 4. Représentation de la leucomalacie périventriculaire cystique et non cystique sur une coupe coronale d'un cerveau de nouveau-né prématuré**

La PVL présente une atteinte focale qui peut être macroscopique (cystique) ou microscopique (non cystique) illustrée respectivement par les cercles à gauche et les points à droite. Les deux formes de PVL sont accompagnées d'une lésion diffuse de la substance blanche. Figure adaptée de Volpe (66)

Les expériences *in vitro* sur des cultures de cellules primaires cérébrales ont permis de décortiquer et de mieux comprendre les mécanismes cellulaires dans les WMI. Il a été démontré que l'activation de la microglie altérait la maturation des oligodendrocytes en culture (165, 278, 279). L'ajout de microglie ou de milieux provenant de microglie activée par le LPS à des cultures d'OPC induit une altération de la maturation de ces cellules (278, 280). À l'opposé, l'application du LPS à des concentrations élevées n'induit pas la mort cellulaire dans des cultures hautement purifiées d'OPC (165, 281). Les effets de la microglie pourraient provenir des différents facteurs produits par la microglie incluant les cytokines  $TNF\alpha$  et  $IL-1\beta$  et la « Heat shock protein 60 » (HSP60). La production de  $TNF\alpha$  et de HSP60 est associée à une

augmentation de la mort cellulaire des OPC (281-283). L'exposition à l'IL-1 $\beta$  a démontré des effets inhibiteurs sur la migration, la prolifération et la maturation des OPC (284-287). Donc, en fonction des médiateurs produits, l'activation de la microglie peut induire la mort cellulaire et aussi une altération de la maturation des OPC durant la période néonatale.

#### **4.1 Le rôle de l'inflammation dans la WMI chez le prématuré**

Les principaux facteurs de risque de la WMI chez le prématuré sont les épisodes d'infections et d'inflammation et les épisodes d'hypoxie-ischémie (288, 289).

Tout d'abord, l'HI survient lorsque l'apport sanguin et l'apport en oxygène diminuent dans le cerveau. Ces épisodes peuvent survenir durant la grossesse, à l'accouchement et durant les premiers jours de vie du nouveau-né (290). Les prématurés ont une plus grande prévalence d'épisodes d'HI que les enfants nés à terme et le risque d'HI augmente avec la diminution de l'âge gestationnel (291). L'HI a été associée au risque élevé WMI, à l'IVH et l'hémorragie cérébrale chez les prématurés (66, 292). De plus, les épisodes d'HI sont aussi accompagné d'une réponse inflammatoire systémique et cérébrale (291, 293, 294). Donc, l'HI possède une composante inflammatoire qui joue aussi un rôle dans les dommages cérébraux associés à cette pathologie.

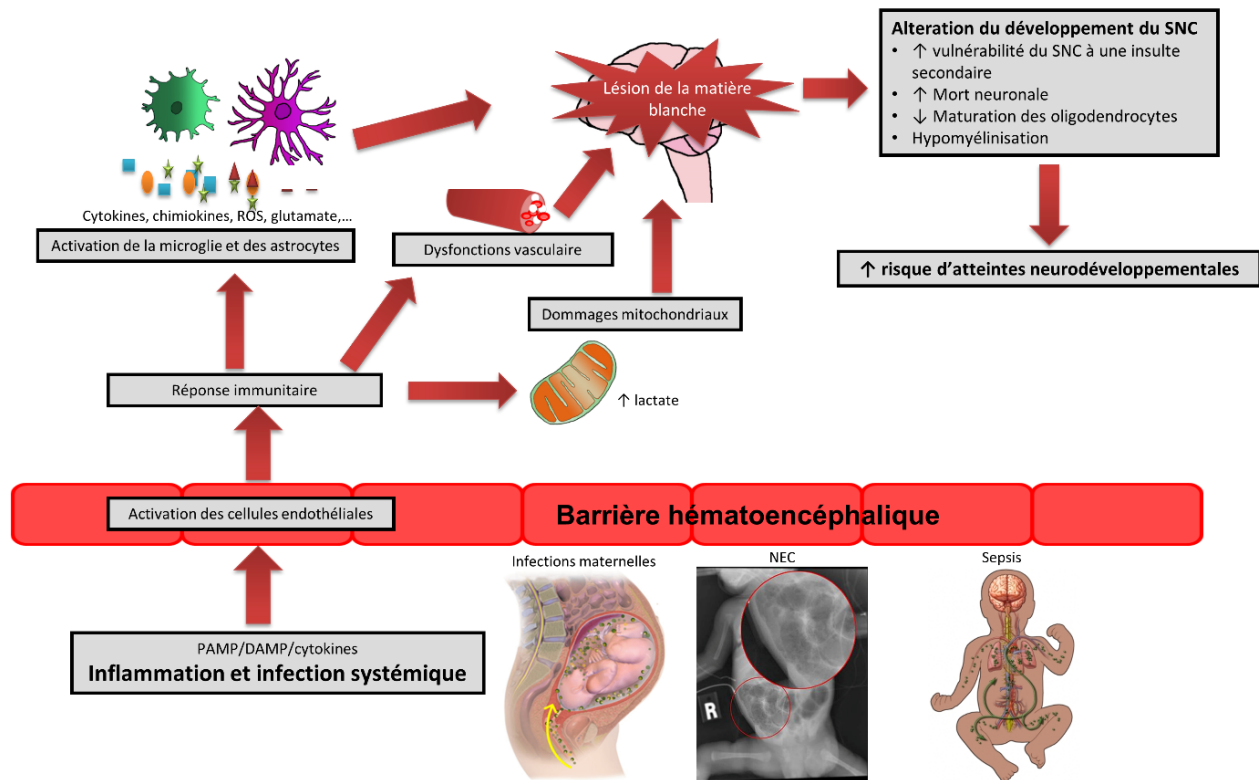
Les épisodes d'infections chez le prématuré peuvent survenir durant la période prénatale à la suite d'une infection chez la mère ou durant la période postnatale. Parmi les infections chez la mère, la chorioamniotite démontre la plus grande association aux atteintes cérébrales (295, 296). La chorioamniotite est présente dans 10 à 40 % des PTB et cette incidence augmente avec la diminution de l'âge gestationnel (297, 298). La présence de chorioamniotite chez la mère est un facteur de risque de PVL cystique et non cystique chez l'enfant prématuré (299, 300).

Outre les infections maternelles, les enfants prématurés sont plus susceptibles d'avoir des épisodes de septicémie (voir section 1.2.3) (105). Ces épisodes de septicémie augmentent le risque de WMI chez les prématurés (62, 301, 302). Dans une cohorte de grands prématurés, environ 80 % des enfants présentant des WMI à terme avaient eu un ou des épisodes de septicémie durant leur hospitalisation (303). Ces épisodes infectieux étaient accompagnés d'une augmentation de la concentration des marqueurs inflammatoires en circulation (63, 64, 304, 305). De plus, cette augmentation était reliée à un risque accru de déficits cognitifs et neurodéveloppementaux à 2 ans et 10 ans (63, 64, 304, 306). Les épisodes infectieux peuvent aussi favoriser l'apparition des HI (292, 307). En résumé, les épisodes d'infections périnatales jouent un rôle important dans le développement des WMI et des atteintes neurodéveloppementales chez les prématurés.

À la lumière de ces deux étiologies, il est possible de voir que chacune induit l'activation de la réponse inflammatoire ce qui contribue hautement à la physiopathologie des WMI chez le prématuré.

## **4.2 Lien entre l'inflammation et les WMI chez le prématuré**

Un mécanisme proposé entre les dommages cérébraux et les épisodes d'infection et d'inflammation systémique est décrit à la figure 5. Il a été émis que la neuroinflammation présente dans les WMI pourrait être causée indirectement par l'inflammation systémique (241, 289). La naissance prématurée est associée à une réponse immunitaire immature et des niveaux de cytokines inflammatoires élevées (293, 305).



**Figure 5. Illustration du lien entre inflammation et infection systémique et atteinte de la substance blanche chez le prématuré**

Les épisodes d'infections et d'inflammations systémiques induisent l'activation des cellules endothéliales qui vont transmettre le signal inflammatoire dans le cerveau. Ceci induit l'activation de la microglie et des astrocytes qui mène à une réponse inflammatoire exagérée. Cet état neuroinflammatoire altère le développement normal du cerveau. Figure adaptée de Jin *et al.* (241)

Lorsqu'une infection survient, il y aura production de PAMP dont le LPS et de DAMP dans la circulation. D'une part, les cellules immunitaires en circulation produisent différents facteurs inflammatoires en réponse à ces agents qui à leur tour interagissent avec les cellules endothéliales de la barrière hématoencéphalique (BBB) (308). D'autre part, les PAMP et DAMP peuvent activer directement les cellules endothéliales qui expriment différents récepteurs, dont les TLR (308-311).



Par la suite, l'activation des cellules endothéliales induit la production et la relâche de médiateurs inflammatoires dans le parenchyme cérébral qui active la microglie (312-315). Cette activation de la microglie induit la production de médiateurs pro-inflammatoires particulièrement l'IL-1 $\beta$  et de dérivés réactifs de l'oxygène. La microglie activée amplifie la réponse inflammatoire en induisant l'activation des astrocytes (163). Cet état inflammatoire induit des changements vasculaires et métaboliques qui causent une neuroinflammation et une altération du développement normal du cerveau caractérisé par la mort neuronale, une diminution de la maturation des oligodendrocytes et une susceptibilité aux stimuli adverses (307).

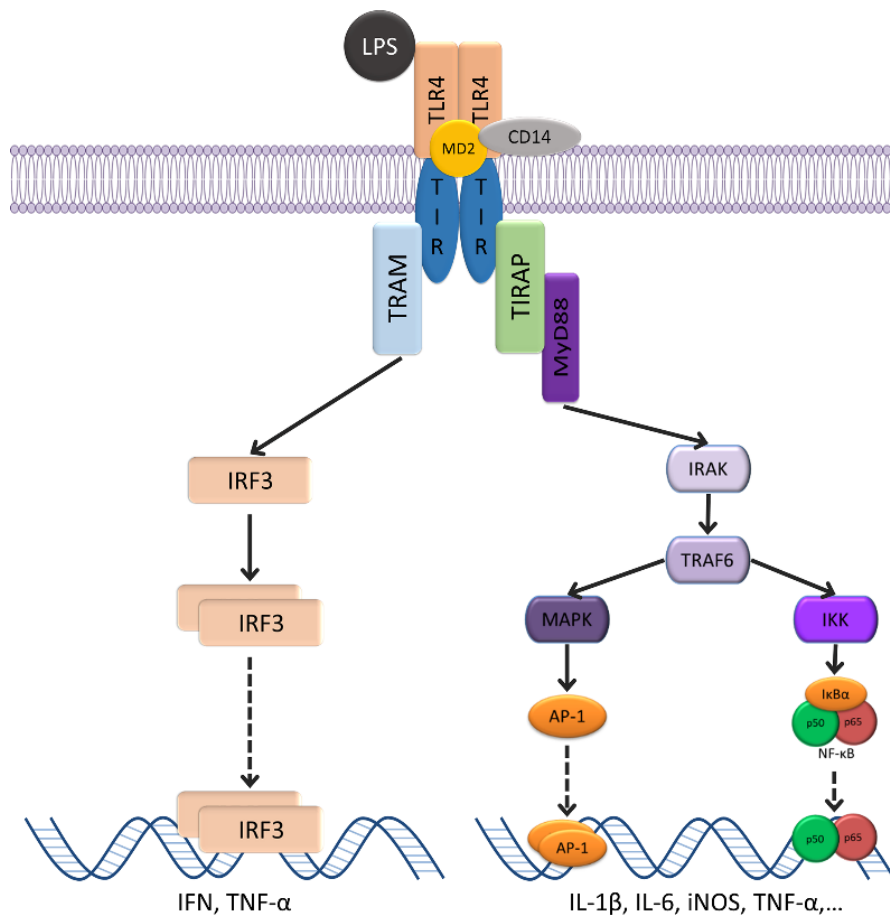
## **5. Modèle animal de lésion de la substance blanche du prématuré**

Actuellement, les modèles animaux de WMI chez la souris et le rat néonatal peuvent être séparés en quatre grandes catégories selon l'étiologie soient : l'hypoxie-ischémie, l'inflammation, l'excitotoxicité et l'hyperoxie (316). La WMI induite par hyperoxie permet de mimer l'hyperoxygénation durant la ventilation mécanique chez les prématurés et ce modèle est associé à une hypomyélinisation et une altération de la microstructure de la substance blanche (317-321). Le modèle de WMI induite par excitotoxicité consiste en l'injection intracérébrale d'agonistes du glutamate comme l'acide iboténique qui activent les récepteurs glutamatergiques et induisent des lésions cérébrales mimant celles présentes dans la WMI et la paralysie cérébrale (322-325). Le modèle de lésion cérébrale par HI le plus couramment utilisé est le modèle de Rice-Vannucci qui consiste en la ligature de l'artère carotide commune suivie d'une exposition de 1 h à 3 h à 8 % d'oxygène (326, 327). La sévérité des atteintes augmente avec la durée d'exposition au milieu hypo-oxygéné (328, 329). Les modèles de lésions inflammatoires sont induits par l'injection systémique ou intracérébrale de pathogènes vivants, d'endotoxines ou encore de cytokines pro-inflammatoires chez l'animal en gestation pour mimer l'infection maternelle ou chez l'animal nouveau-né pour mimer l'infection postnatale (330-335). Dans cette partie de l'introduction, nous parlerons du modèle de WMI induite par injection intracérébrale de LPS chez le rat âgé de 3 jours de vie (P3).

## 5.1 Signalisation cellulaire du LPS

Avant d'aborder le modèle de WMI, nous allons nous pencher sur la signalisation cellulaire du LPS. Le LPS est une endotoxine présente dans la membrane externe des bactéries Gram négative. Le LPS est parmi les molécules les plus couramment utilisées pour induire l'inflammation (336). Le LPS est reconnu par le récepteur membranaire TLR4 qui est exprimé majoritairement par la microglie dans le SNC (337, 338).

Le TLR4 est un récepteur composé d'un domaine extracellulaire liant les ligands et d'un domaine cytoplasmique « Toll/interleukin 1 receptor domain » (TIR) qui est responsable de recruter les éléments de la cascade de signalisation intracellulaire (Fig. 6) (339). La liaison de la protéine MD2 au TLR4 permet la reconnaissance et la liaison du LPS (340). Les complexes TLR4/MD-2/LPS forment des homodimères qui rapprochent les domaines TIR cytoplasmique. Ce complexe recrute la protéine TIRAP et la protéine TRAM qui vont interagir avec les protéines MyD88 et TRIF respectivement (339). L'activation de MyD88 induit le recrutement de la protéine kinase associée à l'IL-1R (IRAK) 4, ce qui active IRAK 1 et IRAK2 (341). Une fois activées, les protéines IRAK1 et IRAK2 activent le facteur associé aux récepteurs de TNF 6 (TRAF6). Par la suite, TRAF6 induit l'activation du « nuclear factor  $\kappa$  light chain enhancer of activated B cells » (NF $\kappa$ B) et de « mitogen-activated protein kinase » (MAPK) (342). L'activation de cette cascade de signalisation induit l'expression et la production de médiateurs de l'inflammation, dont les cytokines pro-inflammatoires (Fig. 6) (343).



**Figure 6. Signalisation du récepteur TLR4**

La liaison du LPS au TLR4 induit l'activation de la signalisation intracellulaire dépendante de MyD88 et indépendante de MyD88. La signalisation dépendante de MyD88 induit l'expression de médiateurs pro-inflammatoires. La signalisation MyD88-indépendante active IRF3 qui induit l'expression de l'IFN et du TNF $\alpha$ . Figure adaptée de Pierre *et al.* (136)

D'autre part, le recrutement de la protéine TRIF induit la dimérisation du facteur de régulation des interférons 3 (Fig. 6) (IRF3). Le dimère IRF3 phosphorylé va transloquer dans le noyau pour induire l'expression des interférons de type I (IFN) et du TNF $\alpha$  (338). L'activation du TLR4 a été associée à la réponse inflammatoire dans différents modèles animaux de neuropathologies néonatales et adultes (344).

## 5.2 La WMI induite par injection intracérébrale de LPS

Dans cette thèse, nous avons utilisé le modèle de WMI induite par une injection intracérébrale (IC) de LPS chez le rat néonatal âgé de 3 jours de vie. Ce modèle a été développé au début des années 2000 et se base sur le rôle de la réponse inflammatoire dans la physiopathologie des WMI chez le prématuré (279).

Ce modèle consiste en une injection IC de LPS (1 mg/kg) dans le corps calleux de rats néonataux âgés entre 3 et 7 jours de vie. La réponse inflammatoire subséquente à cette injection induit une activation de la microglie, l'astrogliose, des atteintes neuronales, une hypomyélinisation et une dilatation des ventricules latéraux similaire aux changements pathologiques observés chez les prématurés avec WMI (279, 345-347). Outre cela, l'IRM effectuée à 9,4 Tesla (T) et 11,74 T dans ce modèle a détecté des changements similaires à ceux observés chez l'humain par l'IRM à 1,5 T et 3 T. Ces altérations incluent une dilatation bilatérale des ventricules, une augmentation du temps de relaxation de la constante T2 et une restriction du coefficient de diffusion apparent (ADC) durant la phase aiguë de l'inflammation suivie d'une augmentation de l'ADC durant les jours suivant la lésion (347, 348). La diminution de la diffusivité moyenne, durant la phase aiguë, corrèle avec une augmentation de l'apoptose et l'augmentation subséquente de l'ADC est causée par une diminution de la densité cellulaire ou la présence d'œdème (347-349). De plus, la MRS décèle des changements de la concentration cérébrale de métabolites, dont une diminution du NAA et une augmentation du lactate (347). Les évaluations comportementales effectuées dans ce modèle démontrent la présence d'atteintes motrices, des déficits d'apprentissage et de la mémoire et de l'hyperactivité (350-353).

Les lésions dans ce modèle sont en grande partie induites par un déséquilibre dans le système de l'IL-1 $\beta$ . Le suivi de l'expression temporelle de différentes cytokines a permis de constater que l'expression de l'IL-6 et du TNF $\alpha$  augmentait pour atteindre un pic à 6 h et puis elle retournait au niveau basal après 48 h (345). À l'opposé, l'IL-1 $\beta$  atteignait son pic après 24 h et malgré une diminution de la concentration, l'IL-1 $\beta$  était plus élevée que le niveau basal jusqu'à 7 jours après la lésion (345). De plus, l'injection concomitante de l'antagoniste du

récepteur à l'IL-1 (IL-1Ra), mais pas d'anticorps anti-TNF $\alpha$  a diminué les atteintes cérébrales induites par le LPS (346). Bien que l'IL-1Ra diminue les atteintes cérébrales à long terme, les niveaux d'IL-1 $\beta$  demeurent élevés durant la période aiguë de l'inflammation (346). L'injection IC de l'IL-1 $\beta$  induit un phénotype plus sévère que l'injection du TNF $\alpha$  ou de l'IL-6 (354, 355). Similairement aux prématurés atteints de WMI, ce modèle présente un déséquilibre du système à l'IL-1 $\beta$ . Ce déséquilibre est caractérisé par une augmentation de l'expression de l'IL-1 $\beta$  et une diminution de l'expression de l'IL-1Ra (356, 357).

Donc, le modèle par injection IC de LPS entre 3 et 7 jours de vie, période équivalente au cerveau d'un grand prématuré, mime les changements anatomiques, cellulaires, à l'IRM et comportementaux observé chez les prématurés souffrants de WMI (66, 92, 358).

### **5.3 Sensibilisation à long terme induite par l'inflammation néonatale**

L'exposition au LPS dans ce modèle induit une vulnérabilité à des lésions secondaires et à la neurodégénérescence à l'âge adulte (136). Cette vulnérabilité secondaire est possiblement due à la présence d'une inflammation chronique. Une exposition inflammatoire durant la période néonatale augmente le nombre de cellules microgliales et l'expression des cytokines inflammatoires, dont l'IL-1 $\beta$  et l'IL-6, jusqu'à l'âge adulte chez le rat (351, 359). Cette augmentation de la réponse basale facilite l'expression de l'IL-1 $\beta$  et l'activation de la microglie et des astrocytes à la suite d'une exposition systémique au LPS à l'âge adulte (360). De plus, les rats exposés au LPS durant la période néonatale présentent des changements dans le système dopaminergique qui induit des dommages plus profonds à la suite d'une exposition à la roténone qui mime la maladie de Parkinson (351, 361). Ces animaux présentent des atteintes motrices plus sévères, une accumulation de la protéine  $\alpha$ -synucléine et une altération de l'expression du transporteur à la dopamine (362). L'exposition inflammatoire facilite l'apparition de déficits d'apprentissage et de la mémoire (359, 363, 364).

## 5.4 Limites du modèle de WMI par injection intracérébrale de LPS

Une des limites de ce modèle animal est que la neuroinflammation est induite par une seule injection intracérébrale de LPS. Chez le prématuré, il a été démontré que le LPS était rarement présent dans le tissu cérébral et que la neuroinflammation serait secondaire à une inflammation systémique soutenue comme discuté à la section 4.2 de ce chapitre (365-368). Il a été démontré que l'exposition systémique au LPS (1 mg/kg ou 2 mg/kg) est associée à une réponse neuroinflammatoire moins sévère que l'exposition intracérébrale et cette neuroinflammation n'induit pas d'atteintes neuronales ou de la maturation oligodendrocytes (345, 351, 366-369).

Une autre limite de ce modèle est que l'animal ne reçoit qu'une seule injection de LPS. Comme vu à la section 4, les enfants prématurés sont à risque d'être exposés à une multitude d'insultes inflammatoires durant leur hospitalisation. Dans un modèle récemment développé d'inflammation chronique néonatale, il a été démontré que les injections systémiques répétées de LPS (1 mg/kg ou 2 mg/kg) induisaient la neuroinflammation et avaient un haut taux de mortalité (>50 %) (370-373). L'évaluation comportementale dans ce modèle n'a pas démontré d'altérations de l'activité locomotrice, de l'anxiété et de la sensibilité à la douleur (370-373).

Malgré la présence de ces limites, le modèle par injection intracérébrale de LPS permet de reproduire les changements pathologiques associés à la WMI induite par l'inflammation incluant l'activation de la microglie, l'astrogliose, l'arrêt de maturation de la maturation des oligodendrocytes, les atteintes neuronales et les déficits cognitifs. De plus, ce modèle est associé à un très faible taux de mortalité.

## **6. L'altération du méthylome dans la lésion de la substance blanche du prématuré**

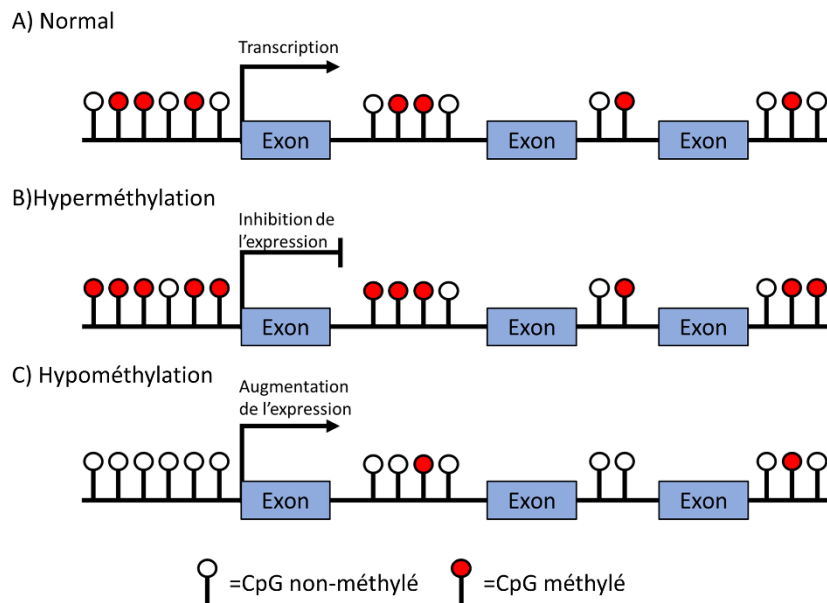
### **6.1 L'épigénétique**

L'épigénétique est l'étude de l'ensemble des changements facilitant ou diminuant l'expression d'un gène sans changer la séquence d'ADN (374). Ces changements incluent la méthylation de l'ADN, les modifications post-traductionnelles des histones et les ARN non codants (375). Parmi ces changements épigénétiques, la méthylation de l'ADN est un des processus les plus étudiés (374, 376). Comparativement aux autres changements épigénétiques, la méthylation de l'ADN est plus stable, à différentes méthodes d'analyses moins coûteuses et plus précises, et l'ADN est plus stable durant son extraction et sa préservation (377, 378). Les changements épigénétiques sont transmis durant la mitose et la méiose cellulaire pour assurer le développement, la différenciation et la survie cellulaire (376). Les modifications épigénétiques, particulièrement la méthylation, modulent l'expression de différents gènes durant le neurodéveloppement (379-381). Les modifications épigénétiques sont des processus réversibles qui peuvent être influencés par l'environnement, l'âge, la naissance prématurée ou encore les infections (376). Ces altérations peuvent avoir des conséquences à long terme chez l'humain facilitant l'apparition de pathologies neurologiques.

### **6.2 La méthylation de l'ADN**

La méthylation de l'ADN consiste en l'ajout ou le retrait d'un groupe méthyle sur les dinucléotides CpG (cytosine suivie d'une guanine). Ces changements altèrent les interactions de l'ADN avec les facteurs de transcriptions ce qui facilite ou inhibe l'expression génique (Fig. 7) (382). L'ajout de groupement méthyle est un processus actif régulé par les membres de la famille des ADN méthyltransférases (DNMT) dont la DNMT1, la DNMT3a et DNMT3b (383). À la suite de la division cellulaire, la DNMT1 est l'enzyme responsable de maintenir le modèle de méthylation sur les brins d'ADN nouvellement synthétisés à partir du profil de méthylation du brin parental (384). La DNMT3a et la DNMT3b sont des enzymes causant l'ajout de groupements méthyles sur des CpG non méthylés créant ainsi la méthylation *de novo*

(383). L'ajout de groupement méthyle induit une hyperméthylation du gène qui peut mener à une inhibition de l'expression génique. Cette répression génique résulte d'une diminution de la capacité de liaison des facteurs de transcription ou bien de changements dans la structure de la chromatine (Fig. 7b) (381, 385).



**Figure 7. La méthylation de l'ADN altère la transcription génique**

Les changements de la méthylation sur les CpG sont associés à une altération de l'expression génique. B) Le clivage de groupements méthyles induit une hypométhylation facilitant l'expression génique. C) L'ajout de groupements méthyles induit une hyperméthylation associée à une inhibition de la transcription. Figure adaptée de Nikolova et Hariri (386)

La déméthylation est un processus passif ou actif durant lequel des groupements méthyles sont enlevés, ce qui rend l'ADN dans un état hypométhylé diminuant ainsi l'expression du gène (Fig. 7c). La déméthylation passive survient durant la division cellulaire à la suite de l'inhibition et/ou du mauvais fonctionnement de la DNMT1 (381). À l'opposé, la déméthylation active est un processus nécessitant des réactions chimiques incluant l'oxydation et la désamination pour faciliter le clivage du groupement méthyle par des enzymes incluant la méthylcytosine dioxygénase TET1 (387, 388).



Durant le neurodéveloppement, la méthylation de l'ADN joue un rôle dans la différenciation des neurones et des cellules gliales, la synaptogénèse, l'axonogénèse, la maturation des oligodendrocytes et les processus d'apprentissage et de mémoire (387-391). En sachant que la méthylation est un processus actif impliqué dans le neurodéveloppement, l'altération du méthylome en réponse à la naissance prématurée pourrait être associée à des atteintes neurodéveloppementales.

### **6.3 Les changements de la méthylation de l'ADN chez le prématuré**

Parmi les études évaluant les changements épigénétiques associés à la naissance, l'étude longitudinale « Peri/Postnatal Epigenetic Twins Study » réalisée à Melbourne a pour but de mieux comprendre comment la période périnatale peut altérer la méthylation de l'ADN à long terme et de voir quels marqueurs épigénétiques pourraient aider à prédire la trajectoire neurodéveloppementale de l'enfant à 11 ans (392, 393). Cette cohorte a démontré que l'environnement utérin affectait le méthylome par la présence de certaines discordances du profil de méthylation de l'ADN qui augmentent chez les jumeaux dizygotiques (séquences d'ADN différent) comparativement aux paires de jumeaux monozygotiques (possédant une séquence d'ADN identique) (394, 395). La discordance observée entre les paires de jumeaux à la naissance était encore présente dans certains gènes à 18 mois de vie et était associée aux voies de signalisation du métabolisme de l'ARN (396). Bien que les études dans cette cohorte n'aient pas adressé directement les changements épigénétiques reliés à la prématurité, elles ont permis de voir que l'environnement périnatal affecte la méthylation de l'ADN.

Chez l'humain, la naissance prématurée induit des altérations de l'épigénome du nouveau-né qui peuvent être mesurées par des prélèvements sanguins, dans la salive et/ou les frottis buccaux. Dû à l'accès limité au tissu cérébral *in vivo* et *post mortem*, l'évaluation du profil de méthylation dans les tissus périphériques tels que le sang, la salive ou encore l'épithélium buccal permet une évaluation indirecte du méthylome cérébral (397, 398). L'évaluation à partir de la salive présente la meilleure corrélation au tissu cérébral (397-400).

L'évaluation de la méthylation dans la salive de nouveau-nés prématurés (<32 semaines ou <1500g) a démontré une altération de la méthylation dans 34 gènes différents dont 10 jouent un rôle dans le neurodéveloppement (401). Dans cette même cohorte de prématurés, les altérations du méthylome étaient associées à des changements de la microstructure du corps calleux et du faisceau cortico-spinal évalué par DTI à l'âge équivalent au terme (268). De plus, les prématurés (<30 semaines) ayant un profil atypique à la suite de l'évaluation comportementale par le « NICU Network Neurobehavioral Scale » avant la sortie de l'hôpital présentaient une méthylation différentielle sur 30 gènes comparativement aux prématurés avec un score optimal (402). Parmi ces gènes, une majorité était reliée au neurodéveloppement plus particulièrement à la transmission synaptique et la signalisation glutamatergique (402). Outre ces changements durant la période périnatale, la prématurité altère le méthylome à long terme. L'analyse de la méthylation dans des prélèvements sanguins chez les prématurés (<31 semaines) a révélé la persistance d'altération de la méthylation à l'âge de 18 ans dans des gènes reliés au développement, au neurodéveloppement et à la réponse immunitaire (403). Ces observations sont confirmées par la présence d'altérations de la méthylation d'ADN dans des gènes reliés à la réponse immunitaire chez des adultes nés prématurément (30-35 ans) et ces perturbations persistent à un âge plus avancé (56-80 ans) (404).

En résumé, la prématurité induit des changements de la méthylation de l'ADN à long terme qui affectent des gènes reliés au neurodéveloppement et à la réponse immunitaire. Ces altérations soulèvent le besoin d'évaluer l'impact des changements du méthylome dans les pathologies associées à la prématurité, dont les WMI.

## **6.4 Autres changements épigénétiques chez le prématuré**

### **6.4.1 Les modifications post-traductionnelles des histones**

Tout d'abord, les histones sont des protéines ayant une partie C-terminale qui forme la portion globulaire des nucléosomes et une extrémité N-terminale qui est susceptible à des modifications covalentes (405). Un nucléosome est formé d'un ensemble de 4 paires d'histones

(H2A, H2B, H3 et H4) autour duquel 146 paires de bases d'ADN s'enroulent et la liaison et l'emballage des nucléosomes entre eux permettent de former la chromatine (406). Les modifications des histones peuvent altérer la compaction et l'accessibilité de la chromatine causant une inhibition ou une induction de l'expression génique (405, 406). L'acétylation, la méthylation, la phosphorylation, l'ubiquitination ou la sumoylation des aminoacides de la queue N-terminale sont des modifications possibles des histones (382). Parmi ces modifications des histones, l'acétylation est un des changements les plus étudiés (375, 407). L'acétylation consiste en l'ajout de groupement acétyle ( $\text{CH}_3\text{-CO}$ ) par les histones acétyltransférases (HAT) de type A sur les résidus lysine chargés positivement (375, 408, 409). Cet ajout induit une décondensation de la chromatine ce qui facilite la transcription génique due à la plus grande accessibilité des facteurs de transcriptions à la chromatine (375, 408). À l'opposé, la désacétylation par les histones désacétylase (HDAC) augmente la compaction de la chromatine et diminue ainsi l'expression génique (375, 408). Les HDAC peuvent être séparées en quatre groupes dont la classe I (HDAC1, 2, 3 et 8), la classe II (HDAC4, 5, 6, 7 et 9), la classe III (SIRT1-7) et la classe IV (HDAC11) (410). Les changements d'acétylation de la lysine en position 5 de l'histone H2B (H2BK5ac) et de la lysine 27 de l'histone 3 (H3K27ac) sur les promoteurs géniques affectent le plus l'expression génique (411). Comparativement à l'analyse des changements de la méthylation de l'ADN, l'analyse des changements d'acétylation des histones requiert une plus grande quantité d'échantillons de départ et est plus susceptible aux variations des marques d'histones entre les échantillons ce qui diminue l'évaluation de ce changement dans les études cliniques à grande échelle (412).

Bien que le lien entre la naissance prématurée et l'altération cérébrale de l'acétylation des histones ait été peu étudié, il a été démontré que l'acétylation des histones est un processus actif participant au neurodéveloppement et des changements de l'acétylation ont été associés à diverses pathologies neurodéveloppementales et neurodégénératives (408, 412-415). La majorité des fonctions associées à l'acétylation des histones ont été étudiées dans des modèles murins par l'altération de l'expression des HDAC et HAT ou par l'utilisation d'inhibiteurs d'HDAC. Par exemple, il a été démontré que le recrutement des HDAC dans les régions promotrices de gènes neuronaux jouait un rôle important dans la répression de ces gènes dans les cellules non neuronales (416-418). De plus, l'acétylation des histones participe à la

neurogenèse en contrôlant la différenciation et la survie des cellules neuronales (417, 419, 420). L'acétylation des histones est associée à la synaptogénèse, le contrôle de la neurotransmission et la formation de la mémoire (406, 419). La surexpression des HDAC4 a été associée à une diminution de la formation de synapse, des déficits d'apprentissage et la neurodégénérescence, similairement, la suractivation de HDAC2 est associée à la répression de gènes associés à la plasticité synaptique (419, 421-423). Outre cela, les HDAC, plus particulièrement HDAC1 et HDAC2, contribuent à l'induction de la différenciation des OPC en oligodendrocyte mature, à l'initiation de la myélinisation durant le neurodéveloppement et à la remyélinisation à la suite d'insultes cérébrales (424-427). Il a été mis de l'avant que la diminution de la différenciation des OPC durant l'inflammation et le stress oxydatif pouvait résulter d'une augmentation de l'expression d'inhibiteur de la différenciation à la suite d'une augmentation globale de l'acétylation (103, 426, 428). Donc, l'acétylation des histones est un mécanisme épigénétique impliqué dans le neurodéveloppement.

À la lumière du rôle de l'acétylation des histones dans le neurodéveloppement, les altérations de ce mécanisme sont associées à un risque accru d'atteintes neurodéveloppementales. Diverses mutations des HAT et des HDAC ont été associées à différents syndromes et pathologies pouvant causer des déficits cognitifs, psychomoteurs et développementaux (408, 429, 430). Outre cela, l'analyse post-mortem de tissus cérébraux de patients souffrant d'un trouble du spectre autistique (ASD) a démontré une altération de l'acétylation des histones de gènes associés était associé à différentes voies de signalisation dont la régulation des canaux ioniques, les fonctions synaptiques, l'excitabilité neuronale ou encore l'activité des HDAC (430-432). De plus, l'exposition prénatale à l'acide valproïque, un inhibiteur des HDAC, était associée à une augmentation d'un diagnostic d'ASD dans une cohorte pédiatrique danoise (433).

#### **6.4.2 Les ARN non codants**

Les ARN non codants sont des séquences d'ARN ne produisant pas de protéines et qui peuvent altérer l'expression de différents gènes. Les ARN non codants représentent environ 80 % des ARN transcrits dans le génome (434). Ils sont catégorisés selon le nombre de

nucléotides présents ce qui inclut les micro-ARN (miRNA), les longs ARN non codants (lncRNA), les ARN circulaires et les petits ARN nucléaires (435). L'étude du rôle des ARN non codants dans le neurodéveloppement et les neuropathologies est encore à ses débuts, car il a été longtemps cru que les ARN non codants étaient un bruit de fond dans la transcription de l'ARN (436). Parmi les ARN non codants, les miRNA et les lncRNA sont les plus étudiés en recherche.

#### *6.4.2.1 Les miRNA*

Les miRNA sont composés d'environ 22 nucléotides et peuvent altérer l'expression de protéines en inhibant la traduction de l'ARN messager (mRNA) ou en facilitant sa dégradation (435, 437). Un miRNA peut contrôler l'expression de plus de 200 gènes différents et un gène peut être sous le contrôle de plusieurs miRNA (437). Les miRNA participent au neurodéveloppement et jouent un rôle dans différentes neuropathologies (438, 439). Les miRNA sont impliqués dans la neurogenèse, la différenciation des NPC, la synaptogenèse, la différenciation des oligodendrocytes et la vascularisation cérébrale (437, 439, 440).

Durant la période néonatale, les atteintes cérébrales ont été associées à une altération de l'expression de différents miRNA. Par exemple, l'étude de l'expression de miRNA dans le sang de cordon ombilical a démontré que les enfants nés à terme atteints d'encéphalopathie hypoxique ischémique (HIE) avaient une altération de plus de 70 miRNA dont le plus significatif est une diminution de l'expression de miR-374 (441-443). De plus, la combinaison de la diminution du miR-374 avec une diminution du miR-210 et une augmentation des marqueurs de dommages neuronaux (la protéine S100B et l'énolase spécifique des neurones) augmente la prédictibilité et la détection de HIE chez les nouveau-nés (441). Chez les prématurés, l'IVH est associée à une altération des miRNA dans le CSF dont le plus marquant est une diminution du miR-9 (444, 445). L'étude des profils d'altération des miRNA permettrait à long terme de développer de nouveaux biomarqueurs dans les neuropathologies chez le nouveau-né.

#### 6.4.2.2 *Les lncRNA*

Les lncRNA sont formés de plus de 200 nucléotides pouvant se configurer en structures secondaires et tertiaires (434). Les lncRNA sont un mécanisme épigénétique altérant l'expression des gènes par différents moyens. Les lncRNA dans le noyau peuvent altérer le remodelage de la chromatine en facilitant ou inhibant le recrutement des enzymes participant aux modifications des histones (446). Dans le cytoplasme, les lncRNA peuvent augmenter la stabilité des mRNA, faciliter la dégradation des mRNA, modifier l'épissage alternatif ou encore favoriser l'expression de miRNA (434, 446, 447). Les lncRNA sont exprimés dans une variété d'organes et l'analyse du transcriptome humain a révélé qu'une majorité des lncRNA étaient spécifiquement associés au SNC (448). Les lncRNA participent à différents mécanismes neurodéveloppementaux, dont la différenciation des NPC, la plasticité neuronale, la synaptogénèse et la différenciation et la maturation des oligodendrocytes (434, 436, 447). La compréhension du rôle et des fonctions des lncRNA est plus complexe que leur détection et est limitée par la présence de redondance dans leurs fonctions, une faible abondance des lncRNA et une faible conservation des séquences de nucléotides (434, 449, 450).

Bien que peu d'études aient documenté les altérations des lncRNA durant la période néonatale, les atteintes cérébrales ont été associées à une altération de l'expression de différents lncRNA (447, 451). Par exemple, on dénote la présence de changement d'expression de plus de 200 lncRNA chez les patients atteints d'ASD (452, 453). Ces changements des lncRNA sont associés à l'expression du miRNA miR103/107 et aussi à des gènes participant à la migration cellulaire dans le cortex cérébrale (452). Chez les enfants atteints d'HIE, l'analyse du sang de cordon a révélé une altération de 376 lncRNA qui est associée à l'expression de gènes dans la réponse immunitaire, la phosphorylation de la protéine Stat5 et l'adhésion cellulaire (454).

## 7. Approche thérapeutique

Les soins prodigués au NICU visent à atténuer et traiter les symptômes présents chez les prématurés sans cibler directement les lésions cérébrales. La thérapie par hypothermie est utilisée dans les cas d'HIE de modérées à sévères chez les prématurés de plus de 35 semaines

et les nouveau-nés à terme selon l'«American Academy of Pediatrics» (455, 456). L'hypothermie consiste en la diminution de la température corporelle ou cérébrale débutant dans les 6 heures suivant la naissance et est continuée durant 72h (457, 458). Dans une étude avec une cohorte rétrospective de prématurés nés entre 32 et 35 semaines, il y avait une plus grande incidence de complications et d'atteintes neurodéveloppementales à la suite de l'hypothermie donc, son utilisation est limitée dans les prématurés de moins de 35 semaines (458). Actuellement, l'efficacité de l'hypothermie chez les prématurés de 33 à 35 semaines est à l'étude dans l'essai randomisé contrôlé multicentrique «Preemie Hypothermia for Neonatal Encephalopathy» (NCT01793129) aux États-Unis (297, 459). Bien que plusieurs molécules aient été testées dans des modèles animaux ou sont dans les premières phases d'essais cliniques, aucune n'a encore été approuvée pour le traitement des lésions cérébrales chez les grands prématurés. Dans cette partie du chapitre I, nous discuterons des approches thérapeutiques expérimentales ciblant la réponse neuroinflammatoire néonatale avec une attention particulière sur les molécules ciblant l'IL-1.

## **7.1 Approches thérapeutiques expérimentales**

Considérant le rôle prépondérant de la réponse inflammatoire dans les WMI et l'immaturation du système immunitaire chez le prématuré, il est important de développer des approches thérapeutiques diminuant la réponse inflammatoire tout en préservant les mécanismes de défenses immunitaires pour prévenir les infections dans cette population (136). En utilisant divers modèles animaux, différentes molécules ont démontré des effets neuroprotecteurs en ciblant différents mécanismes, dont la réponse antioxydante et anti-inflammatoire (Fig. 8) (460).

### **7.1.1 Facteurs de croissance**

L'érythropoïétine (EPO) est une cytokine hématopoïétique ayant démontré des effets neuroprotecteurs dans des modèles néonataux de WMI incluant l'HI et l'inflammation prénatale (461-464). L'EPO agit en se liant à son récepteur ce qui diminue l'activation de la microglie, l'apoptose, les atteintes aux oligodendrocytes tout en stimulant la réparation et la neurogenèse

(241, 465). L'EPO favorise la polarisation de la microglie vers un profil M2/anti-inflammatoire (466, 467).

### **7.1.2 Molécules antioxydantes**

La mélatonine est un antioxydant endogène produit par la glande pinéale qui exerce des effets neuroprotecteurs dans différents modèles néonataux de WMI (136, 468). Dans les modèles de WMI induit par une exposition systémique au LPS, la mélatonine a diminué l'apoptose, le stress oxydatif et les atteintes sensorimotrices (469, 470). La mélatonine exerce ses effets en inhibant la translocation nucléaire du NFκB et en stimulant l'activation du Nrf2 qui régule la réponse antioxydante (468, 469).

Le pyruvate d'éthyle est un dérivé du pyruvate qui exerce des effets anti-inflammatoires, anti-apoptotiques et antioxydants dans des modèles animaux de lésions cérébrales induites par HI ou par injection intracérébrale de LPS (471-473). Une partie des effets neuroprotecteurs du pyruvate d'éthyle proviennent de la modulation de la sous-unité p65 du NFκB, ce qui diminue l'expression d'agents pro-inflammatoire chez la microglie (473, 474). Dans l'étude de Shin *et al.*, le pyruvate d'éthyle a induit des effets antioxydants par une activation de la voie Nrf2 chez les astrocytes (475).

### **7.1.3 Molécules anti-inflammatoires**

Les protéines inhibitrices inter-alpha (IAIP) sont des protéines endogènes exprimées dans différents organes, dont le cerveau, et sont des inhibiteurs des protéases à sérine (476, 477). Une diminution de la concentration des IAIP en circulation a été observée chez les enfants prématurés atteints de septicémie et de NEC (476, 478). L'injection systémique d'IAIP purifié du sang humain a démontré des effets neuroprotecteurs et anti-inflammatoires dans des modèles néonataux d'HI chez le rat et l'agneau (477). L'effet neuroprotecteur des IAIP est caractérisé par une diminution de l'activation de la microglie, des astrocytes, de la mort neuronale à la suite de l'HI (478-480). De plus, les IAIP inhibent l'expression de gènes pro-inflammatoires et favorisent l'expression de gènes anti-inflammatoires dont l'IL-10 (478, 479).



Les inhibiteurs large spectre des chimiokines (BSCI) sont des peptides ayant démontrés des effets anti-inflammatoires et neuroprotecteurs. Il a été proposé que les BSCI agissent en se liant au récepteur de la somatostatine de type 2 ce qui active des voies de signalisation causant une inhibition de la signalisation intracellulaire des récepteurs à chimiokines (481, 482). Les BSCI sont associés à une diminution de l'inflammation, de la mort cellulaire et du recrutement des cellules immunitaires dans des modèles d'HI néonatale, de dégénérescence maculaire liée à l'âge et de naissance prématurée chez les rongeurs (482-484). De plus, l'usage des BSCI a diminué l'incidence de naissance prématurée dans des modèles chez la souris et chez le primate non humain (481, 482).

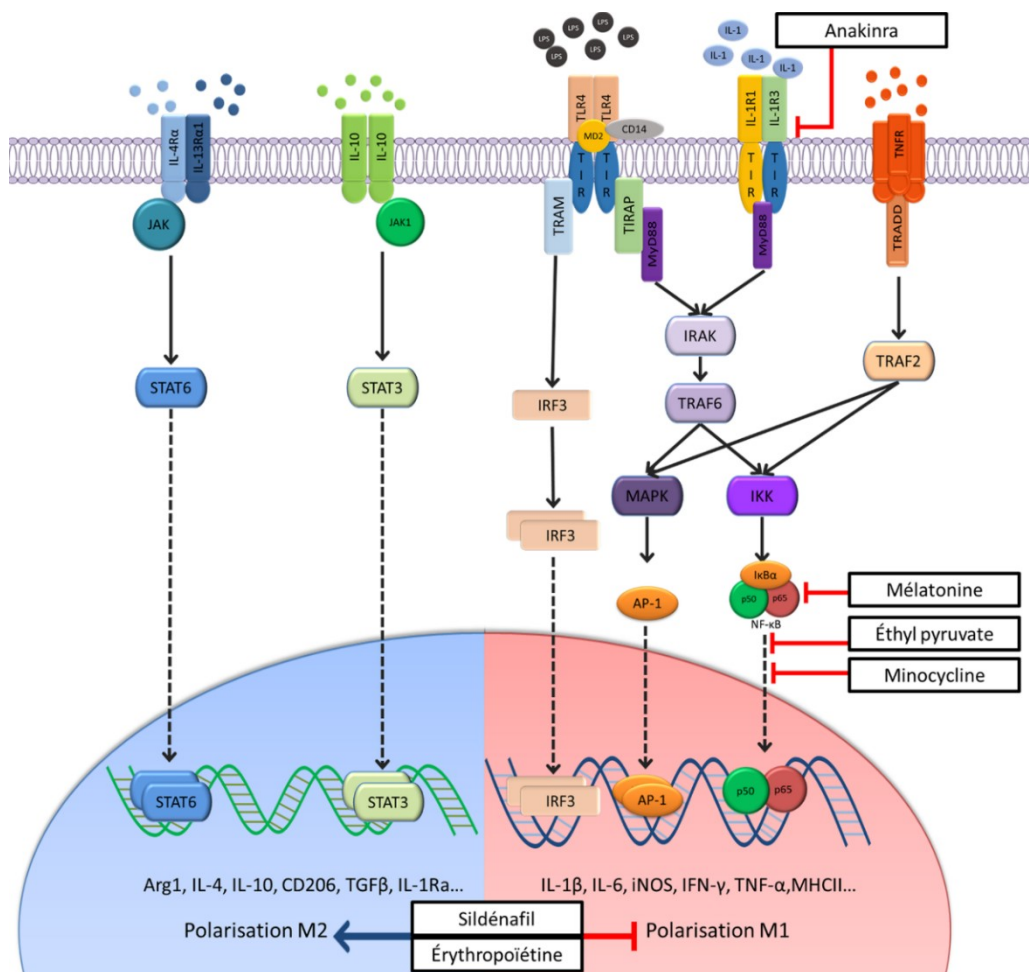
Le sildénafil est un inhibiteur de la phosphodiesterase du GMP cyclique qui possède des effets anti-inflammatoires dans les lésions cérébrales induites par HI et par inflammation (485, 486). Dans les modèles animaux d'HI néonatal, le sildénafil a exercé des effets neuroprotecteurs par une modulation de l'activation de la microglie vers un profil M2/anti-inflammatoire (485, 487). Le sildénafil a exercé des effets anti-inflammatoires sur des cultures de microglie stimulées au LPS en diminuant l'expression de marqueurs pro-inflammatoires dont l'IL-1 $\beta$ , le TNF $\alpha$  et l'oxyde nitrique (488). Par ailleurs, le sildénafil a diminué les altérations du cytosquelette et des signaux calciques induits par le LPS dans des cultures primaires d'astrocytes (489, 490).

La minocycline est un dérivé de seconde génération des tétracyclines qui a exercé des actions neuroprotectrices dans divers modèles de WMI néonatales, dont la WMI induite par HI, par hyperoxie ou encore par l'administration cérébrale de LPS (321, 491-494). Les actions anti-inflammatoires de la minocycline résultent d'une inhibition de l'activation de la microglie à la suite d'une diminution de la translocation nucléaire et de la transcription du NF $\kappa$ B (495).

#### **7.1.4 Les exosomes**

Les exosomes sont des vésicules extracellulaires sécrétées après la fusion des endosomes multivésiculaires avec la membrane plasmique (496, 497). Les exosomes sont produits par divers types cellulaires et elles participent à la communication intercellulaire en transférant leur

contenu (incluant des récepteurs de surface, des cytokines, des lipides, des mRNA, des miRNA et des lncRNA) à d'autres cellules (496, 497). Il a été démontré que les exosomes produits par les cellules souches mésenchymateuses et les cellules souches pluripotentes exerçaient des effets thérapeutiques et anti-inflammatoires dans divers modèles animaux néonataux dont de la BPD, de la NEC et de l'hypoxie-ischémie (498-501). Par exemple, le traitement à l'aide d'exosomes extraits de cellules souches humaines a diminué l'activation de la microglie induite par une stimulation au LPS ou à la suite d'un épisode d'hypoxie-ischémie (498, 501, 502). L'action neuroprotectrice des exosomes proviendrait de la présence de différents miRNA, dont le miRNA-223 ou encore le miRNA-124-3p (501-503).



**Figure 8. Modulation de la polarisation de la microglie**

L'action neuroprotectrice de différentes molécules inclut aussi une modulation ou une inhibition de la polarisation de l'activation microgliale.

Les différentes molécules présentées dans cette section ont démontré des effets bénéfiques dans des modèles animaux néonataux de WMI. Une partie de l'action neuroprotectrice de ces molécules passe par l'inhibition ou la modulation de l'activation de la microglie (Fig. 8). Outre ces molécules, il est possible de cibler la réponse microgliale en bloquant directement les cytokines pro-inflammatoires jouant un rôle prépondérant dans la WMI induite par l'inflammation, dont l'IL-1 $\beta$ .

## 7.2 Cibler l'IL-1 dans les lésions inflammatoires de la substance blanche

### 7.2.1 Le système à l'IL-1

La superfamille de cytokines de l'IL-1 est composée de 11 ligands différents et de 10 récepteurs qui ont des actions pro- et anti-inflammatoires (Tableau II) (504). Ces cytokines sont hautement impliquées dans la réponse immunitaire innée. La réponse inflammatoire de l'IL-1 est nécessaire face aux agents pathogènes, mais lorsqu'elle est incontrôlée, elle peut induire des dommages cellulaires. La présente partie s'intéressera au système de l'IL-1.

**Tableau II. Ligands et récepteurs de la famille de cytokines de l'IL-1**

Famille	Ligand	Récepteur	Corécepteur	Rôle
IL-1F1	IL-1 $\alpha$	IL-1R1	IL-1R3	Pro-inflammatoire
IL-1F2	IL-1 $\beta$	IL-1R1, IL-1R2	IL-1R3	Pro-inflammatoire
IL-1F3	IL-1Ra	IL-1R1	Non applicable	Antagoniste de l'IL-1 $\alpha$ et l'IL-1 $\beta$
IL-1F4	IL-18	IL-1R5	IL-1R7	Pro-inflammatoire
IL-1F5	IL-36Ra	IL-1R6	IL-1R3	Antagoniste de l'IL-36 $\alpha$ , l'IL-36 $\beta$ et l'IL-36 $\gamma$
IL-1F6	IL-36 $\alpha$	IL-1R6	IL-1R3	Pro-inflammatoire
IL-1F7	IL-37	IL-1R5	IL-1R8	Anti-inflammatoire
IL-1F8	IL-36 $\beta$	IL-1R6	IL-1R3	Pro-inflammatoire
IL-1F9	IL-36 $\gamma$	IL-1R6	IL-1R3	Pro-inflammatoire
IL-1F10	IL-38	IL-1R6	IL-1R9	Anti-inflammatoire
IL-1F11	IL-33	IL-1R4	IL-1R3	Pro-inflammatoire

Adapté de Dinarello (504)

La voie de signalisation de l'interleukine 1 (IL-1) est composée de deux ligands agonistes IL-1 $\alpha$  (IL-1F1) et IL-1 $\beta$  (IL-1F2) et du ligand antagoniste IL-1Ra (IL-1F3) (505). Les ligands agonistes sont produits sous forme de précurseurs soit la pro-IL-1 $\alpha$  et la pro-IL-1 $\beta$  qui sont emmagasinés dans le cytoplasme. Pour devenir matures, la pro-IL-1 $\alpha$  et la pro-IL-1 $\beta$  subissent un clivage protéolytique par la caspase 1 qui est activée par l'inflammasome NLRP3 (506). L'IL-1 $\alpha$  et la pro-IL-1 $\alpha$  sont actives et peuvent se lier au récepteur à l'interleukine 1 (IL-1R) pour amorcer la cascade de signalisation. La pro-IL-1 $\beta$  est inactive et donc nécessite un clivage pour permettre l'interaction de la forme mature avec les récepteurs. L'antagoniste IL-1Ra est produite sous sa forme mature et bloque l'interaction entre les agonistes et le récepteur.

Deux types de récepteurs existent dans le système de l'IL-1 soit le récepteur de type 1 (IL-1R1) et celui de type 2 (IL-1R2). Ces récepteurs qui interagissent avec la protéine accessoire du récepteur IL-1R3 (aussi connue sous le nom d'IL-1RAcP) pour induire la transmission du signal. L'IL-1R1 est composé d'un domaine extracellulaire interagissant avec l'IL-1 $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$ , et d'un domaine cytoplasmique TIR. Le domaine cytoplasmique TIR est similaire au domaine cytoplasmique des TLRs et assure l'interaction avec MyD88 pour activer la cascade de signalisation. Le récepteur IL-1R2 possède le domaine extracellulaire et un petit domaine cytoplasmique ne permettant pas l'activation de la signalisation intracellulaire. L'IL-1R2 agit à titre de récepteur leurre qui lie l'IL-1 $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  et ce récepteur peut aussi lier la pro-IL-1 $\alpha$  intracellulaire (507). Chez l'humain, l'IL-1R2 existe aussi sous une forme soluble qui lie de façon quasi irréversible l'IL-1 $\beta$  en circulation.

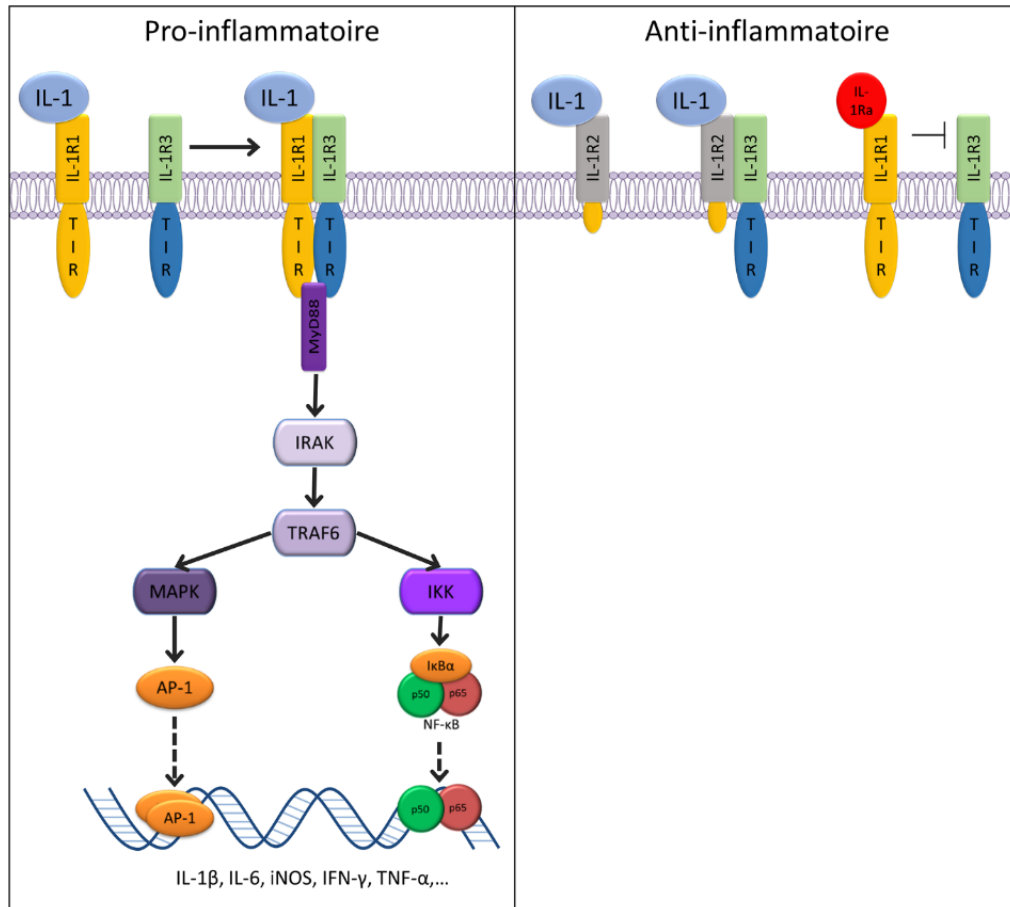
Le système à l'IL-1 contient aussi l'IL-1R3 qui est une protéine accessoire du récepteur nécessaire au recrutement de MyD88 (508). L'épissage alternatif de l'IL-1R3 induit l'expression de l'isoforme IL-1R3b. L'IL-1R3b est principalement exprimée par les neurones du SNC et possède un rôle neuroprotecteur (509, 510).

En résumé, la voie de signalisation de l'IL-1 possède des actions pro-inflammatoires et anti-inflammatoires dépendamment des interactions entre les ligands (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et IL-1Ra), les récepteurs (IL-1R1 et IL-1R2) et les corécepteurs (IL-1R3 et IL-1R3b).

### 7.2.2 Signalisation des récepteurs à l'IL-1

L'activation du système de l'IL-1 est induite par l'interaction entre le récepteur IL-1R1 et les ligands agonistes IL-1 $\alpha$  et IL-1 $\beta$  (Fig. 9). Lorsque l'IL-1 $\alpha$  ou l'IL-1 $\beta$  se lie à l'IL-1R1, ceci induit un changement de conformation qui permet le recrutement de l'IL-1R3 (511, 512). Ce recrutement rapproche le domaine TIR de l'IL-1R1 du domaine TIR de l'IL-1R de l'IL-1R3. Ce complexe trimérique (IL-1/IL-1R1/IL-1R3) recrute la protéine MyD88 qui induit une signalisation intracellulaire similaire à celle du TLR4 (voir section 5.1) induisant la production de médiateurs de l'inflammation dont les cytokines, les chimiokines et les dérivés réactifs de l'oxygène. Cette cascade de signalisation est illustrée à la figure 9.

D'autre part, la cascade d'activation de l'IL-1 peut être inhibée par l'action de l'IL-1R2 et de l'IL-1Ra (Fig. 9). Le récepteur IL-1R2 possède un petit domaine intracellulaire qui ne permet pas de recruter la machinerie intracellulaire nécessaire à la transduction du signal (513). Une fois que l'IL-1 se lie à l'IL-1R2, ce complexe recrute l'IL-1R3. Donc, l'IL-1R2 diminue la disponibilité de l'IL-1 et de l'IL-1R3. L'IL-1Ra est un antagoniste compétitif de l'IL-1. La liaison de l'IL-1Ra au récepteur n'induit pas le recrutement de l'IL-1R3 ce qui ne permet pas de transduction du signal. La présence de ces régulateurs négatifs assure le contrôle de la réponse inflammatoire induite par la voie de signalisation de l'IL-1. Une diminution de cette réponse anti-inflammatoire peut être associée à une réponse pro-inflammatoire incontrôlée ayant des conséquences néfastes.



**Figure 9. Interaction entre les récepteurs et les ligands du système IL-1**

Pro-inflammatoire : La liaison de l'IL-1 $\alpha$  ou l'IL-1 $\beta$  à l'IL-1R1 active la cascade de signalisation induisant la production de médiateurs pro-inflammatoires. Anti-inflammatoire : L'interaction de l'IL-1 $\alpha$  ou l'IL-1 $\beta$  avec l'IL-1R2 ne permet pas de recruter MyD88. La liaison de l'IL-1Ra avec IL-1R1 empêche l'interaction avec IL-1R3. Ces interactions empêchent l'induction de la cascade de signalisation intracellulaire. Figure adaptée de Boraschi *et al* (508)

### 7.2.3 Rôle physiologique de l'IL-1 dans le SNC

Bien que l'activation du système à l'IL-1 est connue pour ces actions délétères durant les pathologies, cette voie de signalisation joue aussi un rôle important durant les processus physiologiques du SNC incluant la thermorégulation, la régulation du sommeil, la consolidation de la mémoire, le neurodéveloppement et la survie neuronale.

Tout d'abord, l'IL-1 participe à la thermorégulation. Chez le rat, l'application d'IL-1 a diminué la décharge des neurones sensibles à la chaleur et augmenté la décharge des neurones sensibles au froid dans l'aire préoptique de l'hypothalamus (514, 515). L'injection d'IL-1 $\beta$  dans l'aire préoptique augmente de façon dose dépendante la température corporelle (516). L'augmentation de la température corporelle est associée à la fièvre présente durant les épisodes infectieux (517).

L'IL-1 participe aussi à la régulation du cycle du sommeil. L'injection intracérébrale d'IL-1 $\beta$  chez la souris augmente la durée du sommeil lent et diminue la durée passée en sommeil paradoxal et en éveil (518). À l'opposé, l'absence ou l'inhibition du récepteur IL-1R1 diminue la durée des périodes de sommeil lent (519, 520). Cette altération du sommeil est induite par une augmentation de la décharge des neurones liés au sommeil et une diminution de la décharge des neurones liés à l'éveil dans l'aire préoptique de l'hypothalamus et le télencéphale basal (521). L'isoforme IL-1R3b renforce le circuit neuronal du sommeil durant le développement. L'IL-1R3b diminue l'augmentation du sommeil lent induit par l'administration systémique de LPS (522, 523).

L'IL-1 $\beta$  est aussi impliquée dans la formation de la mémoire et la modulation de la potentialisation à long terme (LTP) dans l'hippocampe. À une concentration cérébrale physiopathologique, l'IL-1 $\beta$  est associée à des déficits d'apprentissage et de la mémoire alors qu'à une concentration physiologique, elle potentialise ces phénomènes (524-526). Chez des rats adultes, l'injection intracérébrale d'IL-1Ra induit des déficits d'apprentissage durant le test du labyrinthe de Morris et le test d'évitement passif (524). Dans l'étude de del Rey *et al*, les concentrations d'IL-1 $\beta$  augmentent dans le gyrus dentelé suivant l'induction de la LTP (527). De plus, l'exposition prénatale à l'IL-1Ra, en absence d'inflammation systémique, est associée à des atteintes de la mémoire chez des souris âgées de 2 mois (525). L'absence d'expression de l'IL-1R1 ou l'IL-1 $\beta$  augmente chez de jeunes souris (3 mois) les déficits d'apprentissage dans le test du labyrinthe de Morris alors que ces déficits sont diminués chez des souris âgées de 6 mois (528) ce qui démontre un effet plus important chez les jeunes animaux. Ces effets bénéfiques de l'IL-1 sur l'apprentissage sont surtout présents chez les jeunes animaux. En

résumé, les concentrations physiologiques d'IL-1 $\beta$  sont associées à la mémoire et l'apprentissage dans l'hippocampe chez les jeunes animaux.

Par ailleurs, l'IL-1 $\beta$  est aussi impliqué dans la neurogenèse et la survie des neurones. *In vitro*, la présence d'IL-1 $\beta$  dans des coupes organotypiques du cortex entorhinal induit de façon dose dépendante la croissance des neurites (529). Cette augmentation de la croissance des neurites résulte d'une augmentation de l'expression du facteur Wnt5a qui est associé à la différenciation neuronale et la croissance des axones (530, 531). De plus, l'IL-1 $\beta$  favorise la migration neuronale *in vivo* et *in vitro*. L'inhibition du récepteur à l'IL-1R1 par électroporation d'un petit ARN interférant (siRNA) chez la rate gestante a induit une altération du développement cortical chez la progéniture (532). Cette altération du développement cortical était caractérisée par la présence d'une majorité de neurones n'arrivant pas aux couches supérieures du cortex (532). Donc, le système de l'IL-1 participe dans le neurodéveloppement en induisant la migration et la croissance des neurites et en assurant la consolidation de l'apprentissage et de la mémoire dans l'hippocampe.

Outre ses actions durant le neurodéveloppement, l'IL-1 $\beta$  possède aussi une activité neuroprotectrice à la suite de lésions dans le SNC. L'injection intravitréenne d'IL-1 $\beta$ , à des concentrations supra-physiologiques, augmente la survie des cellules ganglionnaires dans la rétine de souris adultes en diminuant la mort cellulaire induite par excitotoxicité ou par transection du nerf optique (533, 534). Les effets neuroprotecteurs de l'IL-1 $\beta$  pourraient résulter de l'action de l'IL-1R3. Dans un modèle d'excitotoxicité induite par injection intracérébrale d'acide kaïnique, l'absence de l'IL-1R3 était associée à une plus grande mort neuronale 15 jours après la lésion (509). L'action neuroprotectrice de l'IL-1 pourrait résulter d'une augmentation de la capacité de survie des neurones à la suite des lésions.

Donc, la voie de signalisation de l'IL-1 assure diverses fonctions durant le neurodéveloppement, la survie neuronale à la suite de lésions et la régulation de la température corporelle et du cycle du sommeil. La majorité des actions bénéfiques de l'IL-1 surviennent à des concentrations physiologiques, alors que les concentrations élevées sont associées à la réponse pro-inflammatoire neurotoxique.



#### **7.2.4 Production de l'IL dans l'inflammation**

La production de l'IL-1 $\beta$  durant l'inflammation est sous le contrôle des PAMP et des DAMP. D'une part, les PAMP tels que le LPS activent la signalisation intracellulaire des TLRs ce qui amène la production de pro-IL-1 $\beta$  (535). D'autre part, les DAMP, dont l'ATP, activent l'inflammasome NLRP3 qui en retour active la caspase 1 pour augmenter le clivage de la pro-IL-1 en IL-1 $\beta$  mature (504). L'activation de l'inflammasome par l'ATP survient à la suite d'une diminution de la concentration intracellulaire de potassium après l'activation du récepteur purinergique P2X7 (536, 537). Puis, l'IL-1 $\beta$  mature est sécrétée dans le milieu extracellulaire où elle stimule la réponse inflammatoire (504, 535, 538).

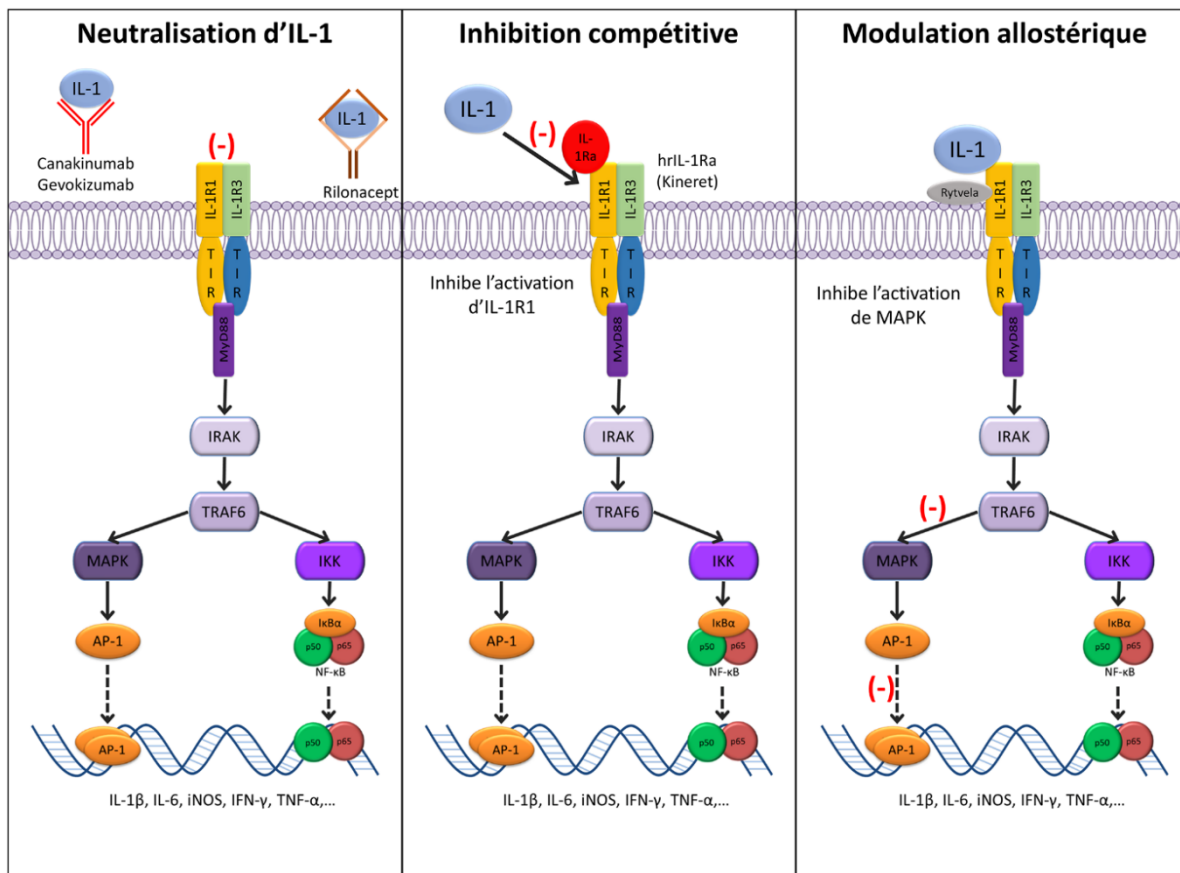
#### **7.2.5 Comment bloquer l'IL-1**

Le déséquilibre du système à l'IL-1 joue un rôle important dans les WMI chez les prématurés, mais aussi dans les modèles animaux (voir sections 4.6.2). À la lumière de son rôle majoritairement néfaste, l'IL-1 est une cible intéressante dans la prévention et la diminution des lésions cérébrales chez le prématuré.

Jusqu'à ce jour, trois molécules ciblant l'IL-1 ont été approuvées et sont utilisées en clinique soient : le Riloncept, le canakinumab et l'anakinra (Fig. 7) (539). Ces trois molécules ont été approuvées par la Food and Drug Administration (FDA) dans le traitement du syndrome périodique associé à la cryopyrine (CAPS) et sont à l'étude dans d'autres pathologies telles que le diabète de type 2 (540).

Le canakinumab et le riloncept agissent en neutralisant les ligands de l'IL-1 pour bloquer leur interaction avec l'IL-1R1 (Fig. 7). Le canakinumab est un anticorps humain monoclonal qui cible spécifiquement l'IL-1 $\beta$  (541). Le riloncept est une protéine recombinante produite par la fusion des deux chaînes extracellulaires de l'IL-1R et elle possède une grande affinité pour l'IL-1. Le riloncept agit comme un récepteur leurre soluble qui capture l'IL-1 $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$  et l'IL-1Ra (542).

L'anakinra est un recombinant humain de l'IL-1Ra qui agit à titre d'antagoniste compétitif (Fig.7). L'anakinra a aussi été approuvé dans la population pédiatrique pour le traitement du syndrome CINCA qui est une inflammation multisystémique due à une mutation dans le gène de l'inflammasome NLRP3 (543, 544). Aucune de ces molécules n'est approuvée pour le traitement de la neuroinflammation. Malgré la présence du riloncept et du canakinumab, l'anakinra demeure la molécule la plus utilisée pour cibler l'IL-1 en recherche préclinique et clinique (545). L'administration d'anakinra sur une période de plusieurs jours a démontré une efficacité thérapeutique en inhibant la réponse IL-1 dépendante dans différents modèles animaux de WMI induits par l'inflammation et par HI (546-550).



**Figure 10. Mode d'action des inhibiteurs ou modulateurs du système de l'IL-1**

L'activation du récepteur IL-1R1 peut être inhibée par la neutralisation de l'IL-1 $\alpha$  et de l'IL-1 $\beta$  par le riloncept et le canakinumab. L'activité de l'IL-1R1 peut être modulée par le Rytvela qui inhibe la voie des MAPK tout en préservant la voie NF- $\kappa$ B.

Le système de l'IL-1 peut aussi être modulé pour favoriser l'activation d'une voie de la cascade de signalisation intracellulaire tout en préservant les autres. Le Rytvela (connue aussi sous le nom de 101.10) est un petit peptide composé de 7 acides aminés (RYTVELA) qui a été développé par le laboratoire du Dr Chemtob (551). Le Rytvela est un modulateur allostérique qui se lie spécifiquement au récepteur IL-1R1 sans bloquer la liaison des ligands IL-1 (551, 552). La liaison du Rytvela induit une activation de la voie NF- $\kappa$ B tout en inhibant la voie MAPK (Fig. 7) (553). L'efficacité de cette molécule a été démontrée dans différents modèles de lésions inflammatoires. Dans un modèle de ROP, le Rytvela a eu un effet protecteur similaire à l'anakinra (554, 555). Le Rytvela a démontré une efficacité supérieure à l'anakinra dans des modèles animaux de dermatite, de maladie inflammatoire chronique de l'intestin et d'HI néonatale (551, 552). Plus récemment, le Rytvela s'est avéré plus efficace que l'anakinra pour prévenir le travail préterme dans un modèle murin de naissance prématurée induite par injection intra-utérine d'IL-1 $\beta$  ou de LPS (553, 556). L'efficacité du Rytvela dans la prévention du travail préterme est associée à une diminution de la mortalité, de l'inflammation cérébrale et des atteintes rétiniennes associées à la prématurité (556, 557). En fonction du modèle à l'étude, le Rytvela démontre un effet neuroprotecteur similaire voir supérieure à l'anakinra. Donc, ces deux molécules représentent des approches thérapeutiques intéressantes pour cibler l'IL-1 dans la neuroinflammation chez le prématuré.

## Objectifs de la thèse

L'inflammation, particulièrement la voie de l'IL-1, joue un rôle important dans la physiopathologie des WMI chez le prématuré. L'utilisation de l'IRM dans cette population a facilité le diagnostic et le suivi de ces lésions cérébrales à long terme. Il a été démontré que les WMI étaient accompagnées d'un risque d'atteintes neurodéveloppemental jusqu'à l'âge adulte. Avec l'utilisation plus fréquente de l'IRM en clinique, il est important de comprendre son potentiel dans le développement d'approches thérapeutiques dans cette population hautement vulnérable. Donc, en utilisant un modèle de WMI chez le rat néonatal, nous avons :

- 1) Caractérisé les changements de méthylation de l'ADN durant la phase aiguë et chronique de la réponse inflammatoire induite par le LPS
- 2) Évalué la capacité de l'IRM de détecter les lésions et la réponse thérapeutique durant la phase aiguë de l'inflammation
- 3) Étudié l'évolution de la polarisation de la microglie et des astrocytes en présence de LPS
- 4) Déterminé l'implication de la modulation du système à l'IL-1 dans la polarisation gliale induite par le LPS

Cette thèse comporte trois articles.

### **Article 1**

**Ordre des auteurs :** *Wyston C. Pierre, Lisa-Marie Legault, Irene Londono, Serge McGraw and Gregory A. Lodygensky*

**Titre de l'article :** *Alteration of the brain methylation landscape following postnatal inflammatory injury in rat pups*

*Article publié en janvier 2020 dans le journal FASEB*

<https://doi.org/10.1096/fj.201901461R>

### **Article 2**

**Ordre des auteurs :** *Wyston C Pierre, Luis Akakpo, Irène Londono, Philippe Pouliot, Sylvain Chemtob, Frédéric Lesage, Gregory A Lodygensky*

**Titre de l'article :** *Assessing therapeutic response non-invasively in a neonatal rat model of acute inflammatory white matter injury using high-field MRI*

*Article publié en octobre 2019 dans le journal Brain, Behavior and Immunity*

<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.06.032>

### **Article 3**

**Ordre des auteurs :** *Wyston C. Pierre, Irene Londono, Christiane Quiniou, Sylvain Chemtob and Gregory A. Lodygensky*

**Titre de l'article :** *Modulatory effect of IL-1 inhibition following lipopolysaccharide-induced neuroinflammation in neonatal microglia and astrocytes*

*Article soumis au journal NeuroImmunoModulation le 11 août 2020 et en cours de révision*

# **Chapitre II : Alteration of the brain methylation landscape following postnatal inflammatory injury in rat pups**

**RUNNING TITLE:** Neonatal white matter injury alters the brain methylome

**AUTHORS:** Wyston C. Pierre<sup>1</sup>, Lisa-Marie Legault<sup>2</sup>, Irene Londono<sup>1</sup>, Serge McGraw<sup>2,3†</sup> and Gregory A. Lodygensky<sup>1,4†</sup>

## **AFFILIATIONS :**

1. Department of Paediatrics, Université de Montréal, Research Center of the CHU Sainte-Justine, Montréal Québec.
2. Department of Biochemistry and Molecular Medicine, Université de Montréal, Research Center of the CHU Sainte-Justine, Montréal, Canada.
3. Department of Obstetrics & Gynecology, Université de Montréal, Research Center of the CHU Sainte-Justine, Montréal, Canada.
4. Department of Pharmacology and Physiology, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

† These authors equally contributed to the manuscript

**CORRESPONDING AUTHOR:** Gregory A. Lodygensky

Department of Pediatrics, NICU,

Sainte-Justine Hospital and Research Center,

3175 Chemin de la Côte Sainte-Catherine,

Montreal, QC, Canada H3T 1C5

ga.lodygensky@umontreal.ca

## **Nonstandard Abbreviations**

ASD : Autism spectrum disorder

CpG: Cytosine followed by guanine

DMR: Differentially methylated region

DOHaD: Developmental origins of health and disease

E. coli : Escherichia coli

GO : Gene ontology

LPS : Lipopolysaccharide

P3: Postnatal day 3

P4: Postnatal day 4

P24: Postnatal day 24

PBS: Phosphate buffered saline

PFA: Paraformaldehyde

RRBS: Reduced representation bisulfite sequencing

WMI: White matter injury

## **Abstract**

Preterm infants are vulnerable to inflammation-induced white matter injury (WMI), which is associated with neurocognitive impairment and increased risk of neuro-psychiatric diseases in adulthood. Epigenetic mechanisms, particularly DNA methylation, play a role in normal development and modulate the response to pathological challenges. Our aims were to determine how WMI triggered DNA methylation alterations in brains of neonatal rats and if such changes persisted over time. We used a robust model of WMI by injecting lipopolysaccharide or sterile saline in the corpus callosum of 3 days old (P3) rat pups. Brains were collected 24 hours (P4) and 21 days post-injection (P24). We extracted genomic DNA from the brain to establish genome-wide quantitative DNA methylation profiles using reduced representation bisulfite sequencing. Neonatal lipopolysaccharide exposure induced a persistent increased methylation of genes related to nervous system development and a reduced methylation of genes associated with inflammatory pathways. These findings suggest that early-life neuro-inflammatory exposure impacts the cerebral methylation landscape with determining widespread epigenetic modifications especially in genes related to neurodevelopment.

**Keywords:** Epigenetics; DNA methylation; Periventricular leukomalacia; Lipopolysaccharide



# 1. Introduction

Exposure to infections during the post-natal period in preterm newborns has been shown to have a drastic effect on neurodevelopmental outcomes especially in the setting of early meningitis but also in cases of sepsis and necrotizing enterocolitis (1-3). Preterm infants are highly vulnerable to infection due to their immature immune system particularly the extreme-born preterm (born 22 to 28-week gestation) in which 25 to 60% develop at least one infectious episode prior to hospital discharge with risk of recurring infections (4). These infectious episodes are associated with drastic production of inflammatory cytokines known to be highly toxic to the vulnerable developing white matter and they are associated to increased risk of white matter injury (WMI). WMI in the preterm is characterized by microglial activation, astrogliosis, ventricular dilatation, hypomyelination, altered connectivity and reduction of white and grey matter volumes (5-8) leading to an heightened risk of neurodevelopmental and neurocognitive impairments (5, 6, 8). To better understand the pathophysiological impact of inflammation on the premature infant's brain, different animal models have been developed which includes intracerebral lipopolysaccharide (LPS) injection that mimics the effect of Gram-negative infection. It was shown that intracerebral LPS injection in the corpus callosum of three days old (P3) rats, at a brain developmental state equivalent to very preterm babies, induced microglia and astrocyte activation, ventricular dilatation, hypomyelination and hippocampal atrophy (9-12). This recognized animal model also exhibited behavioral impairments including hyperactivity, memory impairments and motor deficits (13-15) similar to alterations seen in preterm infants with WMI (5, 7, 8). This early life inflammatory insult has long term repercussion characterized by sustained inflammation and increased sensitivity to secondary insults at adulthood.

The developmental origins of health and disease hypothesis (DOHaD) postulates that adaptation in response to early life injury alters the risk of disease during adulthood (16, 17). Animal exposed to inflammation, whether by systemic or intracerebral injection, during the perinatal period had sustained increase of pro-inflammatory markers (IL-1 $\beta$ , IL-6 and iNOS) and higher number of microglia in the striatum, the substantia nigra and the hippocampus at adulthood (14, 18). This early insult sensitized the brain to secondary insults at adulthood as seen with exacerbated impairments following induction of seizure and even of Parkinson disease (18-20).

Furthermore, in humans, recent evidences showed how perinatal inflammatory exposure predisposes to delayed psychiatric manifestations such as depression and schizophrenia (21-25). In the Helsinki Birth Cohort Study, preterm birth was a significant factor for appearance of early signs of mild cognitive decline and poorer cognitive score at adulthood (26). The increased risk for neuropsychiatric pathologies and early signs of neurodegeneration identified later in life following perinatal inflammation begs to question the possible involvement of long-lasting epigenetic changes.

Epigenetic mechanisms play an important developmental role in central nervous system. These mechanisms primarily involve DNA methylation, post-translational histone modifications and noncoding RNAs that together remodel chromatin to facilitate or suppress gene expression without changing the DNA sequence and are heritable during cell division (27). DNA methylation is the most stable and well-studied epigenetic change and consists of the addition or removal of a methyl group on the CpG region (cytosine followed by guanine) which alters DNA interactions with transcriptions factors (28). Addition of methyl group, hypermethylation, decreases or stops transcription particularly when it occurs in CpG dense promoter regions, and removal of a methyl group, hypomethylation, inversely tends to increase transcription rates (29). Currently, there are two major paradigms on the effect of methylation alteration in pathologies: i) methylation changes leading to clear gene activation or silencing which is highly found in oncogenes and ii) subtle and complex accumulation of methylation changes that are associated to disease phenotype particularly in programming non-malignant pathologies such as depression or schizophrenia (30, 31). Particularly, subtle methylation changes during the early life period has been associated to increased risk of developing neurodegenerative and neuropsychiatric disorders (30).

In humans, preterm birth has been associated to short- and long-term alterations of the epigenome landscape. Analysis of buccal swab at term equivalent age showed that very preterm with poorer neurobehavioral outcomes had altered methylation in genes relevant to neurodevelopment and neurodegenerative disease (32). Furthermore, DNA methylation in preterm saliva at term equivalent age, which has a higher correlation to the brain methylome compared to blood or buccal swab (33, 34), identified differential methylation of 10 protein coding genes playing a role in neural cell functions and behavioral traits development (35). As assessed through

analysis of blood spot methylation, very preterm born infants displayed until 18 years old persistent methylation changes in pathways related to nervous system and hematological system development, antigen presentation and embryonic development when compared to term born infants (36). This was corroborated by analysis of whole blood DNA methylation in preterm born pair of twins that showed methylation alterations in genes related to immune response at adulthood (30-35 years) that persisted at older ages (56-80 years) (37). The persistent signs of altered methylation profile in genes related to immune response and neuronal development in preterm infants further corroborate the idea of the early establishment of altered inflammatory and developmental states that could facilitate neurological disorders at adulthood. Yet, a clear description of the short- and long-term impact of neonatal inflammation on brain methylome is not available to date.

Using this robust animal model of inflammatory WMI (10, 11, 38-40), we hypothesised that postnatal inflammatory exposure induced significant cerebral epigenetics modifications similarly to recent epidemiological findings in former preterm infants.

## 2. Materials and Methods

### Animal preparation

Animal-handling procedures were approved by the Animal Research Ethics Committee of the Montreal Heart Institute in accordance with the Canadian Council of Animal Care. The animals were given ad libitum access to food and water and were kept under a 12 hours light/dark cycles. A total of 32 male and female Sprague-Dawley rats at 3 days old (P3) were randomly assigned to one of 4 groups (n=8 in each group): a) Sham at postnatal day 4 (P4); b) Sham at postnatal day 24 (P24); c) lipopolysaccharide (LPS) at P4 and d) LPS at P24. P4 corresponds to the acute phase of inflammation and represent an age where the rat brain is equivalent to the brain of a preterm infant (9), and P24 rat brain is equivalent to the brain of 2-3 years old human child (9, 41). Animals were injected in the corpus callosum, at a level equivalent to P-7, c9 (42), under ultrasound guidance using Vevo LAZR micro-ultrasound system (FUJIFILM VisualSonics Inc., Toronto, ON, Canada). The LPS animals were injected with a suspension of 1 mg/kg LPS (E. Coli, serotype 055:B5, Sigma) in sterile saline solution. The LPS dosage was established in previous studies using this model of WMI (10, 40). An equivalent volume of sterile saline alone was injected to the Sham group pups. A micropipette mounted on a microprocessor-controlled injector (Micro4 from World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) with a speed rate of 100 nL/min was used for the injections. All the injections were performed under isoflurane anesthesia. The animals were euthanized at P4 and P24 and the brains were collected for DNA methylation assessment (n=4 per group) and for histology (n=4 per group).

### Histology

Rats at P4 and P24 were perfused through the heart with PBS followed by 4% paraformaldehyde (PFA) and brains were extracted and submerged in 4% PFA for 24h at 4°C and then cryoprotected by immersion in 30% sucrose for at least 48h. Brains were kept at 4°C until cutting. Coronal sections (50 µm thick) were cut on a cryostat and conserved at - 20°C in cryoprotectant solution (30% ethylene glycol in 0.03 mol/L PBS and 15% sucrose) until staining. Brain sections at the level of the bregma were stained with cresyl violet and scanned at 20x in the slide scanner Axioscan Z1 (Carl Zeiss Inc, ON, Canada) to measure lateral ventricle size. Area of left and right ventricles and total brain section area were measured for each section using Fiji (39).

The ventricle size index was calculated as the ratio between area of each ventricle and area of the whole brain section and ratio between left and right ventricle was also calculated. Comparisons between groups at each time point were performed using a Mann-Whitney test with statistical significance set at  $P < 0.05$ . Analysis were performed using GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA).

### **DNA extraction**

Rat pups used for DNA methylation, were perfused through the heart with phosphate buffered saline solution (PBS), then, the ipsilateral hemispheres were snap-frozen on dry ice and kept at  $-80^{\circ}\text{C}$ . The ipsilateral brain hemisphere was coronally trimmed into a block of tissue, containing areas near the site of injection, from 2.80mm to -0.40mm from Bregma at P4 and 2.80mm to -1.80mm from Bregma at P24 and processed for DNA extraction. In brief, the block of tissue was reduced to powder by grinding it in liquid nitrogen and the powder was kept at  $-80^{\circ}\text{C}$  until DNA extraction. Total DNA was extracted with the QIAGEN DNA mini kit (#51304) according to the manufacturer's instructions. DNA quality and concentration were assessed by spectrophotometry using the Nanodrop apparatus (Thermoscientific, Wilmington, DE, USA).

### **Reduced Representation Bisulfite Sequencing**

Quantitative DNA methylation profiles were obtained by Reduced Representation Bisulfite Sequencing using a modified version of previously published protocols (43-47). Briefly, 600ng of genomic DNA were digested over night with non-methylation specific Msp1 enzyme (NEB # R0106M). Ligation of methylated adaptors (NEB # E7535L) was done on the digested DNA with T4 ligase enzyme (NEB #M0202L) before sodium bisulfite conversion (QIAGEN # 59826). Libraries were amplified by qPCR with Illumina indexing primers (NEB # E7535L) followed by clean up and size selection of the libraries using Agencourt® AMPure® XP magnetic beads (Beckman Coulter # A63881). Quality of the libraries was assessed by Bioanalyzer (Agilent # 5067-4626) and eight individual libraries were multiplexed into one lane of 100bp paired-end sequencing on Illumina HiSeq 2000 sequencer. Raw sequencing data was preprocessed for quality control and adapters removal with TrimGalore (version 0.3.3), and alignment to the rat reference genome (rn6) and methylation calls with BSMAP (version 2.9)(48). X and Y chromosomes were removed from the rest of the analysis to avoid sex bias. R package Methylkit (version 0.5.3) (49)

was used to obtain differentially methylated regions applying specific parameters (p-value threshold of  $q = 0.01$  by the Benjamini–Hochberg FDR procedure, 100 bp step-wise tiling windows, a minimum of 2 CpGs per tile and a minimum of  $10\times$  CpG coverage of each tile per sample). The methylation score of each tile was the average of the methylation of each single CpGs within the tile. For each time points, differentially methylated regions corresponded to tiles with at least 10% of difference of methylation between the two conditions (Sham vs LPS) as previously published (50-52). Differentially methylated regions (DMRs) were finally annotated using Homer (version 4.1).

### **Gene ontology and pathway analysis**

The hypermethylated (gain of methylation) and hypomethylated (loss of methylation) genic DMRs at P4 and P24 were analysed with the online software Metascape version 3.0 (<http://metascape.org>) (53, 54) for functional enrichment using ontology terms collected from Gene Ontology for biological processes, cellular components and molecular functions (<http://geneontology.org>), Reactome Gene Set pathways (<http://portal.genego.com>), and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathways (<http://www.genome.jp/kegg>). Functional analyses for the datasets were run to display the 40 most significant biological functions across the dataset that meet a p-value cut-off of 0.01. For ease of visualization, only the 10 functions with the lowest p-value are displayed.

### 3. Results

#### Neonatal LPS-induced WMI resulted in ventricles dilatation

We first sought to determine the impact of WMI on animal weight and ventricles morphology. Animal's body weight did not vary significantly between Sham and LPS groups at each time points ( $10.50 \pm 0.45$ g vs  $10.06 \pm 0.41$ g at P4;  $70.24 \pm 3.29$ g vs  $68.69 \pm 3.46$ g at P24, Sham vs LPS respectively). Knowing that lateral ventricle enlargement is the most common histopathological hallmark in LPS-injected rats, we measured ventricle size index on brain sections stained with cresyl violet (10, 12). At P4, ventricle size did not have a significant difference between Sham and LPS animal for both left and right ventricles (Fig. 1). On the opposite, at P24, LPS rats presented increased bilateral ventricle size index and the left ventricle, the side of injection, reached statistical significance ( $0.49 \pm 0.11$  vs  $9.65 \pm 4.75$   $p < 0.0286$ , Sham vs LPS respectively) (Fig. 1). Thus, neonatal LPS exposure resulted in bi-hemispheric cerebral injury.

#### Changes in methylation following inflammation-induced WMI

We then aimed at investigating the impact of LPS-induced WMI on epigenetic marks by establishing methylation profiles of rat brains, at P4 and P24, by reduced representation bisulfite sequencing (RRBS). Following RRBS, differentially methylated regions (DMRs) were identified between Sham and LPS animals at each time point by comparing CGs methylation levels. Due to sex heterogeneity in the groups, DMRs on chromosomes X and Y were excluded (supplemental figure 1). DMRs were distributed across all chromosomes studied at both time points (supplemental figure 1).

First, DMRs at P4 (Fig. 2) and P24 (Fig. 3) were aligned to the reference genome (rn6) and 100bp regions were compared between Sham and LPS animals. At P4, 183210 100bp regions were analysed with a high proportion of them located within intergenic (46%), intronic (26%) and promoter (14%) regions (Fig. 2b). Of the total 100bp regions studied at P4, 1453 DMRs were identified following LPS exposure (696 hypermethylated and 757 hypomethylated DMRs) with the majority located in intergenic regions (59%) or in introns (30%) (Fig. 2a & b). At P24, 168667 100bp regions were analyzed and they were mainly located in intergenic regions (45%), in introns (25%) and in promoters (15%) similarly to P4 (Fig. 3b). From the 1502 DMRs identified at P24

(902 hypermethylated and 600 hypomethylated), the majority were either intergenic (58%) or located in introns (29%) (Fig. 3a & b). In sum, neonatal inflammatory WMI increased the occurrence of methylation changes within the intergenic region and introns at both time points (Fig 2b and 3b).

### **CpG content and neighborhood:**

Analogous to the characterization by genic region, DMRs distribution was also assessed based on their proximity to CpG content and neighborhood context (island, shore, shelf and open sea). CpG shores are located up to 2 kb from CpG islands, shelves are 2–4 kb away, and open sea regions are isolated CpG in the genome (55). We compared the relative proportion of DMRs CpG location to the proportion within the total 100bp regions at both time points.

At both P4 and P24, the majority of CpG of the total 100bp tiles were located within the open sea and on CpG islands (Fig. 2c and 3c). Within identified DMRs, the majority were in the open sea at both P4 and P24 with the lowest percentage of DMRs found on CpG islands at P4 and CpG shelves at P24 (Fig. 2c and 3c). Compared to the distribution pattern seen in all 100bp regions analyzed, there was a strong increase of DMRs in the open sea and a decrease on CpG islands at both time points (Fig. 2c and 3c). Therefore, inflammation-induced WMI resulted in a persistent increase of methylation alterations across CpG in the open sea. When taken together, the preferential methylation changes in the intergenic region and in the open sea could point toward alteration of genomic stability following neonatal WMI.

### **Gene enrichment analysis**

Gene ontology (GO) analysis was performed with Metascape to characterize pathways associated to the genes with DMRs, (53, 56). The intergenic regions were excluded, which leaves 597 genic DMRs (281 hypermethylated and 316 hypomethylated) at P4 and 626 genic DMRs (380 hypermethylated and 246 hypomethylated) at P24 (table I). A first analysis performed with the DMRs-associated genes, regardless of their methylation status, showed that majority of the pathways were related to inflammatory response at P4 and to neurodevelopment at P24 (supplemental figure 2). Knowing that the methylation status can influence differently gene expression, genes were separated in function of whether their DMRs were hyper- or



hypomethylated for subsequent GO analysis. For ease of comprehension, only the 10 pathways with the strongest enrichment were depicted in figures 2 and 3 with the complete set illustrated in supplemental figures 3 and 4.

At P4, 240 unique genes had hypermethylated DMRs and 283 genes had hypomethylated DMRs (table I). Hypermethylated DMRs within genes showed multiple pathways associated with nervous system development such as the dendritic compartment and neuron differentiation, and also with protein and lipid synthesis pathways (Fig. 2d and supplemental figure 3a). The 283 genes with hypomethylated DMRs at P4 were highly enriched for immune and inflammatory response pathways and pathways associated to synaptic and axonal compartments (Fig. 2e and supplemental figure 3b). Furthermore, regulation of synapse assembly was associated to both hypermethylated and hypomethylated DMRs within genes (supplemental table I). Thus, at P4, neonatal WMI altered methylation within genes associated to innate immune response and to nervous system.

At P24, 323 genes had hypermethylated DMRs and 219 had hypomethylated DMRs (Table I). Although, there was more genes with hypermethylated than hypomethylated genic DMRs, the absolute values of average percentage difference of methylation change were similar (table I). Hypermethylated DMRs within genes at P24 were highly enriched in neurodevelopmental pathways such as regulation of neuronal differentiation, axonal compartment, and ensheathment of neurons (Fig. 3d and supplemental figure 4a). Hypermethylated DMRs within genes were also associated to immune system regulatory pathways which included myeloid cell differentiation and CTLA4 inhibitory signal (Fig. 3d and supplemental figure 4a). At P24, hypomethylated DMRs within genes still showed an increased representation of inflammatory and innate immune response pathways like T cell cytokine production and interleukin 12 production and were also associated to neurodevelopmental pathways particularly synaptic organization and to receptor tyrosine kinase signalling pathways (Fig. 3e and supplemental figure 4b). At P24, lipid binding, regulation of GTPase activity and phosphoric ester hydrolase activity pathways were associated to both hypermethylated and hypomethylated DMRs within genes (supplemental table I). Even at P24, neonatal WMI changed DNA methylation in genes associated to nervous system and inflammatory pathways.

In light of global alteration of pathways associated to neurodevelopment and immune response at P4 and P24, and the fact that DNA methylation is a dynamic process, we compared the GO analysis results to identify identical pathways between both time points. No identical pathway was found for hypermethylated DMRs within genes at P4 and P24. Cell projection membrane, innate immune system and regulation of cell adhesion pathways were identified at P4 and P24 for hypomethylated DMRs within genes (supplemental table I). Furthermore, regulation of fat cell differentiation, import into cell and the axonal compartment pathways were associated to hypomethylated DMRs at P4 and to hypermethylated at P24 (supplemental table I). CNS neuron differentiation pathway was identified at P4 to hypermethylated DMRs within genes and to hypomethylated DMRs within genes at P24 (supplemental table I).

Next, we investigated, with GO analysis, pathways that could be associated to altered methylation in promoter regions at P4 and P24 (table I). No pathways were identified for hypermethylated DMRs-associated genes at P4 and hypomethylated DMRs at P24. At P4, hypomethylated DMRs in the promoter region were associated to inflammatory processes (supplemental figure 3c). At P24, promoter region hypermethylated DMRs were linked to cellular nitrogen compound catabolic process and gland development (supplemental figure 4c).

Taken together, neonatal inflammatory WMI induced a persistent methylation alteration in genes relevant to nervous system developments, inflammatory response and alteration in the synaptic compartment pathways.

### **Methylation difference in genes related to inflammation and myelination**

As interindividual variabilities are present in the histological examination (Fig. 1), we looked at occurrence of individual variability in methylation changes for genes related to inflammatory response, and to myelination and oligodendrocytes. These pathways were chosen as inflammation and hypomyelination are two established pathological hallmarks in this animal model. At P4 and P24, the genes *DLXI*, *SDCI* and *UNC13D* had multiple methylation changes as noted with the presence of at least two DMRs for each gene (Fig. 4a and d). For inflammatory response, all DMRs were hypomethylated at P4 and both hyper- and hypomethylated DMRs were present at P24 (Fig. 4a and b). At both P4 and P24, hypermethylated and hypomethylated DMRs

were present for myelination/oligodendrocyte pathway (Fig. 4c and d). For both hypermethylated and hypomethylated DMRs-associated genes in each pathway, LPS-exposed animals had similar methylation changes on some genes while there was individual variability for other genes (Fig. 4). Furthermore, the genes *ABCD2* and *NRTK2*, identified at P24, were associated to both pathways (Fig. 4b and d). Consequently, LPS-exposed animals had variable methylation changes in some genes while other genes had more conserved alteration between animals.

### **Common DMRs at P4 and P24**

Considering the presence of similar genes and pathways between P4 and P24 (supplemental table I), we looked at the possibility of finding identical DMRs at both time points. Over the 1453 and 1502 DMRs identified at P4 and P24 respectively, 102 DMRs were identified on the exact same 100bp region at both time points. Of the 102 DMRs, 50% (n=51) kept similar methylation status between P4 and P24 and 50% (n=51) had a shift to the opposite methylation status (Fig. 5a). Similar to results with all identified DMRs, common DMRs at both time points had enhanced methylation changes in the intergenic region and in the open sea (supplemental figure 5). Following exclusion of intergenic DMRs, GO analysis performed with Metascape, regardless of DMRs methylation status evolution, showed an enrichment in genes related to negative regulation of fat cell differentiation, receptor-mediated endocytosis, ion channel transport and cilium compartment (Fig. 5b) thus pointing toward persistent alterations in these pathways following early life inflammation.

## 4. Discussion

In the present study, we investigated methylation profile changes in rat brains subjected to neonatal LPS-induced moderate to severe WMI at 24 hours and 21 days following exposure. We observed that WMI induced methylation perturbation in a period highly important for neurodevelopment that persisted up to 21 days post-injury. We identified increased rate of methylation changes occurring in intergenic regions, CpG open-sea and on transposable elements, which could point toward altered genomic stability. Moreover, GO analysis showed that neonatal inflammation induced persistent methylation alterations in genes associated to neurodevelopmental and immune response pathways particularly in axonal and synaptic compartments, and in inflammatory response and leukocyte-mediated immunity. Furthermore, we observed methylation alteration on genes enriched in pathways related to protein and lipid metabolism and receptor tyrosine kinase signaling.

DNA methylation is an important regulatory mechanism that partakes in neurodevelopmental processes, different neurological functions such as learning and memory and maintenance of homeostasis at adulthood (57-60). Alteration of DNA methylation has been implicated in many neurodevelopmental and neurodegenerative diseases including autism spectrum disorder (ASD), Down syndrome, Alzheimer disease and schizophrenia. In our study, neonatal inflammation-induced WMI resulted in DNA methylation alteration that persisted up to 21 days post-injury. In accordance to our results, animal studies showed that adverse events during the perinatal period can lead to sustained alteration of the brain methylome up to 1 year after the initial insult (61, 62). For example, exposure to maternal maltreatment during the first days of life in rats induced a global alteration of DNA methylation in the amygdala and hippocampus at adolescence (P30) (61). Our datasets revealed that major portion of methylation changes occurred in intergenic and intronic regions and on CpG within the open sea. The susceptibility of these regions to methylation changes was also seen in models of maternal separation and in prenatal alcohol exposure (62, 63). It was suggested that methylation in intergenic and introns could target regulatory sequences that play a role in gene expression (63-66).

One major group of pathways that emerged from our methylome analysis following neonatal inflammation-induced WMI was related to the axon. We noted that genes associated to axonal compartment had a shift from a hypomethylated to a hypermethylated state which could be associated to the presence of axonal injury as it has been confirmed in this model by diffusion tensor imaging and by immunohistochemistry using the apoptotic marker fractin (38, 40). Furthermore, using the microtubule associated protein 1 expressed in axons, Fan et *al.* has confirmed that axonal fragmentation, already present 3 days after LPS exposure, was still there 70 days later (13, 67). In post-mortem preterm infants brains, diffuse axonal injury has been shown in the white matter by immunostaining for fractin and other axonal damage markers (68). Surviving preterm infants had impaired hippocampal and cortical growth seen seven years later (69, 70) and even signs of increasing atrophy over time (71). Moreover, hypermethylation of synaptic processes and axonal compartment was associated to aging and cognitive decline in aging rat prefrontal cortices (72). Thus, the hypermethylation of genes related to axonal compartment, seen in our study, could reflect the onset of long-lasting changes in neurodevelopment.

The enrichment of genes in pathways relevant to inflammation and immune response at P4 and P24 supports the presence of a sustained inflammatory state that could be caused in part by methylome alteration. As stated earlier, perinatal inflammation is associated to increased vulnerability to secondary insults at later time points in life particularly in the context of microglia priming. It was shown that microglia of adult rats exposed to *E. coli* bacteria in the neonatal period had a stronger response to a secondary LPS challenge compared to naïve rats' microglia (18). Furthermore, neonatal infection in mice led to heightened susceptibility to amyloid beta at adulthood with increased microglial activation and higher memory impairment in the novel object recognition test (73). Indeed, the methylation alterations in inflammatory pathways seen in this study could be a key component of a chronic low-level inflammation state, which is being increasingly recognized as central to cognitive decline, neuropsychiatric and neurodegenerative diseases (74-78). Several world leaders in neonatal neurobiology, actively studying the *inflammation-induced sensitization paradigm*, are expressing grave concern over the increased risk of neurodegeneration following subsequent insults (79-81).

102 identical DMRs were identified between P4 and P24 for which half preserved their methylation status and the other half shifted to the opposite status. DNA methylation is a dynamic process that evolves with age and in pathological conditions (82-84). During normal aging, GO analysis of peripheral blood samples from paediatric and aged population revealed that methylation changes were highly related to developmental and inflammatory pathways (85, 86). It was shown that aging was associated to decreased DNA methylation of pro-inflammatory cytokines genes in both the brain and blood and these changes could render them more susceptible to be expressed following a secondary adverse insult (87). Furthermore, alteration of DNA methylation by adverse events can lead to discrepancy between chronological age and methylome age, which is associated to accelerated aging processes and age-related pathologies including neurodegenerative diseases and decreased white matter integrity (88-92). Although the DNA methylation changes seen in this study were mostly subtle compared to changes occurring during development or in cancer, their accumulation could have the potential to impact the normal neurodevelopmental course (30). Therefore, it is possible that the changes in the epigenome seen in this study could play a major role in potentiating brain injury after neuroimmune challenges later in life.

A limitation of this study is that methylation data were derived from brain homogenates that are composed of different cells type. It was previously established that epigenetic difference could be seen within same tissue due to cell heterogeneity (93). Although a single cell methylome analysis would have allowed a better understanding of inflammation effect on different type of brain cells, it would have been less impactful to study the broad effect of early life inflammation on the brain methylome. Another limitation is the presence of pathways not related to the central nervous system like prostate morphogenesis or chondrocyte differentiation, this points toward the presence of gene networks not characterized in regard to brain development and/or brain-related functions (94).

In conclusion, we showed how postnatal inflammatory exposure caused a vast array of cerebral epigenomic alteration in genes relevant to inflammatory response and neurodevelopment with significant modifications still present 3 weeks after the injury. Given the long-lasting impact of neonatal inflammation on methylation profile, we believe that the inclusion of epigenetic analysis will become mandatory in neonatal neuroprotection studies in the future and whether

future preclinical studies should i) consider an epigenomic intervention as done in psychiatric and cancer research and ii) seek a protective role on the epigenetic signature by specific anti-inflammatory therapies.

## **Acknowledgement**

This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (<http://www.cihr-irsc.gc.ca/>)– Institute of Human Development, Child and Youth Health (IHDCYH) (136908 to G.A.L.). G.A.L. and S.M are supported by a start-up grant from the Research Center of CHU Sainte-Justine. Salary support to L.M.L is provided by the Canadian Institutes of Health Research and to S.M. by the Fonds de Recherche Québec Santé.

## **Author Contributions**

Wyston C. Pierre participated in data acquisition, data analysis, and manuscript draft, reviewed and revised the manuscript. Lisa-Marie Legault has contributed to the data acquisition, data analysis and manuscript preparation and revision. Irène Londono has contributed to the study preparation, data acquisition and manuscript revision. Gregory A. Lodygensky and Serge McGraw conceptualized and designed the study, contributed to data acquisition, supervised the data analysis, and revised the manuscript.

## **Conflict of interest**

The authors declare no competing financial interests.



## References

1. van Vliet, E. O., de Kieviet, J. F., Oosterlaan, J., and van Elburg, R. M. (2013) Perinatal infections and neurodevelopmental outcome in very preterm and very low-birth-weight infants: a meta-analysis. *JAMA Pediatr* **167**, 662-668
2. Thornton, C., Rousset, C. I., Kichev, A., Miyakuni, Y., Vontell, R., Baburamani, A. A., Fleiss, B., Gressens, P., and Hagberg, H. (2012) Molecular mechanisms of neonatal brain injury. *Neurol Res Int* **2012**, 506320
3. Hagberg, H., Mallard, C., Ferriero, D. M., Vannucci, S. J., Levison, S. W., Vexler, Z. S., and Gressens, P. (2015) The role of inflammation in perinatal brain injury. *Nat Rev Neurol* **11**, 192-208
4. Strunk, T., Inder, T., Wang, X., Burgner, D., Mallard, C., and Levy, O. (2014) Infection-induced inflammation and cerebral injury in preterm infants. *Lancet Infect. Dis.* **14**, 751-762
5. Back, S. A., and Rosenberg, P. A. (2014) Pathophysiology of glia in perinatal white matter injury. *Glia*
6. Volpe, J. J. (2003) Cerebral white matter injury of the premature infant-more common than you think. *Pediatrics* **112**, 176-180
7. Khwaja, O., and Volpe, J. J. (2008) Pathogenesis of cerebral white matter injury of prematurity. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.* **93**, F153-161
8. Volpe, J. J. (2009) Brain injury in premature infants: a complex amalgam of destructive and developmental disturbances. *Lancet Neurol.* **8**, 110-124
9. Semple, B. D., Blomgren, K., Gimlin, K., Ferriero, D. M., and Noble-Haeusslein, L. J. (2013) Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Prog. Neurobiol.* **0**, 1-16
10. Pang, Y., Cai, Z., and Rhodes, P. G. (2003) Disturbance of oligodendrocyte development, hypomyelination and white matter injury in the neonatal rat brain after intracerebral injection of lipopolysaccharide. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **140**, 205-214
11. Cai, Z., Pang, Y., Lin, S., and Rhodes, P. G. (2003) Differential roles of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta in lipopolysaccharide-induced brain injury in the neonatal rat. *Brain Res.* **975**, 37-47

12. Lodygensky, G. A., West, T., Stump, M., Holtzman, D. M., Inder, T. E., and Neil, J. J. (2010) In vivo MRI analysis of an inflammatory injury in the developing brain. *Brain. Behav. Immun.* **24**, 759-767
13. Wang, K. C., Fan, L. W., Kaizaki, A., Pang, Y., Cai, Z., and Tien, L. T. (2013) Neonatal lipopolysaccharide exposure induces long-lasting learning impairment, less anxiety-like response and hippocampal injury in adult rats. *Neuroscience* **234**, 146-157
14. Fan, L. W., Tien, L. T., Zheng, B., Pang, Y., Lin, R. C., Simpson, K. L., Ma, T., Rhodes, P. G., and Cai, Z. (2011) Dopaminergic neuronal injury in the adult rat brain following neonatal exposure to lipopolysaccharide and the silent neurotoxicity. *Brain. Behav. Immun.* **25**, 286-297
15. Fan, L. W., Tien, L. T., Mitchell, H. J., Rhodes, P. G., and Cai, Z. (2008) Alpha-phenyl-n-tert-butyl-nitron ameliorates hippocampal injury and improves learning and memory in juvenile rats following neonatal exposure to lipopolysaccharide. *Eur. J. Neurosci.* **27**, 1475-1484
16. Langley-Evans, S. C., and McMullen, S. (2010) Developmental origins of adult disease. *Med Princ Pract* **19**, 87-98
17. Power, C., Kuh, D., and Morton, S. (2013) From developmental origins of adult disease to life course research on adult disease and aging: insights from birth cohort studies. *Annu. Rev. Public Health* **34**, 7-28
18. Williamson, L. L., Sholar, P. W., Mistry, R. S., Smith, S. H., and Bilbo, S. D. (2011) Microglia and memory: modulation by early-life infection. *J. Neurosci.* **31**, 15511-15521
19. Yin, P., Li, Z., Wang, Y. Y., Qiao, N. N., Huang, S. Y., Sun, R. P., and Wang, J. W. (2013) Neonatal immune challenge exacerbates seizure-induced hippocampus-dependent memory impairment in adult rats. *Epilepsy Behav* **27**, 9-17
20. Tien, L. T., Kaizaki, A., Pang, Y., Cai, Z., Bhatt, A. J., and Fan, L. W. (2013) Neonatal exposure to lipopolysaccharide enhances accumulation of alpha-synuclein aggregation and dopamine transporter protein expression in the substantia nigra in responses to rotenone challenge in later life. *Toxicology* **308**, 96-103
21. Debnath, M., Venkatasubramanian, G., and Berk, M. (2015) Fetal programming of schizophrenia: select mechanisms. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **49**, 90-104

22. Allswede, D. M., Buka, S. L., Yolken, R. H., Torrey, E. F., and Cannon, T. D. (2016) Elevated maternal cytokine levels at birth and risk for psychosis in adult offspring. *Schizophr. Res.* **172**, 41-45
23. Meyer, U., Nyffeler, M., Engler, A., Urwyler, A., Schedlowski, M., Knuesel, I., Yee, B. K., and Feldon, J. (2006) The time of prenatal immune challenge determines the specificity of inflammation-mediated brain and behavioral pathology. *J. Neurosci.* **26**, 4752-4762
24. Meyer, U., Feldon, J., and Dammann, O. (2011) Schizophrenia and Autism: Both Shared and Disorder-Specific Pathogenesis Via Perinatal Inflammation? *Pediatr. Res.* **69**, 26R-33R
25. Wischhof, L., Irrsack, E., Osorio, C., and Koch, M. (2015) Prenatal LPS-exposure--a neurodevelopmental rat model of schizophrenia--differentially affects cognitive functions, myelination and parvalbumin expression in male and female offspring. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **57**, 17-30
26. Heinonen, K., Eriksson, J. G., Lahti, J., Kajantie, E., Pesonen, A. K., Tuovinen, S., Osmond, C., and Raikkonen, K. (2015) Late preterm birth and neurocognitive performance in late adulthood: a birth cohort study. *Pediatrics* **135**, e818-825
27. Lardenoije, R., Iatrou, A., Kenis, G., Kompotis, K., Steinbusch, H. W. M., Mastroeni, D., Coleman, P., Lemere, C. A., Hof, P. R., van den Hove, D. L. A., and Rutten, B. P. F. (2015) The epigenetics of aging and neurodegeneration. *Prog. Neurobiol.* **131**, 21-64
28. Jin, B., Li, Y., and Robertson, K. D. (2011) DNA Methylation: Superior or Subordinate in the Epigenetic Hierarchy? *Genes & Cancer* **2**, 607-617
29. Xu, X. (2015) DNA methylation and cognitive aging. *Oncotarget* **6**, 13922-13932
30. Leenen, F. A., Muller, C. P., and Turner, J. D. (2016) DNA methylation: conducting the orchestra from exposure to phenotype? *Clin Epigenetics* **8**, 92
31. Grova, N., Schroeder, H., Olivier, J. L., and Turner, J. D. (2019) Epigenetic and Neurological Impairments Associated with Early Life Exposure to Persistent Organic Pollutants. *Int J Genomics* **2019**, 2085496
32. Everson, T. M., Marsit, C. J., Michael O'Shea, T., Burt, A., Hermetz, K., Carter, B. S., Helderman, J., Hofheimer, J. A., McGowan, E. C., Neal, C. R., Pastyrnak, S. L., Smith, L. M., Soliman, A., DellaGrotta, S. A., Dansereau, L. M., Padbury, J. F., and Lester, B. M.

- (2019) Epigenome-wide Analysis Identifies Genes and Pathways Linked to Neurobehavioral Variation in Preterm Infants. *Sci Rep* **9**, 6322
33. Smith, A. K., Kilaru, V., Klengel, T., Mercer, K. B., Bradley, B., Conneely, K. N., Ressler, K. J., and Binder, E. B. (2015) DNA extracted from saliva for methylation studies of psychiatric traits: evidence tissue specificity and relatedness to brain. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* **168b**, 36-44
  34. Braun, P. R., Han, S., Hing, B., Nagahama, Y., Gaul, L. N., Heinzman, J. T., Grossbach, A. J., Close, L., Dlouhy, B. J., Howard, M. A., 3rd, Kawasaki, H., Potash, J. B., and Shinozaki, G. (2019) Genome-wide DNA methylation comparison between live human brain and peripheral tissues within individuals. *Transl Psychiatry* **9**, 47
  35. Sparrow, S., Manning, J. R., Cartier, J., Anblagan, D., Bastin, M. E., Piyasena, C., Pataky, R., Moore, E. J., Semple, S. I., Wilkinson, A. G., Evans, M., Drake, A. J., and Boardman, J. P. (2016) Epigenomic profiling of preterm infants reveals DNA methylation differences at sites associated with neural function. *Transl Psychiatry* **6**, e716
  36. Cruickshank, M. N., Oshlack, A., Theda, C., Davis, P. G., Martino, D., Sheehan, P., Dai, Y., Saffery, R., Doyle, L. W., and Craig, J. M. (2013) Analysis of epigenetic changes in survivors of preterm birth reveals the effect of gestational age and evidence for a long term legacy. *Genome Med* **5**, 96
  37. Tan, Q., Li, S., Frost, M., Nygaard, M., Soerensen, M., Larsen, M., Christensen, K., and Christiansen, L. (2018) Epigenetic signature of preterm birth in adult twins. *Clinical Epigenetics* **10**, 87
  38. Akakpo, L., Pierre, W. C., Jin, C., Londono, I., Pouliot, P., and Lodygensky, G. A. (2017) User-independent diffusion tensor imaging analysis pipelines in a rat model presenting ventriculomegalia: A comparison study. *NMR Biomed.* **30**
  39. Guevara, E., Pierre, W. C., Tessier, C., Akakpo, L., Londono, I., Lesage, F., and Lodygensky, G. A. (2017) Altered Functional Connectivity Following an Inflammatory White Matter Injury in the Newborn Rat: A High Spatial and Temporal Resolution Intrinsic Optical Imaging Study. *Front Neurosci* **11**, 358
  40. Lodygensky, G. A., Kunz, N., Perroud, E., Somm, E., Mlynarik, V., Huppi, P. S., Gruetter, R., and Sizonenko, S. V. (2014) Definition and quantification of acute

- inflammatory white matter injury in the immature brain by MRI/MRS at high magnetic field. *Pediatr. Res.* **75**, 415-423
41. Clancy, B., Finlay, B. L., Darlington, R. B., and Anand, K. J. S. (2007) EXTRAPOLATING BRAIN DEVELOPMENT FROM EXPERIMENTAL SPECIES TO HUMANS. *Neurotoxicology* **28**, 10.1016/j.neuro.2007.1001.1014
  42. Ramachandra, R., and Subramanian, T. (2011) *Atlas of the neonatal rat brain*, CRC Press, Boca Raton, FL
  43. Legault, L.-M., Chan, D., and McGraw, S. (2019) Rapid Multiplexed Reduced Representation Bisulfite Sequencing Library Prep (rRRBS). *Bio-protocol* **9**, e3171
  44. Magnus, N., Garnier, D., Meehan, B., McGraw, S., Lee, T. H., Caron, M., Bourque, G., Milsom, C., Jabado, N., Trasler, J., Pawlinski, R., Mackman, N., and Rak, J. (2014) Tissue factor expression provokes escape from tumor dormancy and leads to genomic alterations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 3544-3549
  45. McGraw, S., Zhang, J. X., Farag, M., Chan, D., Caron, M., Konermann, C., Oakes, C. C., Mohan, K. N., Plass, C., Pastinen, T., Bourque, G., Chaillet, J. R., and Trasler, J. M. (2015) Transient DNMT1 suppression reveals hidden heritable marks in the genome. *Nucleic Acids Res.* **43**, 1485-1497
  46. Gu, H., Smith, Z. D., Bock, C., Boyle, P., Gnirke, A., and Meissner, A. (2011) Preparation of reduced representation bisulfite sequencing libraries for genome-scale DNA methylation profiling. *Nat. Protoc.* **6**, 468-481
  47. Boyle, P., Clement, K., Gu, H., Smith, Z. D., Ziller, M., Fostel, J. L., Holmes, L., Meldrim, J., Kelley, F., Gnirke, A., and Meissner, A. (2012) Gel-free multiplexed reduced representation bisulfite sequencing for large-scale DNA methylation profiling. *Genome Biol.* **13**, R92
  48. Xi, Y., and Li, W. (2009) BSMAP: whole genome bisulfite sequence MAPping program. *BMC Bioinformatics* **10**, 232
  49. Akalin, A., Kormaksson, M., Li, S., Garrett-Bakelman, F. E., Figueroa, M. E., Melnick, A., and Mason, C. E. (2012) methylKit: a comprehensive R package for the analysis of genome-wide DNA methylation profiles. *Genome Biol.* **13**, R87
  50. Rahimi, S., Martel, J., Karahan, G., Angle, C., Behan, N. A., Chan, D., MacFarlane, A. J., and Trasler, J. M. (2019) Moderate maternal folic acid supplementation ameliorates

- adverse embryonic and epigenetic outcomes associated with assisted reproduction in a mouse model. *Hum. Reprod.* **34**, 851-862
51. Whidden, L., Martel, J., Rahimi, S., Chaillet, J. R., Chan, D., and Trasler, J. M. (2016) Compromised oocyte quality and assisted reproduction contribute to sex-specific effects on offspring outcomes and epigenetic patterning. *Hum. Mol. Genet.* **25**, 4649-4660
  52. Smith, Z. D., Shi, J., Gu, H., Donaghey, J., Clement, K., Cacchiarelli, D., Gnirke, A., Michor, F., and Meissner, A. (2017) Epigenetic restriction of extraembryonic lineages mirrors the somatic transition to cancer. *Nature* **549**, 543-547
  53. Tripathi, S., Pohl, M. O., Zhou, Y., Rodriguez-Frandsen, A., Wang, G., Stein, D. A., Moulton, H. M., DeJesus, P., Che, J., Mulder, L. C., Yanguez, E., Andenmatten, D., Pache, L., Manicassamy, B., Albrecht, R. A., Gonzalez, M. G., Nguyen, Q., Brass, A., Elledge, S., White, M., Shapira, S., Hacohen, N., Karlas, A., Meyer, T. F., Shales, M., Gatorano, A., Johnson, J. R., Jang, G., Johnson, T., Verschueren, E., Sanders, D., Krogan, N., Shaw, M., Konig, R., Stertz, S., Garcia-Sastre, A., and Chanda, S. K. (2015) Meta- and Orthogonal Integration of Influenza "OMICs" Data Defines a Role for UBR4 in Virus Budding. *Cell Host Microbe* **18**, 723-735
  54. Zhou, Y., Zhou, B., Pache, L., Chang, M., Khodabakhshi, A. H., Tanaseichuk, O., Benner, C., and Chanda, S. K. (2019) Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets. *Nature Communications* **10**, 1523
  55. Sandoval, J., Heyn, H., Moran, S., Serra-Musach, J., Pujana, M. A., Bibikova, M., and Esteller, M. (2011) Validation of a DNA methylation microarray for 450,000 CpG sites in the human genome. *Epigenetics* **6**, 692-702
  56. Rhee, S. Y., Wood, V., Dolinski, K., and Draghici, S. (2008) Use and misuse of the gene ontology annotations. *Nat. Rev. Genet.* **9**, 509-515
  57. Halder, R., Hennion, M., Vidal, R. O., Shomroni, O., Rahman, R. U., Rajput, A., Centeno, T. P., van Bebber, F., Capece, V., Garcia Vizcaino, J. C., Schuetz, A. L., Burkhardt, S., Benito, E., Navarro Sala, M., Javan, S. B., Haass, C., Schmid, B., Fischer, A., and Bonn, S. (2016) DNA methylation changes in plasticity genes accompany the formation and maintenance of memory. *Nat. Neurosci.* **19**, 102-110
  58. Kim-Ha, J., and Kim, Y.-J. (2016) Age-related epigenetic regulation in the brain and its role in neuronal diseases. *BMB Reports* **49**, 671-680

59. Neal, M., and Richardson, J. R. (2018) Epigenetic regulation of astrocyte function in neuroinflammation and neurodegeneration. *Biochim. Biophys. Acta* **1864**, 432-443
60. Weng, Y. L., Joseph, J., An, R., Song, H., and Ming, G. L. (2016) Epigenetic regulation of axonal regenerative capacity. *Epigenomics* **8**, 1429-1442
61. Doherty, T. S., Forster, A., and Roth, T. L. (2016) Global and gene-specific DNA methylation alterations in the adolescent amygdala and hippocampus in an animal model of caregiver maltreatment. *Behav. Brain Res.* **298**, 55-61
62. McCoy, C. R., Rana, S., Stringfellow, S. A., Day, J. J., Wyss, J. M., Clinton, S. M., and Kerman, I. A. (2016) Neonatal maternal separation stress elicits lasting DNA methylation changes in the hippocampus of stress-reactive Wistar Kyoto rats. *The European journal of neuroscience* **44**, 2829-2845
63. Lussier, A. A., Bodnar, T. S., Mingay, M., Morin, A. M., Hirst, M., Kobor, M. S., and Weinberg, J. (2018) Prenatal Alcohol Exposure: Profiling Developmental DNA Methylation Patterns in Central and Peripheral Tissues. *Frontiers in Genetics* **9**
64. Schlesinger, F., Smith, A. D., Gingeras, T. R., Hannon, G. J., and Hodges, E. (2013) De novo DNA demethylation and noncoding transcription define active intergenic regulatory elements. *Genome Res.* **23**, 1601-1614
65. Rauscher, G. H., Kresovich, J. K., Poulin, M., Yan, L., Macias, V., Mahmoud, A. M., Al-Alem, U., Kajdacsy-Balla, A., Wiley, E. L., Tonetti, D., and Ehrlich, M. (2015) Exploring DNA methylation changes in promoter, intragenic, and intergenic regions as early and late events in breast cancer formation. *BMC Cancer* **15**, 816
66. Karlsson, L., Barbaro, M., Ewing, E., Gomez-Cabrero, D., and Lajic, S. (2019) Epigenetic Alterations Associated With Early Prenatal Dexamethasone Treatment. *J Endocr Soc* **3**, 250-263
67. Fan, L. W., Mitchell, H. J., Tien, L. T., Rhodes, P. G., and Cai, Z. (2009) Interleukin-1beta-induced brain injury in the neonatal rat can be ameliorated by alpha-phenyl-n-tert-butyl-nitrone. *Exp. Neurol.* **220**, 143-153
68. Haynes, R. L., Billiards, S. S., Borenstein, N. S., Volpe, J. J., and Kinney, H. C. (2008) Diffuse Axonal Injury in Periventricular Leukomalacia as Determined by Apoptotic Marker Fractin. *Pediatr. Res.* **63**, 656-661

69. Lodygensky, G. A., Rademaker, K., Zimine, S., Gex-Fabry, M., Liefstink, A. F., Lazeyras, F., Groenendaal, F., de Vries, L. S., and Huppi, P. S. (2005) Structural and functional brain development after hydrocortisone treatment for neonatal chronic lung disease. *Pediatrics* **116**, 1-7
70. Thompson, D. K., Omizzolo, C., Adamson, C., Lee, K. J., Stargatt, R., Egan, G. F., Doyle, L. W., Inder, T. E., and Anderson, P. J. (2014) Longitudinal growth and morphology of the hippocampus through childhood: Impact of prematurity and implications for memory and learning. *Hum. Brain Mapp.* **35**, 4129-4139
71. Monson, B. B., Anderson, P. J., Matthews, L. G., and et al. (2016) Examination of the pattern of growth of cerebral tissue volumes from hospital discharge to early childhood in very preterm infants. *JAMA Pediatrics* **170**, 772-779
72. Ianov, L., Riva, A., Kumar, A., and Foster, T. C. (2017) DNA Methylation of Synaptic Genes in the Prefrontal Cortex Is Associated with Aging and Age-Related Cognitive Impairment. *Front Aging Neurosci* **9**, 249
73. Frost, P. S., Barros-Aragao, F., da Silva, R. T., Venancio, A., Matias, I., Lyra, E. S. N. M., Kincheski, G. C., Pimentel-Coelho, P. M., De Felice, F. G., Gomes, F. C. A., Ferreira, S. T., Figueiredo, C. P., and Clarke, J. R. (2019) Neonatal infection leads to increased susceptibility to Abeta oligomer-induced brain inflammation, synapse loss and cognitive impairment in mice. *Cell Death Dis* **10**, 323
74. Akiyama, H., Barger, S., Barnum, S., Bradt, B., Bauer, J., Cole, G. M., Cooper, N. R., Eikelenboom, P., Emmerling, M., Fiebich, B. L., Finch, C. E., Frautschy, S., Griffin, W. S., Hampel, H., Hull, M., Landreth, G., Lue, L., Mrak, R., Mackenzie, I. R., McGeer, P. L., O'Banion, M. K., Pachter, J., Pasinetti, G., Plata-Salaman, C., Rogers, J., Rydel, R., Shen, Y., Streit, W., Strohmeyer, R., Tooyoma, I., Van Muiswinkel, F. L., Veerhuis, R., Walker, D., Webster, S., Wegrzyniak, B., Wenk, G., and Wyss-Coray, T. (2000) Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **21**, 383-421
75. Bilbo, S. D., Biedenkapp, J. C., Der-Avakian, A., Watkins, L. R., Rudy, J. W., and Maier, S. F. (2005) Neonatal infection-induced memory impairment after lipopolysaccharide in adulthood is prevented via caspase-1 inhibition. *J. Neurosci.* **25**, 8000-8009
76. Glass, C. K., Saijo, K., Winner, B., Marchetto, M. C., and Gage, F. H. (2010) Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell* **140**, 918-934



77. Knuesel, I., Chicha, L., Britschgi, M., Schobel, S. A., Bodmer, M., Hellings, J. A., Toovey, S., and Prinssen, E. P. (2014) Maternal immune activation and abnormal brain development across CNS disorders. *Nat Rev Neurol* **10**, 643-660
78. Pierre, W. C., Smith, P. L. P., Londono, I., Chemtob, S., Mallard, C., and Lodygensky, G. A. (2017) Neonatal microglia: The cornerstone of brain fate. *Brain, Behavior, and Immunity* **59**, 333-345
79. Degos, V., Peineau, S., Nijboer, C., Kaindl, A. M., Sigaut, S., Favrais, G., Plaisant, F., Teissier, N., Gouadon, E., Lombet, A., Saliba, E., Collingridge, G. L., Maze, M., Nicoletti, F., Heijnen, C., Mantz, J., Kavelaars, A., and Gressens, P. (2013) G protein-coupled receptor kinase 2 and group I metabotropic glutamate receptors mediate inflammation-induced sensitization to excitotoxic neurodegeneration. *Ann. Neurol.* **73**, 667-678
80. Tartaglione, A. M., Venerosi, A., and Calamandrei, G. (2016) Early-Life Toxic Insults and Onset of Sporadic Neurodegenerative Diseases-an Overview of Experimental Studies. *Curr Top Behav Neurosci* **29**, 231-264
81. Mottahedin, A., Ardalan, M., Chumak, T., Riebe, I., Ek, J., and Mallard, C. (2017) Effect of Neuroinflammation on Synaptic Organization and Function in the Developing Brain: Implications for Neurodevelopmental and Neurodegenerative Disorders. *Frontiers in Cellular Neuroscience* **11**
82. Field, A. E., Robertson, N. A., Wang, T., Havas, A., Ideker, T., and Adams, P. D. (2018) DNA Methylation Clocks in Aging: Categories, Causes, and Consequences. *Mol. Cell* **71**, 882-895
83. Numata, S., Ye, T., Hyde, T. M., Guitart-Navarro, X., Tao, R., Wininger, M., Colantuoni, C., Weinberger, D. R., Kleinman, J. E., and Lipska, B. K. (2012) DNA methylation signatures in development and aging of the human prefrontal cortex. *Am. J. Hum. Genet.* **90**, 260-272
84. Lister, R., and Mukamel, E. (2015) Turning over DNA methylation in the mind. *Frontiers in Neuroscience* **9**
85. Alisch, R. S., Barwick, B. G., Chopra, P., Myrick, L. K., Satten, G. A., Conneely, K. N., and Warren, S. T. (2012) Age-associated DNA methylation in pediatric populations. *Genome Res.* **22**, 623-632

86. Gentilini, D., Mari, D., Castaldi, D., Remondini, D., Ogliari, G., Ostan, R., Bucci, L., Sirchia, S. M., Tabano, S., Cavagnini, F., Monti, D., Franceschi, C., Di Blasio, A. M., and Vitale, G. (2013) Role of epigenetics in human aging and longevity: genome-wide DNA methylation profile in centenarians and centenarians' offspring. *Age* **35**, 1961-1973
87. Shinozaki, G., Braun, P. R., Hing, B. W. Q., Ratanatharathorn, A., Klisares, M. J., Duncan, G. N., Jellison, S. S., Heinzman, J. T., Nagahama, Y., Close, L., Sabbagh, S., Dlouhy, B. J., Howard, M. A., Kawasaki, H., and Cho, H. R. (2018) Epigenetics of Delirium and Aging: Potential Role of DNA Methylation Change on Cytokine Genes in Glia and Blood Along With Aging. *Front Aging Neurosci* **10**, 311
88. Horvath, S. (2013) DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol.* **14**, 3156
89. Horvath, S., Erhart, W., Brosch, M., Ammerpohl, O., von Schönfels, W., Ahrens, M., Heits, N., Bell, J. T., Tsai, P.-C., Spector, T. D., Deloukas, P., Siebert, R., Sipos, B., Becker, T., Röcken, C., Schafmayer, C., and Hampe, J. (2014) Obesity accelerates epigenetic aging of human liver. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 15538
90. Levine, M. E., Lu, A. T., Bennett, D. A., and Horvath, S. (2015) Epigenetic age of the pre-frontal cortex is associated with neuritic plaques, amyloid load, and Alzheimer's disease related cognitive functioning. *Aging (Albany NY)* **7**, 1198-1211
91. Hodgson, K., Carless, M. A., Kulkarni, H., Curran, J. E., Sprooten, E., Knowles, E. E., Mathias, S., Goring, H. H. H., Yao, N., Olvera, R. L., Fox, P. T., Almasy, L., Duggirala, R., Blangero, J., and Glahn, D. C. (2017) Epigenetic Age Acceleration Assessed with Human White-Matter Images. *J. Neurosci.* **37**, 4735-4743
92. Ciccarone, F., Tagliatesta, S., Caiafa, P., and Zampieri, M. (2018) DNA methylation dynamics in aging: how far are we from understanding the mechanisms? *Mech. Ageing Dev.* **174**, 3-17
93. Lister, R., Mukamel, E. A., Nery, J. R., Urich, M., Puddifoot, C. A., Johnson, N. D., Lucero, J., Huang, Y., Dwork, A. J., Schultz, M. D., Yu, M., Tonti-Filippini, J., Heyn, H., Hu, S., Wu, J. C., Rao, A., Esteller, M., He, C., Haghghi, F. G., Sejnowski, T. J., Behrens, M. M., and Ecker, J. R. (2013) Global epigenomic reconfiguration during mammalian brain development. *Science* **341**, 1237905

94. Duke, C. G., Kennedy, A. J., Gavin, C. F., Day, J. J., and Sweatt, J. D. (2017) Experience-dependent epigenomic reorganization in the hippocampus. *Learn. Mem.* **24**, 278-288

## Table du chapitre II

**Table I.** Distribution of the DMRs, excluding intergenic regions, and average percentage difference of methylation changes compared to sham at P4 and P24

Condition	Number of DMRs	Avg % difference of methylation changes	Number of unique genes	Genes with DMRs located on promoter region
<b>P4 hypermethylated</b>	281	14.08±4.11	240	<i>ELMOD3, HORMAD2, KRTCAP3, MIR219-2, MIR290, ODF3, TNS3</i>
<b>P4 hypomethylated</b>	316	-13.55±3.68	283	<i>ABCC6, ACVRL1, ADAMTS18, APOBR, ARPP21, CAR13, F2RL3, FXN, GFER, IGBP1B, LAT, LTA, MCEMP1, MPDU1, NKAPL, P2RX1, PF4, SIPA1, SMIM3, TMEM255B, TNFRSF25, ZRSR1</i>
<b>P24 hypermethylated</b>	380	14.74±5.22	323	<i>CCKBR, CDC20, CXCL1, DPYS, EXOSC7, F8A1, FAM217A, FSTL3, HK2, MIR219-2, MSH4, ODF3, PABPC4, PAQR7, RN5-8S, SALL3, SGK2, SIPA1, STK3, TENM3, UPB1</i>
<b>P24 hypomethylated</b>	246	-14.42±4.53	219	<i>ALOX12E, CD55, COX6A2, DOK3, MIR671, ODF3, OTOP3, RMND1, SLAMF8, SNCG, SOAT2, ST13, TRIM17</i>

## Légende et figures du chapitre II

**Figure 1. Lateral ventricles size index at P4 and P24.** Representative image of lateral ventricle size for Sham and LPS animals at P4 (a and b) and at P24 (c and d). Bar graph of ventricle size at E) P4 and F) P24.

\* $p < 0.05$  compared to Sham

LV=left ventricle ; RV=right ventricle

**Figure 2. DNA methylation alteration at P4 in the brain of Sprague-Dawley exposed to neonatal WMI.** A) Heat map of mean methylation levels for 1453 DMRs with methylation alteration in the LPS group (n=4) compared to Sham (n=4) at 24h post-injection. B) Genomic distribution of total 100bp tiles and the 1453 DMRs. C) CpG content and neighborhood in total 100bp tiles and DMRs D-E) Top 10 pathways identified following GO analysis without intergenic DMRs for D) hypermethylated DMRs and E) hypomethylated DMRs. GO enrichment was performed for biological processes (plain bar), molecular functions (bar with vertical line) and cellular components (bar with oblique line). The number of genes associated to each pathway is in parenthesis.

SINE, short interspersed nuclear element; LINE, long interspersed nuclear element; LTR, long terminal repeat element.

**Figure 3. DNA methylation changes at P24 in the brain Sprague-Dawley rats subjected to neonatal WMI.** A) Heat map of mean methylation levels for 1502 DMRs with methylation alteration in the LPS group (n=4) compared to Sham (n=4) 21 days post-injection. B) Distribution of total 100bp tiles and 1502 DMRs across the genome. C) CpG content and neighborhood in total 100bp tiles and DMRs D-E) Top 10 pathways identified following GO analysis without intergenic DMRs for D) hypermethylated DMRs and E) hypomethylated DMRs. GO enrichment was performed for biological processes (plain bar), molecular functions (bar with vertical line) and

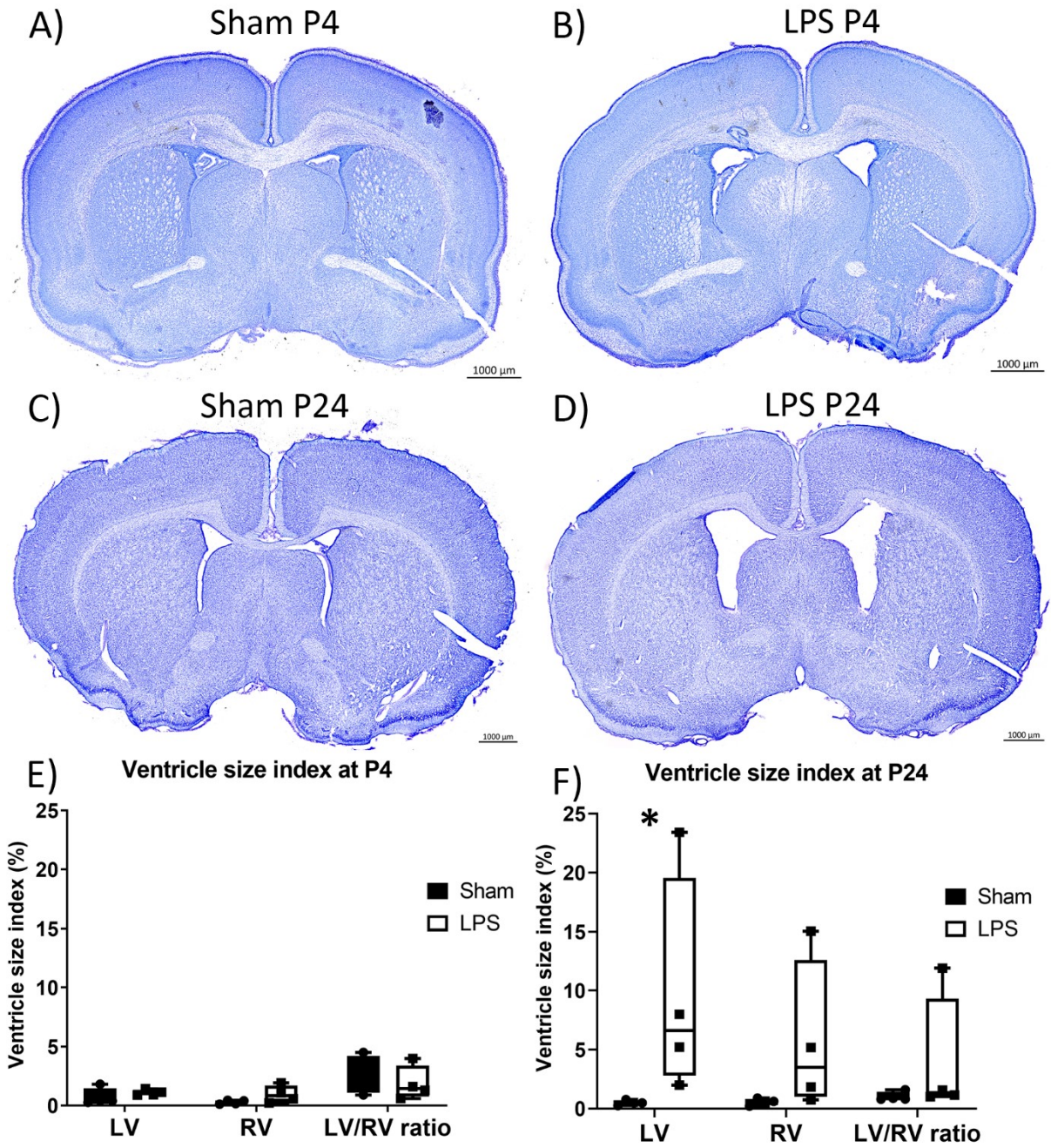
cellular components (bar with oblique line). The number of genes associated to each pathway is in parenthesis.

SINE, short interspersed nuclear element; LINE, long interspersed nuclear element; LTR, long terminal repeat element.

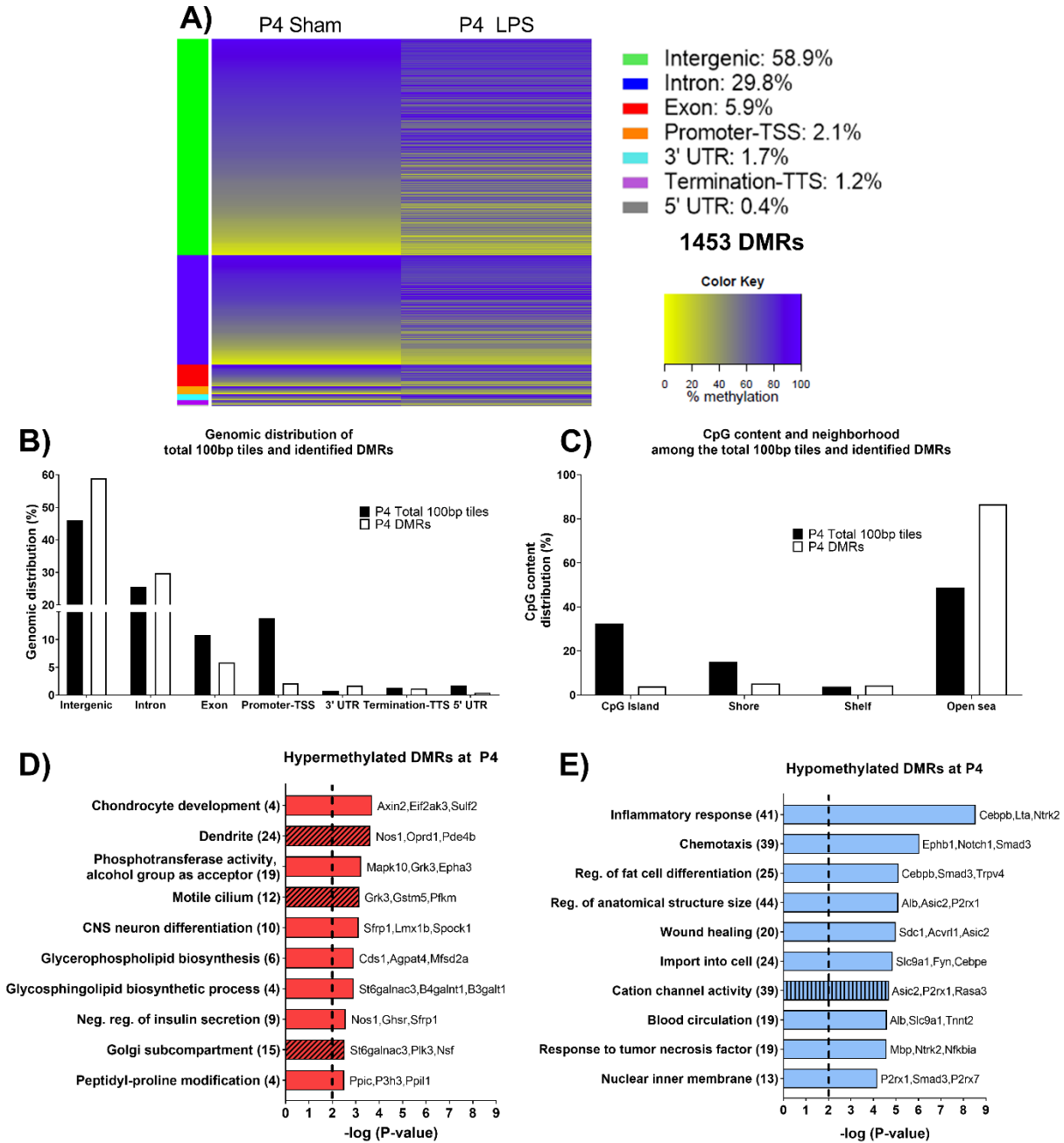
**Figure 4.** Methylation levels of gene on interest associated to inflammatory response (A-B) and myelination (C-D) at P4 and P24 in brains of Sham rats compared to LPS exposed animals. Individual values are represented by square (Sham) and dots (LPS) for each gene and box plot represent minimal to maximal value with line at median.

**Figure 5.** Analysis of similar DMRs found at P4 and P24 in rats subjected to inflammatory WMI. A) Venn diagram of the methylation status changes occurring between P4 and P24 of identical DMRs identified at both time points. B) Gene ontology (GO) enrichment analysis of the DMRs on all regions excluding intergenic. GO enrichment was performed for biological processes (plain bar), molecular functions (bar with vertical line) and cellular components (bar with oblique line). The number of genes associated to each pathway is in parenthesis.

**Figure 1**

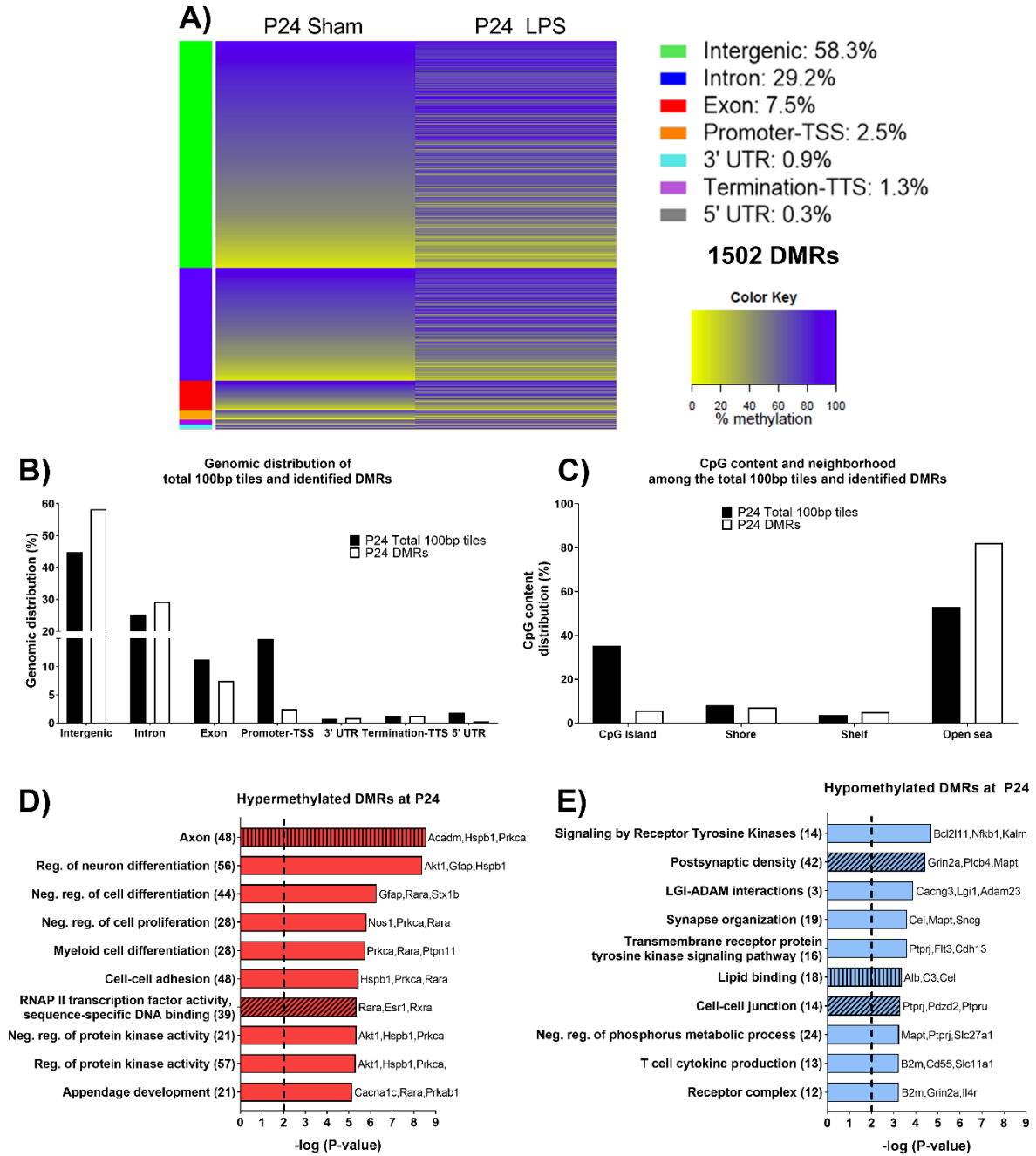


**Figure 2**

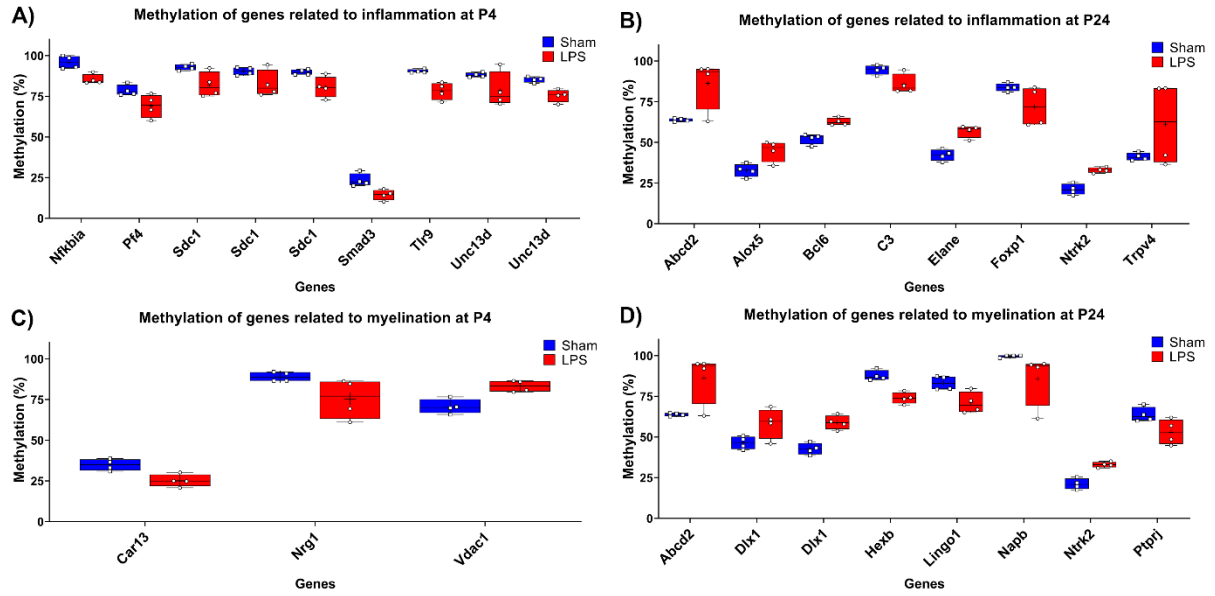




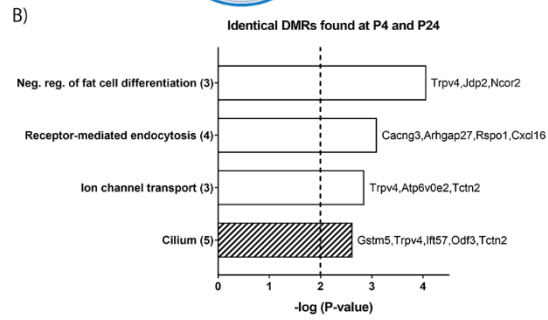
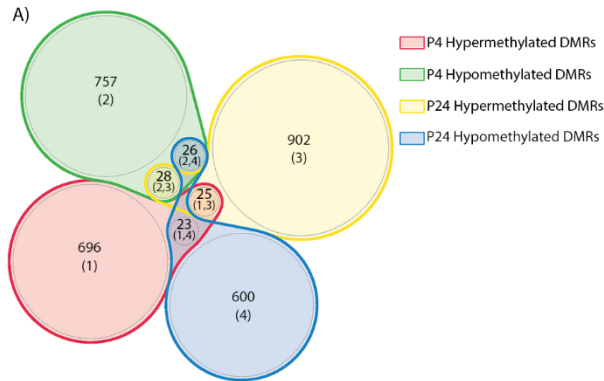
**Figure 3**



**Figure 4**



**Figure 5**



## Matériels supplémentaires du chapitre II

### Table supplémentaire du chapitre II

**Supplemental Table I.** Common pathways at P4 and P24 affected by changes in DNA methylation profile following neonatal WMI

Enriched Pathways	DMRs condition	Genes
<b>Regulation of synapse assembly (GO:0051963)</b>	P4 hypermethylated	<i>ASIC2; EPHB2; FLRT1; GHSR; IL1RAP</i>
	P4 hypomethylated	<i>ADGRL2; ADGRL3; ARHGAP35; ASIC2; BCL11A; CAMK1D; CDK5R1; DOK7; EPHB1; EVL; FXN; FYN; GOLGA4; GPER1; LINGO4; LTA; NECTIN1; NOTCH1; NRG1; NTRK2; P2RX7; PAXIP1; PIEZO1; RGS6; SDC1; SMAD3; SPIDR; SPIRE2; UTRN; WHAMM</i>
<b>CNS neuron differentiation (GO:0021953)</b>	P4 hypermethylated	<i>CDNF; DISC1; EPHB2; LHX4; LMX1B; MIR200C; PAX7; SFRP1; SPOCK1; TFAP2C</i>
	P24 hypomethylated	<i>ARHGEF28; DBX1; EPHA4; LINGO1; PAX7; RAPGEF2; SATB2</i>
<b>Axon (GO:0030424)</b>	P4 hypomethylated	<i>ACADM; ADGRL3; CACNA1B; CDK5R1; CPN1; CRTAC1; ENG; EPHB1; GPER1; KANK2; KCNMA1; MBP; MGARP; NECTIN1; NOTCH1; NR1D2; NRG1; NTRK2; P2RX7; ROR2; SDC1; SEPT11; SFRP1; SLC38A1; TOR1A; TRPM7; TRPV4; UTRN; ZFP36</i>
	P24 hypermethylated	<i>ACADM; ALOX5; AP3B1; ATG7; ATP13A2; BEGAIN; CACNA1C; CORO1A; EPB41L3; EPHB2; ESR1; FEZ2; FYN; GFAP; GPC1; GRK3; HSPB1; IFT57; IGF1R; ITPR2; KCNK2; LRIG2; NCS1; NECTIN1; NELL2; NEURL1; NFASC; NOS1; NSG1; NSMF; NTM; NTRK2; PREX1;</i>

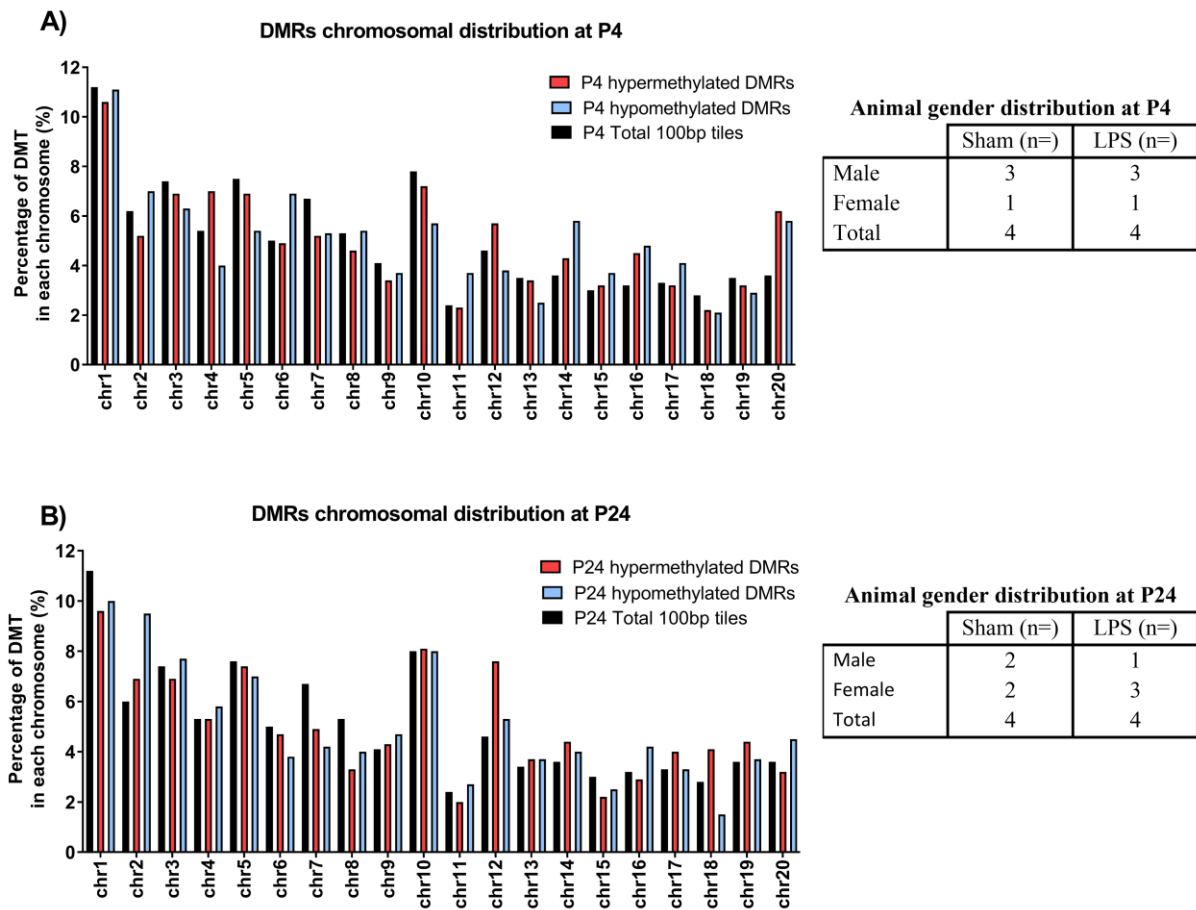
		<i>PRKCA; RAPIGAP; RARA; RGS10; <b>ROR2</b>; RXRA; SEPT11; SLC38A2; SPOCK1; SRCIN1; STX1B; SYDE1; TANC1; TIAM1; <b>TRPV4</b></i>
<b>Regulation of fat cell differentiation</b> (GO:0045598)	P4 hypomethylated	<i>ACVRL1; ARID5B; BCL11A; CDK5R1; CEBPB; EPHB1; <b>FTO</b>; GPER1; HIFOO; <b>JDP2</b>; MBP; <b>NCOR2</b>; NFKBIA; NOTCH1; NOTCH3; NRG1; PF4; PLCB1; SEMA3B; <b>SFRP1</b>; SMAD3; TRIM11; <b>TRPV4</b>; ZBTB16; ZFP36</i>
	P24 hypermethylated	<i>AKT1; BBS7; <b>FTO</b>; ITGA6; <b>JDP2</b>; <b>NCOR2</b>; NOCT; PPARC; <b>SFRP1</b>; STK3; TMEM120B; <b>TRPV4</b></i>
<b>Import into cell</b> (GO:0098657)	P4 hypomethylated	<i>ANO6; APOBR; <b>ARHGAP27</b>; CACNG3; CAMK1D; CD47; CDH13; CEBPE; CUBN; <b>CXCL16</b>; ELANE; ELMO1; FYN; GULP1; HCK; P2RX7; RSP01; RUFY1; SLC7A1; SLC9A1; STAB2; TMPRSS4; TOR1A; UNC13D</i>
	P24 hypermethylated	<i>AMN; <b>ARHGAP27</b>; ATG7; CORO1A; <b>CXCL16</b>; ELANE; FCNA; FYN; GFAP; GRK3; KCNJ8; MEGF10; NOS1; PECAMI; PLCG2; PRKCA; RAPIGAP; RARA; SNX11; STX1B; SUSD2; TGFB2</i>
<b>Cell projection membrane</b> (GO:0031253)	P4 hypomethylated	<i>ATP8B1; CACNA1D; CUBN; EVL; GABRG3; GPER1; ITGA8; ITGB5; MYLK; NOTCH1; NRG1; PDE9A; PIEZO1; <b>SLC3A1</b>; SNTG1; TRPM7; <b>TRPV4</b>; UTRN</i>
	P24 hypomethylated	<i>GABRA1; GABRG2; GRIN2A; KIRREL1; LAMP5; MAPT; MTTF; MYO10; PTPRJ; <b>SLC3A1</b>; TTYH3</i>
<b>Innate immune system</b> (R-RNO-168249)	P4 hypomethylated	<i>ANO6; ARHGAP45; ATP11A; CD47; CHI3L1; COTL1; CPN1; ELANE; ELMO1; FTL1; FYN; HCK; IL18BP; IRF2; LAT; LTA; MCEMP1;</i>

		<i>NFKB1; NFKBIA; P2RX1; P2RX7; PELI2; RIPK2; SDC1; TCTN2; TNFRSF25; USP18</i>
	P24 hypomethylated	<i>ATP6V0E2; B2M; C3; CD55; CRISPLD2; DOCK1; DOK3; GPR84; HK3; MAP2K6; MYO10; NFKB1; PYGL; SLC11A1; TCTN2; WIPF3</i>
<b>Regulation of cell adhesion</b> <b>(GO:0030155)</b>	P4 hypomethylated	<i>ACVRL1; ADAMTS18; ADGRL3; CD47; CDH13; CDK5R1; CEBPB; ELANE; ITGB5; LMO7; MBP; NECTINI; NOTCH1; NRG1; PIEZO1; RASGRP1; RIPK2; SMAD3; TRIM29; TRPV4; UNC13D; UTRN; VSIR; ZBTB16</i>
	P24 hypomethylated	<i>ADGRL3; AJAPI; ANK3; CD55; CDH13; CEL; COL16A1; COL26A1; CTNND2; DOCK1; GNAS; IDO1; IL4R; KIRREL1; LAMA1; MINK1; MYO10; PTPRJ; PTPRU; UBASH3B; VSIR</i>
<b>Lipid binding</b> <b>(GO:0008289)</b>	P24 hypermethylated	<i>AKT1; ATP13A2; ATP5PO; DOK7; ESR1; FZD7; GM2A; INPP4B; ITPR2; MTSSIL; MVB12B; MYO1B; PAQR7; PAQR8; PIK3C2B; PPARD; PREX1; RARA; RXRA; SNX11; SOAT2; STXBP6; TIAMI</i>
	P24 hypomethylated	<i>ACAP2; ALB; C3; CD55; CEL; FGD2; ITPR3; KIF16B; LAMA1; MYO10; NR3C2; OSBP2; RAPGEF2; SCGB2A2; SOAT2; STARD3; UCP1; WDFY1</i>
<b>Regulation of GTPase activity</b> <b>(GO:0043087)</b>	P24 hypermethylated	<i>APPL2; ARHGAP27; ARHGEF18; AXIN2; BCL6; EPHB2; ITGA6; ITPKB; LRCH1; MTSSIL; NTRK2; PECAM1; PREX1; RAPIGAP; RGS10; SIPA1; SYDE1; TBC1D7; TIAMI; VAV2</i>
	P24 hypomethylated	<i>ACAP2; AGAP3; ARHGAP24; ARHGAP28; ARHGEF28; CDC42EP4; CDH13; DOCK1; DOCK9; DOK3; EPHA4; FGD2; GNAS; IPO4;</i>

	<i>KALRN; KIF16B; RAPGEF2; RTKN2; SYDE2; TBC1D17</i>
<b>Phosphoric ester hydrolase activity (GO:0042578)</b>	P24 hypermethylated <i>ACPI; <b>ENOPH1</b>; INPP4B; MTMR1; PDE4A; PDE5A; PGAP1; PLCG2; PLPP4; PLPP7; <b>PPM1E</b>; PPM1H; PTPN11; <b>PTPRU</b>; <b>UBASH3B</b></i>
	P24 hypomethylated <i>AKP3; CTDSPL; <b>ENOPH1</b>; GNAS; LPIN2; PLCB4; PLPPR2; <b>PPM1H</b>; PPP1R16B; PTPRJ; <b>PTPRU</b>; TMEM132D; <b>UBASH3B</b></i>

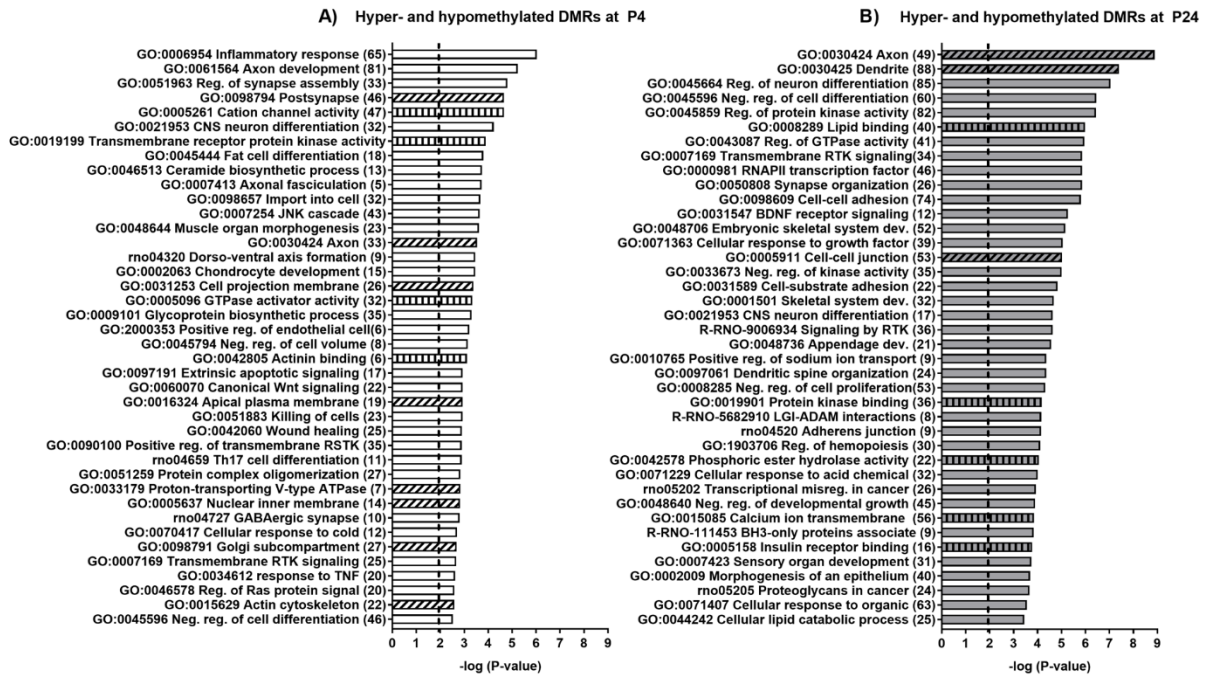
## Figures supplémentaires du chapitre II

### Supplemental data

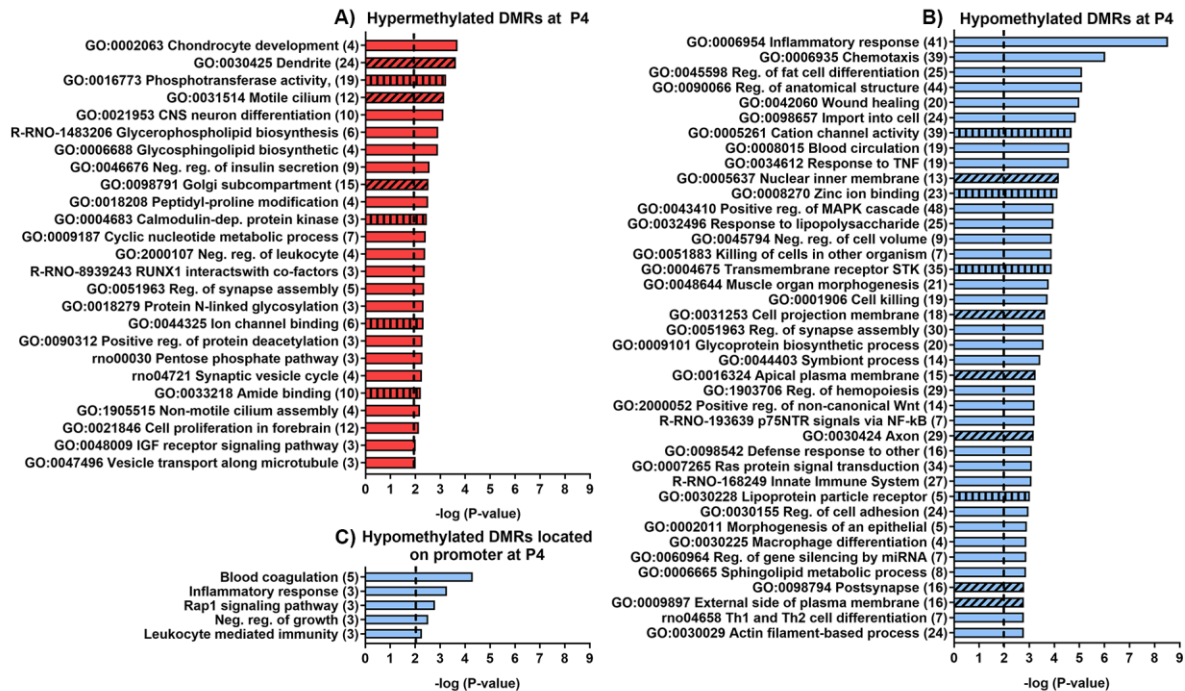


**Supplemental figure 1.** Chromosomal distribution of DMRs at P4 (A) and P24 (B) following WMI in rats. The tables represent the gender distribution of animals used to study DNA methylation alteration.

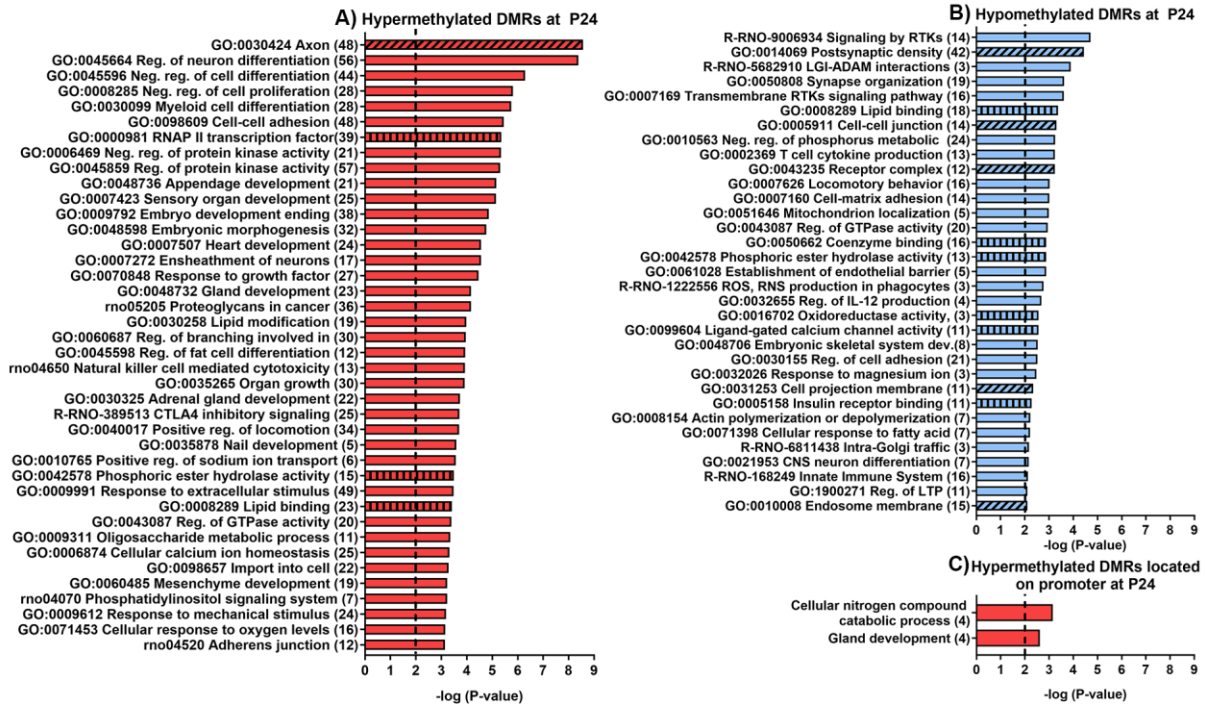




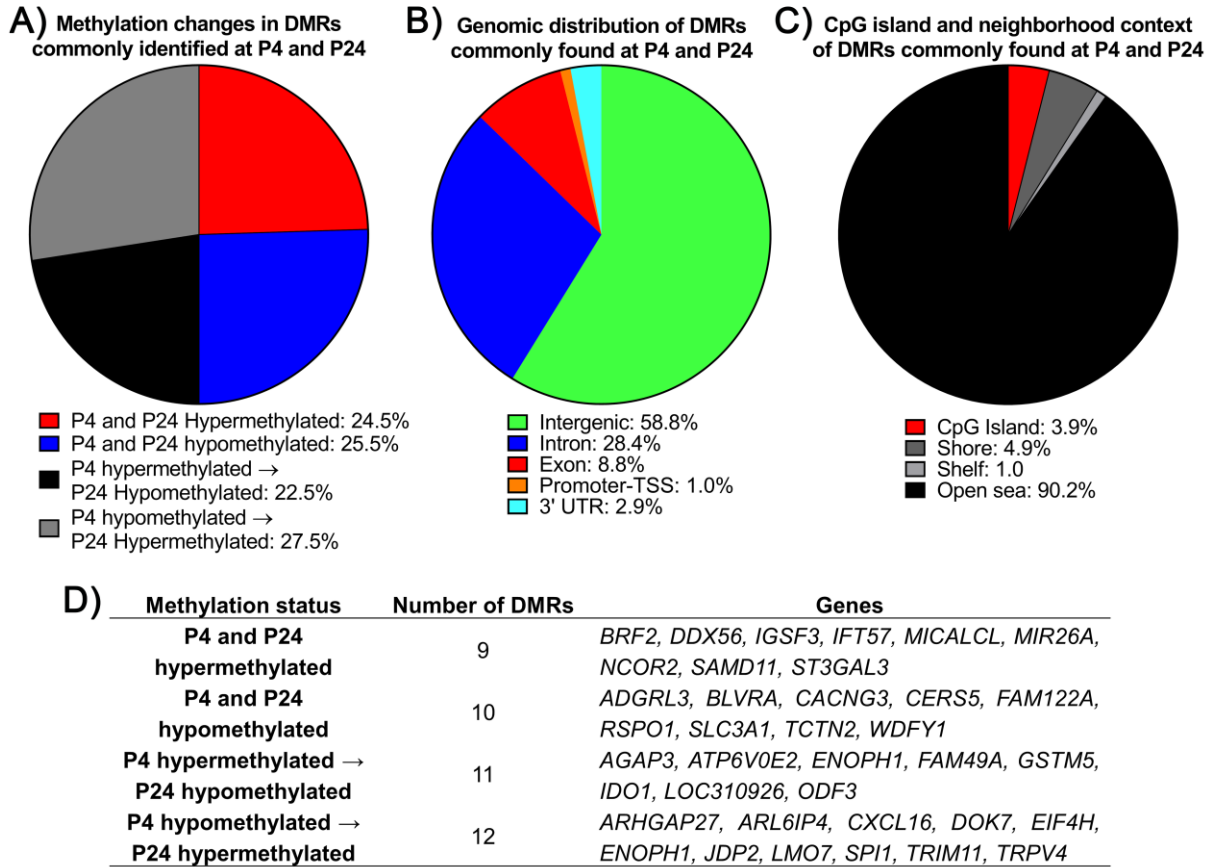
**Supplemental figure 2.** Gene ontology (GO) enrichment analysis of the DMRs at A) P4 and B) P24 regardless of methylation status. GO enrichment was performed for biological process (plain bar), metabolic function (bar with vertical line) and cellular component (bar with oblique line). The number of genes associated to each pathway is in parenthesis.



**Supplemental figure 3.** Pathways identified at P4 following gene ontology enrichment analysis of A-B)DMRs on all genomic regions excluding the intergenic region and C) DMRs located on promoter region. Pathways were found for A) hypermethylated DMRs, B) hypomethylated DMR and C) DMRs on promoters. No pathway was identified for hypermethylated DMRs located on promoter region at P4. GO enrichment was performed for biological process (plain bar), metabolic function (bar with vertical line) and cellular component (bar with oblique line). The number of genes associated to each pathway is in parenthesis.



**Supplemental figure 4.** Gene ontology enrichment analysis of DMRs identified at P24 on all genomic regions excluding intergenic (A and B) and solely on the promoter (C). Pathways were identified for A) hypermethylated DMRs, B) hypomethylated DMRs and C) hypermethylated DMRs located on promoter. No pathways were associated with hypomethylated DMRs located in promoter at P24. GO enrichment was performed for biological process (plain bar), metabolic function (bar with vertical line) and cellular component (bar with oblique line). The number of genes associated to each pathway is in parenthesis.



**Supplemental figure 5.** Analysis of similar DMRs found at P4 and P24 in rats subjected to inflammation-induced WMI. A) Methylation status changes between P4 and P24 of identical DMRs identified at both time points. B) Distribution of common DMRs across the genome. C) DMRs distribution across CpG islands/shores/shelves. D) Table of genes with similar DMRS at P4 and P24 excluding DMRs located in intergenic region

SINE, short interspersed nuclear element; LINE, long interspersed nuclear element; LTR, long terminal repeat element.

# **Chapitre III : Assessing therapeutic response non-invasively in a neonatal rat model of acute inflammatory white matter injury using high-field MRI**

**Authors: Wyston C. Pierre<sup>1,2</sup>, Luis Akakpo<sup>1,3</sup>, Irène Londono<sup>1</sup>, Philippe Pouliot<sup>3,4</sup>, Sylvain Chemtob<sup>1,2,5</sup>, Frédéric Lesage<sup>3,4</sup>, Gregory A. Lodygensky<sup>1,2,4</sup>**

Affiliations :

1. Departments of Pediatrics, Ophthalmology and Pharmacology, CHU Sainte-Justine Research Centre, Montréal, Canada.
2. Department of Pharmacology, Université de Montréal, Montréal, Canada.
3. École Polytechnique de Montréal, Montreal, QC, Canada.
4. Montreal Heart Institute, Montreal, QC, Canada.
5. Department of Pharmacology and Therapeutics, McGill University, Montréal, Canada

**Corresponding author:** Gregory A. Lodygensky

Department of Pediatrics, NICU,  
Sainte-Justine Hospital and Research Center,  
3175 Chemin de la Côte Sainte-Catherine,  
Montreal, QC, Canada H3T 1C5

[ga.lodygensky@umontreal.ca](mailto:ga.lodygensky@umontreal.ca)

**Word count :** 6455

## **Abstract :**

Perinatal infection and inflammatory episodes in preterm infants are associated with diffuse white matter injury (WMI) and adverse neurological outcome. Inflammation-induced WMI was previously shown to be linked with later hippocampal atrophy and learning and memory impairments in preterm infants. Early evaluation of injury load and therapeutic response with non-invasive tool such as multimodal magnetic resonance would greatly improve the search of new therapeutic approaches in preterm infants. Our aim was to evaluate the potential of multimodal MRI to detect the response of interleukin-1 receptor antagonist (IL-1Ra) treatment, known for its neuroprotective properties, during the acute phase of injury on a model of neonatal WMI.

Rat pups at postnatal day 3 (P3) received intracerebral injection of lipopolysaccharide with systemic IL-1Ra therapy. 24h later (P4), rats were imaged with multimodal MRI to assess microstructure by diffusion tensor imaging and neurochemical profile of the hippocampus with <sup>1</sup>H-magnetic resonance spectroscopy. Astrocyte and microglial activation, apoptosis and the mRNA expression of pro-inflammatory and necroptotic marker were assessed.

During the acute phase of injury, neonatal LPS exposure altered concentration of hippocampus metabolites related to neuronal integrity, neurotransmission and membrane integrity and induced diffusivity restriction. Just 24h after initiation of therapy, early indication of IL-1Ra neuroprotective effect could be detected in vivo non-invasive spectroscopy and DTI and confirmed with immunohistochemical evaluation and mRNA expression of inflammatory markers and cell death.

In conclusion, multimodal MRI, particularly DTI, can detect not only injury but also the acute therapeutic effect of IL-1Ra suggesting that MRI could be a useful non-invasive tool to follow, at early time points, the therapeutic response in preterm infants.

**Keywords:** Periventricular leukomalacia, Lipopolysaccharide, IL-1Ra, Diffusion tensor imaging, Magnetic resonance spectroscopy, high-field MRI, in vivo imaging

## Highlights

- White matter injury induces changes detectable at multimodal MRI (DTI and MRS).
- Multimodal MRI allow the detection of early sign of IL-1Ra neuroprotective effect during the acute period of inflammation.

# 1 Introduction

More than 50% of very low birth weight (VLBW) preterm infants are affected by white matter injury (WMI) (Volpe, 2009; Pavlova and Krageloh-Mann, 2013). Magnetic resonance imaging (MRI) allows the detection of diffusible WMI in up to 79% of preterm infants (Maalouf et al., 2001). Perinatal inflammation and infection (from chorioamnionitis, necrotizing enterocolitis, sepsis and sustained ventilation) are major risk factors of WMI (Khwaja and Volpe, 2008). Together with hypoxic-ischemic injuries, inflammatory injuries are the main pathogenic factors in periventricular leukomalacia (PVL) (Khwaja and Volpe, 2008). The diagnosis is usually confirmed at the end of the hospitalisation by imaging. In the months following discharge, physical and occupational therapy are then introduced if found clinically relevant. To date, there is no recognized therapy to treat WMI at the earliest onset. With the advancements in non-invasive imaging tools, the question that comes to mind is if an early recognition of on-going WMI by imaging could trigger the application of a therapy and if its effect could then be monitored.

A robust animal model of inflammatory WMI, consisting in the injection of lipopolysaccharides (LPS) in the corpus callosum of rat pups, was shown to reproduce the pathophysiological hallmarks seen in preterm infants with WMI such as microglia activation, astrogliosis, ventricular dilatation and hypomyelination (Cai et al., 2003; Pang et al., 2003; Lodygensky et al., 2010). This animal model showed several neurobehavioral alterations, observed in preterm infants with WMI, which includes hyperactivity, memory impairments and motor deficits (Fan et al., 2008b; Khwaja and Volpe, 2008; Volpe, 2009; Fan et al., 2011; Wang et al., 2013; Back and Rosenberg, 2014). Furthermore, late hippocampal atrophy following preterm birth exacerbated by WMI is also reproduced in this model (Fan et al., 2005; Lodygensky et al., 2005; Fan et al., 2008a; Thompson et al., 2008). An up-regulation of pro-inflammatory cytokines associated to adverse neurodevelopmental outcomes in preterm infants was also seen in this model which includes interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) and, long-lasting elevated levels of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (Pang et al., 2003; Lodygensky et al., 2014; Jin et al., 2015; Galinsky et al., 2018). Particularly, clinical and animal studies in WMI suggest that IL-1 $\beta$  plays a central role in the acute and chronic phase of injury (Girard et al., 2010; Favrais et al., 2011; Rosenzweig et al., 2014). Compared to IL-6 and TNF- $\alpha$ , exposure to IL-1 $\beta$  alone in neonatal animals resulted in a



more severe neuropathological phenotype characterized by microglial activation, increased cell death, oligodendrocytes impairments and behavioral alterations (Lee et al., 1993; Pang et al., 2003; Cai et al., 2004; Pang et al., 2006). The study of Girard et al. demonstrated that acute phase of WMI in preterm infants was characterized by an increased expression IL-1 $\beta$ , IL-1 receptor with no expression of the endogenous IL-1R antagonist (IL-1Ra) and its natural antagonist the IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) (Girard et al., 2010). As mentioned earlier, there is currently no approved therapeutic drug in inflammatory WMI but human recombinant IL-1Ra is an interesting therapeutic target with promising neuroprotective potential that was approved by the FDA in 2013 in the pediatric population to treat neonatal-onset multisystem inflammatory disease (Dinarello et al., 2012; Rosenzweig et al., 2014). In the LPS-induced WMI model described earlier, simultaneous intracerebral injection of IL-1Ra (but not with TNF- $\alpha$  antibody) decreased the extent of LPS-induced injury (Cai et al., 2003; Pang et al., 2003). Furthermore, systemic administration of IL-1Ra protected against brain injury in models of perinatal systemic inflammation (Girard et al., 2012 ; Savard et al., 2013 ; Savard et al., 2015).

Recent amelioration in neonatal intensive care led to a decrease in cystic PVL which made diffuse WMI such as non-cystic PVL the most common WMI in preterm infants (Khwaja and Volpe, 2008). Compared to cystic PVL, diffuse WMI cannot be identified reliably by ultrasonography, as its cystic counterpart (Inder et al., 2003). In the study of Inder et al., on a 30 weeks born preterm, the use of diffusion weighted imaging was able to detect early sign of injury (5 days post birth), with widespread apparent diffusion coefficient reduction in the white matter at a time where ultrasonography and traditional MRI did not detect any changes (Inder et al., 1999). This sharp decrease in diffusivity seen on mean diffusivity maps (MD) occurs during the first few days following brain injury was initially described in patients with stroke and in newborns with birth asphyxia (McKinstry et al., 2002). In rat pups injected with LPS intracerebrally, MD restriction detected *in vivo* has been shown to strongly correlate with apoptosis in the corpus callosum (Lodygensky et al., 2014). In rat pups, MRS detected metabolic changes identical to preterm infants with white matter injury showing an increased concentration of lactate and macromolecules in the corpus callosum 24h following the LPS injection (Lodygensky et al., 2014). In a clinical setting, *in vivo* MRI (DTI and MRS) was able to monitor early therapeutic response in different diseases including glioblastoma (Najac and Ronen, 2016; Price et al., 2016), breast cancer (Bathen et al., 2011; Sharma et al., 2011; Cao et al., 2012), strokes (Schabitz and Fisher, 1995; Seitz and Donnan,

2010), and depression (Caverzasi et al., 2012).

The aim of this paper was to demonstrate, in rat pups, the use of magnetic resonance technologies (DTI and MRS) as potential tools for *in vivo* monitoring of therapeutic response of IL-1Ra following LPS exposure.

## **2. Methods**

### **2.1 Animal preparation**

Sprague-Dawley dams and their litter composed of male rats at one day of life (P1) were obtained from Charles River Laboratories (Charles River, Canada). They were allowed to acclimatize to the animal facility prior to experimental procedures. The animals had free access to water and food and were exposed to 12 hours light/ dark cycles. All animal-handling procedures were approved by the Institutional Committee for Animal Care of the Montreal Heart Institute Research Center, following the recommendations of the Canadian Council of Animal Care.

#### **2.1.1 Intracerebral injection**

Forty-eight 3 days old (P3) male Sprague-Dawley rats (average weight of  $8.77 \pm 0.09$ g) were randomly assigned to one of three experimental groups: Sham (n=17), LPS (n=16) and LPS + IL-1Ra (n=15); with each litter having at least 2 animals from each treatment group. LPS exposed animals received an intracerebral injection of a suspension of 16  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  LPS (1 mg/kg; Lipopolysaccharide E. coli, serotype 055:B5; SigmaAldrich, Oakville, ON, Canada), in sterile saline (0.5  $\mu\text{L}$  for 8 g pup) and, Sham pups received an equivalent volume of 0.9% sterile saline solution alone. The intracerebral injection was made in the corpus callosum at a level equivalent to P-7, c9 (Ramachandra and Subramanian, 2011) under ultrasound guidance using Vevo LAZR micro-ultrasound system (FUJIFILM VisualSonics Inc., Toronto, ON, Canada) as it was previously published (Lodygensky et al., 2014). A micropipette mounted on a microprocessor-controlled injector (Micro4 from World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) with a rate of 100 nL/min was used for the injections. All the intracerebral injections were performed under isoflurane anesthesia.

#### **2.1.2 Animal treatment**

LPS animal were further divided into two groups: one with IP injection of IL-1Ra (LPS+IL-1Ra; 2 mg/kg; Kineret-Anakinra, Amgen, Thousand Oaks, CA, USA)) and the other with IP injection of 0.9% sterile saline (LPS). Three doses of sterile saline were administered at 5min, 6h and 22-24h after intracerebral LPS injection. Half of the animals (n=24) were imaged at MRI, euthanized and the brain were collected for immunohistochemistry. For the other half (n=24), MRI was not

performed, pups were euthanized, and the brains were collected for biochemical and gene expression analysis.

## **2.2 Nuclear Magnetic Resonance**

Animals were anaesthetized by isoflurane (4% for induction; 0.5-2 % for maintenance) in a mixture of 0.25% air and 0.5% O<sub>2</sub> and placed in a tailor-made MRI-compatible ertalyte head-holder. The procedure was performed according to previously described protocols (Lodygensky et al., 2014). Physiology monitoring was conducted with a custom-built pressure pillow combined with a temperature probe placed under the abdomen. Temperature was maintained stable at 36°C. Respiration was maintained between 50-100 breaths/min by adapting the level of isoflurane. Imaging and spectroscopy acquisitions were conducted using a specifically designed quadrature surface coil consisting of two geometrically decoupled loops of 14 mm in diameter. All MRI/MRS experiments were acquired on an actively shielded 7-T/30-cm horizontal bore magnet scanner interfaced with a DirectDrive console (Agilent, Palo Alto, CA, USA) with gradients of 600 mT/m.

### **2.2.1 Diffusion Tensor Imaging (DTI)**

Diffusion-weighted images were acquired with a coronal-plane resolution of 117 x 234  $\mu\text{m}^2$  and a slice thickness of 600  $\mu\text{m}$ . Data was acquired using a standard spin echo sequence (repetition time = 2.2s and an echo time = 35ms) with an origin-symmetric diffusion gradient direction (2 x 6) and b-values of 0 and 700  $\text{s}/\text{mm}^2$  similarly to our study using this animal model (Lodygensky et al., 2010). The diffusion-weighting gradients were applied for a duration ( $\partial$ ) of 7ms and a delay ( $\Delta$ ) of 21ms with 4 averages and a total scan time of 1 hour.

#### **2.2.1.1 DTI Analysis**

The diffusion tensor was fitted to the diffusion-weighted data (weighted linear least square) and different scalar maps were extracted from the tensor. Fractional anisotropy (FA), radial diffusivity (RAD), axial diffusivity (AD), mean diffusivity (MD) and color-coded (Red, Green and Blue - RGB) FA maps were derived from the diffusion tensor using a software written in Matlab (MathWorks, Natick, MA, USA) developed by Song et al. (Song et al., 2002; Song et al., 2003; Sun et al., 2003; Song et al., 2005). The color-coded FA map was used as principal view for the positioning of regions of interest (ROIs), as it offers a greater contrast between white and grey

matter, but the placement was validated with the other scalar maps. The ROIs were positioned by a rater (L.A.) on the corpus callosum and on ipsilateral and contralateral cingulum, as labeled by Paxinos and Watson atlas (Paxinos and Watson, 2007), on three consecutive slices at a level equivalent to P-1, c7 and P-1,c10 (Ramachandra and Subramanian, 2011). The ROIs were drawn using NIH's ImageJ software and for each slice, the mean of the ROIs was measured on the FA, RAD, AD and MD maps as previously published (Lodygensky et al., 2010 ; Lodygensky et al., 2014).

### **2.2.2 Magnetic Resonance Spectroscopy**

Anatomical images were acquired to allow the positioning of the volumes of interest (VOI) for the spectroscopy experiments. They were obtained with a fast spin echo MRI sequence (repetition time = 3 s, echo train length = 8, effective echo time = 78 ms) with an in-plane resolution of 58 x 117  $\mu\text{m}^2$  and a slice thickness of 600  $\mu\text{m}$  and a total scan time of 5 min. The VOIs were placed on the ipsilateral hippocampus known to have an impaired growth following LPS exposure (VOI=1.5x3x2  $\text{mm}^3$ ). The  $B_0$  magnetic field homogeneity was adjusted using FASTMAP (Gruetter, 1993). Localized spectra were acquired with SPECIAL sequence using a very short echo time (2,7 ms) combined with water suppression and an outer volume suppression as described previously (Mlynarik et al., 2006; Lodygensky et al., 2014). The spectra were acquired in 18 blocks of 16 to improve signal-to-noise ratio, a bandwidth of 5 kHz, 4096 complex data points and a repetition time of 4s, for a total acquisition time of 19 min. An additional spectrum with an unsuppressed water signal was acquired for referencing and eddy-current correction.

#### **2.2.2.1 MRS Analysis**

Spectra were post-processed using an in-house MATLAB pipeline before the metabolite quantification using the LCModel (Provencher, 1993). FIDs were corrected for the phase and frequency shifts between the blocks of the spectra, due to the  $B_0$  magnetic field drift in time, as described in (Near et al., 2015). All blocks were then summed together to increase the SNR, a DC offset correction and a left shift of the 4 first complex data points were also applied to minimize the first-order phase error. All these steps were conducted using the FID-A matlab toolbox (Simpson et al., 2017). The following 18 metabolites were quantified using LCModel: alanine (Ala), aspartate (Asp), creatine (Cr),  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA), glucose (Glc), glutamate (Glu),

glutamine (Gln), glycine (Glyc), glutathione (GSH), glycerophosphorylcholine (GPC), phosphorylcholine (PCh), myo-inositol (Ins), lactate (Lac), N-acetylaspartate (NAA), N-acetylaspartylglutamate (NAAG), phosphocreatine (PCr), phosphoethanolamine (PE) and taurine (Tau). In addition to these, lipids and macromolecules signals at specific chemical-shifts were also considered as targets for the search of a biomarker and were studied in the same way as the aforementioned molecules.

Only metabolite with a Cramer-Rao lower bound inferior to 20 were kept. A limit on line width (30 Hz maximum) and SNR (5 minimum) were also applied.

### **2.3 Tissue preparation for immunohistochemistry**

Following the MRI, the rats were deeply anesthetised with isoflurane and transcardially perfused with saline followed by 4% paraformaldehyde (PFA). Brains were extracted and submerged in 4% PFA for 24h at 4°C and then cryoprotected by immersion in 30% sucrose for at least 48h. Brains were kept at 4°C until cutting. Coronal sections (50 µm thick) were cut on a cryostat and conserved at -20°C in cryoprotectant solution (30% ethylene glycol in 0.03 mol/L PBS and 15% sucrose) until staining. Special care was taken to ensure that the midline of the brain was absolutely perpendicular to the blade for cutting coronal sections.

#### **2.3.1 Immunohistochemistry**

Immunohistochemistry was performed on five free-floating brain sections, 300 µm apart, for each animal using the antibodies listed in Table 1 to evaluate cell death (fractin), microgliosis (Iba-1) and astrogliosis (GFAP). Briefly, the selected cryosections were washed in PBS and, transferred to blocking buffer (1% BSA, 1-5% normal goat serum (NGS), 0.3% Triton X100) for 2h with gentle agitation. Sections were then incubated in the primary antibody solution prepared with diluent buffer (1% BSA, 0.1% Triton X100 and 1% NGS) at 4°C overnight with gentle agitation. The day after, sections were washed in PBS and incubated for 2h at room temperature in the secondary antibody solution prepared in diluent. At the end, sections were washed in PBS, stained with DAPI solution (0.074% in PBS) for 5 min, washed in PBS and mounted on gelatin-coated slides. Slides were air-dried and mounted with Fluorogel (EMS, Cedarlane Labs, Burlington, ON, Canada) before scanning them at 20x in the slide scanner Axioscan Z1 (Zeiss, Toronto, ON, Canada).

### **2.3.2 Immunohistochemistry analysis**

ROIs with fixed dimension (2000x1000 pixels) were drawn out the AxioScan whole brain images and quantified using ImageJ (fig. 3-5). For the quantification, a pixel intensity threshold was defined as the non-specific background noise intensity as seen on the control brain slices incubated solely with the Alexa488 secondary antibody. For the particulated labeling of fractin, the number of Fractin<sup>+</sup> pixels (fractin) was quantified in the corpus callosum and in the ipsi- and contralateral cingulum. The percentage of area covered by Iba-1<sup>+</sup> and GFAP<sup>+</sup> immunolabelling was performed in the ipsilateral and contralateral sides of cortex, hippocampus and cingulum and in the corpus callosum. The values of the sections were averaged together to obtain one value per ROI for each animal.

## **2.4 Tissue preparation for biochemical and gene expression analysis**

For protein and RNA preparation and gene expression analysis, 24 pups (n=8 pups per group) were used. 24h following the injection, the animals were deeply anesthetized with isoflurane and transcardially perfused with saline. Brains were extracted, and the ipsilateral hemisphere was snap-frozen on dry-ice. Ipsilateral brain hemispheres were reduced to powder by grinding the tissue in liquid nitrogen and kept at -80°C.

### **2.4.1 Protein extraction and ELISA**

For protein extraction, tissue powder was resuspended in RIPA buffer (100 mMTris, pH 7.4, 150 mMNaCl, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate) with protease inhibitor cocktail and PMSF added. The suspension was incubated for 15 min and centrifuged at 10 000 g for 15 min at 4°C. Protein determination was performed using a standard Bradford protocol. Aliquots were made and kept frozen at -80°C until use. In order to quantify the IL-1Ra in brain extracts of treated animals, an ELISA immunoassay was performed using a commercial rat IL-1Ra ELISA kit (TSZ Elisa, Biotang, Lexington, MA, USA).

### **2.4.2 RNA preparation and gene expression analysis**

Total RNA was extracted with the RNeasy mini kit according to the manufacturer's instructions (Qiagen, Hilden, Germany). RNA quality and concentration were assessed by spectrophotometry using the Nanodrop apparatus (Thermoscientific, Wilmington, DE, USA). Total RNA (1µg) was

subjected to reverse transcription using the iScript™ cDNA synthesis kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). RT-qPCR was performed in triplicate for each sample using SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) for 40 cycles with a 3-step program (20s of denaturation at 95°C, 30s of annealing at 58°C and 30s of extension at 72°C). Amplification specificity was assessed with a melting curve analysis. The sequences of the primers used are provided in Table 2.

## **2.5 Statistics**

All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 7 software (GraphPad Software, La Jolla, CA). All data are presented as mean  $\pm$  SEM. Comparisons between groups were performed using Kruskal-Wallis tests followed by Dunn's multiple comparisons test. Statistical significance was set below 0.05.



### 3. Results

At P4, we did not see significant difference in body weight between the groups (Sham=10.05 ±0,20g ; LPS=9.33 ±0,3g and LPS+IL-1Ra=9.28 ±.120g) but we noted a significance decrease in weight gain from P3 to P4 in the LPS (0.40±0.18g; p=0.022) and LPS+IL-1Ra (0.45±0.28; p=0.043). animals compared to Sham (1,47 ±0,22g).

#### 3.1 <sup>1</sup>H-MRS of the hippocampus.

24h post-injection of lipopolysaccharide in the corpus callosum of rat pups, MRS was acquired in the ipsilateral hippocampus on a 7T scanner on 24 animals (8 Sham, 9 LPS, 7 LPS+IL-1Ra). The ipsilateral hippocampus was chosen to evaluate the detection of early sign of injury in a region known to undergo late atrophy (Lodygensky et al., 2005; Thompson et al., 2008; Thompson et al., 2014). Of the 24 spectra processed, 2 were rejected because one had insufficient resolution (linewidth > 20) and SNR, and another one had ROI placement errors, leaving a total of 22 spectra; 8 Sham, 8 LPS and 6 LPS+IL-1Ra. Glutamate, glutathione, N-acetylaspartate, phosphorylethanolamine and taurine were quantified in all spectra with a CRLB < 20%. GABA was also detected in all but one spectrum with a CRLB < 20%. Due to their resonance proximity in <sup>1</sup>H-MRS, creatine and phosphocreatine, glutamate and glutamine, N-acetylaspartate and N-acetylaspartylglutamate, and finally phosphocholine and glycerophosphocholine, were combined by two to allow better concentration estimation. For these combinations (respectively Cr+PCr, Glu+Gln, NAA+NAAG and PCh+GPC), concentrations could be estimated with a CRLB < 20 % for all spectra except for PCh+GPC for which two spectra had a CRLB > 20%. Only GPC was not identified in more than 50% of the processed spectra.

##### 3.1.1 Changes in metabolite and metabolite combination

From the metabolites and metabolite combination evaluated (Table 3), four had significant concentration changes between the Sham and LPS-treated groups (fig. 1B). Glutamate (Glu), N-acetylaspartate (NAA), N-acetylaspartate + N-acetylaspartylglutamate (NAA+NAAG) and phosphorylethanolamine (PE) significantly decreased between Sham and LPS animals (Glu : p=0.007; NAA: p=0.01; NAA+NAAG: p=0.001 ; PE : p=0.02). For these metabolites, however, there was no significant difference between Sham and LPS+IL-1Ra group. We observed a general

improvement of the four metabolites concentration changes induced by LPS in animals treated with IL-1Ra, particularly for NAA and NAA+NAAG. NAA decreased of 19 % for LPS ( $2,31 \pm 0,06 \mu\text{mol/g}$ ) and of 6 % for LPS+IL-1Ra animals ( $2,67 \pm 0,15 \mu\text{mol/g}$ ); and NAA+NAAG (fig. 1B) decreased of 21% in injured animals ( $3,11 \pm 0,11 \mu\text{mol/g}$ ) compared to 11% in treated animals ( $3,51 \pm 0,19 \mu\text{mol/g}$ ).

### *3.1.2 Changes in Free Lipids and Macromolecules*

Lipid peak are readily identifiable due to the ultrashort echo time used in the SPECIAL sequence. Of the 3 lipids and macromolecules concentrations measured (Table 3), a significant increase ( $p=0.009$ ) was found for the lipid 20 + macromolecule 20 (Lip20+MM20), whose peak is highest at 2.0 ppm and were combined due to their resonance proximity. Lip20+MM20 (fig. 1B) concentration increased of 45% in the LPS group ( $13,19 \pm 0,72 \mu\text{mol/g}$ ) and of only 36% in the LPS+IL1-Ra group ( $12,38 \pm 0,92 \mu\text{mol/g}$ ) when compared to Sham animals ( $9,07 \pm 0,65 \mu\text{mol/g}$ ).

## **3.2 DTI study**

DTI was acquired on 24 animals (Sham=8, LPS=9 and LPS+IL-1Ra=7) to measure fractional anisotropy (FA), mean diffusivity (MD), axial diffusivity (AD) and radial diffusivity (RD) in the central part of the corpus callosum and in the ipsilateral and contralateral cingulum. Due to the presence of artifacts and/or blood, the ROIs could not be drawn in some animals of the LPS and LPS+IL-1Ra groups and, ROIs were drawn in all 8 Sham animals. Thus, in the corpus callosum, 8 LPS and 6 LPS+IL1-Ra were used; 6 LPS and 4 LPS+IL-1Ra were assessed for the ipsilateral cingulum and 7 LPS and 6 LPS+IL-1Ra for the contralateral cingulum.

We did not record any significant changes in FA values in the 3 regions evaluated (fig. 2). Animals that received LPS had a significant decrease in MD and AD in the 3 ROIs evaluated (fig. 2B, 2C and 2D) and RD decreased in the ipsilateral and contralateral cingulum (fig. 2C and 2D). LPS+IL-1Ra group had significant decrease in RD in the corpus callosum and contralateral cingulum. IL-1Ra treated animal had a significant restriction of MD in the corpus callosum and in the contralateral cingulum although to a lesser extent than LPS animals. There was no significative difference for AD values in the 3 ROIs between Sham and LPS+IL-1Ra group (fig. 2E).

### **3.3 Immunohistological markers**

To support the DTI/MRS results in the three groups evaluated in this study, immunohistological evaluations were to evaluate apoptosis (fractin), microgliosis (Iba-1) and astrogliosis (GFAP).

#### *3.3.1 Apoptosis*

The marker of apoptosis fractin was expressed in the ROIs evaluated in the three groups. Compared to Sham animal, LPS exposed animals had increased fractin expression in the 3 ROIs and the difference were significant in the corpus callosum and contralateral cingulum (fig. 3D). A slight reaction was observed in the ipsilateral cingulum of the Sham animal near the site of the injection (fig. 3A) that could contribute to the increased value in this region compared to the other two (fig. 3D). The LPS+IL-1Ra group had markedly improved fractin expression compared to LPS group, though the values were not significant. Knowing that we previously shown that diffusion restriction had an inverse correlation with cell death marker expression, we looked at possible interactions between fractin expression and DTI. We found that fractin expression had a negative correlation to AD in the corpus callosum and contralateral cingulum and this correlation was stronger in the corpus callosum compared to the contralateral cingulum (fig. 3E and 3F).

#### *3.3.2 Microgliosis*

Microgliosis was assessed by immunolabelling brain slices with Iba-1 (fig. 4). LPS exposure induced bilateral microglia activation within the different ROIs as seen with increased Iba-1 expression (fig. 4A and B). Compared to the sham group, Iba-1 expression increased significantly in the ipsilateral and contralateral cortex of LPS animals (fig. 4B). Treatment with IL-1Ra induced a slight decrease in Iba-1 expression particularly in the hippocampus (fig. 4B). Correlation analysis were performed between Iba-1 expression and changes seen in the DTI and MRS in corresponding ROIs. From the metabolites we measured by MRS, we looked at correlation between Iba-1 expression and metabolites associated to microglia activation and neuroinflammation which includes total creatine, total choline, glutamate and the free lipids and macromolecules (Zahr et al., 2014; Pardon et al., 2016). We did not observe any significant correlation between Iba-1 expression and the metabolites of interest although we observed trend between creatine ( $r=-0.62$ ,  $p=0.06$ ) and Lip20+MM20 ( $r=0.46$ ,  $p=0.08$ ). and Iba-1 expression. Correlation analysis with the different DTI

parameters showed that Iba-1 expression was inversely associated to AD in the corpus callosum and contralateral cingulum (fig. 4C and D) and also, to MD in the contralateral cingulum (fig. 4D).

### 3.3.3 *Astrogliosis*

Astrocyte activation was quantified on brain slices marked with GFAP (figure 5). Images in figure 5 showed that, LPS exposure induced an important astroglial reaction, which was partially dimmed by a treatment with IL-1Ra (fig. 5A). Quantification of GFAP immunolabelling demonstrated that LPS induced a significant increase in astrocyte activation in the contralateral cingulum and the treatment with IL-1Ra tended to decrease it ( $p=0.085$ ) (fig. 5B). Quantification of astrogliosis revealed a strong reaction in the cortex of LPS exposed animals compared to Sham although it did not reach statistical significance (fig. 5B). However, LPS did not seem to influence astrocyte activation in the ipsi- and contralateral hippocampus and in the corpus callosum (fig. 5B). Correlation analysis between immunohistochemistry and MRS/DTI were done. For MRS, we evaluated the correlation between GFAP in the ipsilateral hippocampus and the following metabolites myo-inositol, GSH, glutamine, glutamate, and lactate that are associated to astrogliosis (Xu et al., 2011 ; Harris et al., 2015). Unfortunately, we were not able to quantify myo-Inositol and lactate with sufficient precision in our study. We did not observe any significant correlation between the 3 remaining metabolites and GFAP expression in the ipsilateral hippocampus, but we saw a trend toward an interaction between GFAP expression and glutamine ( $r=0.54$ ,  $p=0.09$ ). Assessment of correlation between DTI and GFAP expression revealed an inverse relationship between radial diffusivity and the extent of astrocytic activation in the ipsilateral and contralateral cingulum (fig. 5C and D).

### **3.4 Intracerebral level of IL-1Ra:**

To confirm the presence of IL-1Ra within the brain parenchyma following its systemic injection, we performed an ELISA with extract from the ipsilateral brain hemisphere. LPS+IL-1Ra had a significant increase in cerebral IL-1Ra concentration compared to the Sham and LPS groups ( $p < 0.05$ , fig. 6). This result suggests that the 23% increase in IL-1Ra is due to the presence of the recombinant IL-1Ra in the ipsilateral brain hemisphere.

### **3.5 RNA expression :**

The expressions of mRNA for pro-inflammatory (IL-1 $\beta$ , IL-6, iNOS and TNF- $\alpha$ ) and necroptotic (RIPK1, RIPK3 and MLKL) genes in the ipsilateral brain hemisphere were determined by quantitative PCR (qPCR). Compared to the sham group, the LPS had a strong inflammatory response for the 4 pro-inflammatory genes tested (fig. 7). IL-1ra treatment decreased LPS-induced expression of pro-inflammatory genes particularly for IL-1 $\beta$  and iNOS (fig. 7). Compared to Sham animals, LPS animals had a significant increase in the expression of the 3 genes related to necroptosis (fig. 8). Animal treated with IL-1Ra had a significant increased expression of RIPK3 and MLKL but not of RIPK1 (fig. 8). IL-1Ra treatment decreased the LPS-induced expression of RIPK3 and MLKL respectively by 27.53% and 15.83% (fig. 8).

## 4. Discussion

The present study provides new insights on the use of multimodal MRI as an early monitoring tool of inflammatory injury and therapeutic response in the immature rat brain.

### 4.1 Neonatal LPS exposure alters the hippocampal metabolism

Using  $^1\text{H}$ -MRS, we showed that intracerebral LPS induced acute metabolic changes in the hippocampus, which precedes the late atrophy known to occur in this preclinical model (Wang et al., 2013). In accordance to previously published results, we observed a decrease in the NAA and NAA+NAAG levels in injured animals typically know to be associated with impaired neuronal integrity (Lodygensky et al., 2014 ; van de Looij et al., 2014a ; van de Looij et al., 2014b). In our study, glutamate levels in the hippocampus decreased following LPS exposure in a similar manner to changes seen during the acute phase of neonatal hypoxia-ischemia (van de Looij et al., 2011 ; Sanches et al., 2018) and in the striatum of adult rats subjected to quinolinic acid injury (Tkac et al., 2001). The decrease in glutamate level can reflect altered neurotransmitter production following neuronal cell death and, it could also represent changes in the glutamate-glutamine cycle between neurons and glia. We also measured decreased levels of phosphorylethanolamine (PE), a precursor of phosphatidylethanolamine, and, decrease in PE levels was associated to myelination impairments and also to sign of lower cellular proliferation in perinatal hypoxia-ischemia (Raman et al., 2005; Wang et al., 2016). Moreover, PE levels reduction could reflect a weakened antioxidative status in the brain since PE is a substrate in sphingolipid peroxidation (Han et al., 2017). The concentration of lipid and macromolecule 20 increased following LPS injury similarly to data published on this model (Lodygensky et al., 2014). Increase in lipid and macromolecule was seen as a sign of microglial cell activation in adult mice subjected to systemic LPS (Pardon et al., 2016) and also in tumors (Yamasaki et al., 2015). In brain tumors, increases in lipid and macromolecule concentrations were associated with membrane rupture and cell death (Sijens et al., 1996; Nakamura et al., 2018).

### 4.2 DTI

DTI is a sensitive tool that allows *in vivo* evaluation of cerebral microstructure and is very sensitive to changes following injury. Although the exact mechanisms and cell types associated to the

different diffusivity parameters have not been yet accurately identified, studies suggest that axial and radial diffusivity could reflect the integrity of axonal and myelin content (Zhang et al., 2012; Tuor et al., 2014; Stolp et al., 2018), however the theory is more complex in the setting of a young and immature brain and acute injury. In accordance to published results for both preterm infants and animal models with WMI, we recorded during the acute phase of injury a decrease in diffusivity (AD, RD and MD) following LPS exposure without changes in fractional anisotropy (Lodygensky et al., 2011 ; Lodygensky et al., 2014 ; Tuor et al., 2014). Moreover, changes in axial diffusivity correlated to fractin expression in the corpus callosum and contralateral cingulum and also, to a lesser extent with microgliosis. Radial diffusivity had an inverse correlation with astrogliosis in the ipsilateral and contralateral cingulum. The changes in axial diffusivity are probably a reflection of combined ongoing damage with increase in cell death, microglial activation and axonal beading (Budde and Frank, 2010; Xie et al., 2010). The changes in radial diffusivity seen in this study, at an age prior to the onset of myelination, could represent reflect ongoing astrogliosis and could also be related to axonal injury as it was seen in animal model of neonatal stroke and also in traumatic brain injury (Zhuo et al., 2012; Tuor et al., 2014; Singh et al., 2016). Thus, DTI parameter alteration could be a reflection the acute neuroinflammatory response characterized by astrocyte activation, microgliosis and apoptotic cell death.

#### **4.3 Neonatal LPS exposure leads to inflammation and cell death**

LPS activation of toll like receptor 4 (TLR-4) induces a pro-inflammatory phenotype characterized by microglia activation, astrogliosis, inflammatory marker expression and cell death via both caspase-dependant (apoptosis) and caspase-independent (necroptosis) pathways (Nikseresht et al., 2015; Savard et al., 2015). Similarly to previous results in this animal model at P3 and P5, LPS exposure at P3 induced a strong neuroinflammatory profile with the expression of the pro-inflammatory markers IL-1 $\beta$ , iNOS, IL-6 and TNF- $\alpha$ , gliosis (increase Iba-1 and GFAP expression) and expression of both apoptotic and necroptosis markers (Pang et al., 2003; Lodygensky et al., 2014). To our knowledge, it is the first time that the LPS-induced expression of necroptosis markers is shown in the intracerebral LPS-injection model. It was previously demonstrated following neonatal hypoxia with associated neuronal and oligodendrocytes death and disruption of normal myelination process (Qu et al., 2016; Qu et al., 2017). Furthermore, RIPK3 and MLKL expression can increase the activity of the NLRP3 inflammasome which favors the establishment of a pro-

inflammatory state via IL-1 $\beta$  production (Lawlor et al., 2015).

#### **4.4 Early indication of IL-1Ra neuroprotective effect during the acute injury phase**

During the acute phase of injury, although the effect of IL-1Ra did not reach statistical significance levels, we observed that IL-1Ra exerted partial neuroprotective effect with similar trends in *in vivo* MRI and immunohistochemistry and gene expression analysis. The effect of therapy at this point cannot be expected to be complete as the animals were only exposed to 3 injections. In Girard et al. study, in an animal model of adult stroke, IL-1Ra showed neuroprotective trends during the acute phase of injury (24-48h post-injury) but, its neuroprotective and restorative effects were more prominent when assessed at later time points (Girard et al., 2014). If animals would have been imaged and analysed at later time points, DTI and MRS biomarkers of acute injury would not have been usable and the cytokine storm would be over. Indeed, the mean diffusivity reduction is only present in the first days following LPS (Lodygensky et al., 2010 ; Lodygensky et al., 2014). Furthermore, *in vivo* MRI is highly relevant when performed during an acute event as it can determine the immediate effect of therapy so that it could be replaced if found inefficient similarly to its use in glioblastoma multiform management (Rygh et al., 2014 ; de Souza et al., 2015 ; Toussaint et al., 2017). We demonstrate here for the first time that the first stages of a neuroprotective effect could be identified using *in vivo* DTI and MRS, which gives complementary information during the acute inflammatory injury. These changes were similar to markers of cell death and inflammatory markers evaluated by immunohistochemical and biochemical methods. In human preterm infants, early imaging was shown to be superior in detecting WMI and predicting outcomes (Inder et al., 1999; Martinez-Biarge et al., 2016; Guo et al., 2017; Nguyen et al., 2019). With the development of new MR systems for the Neonatal Intensive Care Unit (Tkach et al., 2013; Merhar et al., 2017), sequential imaging will be easier to perform and assist in the early injury detection and monitoring of therapy.

#### **4.5 Limitations**

One limit of this study is the initiation of IL-1Ra therapy within 5 min of inflammation onset. The timing of therapy was based on the kinetics as aforementioned. By starting therapy early, we maximised the chances to detect positives changes. We believe that the translational value is still present as the available timeframe is wider in human preterm infants. Another limitation is the fact



that, although DTI is more sensitive than conventional MRI in early detection of brain injury, it lacks specificity in regard to the physiological processes involved (Winklewski et al., 2018; Novikov et al., 2019). Therefore, the development of new techniques and models to analysis diffusion that goes beyond the use of tensors would lead to a better understanding of the contribution of different pathophysiological mechanisms on diffusivity changes during the acute and chronic phase of injury. Nonetheless, the presence of correlation between DTI and immunohistochemical markers underlines its potential to detect the early neuroinflammatory reaction and therapeutic response in neonatal WMI.

## 5. Conclusion

In conclusion, we showed that DTI reflected *in vivo* ongoing neuroinflammation as seen with histology, MRS detected early metabolic changes in the hippocampus prior to appearance of histological sign of injury. Furthermore, DTI and MRS showed early signs of response to neuroprotection during the acute phase of injury. If confirmed in other animal models, these results would suggest that *in vivo* multimodal MRI can detect not only the first stage of major white matter injury and metabolic impairment but assess the effect of therapy. As clinical MRI is being used more and more in the neonatal intensive care unit, it is highly relevant to evaluate the potential role of MRI as a central part in the design of future neuroprotective trials in human neonates.

**Acknowledgement:**

This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (<http://www.cihr-irsc.gc.ca/>)– Institute of Human Development, Child and Youth Health (IHDCYH) (136908 to G.A.L.). G.A.L. is supported by a start-up grant from the Research Center of CHU Sainte-Justine.

**Author Contributions:**

Wyston Pierre participated in data acquisition, data analysis, and manuscript draft, reviewed and revised the manuscript. Luis Akakpo, Irène Londono, Wyston Pierre and Philippe Pouliot contributed to the study preparation, data acquisition and manuscript preparation. Sylvain Chemtob and Frédéric Lesage has participated in the conceptualization of the study and revised the manuscript. Gregory Anton Lodygensky conceptualized and designed the study, contributed to data acquisition, supervised the data analysis, and revised the manuscript.

**Conflict of interest:**

The authors declare no competing financial interests.

## References

- Back, S.A., Rosenberg, P.A., 2014. Pathophysiology of glia in perinatal white matter injury. *Glia*.
- Bathen, T.F., Heldahl, M.G., Sitter, B., Vettukattil, R., Bofin, A., Lundgren, S., Gribbestad, I.S., 2011. In vivo MRS of locally advanced breast cancer: characteristics related to negative or positive choline detection and early monitoring of treatment response. *Magma* 24, 347-357.
- Budde, M.D., Frank, J.A., 2010. Neurite beading is sufficient to decrease the apparent diffusion coefficient after ischemic stroke. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 14472-14477.
- Cai, Z., Lin, S., Pang, Y., Rhodes, P.G., 2004. Brain injury induced by intracerebral injection of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha in the neonatal rat. *Pediatr Res* 56, 377-384.
- Cai, Z., Pang, Y., Lin, S., Rhodes, P.G., 2003. Differential roles of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta in lipopolysaccharide-induced brain injury in the neonatal rat. *Brain Res* 975, 37-47.
- Cao, M.D., Sitter, B., Bathen, T.F., Bofin, A., Lonning, P.E., Lundgren, S., Gribbestad, I.S., 2012. Predicting long-term survival and treatment response in breast cancer patients receiving neoadjuvant chemotherapy by MR metabolic profiling. *NMR Biomed* 25, 369-378.
- Caverzasi, E., Pichiecchio, A., Poloni, G.U., Calligaro, A., Pasin, M., Palesi, F., Castellazzi, G., Pasquini, M., Biondi, M., Barale, F., Bastianello, S., 2012. Magnetic resonance spectroscopy in the evaluation of treatment efficacy in unipolar major depressive disorder: a review of the literature. *Funct Neurol* 27, 13-22.
- Chen, S.H., Oyarzabal, E.A., Sung, Y.F., Chu, C.H., Wang, Q., Chen, S.L., Lu, R.B., Hong, J.S., 2015. Microglial regulation of immunological and neuroprotective functions of astroglia. *Glia* 63, 118-131.
- de Souza, P.C., Balasubramanian, K., Njoku, C., Smith, N., Gillespie, D.L., Schwager, A., Abdullah, O., Ritchey, J.W., Fung, K.M., Saunders, D., Jensen, R.L., Towner, R.A., 2015. OKN-007 decreases tumor necrosis and tumor cell proliferation and increases apoptosis in a preclinical F98 rat glioma model. *J Magn Reson Imaging* 42, 1582-1591.
- Dinarello, C.A., Simon, A., van der Meer, J.W.M., 2012. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. *Nature reviews. Drug discovery* 11, 633-652.

- Fan, L.W., Mitchell, H.J., Rhodes, P.G., Cai, Z., 2008a. Alpha-Phenyl-n-tert-butyl-nitronne attenuates lipopolysaccharide-induced neuronal injury in the neonatal rat brain. *Neuroscience* 151, 737-744.
- Fan, L.W., Pang, Y., Lin, S., Tien, L.T., Ma, T., Rhodes, P.G., Cai, Z., 2005. Minocycline reduces lipopolysaccharide-induced neurological dysfunction and brain injury in the neonatal rat. *J Neurosci Res* 82, 71-82.
- Fan, L.W., Tien, L.T., Mitchell, H.J., Rhodes, P.G., Cai, Z., 2008b. Alpha-phenyl-n-tert-butyl-nitronne ameliorates hippocampal injury and improves learning and memory in juvenile rats following neonatal exposure to lipopolysaccharide. *Eur J Neurosci* 27, 1475-1484.
- Fan, L.W., Tien, L.T., Zheng, B., Pang, Y., Lin, R.C., Simpson, K.L., Ma, T., Rhodes, P.G., Cai, Z., 2011. Dopaminergic neuronal injury in the adult rat brain following neonatal exposure to lipopolysaccharide and the silent neurotoxicity. *Brain Behav Immun* 25, 286-297.
- Favrais, G., van de Looij, Y., Fleiss, B., Ramanantsoa, N., Bonnin, P., Stoltenburg-Didinger, G., Lacaud, A., Saliba, E., Dammann, O., Gallego, J., Sizonenko, S., Hagberg, H., Lelievre, V., Gressens, P., 2011. Systemic inflammation disrupts the developmental program of white matter. *Ann Neurol* 70, 550-565.
- Galinsky, R., Lear, C.A., Dean, J.M., Wassink, G., Dhillon, S.K., Fraser, M., Davidson, J.O., Bennet, L., Gunn, A.J., 2018. Complex interactions between hypoxia-ischemia and inflammation in preterm brain injury. *Dev Med Child Neurol* 60, 126-133.
- Girard, S., Murray, K.N., Rothwell, N.J., Metz, G.A.S., Allan, S.M., 2014. Long-term functional recovery and compensation after cerebral ischemia in rats. *Behavioural Brain Research* 270, 18-28.
- Girard, S., Sebire, G., Kadhim, H., 2010. Proinflammatory orientation of the interleukin 1 system and downstream induction of matrix metalloproteinase 9 in the pathophysiology of human perinatal white matter damage. *J Neuropathol Exp Neurol* 69, 1116-1129.
- Girard, S., Sebire, H., Brochu, M.E., Briota, S., Sarret, P., Sebire, G., 2012. Postnatal administration of IL-1Ra exerts neuroprotective effects following perinatal inflammation and/or hypoxic-ischemic injuries. *Brain Behav Immun* 26, 1331-1339.
- Gruetter, R., 1993. Automatic, localized in vivo adjustment of all first- and second-order shim coils. *Magn Reson Med* 29, 804-811.

- Guo, T., Duerden, E.G., Adams, E., Chau, V., Branson, H.M., Chakravarty, M.M., Poskitt, K.J., Synnes, A., Grunau, R.E., Miller, S.P., 2017. Quantitative assessment of white matter injury in preterm neonates: Association with outcomes. *Neurology* 88, 614-622.
- Han, B., Wang, J.H., Geng, Y., Shen, L., Wang, H.L., Wang, Y.Y., Wang, M.W., 2017. Chronic Stress Contributes to Cognitive Dysfunction and Hippocampal Metabolic Abnormalities in APP/PS1 Mice. *Cell Physiol Biochem* 41, 1766-1776.
- Harris, J.L., Choi, I.Y., Brooks, W.M., 2015. Probing astrocyte metabolism in vivo : proton magnetic resonance spectroscopy in the injured and aging brain. *Front Aging Neurosci* 7, 202.
- Inder, T., Huppi, P.S., Zientara, G.P., Maier, S.E., Jolesz, F.A., di Salvo, D., Robertson, R., Barnes, P.D., Volpe, J.J., 1999. Early detection of periventricular leukomalacia by diffusion-weighted magnetic resonance imaging techniques. *The Journal of Pediatrics* 134, 631-634.
- Inder, T.E., Anderson, N.J., Spencer, C., Wells, S., Volpe, J.J., 2003. White matter injury in the premature infant: a comparison between serial cranial sonographic and MR findings at term. *AJNR Am J Neuroradiol* 24, 805-809.
- Jin, C., Londono, I., Mallard, C., Lodygensky, G.A., 2015. New means to assess neonatal inflammatory brain injury. *J Neuroinflammation* 12, 180.
- Khwaja, O., Volpe, J.J., 2008. Pathogenesis of cerebral white matter injury of prematurity. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 93, F153-161.
- Lawlor, K.E., Khan, N., Mildenhall, A., Gerlic, M., Croker, B.A., D'Cruz, A.A., Hall, C., Kaur Spall, S., Anderton, H., Masters, S.L., Rashidi, M., Wicks, I.P., Alexander, W.S., Mitsuuchi, Y., Benetatos, C.A., Condon, S.M., Wong, W.W., Silke, J., Vaux, D.L., Vince, J.E., 2015. RIPK3 promotes cell death and NLRP3 inflammasome activation in the absence of MLKL. *Nat Commun* 6, 6282.
- Lee, S.C., Liu, W., Dickson, D.W., Brosnan, C.F., Berman, J.W., 1993. Cytokine production by human fetal microglia and astrocytes. Differential induction by lipopolysaccharide and IL-1 beta. *The Journal of Immunology* 150, 2659.
- Liu, T., Zhao, D.X., Cui, H., Chen, L., Bao, Y.H., Wang, Y., Jiang, J.Y., 2016. Therapeutic hypothermia attenuates tissue damage and cytokine expression after traumatic brain injury by inhibiting necroptosis in the rat. *Sci Rep* 6, 24 547.

- Lodygensky, G.A., Kunz, N., Perroud, E., Somm, E., Mlynarik, V., Huppi, P.S., Gruetter, R., Sizonenko, S.V., 2014. Definition and quantification of acute inflammatory white matter injury in the immature brain by MRI/MRS at high magnetic field. *Pediatr Res* 75, 415-423.
- Lodygensky, G.A., Rademaker, K., Zimine, S., Gex-Fabry, M., Lieftink, A.F., Lazeyras, F., Groenendaal, F., de Vries, L.S., Huppi, P.S., 2005. Structural and functional brain development after hydrocortisone treatment for neonatal chronic lung disease. *Pediatrics* 116, 1-7.
- Lodygensky, G.A., West, T., Moravec, M.D., Back, S.A., Dikranian, K., Holtzman, D.M., Neil, J.J., 2011. Diffusion characteristics associated with neuronal injury and glial activation following hypoxia-ischemia in the immature brain. *Magn Reson Med* 66, 839-845.
- Lodygensky, G.A., West, T., Stump, M., Holtzman, D.M., Inder, T.E., Neil, J.J., 2010. In vivo MRI analysis of an inflammatory injury in the developing brain. *Brain Behav Immun* 24, 759-767.
- Ma, S.F., Chen, Y.J., Zhang, J.X., Shen, L., Wang, R., Zhou, J.S., Hu, J.G., Lu, H.Z., 2015. Adoptive transfer of M2 macrophages promotes locomotor recovery in adult rats after spinal cord injury. *Brain Behav Immun* 45, 157-170.
- Maalouf, E. F., Duggan, P.J., Counsell, S.J., Rutherford, M.A., Cowan, F., Azzopardi, D., Edwards, A.D., 2001. Comparison of findings on cranial ultrasound and magnetic resonance imaging in preterm infants. *Pediatrics* 107, 719-727.
- Martinez-Biarge, M., Groenendaal, F., Kersbergen, K. J., Benders, M. J., Foti, F., Cowan, F.M., de Vries, L.S., 2016. MRI Based Preterm White Matter Injury Classification: The Importance of Sequential Imaging in Determining Severity of Injury. *PLoS One* 11, e0156245.
- McKinstry, R.C., Miller, J.H., Snyder, A.Z., Mathur, A., Schefft, G.L., Almlı, C.R., Shimony, J.S., Shiran, S.I., Neil, J.J., 2002. A prospective, longitudinal diffusion tensor imaging study of brain injury in newborns. *Neurology* 59, 824-833.
- Merhar, S.L., Tkach, J.A., Woods, J.C., South, A.P., Wiland, E.L., Rattan, M.S., Dumoulin, C.L., Kline-Fath, B.M., 2017. Neonatal imaging using an on-site small footprint MR scanner. *Pediatric Radiology* 47, 1001-1011.
- Mlynarik, V., Gambarota, G., Frenkel, H., Gruetter, R., 2006. Localized short-echo-time proton MR spectroscopy with full signal-intensity acquisition. *Magn Reson Med* 56, 965-970.

- Najac, C., Ronen, S.M., 2016. MR Molecular Imaging of Brain Cancer Metabolism Using Hyperpolarized <sup>13</sup>C Magnetic Resonance Spectroscopy. *Top Magn Reson Imaging* 25, 187-196.
- Nakamura, H., Doi, M., Suzuki, T., Yoshida, Y., Hoshikawa, M., Uchida, M., Tanaka, Y., Takagi, M., Nakajima, Y., 2018. The Significance of Lactate and Lipid Peaks for Predicting Primary Neuroepithelial Tumor Grade with Proton MR Spectroscopy. *Magnetic Resonance in Medical Sciences* 17, 238-243.
- Near, J., Edden, R., Evans, C.J., Paquin, R., Harris, A., Jezzard, P., 2015. Frequency and phase drift correction of magnetic resonance spectroscopy data by spectral registration in the time domain. *Magn Reson Med* 73, 44-50.
- Nguyen, A.L.A., Ding, Y., Suffren, S., Londono, I., Luck, D., Lodygensky, G.A., 2019. The brain's kryptonite: Overview of punctate white matter lesions in neonates. *Int J Dev Neurosci*.
- Nikseresht, S., Khodagholi, F., Nategh, M., Dargahi, L., 2015. RIP1 Inhibition Rescues from LPS-Induced RIP3-Mediated Programmed Cell Death, Distributed Energy Metabolism and Spatial Memory Impairment. *J Mol Neurosci* 57, 219-230.
- Novikov, D.S., Fieremans, E., Jespersen, S.N., Kiselev, V.G., 2019. Quantifying brain microstructure with diffusion MRI: Theory and parameter estimation. *NMR in Biomedicine* 32, e3998.
- Pang, Y., Cai, Z., Rhodes, P.G., 2003. Disturbance of oligodendrocyte development, hypomyelination and white matter injury in the neonatal rat brain after intracerebral injection of lipopolysaccharide. *Brain Res Dev Brain Res* 140, 205-214.
- Pang, Y., Fan, L.W., Zheng, B., Cai, Z., Rhodes, P.G., 2006. Role of interleukin-6 in lipopolysaccharide-induced brain injury and behavioral dysfunction in neonatal rats. *Neuroscience* 141, 745-755.
- Pardon, M.-C., Yanez Lopez, M., Yuchun, D., Marjańska, M., Prior, M., Brignell, C., Parhizkar, S., Agostini, A., Bai, L., Auer, D.P., Faas, H.M., 2016. Magnetic Resonance Spectroscopy discriminates the response to microglial stimulation of wild type and Alzheimer's disease models. *Scientific Reports* 6, 19880.
- Pavlova, M.A., Krageloh-Mann, I., 2013. Limitations on the developing preterm brain: impact of periventricular white matter lesions on brain connectivity and cognition. *Brain* 136, 998-1011.



- Paxinos, G., Watson, C., 2007. The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press/Elsevier, Amsterdam ; Boston ;
- Price, S.J., Young, A.M., Scotton, W.J., Ching, J., Mohsen, L.A., Boonzaier, N.R., Lupson, V.C., Griffiths, J.R., McLean, M.A., Larkin, T.J., 2016. Multimodal MRI can identify perfusion and metabolic changes in the invasive margin of glioblastomas. *J Magn Reson Imaging* 43, 487-494.
- Provencher, S.W., 1993. Estimation of metabolite concentrations from localized in vivo proton NMR spectra. *Magn Reson Med* 30, 672-679.
- Qu, Y., Shi, J., Tang, Y., Zhao, F., Li, S., Meng, J., Tang, J., Lin, X., Peng, X., Mu, D., 2016. MLKL inhibition attenuates hypoxia-ischemia induced neuronal damage in developing brain. *Exp Neurol* 279, 223-231.
- Qu, Y., Tang, J., Wang, H., Li, S., Zhao, F., Zhang, L., Richard Lu, Q., Mu, D., 2017. RIPK3 interactions with MLKL and CaMKII mediate oligodendrocytes death in the developing brain. *Cell Death Dis* 8, e2629.
- Ramachandra, R., Subramanian, T., 2011. Atlas of the neonatal rat brain. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Raman, L., Tkac, I., Ennis, K., Georgieff, M.K., Gruetter, R., Rao, R., 2005. In vivo effect of chronic hypoxia on the neurochemical profile of the developing rat hippocampus. *Brain Res Dev Brain Res* 156, 202-209.
- Rivera, J.C., Sitaras, N., Noueihed, B., Hamel, D., Madaan, A., Zhou, T., Honore, J.C., Quiniou, C., Joyal, J.S., Hardy, P., Sennlaub, F., Lubell, W., Chemtob, S., 2013. Microglia and interleukin-1beta in ischemic retinopathy elicit microvascular degeneration through neuronal semaphorin-3A. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33, 1881-1891.
- Rosenzweig, J.M., Lei, J., Burd, I., 2014. Interleukin-1 Receptor Blockade in Perinatal Brain Injury. *Frontiers in Pediatrics* 2, 108.
- Rygh, C.B., Wang, J., Thuen, M., Gras Navarro, A., Huuse, E.M., Thorsen, F., Poli, A., Zimmer, J., Haraldseth, O., Lie, S.A., Enger, P.O., Chekenya, M., 2014. Dynamic contrast enhanced MRI detects early response to adoptive NK cellular immunotherapy targeting the NG2 proteoglycan in a rat model of glioblastoma. *PLoS One* 9, e108414.
- Sanches, E.F., Van de Looij, Y., Toulotte, A., da Silva, A.R., Romero, J., Sizonenko, S.V., 2018. Brain Metabolism Alterations Induced by Pregnancy Swimming Decreases Neurological

- Impairments Following Neonatal Hypoxia-Ischemia in Very Immature Rats. *Front Neurol* 9, 480.
- Savard, A., Brochu, M.E., Chevin, M., Guiraut, C., Grbic, D., Sebire, G., 2015. Neuronal self-injury mediated by IL-1beta and MMP-9 in a cerebral palsy model of severe neonatal encephalopathy induced by immune activation plus hypoxia-ischemia. *J Neuroinflammation* 12, 111.
- Savard, A., Lavoie, K., Brochu, M.E., Grbic, D., Lepage, M., Gris, D., Sebire, G., 2013. Involvement of neuronal IL-1beta in acquired brain lesions in a rat model of neonatal encephalopathy. *J Neuroinflammation* 10, 110.
- Schabitz, W.R., Fisher, M., 1995. Diffusion weighted imaging for acute cerebral infarction. *Neurol Res* 17, 270-274.
- Seitz, R.J., Donnan, G.A., 2010. Role of neuroimaging in promoting long-term recovery from ischemic stroke. *J Magn Reson Imaging* 32, 756-772.
- Sharma, U., Baek, H.M., Su, M.Y., Jagannathan, N.R., 2011. In vivo (1)H MRS in the assessment of the therapeutic response of breast cancer patients. *NMR in biomedicine* 24, 700-711.
- Sijens, P.E., Levendag, P.C., Vecht, C.J., van Dijk, P., Oudkerk, M., 1996. 1H MR spectroscopy detection of lipids and lactate in metastatic brain tumors. *NMR Biomed* 9, 65-71.
- Simpson, R., Devenyi, G.A., Jezzard, P., Hennessy, T.J., Near, J., 2017. Advanced processing and simulation of MRS data using the FID appliance (FID-A)-An open source, MATLAB-based toolkit. *Magn Reson Med* 77, 23-33.
- Singh, K., Trivedi, R., Devi, M.M., Tripathi, R.P., Khushu, S., 2016. Longitudinal changes in the DTI measures, anti-GFAP expression and levels of serum inflammatory cytokines following mild traumatic brain injury. *Exp Neurol* 275 Pt 3, 427-435.
- Song, S.K., Sun, S.W., Ju, W.K., Lin, S.J., Cross, A.H., Neufeld, A.H., 2003. Diffusion tensor imaging detects and differentiates axon and myelin degeneration in mouse optic nerve after retinal ischemia. *Neuroimage* 20, 1714-1722.
- Song, S.K., Sun, S.W., Ramsbottom, M.J., Chang, C., Russell, J., Cross, A.H., 2002. Dysmyelination revealed through MRI as increased radial (but unchanged axial) diffusion of water. *Neuroimage* 17, 1429-1436.

- Song, S.K., Yoshino, J., Le, T.Q., Lin, S.J., Sun, S.W., Cross, A.H., Armstrong, R.C., 2005. Demyelination increases radial diffusivity in corpus callosum of mouse brain. *Neuroimage* 26, 132-140.
- Stolp, H.B., Ball, G., So, P.W., Tournier, J.D., Jones, M., Thornton, C., Edwards, A.D., 2018. Voxel-wise comparisons of cellular microstructure and diffusion-MRI in mouse hippocampus using 3D Bridging of Optically-clear histology with Neuroimaging Data (3D-BOND). *Scientific Reports* 8, 4011.
- Sun, S.-W., Neil, J.J., Song, S.-K., 2003. Relative indices of water diffusion anisotropy are equivalent in live and formalin-fixed mouse brains. *Magnetic Resonance in Medicine* 50, 743-748.
- Thompson, D.K., Omizzolo, C., Adamson, C., Lee, K.J., Stargatt, R., Egan, G.F., Doyle, L.W., Inder, T.E., Anderson, P.J., 2014. Longitudinal growth and morphology of the hippocampus through childhood: Impact of prematurity and implications for memory and learning. *Hum Brain Mapp* 35, 4129-4139.
- Thompson, D.K., Wood, S.J., Doyle, L.W., Warfield, S.K., Lodygensky, G.A., Anderson, P.J., Egan, G.F., Inder, T.E., 2008. Neonate hippocampal volumes: prematurity, perinatal predictors, and 2-year outcome. *Ann Neurol* 63, 642-651.
- Tkac, I., Keene, C.D., Pfeuffer, J., Low, W.C., Gruetter, R., 2001. Metabolic changes in quinolinic acid-lesioned rat striatum detected non-invasively by in vivo (1)H NMR spectroscopy. *J Neurosci Res* 66, 891-898.
- Tkach, J.A., Merhar, S.L., Kline-Fath, B.M., Pratt, R.G., Loew, W.M., Daniels, B.R., Giaquinto, R.O., Rattan, M.S., Jones, B.V., Taylor, M.D., Tiefermann, J.M., Tully, L.M., Murphy, E.C., Wolf-Severs, R.N., LaRuffa, A.A., Dumoulin, C.L., 2013. MRI in the Neonatal ICU: Initial Experience Using a Small-Footprint 1.5-T System. *American Journal of Roentgenology* 202, W95-W105.
- Toussaint, M., Pinel, S., Auger, F., Durieux, N., Thomassin, M., Thomas, E., Moussaron, A., Meng, D., Plenat, F., Amouroux, M., Bastogne, T., Frochot, C., Tillement, O., Lux, F., Barberi-Heyob, M., 2017. Proton MR Spectroscopy and Diffusion MR Imaging Monitoring to Predict Tumor Response to Interstitial Photodynamic Therapy for Glioblastoma. *Theranostics* 7, 436-451.

- Tuor, U.I., Morgunov, M., Sule, M., Qiao, M., Clark, D., Rushforth, D., Foniok, T., Kirton, A., 2014. Cellular correlates of longitudinal diffusion tensor imaging of axonal degeneration following hypoxic–ischemic cerebral infarction in neonatal rats. *NeuroImage: Clinical* 6, 32-42.
- van de Looij, Y., Chatagner, A., Huppi, P.S., Gruetter, R., Sizonenko, S.V., 2011. Longitudinal MR assessment of hypoxic ischemic injury in the immature rat brain. *Magn Reson Med* 65, 305-312.
- van de Looij, Y., Chatagner, A., Quairiaux, C., Gruetter, R., Huppi, P.S., Sizonenko, S.V., 2014 a. Multi-modal assessment of long-term erythropoietin treatment after neonatal hypoxic-ischemic injury in rat brain. *PLoS One* 9, e95643.
- van de Looij, Y., Ginet, V., Chatagner, A., Toulotte, A., Somm, E., Huppi, P.S., Sizonenko, S.V., 2014b. Lactoferrin during lactation protects the immature hypoxic-ischemic rat brain. *Ann Clin Transl Neurol* 1, 955-967.
- Volpe, J.J., 2009. Brain injury in premature infants: a complex amalgam of destructive and developmental disturbances. *Lancet Neurol* 8, 110-124.
- Wang, K.C., Fan, L.W., Kaizaki, A., Pang, Y., Cai, Z., Tien, L.T., 2013. Neonatal lipopolysaccharide exposure induces long-lasting learning impairment, less anxiety-like response and hippocampal injury in adult rats. *Neuroscience* 234, 146-157.
- Wang, W.T., Lee, P., Dong, Y., Yeh, H.W., Kim, J., Weiner, C.P., Brooks, W.M., Choi, I.Y., 2016. In Vivo Neurochemical Characterization of Developing Guinea Pigs and the Effect of Chronic Fetal Hypoxia. *Neurochem Res* 41, 1831-1843.
- Winklewski, P.J., Sabisz, A., Naumczyk, P., Jodzio, K., Szurowska, E., Szarmach, A., 2018. Understanding the Physiopathology Behind Axial and Radial Diffusivity Changes—What Do We Know? *Frontiers in Neurology* 9.
- Xie, M., Tobin, J.E., Budde, M.D., Chen, C.I., Trinkaus, K., Cross, A.H., McDaniel, D.P., Song, S.K., Armstrong, R.C., 2010. Rostrocaudal analysis of corpus callosum demyelination and axon damage across disease stages refines diffusion tensor imaging correlations with pathological features. *J Neuropathol Exp Neurol* 69, 704-716.
- Xu, S., Zhuo, J., Racz, J., Shi, D., Roys, S., Fiskum, G., Gullapalli, R., 2011. Early microstructural and metabolic changes following controlled cortical impact injury in rat: a magnetic resonance imaging and spectroscopy study. *Journal of neurotrauma* 28, 2091-2102.

- Yamasaki, F., Takayasu, T., Nosaka, R., Amatya, V.J., Doskaliyev, A., Akiyama, Y., Tominaga, A., Takeshima, Y., Sugiyama, K., Kurisu, K., 2015. Magnetic resonance spectroscopy detection of high lipid levels in intraaxial tumors without central necrosis: a characteristic of malignant lymphoma. *J Neurosurg* 122, 1370-1379.
- Zahr, N.M., Mayer, D., Rohlfing, T., Sullivan, E.V., Pfefferbaum, A., 2014. Imaging neuroinflammation? A perspective from MR spectroscopy. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* 24, 654-664.
- Zhang, J., Aggarwal, M., Mori, S., 2012. Structural insights into the rodent CNS via diffusion tensor imaging. *Trends Neurosci* 35, 412-421.
- Zhao, M., Lu, L., Lei, S., Chai, H., Wu, S., Tang, X., Bao, Q., Chen, L., Wu, W., Liu, X., 2016. Inhibition of Receptor Interacting Protein Kinases Attenuates Cardiomyocyte Hypertrophy Induced by Palmitic Acid. *Oxid Med Cell Longev* 2016, 1451676.
- Zhuo, J., Xu, S., Proctor, J.L., Mullins, R.J., Simon, J.Z., Fiskum, G., Gullapalli, R.P., 2012. Diffusion kurtosis as an in vivo imaging marker for reactive astrogliosis in traumatic brain injury. *Neuroimage* 59, 467-477.

## Tables du chapitre III

**Table 1.** List of antibodies used for immunohistochemistry

Antibody	Specificity	Company	Dilution
Rabbit Anti-Fractin	32 kDa Fractin fragment	Millipore (Etobicoke, ON, Canada)	1:500
Rabbit Anti-GFAP	Total GFAP protein	Cell Signaling (Beverly, MA, USA)	1:500
Rabbit Anti-Iba1	17 kDa calcium-binding protein	Wako (Osaka, Japan)	1:500
Alexa488-Goat Anti-rabbit IgG	Rabbit IgG (H + L) (secondary)	Life Technologies, Invitrogen	1:1000

**Table 2.** List of primers used for gene expression analysis.

<b>Gene</b>	<b>Forward (F) and Reverse (R) primer sequences</b>	<b>Ref.</b>
<b>GAPDH</b>	<b>F-5'-AAGGTCGGTGTGAACGGATT-3'</b> <b>R-5'-TGAACCTGCCGTGGGTAGAG-3'</b>	(Ma et al., 2015)
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	<b>F-5'-GGCAACTGTCCCTGAACTCAA-3'</b> <b>R-5'GCCTCAAAGAACAGGTCATTCTC-3'</b>	(Lodygensky et al., 2014)
<b>IL-6</b>	<b>F-5'-TCCTACCCCAACTTCCAATGC-3'</b> <b>R-5'TAGCACACTAGGTTTGCCGAG-3'</b>	(Ma et al., 2015)
<b>iNOS</b>	<b>F-5'-GAGTGAGGAGCAGGTTGAGGATTAC-3'</b> <b>R-5'AGGAAAAGACCGCACCGAAG-3'</b>	(Chen et al., 2015)
<b>MLKL</b>	<b>F-5'-CCCGAGTTGTTGCAGGAGAT -3'</b> <b>R-5'TCTCCAAGATTCCATCCGCAG-3'</b>	(Liu et al., 2016)
<b>RIPK1</b>	<b>F-5'-CTTAAGCCCAAGTGCAGTCA-3'</b> <b>R-5'ATAGCCCAACAAGGAGGATG-3'</b>	(Zhao et al., 2016)
<b>RIPK3</b>	<b>F-5'-CAGTGTTGGCTGGAAGAGAA-3'</b> <b>R-5'AGGCTCAGAACTCCAGCAAT-3'</b>	(Zhao et al., 2016)
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>F-5'-CTATGTGCTCCTCACCCACA-3'</b> <b>R-5'TGGAAGACTCCTCCCAGGTA-3'</b>	(Rivera et al., 2013)

**Table 3.** Concentrations of metabolites quantified in the ipsilateral hippocampus using the LCModel. Values are expressed as  $\mu\text{mol/g}$  (mean  $\pm$  SEM). Concentrations in bold showed a statistical difference (\* $p < 0.05$  ; \*\* $p < 0.01$ ) compared to Sham animals (see Figure 1).

Metabolites	Sham	LPS	LPS+IL-1Ra
Alanine	2.32 $\pm$ 0.25	2.43 $\pm$ 0.21	3.02 $\pm$ 0.61
Creatine + Phosphocreatine	6.65 $\pm$ 0.14	6.80 $\pm$ 0.28	6.63 $\pm$ 0.39
Creatine	5.38 $\pm$ 0.39	4.42 $\pm$ 0.73	4.34 $\pm$ 0.70
GABA	2.37 $\pm$ 0.14	2.04 $\pm$ 0.15	1.88 $\pm$ 0.18
Glutamine	2.47 $\pm$ 0.17	2.38 $\pm$ 0.17	2.53 $\pm$ 0.41
Glutamate	8.09 $\pm$ 0.22	<b>6.69 <math>\pm</math> 0.25 **</b>	7.08 $\pm$ 0.37
Glutamate + Glutamine	10.29 $\pm$ 0.24	8.89 $\pm$ 0.43	9.35 $\pm$ 0.60
Glutathione	2.68 $\pm$ 0.16	2.22 $\pm$ 0.16	2.15 $\pm$ 0.14
Glycine	3.30 $\pm$ 0.15	2.86 $\pm$ 0.19	2.75 $\pm$ 0.18
N-acetylaspartate	2.84 $\pm$ 0.16	<b>2.31 <math>\pm</math> 0.06*</b>	2.67 $\pm$ 0.15
N-acetylaspartate + N-acetylaspartylglutamate	3.96 $\pm$ 0.16	<b>3.11 <math>\pm</math> 0.11 **</b>	3.51 $\pm$ 0.19
Phosphocholine	1.44 $\pm$ 0.05	1.24 $\pm$ 0.11	1.34 $\pm$ 0.23
Phosphocholine + Glycerophosphocholine	1.53 $\pm$ 0.06	1.25 $\pm$ 0.09	1.47 $\pm$ 0.08
Phosphorylethanolamine	6.71 $\pm$ 0.18	<b>5.71 <math>\pm</math> 0.21 *</b>	6.11 $\pm$ 0.45
Taurine	19.79 $\pm$ 0.57	19.31 $\pm$ 0.65	18.72 $\pm$ 0.78
Lipid 09 + macromolecule 09	14.27 $\pm$ 0.60	15.26 $\pm$ 0.88	16.15 $\pm$ 0.42
Lipid 20 + macromolecule 20	9.07 $\pm$ 0.65	<b>13.19 <math>\pm</math> 0.72 *</b>	12.38 $\pm$ 0.92
Macromolecule 09	11.80 $\pm$ 1.06	10.20 $\pm$ 0.89	12.03 $\pm$ 0.55



## Légendes et figures du chapitre III

**Figure 1.** Metabolites were evaluated by MRS 24h following induction of inflammatory injury and IL1-Ra therapy. (A) Representative spectrum acquired on the ipsilateral hippocampus (highlighted in white rectangle on T2 weighted coronal image on P4 rats). (B) Bar graphs of metabolites concentration in the hippocampus; statistically significant changes compared to Sham are indicated. n=6-8 per group. Values are represented as mean  $\pm$  SEM.

\*p < 0.05; \*\*p < 0.01; compared to Sham.

**Figure 2.** *In vivo* diffusion tensor imaging of P4 rat pups acquired in each group.

(A) Example of coronal RGB (red, green, and blue) map with the ROIs (ipsilateral cingulum, corpus callosum and contralateral cingulum) highlighted in white. The colors in the RBG map represent the preferred direction of water diffusion. Red corresponds to medial–lateral, green to superior–inferior, and blue to rostral–caudal directions. (B, C and D) Bar graph of fractional anisotropy (FA), mean diffusivity (MD), axial diffusivity (AD) and radial diffusivity (RD) in the (B) corpus callosum, (C) ipsilateral cingulum and (D) contralateral cingulum. (E) Table of scalar map values represented as mean  $\pm$  SEM. n=4-8 per group.

\*: P < 0.05 ; \*\* : P < 0.01 ; \*\*\*: P < 0.001 compared to the Sham. Diffusivity:  $\mu\text{m}^2/\text{ms}$ .

**Figure 3.** Post-mortem evaluation of the apoptotic marker fractin

(A-C) Representative images for each group: (A) Sham, (B) LPS (C) LPS+IL-1Ra. (D) Bar graph of the number of fractin<sup>+</sup> particles expression in the corpus callosum, ipsilateral and contralateral cingulum. In the images at 1x, the boxed areas represent the regions of interest obtained at 20x, images correspond to the ipsilateral cingulum. Scatter plot of the axial diffusivity for the natural logarithm of the fractin quantification in (E) the corpus callosum, with the following regression line:  $AD = -0.043 \times \ln(\text{fractin}) + 1.98$ ;  $R^2 = 0.52$  P=0.003 and (F) the contralateral cingulum, with the following regression line:  $AD = -0,070 \times \ln(\text{fractin}) + 1,90$  ;  $R^2 = 0.33$  P=0.03. n=4 animals per group. Values are represented as mean  $\pm$  SEM. Bars : 1 $\times$  = 1,000  $\mu\text{m}$ , 20 $\times$  = 20  $\mu\text{m}$ . \*p < 0.05, compared to Sham.

**Figure 4.** Evaluation of microglia activation by Iba-1 immunohistochemistry.

(A) Representative images for Sham, LPS and LPS+IL-1Ra animals taken at 1x and 10x using Zeiss AxioScan. (B) Bar graph of the percentage of area covered by Iba-1 expression in the ROIs. The corpus callosum is highlighted in red. In the images at 1x, the boxed areas represent ROIs; images at 20x correspond to the ipsilateral cingulum. (C) Scatter plot of the AD effect for Iba-1 expression in the corpus callosum, with the following regression line:  $AD = -0,016 \times \text{Iba-1 expression} + 1.86$ ;  $R^2=0.35$   $P=0.015$  (D) Scatter plot of the AD and MD effects for Iba-1 expression in the contralateral cingulum, with the following regression lines:  $AD = -0,018 \times \text{Iba-1 expression} + 1.77$ ;  $R^2=0.33$   $P=0.02$  and  $MD = -0,013 \times \text{Iba-1 expression} + 1.29$ ;  $R^2=0.30$   $P=0.027$ .  $n=4-5$  animals per group. Bars :  $1\times = 1,000 \mu\text{m}$ ,  $10\times = 100 \mu\text{m}$ . \* $p < 0.05$ .

**Figure 5.** Evaluation of astrocyte activation by immunohistochemistry with GFAP.

(A) Representative images for Sham, LPS and LPS+IL-1Ra animals taken at 1x and 10x using Zeiss AxioScan. (B) Bar graph of the surface covered by GFAP expression in the different regions of interest. In the images at 1x, the boxed areas represent the regions of interest; at 10x, images correspond to the ipsilateral cortex. (C-D) Scatter plot of the RD effect for GFAP expression in (C) the ipsilateral cingulum, with the following regression line:  $RD = -0,009 \times \text{GFAP expression} + 1.11$ ;  $R^2=0.45$   $P=0.018$  and (D) the contralateral cingulum, with the following regression lines:  $RD = -0,010 \times \text{GFAP expression} + 1.22$ ;  $R^2=0.41$   $P=0.026$ .  $n=4-6$  animals per group. Bars :  $1\times = 1,000 \mu\text{m}$ ,  $10\times = 100 \mu\text{m}$ . \* $p < 0.05$ .

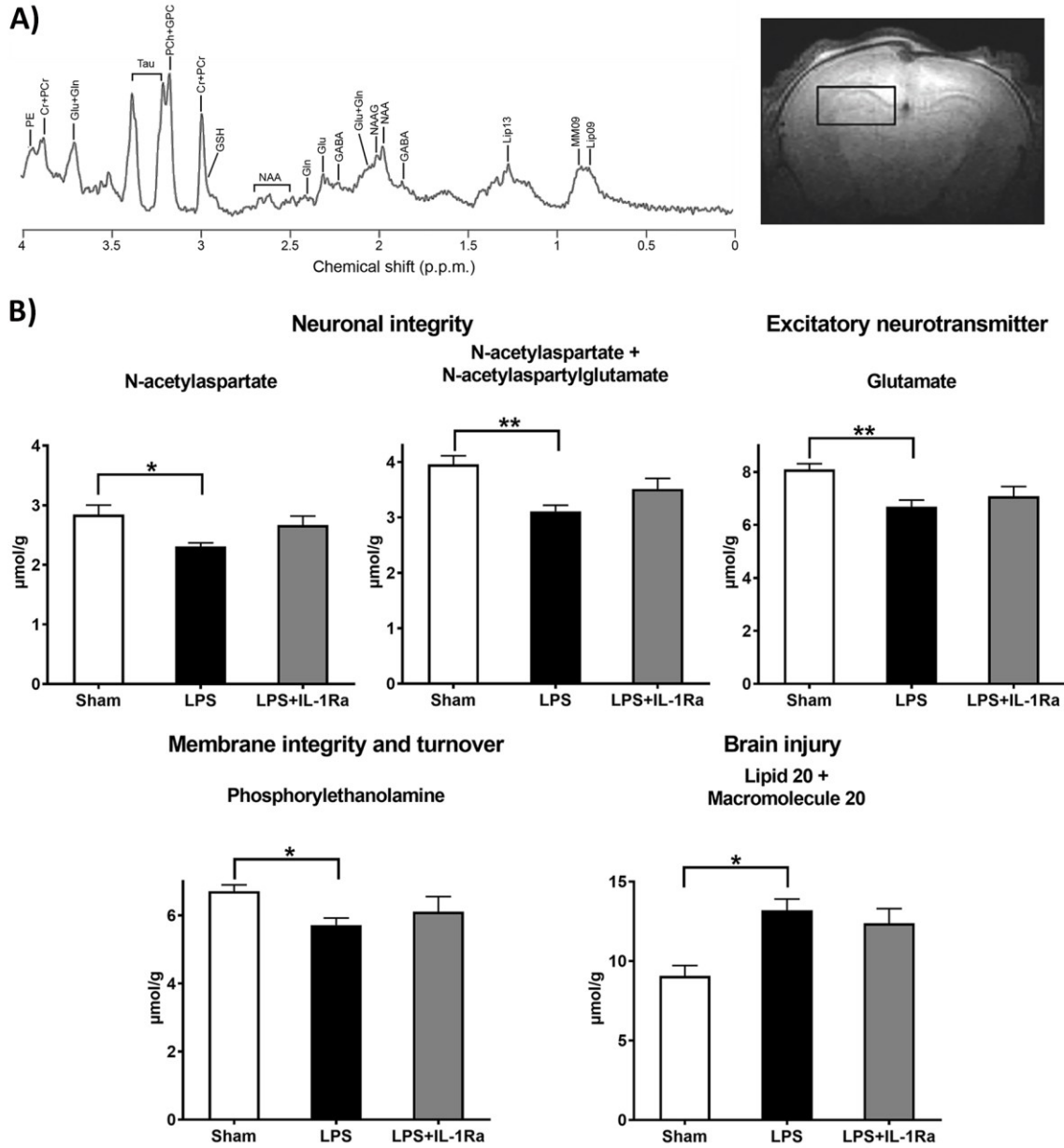
**Figure 6.** IL-1Ra concentration measured by ELISA in the ipsilateral brain hemisphere.  $n=8$  per group. Results are presented in ng/ml (mean $\pm$ SEM). \* $p < 0.05$ .

**Figure 7.** Changes in pro-inflammatory gene expression in brain of P4 rat pups. Relative mRNA levels are presented in arbitrary units (AU, mean $\pm$ SEM) compared to Sham group.  $n=8$  per group. IL-1 $\beta$ , interleukin 1 $\beta$ ; IL-6, interleukin 6; iNOS, inducible nitric oxide synthase, and TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor  $\alpha$ . \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  compared to Sham

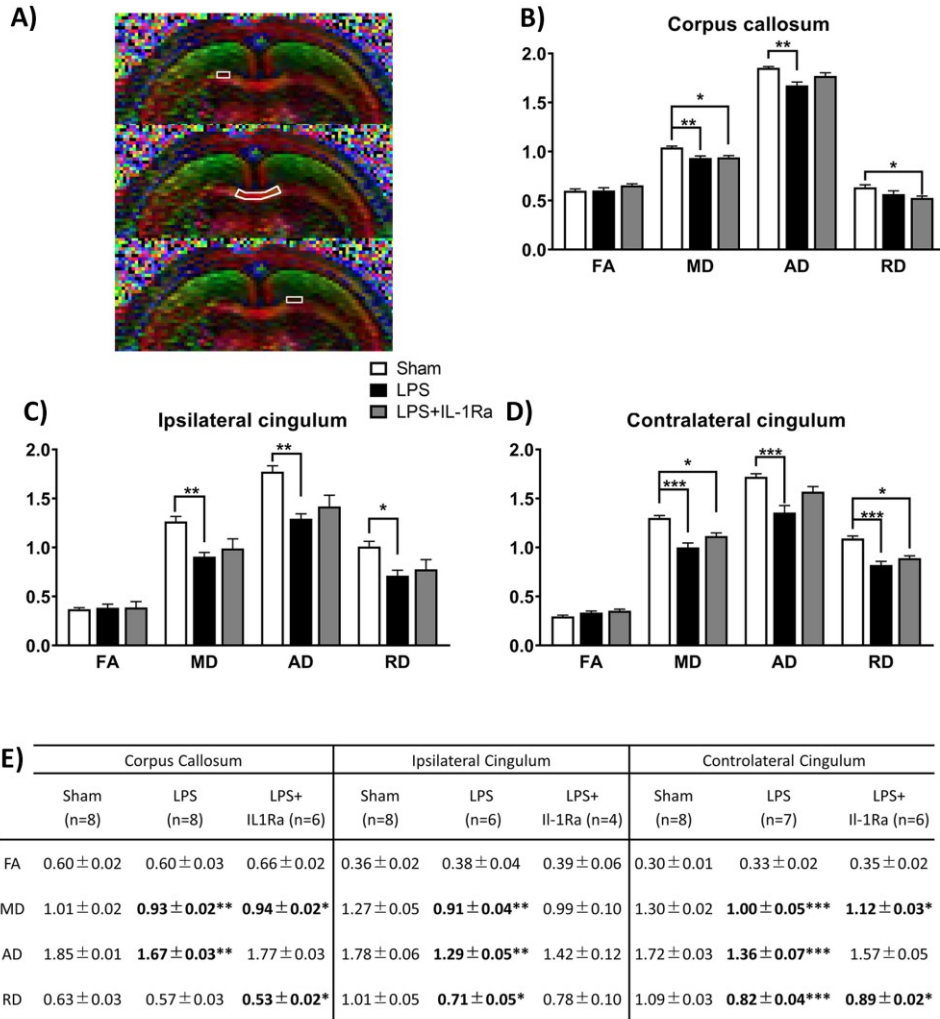
**Figure 8.** Changes in necroptotic gene expression in brain of P4 rat pups 24 h after exposure. Relative mRNA levels are presented in arbitrary units (AU, mean  $\pm$  SEM) compared to Sham

group. n=8 per group. RIPK1, Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1; RIPK3, Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3; MLKL, Mixed Lineage Kinase Domain-Like protein. \*\*p < 0.01 ; ns : non-significant compared to Sham.

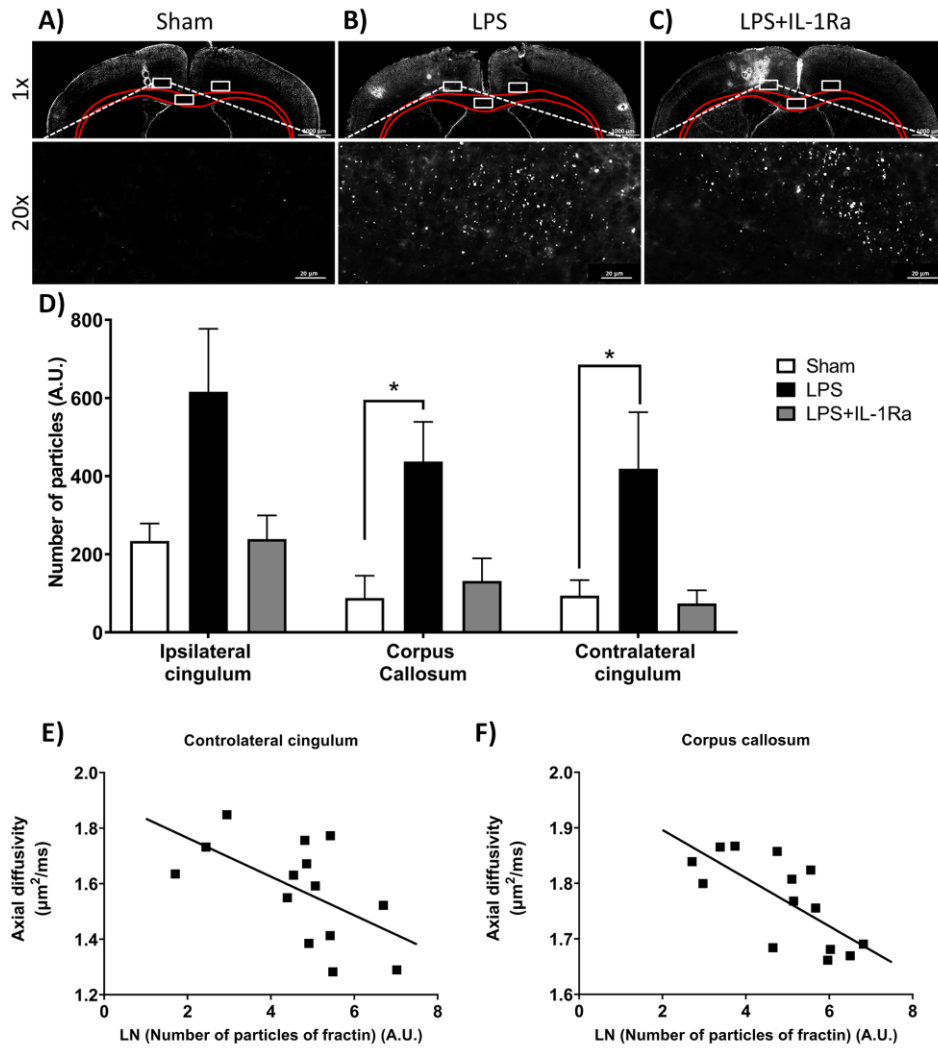
**Figure 1**



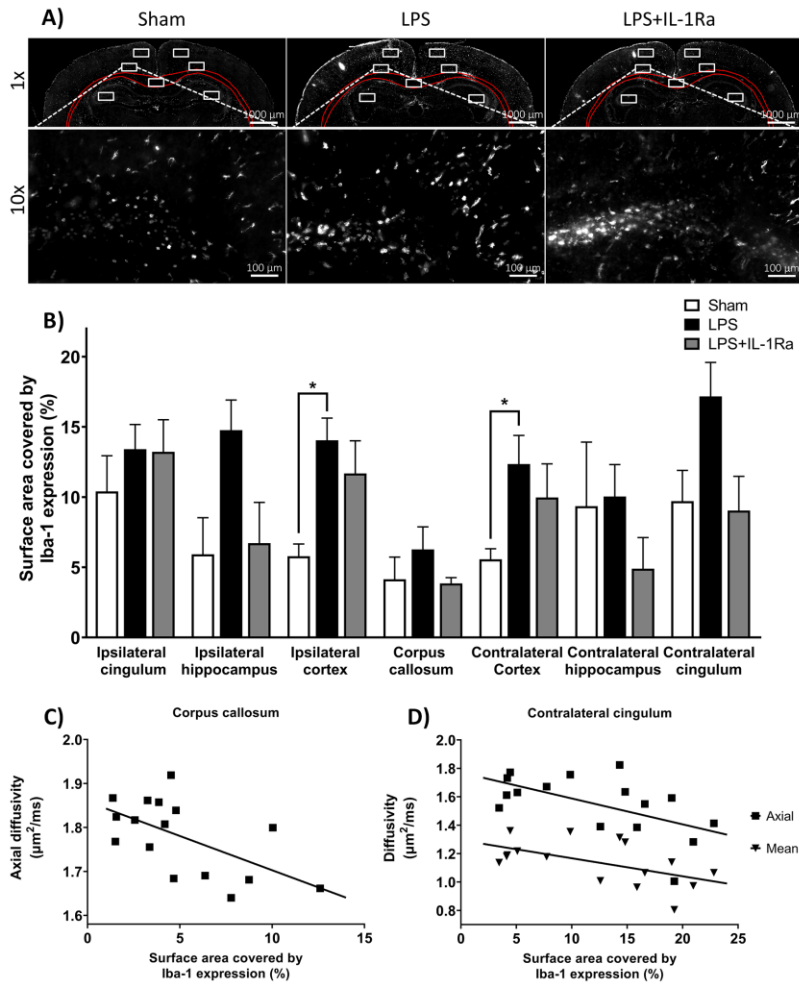
**Figure 2**



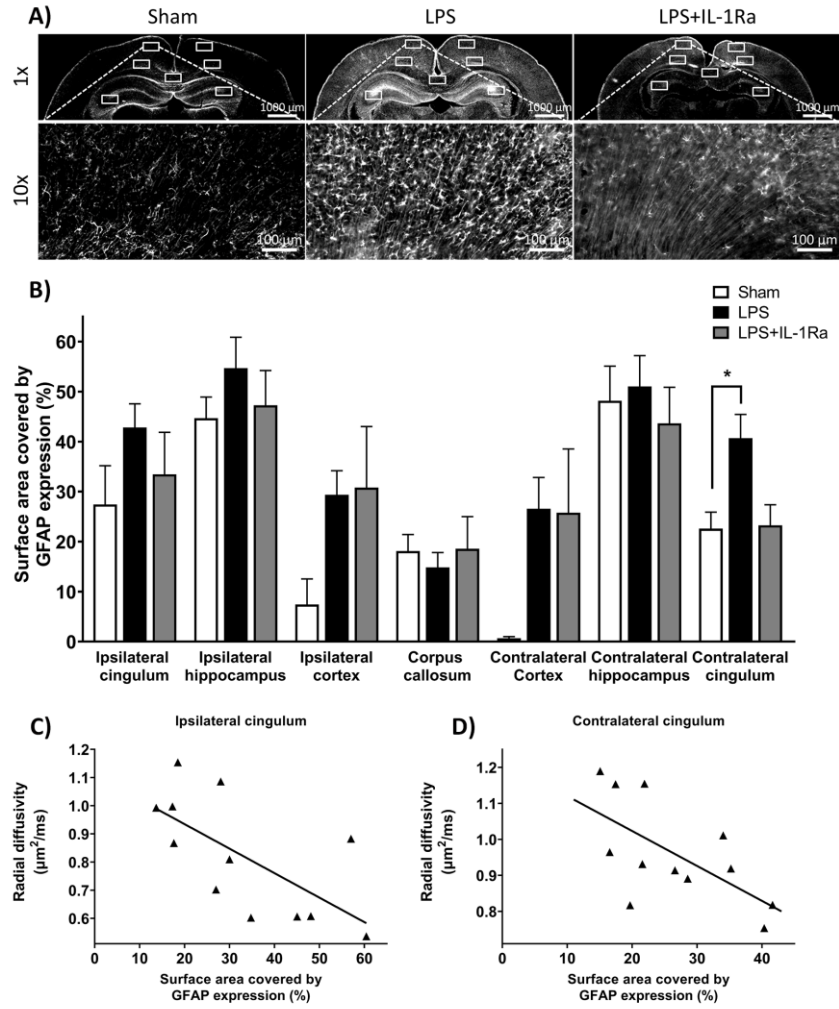
**Figure 3**



**Figure 4**

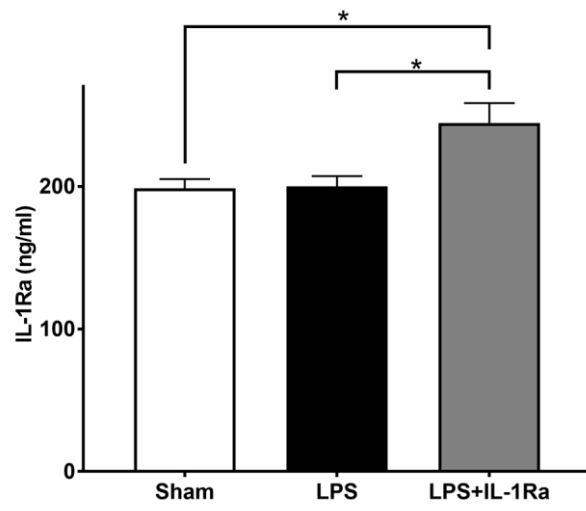


**Figure 5**

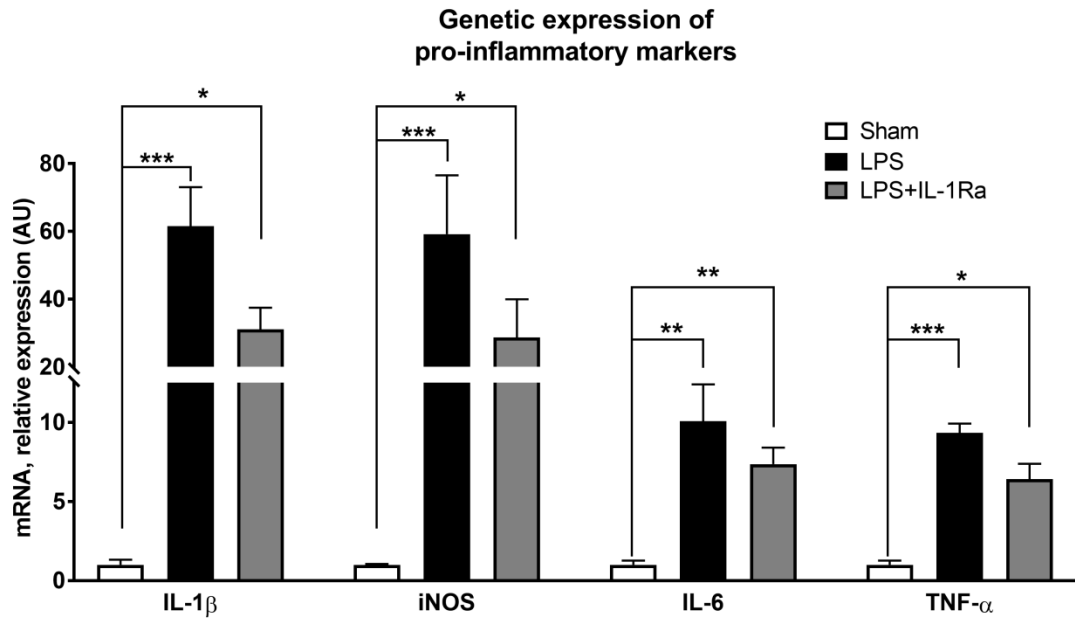




**Figure 6**

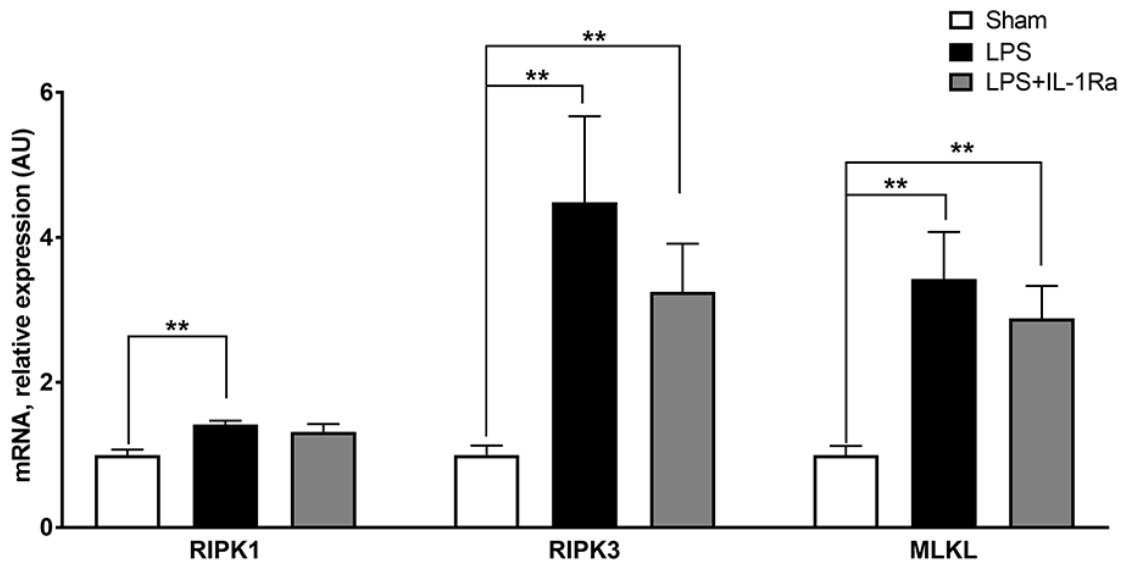


**Figure 7**



**Figure 8**

**Genetic expression of  
necroptosis regulatory protein**



# **Chapitre IV : Modulatory effect of IL-1 inhibition following lipopolysaccharide-induced neuroinflammation in neonatal microglia and astrocytes**

**Authors:** Wyston C. Pierre <sup>1,2</sup>, Irène Londono<sup>1</sup>, Christiane Quiniou<sup>1</sup>, Sylvain Chemtob<sup>1,2,3</sup> and Gregory A. Lodygensky<sup>1,2</sup>

1. Sainte-Justine Hospital and Research Center, Department of Pediatrics, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

2. Department of Pharmacology and Physiology, Université de Montréal, Montréal, Canada.

3. Department of Pharmacology and Therapeutics, McGill University, Montréal, Canada

**Short title:** Modulatory role of IL-1 in LPS-induced gliosis

**Corresponding author:**

Gregory A. Lodygensky

Department of Pediatrics, NICU,

Sainte-Justine Hospital and Research Center,

3175 Chemin de la Côte Sainte-Catherine,

Montreal, QC, Canada H3T 1C5

[ga.lodygensky@umontreal.ca](mailto:ga.lodygensky@umontreal.ca)

**Number of tables:** 1

**Number of figures:** 6

**Word count:** 6718

**Key words:** Lipopolysaccharide, astrocyte activation, microglia activation, Interleukin 1, Interleukin 1 receptor antagonist

## Abstract

**Introduction :** Inflammation-induced white matter injury (WMI) in preterm infants is characterized by microglia activation, astrogliosis, oxidative stress and short- and long-term neurodevelopmental impairments. Microglia and astrocytes activation can be described under a broad spectrum of activation profile with extremes described as pro-inflammatory/neurotoxic (M1 microglia or A1 astrocyte) or anti-inflammatory/neuroprotective (M2 microglia or A2 astrocyte) in response to stimuli including lipopolysaccharide (LPS) and inflammatory cytokines such as interleukin 1 (IL-1). As IL-1 signalling pathway has been posited as a major driver of inflammation-induced perinatal WMI, our aim was to evaluate the contribution of IL-1 modulation in LPS-induced microglia and astrocyte activation profile in primary neonatal glial cell cultures.

**Methods:** Primary neonatal glial cell cultures, composed of astrocyte and microglia, were treated with LPS (100 ng/mL) for 8 h or 24 h. Two distinct IL-1 receptor antagonists, Rytvela or Kineret (1 µg/mL), were added simultaneously with LPS to respectively modulate or block IL-1 receptor activation. Medium was collected to measure levels of IL-1 $\beta$ . Cells were harvested to assess expression of markers related to pro- and anti-inflammatory microglia and astrocyte activation profiles, and antioxidant genes (HO-1 and NQO1).

**Results:** At 8 h, LPS exposure induced pro-(M1 and A1) and anti-inflammatory (M2 and A2) markers expression and inhibited antioxidant gene expression in microglia and astrocytes. By 24 h, continuous LPS exposure increased pro-inflammatory and neurotoxic microglial and astrocytic markers (M1 and A1), as well as antioxidant genes. Administration of IL-1 antagonists Rytvela and Kineret with continuous LPS exposure had modest effect on modulation of specific microglia and astrocyte activation pathways.

**Discussion/conclusion :** We show that LPS effects on *in vitro* neonatal glial cells are time-dependent eliciting a number of pro- and anti-inflammatory responses during the acute phase of inflammation (8 h), which evolves mostly towards pro-inflammatory and neurotoxic factors by 24 h of stimulation. Although LPS-induced inflammation led to abundant IL-1 expression, IL-1 inhibition had limited impact on modulation of microglia and astrocytes activation pathways *in*

*vitro*. Taken together, these results point toward a broad inflammatory state induced by LPS with multiple pathways activated simultaneously including pro-inflammatory cytokines and chemokines, and generation of oxidative stress.

# 1. Introduction

Prenatal and postnatal episodes of inflammation and infection are associated to increased risk of white matter injury (WMI) in the preterm infants [1, 2]. Inflammation in the preterm brain induces microglia activation, astrogliosis and generation of reactive oxygen and nitrogen species which are associated to neurotoxicity and enhanced risk of altered brain development and subsequent short- and long-term neurological impairments [2-4].

Following exposure to injury or inflammatory stimuli, microglia can be found on a continuum of activation states with the extremes characterized as M1 or pro-inflammatory microglia and M2 or anti-inflammatory microglia [5-7]. M1 microglia are associated with proinflammatory and neurotoxic functions while M2 is associated with immunomodulation, tissue repair and type 2 immune response [5, 8, 9]. Perinatal inflammation triggered by TLR-4 agonists such as relevant lipopolysaccharide (LPS) are associated to an imbalance of microglia phenotype favoring expression of M1-associated markers and subsequent increase in neurotoxicity [10, 11, 8].

Similar to the M1/M2 activation spectrum found in microglia, it was shown that astrocyte activation could adopt neurotoxic or neuroprotective phenotypes termed respectively A1 astrocytes and A2 astrocytes depending on the stimulus [12, 13]. The study of Zamanian et al., which studied the genetic profile of astrocytes, found that systemic injection of LPS in young mice induced A1 astrocytes while exposure to middle cerebral artery occlusion induced A2 astrocytes [12]. Furthermore, the presence of microglia is necessary to induce A1 astrocytes following LPS exposure both *in vivo* and *in vitro* via the production and secretion of interleukin 1 alpha (IL-1 $\alpha$ ), tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) and complement component 1 subcomponent q (C1q) [14]. So far, the majority of research on A1 and A2 astrocyte polarisation have focused in the aging brain and little is known on that mechanism in immature and neonatal brains.

Clinical and animal studies have implicated an important role for IL-1 pathway activation in LPS-induced inflammatory WMI and also in microglia activation toward M1 phenotype and astrogliosis [15-18]. Based on the proposed combined roles of microglia and astrocytes in *in vivo* inflammation and IL-1 contribution, we proceeded to dissect the latter by evaluating in combined glial culture the role of IL-1 in their TLR4-triggered activation. For this purpose, we utilized distinct IL-1 receptor (IL-1R) antagonists, specifically the IL-1RA (recombinant) Kineret<sup>®</sup> which

exerts orthosteric properties, and an established IL-1R modulator (Rytvela<sup>®</sup> [19]), since both have been shown to exert neuroprotective effects [20, 21, 19, 22, 23], to determine the contribution of IL-1 signaling (*in vitro*) in LPS-induced activation of combined neonatal microglia and astrocyte culture.



## **2. Materials and methods**

### **Animals :**

Pregnant Sprague-Dawley dams at gestational day 16 were obtained from Charles River Laboratories (Charles River, Canada). The animals had free access to water and food and were exposed to 12 hours light/dark cycles. All animal-handling procedures were approved by the Institutional Committee for Animal Care of CHU Sainte-Justine Research Center, following the recommendations of the Canadian Council of Animal Care. Pregnant rats were left undisturbed until they gave birth and their offspring were used to obtain primary mixed glial cells cultures.

### **Primary mixed glial cell culture :**

Primary cultures of mixed glial cells were prepared from 1 to 2 days-old Sprague-Dawley rats of both sexes as previously described [8, 24, 25], with minor adaptations. In brief, cerebral hemispheres were dissected (olfactory bulbs and meninges removed) in 0.1M PBS with 6% glucose (Sigma, catalogue No G8769) and 2% penicillin–streptomycin (PS ; Gibco, catalogue No 15140122). Subsequently, the hemispheres were cut into small pieces and mechanically dissociated. Afterward, the cells were cultured in low glucose Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium (DMEM; Gibco, catalogue No 11885084) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Wisent, catalogue No 080-150) and 0.1% PS. Media was changed every 7 days and cells were maintained at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> for all the experiments. Cells were seeded into 6 wells plates and treated when they reached confluency at day *in vitro* 14 (DIV14).

Cells were also seeded on coverslip in 24 wells plates to assess cell type found in mixed glial cells preparation. Immunolabeling was performed on fixed cells to evaluate the presence of microglia, astrocyte and neurons for ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba-1), glial fibrillary acidic protein (GFAP) and NeuN respectively. In these conditions, mixed glial cell cultures were mainly composed of astrocytes and microglia, while neurons were hardly detected (shown in Suppl. Fig. 1).

### **Treatment of cells :**

At DIV14, the culture media of mixed glial cells were replaced with serum-free media prior to onset of stimulation. Mixed glial cells were exposed to 100 ng/mL of lipopolysaccharides (LPS ;

*E. coli*, serotype 055:B5, Sigma, Oakville, ON, Canada) in serum-free DMEM or kept in culture in serum-free DMEM alone (control). LPS dose was chosen based on previous studies [10, 26, 27], and confirmed upon analysis of IL-1 $\beta$  released in the media at LPS concentration ranging from 1 to 1000 ng/mL (shown in Suppl. Fig. 2), revealing that maximum efficacy was attained as of 100 ng/mL. Mixed glial cells that were exposed to LPS were further separated into 3 groups for subsequent treatments: LPS alone, LPS with Rytvela (1  $\mu$ g/mL ; Elim Biopharmaceuticals, Hayward, California) and LPS with Kineret (1  $\mu$ g/mL ; Kineret-Anakinra, Amgen, Thousand Oaks, CA, USA) for 8 h or 24 h. After 8 h and 24 h of exposure, the supernatants were collected to perform IL-1 $\beta$  ELISA and the cells were harvested for RNA extraction to perform gene expression analysis and for protein extraction to assess cytokine level.

#### **RNA extraction and quantification of gene expression by qPCR:**

Total RNA was extracted from combined glial cells using TRIzol reagent (Invitrogen, Thermo Scientific Canada, Montreal, Canada) according to the manufacturer's instructions. RNA quality and concentration were assessed by spectrophotometry using the Nanodrop 1000 spectrophotometer apparatus (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). Total RNA (0,5  $\mu$ g) was subjected to reverse transcription using the iScript<sup>TM</sup> cDNA synthesis kit (Bio-Rad, Ontario, Canada). RT-qPCR was performed in duplicate for each sample using SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Ontario, Canada) for 40 cycles with a 3-step program (20s of denaturation at 95 $^{\circ}$ C, 30s of annealing at 58 $^{\circ}$ C and 30s of extension at 72 $^{\circ}$ C) on Lightcycler 96 machine (Roche Molecular Systems, Mannheim, Germany) [28, 29]. Amplification specificity was assessed with a melting curve analysis. Primers were designed to have a  $T_m \approx 60$   $^{\circ}$ C and to span exon/exon boundaries using the Primer-BLAST tool (NCBI/NIH from the National Library of Medicine, Bethesda, USA) [30]. Primer were synthesized by BioCorp (Montreal, Canada). The sequences of the primers used are provided in Table 1. The fold-change expression was determined by the comparative cycle threshold (CT) method ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) and normalized to the housekeeping genes GAPDH and RSP29.

#### **Protein extraction procedure and Multiplex cytokine assay:**

Whole cell lysate of mixed glial cells was prepared in lysis buffer (RIPA buffer with protease inhibitor cocktail and PMSF added) and cleared from cellular debris by centrifugation (10,000 g for 15 min at 4 $^{\circ}$ C). Supernatants were collected and protein concentration, used to

normalize cytokine data, was determined by Bradford assay (Bio-Rad, Ontario, Canada). Levels of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ , and IL-10 were measured with a custom rat ProcartaPLex 4-Plex (Thermo Fisher Scientific Cat. No. PPX-04-MXH6AKR) following manufacturer's instructions. All samples were run in duplicates on the Luminex xMAP/Autoplex Analyser CS1000 system (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) and data was analysed with the Luminex system software.

#### **IL-1 $\beta$ ELISA:**

The media from mixed glial cells was collected at 8 h and 24 h and briefly centrifuged to remove particles (1,000 RPM for 10min). Level of IL-1 $\beta$  released by the combined glial cells in the supernatant was measured with a rat IL-1 $\beta$  DuoSet ELISA assay (R&D Systems, MN, USA). All samples were run in duplicates and measured on the CLARIOstar microplate reader (BMG LABTECH Inc., Cary, NC, USA).

#### **Statistics:**

All statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 8.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). All data are presented as mean  $\pm$  SEM. Statistical significance was set at a p-value below 0.05.

### 3. Results

#### **LPS-induced expression changes in astrocyte-related phenotype markers at 8 and 24 h in combined glial cells**

Our first aim was to determine changes in astrocyte phenotypes in combined glial cells following treatment with LPS in presence or absence of Rytvela or Kineret. Genes chosen to characterize A1 (Amigo2, C3 and Serping1) and A2 (CD109, EMP1 and S100A10) astrocytes were based on their specificity for each phenotype as shown in previous articles [12, 14, 34, 35]. After 8 h stimulation with LPS, the expression of the three A1-associated markers Amigo2, C3 and Serping1 (shown in Fig. 1A-C) and of A2-associated marker EMP1 and S100A10 (shown in Fig. 1E-F) was induced in combined glial cells; while expression of A2-associated marker CD109 was inhibited (shown in Fig. 1D). Overall treatment with Rytvela and Kineret did not affect changes induced by LPS, excepting Amigo2 that had a tendency to decrease in presence of Kineret that reached statistically significance with Rytvela and significant decrease of EMP1 by Kineret.

At 24 h of LPS stimulation, the expression of the three A1-associated markers was still elevated following LPS treatment compared to control (shown in Fig. 2A-C), while A2 markers were generally decreased. Compared to the expression at 8 h, the fold-change of the three A2-associated markers decreased (shown in Fig. 1D-F and Fig. 2D-F). Rytvela and Kineret did not affect expression of most A1 and A2 markers, with the exception of A2 marker S100A10 marker which had a tendency to increase upon Rytvela and reached statistically significance with Kineret (shown in Fig. 1F). Thus, continuous exposure to LPS (100ng/mL) modulated astrocyte activation toward A1 profile.

#### **LPS induced M1 and M2 microglial makers at 8 h in combined glial cells**

We then looked at M1 and M2 phenotypes of combined glial cells following treatment with LPS alone or in presence of Rytvela or Kineret. The genes chosen to characterize M1 (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  and iNOS) and M2 (IL-10 and arginase 1) microglia polarisation were based on their specificity for each phenotype as established in previous studies [8, 24].

After 8 h of LPS exposure (100 ng/mL), genetic expression of the M1 markers (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  and iNOS) and M2 markers (IL-10, arginase 1) was increased (shown in Fig. 3A-F); the

increase in M1 markers was superior to that of M2 ones. Kineret and Rytvela did not modify changes induced by LPS other than causing a decrease in iNOS by Kineret and in IL-10 by Rytvela (shown in Fig. 3).

### **LPS induced a M1 microglia phenotype at 24 h in combined glial cells**

At 24 h, combined glial cells exposed to LPS (100 ng/ml) had significantly increased genetic expression of M1 markers (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  and iNOS) compared to control (shown in Fig. 4A-D) and relative IL-1 $\beta$  expression increased from 8 h to 24 h (shown in Fig.3A and Fig. 4A). Whereas compared to control, M2 markers expression did not change significantly with 24h of LPS exposure (shown in Fig. 4E-F). In fact, the relative expression of M2 markers decreased from 8 h to 24 h of LPS exposure (shown in Fig. 3E-F and Fig. 4E-F). Thus, combined glial cells exposed to LPS for 24 h acquire a pro-inflammatory profile characterized by increased M1 markers (notably IL-1 $\beta$ ) compared to ‘anti-inflammatory’ M2 markers. Kineret and Rytvela did not affect expression of any markers induced by LPS.

We also determined the protein expression of inflammatory markers. There was a very robust increase in intracellular (shown in Fig. 5A) and released IL-1 $\beta$  at both 8 and 24 h (shown in Suppl. Fig. 3). IL-6 was undetectable. TNF $\alpha$  was also increased at 24 h after LPS ; but IL-10 was not significantly changed (shown in Fig. 5B,C). Consistent with mRNA data, Rytvela and Kineret did not affect examined inflammatory protein expression.

### **LPS induced a rapid biphasic antioxidative response in combined glial cells**

An intrinsic element associated with inflammation is oxidative stress. We determined the effect of LPS on expression of antioxidant genes NQO1 and HO-1 that are regulated by Nrf2 [36-38]. At 8 h after LPS, NQO1 expression decreased and a tendency was also observed for HO-1 mRNA (shown in Fig. 6 A-B); whereas by 24 h, both NQO1 and HO-1 increased (shown in Fig. 6C-D). Rytvela and Kineret did not significantly affect their expression induced by LPS.

## 4. Discussion/conclusion

To dissect out the contribution of IL-1 in LPS-induced activation of microglia and astrocytes, these cells were isolated and cultured in absence or presence of distinct IL-1R inhibitors. We found that during early phase (8 h) of LPS stimulation both M1/M2 and A1/A2 markers were induced; and by 24 h there was a clear predominance of pro-inflammatory and neurotoxic M1 and A1 markers, associated with expression of antioxidant genes. These observations are consistent with those reported on LPS effects on microglia and astrocyte polarization [12, 8, 39, 14, 40]; the same applies to effects of LPS on anti-oxidant Nrf2-dependent genes expression [41, 42]. Following a robust increase in IL-1 induced by LPS exposure, it was not possible to shift the balance toward M2 and A2 response using 2 distinct IL-1R inhibitors.

A relevant component in this study is that although LPS induced an astrocytic profile with mixed increase in A1 and A2 markers during the early phase of inflammation, long-lasting exposure to LPS resulted in polarization toward A1 astrocyte profile. A1 astrocytes are known to induce synaptic loss through upregulation of complement cascade genes and also neuronal and oligodendrocyte death via the production of astrocyte-derived neurotoxins that have yet to be identified [12, 14, 40]. As A2 astrocytic activation is described as neuroprotective, the decrease in A2 markers in our study further support the detrimental phenotype of LPS-activated astrocytes [12, 14]. Among the A2-associated markers studied, CD109 was the earliest marker to be inhibited and had sustained inhibition up to 24 h. Although CD109 role is poorly understood in physiological and pathological conditions, it was shown that CD109 is associated to epidermal growth factor (EGF) signaling, partakes in wound healing process and is also a negative regulator of transforming growth factor beta 1 (TGF- $\beta$ 1) signal [43-46] which are known to partake in different developmental processes including myelination, oligodendrocyte maturation and synaptogenesis [47-50]. Furthermore, the other markers of A2 astrocyte are also associated to neuroprotective effects. S100A10, also known as p11, is known to play a role in membrane repair, cellular proliferation and protection against apoptosis [51, 52] and EMP1 is involved in blood-brain barrier tight junction and regulation of cell cycle [53, 12, 54]. Over time, LPS induces astrocyte activation profile that is potentially neurotoxic and lacks trophic support functions in conjunction with that of pro-inflammatory M1 microglia.

We found that IL-1 $\beta$  induction was higher at both gene and protein levels compared to TNF $\alpha$  or IL-10 at both 8 h and 24 h of LPS exposure. Similar results were also seen previously in *in vivo* and *in vitro* animal studies of LPS-induced inflammation and neonatal WMI [55, 56, 33, 57, 29]. Knowing that IL-1 signalling is posited as a major key player in neonatal WMI, we looked at its implication in the setting of LPS-induced inflammation by targeting IL-1R signaling with Rytvela (NF $\kappa$ B-independent antagonist) or Kineret (competitive antagonist). Although IL-1 $\beta$  had the highest concentration among the cytokines measured, its inhibition did not realign glial reaction toward a strong anti-inflammatory profile (M2 and A2). Among the different markers assessed, IL-1 signaling was shown to particularly partake in iNOS expression early after LPS stimulation. We noted that treatment with Kineret but not Rytvela at 8 h decreased iNOS expression fold change. Similarly, previous studies in primary microglial and astrocytic cell cultures showed an implication of IL-1 signalling in iNOS expression and activity [58-60]. The discrepancy observed here between Rytvela and Kineret further highlight the fact that iNOS expression depend partly of NF $\kappa$ B activation as Rytvela does not block this downstream effector in IL-1R signal [61, 59, 19].

The lack of more robust immunomodulation properties of two distinct IL-1R inhibitors on isolated microglia and astrocytes could reflect the fact that LPS induces a broader inflammatory reaction that implicates multiple inflammatory mediators [62-64, 8]. These complex interactions have been shown to require structured interaction between neuronal, glial and endothelial cells in the brain [60, 65] that induce feedforward retroaction loops amplifying inflammatory response to LPS and different cytokines including IL-1 [40, 66, 65, 67]. For example, LPS have been shown to activate microglia and endothelial cells which releases inflammatory mediators including cytokines and chemokines that activates in autocrine and/or paracrine manner other cells including astrocytes and this leads to strengthened cellular interactions in establishment of a neurotoxic state [68, 69, 67]. We have previously shown that LPS led to long-term alteration of the brain methylome by producing broad methylation changes in more than 500 genes of different pathways related to inflammation and neurodevelopment [70] and this could result from synergistic effect of simultaneous and sustained activation of different downstream effectors and mediators. This concept has been proposed by others that showed that, although IL-1 $\alpha$  is able to induce the expression of A1-related genes, it is the combined action of IL-1 $\alpha$ , TNF $\alpha$  and C1q that played a major role in LPS-induced astrocytic activation [14], as other cytokines such as TNF $\alpha$  contribute to neuroinflammation and neurotoxicity [71, 72, 8, 57, 73, 74]. Furthermore, LPS broad activation

pattern is also seen in systemic inflammation as illustrated with the need of simultaneous blockade of IL-1 and IL-18 to exert beneficial effect in septic shock mice models including LPS-induced models [75]. In human, clinical trials showed that administration of recombinant human IL-1 receptor antagonist (rhIL-1Ra) did not improve significantly survival at 28 days compared to placebo in adult suffering from severe sepsis and/or septic shock except in a small subset of patient suffering from sepsis with secondary macrophage activation syndrome [76-78]. Thus, although IL-1 partakes in LPS-induced inflammatory response, its inhibition alone might not be sufficient to modulate microglial and astrocytic activation in a context of sustained LPS exposure.

In conclusion, although IL-1 is abundantly present, its inhibition is not sufficient to increase A2 and M2 profiles during sustained LPS exposure in primary neonatal combined glial cell cultures. Broad inhibitors of inflammation may be preferable in acute phases of inflammation, while more specific inhibitors should be reserved for later phases, in order to preserve necessary mechanisms crucial normal neurodevelopmental process.



### **Acknowledgment**

We would like to acknowledge the help of Chantal Richer from Dr Sinett's laboratory, at the Research Center of CHU Sainte-Justine, for running the Multiplex cytokine assay. We would like to thank Dr. Jean-Claude Lavoie at the Research Center of CHU Sainte-Justine on assessment of Nrf2 dependent response.

### **Conflict of interest:**

The authors declare no competing financial interests.

### **Funding sources:**

This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (<http://www.cihr-irsc.gc.ca/>) – Institute of Human Development, Child and Youth Health (IHDCYH), Canada (Grant #136 908 to G.A.L.). G.A.L. is supported by a start-up grant from the Research Center of CHU Sainte-Justine and the Fonds de recherche du Québec – Santé (FRQS). S Chemtob holds a Canada Research Chair and the Leopoldine Wolfe Chair in macular degeneration.

### **Author Contributions:**

Wyston Pierre participated in data acquisition, data analysis, and manuscript draft, reviewed and revised the manuscript. Irène Londono and Christiane Quiniou contributed to the study preparation, data acquisition and manuscript preparation. Sylvain Chemtob has participated in the conceptualization of the study and revised the manuscript. Gregory Anton Lodygensky conceptualized and designed the study, contributed to data acquisition, supervised the data analysis, and revised the manuscript.

## References

1. Khwaja O, Volpe JJ. Pathogenesis of cerebral white matter injury of prematurity. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2008 Mar;93(2):F153-61.
2. Hagberg H, Mallard C, Ferriero DM, Vannucci SJ, Levison SW, Vexler ZS, et al. The role of inflammation in perinatal brain injury. *Nat Rev Neurol.* 2015 Apr;11(4):192-208.
3. Jin C, Londono I, Mallard C, Lodygensky GA. New means to assess neonatal inflammatory brain injury. *J Neuroinflammation.* 2015 ; 12 (1) : 180.
4. Back SA. White matter injury in the preterm infant: pathology and mechanisms. *Acta Neuropathol.* 2017 May 22.
5. Colton CA. Heterogeneity of microglial activation in the innate immune response in the brain. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2009 Dec;4(4):399-418.
6. Olah M, Biber K, Vinet J, Boddeke HW. Microglia phenotype diversity. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2011 Feb;10(1):108-18.
7. Eggen BJ, Raj D, Hanisch UK, Boddeke HW. Microglial phenotype and adaptation. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2013 Sep ; 8 (4) : 807-23.
8. Chhor V, Le Charpentier T, Lebon S, Oré M-V, Celador IL, Josserand J, et al. Characterization of phenotype markers and neuronotoxic potential of polarised primary microglia in vitro. *Brain Behav Immun.* 2013 8//;32(0):70-85.
9. Pierre WC, Smith PL, Londono I, Chemtob S, Mallard C, Lodygensky GA. Neonatal microglia: The cornerstone of brain fate. *Brain Behav Immun.* 2016 Sep 3.
10. Lehnardt S, Lachance C, Patrizi S, Lefebvre S, Follett PL, Jensen FE, et al. The toll-like receptor TLR4 is necessary for lipopolysaccharide-induced oligodendrocyte injury in the CNS. *J Neurosci.* 2002 Apr 1;22(7):2478-86.
11. Lehnardt S, Massillon L, Follett P, Jensen FE, Ratan R, Rosenberg PA, et al. Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Jul 8;100(14):8514-9.
12. Zamanian JL, Xu L, Foo LC, Nouri N, Zhou L, Giffard RG, et al. Genomic analysis of reactive astrogliosis. *J Neurosci.* 2012 May 2 ; 32 (18) : 6391-410.
13. Liddelow SA, Barres BA. Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential. *Immunity.* 2017 Jun 20;46(6):957-67.

14. Liddelow SA, Guttenplan KA, Clarke LE, Bennett FC, Bohlen CJ, Schirmer L, et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*. 2017 Jan 26 ; 541 (7638) : 481-87.
15. Cai Z, Pang Y, Lin S, Rhodes PG. Differential roles of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta in lipopolysaccharide-induced brain injury in the neonatal rat. *Brain Res*. 2003 Jun 13;975(1-2):37-47.
16. Girard S, Kadhim H, Larouche A, Roy M, Gobeil F, Sebire G. Pro-inflammatory disequilibrium of the IL-1 beta/IL-1ra ratio in an experimental model of perinatal brain damages induced by lipopolysaccharide and hypoxia-ischemia. *Cytokine*. 2008 Jul;43(1):54-62.
17. Girard S, Sebire G, Kadhim H. Proinflammatory orientation of the interleukin 1 system and downstream induction of matrix metalloproteinase 9 in the pathophysiology of human perinatal white matter damage. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2010 Nov;69(11):1116-29.
18. Favrais G, van de Looij Y, Fleiss B, Ramanantsoa N, Bonnin P, Stoltenburg-Didinger G, et al. Systemic inflammation disrupts the developmental program of white matter. *Ann Neurol*. 2011 Oct ; 70 (4) : 550-65.
19. Nadeau-Vallee M, Quiniou C, Palacios J, Hou X, Erfani A, Madaan A, et al. Novel Noncompetitive IL-1 Receptor-Biased Ligand Prevents Infection- and Inflammation-Induced Preterm Birth. *J Immunol*. 2015 Oct 1 ; 195 (7) : 3402-15.
20. Girard S, Sebire H, Brochu ME, Briota S, Sarret P, Sebire G. Postnatal administration of IL-1Ra exerts neuroprotective effects following perinatal inflammation and/or hypoxic-ischemic injuries. *Brain Behav Immun*. 2012 Nov;26(8):1331-9.
21. Savard A, Lavoie K, Brochu ME, Grbic D, Lepage M, Gris D, et al. Involvement of neuronal IL-1beta in acquired brain lesions in a rat model of neonatal encephalopathy. *J Neuroinflammation*. 2013 Sep 5 ; 10:110.
22. Savard A, Brochu ME, Chevin M, Guiraut C, Grbic D, Sebire G. Neuronal self-injury mediated by IL-1beta and MMP-9 in a cerebral palsy model of severe neonatal encephalopathy induced by immune activation plus hypoxia-ischemia. *J Neuroinflammation*. 2015 ; 12:111.
23. Nadeau-Vallee M, Chin PY, Belarbi L, Brien ME, Pundir S, Berryer MH, et al. Antenatal Suppression of IL-1 Protects against Inflammation-Induced Fetal Injury and Improves Neonatal and Developmental Outcomes in Mice. *J Immunol*. 2017 Mar 01;198(5):2047-62.
24. Girard S, Brough D, Lopez-Castejon G, Giles J, Rothwell NJ, Allan SM. Microglia and macrophages differentially modulate cell death after brain injury caused by oxygen-glucose deprivation in organotypic brain slices. *Glia*. 2013 May;61 (5) : 813-24.
25. Kobayashi K, Imagama S, Ohgomori T, Hirano K, Uchimura K, Sakamoto K, et al. Minocycline selectively inhibits M1 polarization of microglia. *Cell Death Dis*. 2013 03/07/online ; 4 : e525.

26. Lehnardt S, Schott E, Trimbuch T, Laubisch D, Krueger C, Wulczyn G, et al. A vicious cycle involving release of heat shock protein 60 from injured cells and activation of toll-like receptor 4 mediates neurodegeneration in the CNS. *J Neurosci*. 2008 Mar 5;28(10):2320-31.
27. Nair S, Sobotka KS, Joshi P, Gressens P, Fleiss B, Thornton C, et al. Lipopolysaccharide-induced alteration of mitochondrial morphology induces a metabolic shift in microglia modulating the inflammatory response in vitro and in vivo. *Glia*. 2019 Jun;67(6):1047-61.
28. Demina EP, Pierre WC, Nguyen ALA, Londono I, Reiz B, Zou C, et al. Persistent reduction in sialylation of cerebral glycoproteins following postnatal inflammatory exposure. *J Neuroinflammation*. 2018 Dec 5;15(1):336.
29. Pierre WC, Akakpo L, Londono I, Pouliot P, Chemtob S, Lesage F, et al. Assessing therapeutic response non-invasively in a neonatal rat model of acute inflammatory white matter injury using high-field MRI. *Brain Behav Immun*. 2019 Oct ; 81:348-60.
30. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST : a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. 2012;13:134-34.
31. Qian D, Li L, Rong Y, Liu W, Wang Q, Zhou Z, et al. Blocking Notch signal pathway suppresses the activation of neurotoxic A1 astrocytes after spinal cord injury. *Cell Cycle*. 2019 Nov;18(21):3010-29.
32. Wang H, Nagai A, Sheikh AM, Liang XY, Yano S, Mitaki S, et al. Human mesenchymal stem cell transplantation changes proinflammatory gene expression through a nuclear factor-kappaB-dependent pathway in a rat focal cerebral ischemic model. *J Neurosci Res*. 2013 Nov;91(11):1440-9.
33. Lodygensky GA, Kunz N, Perroud E, Somm E, Mlynarik V, Huppi PS, et al. Definition and quantification of acute inflammatory white matter injury in the immature brain by MRI/MRS at high magnetic field. *Pediatr Res*. 2014 Mar;75(3):415-23.
34. Shio LR, Favrais G, Schirmer L, Schang AL, Cipriani S, Andres C, et al. Reactive astrocyte COX2-PGE2 production inhibits oligodendrocyte maturation in neonatal white matter injury. *Glia*. 2017 Dec;65(12):2024-37.
35. Clark DPQ, Perreau VM, Shultz SR, Brady RD, Lei E, Dixit S, et al. Inflammation in Traumatic Brain Injury: Roles for Toxic A1 Astrocytes and Microglial-Astrocytic Crosstalk. *Neurochem Res*. 2019 Jun;44(6):1410-24.
36. Joshi G, Johnson JA. The Nrf2-ARE pathway: a valuable therapeutic target for the treatment of neurodegenerative diseases. *Recent Pat CNS Drug Discov*. 2012 Dec;7(3):218-29.

37. Li C, Yang F, Liu F, Li D, Yang T. NRF2/HO-1 activation via ERK pathway involved in the anti-neuroinflammatory effect of Astragaloside IV in LPS induced microglial cells. *Neurosci Lett*. 2018 Feb 14;666:104-10.
38. Wang Y, Zhao CS. Sigma-1 receptor activation ameliorates LPS-induced NO production and ROS formation through the Nrf2/HO-1 signaling pathway in cultured astrocytes. *Neurosci Lett*. 2019 Oct 15 ; 711:134387.
39. Cunha C, Gomes C, Vaz AR, Brites D. Exploring New Inflammatory Biomarkers and Pathways during LPS-Induced M1 Polarization. *Mediators Inflamm*. 2016;2016:6986175.
40. Joshi AU, Minhas PS, Liddel SA, Haileselassie B, Andreasson KI, Dorn GW, 2nd, et al. Fragmented mitochondria released from microglia trigger A1 astrocytic response and propagate inflammatory neurodegeneration. *Nat Neurosci*. 2019 Oct ; 22 (10) : 1635-48.
41. Correa F, Ljunggren E, Mallard C, Nilsson M, Weber SG, Sandberg M. The Nrf2-inducible antioxidant defense in astrocytes can be both up- and down-regulated by activated microglia: Involvement of p38 MAPK. *Glia*. 2011 May;59 (5) : 785-99.
42. Correa F, Ljunggren E, Patil J, Wang X, Hagberg H, Mallard C, et al. Time-dependent effects of systemic lipopolysaccharide injection on regulators of antioxidant defence Nrf2 and PGC-1alpha in the neonatal rat brain. *Neuroimmunomodulation*. 2013;20(4):185-93.
43. Bizet AA, Liu K, Tran-Khanh N, Saksena A, Vorstenbosch J, Finnson KW, et al. The TGF- $\beta$  co-receptor, CD109, promotes internalization and degradation of TGF- $\beta$  receptors. *Biochim Biophys Acta*. 2011 May;1813 (5) : 742-53.
44. Bizet AA, Tran-Khanh N, Saksena A, Liu K, Buschmann MD, Philip A. CD109-mediated degradation of TGF- $\beta$  receptors and inhibition of TGF- $\beta$  responses involve regulation of SMAD7 and Smurf2 localization and function. *J Cell Biochem*. 2012 Jan;113 (1) : 238-46.
45. Vorstenbosch J, Gallant-Behm C, Trzeciak A, Roy S, Mustoe T, Philip A. Transgenic mice overexpressing CD109 in the epidermis display decreased inflammation and granulation tissue and improved collagen architecture during wound healing. *Wound Repair Regen*. 2013 Mar-Apr;21(2):235-46.
46. Zhang JM, Murakumo Y, Hagiwara S, Jiang P, Mii S, Kalyoncu E, et al. CD109 attenuates TGF- $\beta$ 1 signaling and enhances EGF signaling in SK-MG-1 human glioblastoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015 Apr 3;459(2):252-58.
47. Nobuta H, Ghiani CA, Paez PM, Spreuer V, Dong H, Korsak RA, et al. STAT3-mediated astrogliosis protects myelin development in neonatal brain injury. *Ann Neurol*. 2012 Nov;72(5):750-65.
48. Bialas AR, Stevens B. TGF-beta signaling regulates neuronal C1q expression and developmental synaptic refinement. *Nat Neurosci*. 2013 Dec;16(12):1773-82.

49. Vinukonda G, Hu F, Mehdizadeh R, Dohare P, Kidwai A, Juneja A, et al. Epidermal growth factor preserves myelin and promotes astrogliosis after intraventricular hemorrhage. *Glia*. 2016;64(11):1987-2004.
50. Yang J, Cheng X, Qi J, Xie B, Zhao X, Zheng K, et al. EGF Enhances Oligodendrogenesis from Glial Progenitor Cells. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2017 2017-April-11 ; 10 (106).
51. Fujita A, Yamaguchi H, Yamasaki R, Cui Y, Matsuoka Y, Yamada K-i, et al. Connexin 30 deficiency attenuates A2 astrocyte responses and induces severe neurodegeneration in a 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine hydrochloride Parkinson's disease animal model. *J Neuroinflammation*. 2018 2018/08/13 ; 15 (1) : 227.
52. Li T, Chen X, Zhang C, Zhang Y, Yao W. An update on reactive astrocytes in chronic pain. *J Neuroinflammation*. 2019 2019/07/09 ; 16 (1) : 140.
53. Bangsow T, Baumann E, Bangsow C, Jaeger MH, Pelzer B, Gruhn P, et al. The Epithelial Membrane Protein 1 is a Novel Tight Junction Protein of the Blood—Brain Barrier. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2008 2008/06/01;28(6):1249-60.
54. Magistri M, Khoury N, Mazza EMC, Velmeshev D, Lee JK, Biciato S, et al. A comparative transcriptomic analysis of astrocytes differentiation from human neural progenitor cells. *Eur J Neurosci*. 2016 2016/11/01;44(10):2858-70.
55. Pang Y, Cai Z, Rhodes PG. Disturbance of oligodendrocyte development, hypomyelination and white matter injury in the neonatal rat brain after intracerebral injection of lipopolysaccharide. *Brain Res Dev Brain Res*. 2003 Feb 16;140(2):205-14.
56. Fan LW, Pang Y, Lin S, Rhodes PG, Cai Z. Minocycline attenuates lipopolysaccharide-induced white matter injury in the neonatal rat brain. *Neuroscience*. 2005 ; 133 (1) : 159-68.
57. Lively S, Schlichter LC. Microglia Responses to Pro-inflammatory Stimuli (LPS, IFN $\gamma$ +TNF $\alpha$ ) and Reprogramming by Resolving Cytokines (IL-4, IL-10). *Front Cell Neurosci*. 2018 ; 12:215.
58. Akama KT, Van Eldik LJ. Beta-amyloid stimulation of inducible nitric-oxide synthase in astrocytes is interleukin-1 $\beta$ - and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ )-dependent, and involves a TNF $\alpha$  receptor-associated factor- and NF $\kappa$ B-inducing kinase-dependent signaling mechanism. *J Biol Chem*. 2000 Mar 17;275(11):7918-24.
59. Ferreira R, Xapelli S, Santos T, Silva AP, Cristóvão A, Cortes L, et al. Neuropeptide Y modulation of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )-induced nitric oxide production in microglia. *J Biol Chem*. 2010 Dec 31;285(53):41921-34.
60. Krasnow SM, Knoll JG, Verghese SC, Levasseur PR, Marks DL. Amplification and propagation of interleukin-1 $\beta$  signaling by murine brain endothelial and glial cells. *J Neuroinflammation*. 2017 Jul 1;14(1):133.

61. Aktan F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci.* 2004 2004/06/25/;75(6):639-53.
62. Kaushik DK, Gupta M, Das S, Basu A. Krüppel-like factor 4, a novel transcription factor regulates microglial activation and subsequent neuroinflammation. *J Neuroinflammation.* 2010 Oct 15 ; 7:68.
63. Schwarz JM, Bilbo SD. LPS elicits a much larger and broader inflammatory response than *Escherichia coli* infection within the hippocampus of neonatal rats. *Neurosci Lett.* 2011 Jun 22;497(2):110-5.
64. Sheng W, Zong Y, Mohammad A, Ajit D, Cui J, Han D, et al. Pro-inflammatory cytokines and lipopolysaccharide induce changes in cell morphology, and upregulation of ERK1/2, iNOS and sPLA<sub>2</sub>-IIA expression in astrocytes and microglia. *J Neuroinflammation.* 2011 Sep 24 ; 8:121.
65. Zhu L, Liu X, Nemeth DP, DiSabato DJ, Witcher KG, McKim DB, et al. Interleukin-1 causes CNS inflammatory cytokine expression via endothelia-microglia bi-cellular signaling. *Brain Behav Immun.* 2019 Oct ; 81:292-304.
66. Liu X, Nemeth DP, McKim DB, Zhu L, DiSabato DJ, Berdysz O, et al. Cell-Type-Specific Interleukin 1 Receptor 1 Signaling in the Brain Regulates Distinct Neuroimmune Activities. *Immunity.* 2019 2019/03/19/;50(3):764-66.
67. Goshi N, Morgan RK, Lein PJ, Seker E. A primary neural cell culture model to study neuron, astrocyte, and microglia interactions in neuroinflammation. *J Neuroinflammation.* 2020 2020/05/11 ; 17 (1) : 155.
68. Verma S, Nakaoke R, Dohgu S, Banks WA. Release of cytokines by brain endothelial cells: A polarized response to lipopolysaccharide. *Brain Behav Immun.* 2006 Sep ; 20 (5) : 449-55.
69. Bowyer JF, Sarkar S, Burks SM, Hess JN, Tolani S, O'Callaghan JP, et al. Microglial activation and responses to vasculature that result from an acute LPS exposure. *Neurotoxicology.* 2020 Mar;77:181-92.
70. Pierre WC, Legault LM, Londono I, McGraw S, Lodygensky GA. Alteration of the brain methylation landscape following postnatal inflammatory injury in rat pups. *FASEB J.* 2020 Jan;34(1):432-45.
71. Pang Y, Cai Z, Rhodes PG. Effect of tumor necrosis factor-alpha on developing optic nerve oligodendrocytes in culture. *J Neurosci Res.* 2005 Apr 15;80(2):226-34.
72. Cui M, Huang Y, Tian C, Zhao Y, Zheng J. FOXO3a inhibits TNF- $\alpha$ - and IL-1 $\beta$ -induced astrocyte proliferation: Implication for reactive astrogliosis. *Glia.* 2011 Apr;59(4):641-54.

73. Hyvärinen T, Hagman S, Ristola M, Sukki L, Veijula K, Kreutzer J, et al. Co-stimulation with IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  induces an inflammatory reactive astrocyte phenotype with neurosupportive characteristics in a human pluripotent stem cell model system. *Scientific Reports*. 2019 2019/11/15;9(1):16944.
74. Brás JP, Bravo J, Freitas J, Barbosa MA, Santos SG, Summavielle T, et al. TNF-alpha-induced microglia activation requires miR-342: impact on NF-kB signaling and neurotoxicity. *Cell Death Dis*. 2020 Jun 2;11(6):415.
75. Vanden Berghe T, Demon D, Bogaert P, Vandendriessche B, Goethals A, Depuydt B, et al. Simultaneous targeting of IL-1 and IL-18 is required for protection against inflammatory and septic shock. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014 Feb 1;189(3):282-91.
76. Fisher CJ, Jr., Dhainaut JF, Opal SM, Pribble JP, Balk RA, Slotman GJ, et al. Recombinant human interleukin 1 receptor antagonist in the treatment of patients with sepsis syndrome. Results from a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Phase III rhIL-1ra Sepsis Syndrome Study Group. *JAMA*. 1994 Jun 15;271(23):1836-43.
77. Opal SM, Fisher CJ, Jr., Dhainaut JF, Vincent JL, Brase R, Lowry SF, et al. Confirmatory interleukin-1 receptor antagonist trial in severe sepsis: a phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial. The Interleukin-1 Receptor Antagonist Sepsis Investigator Group. *Crit Care Med*. 1997 Jul;25(7):1115-24.
78. Shakoory B, Carcillo JA, Chatham WW, Amdur RL, Zhao H, Dinarello CA, et al. Interleukin-1 Receptor Blockade Is Associated With Reduced Mortality in Sepsis Patients With Features of Macrophage Activation Syndrome: Reanalysis of a Prior Phase III Trial. *Crit Care Med*. 2016 Feb;44(2):275-81.



## Tables du chapitre IV

**Table 1.** List of primer used for gene expression analysis

<b>Gene</b>	<b>Forward (F) and Reverse (R) primer sequence</b>	<b>Ref.</b>
Amigo2	F-5'-GTTCGCCACAACAACATCAC-3' R-5'-GTTTCTGCAAGTGGGAGAGC-3'	(558)
GAPDH	F-5'-AAGGTCGGTGTGAACGGATT-3' R-5'-TGAACTTGCCGTGGGTAGAG-3'	(559)
IL-1 $\beta$	F-5'-GGCAACTGTCCCTGAACTCAA-3' R-5'-GCCTCAAAGAACAGGTCATTCTC-3'	(559)
IL-6	F-5'-TCCTACCCCAACTTCCAATGC-3' R-5'-TAGCACACTAGGTTTGCCGAG-3'	(559)
IL-10	F-5'-CAGAGAACCATGGCCCAGAA-3' R-5'-CAGCTGTATCCAGAGGGTCTTCA-3'	(560)
iNOS	F-5'-GAGTGAGGAGCAGGTTGAGGATTAC-3' R-5'-AGGAAAAGACCCGCACCGAAG-3'	(559)
RSP29	F-5'-GCCAGGGTTCTCGCTCTTG-3' R-5'-GGCACATGTTTCAGCCCGTAT-3'	(347)
TNF- $\alpha$	F-5'-CTATGTGCTCCTCACCCACA-3' R-5'-TGGAAGACTCCTCCCAGGTA-3'	(559)
<b>Gene</b>	<b>Forward (F) and Reverse (R) primer sequence</b>	<b>Accession No</b>
Arginase 1	F-5'-GGACATCGTGTACATCGGCT-3' R-5'-GTAGCCGGGGTGAATACTGG-3'	NM_017134.3
C3	F-5'-ATCGAGGATGGTTCAGGGGA-3' R-5'-GCCTCTACCATGTCGCTACC-3'	NM_016994.2
CD 109	F-5'-TCCATCACTTCTTGGGTGGC-3' R-5'-AAAAACGGTTGGAAGGCGTG-3'	NM_001108771.2
EMP1	F-5'-AGGGGAAGGTGCTATCTGGT-3' R-5'-GCCACCACCAGGACTTTAT-3'	NM_012843.2
HO-1	F-5'-TTAAGCTGGTGATGGCCTCC-3' R-5'-GTGGGGCATAGACTGGGTTC-3'	NM_012580.2

NQO1	F-5'-CTGATTGTATTGGCCACGC-3' R-5'-CGACCACCTCCCATCCTTTC-3'	NM_017000.3
S100A10	F-5'-TGCCGAGATGGAAAAGTGGG-3' R-5'-GAGAGGACGCATCAAGGTGT-3'	NM_031114.1
Serping1	F-5'-AGCGACACAAGTCCCAGTC-3' R-5'-GTGGCAGTGCTTACTCAAGCC-3'	NM_199093.1

---

## Légendes et figures du chapitre IV

**Figure 1. Gene expression of A1 and A2 astrocytic markers in mixt glia cell culture 8 h after exposure to LPS (100 ng/mL) ± Rytvela (1 µg/mL) or Kineret (1 µg/mL).** The expression of A1 markers (A) Amigo2, (B) C3 and (C) Serping1, and of A2 markers (D) CD109 (E) EMP1 and (F) S100A10 were assessed. mRNA fold changes are presented as mean±SEM in arbitrary units (AU) compared to Ctl group (n=9 per group). C3, Complement component 3; CD109, Cluster of differentiation 109; EMP1, Epithelial membrane protein 1; S100A10, S100 calcium-binding protein A10; Serping1; Complement component 1 inhibitor. n.s., non significative ; \*p < 0.05; \*\*p < 0.01 ; \*\*\*p < 0.001; \*\*\*\*p < 0.0001 compared to LPS

**Figure 2. Gene expression of A1 and A2 astrocytic markers in mixt glia cell culture 24 h after exposure to LPS (100 ng/mL) ± Rytvela (1 µg/mL) or Kineret (1 µg/mL).** The expression of A1 markers (A) Amigo2, (B) C3 and (C) Serping1, and of A2 markers (D) CD109 (E) EMP1 and (F) S100A10 were assessed. mRNA fold changes are presented as mean±SEM in arbitrary units (AU) compared to Ctl group (n=6 per group). C3, Complement component 3; CD109, Cluster of differentiation 109; EMP1, Epithelial membrane protein 1; S100A10, S100 calcium-binding protein A10; Serping1; Complement component 1 inhibitor. n.s., non significative ; \*p < 0.05; \*\*p < 0.01 compared to LPS

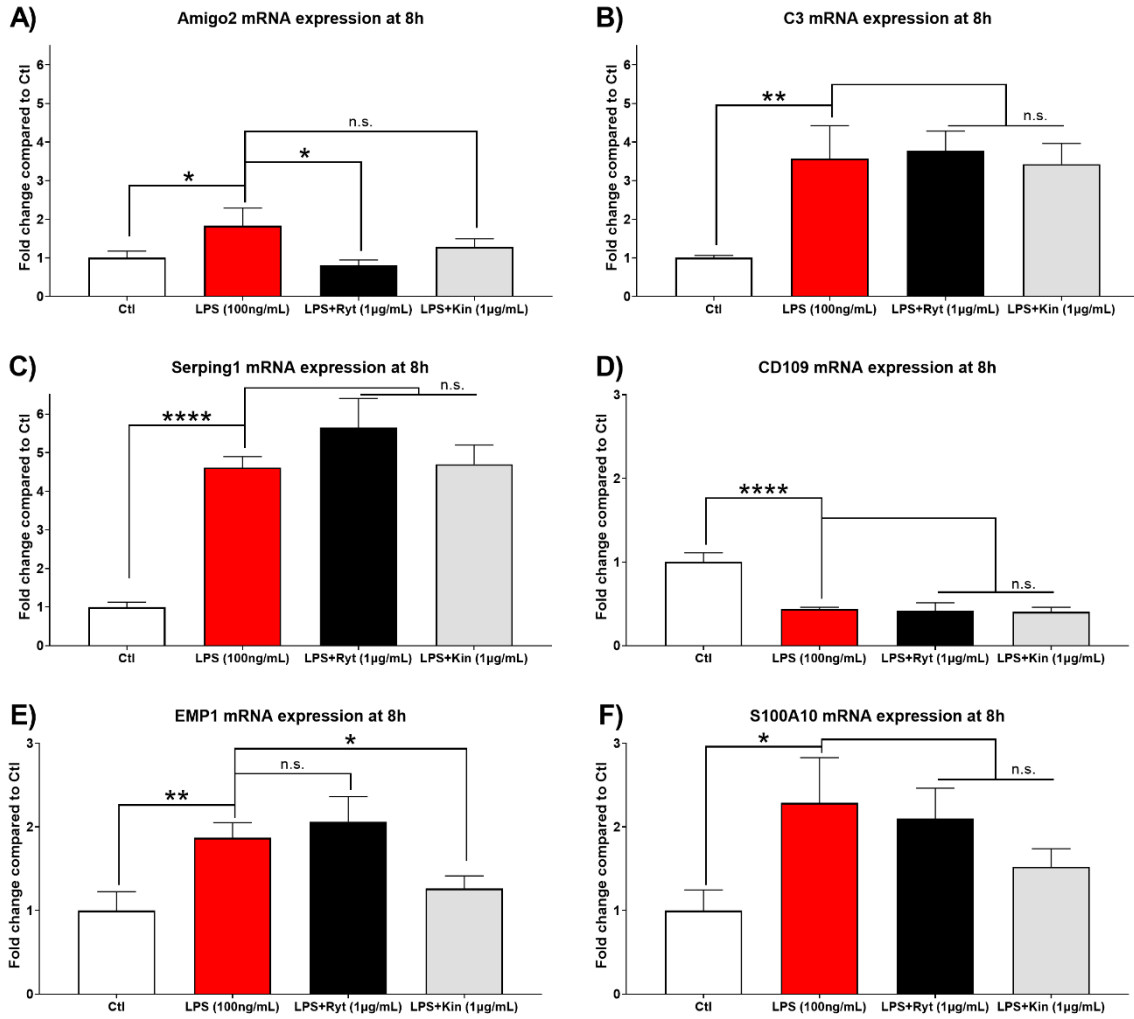
**Figure 3. Gene expression of M1 and M2 microglial markers in mixt glia cell culture 8 h after exposure to LPS (100 ng/mL) ± Rytvela (1µg/mL) or Kineret (1µg/mL).** The expression of M1 markers (A) IL-1, (B) IL-6, (C) TNF-α and (D) iNOS and of M2 markers (E) IL-10 and (F) Arginase 1 were assessed. mRNA fold changes are presented as mean±SEM in arbitrary units (AU) compared to Ctl group (n=9 per group). IL-1β, interleukin 1β; IL-6, interleukin 6; IL-10, Interleukin 10 ; iNOS, inducible nitric oxide synthase and TNF-α, tumor necrosis factor α. n.s., non significative; \*p < 0.05 ; \*\*p < 0.01 ; \*\*\*p < 0.001; \*\*\*\*p < 0.0001 compared to LPS

**Figure 4. Gene expression of M1 and M2 microglial markers in mixt glia cell culture 24 h after exposure to LPS (100 ng/mL) ± Rytvela (1 µg/mL) or Kineret (1 µg/mL).** The expression of M1 markers (A) IL-1, (B) IL-6, (C) TNF- $\alpha$  and (D) iNOS, and of M2 markers (E) IL-10 and (F) Arginase 1 were assessed. mRNA fold changes are presented as mean $\pm$ SEM in arbitrary units (AU) compared to Ctl group (n=6 per group). IL-1 $\beta$ , interleukin 1 $\beta$ ; IL-6, interleukin 6; IL-10, interleukin 10; iNOS, inducible nitric oxide synthase and TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor  $\alpha$ . n.s., non significant; \*p < 0.05; \*\*p < 0.01 compared to LPS

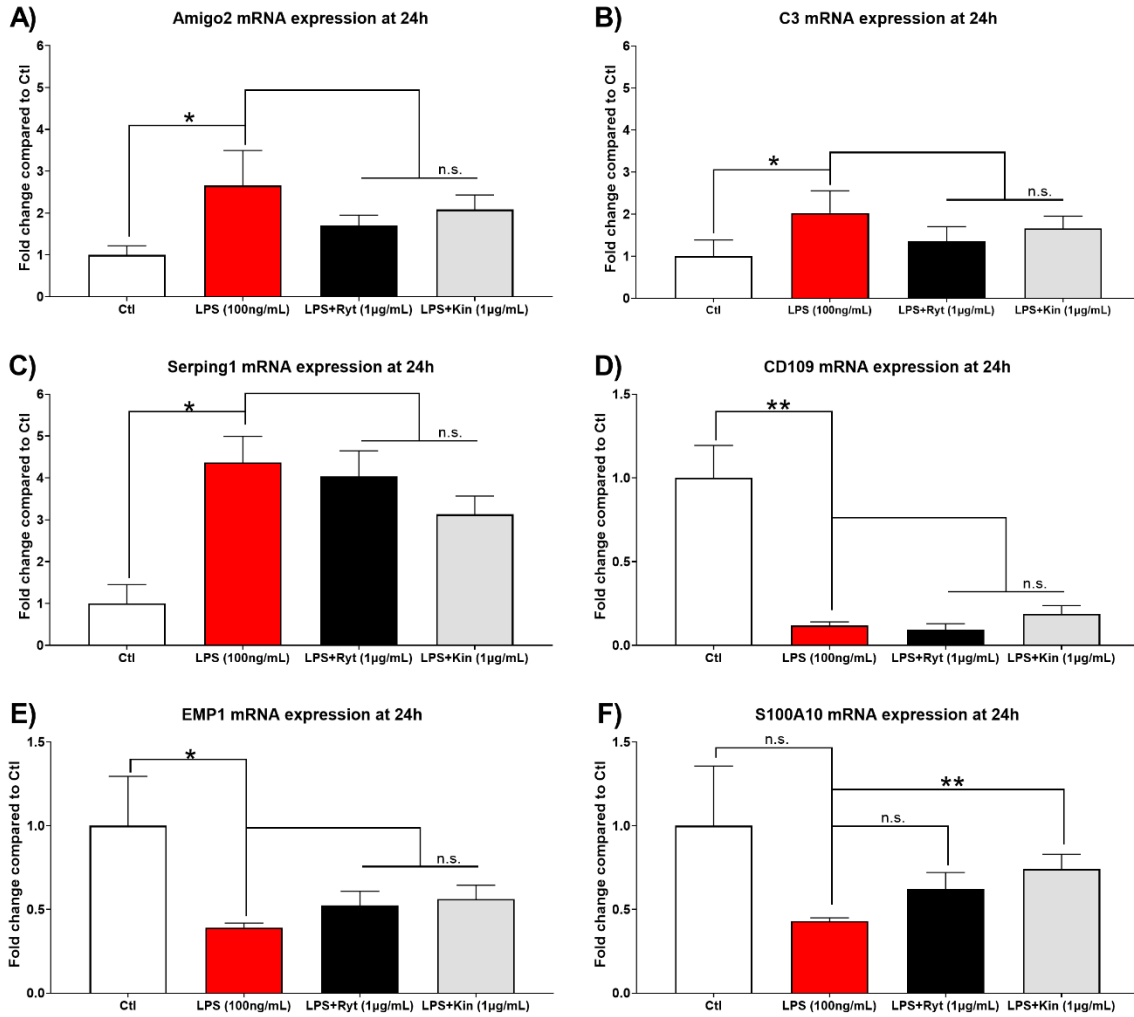
**Figure 5. Intracellular protein level of M1 and M2 microglial markers in mixt glia cell culture 24 h after exposure to LPS (100 ng/mL) ± Rytvela (1 µg/mL) or Kineret (1 µg/mL).** The intracellular concentration M1 markers (A) IL-1, (B) TNF- $\alpha$  and of M2 markers (C) IL-10 was assessed. Protein concentrations are presented as mean $\pm$ SEM in pg/mL/mg of proteins (n=5 per group). IL-1 $\beta$ , interleukin 1 $\beta$ ; IL-10, Interleukin 10; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor. n.s., non significant; \*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001; \*\*\*\*p < 0.0001 compared to LPS

**Figure 6. Expression of NRF2-dependent antioxidant genes in mixt glia cell culture at 8 h and 24 h after exposure to LPS (100 ng/mL) ± Rytvela (1 µg/mL) or Kineret (1 µg/mL).** The expression of antioxidative genes HO-1 (A and C) and NQO1 (B and D) were assessed at 8 h and 24 h. mRNA fold changes are presented as mean $\pm$ SEM in arbitrary units (AU) compared to Ctl group (n=9 at 8 h per group and n=6 at 24 h per group). HO-1, Heme oxygenase 1; NQO1, NAD (P) H dehydrogenase [quinone] 1. n. s., non significant; \*p < 0.05; compared to LPS

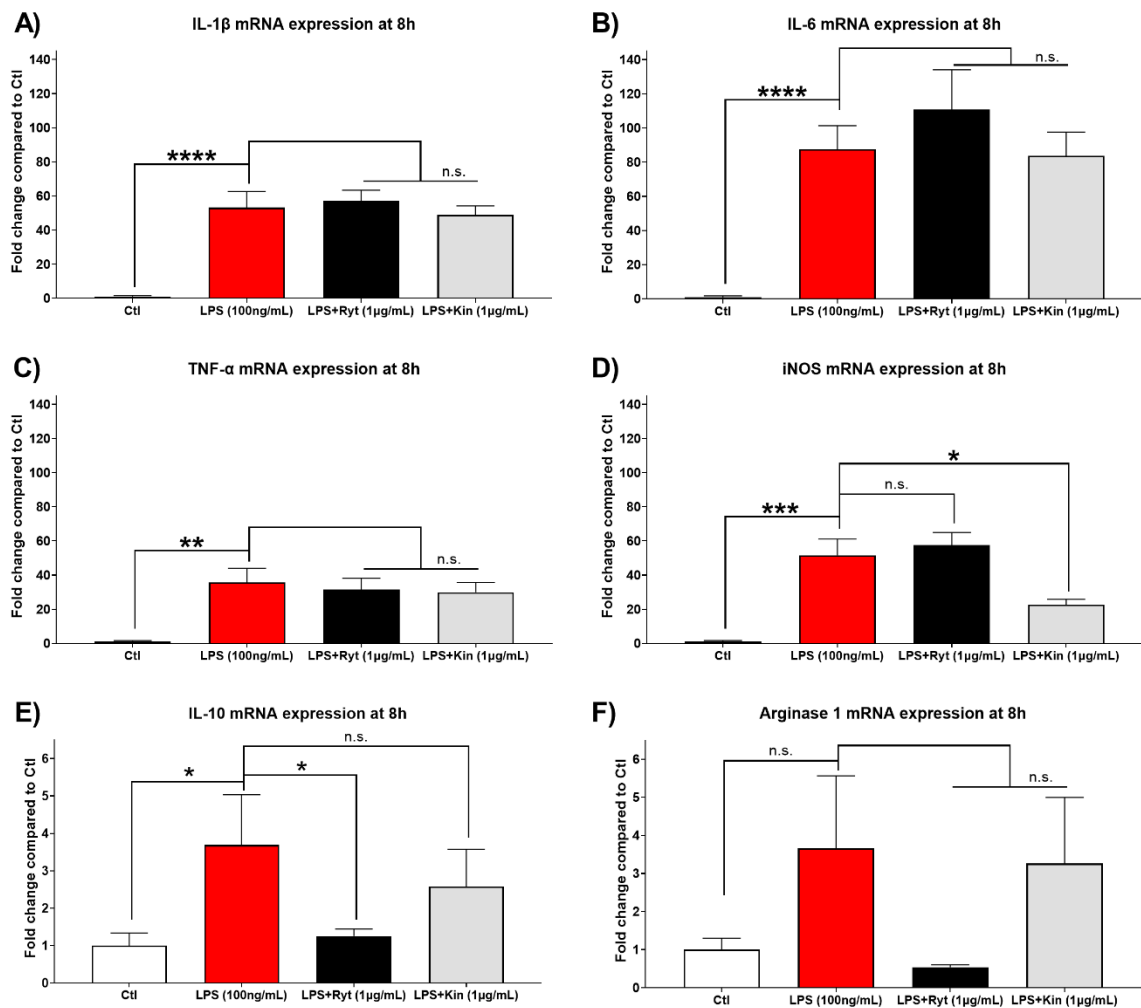
**Figure 1**



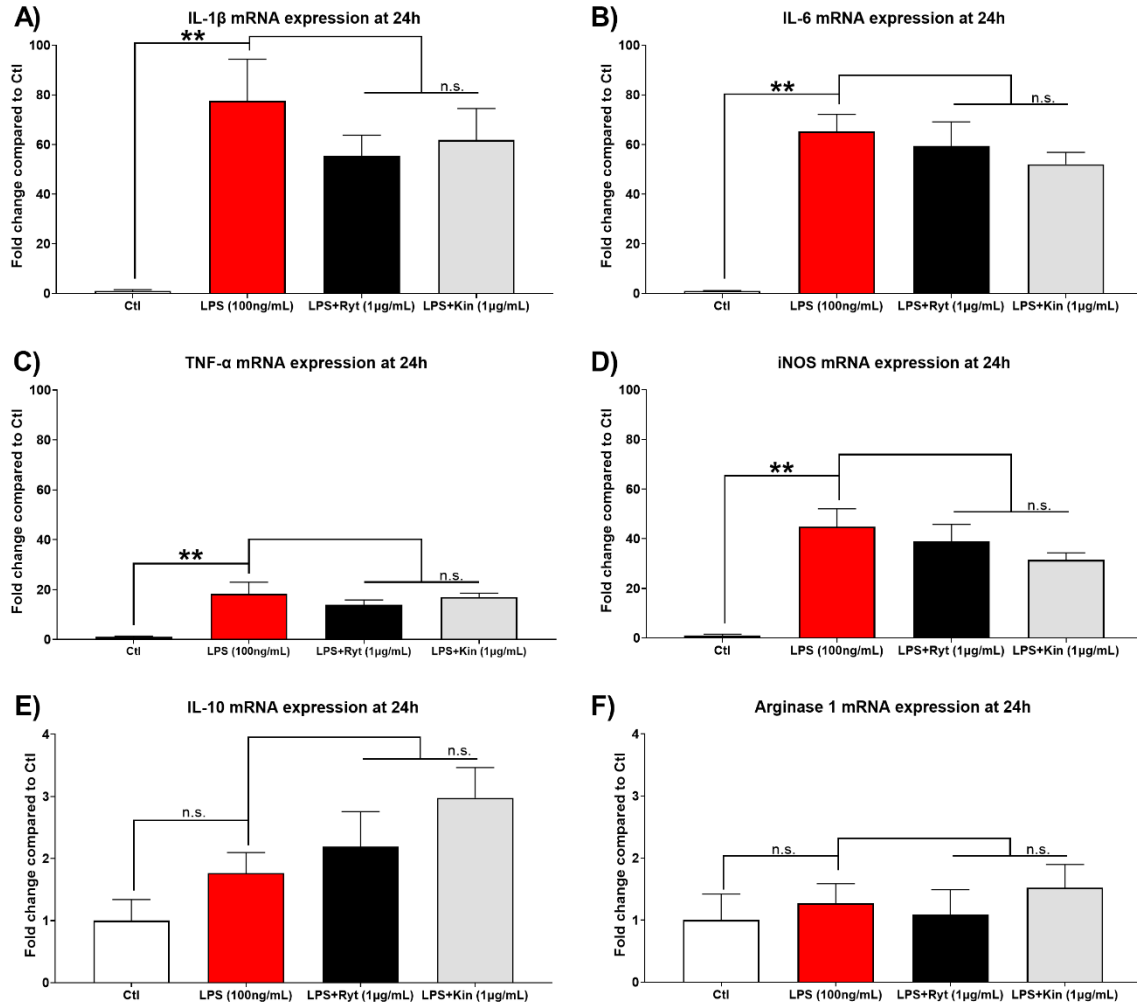
**Figure 2**



**Figure 3**

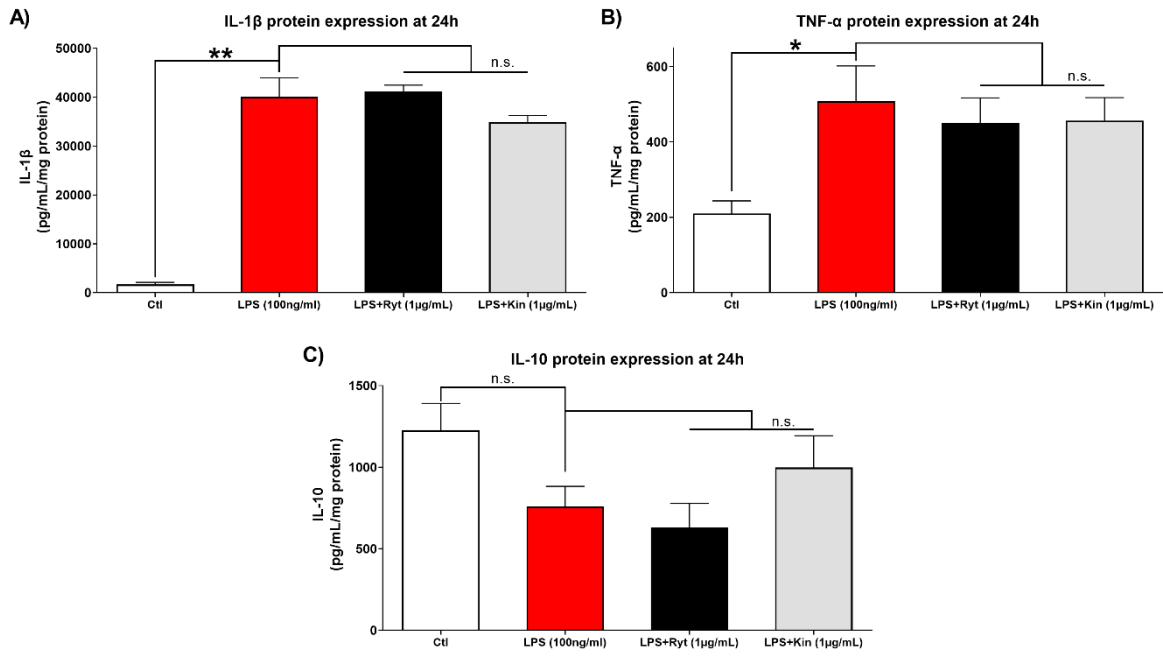


**Figure 4**

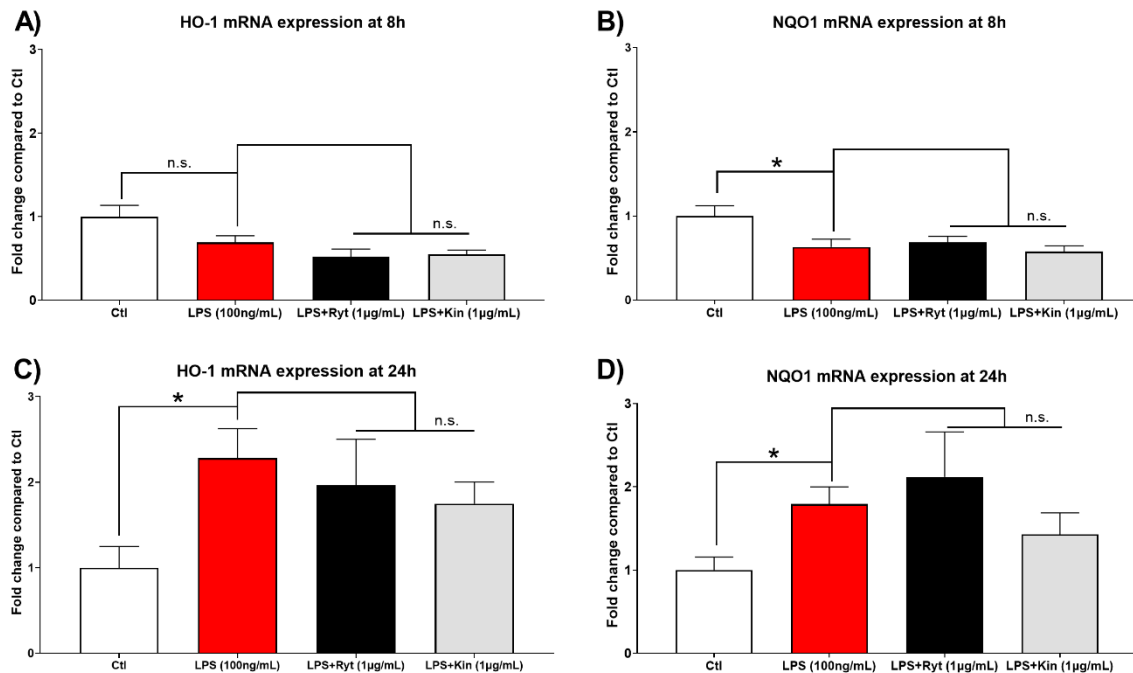




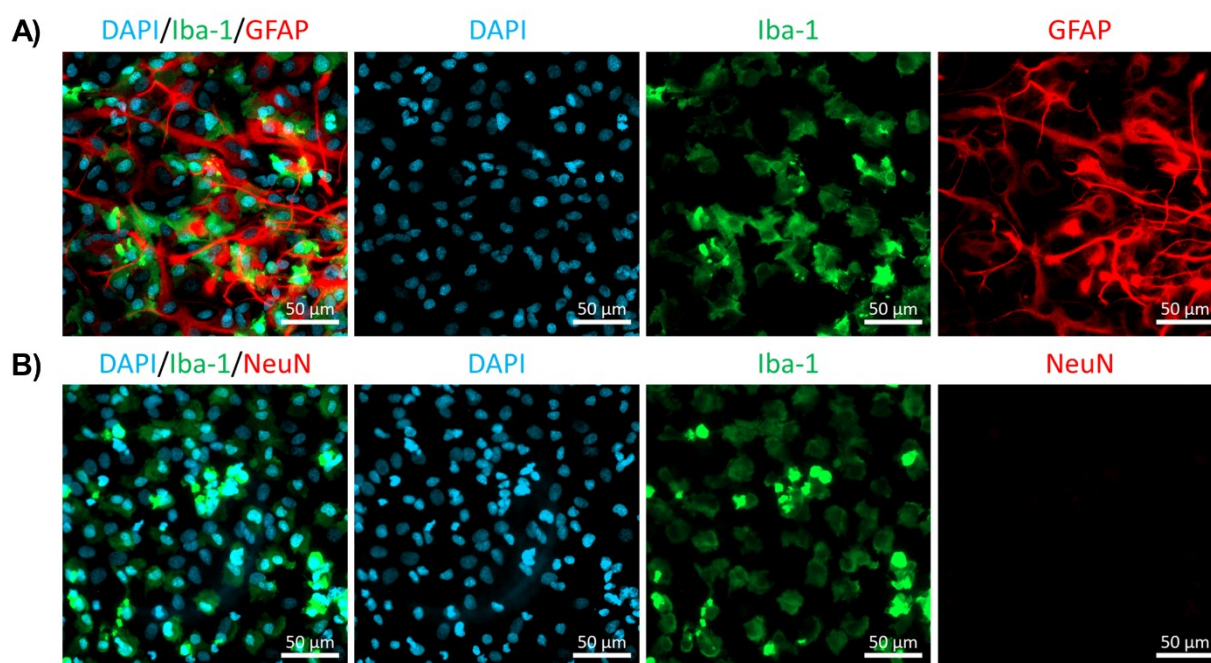
**Figure 5**



**Figure 6**

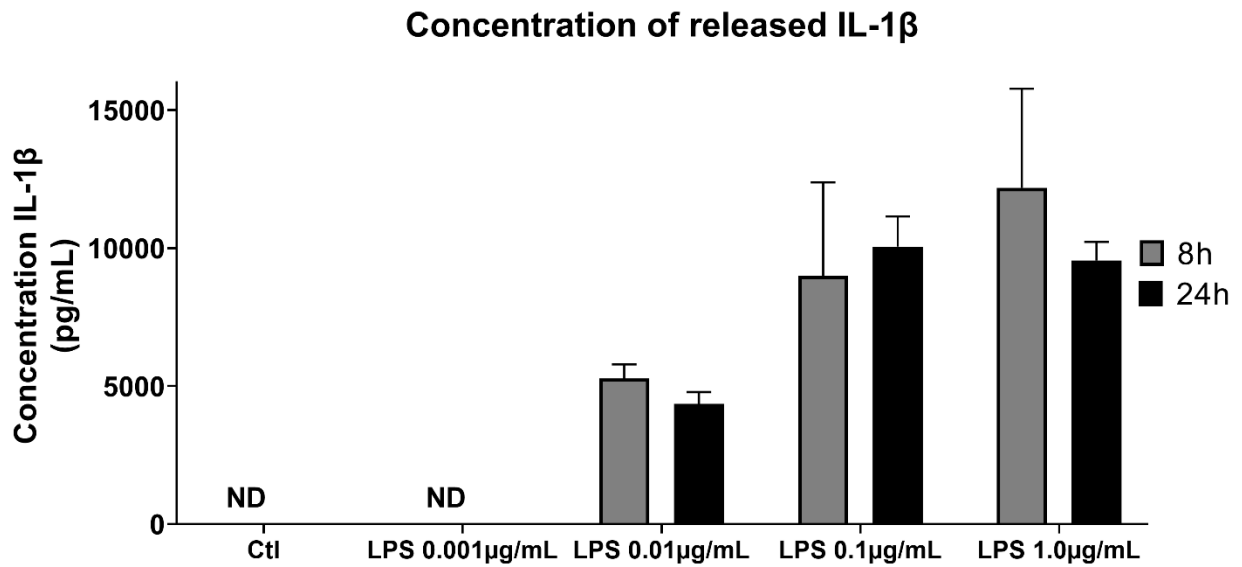


## Matériels supplémentaires du chapitre IV



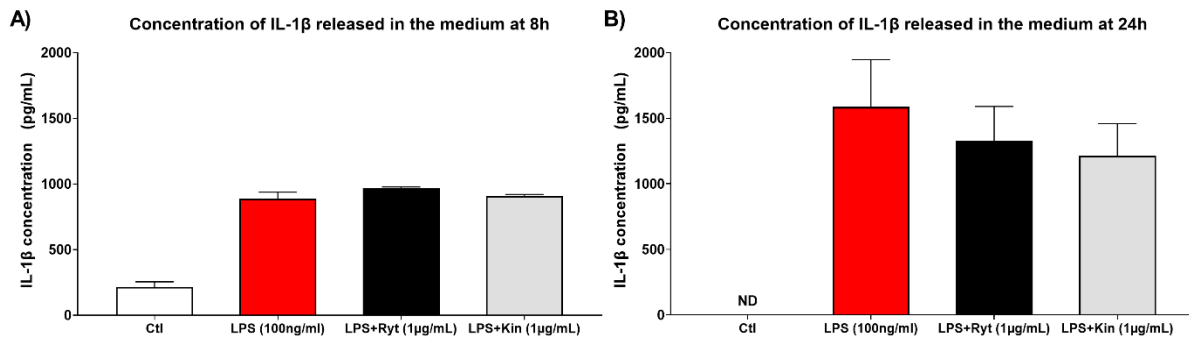
### Supplemental figure 1. Evaluation of cell types present in mixt glial cell cultures

Cells were stained with markers for nucleus (DAPI), microglia (Iba-1), astrocytes (GFAP) and neurons (NeuN) as indicated. All pictures were taken on the slide scanner AxioScan Z1, scale bar 50 µm. (A) DAPI in blue, Iba-1 in green and GFAP in red. (B) DAPI in blue, Iba-1 in green and NeuN in red.



**Supplemental figure 2. Dose-dependent level of IL-1 $\beta$  released the medium of mixt glia cell culture at 8 h and 24 h after exposure to different concentration of LPS.**

Protein concentrations are presented as mean $\pm$ SEM in pg/mL (n=3 per group). IL-1 $\beta$ , interleukin 1 $\beta$ . ND, non detectable concentration with ELISA kit



**Supplemental figure 3. Level of IL-1 $\beta$  released the medium of mixt glia cell culture at 8 h and 24 h after exposure to LPS (100 ng/mL)  $\pm$  Rytvela (1  $\mu$ g/mL) or Kineret (1  $\mu$ g/mL). Protein concentrations are presented as mean $\pm$ SEM in pg/mL (n=3 per group). IL-1 $\beta$ , interleukin 1 $\beta$ . ND, non detectable concentration with ELISA kit**

# Chapitre V : Discussion et perspectives

## 5.1 Discussion

Dans le cadre de cette thèse, nous avons vu que l'exposition néonatale au LPS induit des changements à court et à long terme dans le cerveau. De plus, la réponse inflammatoire et thérapeutique durant la phase aigüe de la neuroinflammation peut être détectée à l'IRM *in vivo* chez le rat néonatal. En utilisant le modèle de WMI par injection intracérébrale chez le rat néonatal, nous avons démontré que :

- 1) L'exposition au LPS induisait des changements du méthylome impliqués dans une multitude de gènes reliés à différents mécanismes neurodéveloppementaux et neuroinflammatoires qui persistaient 21 jours plus tard
- 2) L'IRM multimodale permet d'évaluer *in vivo* la lésion et le début de la réponse thérapeutique durant la phase aigüe de l'inflammation
- 3) Le LPS induit un profil d'activation mixte de la microglie et des astrocytes qui évolue vers une réponse pro-inflammatoire neurotoxique
- 4) Le système de l'IL-1 a un rôle limité sur la modulation de l'activation de la microglie et des astrocytes induite par le LPS

### 5.1.1 Changement du profil épigénétique

Dans le chapitre II, nous avons démontré la présence d'altération du méthylome cérébral durant la phase aigüe et chronique de la réponse inflammatoire dans le modèle de WMI. De manière générale, l'exposition au LPS induisait une hyperméthylation des gènes reliés au neurodéveloppement et une hypométhylation des gènes impliqués dans la réponse inflammatoire innée et acquise. De plus, nous avons identifié 51 régions identiques qui gardaient leur profil de méthylation entre 24 h et 21 jours après la lésion. Il a été démontré chez l'humain que certains changements de méthylation demeuraient stables sur une période allant de 3 à

6 mois malgré que la méthylation est un processus dynamique (561). Donc, il pourrait être d'intérêt de considérer ces gènes comme de potentiels candidats lors d'études futures.

Outre les changements épigénétiques, l'exposition au LPS induit une dilatation bilatérale des ventricules cérébraux 21 jours après l'exposition au LPS. Cette dilatation est similaire aux études précédentes qui ont démontré que l'exposition centrale ou systémique au LPS induisait une dilatation ventriculaire tant chez les animaux néonataux qu'adultes (345, 354, 562-564). Il a été mis de l'avant que cette dilatation ventriculaire puisse être secondaire à une perte cellulaire ou une augmentation de la pression intraventriculaire dans le cerveau immature (368, 565, 566). L'absence d'hémorragie intraventriculaire dans notre modèle démontre que la dilatation ventriculaire serait plus associée à une perte du tissu périventriculaire et il a été proposé que ceci serait un mécanisme de compensation secondaire aux atteintes de la substance blanche (346, 562, 567, 568). Tant chez l'humain que chez le rat, la sévérité de la dilatation ventriculaire a été associée à des déficits moteurs et cognitifs (569-572). Tout comme pour les changements de méthylations sur certains gènes, la dilatation ventriculaire présentait une certaine variabilité qui pourrait être associée à la sévérité des atteintes. Dans notre étude, nous avons utilisé deux cohortes différentes de rats pour mesurer la méthylation et la dilatation ventriculaire. Il serait intéressant de mesurer la dilatation ventriculaire par IRM chez les rats avant d'étudier le profil de méthylation cérébral. Ceci permettrait d'évaluer la présence d'une corrélation entre la sévérité de la lésion et les altérations épigénétiques.

La présence de l'altération du méthylome pourrait avoir un impact sur la trajectoire neurodéveloppementale. Donc, de futures études seront nécessaires pour répliquer et valider ces résultats et étudier les changements d'expression associés à différents gènes candidats, notamment ceux ayant une persistance des changements de méthylation.

### **5.1.2 Détection de la lésion et de la réponse thérapeutique par IRM multimodale durant la phase aigüe de l'inflammation**

Dans le chapitre 3 de cette thèse, nous avons évalué la capacité de l'IRM multimodale à détecter les lésions et la réponse thérapeutique durant la phase aigüe de la réponse inflammatoire dans le modèle animal de WMI induit par LPS.

Tout d'abord, nous avons mesuré l'intégrité de la microstructure de la substance blanche dans le corps calleux et les cingulum ipsilatéral et controlatéral par DTI. Nous avons observé une diminution de la diffusivité dans ces régions d'intérêt et ces altérations corrélaient avec l'évaluation post-mortem de la mort cellulaire et de l'activation de la microglie et des astrocytes. Ces changements sont similaires à la restriction de la diffusivité observée durant la phase aigüe de l'inflammation chez les prématurés et les modèles d'inflammation périnatale (213, 224, 347, 349, 573).

Nous avons aussi détecté par MRS une altération du métabolisme de l'hippocampe. L'hippocampe des animaux lésés avait une diminution des métabolites reliés à l'intégrité neuronale, à l'intégrité membranaire et à la neurotransmission glutamatergique et une augmentation de métabolites liés aux lésions cérébrales. Ces changements dans le métabolisme de l'hippocampe n'étaient pas associés à l'augmentation de l'expression des marqueurs des astrocytes et de la microglie. L'hippocampe est une région cérébrale plus susceptible à l'atrophie chez les enfants nés prématurément (264-266, 574). Dans les modèles animaux d'inflammation périnatale, l'activation de la réponse inflammatoire a été associée à des atteintes neuronales dans l'hippocampe. Ces atteintes sont caractérisées par altération du système glutamatergique, une inflammation persistante et une diminution de la survie des neurones nouvellement formés (575-578). Ces changements métaboliques de l'hippocampe à la MRS pourraient représenter le début des atteintes neuronales dans l'hippocampe.

Outre la détection de la lésion cérébrale, l'IRM multimodale a permis de démontrer une efficacité partielle de l'IL-1Ra qui a été corroborée par des analyses post-mortem de l'expression de marqueurs génétiques et immunohistochimiques. L'observation des débuts de la réponse thérapeutique à l'IRM supporte l'importance de l'utilisation de cette technique dans les études précliniques et cliniques sur le développement d'approches thérapeutiques.



Actuellement, la majorité des appareils d'IRM utilisés en clinique ont une force du champ magnétique de 1,5 T ou de 3 T (579). Ces appareils permettent d'obtenir facilement des images avec une résolution allant jusqu'à 1 mm dans le cerveau humain (579-581). À l'opposé, l'IRM de petits animaux est effectuée sur des appareils à haut champ magnétique (>7 T) pour obtenir des images de haute résolution en présence d'un plus petit volume cérébral comparativement au cerveau humain (0,45 mL chez le rat nouveau-né vs 0,5 L chez l'humain) (581, 582). Le haut champ magnétique des IRM animal permet d'augmenter substantiellement le ratio de signal sur bruit pour avoir des données d'une qualité se rapprochant de celles observées en clinique (581-583). Donc, il est possible de mesurer chez les prématurés la présence des changements vus par IRM multimodale (DTI et MRS) dans notre modèle animal. En recherche clinique, l'utilisation de l'IRM a permis de démontrer l'efficacité neuroprotectrice de la mélatonine et de l'EPO lors d'essais randomisés contrôlés chez les prématurés (584-587). Par exemple, l'IRM effectuée à l'âge correspondant au terme a démontré que l'EPO était associée à une diminution du score de WMI, une augmentation de l'anisotropie fractionnelle (584, 585). De plus, l'IRM à 3 T acquise le plus tôt possible après la naissance a détecté que l'administration anténatale de sulfate de magnésium diminue l'incidence d'hémorragie cérébelleuse chez les prématurés (588). De plus, l'étude MagNUM a démontré que l'effet neuroprotecteur de l'administration de magnésium sulfate chez les mères à risque de travail préterme était associé à une augmentation de la valeur de l'anisotropie fractionnelle et une diminution de la diffusivité radiale à l'IRM à l'âge équivalent au terme (589). Bien que la majorité des essais cliniques chez le prématuré ait effectué l'IRM seulement à l'âge équivalent au terme, il est envisageable d'effectuer l'IRM plus précocement après le début de la thérapie. Il a été établi que les acquisitions à l'IRM avant l'âge équivalent au terme possèdent la capacité de détecter la présence de WMI et que ces atteintes corrélaient à des déficits neurologiques et cognitifs jusqu'à l'âge de 3 ans (301, 590-592). Donc, l'application de l'IRM précocement chez les prématurés pourrait faciliter le développement et l'évaluation de nouvelles approches thérapeutique dans cette population au devenir fragile.

### 5.1.3 La polarisation de la microglie et des astrocytes *in vitro*

Dans le chapitre IV de cette thèse, nous avons évalué *in vitro* l'évolution temporelle de la réponse astrocytaire et microgliale durant une stimulation continue au LPS. Nous avons observé que le LPS induisait une réponse biphasique de l'activation gliale. Après 8 h de stimulation continue au LPS, les cellules gliales activées expriment des marqueurs pro-inflammatoires (M1 et A1) et anti-inflammatoires (M2 et A2). Après 24 h de LPS en continu, les cellules gliales adoptent un profil pro-inflammatoire et neurotoxique (M1 et A1).

L'évolution temporelle de la polarisation de l'activation de la microglie est en accord avec les données *in vitro* et *in vivo* publiées précédemment. *In vitro*, il a été démontré que les cultures de microglie stimulées au LPS ont une réponse mixte M1/M2 qui atteint un pic à 12 h de stimulation pour devenir une réponse majoritairement M1 par après (162). De plus, l'HI néonatale est accompagnée d'une réponse mixte M1/M2 durant les premiers 24 h suivie d'une augmentation du nombre de la microglie M1 qui persiste jusqu'à 7 jours après la lésion (176).

L'évolution temporelle de la polarisation des astrocytes en réponse au LPS a été peu évaluée à moins de 24 h ou encore dans des modèles néonataux (163, 191-193, 593). Parmi les études néonatales, l'étude de Shiw *et al.* a démontré que l'induction des astrocytes A2, par l'exposition systémique à l'IL-1 $\beta$  chez la souris néonatale, était associée à une inhibition de la maturation des oligodendrocytes et une hypomyélinisation (594). Donc, contrairement au rôle neuroprotecteur observé chez les animaux matures, les astrocytes A2 chez les animaux immatures sont associés à des altérations neurodéveloppementales. Donc, tant les astrocytes A1 que les astrocytes A2 sont possiblement associés à des effets délétères durant la période néonatale.

Notre étude est parmi les premières à détailler la réponse astrocytaire *in vitro* durant la phase aiguë de la réponse inflammatoire. L'augmentation concomitante du profil d'astrocyte A1 et de microglie M1 vient supporter l'hypothèse d'une boucle de rétroaction positive entre ces deux cellules (voir section 2.3). Bien que nous n'ayons pas étudié en détail la modulation de la polarisation *in vivo*, nous avons observé une augmentation de l'expression du marqueur astrocytaire GFAP et du marqueur de la microglie Iba-1 dans des régions cérébrales similaires à 24 h (voir Fig. 4 et Fig. 5 chapitre III). De plus, l'activation de ces cellules est

concomitante à une augmentation de l'expression de marqueurs inflammatoires associés à la microglie M1. Le lien entre l'activation de ces cellules gliales suggère fortement que l'activation astrocytaire dans notre modèle néonatal serait de type A1. Cela reste à être confirmé lors de futures expériences.

#### **5.1.4 Contribution de l'IL-1 durant la phase aigüe de la réponse inflammatoire induite par le LPS**

Dans le chapitre IV, nous avons évalué la contribution de la signalisation IL-1 dans la polarisation de la microglie et des astrocytes induite par le LPS. Nous avons démontré *in vitro* que la modulation de la réponse IL-1 par le biais de l'IL-1Ra ou du Rytvela jouait un rôle limité dans la polarisation de la microglie et des astrocytes par le LPS. De plus, nous avons noté *in vivo* que l'IL-1Ra avait un effet partiel sur l'activation des cellules gliales et sur la réponse inflammatoire durant la période aigüe de l'inflammation. Donc, l'effet limité de la modulation de la voie de signalisation de l'IL-1 pourrait découler de la réaction inflammatoire excessive induite par le LPS durant les premières 24 h (595). Tel que vu dans le chapitre II, le LPS induit une hypométhylation de différents gènes reliés à la réponse immunitaire. Cette hypométhylation pourrait se traduire par une induction de l'expression de différents médiateurs inflammatoires interagissant entre eux pour établir une boucle de rétroaction amplifiant la réponse inflammatoire durant la phase aigüe de l'inflammation (312, 313). En sachant que la majorité (>70 %) du LPS est éliminé du cerveau de la souris adulte après 4 h, il est fort probable que l'inflammation chronique dépende de l'expression de ces différents médiateurs, dont l'IL-1 (596-598).

Bien que nous ayons observé un rôle limité de l'IL-1 dans la réponse gliale durant la phase aigüe de l'inflammation (24 h) *in vivo*, il est possible que cette cytokine joue un rôle plus prépondérant durant l'initiation et l'établissement de la neuroinflammation chronique. Chez l'animal, l'exposition systémique ou centrale au LPS durant la période néonatale induit une augmentation des niveaux d'IL-1 $\beta$  qui persiste jusqu'à l'âge adulte (351, 359, 366). De plus, l'injection intracérébrale d'IL-1Ra concomitante au LPS produit un effet neuroprotecteur partiel durant la phase aigüe de la réponse inflammatoire (24-72h suivant le début de la lésion) et cet

effet est plus significatif lorsqu'évalué à des temps ultérieurs (346, 361, 599). Similairement, dans des modèles néonataux d'exposition systémique au LPS ou au LPS combiné à un épisode d'hypoxie-ischémie, l'effet neuroprotecteur de l'injection systémique d'IL-1Ra (10 mg/kg ou 100 mg/kg) était plus significatif lorsqu'évalué à long terme (346, 546, 600, 601). Donc, l'effet neuroprotecteur de la modulation de l'IL-1 par l'IL-1Ra ou le Rytvela pourrait être plus apparent lorsqu'évalué durant la phase chronique de la neuroinflammation.

## 5.2 Perspectives

### 5.2.1 Étude de l'impact de la WMI sur le méthylome cérébral

Dans le chapitre II de cette thèse, nous avons démontré que l'exposition néonatale au LPS induisait une altération du méthylome cérébrale qui persistait jusqu'à 21 jours après l'insulte. Pour faire suite à cette étude, il serait intéressant de mesurer la corrélation entre les changements de méthylation observés et l'expression génique de gènes d'intérêts durant la période aigüe et chronique de la réponse inflammatoire. Tout d'abord, les efforts seraient concentrés sur la mesure de l'expression des gènes qui démontrent des changements de méthylations persistants entre les 2 temps par PCR (expression génique) et aussi à l'aide d'immunobuvardage (expression protéique). De plus, nous pourrions aussi vérifier l'expression des gènes qui sont le plus fortement associés à différents mécanismes clés démontrés dans l'analyse des voies de signalisation (« GO analysis ») dont la réponse inflammatoire et le développement axonal. Ces expériences permettront de mieux cibler les gènes et voies de signalisations jouant un rôle prépondérant dans la neuropathologie du modèle de WMI. Une fois que certains gènes ciblent seront identifiés, il sera possible de vérifier leur implication dans les WMI chez le nouveau-né en étudiant la méthylation de l'ADN dans la salive qui a démontré une corrélation élevée au tissu cérébral.

Outre ceci, l'impact de l'exposition au LPS sur la machinerie enzymatique de la méthylation de l'ADN devrait être évalué. Il a été dénoté que l'exposition au LPS *in vitro* augmentait l'expression de la protéine DNMT3-like (DNMT3l) dans des cultures primaires de microglie et la lignée cellulaire microgliale BV-2 (602-604). Bien que la DNMT3l ne possède

pas d'activité méthyltransférase, elle facilite l'activité enzymatique de la DNMT3a et de la DNMT3b (605). Outre ces changements *in vitro*, l'exposition systémique au LPS a été associée à une diminution de l'expression des DNMT3a et DNMT3b dans la microglie (606). De plus, une diminution de l'expression de la DNMT1 a été dénotée dans l'amygdale de porcs exposés à une infection virale durant la gestation (607). À la lumière de ces résultats, nous croyons qu'il est important de mesurer l'expression de ces différentes protéines dans notre modèle de WMI. Tout d'abord, nous mesurons l'expression protéique et génique de ces différents médiateurs de la méthylation. Par la suite, il serait intéressant de mesurer l'activité enzymatique des DNMT par le biais de tests enzymatiques colorimétriques. Finalement, nous pourrions évaluer la contribution de ces enzymes en comparant le profil de méthylation entre des animaux exposés au LPS et des animaux exposés au LPS et traités avec un inhibiteur de l'activité des méthyltransférases telles que la 5-aza-2'-deoxycytidine ou la zébularine (608). Ces expériences permettraient de mieux comprendre le rôle et le mécanisme d'action des méthyltransférases dans la WMI induite par exposition au LPS.

### **5.2.2 Étude de la polarisation astrocytaire et microgliale *in vivo* dans le modèle de WMI**

À ce jour, la majorité des études portant sur la polarisation astrocytaire a été effectuée *in vitro* ou *in vivo* dans des modèles animaux à l'âge adulte. En lumière des observations *in vitro* de la polarisation de la réponse astrocytaire vers un profil A1 à la suite de l'exposition au LPS, il serait intéressant d'étudier ce phénomène *in vivo* chez le rat néonatal. Nous avons dénoté que le modèle animal présentait une augmentation de l'expression du GFAP, un marqueur panréactif des astrocytes, particulièrement dans le cingulum. La polarisation des astrocytes pourrait être évaluée à différent temps durant la phase aiguë (6 h, 12 h et 24 h) et la phase chronique (3, 7 et 21 jours) après l'exposition au LPS. Des immunomarquages sur des coupes de cerveau permettraient d'évaluer la colocalisation avec le GFAP des marqueurs C3 et S100A10 associés respectivement aux astrocytes A1 et aux astrocytes A2. Parallèlement à l'évaluation de l'activation astrocytaire, la polarisation de la microglie serait aussi évaluée *in vivo* à des temps similaires dans différentes régions du cerveau. L'activation de la microglie pourrait être détectée

par des immunomarquage sur des coupes de cerveau pour évaluer la colocalisation du marqueur Iba-1 avec des marqueurs de surfaces de la microglie M1 dont le CD16/32 et le CD86, et de la microglie M2 tel que CD206 et le CD163 (609). Ceci permettra de détecter les différences régionales dans la polarisation astrocytaire et microgliale et de mesurer l'évolution de la polarisation dans le temps.

En identifiant les régions cérébrales où l'activation de la microglie et des astrocytes adoptent un profil associé à la neurotoxicité et la neuroinflammation, nous pourrions isoler ces cellules pour effectuer une évaluation du transcriptome par séquençage de l'ARN en cellule unique (« single cell RNAseq »). Ceci permettra une meilleure identification et caractérisation des phénotypes de la microglie et des astrocytes associés à la WMI allant au-delà de la simple polarisation M1/A1 et M2/A2.

### **5.2.3 Étude du rôle de l'IL-1 dans la réponse inflammatoire chronique in vivo dans le modèle de WMI**

Un des principaux buts de cette thèse était de démontrer la capacité de l'IRM de détecter le début de la réponse thérapeutique durant la phase aigüe de l'inflammation. Les paramètres évalués à l'IRM dans cette thèse sont maximaux durant le pic de la réponse inflammatoire induite par le LPS.

Afin de maximiser l'efficacité de l'IL-1Ra et du Rytvela, il serait nécessaire d'effectuer une courbe dose-réponse de l'effet neuroprotecteur de ces molécules dans notre modèle. Dans la majorité des études, la concentration d'IL-1Ra administrée par injection systémique varie entre 10 µg/kg et 200 mg/kg en fonction de l'espèce et du modèle animal (547). En partant de cet intervalle, nous testerions des concentrations de 10 mg/kg, 20 mg/kg, 50 mg/kg et 100 mg/kg par injection intrapéritonéale au 12 h. Ces concentrations d'IL-1Ra ont déjà démontré une efficacité thérapeutique dans divers modèles animaux de lésions néonatales (546, 547, 601). Pour le Rytvela, nous testerions les doses de 0,5 mg/kg, 1 mg/kg et 1,5 mg/kg au 12 h qui ont déjà démontré une efficacité thérapeutique dans divers modèles animaux chez le rat et la souris (551, 553-555, 557, 610). Les animaux seraient imagés à l'IRM à 24 h (P4) pour déterminer la dose d'IL-1Ra et de Rytvela présentant la meilleure efficacité durant la période aigüe de l'inflammation.

Les études ont démontré que les effets de l'inhibition de l'IL-1 étaient plus apparents lorsqu'évalués à long terme (346, 600). Donc, nous pourrions vérifier l'impact d'un traitement continu à l'IL-1Ra ou au Rytvela dans notre modèle animal d'injection intracérébral de LPS à P3. Les animaux pourraient être traités par deux injections quotidiennes par voie intrapéritonéale jusqu'à 7 jours après le début de la lésion. Les animaux seraient imagés à l'IRM à 24 h (P4) et à 7 jours (P10) après le début de la lésion pour évaluer l'évolution de la lésion et de la réponse thérapeutique. L'IRM à P4 permettra de voir la présence ou l'absence d'une réponse thérapeutique partielle et l'IRM à P10 confirmera la valeur thérapeutique de l'inhibition ou de la modulation de l'IL-1L avant de poursuivre l'étude. En cas d'effet neuroprotecteur à P4 et à P10, les animaux subiront à l'âge adulte (P30 et P80) différents tests comportementaux mesurant la mémoire et l'activité locomotrice de l'animal pour évaluer l'effet à long terme de ces deux molécules.

Lorsque le potentiel neuroprotecteur de ces molécules sera confirmé, il sera possible d'envisager leur utilisation dans la prévention des WMI chez les prématurés. Dans nos études, les animaux ont été traités avec le recombinant humain de l'IL-1Ra qui partage 75 % d'homologie avec l'isoforme du rat, donc les concentrations à utiliser chez l'humain seraient relativement inférieures à celles du modèle animal (546). Actuellement, l'utilisation de l'anakinra (0,5 à 1,5 mg/kg/jour) dans la population pédiatrique souffrant du syndrome CINCA est associée à peu d'effets secondaires dont le plus fréquent est une réaction cutanée au site d'injection (611). Tout comme démontré dans notre modèle, l'injection systémique d'IL-1Ra augmente les concentrations d'IL-1Ra dans le CSF et ceci est associé à une diminution des niveaux de médiateurs inflammatoires, dont l'IL-6 (538, 612). Donc, l'IL-1Ra est une molécule prometteuse dans le traitement de la neuroinflammation néonatale.

En l'absence d'un effet neuroprotecteur de ces molécules, nous pourrions vérifier l'effet de molécules ayant un effet anti-inflammatoire plus global tel qu'une des molécules présentées dans la section 7.1 de l'introduction. Par exemple, nous pourrions évaluer l'effet des IAIP dans notre modèle en suivant le schéma d'expérience décrit précédemment.

## Conclusion

Les données présentées dans cette thèse démontrent que l'inflammation postnatale induite par le LPS altère l'épigénome cérébral dans des gènes jouant un rôle dans le neurodéveloppement et l'inflammation et ceci persiste jusqu'à trois semaines après la lésion. De plus, l'inhibition du récepteur à l'IL-1 exerce un effet minimal sur la modulation de l'activation *in vivo* et *in vitro* de la microglie et des astrocytes durant la période aigüe de la réponse inflammatoire au LPS. Finalement, nous avons démontré que les changements à l'IRM multimodale corrélient avec des altérations cellulaires et que cette méthode détecte la réponse neuroprotectrice partielle de l'inhibition de l'IL-1 durant la période aigüe de l'inflammation. La confirmation de ces résultats lors d'études subséquentes démontrera un rôle central de l'IRM multimodale dans la détection et le suivi de l'évolution des lésions cérébrales chez le prématuré. De plus, l'étude de l'épigénome du prématuré possède la capacité d'identifier des marqueurs de lésions cérébrales et aussi de nouvelles cibles thérapeutiques. La combinaison des données de ces méthodes non invasives facilitera le développement de nouvelles approches neuroprotectrices. Donc, l'amélioration du devenir neurodéveloppemental chez le prématuré passerait par une meilleure compréhension et intégration de la signature épigénétique, inflammatoire et à l'IRM dans cette population fragile.



## Bibliographie

1. WHO: recommended definitions, terminology and format for statistical tables related to the perinatal period and use of a new certificate for cause of perinatal deaths. Modifications recommended by FIGO as amended October 14, 1976. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1977;56(3):247-53.
2. Marlow N. Full term; an artificial concept. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2012;97(3):F158-9.
3. Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet.* 2008;371(9606):75-84.
4. Platt MJ. Outcomes in preterm infants. *Public Health.* 2014;128(5):399-403.
5. Purisch SE, Gyamfi-Bannerman C. Epidemiology of preterm birth. *Semin Perinatol.* 2017;41(7):387-91.
6. Richter LL, Ting J, Muraca GM, Boutin A, Wen Q, Lyons J, et al. Temporal Trends in Preterm Birth, Neonatal Mortality, and Neonatal Morbidity Following Spontaneous and Clinician-Initiated Delivery in Canada, 2009-2016. *J Obstet Gynaecol Can.* 2019;41(12):1742-51.e6.
7. Jaekel J, Scott M. Preterm and Low-Birth-Weight Birth. In: Donders J, Hunter SJ, editors. *Neuropsychological Conditions Across the Lifespan.* Cambridge: Cambridge University Press; 2018. p. 2-23.
8. Quinn JA, Munoz FM, Gonik B, Frau L, Cutland C, Mallett-Moore T, et al. Preterm birth: Case definition & guidelines for data collection, analysis, and presentation of immunisation safety data. *Vaccine.* 2016;34(49):6047-56.
9. Salas AA, Carlo WA, Ambalavanan N, Nolen TL, Stoll BJ, Das A, et al. Gestational age and birthweight for risk assessment of neurodevelopmental impairment or death in extremely preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2016;101(6):F494-F501.
10. Stoll BJ, Hansen NI, Bell EF, Walsh MC, Carlo WA, Shankaran S, et al. Trends in Care Practices, Morbidity, and Mortality of Extremely Preterm Neonates, 1993-2012. *JAMA.* 2015;314(10):1039-51.

11. Vogel JP, Chawanpaiboon S, Moller A-B, Watananirun K, Bonet M, Lumbiganon P. The global epidemiology of preterm birth. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*. 2018;52:3-12.
12. Rubens CE, Sadovsky Y, Muglia L, Gravett MG, Lackritz E, Gravett C. Prevention of preterm birth: Harnessing science to address the global epidemic. *Science Translational Medicine*. 2014;6(262):262sr5.
13. Boyle AK, Rinaldi SF, Norman JE, Stock SJ. Preterm birth: Inflammation, fetal injury and treatment strategies. *J Reprod Immunol*. 2017;119:62-6.
14. Harrison MS, Goldenberg RL. Global burden of prematurity. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2016;21(2):74-9.
15. Cappelletti M, Della Bella S, Ferrazzi E, Mavilio D, Divanovic S. Inflammation and preterm birth. *J Leukoc Biol*. 2016;99(1):67-78.
16. Ravelli ACJ, Eskes M, van der Post JAM, Abu-Hanna A, de Groot CJM. Decreasing trend in preterm birth and perinatal mortality, do disparities also decline? *BMC Public Health*. 2020;20(1):783.
17. Gillian Lim JTNBSKJWJ-MB, Caroline H. CIHI Survey: Hospital Costs for Preterm and Small-for-Gestational Age Babies in Canada. *Healthcare Quarterly*. 2009;12(4):20-4.
18. Shah PS, McDonald SD, Barrett J, Synnes A, Robson K, Foster J, et al. The Canadian Preterm Birth Network: a study protocol for improving outcomes for preterm infants and their families. *CMAJ Open*. 2018;6(1):E44-e9.
19. McCabe ER, Carrino GE, Russell RB, Howse JL. Fighting for the next generation: US Prematurity in 2030. *Pediatrics*. 2014;134(6):1193-9.
20. Johnston KM, Gooch K, Korol E, Vo P, Eyawo O, Bradt P, et al. The economic burden of prematurity in Canada. *BMC Pediatr*. 2014;14:93.
21. Coalson JJ. Pathology of new bronchopulmonary dysplasia. *Semin Neonatol*. 2003;8(1):73-81.
22. Baraldi E, Filippone M. Chronic lung disease after premature birth. *N Engl J Med*. 2007;357(19):1946-55.
23. Gou X, Yang L, Pan L, Xiao D. Association between bronchopulmonary dysplasia and cerebral palsy in children: a meta-analysis. *BMJ Open*. 2018;8(9):e020735.

24. Baker CD, Abman SH. Impaired pulmonary vascular development in bronchopulmonary dysplasia. *Neonatology*. 2015;107(4):344-51.
25. Gallini F, Arena R, Stella G, Frezza S, Maggio L. Neurodevelopmental outcomes of premature infants with bronchopulmonary dysplasia. *Acta Biomed*. 2014;85(1):30-4.
26. Cheong JLY, Doyle LW. An update on pulmonary and neurodevelopmental outcomes of bronchopulmonary dysplasia. *Semin Perinatol*. 2018;42(7):478-84.
27. Sriram S, Schreiber MD, Msall ME, Kuban KCK, Joseph RM, TM OS, et al. Cognitive Development and Quality of Life Associated With BPD in 10-Year-Olds Born Preterm. *Pediatrics*. 2018;141(6).
28. Cheong JLY, Burnett AC, Lee KJ, Roberts G, Thompson DK, Wood SJ, et al. Association between Postnatal Dexamethasone for Treatment of Bronchopulmonary Dysplasia and Brain Volumes at Adolescence in Infants Born Very Preterm. *J Pediatr*. 2014;164(4):737-43.e1.
29. Sriram S, Condie J, Schreiber MD, Batton DG, Shah B, Bose C, et al. Early Blood Gas Predictors of Bronchopulmonary Dysplasia in Extremely Low Gestational Age Newborns. *International Journal of Pediatrics*. 2014;2014:210218.
30. Leviton A, Allred E, Kuban KCK, Dammann O, O'Shea TM, Hirtz D, et al. Early blood gas abnormalities and the preterm brain. *Am J Epidemiol*. 2010;172(8):907-16.
31. Natarajan G, Pappas A, Shankaran S, Kendrick DE, Das A, Higgins RD, et al. Outcomes of extremely low birth weight infants with bronchopulmonary dysplasia: impact of the physiologic definition. *Early Hum Dev*. 2012;88(7):509-15.
32. Boardman JP, Counsell SJ, Rueckert D, Hajnal JV, Bhatia KK, Srinivasan L, et al. Early growth in brain volume is preserved in the majority of preterm infants. *Ann Neurol*. 2007;62(2):185-92.
33. Anjari M, Counsell SJ, Srinivasan L, Allsop JM, Hajnal JV, Rutherford MA, et al. The association of lung disease with cerebral white matter abnormalities in preterm infants. *Pediatrics*. 2009;124(1):268-76.
34. Lee JM, Choi YH, Hong J, Kim NY, Kim E, Lim J, et al. Bronchopulmonary Dysplasia Is Associated with Altered Brain Volumes and White Matter Microstructure in Preterm Infants. *Neonatology*. 2019;116(2):163-70.

35. Ball G, Counsell SJ, Anjari M, Merchant N, Arichi T, Doria V, et al. An optimised tract-based spatial statistics protocol for neonates: applications to prematurity and chronic lung disease. *Neuroimage*. 2010;53(1):94-102.
36. Caplan MS, Fanaroff A. Necrotizing: A historical perspective. *Semin Perinatol*. 2017;41(1):2-6.
37. Patel BK, Shah JS. Necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants: a systemic review. *ISRN gastroenterology*. 2012;2012:562594-.
38. Rees CM, Pierro A, Eaton S. Neurodevelopmental outcomes of neonates with medically and surgically treated necrotizing enterocolitis. *Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition*. 2007;92(3):F193.
39. Hickey M, Georgieff M, Ramel S. Neurodevelopmental outcomes following necrotizing enterocolitis. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2018;23(6):426-32.
40. Adams-Chapman I. Necrotizing Enterocolitis and Neurodevelopmental Outcome. *Clin Perinatol*. 2018;45(3):453-66.
41. Schulzke SM, Deshpande GC, Patole SK. Neurodevelopmental Outcomes of Very Low-Birth-Weight Infants With Necrotizing Enterocolitis: A Systematic Review of Observational Studies. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine*. 2007;161(6):583-90.
42. Matei A, Montalva L, Goodbaum A, Lauriti G, Zani A. Neurodevelopmental impairment in necrotising enterocolitis survivors: systematic review and meta-analysis. *Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition*. 2020;105(4):432.
43. Denning TL, Bhatia AM, Kane AF, Patel RM, Denning PW. Pathogenesis of NEC: Role of the innate and adaptive immune response. *Semin Perinatol*. 2017;41(1):15-28.
44. Neu J, Walker WA. Necrotizing enterocolitis. *N Engl J Med*. 2011;364(3):255-64.
45. Brunse A, Abbaspour A, Sangild PT. Brain Barrier Disruption and Region-Specific Neuronal Degeneration during Necrotizing Enterocolitis in Preterm Pigs. *Dev Neurosci*. 2018;40(3):198-208.
46. Sun J, Pan X, Christiansen LI, Yuan X-L, Skovgaard K, Chatterton DEW, et al. Necrotizing enterocolitis is associated with acute brain responses in preterm pigs. *J Neuroinflammation*. 2018;15(1):180.

47. Niño DF, Zhou Q, Yamaguchi Y, Martin LY, Wang S, Fulton WB, et al. Cognitive impairments induced by necrotizing enterocolitis can be prevented by inhibiting microglial activation in mouse brain. *Science Translational Medicine*. 2018;10(471):eaan0237.
48. Biouss G, Antounians L, Li B, O'Connell JS, Seo S, Catania VD, et al. Experimental necrotizing enterocolitis induces neuroinflammation in the neonatal brain. *J Neuroinflammation*. 2019;16(1):97.
49. Cai S, Thompson DK, Anderson PJ, Yang JY. Short- and Long-Term Neurodevelopmental Outcomes of Very Preterm Infants with Neonatal Sepsis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Children (Basel)*. 2019;6(12).
50. Wynn JL. Defining neonatal sepsis. *Curr Opin Pediatr*. 2016;28(2).
51. Boghossian NS, Page GP, Bell EF, Stoll BJ, Murray JC, Cotten CM, et al. Late-onset sepsis in very low birth weight infants from singleton and multiple-gestation births. *J Pediatr*. 2013;162(6):1120-4, 4.e1.
52. Stoll BJ, Hansen NI, Adams-Chapman I, Fanaroff AA, Hintz SR, Vohr B, et al. Neurodevelopmental and growth impairment among extremely low-birth-weight infants with neonatal infection. *JAMA*. 2004;292(19):2357-65.
53. Stoll BJ, Hansen N, Fanaroff AA, Wright LL, Carlo WA, Ehrenkranz RA, et al. Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: the experience of the NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics*. 2002;110(2 Pt 1):285-91.
54. Benjamin DK, DeLong E, Cotten CM, Garges HP, Steinbach WJ, Clark RH. Mortality following blood culture in premature infants: increased with Gram-negative bacteremia and candidemia, but not Gram-positive bacteremia. *J Perinatol*. 2004;24(3):175-80.
55. van Vliet EO, de Kieviet JF, Oosterlaan J, van Elburg RM. Perinatal infections and neurodevelopmental outcome in very preterm and very low-birth-weight infants: a meta-analysis. *JAMA Pediatr*. 2013;167(7):662-8.
56. Hornik CP, Fort P, Clark RH, Watt K, Benjamin DK, Jr., Smith PB, et al. Early and late onset sepsis in very-low-birth-weight infants from a large group of neonatal intensive care units. *Early Hum Dev*. 2012;88 Suppl 2(Suppl 2):S69-74.
57. Stoll BJ, Hansen NI, Sánchez PJ, Faix RG, Poindexter BB, Van Meurs KP, et al. Early onset neonatal sepsis: the burden of group B Streptococcal and *E. coli* disease continues. *Pediatrics*. 2011;127(5):817-26.

58. Wynn JL, Hansen NI, Das A, Cotten CM, Goldberg RN, Sánchez PJ, et al. Early sepsis does not increase the risk of late sepsis in very low birth weight neonates. *J Pediatr*. 2013;162(5):942-8.e1-3.
59. Puopolo KM, Mukhopadhyay S, Hansen NI, Cotten CM, Stoll BJ, Sanchez PJ, et al. Identification of Extremely Premature Infants at Low Risk for Early-Onset Sepsis. *Pediatrics*. 2017;140(5).
60. Basu S, Agarwal P, Anupurba S, Shukla R, Kumar A. Elevated plasma and cerebrospinal fluid interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha concentration and combined outcome of death or abnormal neuroimaging in preterm neonates with early-onset clinical sepsis. *J Perinatol*. 2015;35(10):855-61.
61. Boardman JP, Ireland G, Sullivan G, Pataky R, Fleiss B, Gressens P, et al. The Cerebrospinal Fluid Inflammatory Response to Preterm Birth. *Front Physiol*. 2018;9:1299.
62. Rand KM, Austin NC, Inder TE, Bora S, Woodward LJ. Neonatal Infection and Later Neurodevelopmental Risk in the Very Preterm Infant. *J Pediatr*. 2016;170:97-104.
63. Kuban KCK, Joseph RM, O'Shea TM, Heeren T, Fichorova RN, Douglass L, et al. Circulating Inflammatory-Associated Proteins in the First Month of Life and Cognitive Impairment at Age 10 Years in Children Born Extremely Preterm. *J Pediatr*. 2017;180:116-23.e1.
64. Leviton A, Allred EN, Fichorova RN, Kuban KC, Michael O'Shea T, Dammann O. Systemic inflammation on postnatal days 21 and 28 and indicators of brain dysfunction 2 years later among children born before the 28th week of gestation. *Early Hum Dev*. 2016;93:25-32.
65. Glass TJA, Chau V, Grunau RE, Synnes A, Guo T, Duerden EG, et al. Multiple Postnatal Infections in Newborns Born Preterm Predict Delayed Maturation of Motor Pathways at Term-Equivalent Age with Poorer Motor Outcomes at 3 Years. *J Pediatr*. 2018;196:91-7.e1.
66. Volpe JJ. Brain injury in premature infants: a complex amalgam of destructive and developmental disturbances. *Lancet Neurol*. 2009;8(1):110-24.
67. Volpe JJ. Postnatal sepsis, necrotizing enterocolitis, and the critical role of systemic inflammation in white matter injury in premature infants. *J Pediatr*. 2008;153(2):160-3.
68. Leung MP, Thompson B, Black J, Dai S, Alsweiler JM. The effects of preterm birth on visual development. *Clin Exp Optom*. 2018;101(1):4-12.

69. Isaza G, Donaldson L, Chaudhary V. Increased incidence of retinopathy of prematurity and evolving treatment modalities at a Canadian tertiary centre. *Can J Ophthalmol.* 2019;54(2):269-74.
70. Beligere N, Perumalswamy V, Tandon M, Mittal A, Floora J, Vijayakumar B, et al. Retinopathy of prematurity and neurodevelopmental disabilities in premature infants. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2015;20(5):346-53.
71. Schmidt B, Davis PG, Asztalos EV, Solimano A, Roberts RS. Association Between Severe Retinopathy of Prematurity and Nonvisual Disabilities at Age 5 Years. *JAMA.* 2014;311(5):523-5.
72. Hellgren KM, Tornqvist K, Jakobsson PG, Lundgren P, Carlsson B, Källén K, et al. Ophthalmologic Outcome of Extremely Preterm Infants at 6.5 Years of Age: Extremely Preterm Infants in Sweden Study (EXPRESS). *JAMA Ophthalmol.* 2016;134(5):555-62.
73. Drost FJ, Keunen K, Moeskops P, Claessens NHP, van Kalken F, Išgum I, et al. Severe retinopathy of prematurity is associated with reduced cerebellar and brainstem volumes at term and neurodevelopmental deficits at 2 years. *Pediatr Res.* 2018;83(4):818-24.
74. Morken TS, Dammann O, Skranes J, Austeng D. Retinopathy of prematurity, visual and neurodevelopmental outcome, and imaging of the central nervous system. *Semin Perinatol.* 2019;43(6):381-9.
75. Sveinsdóttir K, Ley D, Hövel H, Fellman V, Hüppi PS, Smith LEH, et al. Relation of Retinopathy of Prematurity to Brain Volumes at Term Equivalent Age and Developmental Outcome at 2 Years of Corrected Age in Very Preterm Infants. *Neonatology.* 2018;114(1):46-52.
76. Msall ME, Phelps DL, DiGaudio KM, Dobson V, Tung B, McClead RE, et al. Severity of neonatal retinopathy of prematurity is predictive of neurodevelopmental functional outcome at age 5.5 years. Behalf of the Cryotherapy for Retinopathy of Prematurity Cooperative Group. *Pediatrics.* 2000;106(5):998-1005.
77. Thompson DK, Thai D, Kelly CE, Leemans A, Tournier J-D, Kean MJ, et al. Alterations in the optic radiations of very preterm children—Perinatal predictors and relationships with visual outcomes. *NeuroImage: Clinical.* 2014;4:145-53.
78. Ahn SJ, Park H-K, Lee BR, Lee HJ. Diffusion Tensor Imaging Analysis of White Matter Microstructural Integrity in Infants With Retinopathy of Prematurity. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 2019;60(8):3024-33.

79. Glass TJA, Chau V, Gardiner J, Foong J, Vinall J, Zwicker JG, et al. Severe retinopathy of prematurity predicts delayed white matter maturation and poorer neurodevelopment. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2017;102(6):F532-f7.
80. Inder TE, Perlman JM, Volpe JJ. Chapter 24 - Preterm Intraventricular Hemorrhage/Posthemorrhagic Hydrocephalus. In: Volpe JJ, Inder TE, Darras BT, de Vries LS, du Plessis AJ, Neil JJ, et al., editors. *Volpe's Neurology of the Newborn (Sixth Edition)*: Elsevier; 2018. p. 637-98.e21.
81. Gilard V, Tebani A, Bekri S, Marret S. Intraventricular Hemorrhage in Very Preterm Infants: A Comprehensive Review. *J Clin Med.* 2020;9(8).
82. Christian EA, Jin DL, Attenello F, Wen T, Cen S, Mack WJ, et al. Trends in hospitalization of preterm infants with intraventricular hemorrhage and hydrocephalus in the United States, 2000-2010. *J Neurosurg Pediatr.* 2016;17(3):260-9.
83. Back SA, Miller SP. 60 - Brain Injury in the Preterm Infant. In: Gleason CA, Juul SE, editors. *Avery's Diseases of the Newborn (Tenth Edition)*. Philadelphia: Content Repository Only!; 2018. p. 879-96.e6.
84. Papile L-A, Burstein J, Burstein R, Koffler H. Incidence and evolution of subependymal and intraventricular hemorrhage: A study of infants with birth weights less than 1,500 gm. *J Pediatr.* 1978;92(4):529-34.
85. Radic JA, Vincer M, McNeely PD. Outcomes of intraventricular hemorrhage and posthemorrhagic hydrocephalus in a population-based cohort of very preterm infants born to residents of Nova Scotia from 1993 to 2010. *J Neurosurg Pediatr.* 2015;15(6):580-8.
86. Bolisetty S, Dhawan A, Abdel-Latif M, Bajuk B, Stack J, Lui K. Intraventricular hemorrhage and neurodevelopmental outcomes in extreme preterm infants. *Pediatrics.* 2014;133(1):55-62.
87. Patra K, Wilson-Costello D, Taylor HG, Mercuri-Minich N, Hack M. Grades I-II intraventricular hemorrhage in extremely low birth weight infants: Effects on neurodevelopment. *J Pediatr.* 2006;149(2):169-73.
88. van de Bor M, den Ouden L. School performance in adolescents with and without periventricular-intraventricular hemorrhage in the neonatal period. *Semin Perinatol.* 2004;28(4):295-303.
89. Volpe JJ, Kinney HC, Jensen FE, Rosenberg PA. The developing oligodendrocyte: key cellular target in brain injury in the premature infant. *Int J Dev Neurosci.* 2011;29(4):423-40.



90. Pavlova MA, Krageloh-Mann I. Limitations on the developing preterm brain: impact of periventricular white matter lesions on brain connectivity and cognition. *Brain*. 2013;136(Pt 4):998-1011.
91. Neil JJ, Volpe JJ. Chapter 16 - Encephalopathy of Prematurity: Clinical-Neurological Features, Diagnosis, Imaging, Prognosis, Therapy. In: Volpe JJ, Inder TE, Darras BT, de Vries LS, du Plessis AJ, Neil JJ, et al., editors. *Volpe's Neurology of the Newborn (Sixth Edition)*: Elsevier; 2018. p. 425-57.e11.
92. Khwaja O, Volpe JJ. Pathogenesis of cerebral white matter injury of prematurity. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2008;93(2):F153-61.
93. Schmidt B, Asztalos EV, Roberts RS, Robertson CMT, Sauve RS, Whitfield MF, et al. Impact of Bronchopulmonary Dysplasia, Brain Injury, and Severe Retinopathy on the Outcome of Extremely Low-Birth-Weight Infants at 18 Months Results From the Trial of Indomethacin Prophylaxis in Preterms. *JAMA*. 2003;289(9):1124-9.
94. Bassler D, Stoll BJ, Schmidt B, Asztalos EV, Roberts RS, Robertson CMT, et al. Using a count of neonatal morbidities to predict poor outcome in extremely low birth weight infants: added role of neonatal infection. *Pediatrics*. 2009;123(1):313-8.
95. Manuck TA, Sheng X, Yoder BA, Varner MW. Correlation between initial neonatal and early childhood outcomes following preterm birth. *Am J Obstet Gynecol*. 2014;210(5):426.e1-9.
96. Schmidt B, Roberts RS, Davis PG, Doyle LW, Asztalos EV, Opie G, et al. Prediction of Late Death or Disability at Age 5 Years Using a Count of 3 Neonatal Morbidities in Very Low Birth Weight Infants. *J Pediatr*. 2015;167(5):982-6.e2.
97. Koo KY, Kim JE, Lee SM, Namgung R, Park MS, Park KI, et al. Effect of severe neonatal morbidities on long term outcome in extremely low birthweight infants. *Clin Exp Pediatr*. 2010;53(6):694-700.
98. Korzeniewski SJ, Romero R, Cortez J, Pappas A, Schwartz AG, Kim CJ, et al. A "multi-hit" model of neonatal white matter injury: cumulative contributions of chronic placental inflammation, acute fetal inflammation and postnatal inflammatory events. *J Perinat Med*. 2014;42(6):731-43.
99. Matute C, Ransom BR. Roles of white matter in central nervous system pathophysiologies. *ASN neuro*. 2012;4(2):e00079.

100. Dubois J, Dehaene-Lambertz G, Kulikova S, Poupon C, Hüppi PS, Hertz-Pannier L. The early development of brain white matter: A review of imaging studies in fetuses, newborns and infants. *Neuroscience*. 2014;276:48-71.
101. Narvacan K, Treit S, Camicioli R, Martin W, Beaulieu C. Evolution of deep gray matter volume across the human lifespan. *Hum Brain Mapp*. 2017;38(8):3771-90.
102. Mottahedin A, Ardalan M, Chumak T, Riebe I, Ek J, Mallard C. Effect of Neuroinflammation on Synaptic Organization and Function in the Developing Brain: Implications for Neurodevelopmental and Neurodegenerative Disorders. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2017;11(190).
103. Back SA, Volpe JJ. Chapter 15 - Encephalopathy of Prematurity: Pathophysiology. In: Volpe JJ, Inder TE, Darras BT, de Vries LS, du Plessis AJ, Neil JJ, et al., editors. *Volpe's Neurology of the Newborn (Sixth Edition)*: Elsevier; 2018. p. 405-24.e8.
104. Volpe JJ. Neonatal neurology--my personal journey and some lessons learned. *Pediatr Neurol*. 2014;51 6:753-7.
105. Kinney HC, Volpe JJ. Chapter 14 - Encephalopathy of Prematurity: Neuropathology. In: Volpe JJ, Inder TE, Darras BT, de Vries LS, du Plessis AJ, Neil JJ, et al., editors. *Volpe's Neurology of the Newborn (Sixth Edition)*: Elsevier; 2018. p. 389-404.
106. Keller D, Erö C, Markram H. Cell Densities in the Mouse Brain: A Systematic Review. *Frontiers in neuroanatomy*. 2018;12:83-.
107. Silbereis JC, Pochareddy S, Zhu Y, Li M, Sestan N. The Cellular and Molecular Landscapes of the Developing Human Central Nervous System. *Neuron*. 2016;89(2):248-68.
108. Poduri A, Volpe JJ. Chapter 5 - Neuronal Proliferation. In: Volpe JJ, Inder TE, Darras BT, de Vries LS, du Plessis AJ, Neil JJ, et al., editors. *Volpe's Neurology of the Newborn (Sixth Edition)*: Elsevier; 2018. p. 100-19.e6.
109. Fleiss B, Stolp H, Mezger V, Gressens P. 58 - Central Nervous System Development. In: Gleason CA, Juul SE, editors. *Avery's Diseases of the Newborn (Tenth Edition)*. Philadelphia: Content Repository Only!; 2018. p. 852-6.e1.
110. Kuhn S, Gritti L, Crooks D, Dombrowski Y. Oligodendrocytes in Development, Myelin Generation and Beyond. *Cells*. 2019;8(11).
111. Simons M, Nave KA. Oligodendrocytes: Myelination and Axonal Support. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015;8(1):a020479.

112. Nave KA, Werner HB. Myelination of the nervous system: mechanisms and functions. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2014;30:503-33.
113. Maki T, Liang A, Miyamoto N, Lo E, Arai K. Mechanisms of oligodendrocyte regeneration from ventricular-subventricular zone-derived progenitor cells in white matter diseases. *Frontiers in Cellular Neuroscience.* 2013;7(275).
114. Marinelli C, Bertalot T, Zusso M, Skaper SD, Giusti P. Systematic Review of Pharmacological Properties of the Oligodendrocyte Lineage. *Frontiers in Cellular Neuroscience.* 2016;10(27).
115. Pepper RE, Pitman KA, Cullen CL, Young KM. How Do Cells of the Oligodendrocyte Lineage Affect Neuronal Circuits to Influence Motor Function, Memory and Mood? *Frontiers in Cellular Neuroscience.* 2018;12(399).
116. Wilkins A, Chandran S, Compston A. A role for oligodendrocyte-derived IGF-1 in trophic support of cortical neurons. *Glia.* 2001;36(1):48-57.
117. Lee Y, Morrison BM, Li Y, Lengacher S, Farah MH, Hoffman PN, et al. Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration. *Nature.* 2012;487(7408):443-8.
118. Linker RA, Lee DH, Demir S, Wiese S, Kruse N, Siglienti I, et al. Functional role of brain-derived neurotrophic factor in neuroprotective autoimmunity: therapeutic implications in a model of multiple sclerosis. *Brain.* 2010;133(Pt 8):2248-63.
119. Rajani RM, Williams A. Endothelial cell-oligodendrocyte interactions in small vessel disease and aging. *Clinical science (London, England : 1979).* 2017;131(5):369-79.
120. Back SA. White matter injury in the preterm infant: pathology and mechanisms. *Acta Neuropathol.* 2017.
121. Kierdorf K, Erny D, Goldmann T, Sander V, Schulz C, Perdiguero EG, et al. Microglia emerge from erythromyeloid precursors via Pu.1- and Irf8-dependent pathways. *Nat Neurosci.* 2013;16(3):273-80.
122. Monier A, Adle-Biassette H, Delezoide AL, Evrard P, Gressens P, Verney C. Entry and distribution of microglial cells in human embryonic and fetal cerebral cortex. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2007;66(5):372-82.

123. Monier A, Evrard P, Gressens P, Verney C. Distribution and differentiation of microglia in the human encephalon during the first two trimesters of gestation. *J Comp Neurol*. 2006;499(4):565-82.
124. Rezaie P, Dean A, Male D, Ulfing N. Microglia in the cerebral wall of the human telencephalon at second trimester. *Cereb Cortex*. 2005;15(7):938-49.
125. Pogledic I, Kostovic I, Fallet-Bianco C, Adle-Biassette H, Gressens P, Verney C. Involvement of the subplate zone in preterm infants with periventricular white matter injury. *Brain Pathol*. 2014;24(2):128-41.
126. Alliot F, Godin I, Pessac B. Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. *Brain Res Dev Brain Res*. 1999;117(2):145-52.
127. Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, et al. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science*. 2010;330(6005):841-5.
128. Ajami B, Bennett JL, Krieger C, Tetzlaff W, Rossi FMV. Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat Neurosci*. 2007;10(12):1538-43.
129. Bruttger J, Karram K, Wörtge S, Regen T, Marini F, Hoppmann N, et al. Genetic Cell Ablation Reveals Clusters of Local Self-Renewing Microglia in the Mammalian Central Nervous System. *Immunity*. 2015;43(1):92-106.
130. Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, et al. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci*. 2005;8(6):752-8.
131. Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*. 2005;308(5726):1314-8.
132. Colton CA. Heterogeneity of microglial activation in the innate immune response in the brain. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2009;4(4):399-418.
133. Mallard C, Tremblay M-E, Vexler ZS. Microglia and Neonatal Brain Injury. *Neuroscience*. 2019;405:68-76.
134. Pierre WC, Smith PLP, Londono I, Chemtob S, Mallard C, Lodygensky GA. Neonatal microglia: The cornerstone of brain fate. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2017;59:333-45.

135. Mishra BB, Mishra PK, Teale JM. Expression and distribution of Toll-like receptors in the brain during murine neurocysticercosis. *J Neuroimmunol.* 2006;181(1-2):46-56.
136. Pierre WC, Smith PL, Londono I, Chemtob S, Mallard C, Lodygensky GA. Neonatal microglia: The cornerstone of brain fate. *Brain Behav Immun.* 2016.
137. Supramaniam V, Vontell R, Srinivasan L, Wyatt-Ashmead J, Hagberg H, Rutherford M. Microglia activation in the extremely preterm human brain. *Pediatr Res.* 2013;73(3):301-9.
138. Lenz KM, Nelson LH. Microglia and Beyond: Innate Immune Cells As Regulators of Brain Development and Behavioral Function. *Frontiers in immunology.* 2018;9:698-.
139. Reemst K, Noctor SC, Lucassen PJ, Hol EM. The Indispensable Roles of Microglia and Astrocytes during Brain Development. *Frontiers in human neuroscience.* 2016;10:566-.
140. Schafer DP, Lehrman EK, Kautzman AG, Koyama R, Mardinly AR, Yamasaki R, et al. Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron.* 2012;74(4):691-705.
141. Stevens B, Allen NJ, Vazquez LE, Howell GR, Christopherson KS, Nouri N, et al. The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell.* 2007;131(6):1164-78.
142. Zhan Y, Paolicelli RC, Sforzini F, Weinhard L, Bolasco G, Pagani F, et al. Deficient neuron-microglia signaling results in impaired functional brain connectivity and social behavior. *Nat Neurosci.* 2014;17(3):400-6.
143. Hoshiko M, Arnoux I, Avignone E, Yamamoto N, Audinat E. Deficiency of the microglial receptor CX3CR1 impairs postnatal functional development of thalamocortical synapses in the barrel cortex. *J Neurosci.* 2012;32(43):15106-11.
144. Paolicelli RC, Bolasco G, Pagani F, Maggi L, Scianni M, Panzanelli P, et al. Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science.* 2011;333(6048):1456-8.
145. Mosher KI, Andres RH, Fukuhara T, Bieri G, Hasegawa-Moriyama M, He Y, et al. Neural progenitor cells regulate microglia functions and activity. *Nat Neurosci.* 2012;15(11):1485-7.
146. Cunningham CL, Martinez-Cerdeno V, Noctor SC. Microglia regulate the number of neural precursor cells in the developing cerebral cortex. *J Neurosci.* 2013;33(10):4216-33.

147. Arno B, Grassivaro F, Rossi C, Bergamaschi A, Castiglioni V, Furlan R, et al. Neural progenitor cells orchestrate microglia migration and positioning into the developing cortex. *Nat Commun.* 2014;5:5611.
148. Gao M, Dong Q, Yao H, Zhang Y, Yang Y, Dang Y, et al. Induced neural stem cells modulate microglia activation states via CXCL12/CXCR4 signaling. *Brain, Behavior, and Immunity.* 2017;59:288-99.
149. Squarzoni P, Oller G, Hoeffel G, Pont-Lezica L, Rostaing P, Low D, et al. Microglia modulate wiring of the embryonic forebrain. *Cell Rep.* 2014;8(5):1271-9.
150. Pont-Lezica L, Beumer W, Colasse S, Drexhage H, Versnel M, Bessis A. Microglia shape corpus callosum axon tract fasciculation: functional impact of prenatal inflammation. *Eur J Neurosci.* 2014;39(10):1551-7.
151. Shigemoto-Mogami Y, Hoshikawa K, Goldman JE, Sekino Y, Sato K. Microglia Enhance Neurogenesis and Oligodendrogenesis in the Early Postnatal Subventricular Zone. *J Neurosci.* 2014;34(6):2231-43.
152. Ueno M, Fujita Y, Tanaka T, Nakamura Y, Kikuta J, Ishii M, et al. Layer V cortical neurons require microglial support for survival during postnatal development. *Nat Neurosci.* 2013;16(5):543-51.
153. Peferoen L, Kipp M, van der Valk P, van Noort JM, Amor S. Oligodendrocyte-microglia cross-talk in the central nervous system. *Immunology.* 2014;141(3):302-13.
154. Pang Y, Fan LW, Tien LT, Dai X, Zheng B, Cai Z, et al. Differential roles of astrocyte and microglia in supporting oligodendrocyte development and myelination in vitro. *Brain Behav.* 2013;3(5):503-14.
155. Hamilton SP, Rome LH. Stimulation of in vitro myelin synthesis by microglia. *Glia.* 1994;11(4):326-35.
156. Gitik M, Liraz-Zaltsman S, Oldenburg PA, Reichert F, Rotshenker S. Myelin down-regulates myelin phagocytosis by microglia and macrophages through interactions between CD47 on myelin and SIRPalpha (signal regulatory protein-alpha) on phagocytes. *J Neuroinflammation.* 2011;8:24.
157. Kubota Y, Takubo K, Shimizu T, Ohno H, Kishi K, Shibuya M, et al. M-CSF inhibition selectively targets pathological angiogenesis and lymphangiogenesis. *J Exp Med.* 2009;206(5):1089-102.

158. Fantin A, Vieira JM, Gestri G, Denti L, Schwarz Q, Prykhozhiy S, et al. Tissue macrophages act as cellular chaperones for vascular anastomosis downstream of VEGF-mediated endothelial tip cell induction. *Blood*. 2010;116(5):829-40.
159. Checchin D, Sennlaub F, Levavasseur E, Leduc M, Chemtob S. Potential role of microglia in retinal blood vessel formation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47(8):3595-602.
160. Prinz M, Priller J. Microglia and brain macrophages in the molecular age: from origin to neuropsychiatric disease. *Nat Rev Neurosci*. 2014;15(5):300-12.
161. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*. 2004;25(12):677-86.
162. Chhor V, Le Charpentier T, Lebon S, Oré M-V, Celador IL, Josserand J, et al. Characterization of phenotype markers and neuronotoxic potential of polarised primary microglia in vitro. *Brain Behav Immun*. 2013;32(0):70-85.
163. Liddelow SA, Guttenplan KA, Clarke LE, Bennett FC, Bohlen CJ, Schirmer L, et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*. 2017;541(7638):481-7.
164. Butovsky O, Ziv Y, Schwartz A, Landa G, Talpalar AE, Pluchino S, et al. Microglia activated by IL-4 or IFN-gamma differentially induce neurogenesis and oligodendrogenesis from adult stem/progenitor cells. *Mol Cell Neurosci*. 2006;31(1):149-60.
165. Pang Y, Cai Z, Rhodes PG. Effects of lipopolysaccharide on oligodendrocyte progenitor cells are mediated by astrocytes and microglia. *J Neurosci Res*. 2000;62(4):510-20.
166. Colton CA, Mott RT, Sharpe H, Xu Q, Van Nostrand WE, Vitek MP. Expression profiles for macrophage alternative activation genes in AD and in mouse models of AD. *J Neuroinflammation*. 2006;3(1):1-12.
167. Rossi C, Cusimano M, Zambito M, Finardi A, Capotondo A, Garcia-Manteiga JM, et al. Interleukin 4 modulates microglia homeostasis and attenuates the early slowly progressive phase of amyotrophic lateral sclerosis. *Cell Death & Disease*. 2018;9(2):250.
168. Quarta A, Berneman Z, Ponsaerts P. Neuroprotective modulation of microglia effector functions following priming with interleukin 4 and 13: current limitations in understanding their mode-of-action. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2020;88:856-66.

169. Serdar M, Kempe K, Rizazad M, Herz J, Bendix I, Felderhoff-Müser U, et al. Early Pro-inflammatory Microglia Activation After Inflammation-Sensitized Hypoxic-Ischemic Brain Injury in Neonatal Rats. *Front Cell Neurosci.* 2019;13:237.
170. Kim S, Kim YE, Hong S, Kim K-T, Sung DK, Lee Y, et al. Reactive microglia and astrocytes in neonatal intraventricular hemorrhage model are blocked by mesenchymal stem cells. *Glia.* 2020;68(1):178-92.
171. Ransohoff RM. A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist? *Nat Neurosci.* 2016;19(8):987-91.
172. Brykczynska U, Geigges M, Wiedemann SJ, Dror E, Böni-Schnetzler M, Hess C, et al. Distinct Transcriptional Responses across Tissue-Resident Macrophages to Short-Term and Long-Term Metabolic Challenge. *Cell Reports.* 2020;30(5):1627-43.e7.
173. Chiu IM, Morimoto ET, Goodarzi H, Liao JT, O'Keeffe S, Phatnani HP, et al. A neurodegeneration-specific gene-expression signature of acutely isolated microglia from an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Cell Rep.* 2013;4(2):385-401.
174. Kim CC, Nakamura MC, Hsieh CL. Brain trauma elicits non-canonical macrophage activation states. *J Neuroinflammation.* 2016;13(1):117.
175. Hsieh CL, Kim CC, Ryba BE, Niemi EC, Bando JK, Locksley RM, et al. Traumatic brain injury induces macrophage subsets in the brain. *Eur J Immunol.* 2013;43(8):2010-22.
176. Hellström Erkenstam N, Smith PLP, Fleiss B, Nair S, Svedin P, Wang W, et al. Temporal Characterization of Microglia/Macrophage Phenotypes in a Mouse Model of Neonatal Hypoxic-Ischemic Brain Injury. *Frontiers in Cellular Neuroscience.* 2016;10(286).
177. Xue J, Schmidt SV, Sander J, Draffehn A, Krebs W, Quester I, et al. Transcriptome-based network analysis reveals a spectrum model of human macrophage activation. *Immunity.* 2014;40(2):274-88.
178. He F, Sun YE. Glial cells more than support cells? *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(4):661-5.
179. Barres BA. The Mystery and Magic of Glia: A Perspective on Their Roles in Health and Disease. *Neuron.* 2008;60(3):430-40.
180. Kang P, Lee HK, Glasgow SM, Finley M, Donti T, Gaber ZB, et al. Sox9 and NFIA coordinate a transcriptional regulatory cascade during the initiation of gliogenesis. *Neuron.* 2012;74(1):79-94.



181. Schiweck J, Eickholt BJ, Murk K. Important Shapeshifter: Mechanisms Allowing Astrocytes to Respond to the Changing Nervous System During Development, Injury and Disease. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2018;12(261).
182. Martini S, Bernoth K, Main H, Ortega GDC, Lendahl U, Just U, et al. A Critical Role for Sox9 in Notch-Induced Astroglialogenesis and Stem Cell Maintenance. *Stem Cells*. 2013;31(4):741-51.
183. Molofsky AV, Deneen B. Astrocyte development: A Guide for the Perplexed. *Glia*. 2015;63(8):1320-9.
184. Oberheim NA, Takano T, Han X, He W, Lin JHC, Wang F, et al. Uniquely hominid features of adult human astrocytes. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2009;29(10):3276-87.
185. Tabata H. Diverse subtypes of astrocytes and their development during corticogenesis. *Frontiers in Neuroscience*. 2015;9(114).
186. Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2010;119(1):7-35.
187. Araque A, Carmignoto G, Haydon PG, Oliet SH, Robitaille R, Volterra A. Gliotransmitters travel in time and space. *Neuron*. 2014;81(4):728-39.
188. Colombo E, Farina C. Astrocytes: Key Regulators of Neuroinflammation. *Trends Immunol*. 2016;37(9):608-20.
189. Lundgaard I, Osório MJ, Kress BT, Sanggaard S, Nedergaard M. White matter astrocytes in health and disease. *Neuroscience*. 2014;276:161-73.
190. Liddelow SA, Barres BA. Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential. *Immunity*. 2017;46(6):957-67.
191. Zamanian JL, Xu L, Foo LC, Nouri N, Zhou L, Giffard RG, et al. Genomic analysis of reactive astrogliosis. *J Neurosci*. 2012;32(18):6391-410.
192. Yun SP, Kam T-I, Panicker N, Kim S, Oh Y, Park J-S, et al. Block of A1 astrocyte conversion by microglia is neuroprotective in models of Parkinson's disease. *Nat Med*. 2018;24(7):931-8.

193. Joshi AU, Minhas PS, Liddel SA, Haileselassie B, Andreasson KI, Dorn GW, 2nd, et al. Fragmented mitochondria released from microglia trigger A1 astrocytic response and propagate inflammatory neurodegeneration. *Nat Neurosci.* 2019;22(10):1635-48.
194. Clark DPQ, Perreau VM, Shultz SR, Brady RD, Lei E, Dixit S, et al. Inflammation in Traumatic Brain Injury: Roles for Toxic A1 Astrocytes and Microglial-Astrocytic Crosstalk. *Neurochem Res.* 2019;44(6):1410-24.
195. Wei X, Cho KS, Thee EF, Jager MJ, Chen DF. Neuroinflammation and microglia in glaucoma: time for a paradigm shift. *J Neurosci Res.* 2019;97(1):70-6.
196. Liu L-r, Liu J-c, Bao J-s, Bai Q-q, Wang G-q. Interaction of Microglia and Astrocytes in the Neurovascular Unit. *Frontiers in Immunology.* 2020;11(1024).
197. Norden DM, Trojanowski PJ, Villanueva E, Navarro E, Godbout JP. Sequential activation of microglia and astrocyte cytokine expression precedes increased Iba-1 or GFAP immunoreactivity following systemic immune challenge. *Glia.* 2016;64(2):300-16.
198. Lian H, Litvinchuk A, Chiang ACA, Aithmitti N, Jankowsky JL, Zheng H. Astrocyte-Microglia Cross Talk through Complement Activation Modulates Amyloid Pathology in Mouse Models of Alzheimer's Disease. *The Journal of Neuroscience.* 2016;36(2):577.
199. Chen T, Lennon VA, Liu YU, Bosco DB, Li Y, Yi M-H, et al. Astrocyte-microglia interaction drives evolving neuromyelitis optica lesion. *The Journal of Clinical Investigation.* 2020;130(8):4025-38.
200. Bi F, Huang C, Tong J, Qiu G, Huang B, Wu Q, et al. Reactive astrocytes secrete lcn2 to promote neuron death. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(10):4069-74.
201. Jang E, Kim J-H, Lee S, Kim J-H, Seo J-W, Jin M, et al. Phenotypic Polarization of Activated Astrocytes: the Critical Role of Lipocalin-2 in the Classical Inflammatory Activation of Astrocytes. *The Journal of Immunology.* 2013:1301637.
202. Lee S, Jha MK, Suk K. Lipocalin-2 in the Inflammatory Activation of Brain Astrocytes. *Crit Rev Immunol.* 2015;35(1):77-84.
203. Kim J-H, Ko P-W, Lee H-W, Jeong J-Y, Lee M-G, Kim J-H, et al. Astrocyte-derived lipocalin-2 mediates hippocampal damage and cognitive deficits in experimental models of vascular dementia. *Glia.* 2017;65(9):1471-90.

204. Zhao N, Xu X, Jiang Y, Gao J, Wang F, Xu X, et al. Lipocalin-2 may produce damaging effect after cerebral ischemia by inducing astrocytes classical activation. *J Neuroinflammation*. 2019;16(1):168.
205. Norden DM, Fenn AM, Dugan A, Godbout JP. TGF $\beta$  produced by IL-10 redirected astrocytes attenuates microglial activation. *Glia*. 2014;62(6):881-95.
206. Villacampa N, Almolda B, Vilella A, Campbell IL, González B, Castellano B. Astrocyte-targeted production of IL-10 induces changes in microglial reactivity and reduces motor neuron death after facial nerve axotomy. *Glia*. 2015;63(7):1166-84.
207. Jo M, Kim JH, Song GJ, Seo M, Hwang EM, Suk K. Astrocytic Orosomucoid-2 Modulates Microglial Activation and Neuroinflammation. *J Neurosci*. 2017;37(11):2878-94.
208. Arnold P, Rickert U, Helmers AK, Spreu J, Schneppenheim J, Lucius R. Trefoil factor 3 shows anti-inflammatory effects on activated microglia. *Cell Tissue Res*. 2016;365(1):3-11.
209. Recasens M, Shrivastava K, Almolda B, González B, Castellano B. Astrocyte-targeted IL-10 production decreases proliferation and induces a downregulation of activated microglia/macrophages after PPT. *Glia*. 2019;67(4):741-58.
210. Jha MK, Jo M, Kim JH, Suk K. Microglia-Astrocyte Crosstalk: An Intimate Molecular Conversation. *Neuroscientist*. 2019;25(3):227-40.
211. Grover VPB, Tognarelli JM, Crossey MME, Cox IJ, Taylor-Robinson SD, McPhail MJW. Magnetic Resonance Imaging: Principles and Techniques: Lessons for Clinicians. *Journal of clinical and experimental hepatology*. 2015;5(3):246-55.
212. Huppi PS, Inder TE. Magnetic resonance techniques in the evaluation of the perinatal brain: recent advances and future directions. *Semin Neonatol*. 2001;6(2):195-210.
213. Neil JJ, Inder TE. 63 - Neonatal Neuroimaging. In: Gleason CA, Juul SE, editors. *Avery's Diseases of the Newborn (Tenth Edition)*. Philadelphia: Content Repository Only!; 2018. p. 922-51.e5.
214. Dyet LE, Kennea N, Counsell SJ, Maalouf EF, Ajayi-Obe M, Duggan PJ, et al. Natural history of brain lesions in extremely preterm infants studied with serial magnetic resonance imaging from birth and neurodevelopmental assessment. *Pediatrics*. 2006;118(2):536-48.
215. Counsell SJ, Rutherford MA, Cowan FM, Edwards AD. Magnetic resonance imaging of preterm brain injury. *Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition*. 2003;88(4):F269.

216. Maalouf EF, Duggan PJ, Rutherford MA, Counsell SJ, Fletcher AM, Battin M, et al. Magnetic resonance imaging of the brain in a cohort of extremely preterm infants. *J Pediatr*. 1999;135(3):351-7.
217. Maalouf EF, Duggan PJ, Counsell SJ, Rutherford MA, Cowan F, Azzopardi D, et al. Comparison of findings on cranial ultrasound and magnetic resonance imaging in preterm infants. *Pediatrics*. 2001;107(4):719-27.
218. Nguyen ALA, Ding Y, Suffren S, Londono I, Luck D, Lodygensky GA. The brain's kryptonite: Overview of punctate white matter lesions in neonates. *Int J Dev Neurosci*. 2019.
219. Hinojosa-Rodríguez M, Harmony T, Carrillo-Prado C, Van Horn JD, Irimia A, Torgerson C, et al. Clinical neuroimaging in the preterm infant: Diagnosis and prognosis. *NeuroImage: Clinical*. 2017;16:355-68.
220. Alexander AL, Lee JE, Lazar M, Field AS. Diffusion tensor imaging of the brain. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*. 2007;4(3):316-29.
221. Mukherjee P, Berman JI, Chung SW, Hess CP, Henry RG. Diffusion Tensor MR Imaging and Fiber Tractography: Theoretic Underpinnings. *American Journal of Neuroradiology*. 2008;29(4):632.
222. Inder TE, Huppi PS. In vivo studies of brain development by magnetic resonance techniques. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*. 2000;6(1):59-67.
223. Huisman TAGM. Diffusion-weighted and diffusion tensor imaging of the brain, made easy. *Cancer imaging : the official publication of the International Cancer Imaging Society*. 2010;10 Spec no A(1A):S163-S71.
224. Tuor UI, Morgunov M, Sule M, Qiao M, Clark D, Rushforth D, et al. Cellular correlates of longitudinal diffusion tensor imaging of axonal degeneration following hypoxic–ischemic cerebral infarction in neonatal rats. *NeuroImage: Clinical*. 2014;6:32-42.
225. Zhang J, Aggarwal M, Mori S. Structural insights into the rodent CNS via diffusion tensor imaging. *Trends Neurosci*. 2012;35(7):412-21.
226. Song SK, Yoshino J, Le TQ, Lin SJ, Sun SW, Cross AH, et al. Demyelination increases radial diffusivity in corpus callosum of mouse brain. *Neuroimage*. 2005;26(1):132-40.

227. Song SK, Sun SW, Ju WK, Lin SJ, Cross AH, Neufeld AH. Diffusion tensor imaging detects and differentiates axon and myelin degeneration in mouse optic nerve after retinal ischemia. *Neuroimage*. 2003;20(3):1714-22.
228. Song SK, Sun SW, Ramsbottom MJ, Chang C, Russell J, Cross AH. Dysmyelination revealed through MRI as increased radial (but unchanged axial) diffusion of water. *Neuroimage*. 2002;17(3):1429-36.
229. Counsell SJ, Shen Y, Boardman JP, Larkman DJ, Kapellou O, Ward P, et al. Axial and Radial Diffusivity in Preterm Infants Who Have Diffuse White Matter Changes on Magnetic Resonance Imaging at Term-Equivalent Age. *Pediatrics*. 2006;117(2):376.
230. Zhuo J, Xu S, Proctor JL, Mullins RJ, Simon JZ, Fiskum G, et al. Diffusion kurtosis as an in vivo imaging marker for reactive astrogliosis in traumatic brain injury. *Neuroimage*. 2012;59(1):467-77.
231. Singh K, Trivedi R, Devi MM, Tripathi RP, Khushu S. Longitudinal changes in the DTI measures, anti-GFAP expression and levels of serum inflammatory cytokines following mild traumatic brain injury. *Exp Neurol*. 2016;275 Pt 3:427-35.
232. Qiu A, Mori S, Miller MI. Diffusion tensor imaging for understanding brain development in early life. *Annu Rev Psychol*. 2015;66:853-76.
233. Rose J, Vassar R, Cahill-Rowley K, Guzman XS, Stevenson DK, Barnea-Goraly N. Brain microstructural development at near-term age in very-low-birth-weight preterm infants: An atlas-based diffusion imaging study. *Neuroimage*. 2014;86:244-56.
234. Neil JJ, Shiran SI, McKinstry RC, Schefft GL, Snyder AZ, Almlí CR, et al. Normal brain in human newborns: apparent diffusion coefficient and diffusion anisotropy measured by using diffusion tensor MR imaging. *Radiology*. 1998;209(1):57-66.
235. Lodygensky GA, Inder TE, Neil JJ. Application of magnetic resonance imaging in animal models of perinatal hypoxic-ischemic cerebral injury. *Int J Dev Neurosci*. 2008;26(1):13-25.
236. Bertholdo D, Watcharakorn A, Castillo M. Brain Proton Magnetic Resonance Spectroscopy: Introduction and Overview. *Neuroimaging Clin N Am*. 2013;23(3):359-80.
237. Roelants-Van Rijn AM, van der Grond J, de Vries LS, Groenendaal F. Value of 1H-MRS Using Different Echo Times in Neonates with Cerebral Hypoxia-Ischemia. *Pediatr Res*. 2001;49(3):356-62.

238. Chau V, Brant R, Poskitt KJ, Tam EW, Synnes A, Miller SP. Postnatal infection is associated with widespread abnormalities of brain development in premature newborns. *Pediatr Res.* 2012;71(3):274-9.
239. Kreis R, Hofmann L, Kuhlmann B, Boesch C, Bossi E, Hüppi PS. Brain metabolite composition during early human brain development as measured by quantitative in vivo <sup>1</sup>H magnetic resonance spectroscopy. *Magn Reson Med.* 2002;48(6):949-58.
240. Sorokan ST, Jefferies AL, Miller SP. L'imagerie du cerveau du nouveau-né à terme. *Paediatrics & Child Health.* 2018;23(5):329-35.
241. Jin C, Londono I, Mallard C, Lodygensky GA. New means to assess neonatal inflammatory brain injury. *J Neuroinflammation.* 2015;12(1):180.
242. van Wezel-Meijler G, Steggerda SJ, Leijser LM. Cranial ultrasonography in neonates: role and limitations. *Semin Perinatol.* 2010;34(1):28-38.
243. Groenendaal F, de Vries LS. Fifty years of brain imaging in neonatal encephalopathy following perinatal asphyxia. *Pediatr Res.* 2017;81(1-2):150-5.
244. Guillot M, Chau V, Lemyre B. Routine imaging of the preterm neonatal brain. *Paediatr Child Health.* 2020;25(4):249-62.
245. Krille L, Dreger S, Schindel R, Albrecht T, Asmussen M, Barkhausen J, et al. Risk of cancer incidence before the age of 15 years after exposure to ionising radiation from computed tomography: results from a German cohort study. *Radiat Environ Biophys.* 2015;54(1):1-12.
246. Inder T, Hüppi PS, Zientara GP, Maier SE, Jolesz FA, di Salvo D, et al. Early detection of periventricular leukomalacia by diffusion-weighted magnetic resonance imaging techniques. *J Pediatr.* 1999;134(5):631-4.
247. Inder TE, Anderson NJ, Spencer C, Wells S, Volpe JJ. White matter injury in the premature infant: a comparison between serial cranial sonographic and MR findings at term. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2003;24(5):805-9.
248. Miller SP, Cozzio CC, Goldstein RB, Ferriero DM, Partridge JC, Vigneron DB, et al. Comparing the diagnosis of white matter injury in premature newborns with serial MR imaging and transfontanel ultrasonography findings. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2003;24(8):1661-9.
249. Rademaker KJ, Uiterwaal CSPM, Beek FJA, van Haastert IC, Liefstink AF, Groenendaal F, et al. Neonatal cranial ultrasound versus MRI and neurodevelopmental outcome at school age in children born preterm. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2005;90(6):F489-F93.

250. Horsch S, Skiöld B, Hallberg B, Nordell B, Nordell A, Mosskin M, et al. Cranial ultrasound and MRI at term age in extremely preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2010;95(5):F310-4.
251. Arthurs OJ, Edwards A, Austin T, Graves MJ, Lomas DJ. The challenges of neonatal magnetic resonance imaging. *Pediatr Radiol.* 2012;42(10):1183-94.
252. Tkach JA, Hillman NH, Jobe AH. An MRI system for imaging neonates in the NICU: initial feasibility study. *Pediatr Radiol.* 2012;42:1347.
253. Tkach JA, Merhar SL, Kline-Fath BM, Pratt RG, Loew WM, Daniels BR, et al. MRI in the Neonatal ICU: Initial Experience Using a Small-Footprint 1.5-T System. *Am J Roentgenol.* 2013;202(1):W95-W105.
254. Griffiths PD, Jarvis D, Armstrong L, Connolly DJA, Bayliss P, Cook J, et al. Initial experience of an investigational 3T MR scanner designed for use on neonatal wards. *Eur Radiol.* 2018;28(10):4438-46.
255. Merhar SL, Tkach JA, Woods JC, South AP, Wiland EL, Rattan MS, et al. Neonatal imaging using an on-site small footprint MR scanner. *Pediatr Radiol.* 2017;47(8):1001-11.
256. Ireland CM, Giaquinto RO, Loew W, Tkach JA, Pratt RG, Kline-Fath BM, et al. A novel acoustically quiet coil for neonatal MRI system. *Concepts Magn Reson Part B Magn Reson Eng.* 2015;45(3):107-14.
257. Thompson DK, Kelly CE, Chen J, Beare R, Alexander B, Seal ML, et al. Characterisation of brain volume and microstructure at term-equivalent age in infants born across the gestational age spectrum. *NeuroImage: Clinical.* 2019;21:101630.
258. Giménez M, Junqué C, Narberhaus A, Caldú X, Salgado-Pineda P, Bargalló N, et al. Hippocampal gray matter reduction associates with memory deficits in adolescents with history of prematurity. *Neuroimage.* 2004;23(3):869-77.
259. Thompson DK, Warfield SK, Carlin JB, Pavlovic M, Wang HX, Bear M, et al. Perinatal risk factors altering regional brain structure in the preterm infant. *Brain.* 2007;130(Pt 3):667-77.
260. Kidokoro H, Anderson PJ, Doyle LW, Woodward LJ, Neil JJ, Inder TE. Brain injury and altered brain growth in preterm infants: predictors and prognosis. *Pediatrics.* 2014;134(2):e444-53.

261. Monson BB, Anderson PJ, Matthews LG, et al. Examination of the pattern of growth of cerebral tissue volumes from hospital discharge to early childhood in very preterm infants. *JAMA Pediatrics*. 2016;170(8):772-9.
262. Lemola S, Oser N, Urfer-Maurer N, Brand S, Holsboer-Trachsler E, Bechtel N, et al. Effects of gestational age on brain volume and cognitive functions in generally healthy very preterm born children during school-age: A voxel-based morphometry study. *PLoS ONE*. 2017;12(8):e0183519.
263. Nosarti C, Nam KW, Walshe M, Murray RM, Cuddy M, Rifkin L, et al. Preterm birth and structural brain alterations in early adulthood. *NeuroImage: Clinical*. 2014;6:180-91.
264. Thompson DK, Wood SJ, Doyle LW, Warfield SK, Lodygensky GA, Anderson PJ, et al. Neonate hippocampal volumes: prematurity, perinatal predictors, and 2-year outcome. *Ann Neurol*. 2008;63(5):642-51.
265. Thompson DK, Omizzolo C, Adamson C, Lee KJ, Stargatt R, Egan GF, et al. Longitudinal growth and morphology of the hippocampus through childhood: Impact of prematurity and implications for memory and learning. *Hum Brain Mapp*. 2014;35(8):4129-39.
266. Omizzolo C, Thompson DK, Scratch SE, Stargatt R, Lee KJ, Cheong J, et al. Hippocampal volume and memory and learning outcomes at 7 years in children born very preterm. *Journal of the International Neuropsychological Society : JINS*. 2013;19(10):1065-75.
267. Koob M, Viola A, Le Fur Y, Viout P, Ratiney H, Confort-Gouny S, et al. Creatine, Glutamine plus Glutamate, and Macromolecules Are Decreased in the Central White Matter of Premature Neonates around Term. *PLoS ONE*. 2016;11(8):e0160990-e.
268. Sparrow S, editor *Neuroepigenetics of preterm white matter injury* 2018.
269. Krishnan ML, Dyet LE, Boardman JP, Kapellou O, Allsop JM, Cowan F, et al. Relationship between white matter apparent diffusion coefficients in preterm infants at term-equivalent age and developmental outcome at 2 years. *Pediatrics*. 2007;120(3):e604-9.
270. Rogers EE, Hintz SR. Early neurodevelopmental outcomes of extremely preterm infants. *Semin Perinatol*. 2016;40(8):497-509.
271. Jo HM, Cho HK, Jang SH, Yeo SS, Lee E, Kim HS, et al. A comparison of microstructural maturational changes of the corpus callosum in preterm and full-term children: a diffusion tensor imaging study. *Neuroradiology*. 2012;54(9):997-1005.



272. Duerden EG, Foong J, Chau V, Branson H, Poskitt KJ, Grunau RE, et al. Tract-Based Spatial Statistics in Preterm-Born Neonates Predicts Cognitive and Motor Outcomes at 18 Months. *American Journal of Neuroradiology*. 2015;36(8):1565.
273. Eikenes L, Løhaugen GC, Brubakk AM, Skranes J, Håberg AK. Young adults born preterm with very low birth weight demonstrate widespread white matter alterations on brain DTI. *Neuroimage*. 2011;54(3):1774-85.
274. Hollund IMH, Olsen A, Skranes J, Brubakk A-M, Håberg AK, Eikenes L, et al. White matter alterations and their associations with motor function in young adults born preterm with very low birth weight. *NeuroImage Clinical*. 2017;17:241-50.
275. Thayyil S, Chandrasekaran M, Taylor A, Bainbridge A, Cady EB, Chong WK, et al. Cerebral magnetic resonance biomarkers in neonatal encephalopathy: a meta-analysis. *Pediatrics*. 2010;125(2):e382-95.
276. Hart AR, Smith MF, Whitby EH, Alladi S, Wilkinson S, Paley MN, et al. Diffusion-weighted imaging and magnetic resonance proton spectroscopy following preterm birth. *Clin Radiol*. 2014;69(8):870-9.
277. Gimenez M, Soria-Pastor S, Junque C, Caldu X, Narberhaus A, Botet F, et al. Proton magnetic resonance spectroscopy reveals medial temporal metabolic abnormalities in adolescents with history of preterm birth. *Pediatr Res*. 2008;64(5):572-7.
278. Lehnardt S, Massillon L, Follett P, Jensen FE, Ratan R, Rosenberg PA, et al. Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(14):8514-9.
279. Lehnardt S, Lachance C, Patrizi S, Lefebvre S, Follett PL, Jensen FE, et al. The toll-like receptor TLR4 is necessary for lipopolysaccharide-induced oligodendrocyte injury in the CNS. *J Neurosci*. 2002;22(7):2478-86.
280. Pang Y, Campbell L, Zheng B, Fan L, Cai Z, Rhodes P. Lipopolysaccharide-activated microglia induce death of oligodendrocyte progenitor cells and impede their development. *Neuroscience*. 2010;166(2):464-75.
281. Pang Y, Cai Z, Rhodes PG. Effect of tumor necrosis factor-alpha on developing optic nerve oligodendrocytes in culture. *J Neurosci Res*. 2005;80(2):226-34.
282. Li Y, Zhang R, Hou X, Zhang Y, Ding F, Li F, et al. Microglia activation triggers oligodendrocyte precursor cells apoptosis via HSP60. *Mol Med Rep*. 2017;16(1):603-8.

283. Miller BA, Crum JM, Tovar CA, Ferguson AR, Bresnahan JC, Beattie MS. Developmental stage of oligodendrocytes determines their response to activated microglia in vitro. *J Neuroinflammation*. 2007;4(1):28.
284. Favrais G, Tourneux P, Lopez E, Durrmeyer X, Gascoin G, Ramful D, et al. Impact of Common Treatments Given in the Perinatal Period on the Developing Brain. *Neonatology*. 2014;106(3):163-72.
285. Zhou Y, Zhang J, Wang L, Chen Y, Wan Y, He Y, et al. Interleukin-1 $\beta$  impedes oligodendrocyte progenitor cell recruitment and white matter repair following chronic cerebral hypoperfusion. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2017;60:93-105.
286. Xie D, Shen F, He S, Chen M, Han Q, Fang M, et al. IL-1beta induces hypomyelination in the periventricular white matter through inhibition of oligodendrocyte progenitor cell maturation via FYN/MEK/ERK signaling pathway in septic neonatal rats. *Glia*. 2016;64(4):583-602.
287. Vela JM, Molina-Holgado E, Arévalo-Martín Á, Almazán G, Guaza C. Interleukin-1 Regulates Proliferation and Differentiation of Oligodendrocyte Progenitor Cells. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 2002;20(3):489-502.
288. Strunk T, Inder T, Wang X, Burgner D, Mallard C, Levy O. Infection-induced inflammation and cerebral injury in preterm infants. *Lancet Infect Dis*. 2014;14(8):751-62.
289. Jiang NM, Cowan M, Moonah SN, Petri WA, Jr. The Impact of Systemic Inflammation on Neurodevelopment. *Trends Mol Med*. 2018;24(9):794-804.
290. Inder TE, Volpe JJ. Chapter 13 Pathophysiology General Principles. *Volpe's Neurology of the Newborn* 2018. p. 325-88.e26.
291. Galinsky R, Lear CA, Dean JM, Wassink G, Dhillon SK, Fraser M, et al. Complex interactions between hypoxia-ischemia and inflammation in preterm brain injury. *Dev Med Child Neurol*. 2018;60(2):126-33.
292. Mallard C, Vexler ZS. Modeling Ischemia in the Immature Brain: How Translational Are Animal Models? *Stroke*. 2015;46(10):3006-11.
293. Lai JCY, Rocha-Ferreira E, Ek CJ, Wang X, Hagberg H, Mallard C. Immune responses in perinatal brain injury. *Brain Behav Immun*. 2017;63:210-23.

294. Bhalala US, Koehler RC, Kannan S. Neuroinflammation and Neuroimmune Dysregulation after Acute Hypoxic-Ischemic Injury of Developing Brain. *Frontiers in Pediatrics*. 2015;2(144).
295. Meyer U, Nyffeler M, Engler A, Urwyler A, Schedlowski M, Knuesel I, et al. The time of prenatal immune challenge determines the specificity of inflammation-mediated brain and behavioral pathology. *J Neurosci*. 2006;26(18):4752-62.
296. Nelson KB, Chang T. Is cerebral palsy preventable? *Curr Opin Neurol*. 2008;21(2):129-35.
297. Ophelders D, Gussenhoven R, Klein L, Jellema RK, Westerlaken RJJ, Hütten MC, et al. Preterm Brain Injury, Antenatal Triggers, and Therapeutics: Timing Is Key. *Cells*. 2020;9(8).
298. Kim CJ, Romero R, Chaemsaitong P, Chaiyasit N, Yoon BH, Kim YM. Acute chorioamnionitis and funisitis: definition, pathologic features, and clinical significance. *Am J Obstet Gynecol*. 2015;213(4, Supplement):S29-S52.
299. Bersani I, Thomas W, Speer CP. Chorioamnionitis--the good or the evil for neonatal outcome? *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2012;25 Suppl 1:12-6.
300. Herzog M, Cerar LK, Sršen TP, Verdenik I, Lučovnik M. Impact of risk factors other than prematurity on periventricular leukomalacia. A population-based matched case control study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2015;187:57-9.
301. Miller SP, Ferriero DM, Leonard C, Picuch R, Glidden DV, Partridge JC, et al. Early brain injury in premature newborns detected with magnetic resonance imaging is associated with adverse early neurodevelopmental outcome. *J Pediatr*. 2005;147(5):609-16.
302. Tsimis ME, Johnson CT, Raghunathan RS, Northington FJ, Burd I, Graham EM. Risk factors for periventricular white matter injury in very low birthweight neonates. *Am J Obstet Gynecol*. 2016;214(3):380.e1-6.
303. Shah DK, Doyle LW, Anderson PJ, Bear M, Daley AJ, Hunt RW, et al. Adverse neurodevelopment in preterm infants with postnatal sepsis or necrotizing enterocolitis is mediated by white matter abnormalities on magnetic resonance imaging at term. *J Pediatr*. 2008;153(2):170-5, 5.e1.
304. Kuban KCK, O'Shea TM, Allred EN, Fichorova RN, Heeren T, Paneth N, et al. The Breadth and Type of Systemic Inflammation and the Risk of Adverse Neurological Outcomes in Extremely Low Gestation Newborns. *Pediatr Neurol*. 2015;52(1):42-8.

305. O'Hare FM, Watson W, O'Neill A, Grant T, Onwuneme C, Donoghue V, et al. Neutrophil and monocyte toll-like receptor 4, CD11b and reactive oxygen intermediates, and neuroimaging outcomes in preterm infants. *Pediatr Res*. 2015;78(1):82-90.
306. Leviton A, Fichorova RN, O'Shea TM, Kuban K, Paneth N, Dammann O, et al. Two-hit model of brain damage in the very preterm newborn: small for gestational age and postnatal systemic inflammation. *Pediatr Res*. 2013;73(3):362-70.
307. Hagberg H, Mallard C, Ferriero DM, Vannucci SJ, Levison SW, Vexler ZS, et al. The role of inflammation in perinatal brain injury. *Nat Rev Neurol*. 2015;11(4):192-208.
308. Krasnow SM, Knoll JG, Verghese SC, Levasseur PR, Marks DL. Amplification and propagation of interleukin-1 $\beta$  signaling by murine brain endothelial and glial cells. *J Neuroinflammation*. 2017;14(1):133.
309. Nagyoszi P, Wilhelm I, Farkas AE, Fazakas C, Dung NT, Haskó J, et al. Expression and regulation of toll-like receptors in cerebral endothelial cells. *Neurochem Int*. 2010;57(5):556-64.
310. Johnson RH, Kho DT, SJ OC, Angel CE, Graham ES. The functional and inflammatory response of brain endothelial cells to Toll-Like Receptor agonists. *Sci Rep*. 2018;8(1):10102.
311. O'Carroll SJ, Kho DT, Wiltshire R, Nelson V, Rotimi O, Johnson R, et al. Pro-inflammatory TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$  differentially regulate the inflammatory phenotype of brain microvascular endothelial cells. *J Neuroinflammation*. 2015;12:131.
312. Liu X, Nemeth DP, McKim DB, Zhu L, DiSabato DJ, Berdysz O, et al. Cell-Type-Specific Interleukin 1 Receptor 1 Signaling in the Brain Regulates Distinct Neuroimmune Activities. *Immunity*. 2019;50(3):764-6.
313. Zhu L, Liu X, Nemeth DP, DiSabato DJ, Witcher KG, McKim DB, et al. Interleukin-1 causes CNS inflammatory cytokine expression via endothelia-microglia bi-cellular signaling. *Brain Behav Immun*. 2019;81:292-304.
314. Singh AK, Jiang Y. How does peripheral lipopolysaccharide induce gene expression in the brain of rats? *Toxicology*. 2004;201(1):197-207.
315. Verma S, Nakaoke R, Dohgu S, Banks WA. Release of cytokines by brain endothelial cells: A polarized response to lipopolysaccharide. *Brain Behav Immun*. 2006;20(5):449-55.
316. . !!! INVALID CITATION !!! (182).

317. Gerstner B, DeSilva TM, Genz K, Armstrong A, Brehmer F, Neve RL, et al. Hyperoxia causes maturation-dependent cell death in the developing white matter. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2008;28(5):1236-45.
318. Brehmer F, Bendix I, Prager S, van de Looij Y, Reinboth BS, Zimmermanns J, et al. Interaction of inflammation and hyperoxia in a rat model of neonatal white matter damage. *PLoS ONE*. 2012;7(11):e49023.
319. Jungner Å, Vallius Kvist S, Romantsik O, Bruschetti M, Ekström C, Bendix I, et al. White Matter Brain Development after Exposure to Circulating Cell-Free Hemoglobin and Hyperoxia in a Rat Pup Model. *Dev Neurosci*. 2019;41(3-4):234-46.
320. Reich B, Hoeber D, Bendix I, Felderhoff-Mueser U. Hyperoxia and the Immature Brain. *Dev Neurosci*. 2016;38(5):311-30.
321. Schmitz T, Krabbe G, Weikert G, Scheuer T, Matheus F, Wang Y, et al. Minocycline protects the immature white matter against hyperoxia. *Exp Neurol*. 2014;254:153-65.
322. Gressens P, Marret S, Evrard P. Developmental spectrum of the excitotoxic cascade induced by ibotenate: a model of hypoxic insults in fetuses and neonates. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 1996;22(6):498-502.
323. Husson I, Mesplès B, Bac P, Vamecq J, Evrard P, Gressens P. Melatoninergic neuroprotection of the murine periventricular white matter against neonatal excitotoxic challenge. *Ann Neurol*. 2002;51(1):82-92.
324. Husson I, Rangon CM, Lelièvre V, Bemelmans AP, Sachs P, Mallet J, et al. BDNF-induced white matter neuroprotection and stage-dependent neuronal survival following a neonatal excitotoxic challenge. *Cereb Cortex*. 2005;15(3):250-61.
325. Gressens P, Schwendimann L, Husson I, Sarkozy G, Mocaer E, Vamecq J, et al. Agomelatine, a melatonin receptor agonist with 5-HT(2C) receptor antagonist properties, protects the developing murine white matter against excitotoxicity. *Eur J Pharmacol*. 2008;588(1):58-63.
326. Zeng Y, Wang H, Zhang L, Tang J, Shi J, Xiao D, et al. The optimal choices of animal models of white matter injury. *Rev Neurosci*. 2019;30(3):245-59.
327. Hagberg H, Peebles D, Mallard C. Models of white matter injury: comparison of infectious, hypoxic-ischemic, and excitotoxic insults. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*. 2002;8(1):30-8.

328. Fernández-López D, Natarajan N, Ashwal S, Vexler ZS. Mechanisms of perinatal arterial ischemic stroke. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2014;34(6):921-32.
329. Ashwal S, Tone B, Tian HR, Chong S, Obenaus A. Serial magnetic resonance imaging in a rat pup filament stroke model. *Exp Neurol*. 2006;202(2):294-301.
330. Silbereis JC, Huang EJ, Back SA, Rowitch DH. Towards improved animal models of neonatal white matter injury associated with cerebral palsy. *Disease models & mechanisms*. 2010;3(11-12):678-88.
331. Rodts-Palenik S, Wyatt-Ashmead J, Pang Y, Thigpen B, Cai Z, Rhodes P, et al. Maternal infection-induced white matter injury is reduced by treatment with interleukin-10. *Am J Obstet Gynecol*. 2004;191(4):1387-92.
332. Pang Y, Rodts-Palenik S, Cai Z, Bennett WA, Rhodes PG. Suppression of glial activation is involved in the protection of IL-10 on maternal E. coli induced neonatal white matter injury. *Brain Res Dev Brain Res*. 2005;157(2):141-9.
333. Bergdolt L, Dunaevsky A. Brain changes in a maternal immune activation model of neurodevelopmental brain disorders. *Prog Neurobiol*. 2019;175:1-19.
334. Fernández de Cossío L, Guzmán A, van der Veldt S, Luheshi GN. Prenatal infection leads to ASD-like behavior and altered synaptic pruning in the mouse offspring. *Brain Behav Immun*. 2017;63:88-98.
335. Wang X, Rousset CI, Hagberg H, Mallard C. Lipopolysaccharide-induced inflammation and perinatal brain injury. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2006;11(5):343-53.
336. Batista CRA, Gomes GF, Candelario-Jalil E, Fiebich BL, de Oliveira ACP. Lipopolysaccharide-Induced Neuroinflammation as a Bridge to Understand Neurodegeneration. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(9):2293.
337. Hanke ML, Kielian T. Toll-like receptors in health and disease in the brain: mechanisms and therapeutic potential. *Clinical science (London, England : 1979)*. 2011;121(9):367-87.
338. Vaure C, Liu Y. A Comparative Review of Toll-Like Receptor 4 Expression and Functionality in Different Animal Species. *Frontiers in Immunology*. 2014;5(316).
339. Núñez Miguel R, Wong J, Westoll JF, Brooks HJ, O'Neill LAJ, Gay NJ, et al. A dimer of the Toll-like receptor 4 cytoplasmic domain provides a specific scaffold for the recruitment of signalling adaptor proteins. *PLoS ONE*. 2007;2(8):e788-e.

340. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol.* 2010;11(5):373-84.
341. Keating SE, Maloney GM, Moran EM, Bowie AG. IRAK-2 participates in multiple toll-like receptor signaling pathways to NFkappaB via activation of TRAF6 ubiquitination. *J Biol Chem.* 2007;282(46):33435-43.
342. Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. *Semin Immunol.* 2004;16(1):3-9.
343. Kawasaki T, Kawai T. Toll-Like Receptor Signaling Pathways. *Frontiers in Immunology.* 2014;5(461).
344. Buchanan MM, Hutchinson M, Watkins LR, Yin H. Toll-like receptor 4 in CNS pathologies. *J Neurochem.* 2010;114(1):13-27.
345. Pang Y, Cai Z, Rhodes PG. Disturbance of oligodendrocyte development, hypomyelination and white matter injury in the neonatal rat brain after intracerebral injection of lipopolysaccharide. *Brain Res Dev Brain Res.* 2003;140(2):205-14.
346. Cai Z, Pang Y, Lin S, Rhodes PG. Differential roles of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta in lipopolysaccharide-induced brain injury in the neonatal rat. *Brain Res.* 2003;975(1-2):37-47.
347. Lodygensky GA, Kunz N, Perroud E, Somm E, Mlynarik V, Huppi PS, et al. Definition and quantification of acute inflammatory white matter injury in the immature brain by MRI/MRS at high magnetic field. *Pediatr Res.* 2014;75(3):415-23.
348. Lodygensky GA, West T, Stump M, Holtzman DM, Inder TE, Neil JJ. In vivo MRI analysis of an inflammatory injury in the developing brain. *Brain Behav Immun.* 2010;24(5):759-67.
349. Lodygensky GA, West T, Moravec MD, Back SA, Dikranian K, Holtzman DM, et al. Diffusion characteristics associated with neuronal injury and glial activation following hypoxia-ischemia in the immature brain. *Magn Reson Med.* 2011;66(3):839-45.
350. Wang KC, Fan LW, Kaizaki A, Pang Y, Cai Z, Tien LT. Neonatal lipopolysaccharide exposure induces long-lasting learning impairment, less anxiety-like response and hippocampal injury in adult rats. *Neuroscience.* 2013;234:146-57.
351. Fan LW, Tien LT, Zheng B, Pang Y, Lin RC, Simpson KL, et al. Dopaminergic neuronal injury in the adult rat brain following neonatal exposure to lipopolysaccharide and the silent neurotoxicity. *Brain Behav Immun.* 2011;25(2):286-97.

352. Fan LW, Tien LT, Mitchell HJ, Rhodes PG, Cai Z. Alpha-phenyl-n-tert-butyl-nitron ameliorates hippocampal injury and improves learning and memory in juvenile rats following neonatal exposure to lipopolysaccharide. *Eur J Neurosci*. 2008;27(6):1475-84.
353. Fan LW, Mitchell HJ, Rhodes PG, Cai Z. Alpha-Phenyl-n-tert-butyl-nitron attenuates lipopolysaccharide-induced neuronal injury in the neonatal rat brain. *Neuroscience*. 2008;151(3):737-44.
354. Cai Z, Lin S, Pang Y, Rhodes PG. Brain injury induced by intracerebral injection of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha in the neonatal rat. *Pediatr Res*. 2004;56(3):377-84.
355. Pang Y, Fan LW, Zheng B, Cai Z, Rhodes PG. Role of interleukin-6 in lipopolysaccharide-induced brain injury and behavioral dysfunction in neonatal rats. *Neuroscience*. 2006;141(2):745-55.
356. Girard S, Sebire G, Kadhim H. Proinflammatory orientation of the interleukin 1 system and downstream induction of matrix metalloproteinase 9 in the pathophysiology of human perinatal white matter damage. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2010;69(11):1116-29.
357. Girard S, Kadhim H, Larouche A, Roy M, Gobeil F, Sebire G. Pro-inflammatory disequilibrium of the IL-1 beta/IL-1ra ratio in an experimental model of perinatal brain damages induced by lipopolysaccharide and hypoxia-ischemia. *Cytokine*. 2008;43(1):54-62.
358. Semple BD, Blomgren K, Gimlin K, Ferriero DM, Noble-Haesslein LJ. Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Prog Neurobiol*. 2013;0:1-16.
359. Williamson LL, Sholar PW, Mistry RS, Smith SH, Bilbo SD. Microglia and memory: modulation by early-life infection. *J Neurosci*. 2011;31(43):15511-21.
360. Bilbo SD, Biedenkapp JC, Der-Avakian A, Watkins LR, Rudy JW, Maier SF. Neonatal infection-induced memory impairment after lipopolysaccharide in adulthood is prevented via caspase-1 inhibition. *J Neurosci*. 2005;25(35):8000-9.
361. Pang Y, Tien LT, Zhu H, Shen J, Wright CF, Jones TK, et al. Interleukin-1 receptor antagonist reduces neonatal lipopolysaccharide-induced long-lasting neurobehavioral deficits and dopaminergic neuronal injury in adult rats. *Int J Mol Sci*. 2015;16(4):8635-54.
362. Tien LT, Kaizaki A, Pang Y, Cai Z, Bhatt AJ, Fan LW. Neonatal exposure to lipopolysaccharide enhances accumulation of alpha-synuclein aggregation and dopamine transporter protein expression in the substantia nigra in responses to rotenone challenge in later life. *Toxicology*. 2013;308:96-103.



363. Kohman RA, Tarr AJ, Sparkman NL, Bogale TM, Boehm GW. Neonatal endotoxin exposure impairs avoidance learning and attenuates endotoxin-induced sickness behavior and central IL-1beta gene transcription in adulthood. *Behav Brain Res.* 2008;194(1):25-31.
364. Dinel AL, Joffre C, Trifilieff P, Aubert A, Foury A, Le Ruyet P, et al. Inflammation early in life is a vulnerability factor for emotional behavior at adolescence and for lipopolysaccharide-induced spatial memory and neurogenesis alteration at adulthood. *J Neuroinflammation.* 2014;11:155.
365. Fan LW, Kaizaki A, Tien LT, Pang Y, Tanaka S, Numazawa S, et al. Celecoxib attenuates systemic lipopolysaccharide-induced brain inflammation and white matter injury in the neonatal rats. *Neuroscience.* 2013;240:27-38.
366. Cai Z, Fan LW, Kaizaki A, Tien LT, Ma T, Pang Y, et al. Neonatal systemic exposure to lipopolysaccharide enhances susceptibility of nigrostriatal dopaminergic neurons to rotenone neurotoxicity in later life. *Dev Neurosci.* 2013;35(2-3):155-71.
367. Hsieh C-T, Lee Y-J, Dai X, Ojeda NB, Lee HJ, Tien L-T, et al. Systemic Lipopolysaccharide-Induced Pain Sensitivity and Spinal Inflammation Were Reduced by Minocycline in Neonatal Rats. *International Journal of Molecular Sciences.* 2018;19(10):2947.
368. Pang Y, Dai X, Roller A, Carter K, Paul I, Bhatt AJ, et al. Early Postnatal Lipopolysaccharide Exposure Leads to Enhanced Neurogenesis and Impaired Communicative Functions in Rats. *PLoS ONE.* 2016;11(10):e0164403.
369. Wang KC, Wang SJ, Fan LW, Cai Z, Rhodes PG, Tien LT. Interleukin-1 receptor antagonist ameliorates neonatal lipopolysaccharide-induced long-lasting hyperalgesia in the adult rats. *Toxicology.* 2011;279(1-3):123-9.
370. Silva CSd, Cali6 ML, Mosini AC, Pires JM, R6go DdSB, Mello LE, et al. LPS-Induced Systemic Neonatal Inflammation: Blockage of P2X7R by BBG Decreases Mortality on Rat Pups and Oxidative Stress in Hippocampus of Adult Rats. *Frontiers in Behavioral Neuroscience.* 2019;13(240).
371. Pires JM, Foresti ML, Silva CS, R6go DB, Cali6 ML, Mosini AC, et al. Lipopolysaccharide-Induced Systemic Inflammation in the Neonatal Period Increases Microglial Density and Oxidative Stress in the Cerebellum of Adult Rats. *Front Cell Neurosci.* 2020;14:142.
372. Kubsova A, Tejkalova H, Syslova K, Kacer P, Vondrousova J, Tyls F, et al. Biochemical, Histopathological and Morphological Profiling of a Rat Model of Early Immune Stimulation: Relation to Psychopathology. *PLoS ONE.* 2015;10(1):e0115439.

373. Vojtechova I, Petrasek T, Maleninska K, Brozka H, Tejkalova H, Horacek J, et al. Neonatal immune activation by lipopolysaccharide causes inadequate emotional responses to novel situations but no changes in anxiety or cognitive behavior in Wistar rats. *Behav Brain Res.* 2018;349:42-53.
374. Lardenoije R, Iatrou A, Kenis G, Kompotis K, Steinbusch HWM, Mastroeni D, et al. The epigenetics of aging and neurodegeneration. *Prog Neurobiol.* 2015;131:21-64.
375. Podobinska M, Szablowska-Gadomska I, Augustyniak J, Sandvig I, Sandvig A, Buzanska L. Epigenetic Modulation of Stem Cells in Neurodevelopment: The Role of Methylation and Acetylation. *Front Cell Neurosci.* 2017;11:23.
376. Weinhold B. Epigenetics: the science of change. *Environ Health Perspect.* 2006;114(3):A160-A7.
377. Pacchierotti F, Spanò M. Environmental Impact on DNA Methylation in the Germline: State of the Art and Gaps of Knowledge. *BioMed Research International.* 2015;2015:123484.
378. Walters BJ, Cox BC. Approaches for the study of epigenetic modifications in the inner ear and related tissues. *Hear Res.* 2019;376:69-85.
379. Rudenko A, Tsai L-H. Epigenetic modifications in the nervous system and their impact upon cognitive impairments. *Neuropharmacology.* 2014;80:70-82.
380. Tognini P, Napoli D, Pizzorusso T. Dynamic DNA methylation in the brain: a new epigenetic mark for experience-dependent plasticity. *Frontiers in cellular neuroscience.* 2015;9:331-.
381. Moore LD, Le T, Fan G. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology.* 2013;38(1):23-38.
382. Jin B, Li Y, Robertson KD. DNA Methylation: Superior or Subordinate in the Epigenetic Hierarchy? *Genes & Cancer.* 2011;2(6):607-17.
383. Bayraktar G, Kreutz MR. Neuronal DNA Methyltransferases: Epigenetic Mediators between Synaptic Activity and Gene Expression? *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry.* 2018;24(2):171-85.
384. Hermann A, Goyal R, Jeltsch A. The Dnmt1 DNA-(cytosine-C5)-methyltransferase methylates DNA processively with high preference for hemimethylated target sites. *J Biol Chem.* 2004;279(46):48350-9.

385. Miranda TB, Jones PA. DNA methylation: The nuts and bolts of repression. *J Cell Physiol.* 2007;213(2):384-90.
386. Nikolova YS, Hariri AR. Can we observe epigenetic effects on human brain function? *Trends in Cognitive Sciences.* 2015;19(7):366-73.
387. Lister R, Mukamel EA, Nery JR, Urich M, Puddifoot CA, Johnson ND, et al. Global epigenomic reconfiguration during mammalian brain development. *Science.* 2013;341(6146):1237905.
388. Lister R, Mukamel E. Turning over DNA methylation in the mind. *Frontiers in Neuroscience.* 2015;9(252).
389. Kessler NJ, Van Baak TE, Baker MS, Laritsky E, Coarfa C, Waterland RA. CpG methylation differences between neurons and glia are highly conserved from mouse to human. *Hum Mol Genet.* 2015;25(2):223-32.
390. Miller CA, Sweatt JD. Covalent Modification of DNA Regulates Memory Formation. *Neuron.* 2007;53(6):857-69.
391. Moyon S, Huynh JL, Dutta D, Zhang F, Ma D, Yoo S, et al. Functional Characterization of DNA Methylation in the Oligodendrocyte Lineage. *Cell reports.* 2016;15(4):748-60.
392. Leong P, Loke YJ, Saffery R, Silk T, Burnett A, Josev E, et al. Epigenetic Influences on Neurodevelopment at 11 Years of Age: Protocol for the Longitudinal Peri/Postnatal Epigenetic Twins Study at 11 Years of Age (PETS@11). *Twin Res Hum Genet.* 2019;22(6):446-53.
393. Saffery R, Morley R, Carlin JB, Joo J-HE, Ollikainen M, Novakovic B, et al. Cohort Profile: The Peri/post-natal Epigenetic Twins Study. *Int J Epidemiol.* 2012;41(1):55-61.
394. Gordon L, Joo JE, Powell JE, Ollikainen M, Novakovic B, Li X, et al. Neonatal DNA methylation profile in human twins is specified by a complex interplay between intrauterine environmental and genetic factors, subject to tissue-specific influence. *Genome Res.* 2012;22(8):1395-406.
395. Gordon L, Joo J-HE, Andronikos R, Ollikainen M, Wallace EM, Umstad MP, et al. Expression discordance of monozygotic twins at birth: Effect of intrauterine environment and a possible mechanism for fetal programming. *Epigenetics.* 2011;6(5):579-92.
396. Martino D, Loke YJ, Gordon L, Ollikainen M, Cruickshank MN, Saffery R, et al. Longitudinal, genome-scale analysis of DNA methylation in twins from birth to 18 months of

age reveals rapid epigenetic change in early life and pair-specific effects of discordance. *Genome Biol.* 2013;14(5):R42.

397. Smith AK, Kilaru V, Klengel T, Mercer KB, Bradley B, Conneely KN, et al. DNA extracted from saliva for methylation studies of psychiatric traits: evidence tissue specificity and relatedness to brain. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2015;168b(1):36-44.

398. Braun PR, Han S, Hing B, Nagahama Y, Gaul LN, Heinzman JT, et al. Genome-wide DNA methylation comparison between live human brain and peripheral tissues within individuals. *Transl Psychiatry.* 2019;9(1):47.

399. Ghadirivasfi M, Nohesara S, Ahmadkhaniha HR, Eskandari MR, Mostafavi S, Thiagalingam S, et al. Hypomethylation of the serotonin receptor type-2A Gene (HTR2A) at T102C polymorphic site in DNA derived from the saliva of patients with schizophrenia and bipolar disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2011;156b(5):536-45.

400. Nohesara S, Ghadirivasfi M, Mostafavi S, Eskandari MR, Ahmadkhaniha H, Thiagalingam S, et al. DNA hypomethylation of MB-COMT promoter in the DNA derived from saliva in schizophrenia and bipolar disorder. *J Psychiatr Res.* 2011;45(11):1432-8.

401. Sparrow S, Manning JR, Cartier J, Anblagan D, Bastin ME, Piyasena C, et al. Epigenomic profiling of preterm infants reveals DNA methylation differences at sites associated with neural function. *Transl Psychiatry.* 2016;6:e716.

402. Everson TM, Marsit CJ, Michael O'Shea T, Burt A, Hermetz K, Carter BS, et al. Epigenome-wide Analysis Identifies Genes and Pathways Linked to Neurobehavioral Variation in Preterm Infants. *Sci Rep.* 2019;9(1):6322.

403. Cruickshank MN, Oshlack A, Theda C, Davis PG, Martino D, Sheehan P, et al. Analysis of epigenetic changes in survivors of preterm birth reveals the effect of gestational age and evidence for a long term legacy. *Genome Med.* 2013;5(10):96.

404. Tan Q, Li S, Frost M, Nygaard M, Soerensen M, Larsen M, et al. Epigenetic signature of preterm birth in adult twins. *Clinical Epigenetics.* 2018;10:87.

405. Lawrence M, Daujat S, Schneider R. Lateral Thinking: How Histone Modifications Regulate Gene Expression. *Trends Genet.* 2016;32(1):42-56.

406. Peixoto L, Abel T. The role of histone acetylation in memory formation and cognitive impairments. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology.* 2013;38(1):62-76.

407. Bonnaud EM, Suberbielle E, Malnou CE. Histone acetylation in neuronal (dys)function. *Biomolecular Concepts*. 2016;7(2):103-16.
408. Fallah MS, Szarics D, Robson CM, Eubanks JH. Impaired Regulation of Histone Methylation and Acetylation Underlies Specific Neurodevelopmental Disorders. *Frontiers in Genetics*. 2021;11(1734).
409. Roth SY, Denu JM, Allis CD. Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem*. 2001;70:81-120.
410. de Ruijter AJM, van Gennip AH, Caron HN, Kemp S, van Kuilenburg ABP. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *The Biochemical journal*. 2003;370(Pt 3):737-49.
411. Ma Q, Zhang L. Epigenetic programming of hypoxic-ischemic encephalopathy in response to fetal hypoxia. *Prog Neurobiol*. 2015;124:28-48.
412. Park B, Khanam R, Vinayachandran V, Baqui AH, London SJ, Biswal S. Epigenetic biomarkers and preterm birth. *Environmental Epigenetics*. 2020;6(1).
413. D'Mello SR. Regulation of Central Nervous System Development by Class I Histone Deacetylases. *Dev Neurosci*. 2019;41(3-4):149-65.
414. Jakovcevski M, Akbarian S. Epigenetic mechanisms in neurological disease. *Nat Med*. 2012;18(8):1194-204.
415. Gabriele M, Lopez Tobon A, D'Agostino G, Testa G. The chromatin basis of neurodevelopmental disorders: Rethinking dysfunction along the molecular and temporal axes. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2018;84:306-27.
416. Schoenherr CJ, Anderson DJ. Silencing is golden: negative regulation in the control of neuronal gene transcription. *Curr Opin Neurobiol*. 1995;5(5):566-71.
417. Imamura T, Uesaka M, Nakashima K. Epigenetic setting and reprogramming for neural cell fate determination and differentiation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2014;369(1652).
418. Chong JA, Tapia-Ramirez J, Kim S, Toledo-Aral JJ, Zheng Y, Boutros MC, et al. REST: A mammalian silencer protein that restricts sodium channel gene expression to neurons. *Cell*. 1995;80(6):949-57.

419. Sando R, Gounko N, Pieraut S, Liao L, Yates J, Maximov A. HDAC4 Governs a Transcriptional Program Essential for Synaptic Plasticity and Memory. *Cell*. 2012;151(4):821-34.
420. Foti SB, Chou A, Moll AD, Roskams AJ. HDAC inhibitors dysregulate neural stem cell activity in the postnatal mouse brain. *Int J Dev Neurosci*. 2013;31(6):434-47.
421. Kim M-S, Akhtar MW, Adachi M, Mahgoub M, Bassel-Duby R, Kavalali ET, et al. An Essential Role for Histone Deacetylase 4 in Synaptic Plasticity and Memory Formation. *The Journal of Neuroscience*. 2012;32(32):10879.
422. Sada N, Fujita Y, Mizuta N, Ueno M, Furukawa T, Yamashita T. Inhibition of HDAC increases BDNF expression and promotes neuronal rewiring and functional recovery after brain injury. *Cell Death & Disease*. 2020;11(8):655.
423. Guan J-S, Haggarty SJ, Giacometti E, Dannenberg J-H, Joseph N, Gao J, et al. HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity. *Nature*. 2009;459(7243):55-60.
424. Marin-Husstege M, Muggironi M, Liu A, Casaccia-Bonnel P. Histone Deacetylase Activity Is Necessary for Oligodendrocyte Lineage Progression. *The Journal of Neuroscience*. 2002;22(23):10333.
425. Shen S, Li J, Casaccia-Bonnel P. Histone modifications affect timing of oligodendrocyte progenitor differentiation in the developing rat brain. *J Cell Biol*. 2005;169(4):577-89.
426. Shen S, Sandoval J, Swiss VA, Li J, Dupree J, Franklin RJM, et al. Age-dependent epigenetic control of differentiation inhibitors is critical for remyelination efficiency. *Nat Neurosci*. 2008;11(9):1024-34.
427. Ye F, Chen Y, Hoang T, Montgomery RL, Zhao XH, Bu H, et al. HDAC1 and HDAC2 regulate oligodendrocyte differentiation by disrupting the beta-catenin-TCF interaction. *Nat Neurosci*. 2009;12(7):829-38.
428. Back SA, Rosenberg PA. Pathophysiology of glia in perinatal white matter injury. *Glia*. 2014.
429. Cogné B, Ehresmann S, Beauregard-Lacroix E, Rousseau J, Besnard T, Garcia T, et al. Missense Variants in the Histone Acetyltransferase Complex Component Gene TRRAP Cause Autism and Syndromic Intellectual Disability. *The American Journal of Human Genetics*. 2019;104(3):530-41.

430. Tapias A, Wang Z-Q. Lysine Acetylation and Deacetylation in Brain Development and Neuropathies. *Genomics, proteomics & bioinformatics*. 2017;15(1):19-36.
431. Voineagu I, Wang X, Johnston P, Lowe JK, Tian Y, Horvath S, et al. Transcriptomic analysis of autistic brain reveals convergent molecular pathology. *Nature*. 2011;474(7351):380-4.
432. Sun W, Poschmann J, Cruz-Herrera del Rosario R, Parikshak NN, Hajan HS, Kumar V, et al. Histone Acetylome-wide Association Study of Autism Spectrum Disorder. *Cell*. 2016;167(5):1385-97.e11.
433. Christensen J, Grønberg TK, Sørensen MJ, Schendel D, Parner ET, Pedersen LH, et al. Prenatal Valproate Exposure and Risk of Autism Spectrum Disorders and Childhood Autism. *JAMA*. 2013;309(16):1696-703.
434. Cuevas-Diaz Duran R, Wei H, Kim DH, Wu JQ. Invited Review: Long non-coding RNAs: important regulators in the development, function and disorders of the central nervous system. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2019;45(6):538-56.
435. Bustelo M, Barkhuizen M, van den Hove DLA, Steinbusch HWM, Bruno MA, Loidl CF, et al. Clinical Implications of Epigenetic Dysregulation in Perinatal Hypoxic-Ischemic Brain Damage. *Front Neurol*. 2020;11:483.
436. Roberts TC, Morris KV, Wood MJA. The role of long non-coding RNAs in neurodevelopment, brain function and neurological disease. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2014;369(1652):20130507.
437. Murray DM. Chapter 13 - Biomarkers in neonatal hypoxic–ischemic encephalopathy—Review of the literature to date and future directions for research. In: de Vries LS, Glass HC, editors. *Handbook of Clinical Neurology*. 162: Elsevier; 2019. p. 281-93.
438. Chen F, Du Y, Esposito E, Liu Y, Guo S, Wang X, et al. Effects of Focal Cerebral Ischemia on Exosomal Versus Serum miR126. *Transl Stroke Res*. 2015;6(6):478-84.
439. Cho KHT, Xu B, Blenkiron C, Fraser M. Emerging Roles of miRNAs in Brain Development and Perinatal Brain Injury. *Frontiers in physiology*. 2019;10:227-.
440. Ponnusamy V, Yip PK. The role of microRNAs in newborn brain development and hypoxic ischaemic encephalopathy. *Neuropharmacology*. 2019;149:55-65.

441. Wang Z, Liu Y, Shao M, Wang D, Zhang Y. Combined prediction of miR-210 and miR-374a for severity and prognosis of hypoxic-ischemic encephalopathy. *Brain and behavior*. 2017;8(1):e00835-e.
442. O'Sullivan MP, Looney AM, Moloney GM, Finder M, Hallberg B, Clarke G, et al. Validation of Altered Umbilical Cord Blood MicroRNA Expression in Neonatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *JAMA Neurology*. 2019;76(3):333-41.
443. Looney A-M, Walsh BH, Moloney G, Grenham S, Fagan A, O'Keeffe GW, et al. Downregulation of Umbilical Cord Blood Levels of miR-374a in Neonatal Hypoxic Ischemic Encephalopathy. *J Pediatr*. 2015;167(2):269-73.e2.
444. Spaul R, McPherson B, Gialeli A, Clayton A, Uney J, Heep A, et al. Exosomes populate the cerebrospinal fluid of preterm infants with post-haemorrhagic hydrocephalus. *Int J Dev Neurosci*. 2019;73:59-65.
445. Chapman SD, Farina L, Kronforst K, Dizon M. MicroRNA Profile Differences in Neonates at Risk for Cerebral Palsy. *Phys Med Rehabil Int*. 2018;5(3).
446. Bao M-H, Szeto V, Yang BB, Zhu S-z, Sun H-S, Feng Z-P. Long non-coding RNAs in ischemic stroke. *Cell Death & Disease*. 2018;9(3):281.
447. Briggs James A, Wolvetang Ernst J, Mattick John S, Rinn John L, Barry G. Mechanisms of Long Non-coding RNAs in Mammalian Nervous System Development, Plasticity, Disease, and Evolution. *Neuron*. 2015;88(5):861-77.
448. Derrien T, Johnson R, Bussotti G, Tanzer A, Djebali S, Tilgner H, et al. The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Res*. 2012;22(9):1775-89.
449. Schmitz SU, Grote P, Herrmann BG. Mechanisms of long noncoding RNA function in development and disease. *Cell Mol Life Sci*. 2016;73(13):2491-509.
450. Freedman JE, Miano JM, National Heart L, Blood Institute Workshop P. Challenges and Opportunities in Linking Long Noncoding RNAs to Cardiovascular, Lung, and Blood Diseases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017;37(1):21-5.
451. Qureshi IA, Mattick JS, Mehler MF. Long non-coding RNAs in nervous system function and disease. *Brain Res*. 2010;1338:20-35.
452. Ziats MN, Rennert OM. Aberrant Expression of Long Noncoding RNAs in Autistic Brain. *J Mol Neurosci*. 2013;49(3):589-93.



453. Velmeshev D, Magistri M, Faghihi MA. Expression of non-protein-coding antisense RNAs in genomic regions related to autism spectrum disorders. *Molecular Autism*. 2013;4(1):32.
454. Dong X, Zhao Y, Huang Y, Yu L, Yang X, Gao F. Analysis of long noncoding RNA expression profiles in the whole blood of neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy. *J Cell Biochem*. 2019;120(5):8499-509.
455. Committee on F, Newborn, Papile L-A, Baley JE, Benitz W, Cummings J, et al. Hypothermia and neonatal encephalopathy. *Pediatrics*. 2014;133(6):1146-50.
456. Lemyre B, Chau V. Hypothermia for newborns with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Paediatrics & child health*. 2018;23(4):285-91.
457. Davidson JO, Wassink G, van den Heuvel LG, Bennet L, Gunn AJ. Therapeutic Hypothermia for Neonatal Hypoxic–Ischemic Encephalopathy – Where to from Here? *Frontiers in Neurology*. 2015;6(198).
458. Herrera TI, Edwards L, Malcolm WF, Smith PB, Fisher KA, Pizoli C, et al. Outcomes of preterm infants treated with hypothermia for hypoxic-ischemic encephalopathy. *Early Hum Dev*. 2018;125:1-7.
459. Lee CYZ, Chakranon P, Lee SWH. Comparative Efficacy and Safety of Neuroprotective Therapies for Neonates With Hypoxic Ischemic Encephalopathy: A Network Meta-Analysis. *Frontiers in Pharmacology*. 2019;10(1221).
460. Juul SE, Ferriero DM. Pharmacologic neuroprotective strategies in neonatal brain injury. *Clin Perinatol*. 2014;41(1):119-31.
461. Kumral A, Baskin H, Yesilirmak DC, Ergur BU, Aykan S, Genc S, et al. Erythropoietin attenuates lipopolysaccharide-induced white matter injury in the neonatal rat brain. *Neonatology*. 2007;92(4):269-78.
462. Jantzie LL, Miller RH, Robinson S. Erythropoietin signaling promotes oligodendrocyte development following prenatal systemic hypoxic-ischemic brain injury. *Pediatr Res*. 2013;74(6):658-67.
463. Wassink G, Davidson JO, Dhillon SK, Fraser M, Galinsky R, Bennet L, et al. Partial white and grey matter protection with prolonged infusion of recombinant human erythropoietin after asphyxia in preterm fetal sheep. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2017;37(3):1080-94.

464. van de Looij Y, Chatagner A, Quairiaux C, Gruetter R, Huppi PS, Sizonenko SV. Multi-modal assessment of long-term erythropoietin treatment after neonatal hypoxic-ischemic injury in rat brain. *PLoS ONE*. 2014;9(4):e95643.
465. Robinson S, Corbett CJ, Winer JL, Chan LAS, Maxwell JR, Anstine CV, et al. Neonatal erythropoietin mitigates impaired gait, social interaction and diffusion tensor imaging abnormalities in a rat model of prenatal brain injury. *Exp Neurol*. 2018;302:1-13.
466. Lee JH, Kam EH, Kim SY, Cheon SY, Kim EJ, Chung S, et al. Erythropoietin Attenuates Postoperative Cognitive Dysfunction by Shifting Macrophage Activation toward the M2 Phenotype. *Frontiers in pharmacology*. 2017;8:839-.
467. Bond WS, Rex TS. Evidence That Erythropoietin Modulates Neuroinflammation through Differential Action on Neurons, Astrocytes, and Microglia. *Frontiers in immunology*. 2014;5:523-.
468. Balduini W, Carloni S, Perrone S, Bertrando S, Tataranno ML, Negro S, et al. The use of melatonin in hypoxic-ischemic brain damage: an experimental study. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2012;25 Suppl 1:119-24.
469. Shah SA, Khan M, Jo MH, Jo MG, Amin FU, Kim MO. Melatonin Stimulates the SIRT1/Nrf2 Signaling Pathway Counteracting Lipopolysaccharide (LPS)-Induced Oxidative Stress to Rescue Postnatal Rat Brain. *CNS Neurosci Ther*. 2016.
470. Wong CS, Jow GM, Kaizaki A, Fan LW, Tien LT. Melatonin ameliorates brain injury induced by systemic lipopolysaccharide in neonatal rats. *Neuroscience*. 2014;267:147-56.
471. Wang Y, Li B, Li Z, Huang S, Wang J, Sun R. Improvement of hypoxia-ischemia-induced white matter injury in immature rat brain by ethyl pyruvate. *Neurochem Res*. 2013;38(4):742-52.
472. Wang Y, Yin P, Huang S, Wang J, Sun R. Ethyl pyruvate protects against lipopolysaccharide-induced white matter injury in the developing rat brain. *Int J Dev Neurosci*. 2013;31(3):181-8.
473. Shen H, Hu X, Liu C, Wang S, Zhang W, Gao H, et al. Ethyl pyruvate protects against hypoxic-ischemic brain injury via anti-cell death and anti-inflammatory mechanisms. *Neurobiol Dis*. 2010;37(3):711-22.
474. Han Y, Englert JA, Yang R, Delude RL, Fink MP. Ethyl pyruvate inhibits nuclear factor-kappaB-dependent signaling by directly targeting p65. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005;312(3):1097-105.

475. Shin J-H, Kim S-W, Jin Y, Kim I-D, Lee J-K. Ethyl pyruvate-mediated Nrf2 activation and hemoxygenase 1 induction in astrocytes confer protective effects via autocrine and paracrine mechanisms. *Neurochem Int.* 2012;61(1):89-99.
476. Spasova MS, Sadowska GB, Threlkeld SW, Lim YP, Stonestreet BS. Ontogeny of inter-alpha inhibitor proteins in ovine brain and somatic tissues. *Exp Biol Med (Maywood).* 2014;239(6):724-36.
477. Chen X, Rivard L, Naqvi S, Nakada S, Padbury JF, Sanchez-Esteban J, et al. Expression and localization of Inter-alpha Inhibitors in rodent brain. *Neuroscience.* 2016;324:69-81.
478. Threlkeld SW, Gaudet CM, La Rue ME, Dugas E, Hill CA, Lim Y-P, et al. Effects of inter-alpha inhibitor proteins on neonatal brain injury: Age, task and treatment dependent neurobehavioral outcomes. *Exp Neurol.* 2014;261:424-33.
479. Barrios-Anderson A, Chen X, Nakada S, Chen R, Lim YP, Stonestreet BS. Inter-alpha Inhibitor Proteins Modulate Neuroinflammatory Biomarkers After Hypoxia-Ischemia in Neonatal Rats. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2019;78(8):742-55.
480. Threlkeld SW, Lim YP, La Rue M, Gaudet C, Stonestreet BS. Immuno-modulator inter-alpha inhibitor proteins ameliorate complex auditory processing deficits in rats with neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Brain Behav Immun.* 2017;64:173-9.
481. Coleman M, Orvis A, Wu T-Y, Dacanay M, Merillat S, Ogle J, et al. A Broad Spectrum Chemokine Inhibitor Prevents Preterm Labor but Not Microbial Invasion of the Amniotic Cavity or Neonatal Morbidity in a Non-human Primate Model. *Frontiers in Immunology.* 2020;11(770).
482. Shynlova O, Dorogin A, Li Y, Lye S. Inhibition of infection-mediated preterm birth by administration of broad spectrum chemokine inhibitor in mice. *J Cell Mol Med.* 2014;18(9):1816-29.
483. Hagbi-Levi S, Abraham M, Tiosano L, Rinsky B, Grunin M, Eizenberg O, et al. Promiscuous Chemokine Antagonist (BKT130) Suppresses Laser-Induced Choroidal Neovascularization by Inhibition of Monocyte Recruitment. *J Immunol Res.* 2019;2019:8535273.
484. Fernando N, Natoli R, Valter K, Provis J, Rutar M. The broad-spectrum chemokine inhibitor NR58-3.14.3 modulates macrophage-mediated inflammation in the diseased retina. *J Neuroinflammation.* 2016;13:47.

485. Moretti R, Leger P-L, Besson VC, Csaba Z, Pansiot J, Di Criscio L, et al. Sildenafil, a cyclic GMP phosphodiesterase inhibitor, induces microglial modulation after focal ischemia in the neonatal mouse brain. *J Neuroinflammation*. 2016;13(1):1-12.
486. Kniotek M, Boguska A. Sildenafil Can Affect Innate and Adaptive Immune System in Both Experimental Animals and Patients. *Journal of Immunology Research*. 2017;2017:4541958.
487. Charriaut-Marlangue C, Nguyen T, Bonnin P, Duy AP, Leger PL, Csaba Z. Sildenafil mediates blood-flow redistribution and neuroprotection after neonatal hypoxia-ischemia. *Stroke*. 2014;45.
488. Zhao S, Zhang L, Lian G, Wang X, Zhang H, Yao X, et al. Sildenafil attenuates LPS-induced pro-inflammatory responses through down-regulation of intracellular ROS-related MAPK/NF- $\kappa$ B signaling pathways in N9 microglia. *Int Immunopharmacol*. 2011;11(4):468-74.
489. de Santana Nunes AK, Rapôso C, Björklund U, da Cruz-Höfling MA, Peixoto CA, Hansson E. Sildenafil (Viagra®) prevents and restores LPS-induced inflammation in astrocytes. *Neurosci Lett*. 2016;630:59-65.
490. Hansson E, Björklund U, Skiöldebrand E, Rönnbäck L. Anti-inflammatory effects induced by pharmaceutical substances on inflammatory active brain astrocytes-promising treatment of neuroinflammation. *J Neuroinflammation*. 2018;15(1):321.
491. Carty ML, Wixey JA, Colditz PB, Buller KM. Post-insult minocycline treatment attenuates hypoxia-ischemia-induced neuroinflammation and white matter injury in the neonatal rat: a comparison of two different dose regimens. *Int J Dev Neurosci*. 2008;26(5):477-85.
492. Cai Z, Lin S, Fan LW, Pang Y, Rhodes PG. Minocycline alleviates hypoxic-ischemic injury to developing oligodendrocytes in the neonatal rat brain. *Neuroscience*. 2006;137(2):425-35.
493. Fan LW, Lin S, Pang Y, Rhodes PG, Cai Z. Minocycline attenuates hypoxia-ischemia-induced neurological dysfunction and brain injury in the juvenile rat. *Eur J Neurosci*. 2006;24(2):341-50.
494. Fan LW, Pang Y, Lin S, Tien LT, Ma T, Rhodes PG, et al. Minocycline reduces lipopolysaccharide-induced neurological dysfunction and brain injury in the neonatal rat. *J Neurosci Res*. 2005;82(1):71-82.
495. Kobayashi K, Imagama S, Ohgomori T, Hirano K, Uchimura K, Sakamoto K, et al. Minocycline selectively inhibits M1 polarization of microglia. *Cell Death Dis*. 2013;4:e525.

496. van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2018;19(4):213-28.
497. Matei AC, Antounians L, Zani A. Extracellular Vesicles as a Potential Therapy for Neonatal Conditions: State of the Art and Challenges in Clinical Translation. *Pharmaceutics*. 2019;11(8):404.
498. Thomi G, Surbek D, Haesler V, Joerger-Messerli M, Schoeberlein A. Exosomes derived from umbilical cord mesenchymal stem cells reduce microglia-mediated neuroinflammation in perinatal brain injury. *Stem Cell Research & Therapy*. 2019;10(1):105.
499. Braun RK, Chetty C, Balasubramaniam V, Centanni R, Haraldsdottir K, Hematti P, et al. Intraperitoneal injection of MSC-derived exosomes prevent experimental bronchopulmonary dysplasia. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;503(4):2653-8.
500. Li B, Lee C, O'Connell JS, Antounians L, Ganji N, Alganabi M, et al. Activation of Wnt signaling by amniotic fluid stem cell-derived extracellular vesicles attenuates intestinal injury in experimental necrotizing enterocolitis. *Cell Death & Disease*. 2020;11(9):750.
501. Jaimes Y, Naaldijk Y, Wenk K, Leovsky C, Emmrich F. Mesenchymal Stem Cell-Derived Microvesicles Modulate Lipopolysaccharides-Induced Inflammatory Responses to Microglia Cells. *Stem Cells*. 2017;35(3):812-23.
502. Huang S, Ge X, Yu J, Han Z, Yin Z, Li Y, et al. Increased miR-124-3p in microglial exosomes following traumatic brain injury inhibits neuronal inflammation and contributes to neurite outgrowth via their transfer into neurons. *FASEB J*. 2018;32(1):512-28.
503. Du L, Jiang Y, Sun Y. Astrocyte-derived exosomes carry microRNA-17-5p to protect neonatal rats from hypoxic-ischemic brain damage via inhibiting BNIP-2 expression. *Neurotoxicology*. 2020;83:28-39.
504. Dinarello CA. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunol Rev*. 2018;281(1):8-27.
505. Dinarello CA, Simon A, van der Meer JWM. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. *Nat Rev Drug Discov*. 2012;11(8):633-52.
506. Illes P, Rubini P, Ulrich H, Zhao Y, Tang Y. Regulation of Microglial Functions by Purinergic Mechanisms in the Healthy and Diseased CNS. *Cells*. 2020;9(5).

507. Garlanda C, Riva F, Bonavita E, Gentile S, Mantovani A. Decoys and Regulatory “Receptors” of the IL-1/Toll-Like Receptor Superfamily. *Frontiers in Immunology*. 2013;4(180).
508. Boraschi D, Italiani P, Weil S, Martin MU. The family of the interleukin-1 receptors. *Immunol Rev*. 2018;281(1):197-232.
509. Gosselin D, Bellavance MA, Rivest S. IL-1RAcPb signaling regulates adaptive mechanisms in neurons that promote their long-term survival following excitotoxic insults. *Front Cell Neurosci*. 2013;7:9.
510. Yoshida T, Shiroshima T, Lee S-J, Yasumura M, Uemura T, Chen X, et al. Interleukin-1 Receptor Accessory Protein Organizes Neuronal Synaptogenesis as a Cell Adhesion Molecule. *The Journal of Neuroscience*. 2012;32(8):2588.
511. Wesche H, Korherr C, Kracht M, Falk W, Resch K, Martin MU. The interleukin-1 receptor accessory protein (IL-1RAcP) is essential for IL-1-induced activation of interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) and stress-activated protein kinases (SAP kinases). *J Biol Chem*. 1997;272(12):7727-31.
512. Korherr C, Hofmeister R, Wesche H, Falk W. A critical role for interleukin-1 receptor accessory protein in interleukin-1 signaling. *Eur J Immunol*. 1997;27(1):262-7.
513. Peters VA, Joesting JJ, Freund GG. IL-1 receptor 2 (IL-1R2) and its role in immune regulation. *Brain, behavior, and immunity*. 2013;32:1-8.
514. Hori T, Shibata M, Nakashima T, Yamasaki M, Asami A, Asami T, et al. Effects of interleukin-1 and arachidonate on the preoptic and anterior hypothalamic neurons. *Brain Res Bull*. 1988;20(1):75-82.
515. Nakashima T, Hori T, Mori T, Kuriyama K, Mizuno K. Recombinant human interleukin-1 beta alters the activity of preoptic thermosensitive neurons in vitro. *Brain Res Bull*. 1989;23(3):209-13.
516. Murakami N, Sakata Y, Watanabe T. Central action sites of interleukin-1 beta for inducing fever in rabbits. *The Journal of physiology*. 1990;428:299-312.
517. Liu X, Quan N. Microglia and CNS Interleukin-1: Beyond Immunological Concepts. *Frontiers in Neurology*. 2018;9(8).
518. Olivadoti MD, Opp MR. Effects of i.c.v. administration of interleukin-1 on sleep and body temperature of interleukin-6-deficient mice. *Neuroscience*. 2008;153(1):338-48.

519. Fang J, Wang Y, Krueger JM. Effects of interleukin-1 beta on sleep are mediated by the type I receptor. *Am J Physiol.* 1998;274(3):R655-60.
520. Krueger JM. The role of cytokines in sleep regulation. *Curr Pharm Des.* 2008;14(32):3408-16.
521. Alam MN, McGinty D, Bashir T, Kumar S, Imeri L, Opp MR, et al. Interleukin-1beta modulates state-dependent discharge activity of preoptic area and basal forebrain neurons: role in sleep regulation. *Eur J Neurosci.* 2004;20(1):207-16.
522. Nguyen JT, Sahabandu D, Taishi P, Xue M, Jewett K, Dykstra-Aiello C, et al. The neuron-specific interleukin-1 receptor accessory protein alters emergent network state properties in Vitro. *Neurobiology of sleep and circadian rhythms.* 2019;6:35-43.
523. Taishi P, Davis CJ, Bayomy O, Zielinski MR, Liao F, Clinton JM, et al. Brain-specific interleukin-1 receptor accessory protein in sleep regulation. *J Appl Physiol (1985).* 2012;112(6):1015-22.
524. Yirmiya R, Winocur G, Goshen I. Brain Interleukin-1 Is Involved in Spatial Memory and Passive Avoidance Conditioning. *Neurobiol Learn Mem.* 2002;78(2):379-89.
525. Goshen I, Kreisel T, Ounallah-Saad H, Renbaum P, Zalzstein Y, Ben-Hur T, et al. A dual role for interleukin-1 in hippocampal-dependent memory processes. *Psychoneuroendocrinology.* 2007;32(8):1106-15.
526. Ross FM, Allan SM, Rothwell NJ, Verkhratsky A. A dual role for interleukin-1 in LTP in mouse hippocampal slices. *J Neuroimmunol.* 2003;144(1):61-7.
527. del Rey A, Balschun D, Wetzel W, Randolph A, Besedovsky HO. A cytokine network involving brain-borne IL-1 $\beta$ , IL-1ra, IL-18, IL-6, and TNF $\alpha$  operates during long-term potentiation and learning. *Brain Behav Immun.* 2013;33:15-23.
528. Takemiya T, Fumizawa K, Yamagata K, Iwakura Y, Kawakami M. Brain Interleukin-1 Facilitates Learning of a Water Maze Spatial Memory Task in Young Mice. *Frontiers in behavioral neuroscience.* 2017;11:202-.
529. Boato F, Hechler D, Rosenberger K, Lüdecke D, Peters EM, Nitsch R, et al. Interleukin-1 beta and neurotrophin-3 synergistically promote neurite growth in vitro. *J Neuroinflammation.* 2011;8:183.
530. Park SY, Kang MJ, Han JS. Interleukin-1 beta promotes neuronal differentiation through the Wnt5a/RhoA/JNK pathway in cortical neural precursor cells. *Mol Brain.* 2018;11(1):39.

531. Zhang X, Zhu J, Yang G-Y, Wang Q-J, Qian L, Chen Y-M, et al. Dishevelled promotes axon differentiation by regulating atypical protein kinase C. *Nat Cell Biol.* 2007;9(7):743-54.
532. Ma L, Li X-W, Zhang S-J, Yang F, Zhu G-M, Yuan X-B, et al. Interleukin-1 beta guides the migration of cortical neurons. *J Neuroinflammation.* 2014;11:114-.
533. Diem R, Hobom M, Grötsch P, Kramer B, Bähr M. Interleukin-1 beta protects neurons via the interleukin-1 (IL-1) receptor-mediated Akt pathway and by IL-1 receptor-independent decrease of transmembrane currents in vivo. *Mol Cell Neurosci.* 2003;22(4):487-500.
534. Todd L, Palazzo I, Suarez L, Liu X, Volkov L, Hoang TV, et al. Reactive microglia and IL1 $\beta$ /IL-1R1-signaling mediate neuroprotection in excitotoxin-damaged mouse retina. *J Neuroinflammation.* 2019;16(1):118.
535. Dinarello CA. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood.* 2011;117(14):3720-32.
536. Ratajczak MZ, Mack A, Bujko K, Domingues A, Pedziwiatr D, Kucia M, et al. ATP-Nlrp3 Inflammasome-Complement Cascade Axis in Sterile Brain Inflammation in Psychiatric Patients and its Impact on Stem Cell Trafficking. *Stem Cell Reviews and Reports.* 2019;15(4):497-505.
537. Omer M, Melo AM, Kelly L, Mac Dermott EJ, Leahy TR, Killeen O, et al. Emerging Role of the NLRP3 Inflammasome and Interleukin-1 $\beta$  in Neonates. *Neonatology.* 2020;117(5):545-54.
538. Cavalli G, Dinarello CA. Anakinra Therapy for Non-cancer Inflammatory Diseases. *Front Pharmacol.* 2018;9:1157.
539. Dinarello CA. An expanding role for interleukin-1 blockade from gout to cancer. *Molecular medicine (Cambridge, Mass).* 2014;20 Suppl 1(Suppl 1):S43-S58.
540. Cavalli G, Dinarello CA. Treating rheumatological diseases and co-morbidities with interleukin-1 blocking therapies. *Rheumatology.* 2015;54(12):2134-44.
541. Gram H. The long and winding road in pharmaceutical development of canakinumab from rare genetic autoinflammatory syndromes to myocardial infarction and cancer. *Pharmacol Res.* 2020;154:104139.
542. Landmann EC, Walker UA. Pharmacological treatment options for cryopyrin-associated periodic syndromes. *Expert Rev Clin Pharmacol.* 2017;10(8):855-64.



543. Dinarello CA, van der Meer JW. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in humans. *Semin Immunol.* 2013;25(6):469-84.
544. Aubert P, Suárez-Fariñas M, Mitsui H, Johnson-Huang LM, Harden JL, Pierson KC, et al. Homeostatic Tissue Responses in Skin Biopsies from NOMID Patients with Constitutive Overproduction of IL-1 $\beta$ . *PLoS ONE.* 2012;7(11):e49408.
545. Murray KN, Parry-Jones AR, Allan SM. Interleukin-1 and acute brain injury. *Frontiers in Cellular Neuroscience.* 2015;9(18).
546. Girard S, Sebire H, Brochu ME, Briota S, Sarret P, Sebire G. Postnatal administration of IL-1Ra exerts neuroprotective effects following perinatal inflammation and/or hypoxic-ischemic injuries. *Brain Behav Immun.* 2012;26(8):1331-9.
547. Girard S, Tremblay L, Lepage M, Sébire G. IL-1 receptor antagonist protects against placental and neurodevelopmental defects induced by maternal inflammation. *J Immunol.* 2010;184(7):3997-4005.
548. Savard A, Brochu ME, Chevin M, Guiraut C, Grbic D, Sebire G. Neuronal self-injury mediated by IL-1beta and MMP-9 in a cerebral palsy model of severe neonatal encephalopathy induced by immune activation plus hypoxia-ischemia. *J Neuroinflammation.* 2015;12:111.
549. Savard A, Lavoie K, Brochu ME, Grbic D, Lepage M, Gris D, et al. Involvement of neuronal IL-1beta in acquired brain lesions in a rat model of neonatal encephalopathy. *J Neuroinflammation.* 2013;10:110.
550. Leitner K, Al Shammary M, McLane M, Johnston MV, Elovitz MA, Burd I. IL-1 receptor blockade prevents fetal cortical brain injury but not preterm birth in a mouse model of inflammation-induced preterm birth and perinatal brain injury. *Am J Reprod Immunol.* 2014;71(5):418-26.
551. Quiniou C, Sapiha P, Lahaie I, Hou X, Brault S, Beauchamp M, et al. Development of a novel noncompetitive antagonist of IL-1 receptor. *J Immunol.* 2008;180(10):6977-87.
552. Quiniou C, Kooli E, Joyal J-S, Sapiha P, Sennlaub F, Lahaie I, et al. Interleukin-1 and Ischemic Brain Injury in the Newborn: Development of a Small Molecule Inhibitor of IL-1 Receptor. *Semin Perinatol.* 2008;32(5):325-33.
553. Nadeau-Vallee M, Quiniou C, Palacios J, Hou X, Erfani A, Madaan A, et al. Novel Noncompetitive IL-1 Receptor-Biased Ligand Prevents Infection- and Inflammation-Induced Preterm Birth. *J Immunol.* 2015;195(7):3402-15.

554. Rivera JC, Sitaras N, Noueihed B, Hamel D, Madaan A, Zhou T, et al. Microglia and interleukin-1beta in ischemic retinopathy elicit microvascular degeneration through neuronal semaphorin-3A. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33(8):1881-91.
555. Sayah DN, Zhou TE, Omri S, Mazzaferri J, Quiniou C, Wirth M, et al. Novel Anti-Interleukin-1beta Therapy Preserves Retinal Integrity: A Longitudinal Investigation Using OCT Imaging and Automated Retinal Segmentation in Small Rodents. *Front Pharmacol.* 2020;11:296.
556. Nadeau-Vallee M, Chin PY, Belarbi L, Brien ME, Pundir S, Berryer MH, et al. Antenatal Suppression of IL-1 Protects against Inflammation-Induced Fetal Injury and Improves Neonatal and Developmental Outcomes in Mice. *J Immunol.* 2017;198(5):2047-62.
557. Beaudry-Richard A, Nadeau-Vallée M, Prairie É, Maurice N, Heckel É, Nezhady M, et al. Antenatal IL-1-dependent inflammation persists postnatally and causes retinal and sub-retinal vasculopathy in progeny. *Scientific Reports.* 2018;8(1):11875.
558. Qian D, Li L, Rong Y, Liu W, Wang Q, Zhou Z, et al. Blocking Notch signal pathway suppresses the activation of neurotoxic A1 astrocytes after spinal cord injury. *Cell Cycle.* 2019;18(21):3010-29.
559. Pierre WC, Akakpo L, Londono I, Pouliot P, Chemtob S, Lesage F, et al. Assessing therapeutic response non-invasively in a neonatal rat model of acute inflammatory white matter injury using high-field MRI. *Brain Behav Immun.* 2019;81:348-60.
560. Wang H, Nagai A, Sheikh AM, Liang XY, Yano S, Mitaki S, et al. Human mesenchymal stem cell transplantation changes proinflammatory gene expression through a nuclear factor-kappaB-dependent pathway in a rat focal cerebral ischemic model. *J Neurosci Res.* 2013;91(11):1440-9.
561. Lévesque ML, Casey KF, Szyf M, Ismaylova E, Ly V, Verner M-P, et al. Genome-wide DNA methylation variability in adolescent monozygotic twins followed since birth. *Epigenetics.* 2014;9(10):1410-22.
562. Campbell LR, Pang Y, Ojeda NB, Zheng B, Rhodes PG, Alexander BT. Intracerebral lipopolysaccharide induces neuroinflammatory change and augmented brain injury in growth-restricted neonatal rats. *Pediatr Res.* 2012;71(6):645-52.
563. Asami A, Kurganov E, Miyata S. Proliferation of endothelial cells in the choroid plexus of normal and hydrocephalic mice. *J Chem Neuroanat.* 2020;106:101796.

564. Karimy JK, Zhang J, Kurland DB, Theriault BC, Duran D, Stokum JA, et al. Inflammation-dependent cerebrospinal fluid hypersecretion by the choroid plexus epithelium in posthemorrhagic hydrocephalus. *Nat Med.* 2017;23(8):997-1003.
565. Ment LR, Vohr B, Allan W, Westerveld M, Katz KH, Schneider KC, et al. The etiology and outcome of cerebral ventriculomegaly at term in very low birth weight preterm infants. *Pediatrics.* 1999;104(2 Pt 1):243-8.
566. Pang Y, Fan LW, Zheng B, Campbell LR, Cai Z, Rhodes PG. Dexamethasone and betamethasone protect against lipopolysaccharide-induced brain damage in neonatal rats. *Pediatr Res.* 2012;71(5):552-8.
567. Dorner RA, Burton VJ, Allen MC, Robinson S, Soares BP. Preterm neuroimaging and neurodevelopmental outcome: a focus on intraventricular hemorrhage, post-hemorrhagic hydrocephalus, and associated brain injury. *Journal of perinatology : official journal of the California Perinatal Association.* 2018;38(11):1431-43.
568. Leviton A, Gilles F. Ventriculomegaly, delayed myelination, white matter hypoplasia, and "periventricular" leukomalacia: how are they related? *Pediatr Neurol.* 1996;15(2):127-36.
569. Olopade FE, Shokunbi MT, Sirén A-L. The relationship between ventricular dilatation, neuropathological and neurobehavioural changes in hydrocephalic rats. *Fluids and Barriers of the CNS.* 2012;9(1):19.
570. Palm WM, Saczynski JS, van der Grond J, Sigurdsson S, Kjartansson O, Jonsson PV, et al. Ventricular dilation: association with gait and cognition. *Ann Neurol.* 2009;66(4):485-93.
571. Del Bigio MR, Wilson MJ, Enno T. Chronic hydrocephalus in rats and humans: white matter loss and behavior changes. *Ann Neurol.* 2003;53(3):337-46.
572. Pappas A, Adams-Chapman I, Shankaran S, McDonald SA, Stoll BJ, Laptook AR, et al. Neurodevelopmental and Behavioral Outcomes in Extremely Premature Neonates With Ventriculomegaly in the Absence of Periventricular-Intraventricular Hemorrhage. *JAMA Pediatrics.* 2018;172(1):32-42.
573. Neil J, Miller J, Mukherjee P, Hüppi PS. Diffusion tensor imaging of normal and injured developing human brain - a technical review. *NMR Biomed.* 2002;15(7-8):543-52.
574. Lodygensky GA, Rademaker K, Zimine S, Gex-Fabry M, Liefink AF, Lazeyras F, et al. Structural and functional brain development after hydrocortisone treatment for neonatal chronic lung disease. *Pediatrics.* 2005;116(1):1-7.

575. Cardoso FL, Herz J, Fernandes A, Rocha J, Sepodes B, Brito MA, et al. Systemic inflammation in early neonatal mice induces transient and lasting neurodegenerative effects. *J Neuroinflammation*. 2015;12(1):82.
576. Järlestedt K, Naylor AS, Dean J, Hagberg H, Mallard C. Decreased survival of newborn neurons in the dorsal hippocampus after neonatal LPS exposure in mice. *Neuroscience*. 2013;253:21-8.
577. Gisslen T, Singh G, Georgieff MK. Fetal inflammation is associated with persistent systemic and hippocampal inflammation and dysregulation of hippocampal glutamatergic homeostasis. *Pediatr Res*. 2019;85(5):703-10.
578. Malaeb SN, Davis JM, Pinz IM, Newman JL, Dammann O, Rios M. Effect of Sustained Postnatal Systemic Inflammation on Hippocampal Volume and Function in Mice. *Pediatr Res*. 2014;76(4):363-9.
579. Nowogrodzki A. The world's strongest MRI machines are pushing human imaging to new limits. *Nature*. 2018;563(7729):24-6.
580. Tocchio S, Kline-Fath B, Kanal E, Schmithorst VJ, Panigrahy A. MRI evaluation and safety in the developing brain. *Semin Perinatol*. 2015;39(2):73-104.
581. Hoyer C, Gass N, Weber-Fahr W, Sartorius A. Advantages and challenges of small animal magnetic resonance imaging as a translational tool. *Neuropsychobiology*. 2014;69(4):187-201.
582. Enguix V, Ding Y, Lodygensky GA. Recent advances in preclinical and clinical multimodal MR in the newborn brain. *J Magn Reson*. 2018;292:149-54.
583. van de Looij Y, Vasung L, Sizonenko SV, Hüppi PS. MRI of animal models of developmental disorders and translation to human imaging. *Curr Opin Neurol*. 2014;27(2):157-67.
584. O’Gorman RL, Bucher HU, Held U, Koller BM, Hüppi PS, Hagmann CF, et al. Tract-based spatial statistics to assess the neuroprotective effect of early erythropoietin on white matter development in preterm infants. *Brain*. 2015;138(2):388-97.
585. Leuchter RH, Gui L, Poncet A, Hagmann C, Lodygensky GA, Martin E, et al. Association between early administration of high-dose erythropoietin in preterm infants and brain MRI abnormality at term-equivalent age. *JAMA*. 2014;312(8):817-24.

586. Merchant N, Azzopardi D, Counsell S, Gressens P, Dierl A, Gozar I, et al. O-057 Melatonin As A Novel Neuroprotectant In Preterm Infants – A Double Blinded Randomised Controlled Trial (mint Study). *Arch Dis Child*. 2014;99(Suppl 2):A43-A.
587. Aly H, Elmahdy H, El-Dib M, Rowisha M, Awny M, El-Gohary T, et al. Melatonin use for neuroprotection in perinatal asphyxia: a randomized controlled pilot study. *J Perinatol*. 2015;35(3):186-91.
588. Gano D, Ho ML, Partridge JC, Glass HC, Xu D, Barkovich AJ, et al. Antenatal Exposure to Magnesium Sulfate Is Associated with Reduced Cerebellar Hemorrhage in Preterm Newborns. *J Pediatr*. 2016;178:68-74.
589. Poppe T, Thompson B, Boardman JP, Bastin ME, Alsweiler J, Deib G, et al. Effect of antenatal magnesium sulphate on MRI biomarkers of white matter development at term equivalent age: The magnum study. *EBioMedicine*. 2020;59:102957.
590. Plaisier A, Govaert P, Lequin MH, Dudink J. Optimal Timing of Cerebral MRI in Preterm Infants to Predict Long-Term Neurodevelopmental Outcome: A Systematic Review. *American Journal of Neuroradiology*. 2014;35(5):841.
591. Lee HJ, Kwon H, Kim JI, Lee JY, Lee JY, Bang S, et al. The cingulum in very preterm infants relates to language and social-emotional impairment at 2 years of term-equivalent age. *Neuroimage Clin*. 2021;29:102528.
592. Malhotra A, Fahey MC, Davies-Tuck M, Wong F, Carse E, Whiteley G, et al. Comparison of preterm and term equivalent age MRI for the evaluation of preterm brain injury. *J Perinatol*. 2017;37(7):864-8.
593. Clarke LE, Liddel SA, Chakraborty C, Münch AE, Heiman M, Barres BA. Normal aging induces A1-like astrocyte reactivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(8):E1896-e905.
594. Shio LR, Favrais G, Schirmer L, Schang AL, Cipriani S, Andres C, et al. Reactive astrocyte COX2-PGE2 production inhibits oligodendrocyte maturation in neonatal white matter injury. *Glia*. 2017;65(12):2024-37.
595. Schwarz JM, Bilbo SD. LPS elicits a much larger and broader inflammatory response than *Escherichia coli* infection within the hippocampus of neonatal rats. *Neurosci Lett*. 2011;497(2):110-5.
596. Banks WA, Robinson SM. Minimal penetration of lipopolysaccharide across the murine blood-brain barrier. *Brain Behav Immun*. 2010;24(1):102-9.

597. Goralski KB, Abdulla D, Sinal CJ, Arsenault A, Renton KW. Toll-like receptor-4 regulation of hepatic Cyp3a11 metabolism in a mouse model of LPS-induced CNS inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005;289(3):G434-43.
598. Chen G, McCuskey RS, Reichlin S. Blood interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha elevation after intracerebroventricular injection of Escherichia coli endotoxin in the rat is determined by two opposing factors: peripheral induction by LPS transferred from brain to blood and inhibition of peripheral response by a brain-mediated mechanism. *Neuroimmunomodulation*. 2000;8(2):59-69.
599. Lan KM, Tien LT, Pang Y, Bhatt AJ, Fan LW. IL-1 receptor antagonist attenuates neonatal lipopolysaccharide-induced long-lasting learning impairment and hippocampal injury in adult rats. *Toxicol Lett*. 2015;234(1):30-9.
600. Girard S, Murray KN, Rothwell NJ, Metz GAS, Allan SM. Long-term functional recovery and compensation after cerebral ischemia in rats. *Behav Brain Res*. 2014;270(100):18-28.
601. Hsieh CT, Lee YJ, Lee JW, Lu S, Tucci MA, Dai X, et al. Interleukin-1 receptor antagonist ameliorates the pain hypersensitivity, spinal inflammation and oxidative stress induced by systemic lipopolysaccharide in neonatal rats. *Neurochem Int*. 2020;135:104686.
602. Das A, Chai JC, Kim SH, Lee YS, Park KS, Jung KH, et al. Transcriptome sequencing of microglial cells stimulated with TLR3 and TLR4 ligands. *BMC Genomics*. 2015;16(1):517.
603. Das A, Chai JC, Kim SH, Park KS, Lee YS, Jung KH, et al. Dual RNA Sequencing Reveals the Expression of Unique Transcriptomic Signatures in Lipopolysaccharide-Induced BV-2 Microglial Cells. *PLoS ONE*. 2015;10(3):e0121117.
604. Das A, Kim SH, Arifuzzaman S, Yoon T, Chai JC, Lee YS, et al. Transcriptome sequencing reveals that LPS-triggered transcriptional responses in established microglia BV2 cell lines are poorly representative of primary microglia. *J Neuroinflammation*. 2016;13(1):182.
605. Veland N, Lu Y, Hardikar S, Gaddis S, Zeng Y, Liu B, et al. DNMT3L facilitates DNA methylation partly by maintaining DNMT3A stability in mouse embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(1):152-67.
606. Matt SM, Lawson MA, Johnson RW. Aging and peripheral lipopolysaccharide can modulate epigenetic regulators and decrease IL-1 $\beta$  promoter DNA methylation in microglia. *Neurobiol Aging*. 2016;47:1-9.

607. Antonson AM, Lawson MA, Caputo MP, Matt SM, Leyshon BJ, Johnson RW. Maternal viral infection causes global alterations in porcine fetal microglia. *Proc Natl Acad Sci.* 2019;116(40):20190.
608. Griffin PT, Niederhuth CE, Schmitz RJ. A Comparative Analysis of 5-Azacytidine- and Zebularine-Induced DNA Demethylation. *G3 Genes|Genomes|Genetics.* 2016;6(9):2773-80.
609. Jurga AM, Paleczna M, Kuter KZ. Overview of General and Discriminating Markers of Differential Microglia Phenotypes. *Frontiers in Cellular Neuroscience.* 2020;14(198).
610. Dabouz R, Cheng CWH, Abram P, Omri S, Cagnone G, Sawmy KV, et al. An allosteric interleukin-1 receptor modulator mitigates inflammation and photoreceptor toxicity in a model of retinal degeneration. *J Neuroinflammation.* 2020;17(1):359.
611. Kullenberg T, Löfqvist M, Leinonen M, Goldbach-Mansky R, Olivecrona H. Long-term safety profile of anakinra in patients with severe cryopyrin-associated periodic syndromes. *Rheumatology (Oxford).* 2016;55(8):1499-506.
612. Galea J, Ogungbenro K, Hulme S, Greenhalgh A, Aarons L, Scarth S, et al. Intravenous Anakinra can Achieve Experimentally Effective Concentrations in the Central Nervous System within a Therapeutic Time Window: Results of a Dose-Ranging Study. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism.* 2010;31(2):439-47.

# Annexe 1 : Droit d'auteurs de l'article 1

## Alteration of the brain methylation landscape following postnatal inflammatory injury in rat pups

Wyston C. Pierre, Lisa-Marie Legault, Irene Londono, Serge McGraw, Gregory A. Lodygensky

First published: 22 November 2019 | <https://doi.org/10.1096/fj.201901461R>

Serge McGraw and Gregory A. Lodygensky contributed equally to this study.

SECTIONS

PDF TOOLS SHARE

### Abstract

Preterm infants are vulnerable to inflammation-induced white matter injury (WMI), which is associated with neurocognitive impairment and increased risk of neuropsychiatric diseases in adulthood. Epigenetic mechanisms, particularly DNA methylation, play a role in normal development and modulate the response to pathological challenges. Our aims were to determine how WMI triggered DNA methylation alterations in brains of neonatal rats and if such changes persisted over time. We used a robust model of WMI by injecting lipopolysaccharide (LPS) or sterile saline in the corpus callosum of 3-day-old (P3) rat pups. Brains were collected 24 hours (P4) and 21 days post-injection (P24). We extracted genomic DNA from the brain to establish genome-wide quantitative DNA methylation profiles using reduced representation bisulfite sequencing. Neonatal LPS exposure induced a persistent increased methylation of genes related to nervous system development and a reduced methylation of genes associated with inflammatory pathways. These findings suggest that early-life neuroinflammatory exposure impacts the cerebral methylation landscape with determining widespread epigenetic modifications especially in genes related to neurodevelopment.



Volume 34, Issue 1  
January 2020  
Pages 432-445

Figures References Related Information

### Metrics

score 4

### Details

© 2019 The Authors. The FASEB Journal published by Wiley Periodicals, Inc., on behalf of Federation of American Societies for Experimental Biology

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution-NonCommercial](#) License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.

### Keywords

DNA methylation epigenetics







lipopolysaccharide

periventricular leukomalacia

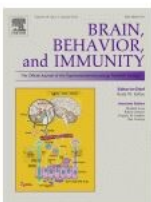


## Annexe 2 : Droit d’auteurs de l’article 2

---



Home Help Email Support Wyston Pierre ▾



**Assessing therapeutic response non-invasively in a neonatal rat model of acute inflammatory white matter injury using high-field MRI**

**Author:**  
Wyston C. Pierre, Luis Akakpo, Irène Londono, Philippe Pouliot, Sylvain Chemtob, Frédéric Lesage, Gregory A. Lodygensky

**Publication:** Brain, Behavior, and Immunity

**Publisher:** Elsevier

**Date:** October 2019

*© 2019 The Authors. Published by Elsevier Inc.*

Please note that, as the author of this Elsevier article, you retain the right to include it in a thesis or dissertation, provided it is not published commercially. Permission is not required, but please ensure that you reference the journal as the original source. For more information on this and on your other retained rights, please visit: <https://www.elsevier.com/about/our-business/policies/copyright#Author-rights>

**BACK** **CLOSE WINDOW**

© 2020 Copyright - All Rights Reserved | Copyright Clearance Center, Inc. | Privacy statement | Terms and Conditions  
Comments? We would like to hear from you. E-mail us at [customer@copyright.com](mailto:customer@copyright.com)

