



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ – NANCY I
2002

ECOLE DOCTORALE "BIOLOGIE SANTE ENVIRONNEMENT "

THESE

Présentée et soutenue publiquement
le 11 octobre 2002
pour obtenir le titre de



DOCTEUR DE L'UNIVERSITE
HENRI POINCARÉ – NANCY I
Mention Neurosciences

par

Stéphanie GROJEAN

née le 28/03/75

Titulaire de Diplôme d'Etudes Approfondies
« Métabolisme et Mécanisme d'Action des Médicaments – Pharmacologie Clinique » - Nancy I

De 2004

Etude de la réponse neuronale dans un modèle d'asphyxie cérébrale
chez le rat nouveau-né.

Influence d'une hyperbilirubinémie associée.

MEMBRES DU JURY

Juges

: Pr Paul VERT
: Pr Maria DELIVORIA-PAPADOPOULOS
: Pr Serge BRACARD

Rapporteurs

: Dr Jean-Luc DAVAL
: Pr Stéphane MARRET
: Pr Tobias HEVOR

BU PHARMA-ODONTOL



D

104 062729 0

*« La science consiste à oublier
ce que l'on croit savoir,
et la sagesse à ne pas s'en soucier. »*

Charles Nodier.

Le travail présenté dans ce mémoire a été réalisé

sous la responsabilité

du Docteur Jean-Luc Daval

à

la Jeune Equipe 2164

de l'Université Henri Poincaré Nancy I

« Adaptation Néonatale et Développement »

Directeur : Professeur Pierre Monin

puis au sein

de l'EMI 0014

à la faculté de Médecine de Nancy

Directeur : Professeur Jean-Louis Guéant

REMERCIEMENTS

Mes remerciements s'adressent :

A Monsieur Paul Vert, Professeur de Pédiatrie à la Faculté de Médecine, pour sa contribution à la reconnaissance internationale de ce travail. Qu'il trouve ici toute ma sympathie pour sa disponibilité et nos réunions scientifiques hebdomadaires.

A Monsieur le Docteur Jean-Luc Daval, Directeur de Recherche Inserm, pour la grande liberté d'action qu'il m'a laissée pour mener cette étude.

A Monsieur le Professeur Stéphane Marret, du CHU de Rouen et Monsieur le Professeur Tobias Hevor, de l'Université d'Orléans pour l'honneur qu'ils m'ont fait d'avoir bien voulu accepter d'être rapporteurs de ce mémoire.

A Madame le Professeur Maria Delivoria-Papadopoulos, professeur de Pédiatrie et de Physiologie, Chef de la Division de Médecine Périnatale et Néonatale à l'Hôpital d'enfants Saint Christopher de Philadelphie, pour avoir accepté de siéger dans ce jury.

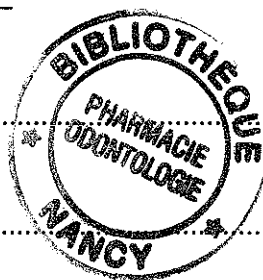
A Monsieur le Professeur Bracard, du service de Neuroradiologie de l'Hôpital Central de Nancy, pour avoir accepté de siéger dans ce jury. Qu'il trouve ici toute ma reconnaissance pour l'accès qu'il m'a donné à la technique d'IRM et pour le temps qu'il a consacré à cette étude.

A Madame le Docteur Mireille Donner du laboratoire de Nutrition et Maladies Métaboliques de Nancy, et Monsieur le Professeur Bernard Foliguet, responsable du service commun de microscopie électronique de Nancy, pour leur assistance et l'accès qu'ils m'ont donné aux systèmes d'analyse d'images.

A Madame Violette Koziel pour m'avoir guidée dans mes premiers pas au laboratoire.

A Mlle Valérie Lièvre pour son soutien moral durant ces 3 années et à notre amitié au-delà des murs du laboratoire.

SOMMAIRE



SOMMAIRE	1
LISTE DES ABREVIATIONS.....	10
INTRODUCTION.....	12
SECTION BIBLIOGRAPHIQUE	15
I) Hypoxie-ischémie périnatale.....	16
A) Définitions	16
B) Physiopathologie de l'hypoxie-ischémie.....	16
1) Vulnérabilité cérébrale.....	17
1.1) Selon l'âge.....	17
1.2) Selon le type cellulaire	18
1.3) Selon la région cérébrale.....	18
2) Causes principales de l'encéphalopathie hypoxique-ischémique.....	19
3) Manifestations pathologiques selon Volpe	19
C) Caractéristiques biochimiques de l'hypoxie ischémie	20
1) Modélisation de l'hypoxie ischémie.....	20
1.1) Modèle <i>in vivo</i>	20
1.2) Modèles <i>in vitro</i>	22
a) Tranches de cerveau	22
b) Cultures cellulaires.....	22
2) Mécanismes impliqués	23
2.1) Mécanismes physiologiques	23
2.2) Mécanismes cellulaires et biochimiques.....	24
a) Rôle du calcium intracellulaire.....	25
b) Implication des acides aminés excitateurs.....	25
c) Implication des radicaux libres.....	26
3) Caractéristiques de la mort cellulaire consécutive à l'hypoxie-ischémie.....	27
3.1) Généralités	27
3.2) Nécrose.....	27

3.3) Apoptose ou mort cellulaire programmée.....	28
a) Caractéristiques	28
b) Mécanismes moléculaires de l'apoptose.....	29
b1) Signaux	29
b2) Seconds messagers : le calcium.....	30
b3) Voies d'induction de l'apoptose	30
b4) Protéines impliquées dans l'apoptose	33
b4.1) La famille Bcl-2	33
b4.1.1) Généralités.....	33
b4.1.2) Régulation	34
b4.2) Gènes codant pour le facteur de transcription AP1	35
b4.3) p53, gène suppresseur de tumeur	37
b4.4) Les protéines de stress (HSPs).....	38
b4.5) Les caspases	41
b5) Activation des Protéines Kinases	42
b6) Synthèse protéique.....	45
b7) Fragmentation de l'ADN.....	45
b8) Fragmentation cellulaire et formation des corps apoptotiques	46
3.4) Apoptose dans l'hypoxie-ischémie	46
D) Stratégies thérapeutiques	49
1) Les traitements spécifiques	49
2) Les thérapeutiques non médicamenteuses	50
2.1) Préconditionnement	50
2.2) Hypothermie.....	51
II) L'hyperbilirubinémie, facteur aggravant d'une hypoxie cérébrale	53
A) Bilirubine	53
1) Introduction.....	53
2) Propriétés	53
2.1) Structure	53
2.2) Propriétés physico-chimiques	54
3) Métabolisme	55
3.1) Généralités	55
3.2) Transport	57

3.3) Conjugaison	59
3.4) Sécrétion de la bilirubine	60
3.5) Métabolisme de la bilirubine dans l'intestin.....	60
4) Caractéristiques de l'ictère	60
4.1) Définitions.....	60
4.2) Causes principales de l'ictère.....	61
4.3) Manifestations de l'ictère nucléaire.....	62
5) Méthodes thérapeutiques	63
5.1) La photothérapie	63
5.2) L'exsanguino-transfusion.....	64
5.3) La perfusion d'albumine	64
5.4) Traitements pharmacologiques	64
6) Modèles expérimentaux d'hyperbilirubinémie.....	65
6.1) Etudes <i>in vivo</i>	65
6.2) Etudes <i>in vitro</i>	66
7) Toxicité cérébrale de la bilirubine	66
7.1) Rôle de la Barrière Hémato-encéphalique	66
7.2) Toxicité cellulaire	68
a) Liaison de la bilirubine aux cellules.....	68
b) Toxicité neuronale.....	68
b1) Processus toxique	69
b2) Sites d'action de la bilirubine.....	69
B) Bilirubine et hypoxie	71

III) Excitotoxicité liée au glutamate, implication dans l'hypoxie-ischémie et

l'hyperbilirubinémie.....	73
A) Introduction sur le rôle du glutamate.....	73
B) Métabolisme et libération du glutamate.....	73
C) Récepteurs.....	75
1) Récepteurs NMDA	75
2) Récepteurs AMPA	77
3) Récepteurs kaïnate	77
4) Récepteurs L-AP4.....	77
5) Récepteurs métabotropes	77

D) Notion d'excitotoxicité.....	82
1) Principe	82
2) Implication de l'excitotoxicité dans l'hypoxie-ischémie.....	84
3) Implication dans l'hyperbilirubinémie	87
OBJECTIF	88
SECTION EXPERIMENTALE	92
METHODOLOGIES	93
I) Animaux	94
II) Approches <i>in vivo</i>	94
A) Exposition à l'hypoxie	94
B) Modèles de tolérance à l'hypoxie.....	96
1) Conditionnement.....	96
2) Hypothermie	96
3) Traitement par le MK801	97
C) Influence de la maturation cérébrale.....	97
1) Exposition à l'hypoxie.....	97
2) Traitement par le MK801	97
D) Effet d'une hyperbilirubinémie, facteur aggravant de l'hypoxie.....	98
E) Mesure des gaz du sang	98
F) Poids corporels et cérébraux	99
1) Suivi des animaux.....	99
2) Prélèvement des cerveaux.....	99
G) Histologie-Coloration	99
H) Morphométrie	100
1) Epaisseur de la couche des cellules pyramidales.....	102
2) Densité cellulaire	102
I) Evaluation de la mort cellulaire	102
1) Marquage des coupes au DAPI.....	102
1.1) Discrimination entre nécrose et apoptose	103
1.2) Comptage cellulaire	103
2) Fragmentation de l'ADN	104

2.1) TUNEL.....	104
2.2) Electrophorèse sur gel d'agarose	104
J) Dosage de la bilirubine	105
K) Analyse de l'expression de protéines spécifiques	106
1) Anticorps utilisés	106
1.1) Anticorps primaires.....	106
1.2) Anticorps secondaires	107
2) Protocole d'immunohistochimie.....	109
L) Etude de l'activité fonctionnelle cérébrale.....	110
1) IRM.....	110
1.1) Principe	110
a) Généralités	110
b) Imagerie de diffusion.....	110
1.2) Protocole	112
1.3) Traitements des données.	113
2) Mesure de l'activité de la cytochrome oxydase.....	113
III) Approche <i>in vitro</i>	114
A) Culture de neurones	114
1) Mise en culture.....	114
2) Caractérisation des neurones	118
B) Exposition à la bilirubine et à l'hypoxie.....	118
C) Traitements pharmacologiques	119
1) Exposition à un inhibiteur de synthèse protéique : la cycloheximide.....	119
2) Exposition à des inhibiteurs des caspases.....	120
3) Exposition au glutamate et aux antagonistes de ses récepteurs	120
D) Mesure de la viabilité	121
E) Caractérisation de la mort cellulaire	121
1) Nécrose et apoptose	121
2) Fragmentation d'ADN: mesure de la libération de thymidine tritiée	122
F) Evaluation du taux de synthèse protéique	123
G) Evaluation de l'activité fonctionnelle des neurones.....	124
H) Analyse statistiques	124

RESULTATS	125
I) Etudes <i>in vivo</i>	126
A) Effet d'une hypoxie transitoire chez le raton de 1 jour	126
1) Survie	126
2) Mesure des gaz du sang	126
3) Evolution des poids corporels et cérébraux	126
4) Morphométrie	129
4.1) Epaisseur de la couche des cellules pyramidales de l'hippocampe	129
4.2) Densité cellulaire au niveau de l'hippocampe et du cortex	129
5) Comptages cellulaires	132
6) Caractéristiques de la mort cellulaire	132
6.1) DAPI	132
6.2) TUNEL	137
6.3) Fragmentation d'ADN sur gel d'agarose	137
7) Activité de la cytochrome oxydase	137
8) Expression de protéines spécifiques	140
9) IRM	140
B) Modèles de tolérance à l'hypoxie	144
1) Conditionnement	144
1.1) Evolution des poids corporels et cérébraux	144
1.2) Morphométrie	144
1.3) Comptages cellulaires	144
1.4) Caractéristiques de la mort cellulaire	148
1.5) Expression de protéines spécifiques	148
2) Hypothermie	148
2.1) Evolution des poids corporels et cérébraux	148
2.2) Morphométrie	152
2.3) Comptages cellulaires	152
2.4) Caractéristiques de la mort cellulaire	152
2.5) Expression de protéines spécifiques	152
3) Traitement par le MK801	157
3.1) Evolution des poids corporels et cérébraux	157

3.2) Morphométrie.....	157
3.3) Comptages cellulaires	157
3.4) Caractéristiques de la mort cellulaire	161
3.5) Expression de protéines spécifiques	161
C) Etude de la maturation cérébrale.....	164
1) Effet d'une hypoxie transitoire chez le raton de 7 jours de naissance	164
1.1) Survie	164
1.2) Evolution des poids corporels et cérébraux	164
1.3) Morphométrie.....	167
1.4) Comptages cellulaires	167
1.5) Caractéristiques de la mort cellulaire	167
1.6) Expression de protéines spécifiques	170
2) Effet d'un traitement par le MK801	170
2.1) Evolution des poids corporels et cérébraux	170
2.2) Morphométrie.....	174
2.3) Comptages cellulaires	174
2.4) Caractéristiques de la mort cellulaire	174
2.5) Expression de protéines spécifiques	178
D) Effet d'une administration intrapéritonéale de bilirubine associée ou non à une hypoxie	178
1) Poids corporel et cérébral	178
2) Etude cellulaire	181
2.1) Comptages cellulaires	181
2.2) Caractéristiques de la mort cellulaire	181
2.3) Expression de protéines spécifiques	184
3) Dosage de la bilirubine	184
II) Etudes <i>in vitro</i>	187
A) Toxicité de la bilirubine.....	187
1) Toxicité en fonction de la dose de bilirubine utilisée	187
2) Toxicité en fonction du temps pour une dose donnée	187
3) Caractéristiques de la mort cellulaire.....	189
4) Evolution de la synthèse protéique	189
5) Etude de l'activité fonctionnelle des neurones.....	192

6) Fragmentation d'ADN	192
B) Toxicité de la bilirubine associée à un épisode hypoxique de 6 heures.....	192
1) Viabilité cellulaire	192
2) Caractéristiques de la mort cellulaire.....	195
3) Evolution de la synthèse protéique	195
4) Etude de l'activité fonctionnelle des neurones	197
C) Implication des récepteurs NMDA et non-NMDA du glutamate dans la neurotoxicité de la bilirubine associée ou non à une hypoxie de 6 heures	197
1) Viabilité cellulaire.....	197
2) Caractéristiques de la mort cellulaire.....	202
D) Toxicité de la bilirubine associée à un épisode hypoxique de 3 heures	201
1) Viabilité cellulaire.....	202
2) Caractéristiques de la mort cellulaire.....	206
3) Evolution de la synthèse protéique	206
4) Etude de l'activité fonctionnelle des neurones	208
E) Implication des récepteurs NMDA et non-NMDA du glutamate dans la neurotoxicité de la bilirubine associée ou non à une hypoxie de 3 heures	208
1) Viabilité cellulaire.....	208
2) Caractéristiques de la mort cellulaire.....	212
DISCUSSION	215
I) Etude <i>in vivo</i> d'une hypoxie cérébrale néonatale	216
A) Effet d'une hypoxie transitoire	216
1) Choix du modèle d'étude.....	216
2) Caractéristiques générales du modèle.....	216
3) Caractéristiques cellulaires du modèle	217
4) Caractéristiques fonctionnelles du modèle	221
4.1) IRM	221
4.2) Activité de la cytochrome oxydase	222
4.3) Etude du comportement	223
B) Modèles de tolérance	224
1) Conditionnement.....	224
2) Hypothermie	226
C) Effet d'un prétraitement par un antagoniste des récepteurs NMDA.....	228

D) Influence de la maturation cérébrale : Hypoxie réalisée chez le rat de 7 jours	229
1) Caractéristiques du modèle.....	228
2) Effet d'un prétraitement par un antagoniste des récepteurs NMDA	231
E) Influence d'une hyperbilirubinémie	234
 II) Etude <i>in vitro</i> de la toxicité de la bilirubine comme facteur aggravant	
d'une hypoxie.....	236
A) Analyse de la neurotoxicité de la bilirubine	236
1) Caractérisation du modèle de culture.....	236
2) Choix du protocole de préparation de la bilirubine et d'exposition des neurones	236
3) Toxicité neuronale de la bilirubine	237
3.1) Mort cellulaire.....	237
3.2) Implication des mécanismes d'excitotoxicité du glutamate	239
B) Effet d'une exposition simultanée des neurones à la bilirubine et à une hypoxie.....	240
 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	242
 ANNEXE.....	248
 BIBLIOGRAPHIE	250



LISTE DES ABREVIATIONS

AAE	acides aminés excitateurs
ADC	apparent diffusion coefficient
AIF	apoptosis inducing factor
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole propionate
AP-1	activated protein 1
Apaf	apoptosis protease activating factor
ATF	activated transcription factor
Bax	Bcl-2 associated protein
Bcl-2	B cell lympho leukemia-2
BHE	barrière hémato-encéphalique
CAD	caspase activated Dnase
CamKII	calcium-calmodulin-dependent protein kinase II
CDF	cholinergic differentiation factor
CHX	cycloheximide
CNTF	ciliary neurotrophic factor
CO	cytochrome oxydase
DAG	diacylglycérol
DAPI	4,6-diamidino-2-phenylindole
DEVD-CHO	N-acethyl-Asp-Glu-Val-Asp-aldéhyde
2DG	2-D-déoxyglucose
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	dimethylsulfoxyde
EGF	epidermal growth factor
ERK	extracellular-regulated kinase
FADD	Fas-associated protein with death domain
FasL	Fas ligand
FGF	fibroblast growth factor
GFAP	glial fibrillary acidic protein
HDL	High Density Lipoproteins
HEPES	N-[12 hydroxyethyl]piperazine-N'-[acide 2-ethanalsulfonique]
HIF	hypoxia inducible factor
HSE	Heat Shock transcription element



HSF	Heat Shock transcription factors
HSP	heat shock protein
ICE	Interleukine-1 β converting enzyme
IP ₃	inositol triphosphate
JNK	c-jun-N-terminal kinase
L-AP4	2-amino-4-phosphobutanoate
LDH	lactate déshydrogénase
MAPK	mitogen-associated protein kinase
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NBQX	tetrahydroxy-6-nitro-2,3-dioxo-benzo[f]quinoxaline-7-sulfonamide
NMDA	N-methyl-D-aspartate
NSE	neuron specific enolase
PBS	phosphate buffered saline
PKC	protéine kinase C
PLC	phospholipase C
RIP	receptor interacting protein
SAB	sérum albumine bovine
SNC	système nerveux central
SVF	sérum de veau foetal
t-ACPD	trans-(+)-1-amino-1,3-cyclopentanedicarboxylate
TBS	tris buffered saline
TE	tampon Tris-EDTA
TNF	tumor necrosis factor
TNFR	tumor necrosis factor receptor protein
TRADD	TNFR1-associated death domain
TUNEL	terminal deoxynucleotidyl-transferase-mediated dUTP end labeling
YVAD-CHO	N-acetyl-Tyr-Val-Ala-Asp-aldehyde

Introduction

L'encéphalopathie hypoxique-ischémique demeure une cause majeure de morbidité périnatale. Elle est caractérisée cliniquement par une diversité de déficits neurologiques qui dépendent des caractéristiques de l'agression ischémique, du moment de sa survenue et de la région cérébrale concernée.

Classiquement, les modèles d'étude *in vivo* d'une hypoxie-ischémie reposent sur des adaptations du modèle de Levine qui consistent à ligaturer une artère carotide commune puis à placer l'animal en hypoxie. L'aspect chirurgical dans ce type de technique implique que l'étude de l'hypoxie périnatale ne peut être abordée chez le rat qu'à l'âge de 7 à 10 jours. Nous avons choisi, pour notre part, de focaliser nos travaux sur les conséquences d'une hypoxie-réoxygénation à un stade plus précoce où la plasticité cérébrale est optimale. Pour cela, une hypoxie transitoire sévère a été réalisée en plaçant des animaux âgés de 1 jour dans une chambre à hypoxie où circule 100% d'azote.

Après une introduction qui rappelle succinctement quelques notions de la pathogenèse de l'hypoxie-ischémie ainsi que les mécanismes cellulaires impliqués, nous évoquerons d'éventuelles stratégies de neuroprotection, encore actuellement à l'étude. Outre le caractère délétère d'une hypoxie cérébrale, l'incidence d'une encéphalopathie hypoxique-ischémique chez le nouveau-né est encore plus élevée chez les enfants présentant un ictère nucléaire que chez les enfants sains. Or, l'hyperbilirubinémie est une pathologie fréquente en période néonatale, du fait de l'immaturation des fonctions du système hépatique dans le métabolisme de la bilirubine à la naissance. La gravité de la situation s'accroît lorsque ces deux agressions sont concomitantes, l'hypoxie-ischémie étant considérée comme un facteur de risque de développer un ictère nucléaire, aux conséquences cérébrales graves. Un rappel des caractéristiques de l'hyperbilirubinémie sera donc réalisé. Enfin, compte tenu de l'immaturation du cerveau à la naissance, nous nous intéresserons au rôle du glutamate, connu pour participer à la fois à la croissance et la maturation du SNC, ainsi qu'aux dommages causés par l'hypoxie-ischémie.

Le travail scientifique réalisé repose principalement sur l'évaluation des conséquences anatomiques et fonctionnelles d'une hypoxie transitoire chez le raton nouveau-né. Après la description du modèle utilisé et la mise en évidence des caractéristiques des lésions cérébrales observées, les propriétés de la mort cellulaire associée seront évaluées.

Dans l'idée de réduire, voire prévenir, les effets délétères de l'hypoxie, nous testerons ensuite différentes stratégies de neuroprotection, à savoir une hypothermie, un conditionnement et un traitement par un antagoniste des récepteurs NMDA du glutamate, le MK801.

Les conséquences lésionnelles d'un épisode hypoxique-ischémique périnatal, ainsi que leur manifestations cliniques varient en fonction de l'état maturationnel du système nerveux central. De ce fait, nous tenterons de comparer les effets d'une hypoxie transitoire chez le rat de 1 jour avec ceux d'une hypoxie réalisée chez l'animal de 7 jours. Par ailleurs, dans ce second modèle, un traitement par le MK801 sera également testé afin d'évaluer l'influence de la maturation cérébrale sur la participation de l'excitotoxicité liée au glutamate dans les dommages hypoxiques.

Afin d'évaluer le caractère aggravant d'une association de l'hypoxie avec une hyperbilirubinémie, une tentative a été entreprise pour reproduire, dans le modèle *in vivo* du rat nouveau-né, un ictère nucléaire par injection intrapéritonéale de bilirubine. Cette expérience *in vivo*, ayant provoquée des difficultés d'interprétation, elle a été prolongée par une étude *in vitro* sur culture de neurones d'embryons de rats de 14 jours, étude qui vient clôturer le travail de recherche présenté dans ce mémoire.

Section Bibliographique

I) HYPOXIE-ISCHEMIE PERINATALE

A) DEFINITIONS

Le terme "hypoxie" vient du grec *hupo* qui signifie sous et de *oxus* ; oxygène. Il caractérise une diminution de la quantité d'oxygène distribuée aux tissus par le sang et par unité de temps.

Lorsque l'apport d'oxygène devient nul, on parle d'anoxie du grec *a*-privatif et *oxus*; oxygène.

Le terme "ischémie" vient du grec *iskhein* qui signifie arrêter et de *haïma*; sang. Il qualifie la diminution de la quantité de sang perfusé à un organe.

Le terme d'asphyxie vient du grec *a*-privatif et de *sphuzô* qui signifie je bats. Il représente la difficulté ou l'arrêt de la respiration.

B) PHYSIOPATHOLOGIE DE L'HYPOXIE-ISCHEMIE

En dépit des progrès de l'obstétrique et de la néonatalogie, la fréquence de survenue d'une asphyxie périnatale reste évaluée à 2-3‰ des nouveau-nés à terme, dont les $\frac{3}{4}$ en meurent ou développent un handicap (Saliba et Henriot, 2000).

Du fait des performances actuelles de la réanimation, le problème ne se pose pas tant en terme de pronostic vital que de qualité de survie.

L'agression hypoxique affecte de nombreux organes chez le nouveau-né à terme, dont les systèmes cardiaque, pulmonaire, rénal hématologique et le système nerveux central. Les effets de l'hypoxie ont surtout été étudiés sur le système nerveux central dont les perturbations qui en résultent entraînent des anomalies du tonus, l'apparition de convulsions, une altération des réflexes, ainsi que divers troubles végétatifs (Hill, 1991 ; Carter 1993). Les séquelles peuvent revêtir l'aspect de retards psycho-moteurs, de paralysies, ou encore de troubles sensoriels...

1) VULNERABILITE CEREBRALE

1.1) SELON L'AGE

Il est établi depuis longtemps que l'animal immature tolère mieux l'hypoxie que l'adulte et que le fœtus est plus résistant que le nouveau-né (Fazekas *et al.*, 1941 ; Towfighi *et al.*, 1991 ; Duffy et Vannucci, 1997 ; Maulik *et al.*, 1999). Les manifestations neuropathologiques de l'encéphalopathie hypoxique/ischémique, en particulier la sévérité des lésions, varient avec l'âge. Ainsi, les lésions présentes au niveau du cortex et du thalamus sont plus importantes chez les rats âgés de 24 à 26 mois que chez les jeunes rats de 3 à 4 mois (Canese *et al.*, 1998).

La tolérance relative des jeunes animaux a été attribuée à leur faible métabolisme énergétique qui, en plus du glucose, utilise les composés cétoniques contrairement à l'adulte. Alors que chez l'adulte l'accumulation de lactate et l'acidose sont deux éléments critiques dans le devenir neurologique suite à une ischémie, chez le jeune animal, le rôle de l'acidose dans le développement des lésions tissulaires ne semble pas être aussi clair. Néanmoins, une asphyxie réalisée chez le fœtus au dernier jour de gestation provoque également une diminution du pH, et une augmentation des taux de lactate cérébral (Engidawork *et al.*, 1997).

Au cours du développement, et contrairement à l'adulte, les corps cétoniques sont impliqués, en plus du glucose, dans le métabolisme énergétique cérébral (Nehlig et Pereira de Vasconcelos, 1993 ; Vannucci et Vannucci, 2000). Le transport des composés cétoniques vers les neurones est favorisé par une cétonémie élevée induite par l'ingestion de corps gras présents dans le lait maternel. Par ailleurs, l'activité élevée de la β -hydroxybutyrate déshydrogénase dans le cerveau en développement augmente sa capacité à métaboliser les corps cétoniques (Bilger et Nehlig, 1992), tandis que l'immaturité des transporteurs de glucose limite l'apport de celui-ci au cerveau (Vannucci, 1994).

De plus, le cerveau immature possède la capacité de métaboliser le lactate grâce à une activité importante de la lactate déshydrogénase (Nehlig, 1993). Cette propriété empêche d'une part l'accumulation d'acide lactique à un niveau toxique et d'autre part fournit une source d'énergie alternative au glucose. Par ailleurs, la production tissulaire excessive d'acide lactique observée dans des conditions hypoxiques-ischémiques chez le rat immature n'aggrave pas les lésions cérébrales (Vannucci et Vannucci, 1994).

1.2) SELON LE TYPE CELLULAIRE

Face à l'hypoxie-ischémie les cellules gliales sont moins sensibles que les neurones, les plus sensibles correspondant aux cellules pyramidales de l'hippocampe (Mitani et Kataoka, 1991) et à certains neurones du striatum (Obrenovitch *et al.*, 1993) ou du cortex cérébral (Shimada *et al.*, 1993).

Ce sont néanmoins les cellules endothéliales des capillaires sanguins qui sont les plus résistantes face à ce type d'agression (Pulsinelli *et al.*, 1979 ; Sochocka *et al.*, 1994).

1.3) SELON LA REGION CEREBRALE

Chez le nouveau-né à terme, les zones sélectivement vulnérables sont le cortex, le diencéphale, les noyaux gris centraux, le cervelet, les pédoncules, la protubérance, le bulbe rachidien. Dans toutes ces structures, l'atteinte frappe prioritairement la substance grise, ce qui oppose les lésions cérébrales du nouveau-né à terme à celles du prématuré qui touchent majoritairement la substance blanche périventriculaire (Volpe, 1995).

Il est généralement considéré que la région CA1 de l'hippocampe est la plus vulnérable alors que l'aire CA3 et le gyrus dentelé seraient beaucoup plus résistants. Le secteur CA2 n'est pas affecté lors d'une ischémie de courte durée mais, lors d'une agression plus longue, les dommages dans ce secteur peuvent précéder ceux de l'aire CA1 (Akai *et al.*, 1993). Toutefois, Nawashiro *et al.* (1995) ont rapporté qu'une hypoxie-ischémie chez le rat n'engendrait aucune lésion dans CA1 et CA2 contrairement à CA3.

2) CAUSES PRINCIPALES DE L'ENCEPHALOPATHIE HYPOXIQUE-ISCHEMIQUE

La cause principale est un déficit dans l'approvisionnement cérébral en oxygène qui peut avoir diverses origines. A titre d'exemples, on peut citer

- l'asphyxie intra-utérine,
- une hypertension artérielle pulmonaire persistante,
- une insuffisance cardiaque ou une malformation cyanogène,
- une insuffisance respiratoire.

L'encéphalopathie survient dans 90% des cas avant ou pendant l'accouchement. Beaucoup plus rarement, la souffrance cérébrale est postnatale. Dans ce cas, d'autres causes spécifiques (infectieuses, métaboliques, traumatiques) dominant (Bompard *et al.*, 1987).

Dans la plupart de ces encéphalopathies, au cours de la période périnatale, l'hypoxie associée ou non à l'ischémie est la résultante d'une asphyxie qui conduit à des désordres biochimiques et métaboliques.

3) MANIFESTATIONS PATHOLOGIQUES SELON VOLPE

Volpe (1995) classe les manifestations de l'encéphalopathie hypoxique-ischémique en 5 groupes distincts.

La *nécrose neuronale sélective* est la lésion la plus communément observée. Les zones les plus vulnérables à cette nécrose sont généralement l'hippocampe, le néocortex et les noyaux de la base.

Le *status marmoratus*, dont la fréquence de survenue est faible, est principalement rencontré chez les nouveau-nés à terme. Elle implique la mort des neurones glutamatergiques des noyaux de la base.

La *lésion cérébrale parasagittale* est la principale lésion ischémique du nouveau-né à terme, avec près de 40% des atteintes ; c'est aussi la plus sévère. Elle implique la mort des neurones du cortex cérébral et la destruction de la substance blanche sous-corticale.

La *leucomalacie périventriculaire* touche principalement le prématuré et dans une moindre mesure le nouveau-né à terme présentant des troubles de la fonction respiratoire. L'atteinte de la substance blanche adjacente aux ventricules latéraux est responsable de 20 % des décès des prématurés (Larroche, 1991).

La *nécrose cérébrale ischémique (multi-) focale* se caractérise par une dégénérescence neuronale dont la distribution est dépendante de la localisation d'une anomalie de la vascularisation, ce qui rend difficile son diagnostic.

C) CARACTERISTIQUES BIOCHIMIQUES

DE L'HYPOXIE- ISCHEMIE

1) MODELISATION DE L'HYPOXIE-ISCHEMIE

L'hypoxie-ischémie périnatale a été étudiée dans un premier temps sur des animaux entiers. Toutefois, afin de contourner les problèmes inhérents à la complexité du cerveau *in situ*, des modèles *in vitro* ont été progressivement développés.

1.1) MODELES IN VIVO

Le rat et la gerbille sont les deux espèces les plus couramment utilisées pour l'étude de l'hypoxie-ischémie. Le rat est un modèle de choix pour l'étude du développement cérébral (Romijn *et al.*, 1991) car le rat et l'homme naissent tous deux avec un cerveau dont la maturation est essentiellement postnatale (Dobbing et Sand, 1973).

La maturation du cerveau d'un nouveau-né humain à terme serait comparable à celle d'un cerveau de rat entre 8 et 13 jours (Romijn *et al.*, 1991). On peut considérer qu'entre la naissance et la première semaine postnatale, le cerveau d'un jeune rat a atteint un degré de maturation proche de celui d'un fœtus humain dans le troisième trimestre de gestation (Dobbing, 1974).

Au niveau du cerveau, deux grands types d'ischémie peuvent être réalisés: une ischémie cérébrale complète, définie par l'absence de débit sanguin cérébral ou une ischémie incomplète dont les effets pourront être réversibles ou non selon l'importance de l'ischémie. L'ischémie globale complète affecte la totalité du cerveau ; elle peut être obtenue par arrêt cardiaque (Safar *et al.*, 1976), par occlusion vasculaire après clampages multiples et hypotension (Kagström *et al.*, 1983) ou par l'utilisation de ballonets gonflables (Jackson et Dole, 1979). L'ischémie globale peut être incomplète et nécessite alors un clampage bicarotidien (Levine et Payan, 1966) associé ou non à une hypotension (Smith *et al.*, 1984) ou une cautérisation du tronc basilaire (Kameyama *et al.*, 1985). L'ischémie focale est le plus fréquemment produite par occlusion de l'artère cérébrale moyenne (Molinari, 1970 ; Tamura *et al.*, 1981). Enfin, l'ischémie multifocale est obtenue par injection intra-carotidienne de particules solides (Bralet *et al.*, 1979) ou d'agents agrégants plaquettaires (Watson *et al.*, 1985).

Pour l'étude des conséquences d'une hypoxie-ischémie néonatale, il existe des modèles foetaux où l'hypoxie est réalisée *in utero*. Les animaux en gestation sont placés dans une chambre isobare où l'atmosphère est appauvrie en oxygène (Vierck et Meier, 1963). Une autre méthode consiste à ligaturer les vaisseaux ombilicaux du fœtus (Wigglesworth, 1964).

L'hypoxie-ischémie peut également être effectuée sur les animaux après leur naissance. Dans le cas d'une hypoxie seule, on placera les animaux en chambre où l'atmosphère est contrôlée (Maulik *et al.*, 1999). L'ischémie sera réalisée par ligature d'une artère carotide et l'hypoxie-ischémie sera obtenue par combinaison des deux techniques.

Enfin, il est possible de reproduire les effets d'adulte d'une hypoxie-ischémie par l'injection de substances neurotoxiques, comme l'ibotenate (Marret *et al.*, 1995).

La complexité du cerveau rend difficilement compréhensible les observations inhérentes à l'hypoxie-ischémie, notamment par le fait du grand nombre de phénotypes cellulaires. De plus, l'influence des mécanismes adaptatifs périphériques et centraux est difficile à évaluer.

1.2) MODELES IN VITRO

Une agression hypoxique peut être obtenue *in vitro* sur des tranches de cerveau ou sur des cultures cellulaires.

a) Tranches de cerveau

Des tranches de cerveau sont placées dans une chambre d'immersion dans laquelle l'atmosphère gazeuse et le liquide de perfusion peuvent être contrôlés. L'hypoxie sera réalisée en appauvrissant l'atmosphère en oxygène et l'ischémie en supprimant le glucose du liquide de perfusion (Mitani *et al.*, 1994 et 1995).

Cette technique est fréquemment utilisée pour l'étude de l'activité électrique des neurones. Elle a l'avantage de conserver l'organisation des réseaux neuronaux et permet des études morphologiques.

b) Cultures cellulaires

Les cellules du SNC peuvent être cultivées en culture primaire monophénotypique (neurones ou cellules gliales). Elles ne contiennent, en principe, qu'une seule population de cellules ; leur durée de vie est limitée et elles ne peuvent servir qu'une seule fois car la différenciation des neurones ne permet pas de repiquage. Il est aussi possible de réaliser des cultures mixtes combinant, par exemple, neurones et astrocytes. Dans ce cas, il est impossible d'attribuer un mécanisme particulier à un phénotype donné.

Enfin, il est possible d'utiliser des lignées de cellules immortalisées, d'origine tumorale (neuroblastomes), comme les cellules PC12 de phéochromocytomes de rat (Froissard et Duval, 1994). Néanmoins, ces lignées ne sont pas purement neuronales et n'ont pas les propriétés des cellules du cerveau immature (Bottenstein et Sato, 1979 ; Bottenstein, 1985).

Les cellules sont placées en conditions où elles peuvent survivre et se multiplier. L'environnement cellulaire peut être modifié, notamment en appauvrissant en oxygène l'atmosphère d'incubation ou en ajoutant au milieu un agent pharmacologique tel que le cyanure ou l'iodoacétate (Uto *et al.*, 1995).

La possibilité de contrôler et de modifier les paramètres expérimentaux dans les cultures de cellules en font un outil de choix pour l'étude des mécanismes cellulaires et moléculaires de la mort neuronale consécutive à diverses agressions. Néanmoins, la simplicité relative des modèles de culture pose le problème de la réalité physiologique des phénomènes observés.

2) MECANISMES IMPLIQUES

2.1) MECANISMES PHYSIOLOGIQUES

En réponse à une hypoxie néonatale, on assiste à des modifications hémodynamiques. Il se produit des vasoconstrictions des territoires « non nobles », tels que les territoires splanchniques, rénaux ou encore pulmonaires; ce qui entraîne une épargne de la consommation d'oxygène et une vasodilatation au profit des territoires comme le cœur ou le cerveau (Cohn *et al.*, 1974 ; Friedman et Kirkpatrick, 1977).

Il se produit également une vasodilatation artériolaire cérébrale en rapport avec l'hypercapnie (Lassen, 1968), une hypertension artérielle systémique (Cohn *et al.*, 1974 ; Lou *et al.*, 1978) puis, du fait de la perte de l'autorégulation vasculaire cérébrale, le débit sanguin cérébral devient dépendant de la pression, générant les risques d'œdèmes et d'hémorragies cérébrales pour des variations modérées de la pression artérielle. Secondairement apparaît une hypotension artérielle cardiogénique, par asphyxie myocardique, avec une chute du débit sanguin cérébral (Vannucci et Plum, 1975).

2.2) MECANISMES CELLULAIRES ET BIOCHIMIQUES

Parmi tous les organes, le cerveau est le plus gros consommateur d'énergie. Alors qu'il ne représente que 12% du poids corporel, il consomme 70% du métabolisme basal chez le nouveau-né contre 23% chez l'adulte.

La consommation cérébrale d'oxygène évolue selon une courbe en "S" au cours du développement postnatal. Le taux de consommation est faible à la naissance puis augmente rapidement pendant la période de croissance active du cerveau pour atteindre les valeurs observées chez l'adulte (Fazekas *et al.*, 1951). Le cerveau consomme du glucose mais le nouveau-né a aussi la possibilité d'utiliser les corps cétoniques, comme nous l'avons évoqué précédemment.

En condition physiologique, l'énergie fournie par l'oxydation du glucose en CO_2 et H_2O sert à la synthèse d'ATP à raison de 38 moles d'ATP pour une mole de glucose. Lors d'une hypoxie, la faible quantité d'oxygène disponible ne peut satisfaire le métabolisme aérobie du glucose. La glycolyse anaérobie va donc prendre le relais avec une production d'ATP 15 fois inférieure. Il va en découler une accumulation de lactate, responsable d'acidose, ainsi que des altérations mitochondriales (Vannucci, 1990 ; Mitani *et al.*, 1994). La diminution de pH due à l'acidose lactique, couplée au déficit en ATP (Seidt *et al.*, 2000), va provoquer une dépolarisation membranaire à l'origine d'une perte de l'homéostasie ionique (Haddad et Jiang, 1993). On assiste à un déséquilibre de la répartition ionique, avec notamment une entrée de calcium et de sodium dans la cellule et une sortie de potassium et de chlore (Spector, 1962).

Outre la perte de l'homéostasie ionique, la dépolarisation membranaire agit au niveau présynaptique en modifiant la libération des neurotransmetteurs. En particulier, la libération de glutamate est stimulée et engendre une suractivation des récepteurs au glutamate, notamment ceux couplés aux canaux calciques, ce qui a pour effet d'accentuer l'influx de calcium et d'entretenir la libération du glutamate. L'acidose a aussi une action directe de dénaturation des protéines membranaires ou cytosoliques.

a) Role du calcium intracellulaire

Dans une cellule au repos, le calcium est présent en faible concentration ; il est stocké dans le réticulum endoplasmique, les mitochondries et le noyau.

L'augmentation intracellulaire du calcium occupe une place prépondérante dans les mécanismes reconnus à l'origine de la dégénérescence des neurones (Siesjö, 1981 ; Orrenius et Nicotera, 1994). D'ailleurs, les territoires les moins vulnérables à l'hypoxie-ischémie sont connus pour être les moins exposés à l'augmentation de calcium. Ainsi, l'accumulation de calcium est plus importante dans la région CA1 que la région CA3 ou le gyrus dentelé (Rodriguez *et al.*, 2001 ; Kubo *et al.*, 2001). Associé à cela, il semblerait que les zones les moins vulnérables synthétisent de façon plus importante les protéines de liaison du calcium, comme la calmoduline, entraînant une diminution de la concentration intracellulaire de calcium (Abe et Kogure, 1993).

L'augmentation du calcium intracellulaire va entraîner l'activation de systèmes enzymatiques aux propriétés autolytiques pour la cellule (Mitani *et al.*, 1995), engendrant notamment des processus de lipolyse, protéolyse, des phosphorylations protéiques, participant à la désagrégation de l'architecture cellulaire. L'activation de certaines voies de signalisation va provoquer une libération secondaire de calcium à partir du réticulum endoplasmique, des mitochondries ou du noyau (Dubinsky et Rothman, 1991). La surcharge en calcium interviendrait dans l'activation de programmes génétiques précoces, directement impliqués dans la détermination du devenir neuronal (Munell *et al.*, 1994 ; Beilharz *et al.*, 1995).

b) Implication des acides aminés excitateurs

Une hypoxie-ischémie provoque une libération accrue de glutamate en relation avec l'augmentation de la concentration intracellulaire en calcium (Wahl *et al.*, 1994). De plus, l'épuisement des réserves énergétiques engendre une réduction de la recapture et du métabolisme des neurotransmetteurs (Wahl *et al.*, 1991). Le glutamate en excès va alors activer différents récepteurs, à l'origine du processus d'excitotoxicité qui sera détaillé dans le chapitre III.

Par exemple, l'activation des récepteurs NMDA, couplés à des canaux calciques va entraîner un influx excessif d'ions Ca^{2+} dans le milieu intracellulaire (Moby et Mc Donald, 1995), responsable de l'activation de divers systèmes de seconds messagers capables de mobiliser les réserves calciques de la cellule mais aussi de stimuler des enzymes autolytiques pour les neurones. L'activation des récepteurs non-NMDA engendrera l'ouverture de canaux sodiques, responsable de la dépolarisation des neurones, favorisant ainsi l'ouverture des canaux calciques, associés aux récepteurs NMDA (Wahl *et al.*, 1991 ; Mitani *et al.*, 1994, 1995).

Par ailleurs, l'activation de certains récepteurs métabotropes du glutamate engendre l'activation de la phospholipase C qui provoque la production d'inositol triphosphate (IP3) et de diacylglycérol (DAG) (Hirose et Chan, 1993). L'IP3 contribue à une élévation supplémentaire du taux de calcium intracellulaire par mobilisation des réserves, alors que le DAG active la protéine kinase C (PKC), stimulant ainsi la phospholipase A2, génératrice d'acide arachidonique. L'acide arachidonique favorise la formation de radicaux libres oxygénés (Reynolds et Hastings, 1995).

c) Implication des radicaux libres

Mc Cord (1985) a montré que les radicaux libres oxygénés étaient impliqués dans l'apparition de lésions associées à la reperfusion post-ischémique. Les altérations fonctionnelles, notamment au niveau des systèmes des cytochromes n'étant pas immédiatement dissipées au premier instant de réoxygénation, l'oxygène ne peut être réduit que progressivement, entraînant la formation de radicaux oxygénés toxiques. Il a été montré que ces radicaux occupent une place importante dans les mécanismes participant au processus de mort neuronale par apoptose, notamment à la suite d'une hypoxie cérébrale (Bagenholm *et al.*, 1997).

L'augmentation du calcium intracellulaire va permettre d'activer la xanthine oxydase, génératrice d'anions superoxide, eux-mêmes inactivateurs de la NADH-déshydrogénase, de la NADH-oxydase et de l'ATPase (Zhang *et al.*, 1990), et qui sont à l'origine de la formation d'autres radicaux.

La surcharge calcique va également provoquer la formation de monoxyde d'azote (NO), un neurotoxique interférant avec le transport des électrons dans le processus de phosphorylation oxydative ainsi qu'avec la synthèse de l'acide désoxyribonucléique (Cacciuttolo *et al.*, 1993).

Les radicaux altèrent protéines et enzymes, responsables d'une désintégration de la cytoarchitecture de la cellule (Johnston, 1993). Ils ont également une action dénaturante sur l'ADN (Haddad et Jiang, 1993).

3) CARACTERISTIQUES DE LA MORT CELLULAIRE CONSECUTIVE A L'HYPOXIE-ISCHEMIE

3.1) GENERALITES

Il existe deux grands types de mort cellulaire correspondant à la nécrose et l'apoptose qui se différencient d'un point de vue temporel, morphologique et pharmacologique. Ces deux types de mort cellulaire peuvent se produire simultanément dans des cultures de cellules exposées à une hypoxie-ischémie suivie d'une réoxygénation (Kato *et al.*, 1997).

Il a fréquemment été rapporté que l'intensité des stimuli était déterminante dans le choix entre nécrose et apoptose (Kerr *et al.*, 1972 ; Bonfoco *et al.*, 1995). La nécrose prédominerait dans les stress les plus sévères alors que l'apoptose serait induite par des agressions plus modérées (Stroemer et Rothwell, 1998).

3.2) NECROSE

La nécrose est une mort cellulaire accidentelle et brutale. C'est un processus rapide qui ne requiert pas la participation active de la cellule. Elle se caractérise morphologiquement par une dilatation du réticulum endoplasmique puis, après augmentation du volume mitochondrial et gonflement de la cellule à la suite d'une entrée massive d'eau, on assiste à une rupture de la membrane. Le contenu de la cellule va alors être libéré dans le milieu extracellulaire où il va provoquer une réaction inflammatoire (Hakim, 1999). Cette destruction cellulaire est généralement suivie d'une cicatrisation fibreuse (Kerr et Harmon, 1991).

Dans le cadre de la nécrose, l'ADN nucléaire va être dégradé de manière aléatoire (Bicknell et Cohen, 1995 ; Dong *et al.*, 1997) par des endonucléases activées notamment par des sérines protéases (Dong *et al.*, 1997). Les fragments ainsi générés sont dépourvus d'extrémité 3' sortante.

3.3) APOPTOSE OU MORT CELLULAIRE PROGRAMMÉE

a) Caractéristiques

La notion d'apoptose a été introduite en 1972 par Kerr et coll. pour désigner une forme de mort cellulaire différente de la nécrose, tant d'un point de vue morphologique que biochimique. Le terme "apoptose" fait référence à la chute programmée des feuilles à l'automne.

La mort cellulaire programmée fait partie intégrante de la physiologie d'un organisme. A la suite des nombreuses mitoses et différenciations cellulaires qui permettront de créer un individu à partir d'un œuf, il est nécessaire d'éliminer les cellules superflues ou potentiellement dangereuses (Gould et Mc Ewen, 1993 ; Vaux et Korsmeyer, 1999). Ainsi, au cours du développement cérébral, un grand nombre de neurones meurent pendant la période où s'établissent les contacts cellulaires.

En fait, il semblerait que tous les neurones soient potentiellement destinés à mourir. Seul l'établissement de contacts cellulaires adéquates empêche la mise en route du programme de mort d'un neurone, via un signal de survie produit par la cellule cible. Ce processus permet l'élimination des neurones impliqués dans des circuits peu performants ou aberrants (Oppenheim, 1991 ; Ameisen, 1996).

L'apoptose se définit comme une mort cellulaire génétiquement programmée, dans laquelle la cellule prend part activement à son propre suicide. La première caractéristique morphologiquement visible est la perte de contact de la cellule avec son environnement. L'un des points caractéristiques de l'apoptose est l'importante condensation à la fois du noyau et du cytoplasme ce qui induit une diminution significative du volume cellulaire.

Par la suite, la membrane plasmique va bourgeonner, sans être altérée, pour finalement conduire à la formation de corps apoptotiques renfermant une partie du cytoplasme de la cellule. L'élimination de ces fragments résiduels est obtenue par phagocytose par les cellules voisines et les macrophages.

b) Mécanismes moléculaires de l'apoptose

b1) Signaux

Une grande variété de composés ou de conditions expérimentales a été utilisée pour induire l'apoptose dans les cellules du système nerveux central. L'étape d'activation nécessite une stimulation telle que la privation en facteurs neurotrophiques, en sérum (Yu *et al.*, 1997), ou encore la privation en insuline (Tanaka *et al.*, 1995). On compte également parmi les inducteurs d'apoptose, les neurotoxiques, particulièrement les AAE et la dopamine. Ainsi, le glutamate, le NMDA et l'acide Kaïnique peuvent provoquer l'apoptose (Bar-Peled *et al.*, 1996 ; Tenneti *et al.*, 1998). Certains peptides et protéines contribuent aussi à la dégénérescence apoptotique. Ainsi le peptide β -amyloïde peut activer la voie apoptotique dans des cultures de neurones corticaux (Imaizumi *et al.*, 1999).

Comme nous l'avons suggéré précédemment, la survie des neurones semble être régulée par l'influence combinée des afférences synaptiques et de leurs supports trophiques dérivés des cellules cibles (Linden, 1994). Par exemple, des cytokines telles que CNTF (ciliary neurotrophic factor) ou CDF (cholinergic differentiation factor) peuvent se lier à un récepteur type tyrosine-kinase ($P^{140\text{trk}}$) et induire la différenciation et la survie cellulaire ou à des récepteurs type neurotrophine ($P^{75\text{NTR}}$) pour induire dans ce cas l'apoptose (Han *et al.*, 2000).

b2) Seconds messagers : le calcium

Il est évident que la concentration intracellulaire de calcium joue un rôle crucial dans l'apoptose, en concourant à l'activation de programmes génétiques précoces (Limbrick Jr *et al.*, 1995). Par exemple, le calcium est nécessaire à l'activation d'endonucléases responsables des dégâts nucléaires, notamment de l'endonucléase Ca^{2+} / Mg^{2+} dépendante, qui dégrade l'ADN double brin (Arends *et al.*, 1990). Des taux élevés de calcium cytosolique induisent aussi l'activation d'enzymes Ca^{2+} dépendantes telles les transglutaminases et les calpaïnes (Ostwald *et al.*, 1993). Au niveau de l'organisation cellulaire, une concentration élevée de calcium engendre l'activation d'enzymes responsables de l'altération des protéines du cytosquelette de la cellule.

b3) Voies d'induction de l'apoptose

La mitochondrie semble être impliquée à différents niveaux dans l'exécution et le contrôle de l'apoptose. En effet, elle intervient en tant qu'initiatrice de l'apoptose par la perte du potentiel de membrane mitochondrial, l'induction de la transition de perméabilité et la déplétion en ATP (Cassarino *et al.*, 1999). Pendant l'apoptose, on assiste à une modification de la perméabilité des 2 membranes, ayant pour conséquences l'ouverture des pores de transition de perméabilité et la libération de diverses molécules comme le cytochrome c, les caspases ou encore le facteur AIF (Apoptosis inducing factor) (fig 1). Cette libération est modulée par des protéines pro- ou anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. Une fois le cytochrome c libéré dans le cytoplasme, il peut interagir avec la protéine Apaf-1 (Apoptosis Activating Factor) (Wang *et al.*, 1996) et la procaspase 9. Cette interaction entraîne l'activation de la procaspase 9 en caspase 9, qui est elle-même responsable de l'activation de la procaspase 3 (Chinnaiyan, 1999).

D'autres protéines mitochondriale, comme l'AIF, pourrait déclencher directement l'apoptose indépendamment des caspases. Il est également libéré de l'espace intermembranaire vers le noyau où il induit une condensation de la chromatine (Susin *et al.*, 1999). Cette libération, tout comme celle du cytochrome c peut être empêchée par Bcl-2 et Bcl-xL, localisée en partie au niveau de la membrane externe de la mitochondrie (Yang *et al.*, 1997 ; Kluck *et al.*, 1997).

Inversement, il semble que Bax puisse directement induire ces modifications (Jurgensmeier *et al.*, 1998 ; Green *et al.*, 1998). Selon d'autres auteurs (Yoshida *et al.*, 1998), la dissipation du potentiel mitochondrial interviendrait après l'activation des caspases par Apaf-1 et donc après la libération du cytochrome c.

Cette voie d'induction faisant intervenir le cytochrome c/Apaf-1 et la procaspase-9 serait dépendant du stade de maturation cérébral. En effet, au cours de la maturation cérébrale, Yakovlev *et al.* (2001) montre une baisse de l'expression de APAF-1 et de la caspase-3, corrélée à une faible susceptibilité à l'apoptose.

Outre ces voies d'induction via la mitochondrie, de nombreux récepteurs sont capables de transmettre un signal conduisant à la mort cellulaire, comme les récepteurs TNF ou Fas. En effet, ces récepteurs possèdent un domaine cytoplasmique homologue qui est responsable de la transduction du signal. Ce domaine, également nommé domaine DD (Death Domain), est paraît essentiel pour l'exécution du programme apoptotique (Itoh et Nagata, 1993). Après fixation du ligand, le récepteur se trimérise, ce qui entraîne une modification de conformation du domaine DD qui peut alors s'associer aux domaines DD équivalents d'autres molécules de signalisation. La fixation du ligand Fas sur son récepteur entraîne l'association avec la protéine FADD (Fas associated protein with DD) (Chinnaiyan *et al.*, 1995).

La fixation de FADD au récepteur Fas/APO1 va permettre l'association de la procaspases 8 et l'activer (Muzio *et al.*, 1996). Il en résulte une activation séquentielle de caspases, responsables de la dégradation de la cellules En ce qui concerne TNFR1, le signal conduisant à la mort cellulaire résulte de l'interaction, au niveau des domaines DD, de TRADD (TNFR associated protein with DD) (Hsu *et al.*, 1995) et de la kinase RIP (receptor interacting protein) qui s'associe à la procaspase 2. La molécule TRADD peut aussi interagir avec FADD pour recruter ls procaspases 8 ou 10.

L'activation des caspases par la voie de l'apoptosome et l'apoptose induite par les récepteurs de mort ne sont pas des phénomènes totalement indépendants. Ainsi, la caspase 8, activée par les récepteurs de mort peut cliver la protéine Bid, une protéine pro-apoptotique, dont le fragment C terminal produit permet la libération du cytochrome c (Li *et al.*, 1998a; Luo *et al.*, 1998). L'interaction Apaf-1/Bcl-xL conduit à l'inhibition de l'association Apaf-1/pro-caspase 9 et empêche donc l'activation de cette caspase (Hu *et al.*, 1998 ; Pan *et al.*, 1998).

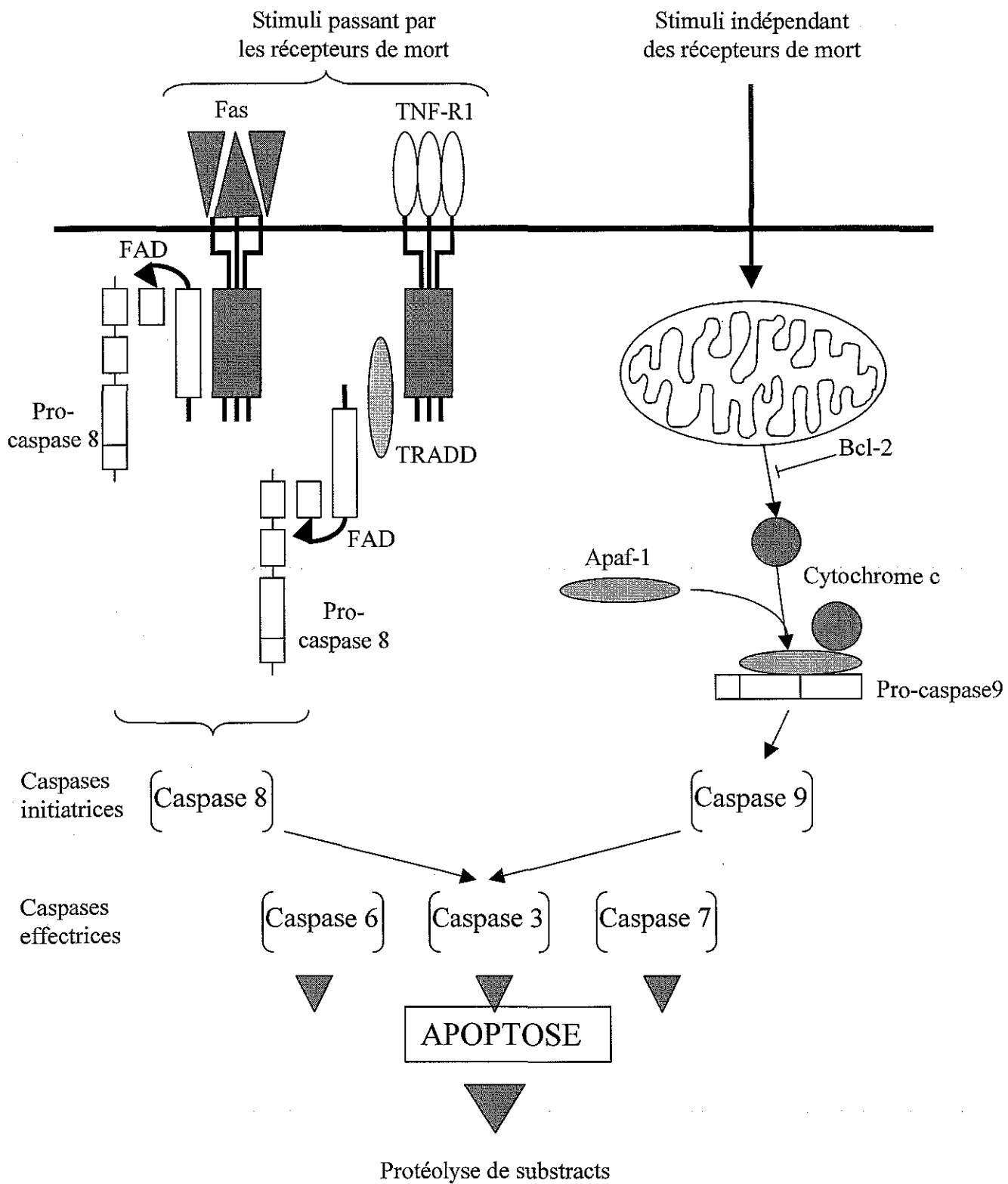


Fig 1: Mécanismes moléculaires de la transduction du signal apoptotique

b4) Protéines impliquées dans l'apoptose

b4.1) La famille Bcl-2

b4.1.1) Généralités

Selon les fonctions biologiques, on peut classer les membres de la famille Bcl-2 en deux sous familles :

- les anti-apoptotiques comme Bcl-2 ou Bcl-xL
- les pro-apoptotiques comme Bax, Bak , Bad ou Bcl-xS..

Ces protéines possèdent un domaine transmembranaire qui leur permet de se localiser dans la membrane mitochondriale, le réticulum endoplasmique ou la membrane nucléaire externe (Nguyen *et al.*, 1993 ; Akao *et al.*, 1994 ; Hsu *et al.*, 1997) (fig 2). Il a été rapporté que Bcl-xL, Bcl-2 et Bax avaient la capacité de former des pores en s'insérant dans les membranes lipidiques (Minn *et al.*, 1997 ; Antonsson *et al.*, 1997). Ainsi le canal formé par Bcl-2 serait plutôt spécifique aux cations monovalents alors que celui formé par Bax présenterait une préférence pour les anions.

La protéine Bcl-2 est largement distribuée dans le système nerveux central pendant le développement embryonnaire puis son expression décline avec l'âge (Merry *et al.* 1994), alors que l'expression de Bcl-xL est importante dans le cerveau embryonnaire mais aussi dans le cerveau adulte.

La surexpression de Bcl-2 permet de bloquer l'apoptose induite par de nombreux stimuli (dommages de l'ADN, irradiations, expression d'oncogènes, glucocorticoïdes,...) (Yang et Korsmeyer, 1996). Son effet anti-apoptotique serait lié au maintien de l'homéostasie calcique et à l'augmentation du potentiel de membrane mitochondriale (Zhu *et al.*, 1999). Elle aurait d'ailleurs la capacité de stabiliser le calcium dans le réticulum endoplasmique (Kroemer, 1997). En plus de ses effets sur la mitochondrie, Bcl-2 peut inhiber les effets pro-apoptotiques de protéines comme Bad ou p53 (Banasiak *et al.*, 2000).

Bcl-2 peut inhiber l'apoptose en empêchant l'activation de la protéase ICE/ced-3 (Srinivasan *et al.*, 1996). Elle inhibe aussi l'activation de la pro-caspase 8, induite notamment par la stimulation du récepteur Fas (Srinivasan *et al.*, 1998 ; Ng et Shore, 1998). Enfin, selon certains auteurs, Bcl-2 aurait des propriétés antioxydantes en freinant la formation de radicaux libres (Myers *et al.*, 1995).

Le gène Bax est aussi exprimée dans le système nerveux central au cours du développement (Vekrellis *et al.*, 1997). Contrairement à Bcl-2, Bax a un rôle pro-apoptotique ; l'injection de Bax dans des cultures de neurones sympathiques suffisant à entraîner l'apoptose neuronale (Vekrellis *et al.*, 1997). Il semblerait que la vulnérabilité sélective des neurones de la région CA1 de l'hippocampe à l'apoptose induite par une ischémie soit dépendante de l'augmentation de l'expression des protéines p53 et Bax. (Koistinaho et Hökfelt, 1997).

Récemment, d'autres protéines régulatrices de l'apoptose ont été mises en évidence, à savoir la protéine Diva, qui induit l'apoptose de neurones sensoriels par inhibition de la liaison de Bcl-xL avec Apaf-1 (Inohara *et al.*, 1998). La protéine Bcl-B se lie à Bcl-2 Bcl-xL et Bax et supprime l'apoptose induite par Bax (Ke *et al.*, 2001).

b4.1.2) Régulation

En dehors du niveau d'expression des différentes protéines, leur activité est soumise à régulation, d'une part par un phénomène de dimérisation et par des processus de phosphorylation.

Ces protéines peuvent s'assembler en homo ou hétérodimère. Des protéines pro-apoptotiques peuvent s'hétérodimériser avec des protéines anti-apoptotiques. Ainsi Bax ou Bak peuvent interagir avec Bcl-2 ou Bcl-xL. Il semble que la balance entre la vie et la mort cellulaire soit influencée par le type et la proportion de dimères anti et pro-apoptotiques formés (Sedlak *et al.*, 1995). Ainsi la surexpression de Bax provoque la formation d'homodimères Bax/Bax qui induisent la mort cellulaire. Outre la régulation par la dimérisation, l'activité de ces protéines peut être modulée par phosphorylation. La protéine Bcl-2 peut-être phosphorylée sur le résidu sérine 70 en réponse à divers stimuli. Elle serait due à une protéine kinase C alpha, activée par le calcium (Ruvolo *et al.*, 1998).

Cette phosphorylation serait nécessaire à la suppression fonctionnelle de l'apoptose par Bcl-2 dans des cellules murines dépendantes de l'apport en facteurs de croissance (Ito *et al.*, 1997). Haldar *et al.* (1995) ont montré que la phosphorylation de Bcl-2 la rendait incapable d'interférer avec l'apoptose. La protéine Bad peut aussi être phosphorylée. Elle se trouve alors séquestrée dans le cytosol alors que non phosphorylée, elle se lie à Bcl-xL au niveau des membranes intracellulaires et favorise l'initiation de l'apoptose.

b4.2) Gènes codant pour le facteur de transcription AP1

AP1 (Activator Protein-1) est un facteur de transcription formé par un complexe de protéines codées par des proto-oncogènes de la famille fos et jun. Il se lie à l'ADN grâce à un élément de réponse spécifique dans la région promotrice de gènes cibles, impliqués dans le contrôle de la croissance ou de la différenciation cellulaire.

Les gènes c-fos et c-jun appartiennent à une famille de gènes caractérisés par leur induction rapide en réponse à divers stimuli. Les produits de ces gènes, les protéines c-Fos et c-Jun, sont des facteurs de régulation transcriptionnelle impliqués dans la régulation de l'expression de nombreux gènes ; elles se dimérisent pour former le complexe AP-1. Les gènes c-fos et c-jun sont impliqués dans l'induction de l'apoptose neuronale (Estus *et al.*, 1994). La phosphorylation de la protéine c-Jun par les Jun-kinases ou JNK (c-jun-N-terminal kinases) serait nécessaire à l'apoptose (Watson *et al.*, 1998 ; Eilers *et al.*, 1998). Son induction participe directement au processus apoptotique et est corrélée à la fragmentation de l'ADN. Alors que la surexpression de c-Jun suffit à déclencher l'apoptose dans des lignées lymphoblastiques (Bossy-Wetzel *et al.*, 1997), certains auteurs ont montré que le blocage de son activité protégeait les neurones de l'apoptose induite par la privation de facteurs trophiques (Estus *et al.*, 1994 ; Ham *et al.*, 1995, Watson *et al.*, 1998).

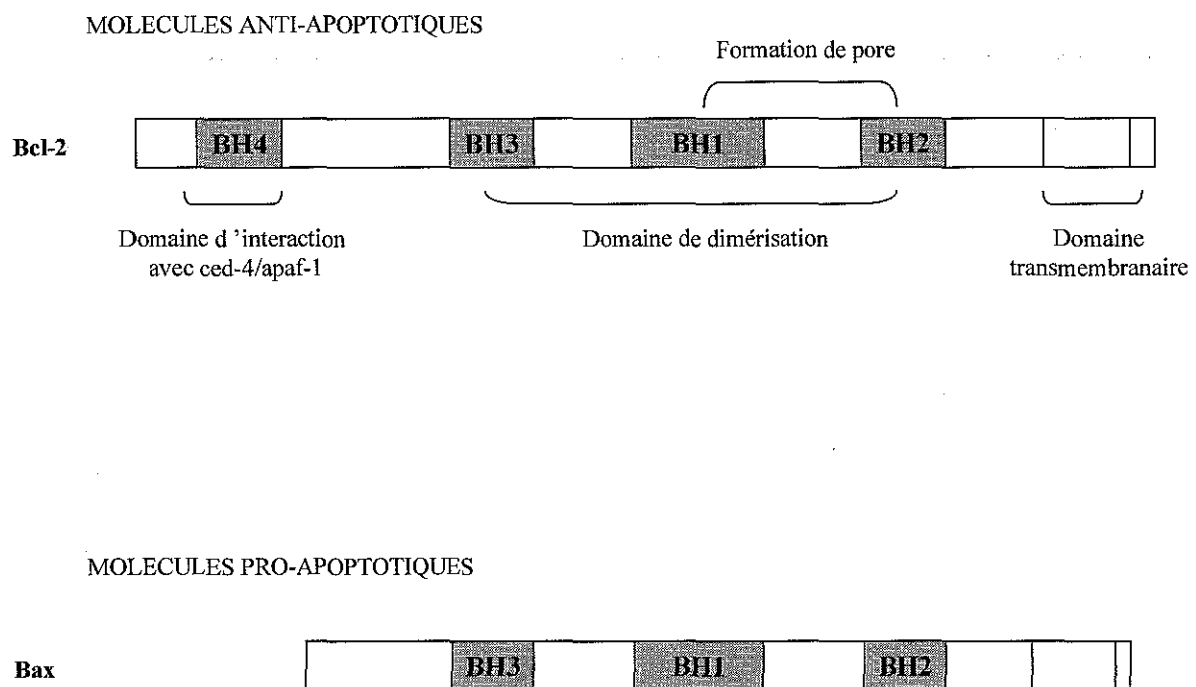


Fig 2 : Structure des molécules de la famille Bcl-2

b4.3) p53, gène suppresseur de tumeur

Le facteur de transcription p53 (ou *gène supresseur de tumeur*), qui est un bloqueur du cycle cellulaire en cas de dommages de l'ADN pour permettre sa réparation, est impliqué dans l'apoptose (Linnik, 1998).

Des cultures primaires de neurones et d'oligodendrocytes de rats expriment constitutivement cette protéine (Eizenberg *et al.*, 1996). Pendant la maturation des neurones, *in vitro*, la localisation subcellulaire de la protéine change. Elle se trouve dans le cytoplasme dans les cellules matures alors qu'elle est localisée dans le noyau dans les cellules en différenciation. Cette translocation de p53 serait influencée par des signaux inducteurs de la différenciation ou de l'apoptose.

Il a été montré que la surexpression de p53 dans les neurones sympathiques (Slack *et al.*, 1996) et les neurones de l'hippocampe (Jordan *et al.*, 1997) était suffisante pour induire l'apoptose, cette augmentation provoquant un déséquilibre entre les facteurs pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 en faveur de l'apoptose.

Néanmoins, la mort des neurones par apoptose peut vraisemblablement être obtenue selon deux voies : une p53 indépendante et une voie p53 dépendante. Par exemple, le méthylazoxyméthanol, un agent génotoxique, provoquerait l'apoptose par une voie p53 indépendante et sans fragmentation d'ADN alors que les radiations ionisantes induiraient l'apoptose selon la voie p53 dépendante (Wood et Youle, 1995). Dans cette voie, l'accumulation de p53 dans la mitochondrie est rapide et précède les changements de potentiel de membrane mitochondriale, le relargage du cytochrome c et l'activation de la procaspase 3 (Marchenko *et al.*, 2000 ; Schuler *et al.*, 2000). En effet, p53 régule positivement les gènes codant pour Bax et Fas/Apo1 (Miyashita *et al.*, 1994 ; Guillouf *et al.*, 1995 ; Cregan *et al.*, 1999), alors qu'elle inhibe le gène bcl-2.

b4.4) Les protéines de stress (HSPs)

Les protéines de stress, ou HSP (heat shock protein) , forment une famille de protéines remarquablement conservée au cours de l'évolution. Elles exercent des fonctions essentielles à la vie cellulaire et plus encore à la survie lors de stress d'origine chimique, physique ou métabolique (tableau 1). Ces protéines ont été classifiées en fonction de leur poids moléculaire respectif. L'élévation modérée de la température permet l'induction de toute la famille des HSPs et l'obtention d'un état dit de "thermotolérance". Cette thermotolérance correspond à l'adaptation de la cellule et à sa résistance à un choc thermique consécutif (Li et Werb, 1982).

Les gènes codant pour des protéines de choc thermique sont sous le contrôle des Heat Shock transcription factors (HSF). Pour les HSPs de faibles poids moléculaires comme les HSP27, ces gènes comportent un motifs ADN régulateur nommé Heat Shock Element (HSE) constitué de motifs répétés GAAn, dont l'activité est augmentée suite à un choc thermique (Knauf *et al.*, 1996). La phosphorylation semble être un des plus important facteur de régulation de l'activité des gènes codant pour les HSP. D'ailleurs, les HSPs peuvent être phosphorylés en réponse à divers stimuli. Outre le choc thermique (Londry *et al.*, 1992), l'eau oxygénée (Huot *et al.*, 1996) ou encore les MAP kinases (Bensaude *et al.*, 1996) activent la phosphorylation des HSPs. Les facteurs de différenciation peuvent aussi conduire à la phosphorylation comme le FGF, le PDGF ou encore le TNF et IL1 (Saklatvala et al., 1991). L'association entre la thermotolérance et, à la fois le niveau d'expression et le degré de phosphorylation des HSPs représente un phénomène complexe (Landry *et al.*, 1991). Elles vont lier les peptides, les protéines en cours de synthèse ou à fort risque d'agrégation et vont ainsi permettre leur repliement correct et leur translocation dans les compartiments subcellulaires appropriés (Gething et Sambrook, 1992). Elles sont aussi capables de lier des protéines dénaturées afin de rétablir leurs fonctions (Parsell et Lindquist, 1993). L'implication des HSPs dans la prévention de l'apoptose passerait par les actions protectrices envers des radicaux libres oxygénés et par l'interaction directe avec différentes molécules dont les caspases.

Protéine	Phénotype	Fonctions
HSP10	Cellulaire : tolérance à l'ischémie	Agit en relation avec HSP60
HSP20 et famille des HSP27	Cellulaire : résistance aux médicaments de chimiothérapie, à H ₂ O ₂ , aux UV. Tolérance à l'ischémie, à l'hyperthermie, stimulation de l'agrégation des protéines nucléaires	Contrôle de la polymérisation de l'actine, chaperonne et cytoprotège
HSP60	Tolérance à l'hyperthermie et à l'ischémie	Chaperonne des protéines en général
HSP65	Cellulaire : régression tumorale	
HSP70	Tissulaire : résistance à l'hyperthermie	Protège contre la cytotoxicité
HSP72	Cellulaire : résistance à l'apoptose, résistance à l'hypoxie	Chaperon moléculaire
HSP90	Cellulaire : tolérance à l'hyperthermie et à l'ischémie, à l'apoptose, fonction de récepteur glucocorticoïde	Se lie aux récepteurs des stéroïdes pour les stabiliser
HSP100/110	Cellulaire : tolérance à l'hyperthermie, reprise de la division cellulaire après choc thermique	

Tableau 1 : Récapitulatif des principales fonctions des différentes HSPs (d'après Feder et Hofmann, 1999).

Il existe des petites protéines de stress, parmi lesquelles on compte les HSP27. L'effet protecteur induit par HSP27 semble être, au moins en partie, lié à sa capacité à interférer avec le métabolisme du glutathion. En effet, il existe une corrélation significative entre la concentration de HSP27 et celle du glutathion (Mehlen *et al.*, 1996). Or le glutathion joue un rôle clé, d'une part dans la détoxification de protéines intracellulaires oxydées, et d'autre part dans l'export des dérivés conjugués au glutathion par la pompe spécifique GS-X dépendante de l'ATP (Ishikawa, 1992). Mais, HSP27 peut également protéger les cellules de l'apoptose induite par Fas ou la staurosporine (Mehlen *et al.*, 1996). Au niveau de la cascade apoptotique faisant intervenir les caspases, HSP27 a la capacité d'inhiber l'activation de la procaspase 9 par le cytochrome c (Garrido *et al.*, 1999), en interagissant avec une des molécules formant l'apoptosome telle que le cytochrome c lui-même, la caspase 9 ou encore Apaf-1. HSP27 est aussi capable d'inhiber l'activation de la caspase 3 en s'associant directement avec elle (Pandey *et al.*, 2000).

Outre, les HSPs27, les protéines de choc thermique les plus étudiées sont les HSP70. Dans les cellules qui surexpriment HSP70, l'augmentation des taux de calcium provoqués par le choc thermique ou l'hypoxie sont atténués (Kiang et Koenig, 1996), ce qui semble être un des mécanismes de défense cellulaire (Kiang et Tsokos, 1998). Le rôle protecteur des HSP70 peut aussi être attribué à un blocage du signal conduisant à l'activation des JNK (Mosser *et al.*, 1997), à une inhibition de l'activation de la caspase 3 (Mosser *et al.*, 1997). Selon Jaattela *et al.* (1998), l'effet anti-apoptotique de HSP70 serait postérieur à l'activation des caspases.

HSP90 est la plus abondante des protéines de choc thermique dans les cellules eucaryotes (Scheibel *et al.*, 1999). Bien que ses propriétés fonctionnelles soient moins bien connues que celles de HSP70, on sait qu'elle intervient dans la transmission du signal cellulaire. HSP90 n'exerce pas de rôle protecteur comme celui des HSP70 dans le cas de l'ischémie. Cependant, il faut noter que HSP90 peut s'associer à HIF1 alpha, facteur d'hypoxie qui intervient dans la transmission du signal ischémique (Gradin *et al.*, 1996).

L'implication de ces HSPs dans la réponse au stress est liée à leur activité chaperone (Ellis 1990). L'activité chaperone consiste en une protection des protéines cellulaires par leur association avec les HSPs et de nombreuses protéines associées en particules spécifiques, comme par exemple les particules prosomales (Arrigo *et al.*, 1988). Les Hsps, notamment HSP 27, et ses protéines associées empêchent l'agrégation des protéines ainsi protégées et facilitent leur restructuration fonctionnelle (Van den Ijssel *et al.*, 1999). Outre leur rôle de régulation de la réponse suite à un choc thermique (Lindquist, 1986), elles jouent un rôle important dans la bonne conformation des protéines (Martin et Hartl, 1994), la translocation nucléaire (Shi et Thomas, 1992), la dégradation d'ARNm (Laroia *et al.*, 1999). Les Hsps peuvent aussi combiner une action antiprotéasique (Orth-Werth et Olisen, 1992) à leur activité chaperone.

b4.5) Les caspases

Les caspases sont des protéases à cystéines cytoplasmiques. La majeure partie de nos connaissances actuelles sur les mécanismes moléculaires de la régulation de l'apoptose provient de travaux menés sur le nématode *Cænorhabditis elegans* (Hengartner et Horvitz, 1994) où un panel de gènes appelés ced-genes a été identifié et étudié.

Parmi ceux-ci, 3 furent identifiés comme des régulateurs clé de l'apoptose dans toutes les cellules somatiques, il s'agit de ced-3, ced-4 et ced-9 (ced pour *Cænorhabditis elegans* death). ced-3 et ced-4 étant tous deux requis pour l'élimination des cellules.

- ced-4 code pour une protéine ayant des homologies avec la protéine humaine Apaf-1 (Zou *et al.*, 1997).

- ced-9 code pour une protéine homologue à la protéine anti-apoptotique Bcl-2 préalablement identifiée chez l'Homme (White, 1996).

- ced-3 code pour une protéase à cystéine homologue à l'enzyme de conversion de l'IL-1b (ICE) (Yuan *et al.*, 1993).

Ces protéases appelées "caspases" possèdent une spécificité stricte de clivage de leurs substrats après un résidu d'acide aspartique. Les caspases vont pouvoir s'auto-activer et/ou être activées par d'autres caspases (Thornberry et Lazebnik, 1998). Cette remarque introduit la notion de cascade d'activation impliquée dans le processus apoptotique (Nagata, 1997).

Sur la base de leur structure primaire, les caspases peuvent être classées en 2 groupes : le groupe I comprenant les caspases 2, 8, 9 et 10 avec un long prodomaine amino-terminal contenant des motifs spécifiques des interactions protéines-protéines et le groupe II comprenant les caspases 3, 6 et 7 avec un prodomaine court ou même absent. Le long prodomaine des caspases de classe I peut interagir avec des protéines qui vont elles-mêmes entrer en interaction avec le domaine intracytoplasmique de récepteurs membranaires. Les caspases de cette classe sont dites activatrices ou initiatrices. Les caspases de classe II nécessitent les caspases de classe I pour leur propre maturation. Elles interviennent donc en aval des caspases de classe I. Ce sont des caspases qui sont principalement responsables de la protéolyse des substrats spécifiques, d'où leur dénomination de caspases effectrices.

Les caspases interviennent dans l'apoptose en agissant sur des molécules qui vont participer à la destruction de la cellule. Les substrats clivés par les caspases sont des protéines cytoplasmiques, nucléaires, des protéines impliquées dans le métabolisme de la réparation de l'ADN et des protéines kinases. Des protéines impliquées dans la transduction du signal, dans la régulation du cycle cellulaire ou dans la prolifération sont aussi des substrats des caspases (Cohen, 1997 ; Nicholson et Thornberry, 1997). Différents exemples d'action des caspases seront abordés par la suite (tableau 2)

b5) Activation des Protéines Kinases

Il est maintenant établi que l'apoptose implique une cascade de protéines kinases (Davis *et al.*, 1997). De nombreuses kinases sont clivées par les caspases durant apoptose. La majeure partie de ces kinases sont clivées dans leurs domaines régulateurs, produisant des formes tronquées constitutivement actives.

- Les MAPK (mitogen-associated protein kinases) sont impliquées dans la survie cellulaires et l'apoptose (Downward, 1998). Elles se subdivisent en 3 groupes, à savoir les ERK (extracellular-regulated kinases), les JNK (c-jun-N-terminal kinases) et les kinases p38 (Graves *et al.*, 1997). Leur activation peut être dépendantes des récepteurs couplés aux protéines G (Luttrell *et al.*, 1997) ou par les calmodulines (Egea *et al.*, 1998). Leurs cibles moléculaires incluent des facteurs de transcription comme NF-kB (Schulze-Osthoff *et al.*, 1997) ou p53 (Verheij *et al.*, 1996).

A titre d'exemple, l'activation de la cascade de signalisation des JNK serait un mécanisme majeur dans l'induction de l'apoptose par l'hypoxie-réoxygénation de cellules rénales humaines (Garay *et al.*, 2000) ou de neurones (Chihab *et al.*, 1998).

- La protéine kinase C protégerait quand à elle les neurones d'une mort induite par un stress oxydant en modulant les activités de différentes MAPK, notamment par l'activation de ERK et de JNK et l'inhibition de p38 (Maher, 2001). Par ailleurs, la perte de l'activité de la PKC membranaire apparaît être un processus nécessaire à la médiation de la mort induite par les acides aminés excitateurs dans les neurones en culture (Durkin *et al.*, 1996, 1997).

Caspases impliquées	Polypeptides	Site de clivage	Effet du clivage	Référence
3	Gelsoline	DQTD/G	Clivage Ca ²⁺ indépendant de l'actine	Kothakota <i>et al.</i> , 1997 Kamada <i>et al.</i> , 1998
?	Gas-2	SRVD/G	Réarrangement du cytosquelette	Brancolini <i>et al.</i> , 1995
3	Fodrine	DETD/S DSLSD/S	Bourgeonnement de la membrane plasmique	Janicke <i>et al.</i> , 1998 Wang <i>et al.</i> , 1998
3	B-Caténine	?	Diminution des interactions cellules-cellules	Brancolini <i>et al.</i> , 1997 Herren <i>et al.</i> , 1998
6	Lamine A	VEID/N	Déassemblage de la laminine nucléaire	Takahashi <i>et al.</i> , 1996 Rao <i>et al.</i> , 1996
6	Lamine B1	VEVD/S	Déassemblage de la laminine nucléaire	Lazebnik <i>et al.</i> , 1995 Liu <i>et al.</i> , 1996
3,6	NuMA	?	Changement de la morphologie nucléaire	Casiano <i>et al.</i> , 1996 Hirata <i>et al.</i> , 1998
3,7,9	PARP	DEVD/G	Diminution de la synthèse du poly(ADP-ribose)	Casiano <i>et al.</i> , 1996 Casciola-Rosen <i>et al.</i> , 1996
3,6,7	mdm2	DVPD/C	Inconnu, se lie toujours à p53	Chen <i>et al.</i> , 1997
3	DNA-PKcs	DEVD/N	Diminution de l'activité	Teraoka <i>et al.</i> , 1996
3	Topo-isomérase I	DDVD/Y	Inconnu	Casiano <i>et al.</i> , 1996 Samejima <i>et al.</i> , 1999
3	PKCdelta	DMQD/M	Kinase constitutivement active	Emoto <i>et al.</i> , 1995 Ghayur <i>et al.</i> , 1996
3	MEKK-1	DTVVD/G	Activation constitutive	Cardone <i>et al.</i> , 1997 Deak <i>et al.</i> , 1998

Tableau 2 : exemples de l'implication des caspases

b6) Synthèse protéique

L'apoptose étant une mort cellulaire programmée, elle requiert la néosynthèse d'ARN et de protéines (Oppenheim *et al.*, 1991). D'ailleurs, il a été montré que les inhibiteurs de synthèse protéique avaient un réel effet protecteur vis-à-vis de l'apoptose (Pittman *et al.*, 1993 ; Martin *et al.*, 1998).

En raison du déficit en ATP (Seidt *et al.*, 2000) qui lui est associé, un stress comme l'hypoxie-ischémie cérébrale transitoire induit des perturbations sévères de la synthèse protéique qui est un mécanisme énergie-dépendant (Siesjö, 1993). En effet, en réponse à l'hypoxie-ischémie, il a été observé une diminution globale de la biosynthèse des protéines, en particulier dans les régions vulnérables, alors que l'accumulation de calcium intracellulaire est responsable de l'activation transcriptionnelle de gènes spécifiques impliqués dans le devenir des neurones (Abe, 1993 ; Rosenbaum *et al.*, 1994 ; Beilharz *et al.*, 1995).

A la suite de la réoxygénation, l'inhibition de la synthèse protéique persiste malgré une restauration rapide des réserves énergétiques ; elle serait la conséquence de la détérioration des polyribosomes (Wieloch *et al.*, 1993). Il apparaît que la restauration finale de la biosynthèse des protéines est d'autant plus rapide qu'il s'agit d'un territoire moins vulnérables à l'hypoxie-ischémie, comme la région CA3 ou le gyrus dentelé (Widmann *et al.*, 1991).

b7) Fragmentation de l'ADN

Des études ont montré qu'une des signatures biochimiques de l'apoptose est un clivage de l'ADN aux régions internucléosomales, lequel peut être visualisé par électrophorèse sur gel d'agarose (Mc Conkey *et al.*, 1988 ; Compton, 1992). Les fragments d'ADN, qui sont des multiples de 180-200 pb correspondant aux nucléosomes, présentent alors une migration en "échelle" caractéristique de l'apoptose, à l'inverse de la migration diffuse (smear) observée dans la nécrose.

La raison de cette fragmentation est attribuée à l'activité d'endonucléases $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ dépendantes (Kyprianou *et al.*, 1988), à l'activité de la DNase I (Arends *et al.*, 1990 ; Peitsch *et al.*, 1993 a et b) et de la DNase II (Barry et Eastmann, 1993). Or, la Dnase I, est activée par le clivage de l'actine par la caspase 1 (Kayalar *et al.*, 1996).

Mais les caspases sont aussi responsables du clivage des lamines qui interviennent dans l'intégrité de l'enveloppe nucléaire et l'organisation de la chromatine en interphase (Takanashi *et al.*, 1996 ; Lazebnik *et al.*, 1995).

Ces phénomènes associés à la dégradation de l'unité de 70kDa de la ribonucléoprotéine U1 (Casciola-Rosen *et al.*, 1996) sont responsables de la condensation de la chromatine, de la fragmentation de l'ADN et de la désorganisation nucléaire. Durant l'apoptose, l'ADN chromosomique va alors être clivé, par une endonucléase spécifique : la CAD (Caspase Activated Dnase). Par ailleurs, son inhibiteur endogène, ICAD, est clivé et désactivé par la caspase 3. Libérée de son inhibiteur, l'endonucléase va alors être transloquée dans le noyau pour aller dégrader l'ADN (Jänicke *et al.*, 1998).

Toutefois, la mise en œuvre de l'apoptose n'est pas toujours associée à une fragmentation de l'ADN en échelle (Cohen *et al.*, 1992). Certains auteurs ont émis l'hypothèse que celle-ci pouvait être un épiphénomène. Cette remarque est d'autant plus intéressante que les observations de Fukuda *et al.* (1993) ont montré que la fragmentation en échelle peut aussi être mise en évidence dans des cellules en train de mourir par nécrose.

b8) Fragmentation cellulaire et formation des corps apoptotiques

Le détachement cellulaire des cellules apoptotiques et leur désordre cellulaire sont corrélés à l'altération des protéines du cytosquelette consécutifs aux clivages par les caspases.

Les interactions cellules/cellules sont réduites par le clivage des β -caténines par la caspase 3 (Herren *et al.*, 1998). Cette caspase intervient également dans le clivage de la spectrine ou de la fodrine, provoquant le bourgeonnement de la membrane plasmique (Wang *et al.*, 1998a). Enfin, la désorganisation cellulaire est accrue par le clivage de l'actine par la caspase 1.

Les corps apoptotiques finalement produits contiennent des protéines liées entre elles et résistantes à la dissolution par les détergents (Bright et Khar, 1994). Le cross-linking des protéines dans les corps apoptotiques est dû à la formation des liaisons $\Sigma(\gamma\text{-glutamyl})$ lysine et $\gamma\text{-glutamyl-bis-spermidine}$, produit caractéristiques de la transglutaminase. Ces liaisons sont résistantes à la protéolyse, et elles s'accumulent durant l'apoptose.

Les changements au niveau des glycoprotéines à la surface de corps apoptotiques permettent la reconnaissance et la phagocytose des cellules apoptotiques. Des protéases Ca^{2+} dépendantes peuvent alors participer à la dégradation du cytosquelette des corps apoptotiques. Ces corps apoptotiques vont être rapidement phagocytés par les cellules adjacentes ou les macrophages.

3.4) APOPTOSE DANS L'HYPOXIE-ISCHEMIE

L'hypoxie-ischémie cérébrale est connue pour provoquer des lésions nécrotiques précoces suivies d'une mort neuronale plus retardée qui, progressivement, est apparue présenter les caractéristiques de l'apoptose (Pulsinelli *et al.*, 1982 ; Kirino *et al.*, 1984). Toutefois, le développement du processus apoptotique est dépendant de la sévérité de l'agression (Beilharz *et al.*, 1995). En effet, l'apoptose est généralement observée dans des cas d'agression hypoxique modérée et, après ischémie, elle est essentiellement présente au pourtour de la région infarctée correspondant à la zone de "pénombre" (Dickson *et al.*, 1995).

Une ischémie globale transitoire chez la souris permet l'induction de Fas/APO1, en corrélation avec le développement du processus apoptotique (Matsuyama *et al.*, 1994). La liaison du ligand de Fas induit une trimérisation de son récepteur qui va permettre l'association avec la procaspase 8 permettant son activation. La caspase 8 activée déclenche alors la cascade d'activation d'autres caspase dont la caspase 3. D'ailleurs, cette caspase a été impliquée dans la mort apoptotique consécutive à des d'ischémies focales (Hara *et al.*, 1997 ; Namura *et al.*, 1998), à une hypoxie associée à un appauvrissement en glucose (Nath *et al.*, 1998) ou encore à une hypoxie seule (Yoshimura *et al.*, 1998). Il est généralement considéré que l'induction de l'apoptose suite à une hypoxie est corrélée à une surexpression de Bax (Ravishankar *et al.*, 2001) associée généralement à une répression de Bcl-2 ou Bcl-xL (Gillardon *et al.*, 1996 ; Northington *et al.*, 2001). Or les protéines pro-apoptotiques de type Bax peuvent induire directement l'apoptose en favorisant la libération du cytochrome c, cette libération étant inhibée par Bcl-xL (Ficunane *et al.*, 1999).

Par ailleurs, l'ouverture des pores de la mitochondrie semble régulée par Bcl-2 et ses partenaires qui entrent en compétition au niveau de la membrane externe des mitochondries pour contrôler la libération des protéines mitochondriales (Yang *et al.*, 1997). En outre, il a été montré que Apaf-1 peut interagir avec Bcl-xL et la procaspase 9 et empêcher la mort. La rupture de l'interaction Apaf1/Bcl-xL entraîne l'activation de la procaspase 9. Cette rupture peut être la conséquence d'une accumulation de la protéine Bax, qui en interagissant avec Bcl-xL diminuerait l'association Bcl-xL/Apaf-1, ou encore de la coupure protéolytique des protéines Bcl-2 et Bcl-xL par la caspase 3 conduisant à l'inactivation de leur fonction anti-apoptotique (Cheng *et al.*, 1997).

La réponse cellulaire va donc être le résultat d'un équilibre entre les niveaux intracellulaires des protéines de type Bcl-2 et des protéines de type Bax. D'ailleurs, une surexpression de Bcl-2 lors d'une ischémie focale, permettrait de protéger les neurones situés autour de la zone nécrosée (Martinou *et al.*, 1994). Cette neuroprotection de Bcl-2, dans des modèles d'hypoxie-ischémie cérébrale pourrait donc s'expliquer par l'inhibition de l'action de Bax et Bad (Wang *et al.*, 1999), par une protection des fonctions mitochondriales et par son influence sur certaines protéines pro-apoptotiques (Myers *et al.*, 1995 ; Shimizu *et al.*, 1995 ; O'Reilly *et al.*, 1996 ; Miyashita *et al.*, 1997, Srinivasan *et al.*, 1996). Enfin, le rôle des caspases a été montré dans l'apoptose induite par l'hypoxie-ischémie (Hara *et al.*, 1997 ; Namura *et al.*, 1998 ; Nath *et al.*, 1998) ou en réponse à une hypoxie seule (Yoshimura *et al.*, 1998 ; Bossenmeyer-Pouré *et al.*, 1999).

Suite à des agressions hypoxiques, on assiste généralement à une induction des protéines de stress (Bossenmeyer-Pouré *et al.*, 2002), notamment les HSP70 et HSP 27, lesquelles exerceraient un effet protecteur et contribueraient à l'établissement d'un phénomène de tolérance (Kato *et al.*, 1994, Jaattela, 1999). La distribution neuronale de HSP70 semble être corrélée à la sévérité de l'agression. Ainsi, elle est exprimée dans les régions où le débit sanguin est diminué de 50% et se trouve localisée dans la périphérie de la zone de pénombre (Nowak *et al.*, 1994). La localisation cérébrale des ARNm de HSP70 est vaste alors que la protéine est essentiellement retrouvée dans les régions les moins sensibles à l'agression hypoxique/ischémique (Simon et Cho, 1990 ; Nowak *et al.*, 1990 a et b).

L'induction des HSP70 semble être plus précoce que celle des HSP27. En effet, Higashi *et al.* (1994) ont montré qu'une ischémie focale induisait les HSP70 après 4 heures de recirculation ; alors que les HSP27 atteignaient leur induction maximale vers 24 heures post-ischémie.

L'action protectrice des ses protéines de stress peut être attribuée à de nombreux mécanismes telle une atténuation de l'augmentation de calcium provoquée par l'hypoxie (Kiang et Koenig, 1996 ; Kiang et Tsokos, 1998), ou encore à l'inhibition de l'activation des caspases (Mosser *et al.*, 1997 ; Garrido *et al.*, 1999 ; Pandey *et al.*, 2000). Concernant la cascade d'activation des caspases, la cible des HSPs semble être encore inconnue. En effet, il a été décrit que l'effet anti-apoptotique de HSP70 ne passait pas par une modification de la libération de cytochrome c. La même étude montre que HSP70 ne modifie pas la quantité de caspase activée en dépit d'une augmentation du nombre de cellules survivantes (Jaattela *et al.*, 1998) suggérant que l'action protectrice de HSP70 se situe en aval des caspases. En revanche, une autre étude relate une suppression de l'activation des caspases par HSP70 sans pour autant affecter les fonctions mitochondriales (Mosser *et al.*, 1997).

Les HSPs semblent avoir deux rôles importants au cours de l'hypoxie-ischémie, le premier étant la protection précoce contre les atteintes du stress ischémique, le second intervenant dans la restauration des dommages et lésions qui se produisent plus tardivement et qui sont liées à la reperfusion.

D) STRATEGIES THERAPEUTIQUES

1) LES TRAITEMENTS SPECIFIQUES

Ils concernent le traitement des conséquences directes de l'hypoxie-ischémie cérébrale, comme les convulsions et l'œdème cérébral. L'œdème cérébral engendre une augmentation de la pression intracrânienne qui elle-même altère la perfusion tissulaire et diminue le transport des substrats indispensables aux cellules. Néanmoins, certains arguments laissent supposer que son traitement est peu utile ; il n'est pas certain que l'œdème lui-même aggrave les lésions cérébrales, et il n'est pas sûr que son traitement améliore le pronostic ou diminue les lésions cérébrales (Vannucci, 1990).

A titre d'exemple, il a été montré que les agents osmotiques pouvaient réduire cet œdème. Chez l'animal nouveau-né, le mannitol donné juste après l'hypoxie-ischémie diminue l'œdème mais pas les lésions ultérieures (Levene et Evans, 1985 ; Levene, 1995).

Les convulsions seraient également nuisibles par augmentation de l'activité métabolique du cerveau. D'ailleurs, chez l'animal, l'activité épileptique post-asphyxie majore la nécrose neuronale et augmente les risques neurologiques ultérieurs. Généralement, les barbituriques sont les médicaments les plus utilisés et permettent d'atténuer les lésions hypoxiques-ischémiques chez l'animal soumis à une asphyxie. Néanmoins, si le traitement des convulsions est peu discuté, leur prévention systématique est contestée (Mouzard et Roze, 1990 ; Vannucci, 1990).

2) LES THERAPEUTIQUES NON MEDICAMENTEUSES

2.1) PRECONDITIONNEMENT

De récentes études sur le rat ou la gerbille adultes ont montré qu'une hypoxie modérée pouvait offrir une neuroprotection vis-à-vis d'une hypoxie-ischémie ultérieure (Kato *et al.*, 1991). La même conclusion a été faite sur des rats de 7 jours (Gidday *et al.*, 1994).

Selon Bossenmeyer-Pourrié et Daval (1998), un conditionnement d'une heure à l'hypoxie, réalisé la veille d'une hypoxie léthale, engendre une protection des neurones *in vitro*, via un remaniement moléculaire. De plus, les neurones conditionnés présentent un taux de viabilité supérieur aux cellules témoins, associé à une biosynthèse d'ADN et une surexpression de protéines de survie telles que HSP70 et PCNA, un cofacteur de l'ADN polymérase qui est corrélé au statut prolifératif de la cellule. L'induction de protéines de stress, notamment les HSP70 et HSP27, interviendrait dans le phénomène de tolérance à l'hypoxie (Jaattela, 1999). Or, le rôle de ces protéines est justement d'induire une tolérance aux agressions qui suivent. Cette tolérance mettrait également en jeu une facilitation de la récupération des synthèses protéiques ainsi qu'une induction des facteurs de croissance (Nishi *et al.*, 1993 ; Kato *et al.*, 1994 ; Sakaki *et al.*, 1995). Outre ces facteurs de survie, Bossenmeyer-Pourrié et Daval (1998) ont montré qu'un conditionnement induisait la surexpression de Bcl-2, qui, comme son homologue Bcl-xL, semble capable de s'opposer à l'apoptose induite par quasiment tous les signaux de mort (Kroemer *et al.*, 1997).

Une autre possibilité réside dans la surexpression de HIF « hypoxia inducible factor ». En effet, HIF induirait une réponse protectrice à l'ischémie cérébrale en phase tardive de conditionnement par un épisode hypoxique transitoire (Semenza, 2001). Plusieurs données suggèrent un rôle neuroprotecteur pour cette protéine. Par exemple, elle stimule l'expression de l'érythropoïétine, protéine ayant des propriétés neuroprotectrices (Sakanaka *et al.*, 1998 ; Alafaci *et al.*, 2000), ou de VEGF, jouant ainsi un rôle dans la réparation vasculaire (Marti *et al.*, 2000).

En normoxie, HIF1 α est rapidement ubiquitinylé et dégradé par le protéasome (Morel et Barouki, 1999 ; Semenza 2000). Son taux de dégradation dépendrait de la durée du stress hypoxique précédent le retour en normoxie (Berra *et al.*, 2001). En revanche, sous hypoxie, HIF1 α est stabilisé par un mécanisme non élucidé qui réduit l'ubiquitinylation de la protéine (Semenza 2000 ; Sutter *et al.*, 2000). Néanmoins, cette hypothèse de neuroprotection par HIF reste controversée en ce sens où HIF1 α stimulerait la transcription d'une protéine proapoptotique Nip3 (Bruick, 2000) et agirait aussi avec p53 dans la mort neuronale secondaire à une agression ischémique (Halterman et Federoff, 1999), en faveur d'un rôle proapoptotique.

2.2) HYPOTHERMIE

De nombreux auteurs ont montré qu'une hypothermie modérée induisait une neuroprotection vis-à-vis de l'hypoxie-ischémie cérébrale. L'hypothermie peut être effectuée pendant l'agression ou plus tardivement (Colbourne et Corbett, 1995 ; Ginsberg *et al.*, 1993).

La réduction de l'acidose intracellulaire (Chopp *et al.*, 1989) semble être l'explication la plus généralisée à la neuroprotection de l'hypothermie. En effet, une diminution de la température de 2 à 3°C engendre des pHi plus élevés chez les animaux ischémiés en hypothermie que chez les normothermiques (Laptook *et al.*, 1995). Or, la diminution de pH due à l'acidose lactique, couplée au déficit en ATP, est responsable de la dépolarisation membranaire à l'origine d'une perte de l'homéostasie ionique (Haddad et Jiang, 1993), avec notamment une entrée de calcium et de sodium dans la cellule et une sortie de potassium et de chlore (Spector, 1962).

D'ailleurs, l'atténuation par l'hypothermie des fluctuations en sodium et en potassium mises en évidence par Amarin *et al.* (1999) pourrait être uniquement le reflet de l'hypothermie sur l'acidose. Toutefois, la réduction de l'acidose comme explication à la neuroprotection de l'hypothermie ne semble pas être valable chez les animaux immatures, lesquels, comme nous l'avons évoqué précédemment, ont la capacité d'utiliser les composés cétoniques pour leur métabolisme énergétique cérébral, contrairement à l'adulte. Outre cette ressource énergétique, ils peuvent métaboliser le lactate grâce à une activité importante de la lactate déshydrogénase (Nehlig, 1993).

Selon Bossenmeyer *et al.* (2000), une hypothermie à 32°C, concomitante à une hypoxie de 6 heures, empêche l'apparition de la mort des neurones *in vitro*. Contrairement au conditionnement, cette protection n'est pas associée à des modifications de biosynthèse des protéines ou d'ADN, ni de l'expression de PCNA, suggérant que l'augmentation de viabilité cellulaire n'est pas le fait d'une stimulation de la prolifération neuronale mais plutôt d'une dépression de l'activité cellulaire. En effet, l'hypothermie abolit l'hyperactivité consécutive à une hypoxie-ischémie (Karasawa *et al.*, 1994) chez le jeune animal (Green *et al.*, 1992 ; Nurse et Corbett, 1994). Cet état de « veille » serait à associer à une diminution du métabolisme cellulaire qui réduit la demande en oxygène (Michenfelder et Theye, 1968) et en ATP (Sutton *et al.*, 1991 ; Swain *et al.*, 1991 ; Yager *et al.*, 1996).

Enfin, Busto *et al.* (1989) ont émis l'hypothèse que l'hypothermie induisait une diminution de la libération du glutamate. Dans ce sens, d'autres études ont impliqué l'hypothermie dans la neuroprotection engendrée par l'antagoniste des récepteurs NMDA, le MK801, puisqu'il engendre une hypothermie (Warner *et al.*, 1991).

II) L'HYPERBILIRUBINEMIE, FACTEUR AGGRAVANT D'UNE HYPOXIE CEREBRALE

A) BILIRUBINE

1) INTRODUCTION

L'hyperbilirubinémie est une manifestation fréquente en pathologie néonatale. L'ictère nucléaire qui peut lui être consécutif se manifeste par une encéphalopathie. Au cours des dernières décennies, la prévention de l'incompatibilité rhésus, l'exsanguino-transfusion et la photothérapie ont concouru à une quasi disparition de l'ictère nucléaire chez les nouveau-nés à terme. Néanmoins, du fait d'une surveillance amoindrie, il apparaît aujourd'hui une ré-émergence de cette pathologie, principalement aux Etats-Unis.

L'idée que la thérapie de l'ictère nucléaire a été considérée comme souvent inutile, voire dangereuse et trop souvent utilisée de façon expansive aurait diminué l'attention des praticiens face à cette pathologie. Ce fait, associé à la sortie précoce des nouveau-nés de l'hôpital, serait à l'origine de cette ré-émergence de l'ictère nucléaire (Brown *et al.*, 1996).

2) PROPRIETES

2.1) STRUCTURE

La bilirubine est le produit final de la dégradation de l'hème. Sa structure primaire est basée sur l'existence d'un squelette constitué de 4 noyaux pyrroles.

Son nom officiel est l'acide 2,17-diéthényl-1,10,19,22,23,24-hexahydro-3,17,13,18-tétraméthyl-1,19-dioxo-21 H-biline-8,12-dipropanoïque. Les deux noyaux pyrroles sont reliés par un pont méthyl (-CH₂) au niveau du carbone 10 (C10) (Falk, 1986 ; Lightner, 1991). Deux énantiomères peuvent se former par rotation au niveau du centre méthylé situé en C10 ; ils peuvent s'interconvertir par rupture de liaisons hydrogènes intramoléculaires (Mac Donagh et Lightner, 1994).

La forme physiologique de la bilirubine est appelée bilirubine IX alpha.

La bilirubine peut se trouver sous trois formes; à l'état lié notamment à l'albumine, conjuguée à l'UDP glucuronique ou encore libre. On appelle "bilirubine totale" l'ensemble de la bilirubine libre, liée et conjuguée.

2.2) PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES (SELON OSTROW, 1994)

Les propriétés physico-chimiques et biologiques de la bilirubine découlent de l'existence de ses liaisons hydrogènes intramoléculaires.

La bilirubine libre est considérée comme une molécule liposoluble; mais Brodersen (1979) la considère plutôt comme une molécule polaire avec une faible solubilité en solution aqueuse. En revanche, la bilirubine liée à l'albumine est soluble dans le plasma circulant et la bilirubine conjuguée est hydrosoluble et normalement éliminée dans la bile.

Selon Brodersen (1979), la bilirubine libre existe sous trois formes (fig 3):

- une forme dianionique (B^{2-}), préférentiellement liée à l'albumine
- une forme monoanionique (HB^-), forme prédominante à pH physiologique et la plus facilement transportable dans les hépatocytes
- une forme diacide (H_2B) qui interagit avec les phospholipides

Le pH joue un rôle important dans l'équilibre de ces trois formes. Ainsi une augmentation de pH provoque une concentration importante de HB^- et B^{2-} . En revanche, une diminution du pH engendre une forte concentration de la forme H_2B , distribuée passivement à l'intérieur des membranes lipidiques.

Si l'excédent de bilirubine à l'intérieur de la cellule ne se trouve pas lié ou métabolisé, cela peut endommager la cellule neuronale, notamment dans le cas de l'ictère nucléaire.

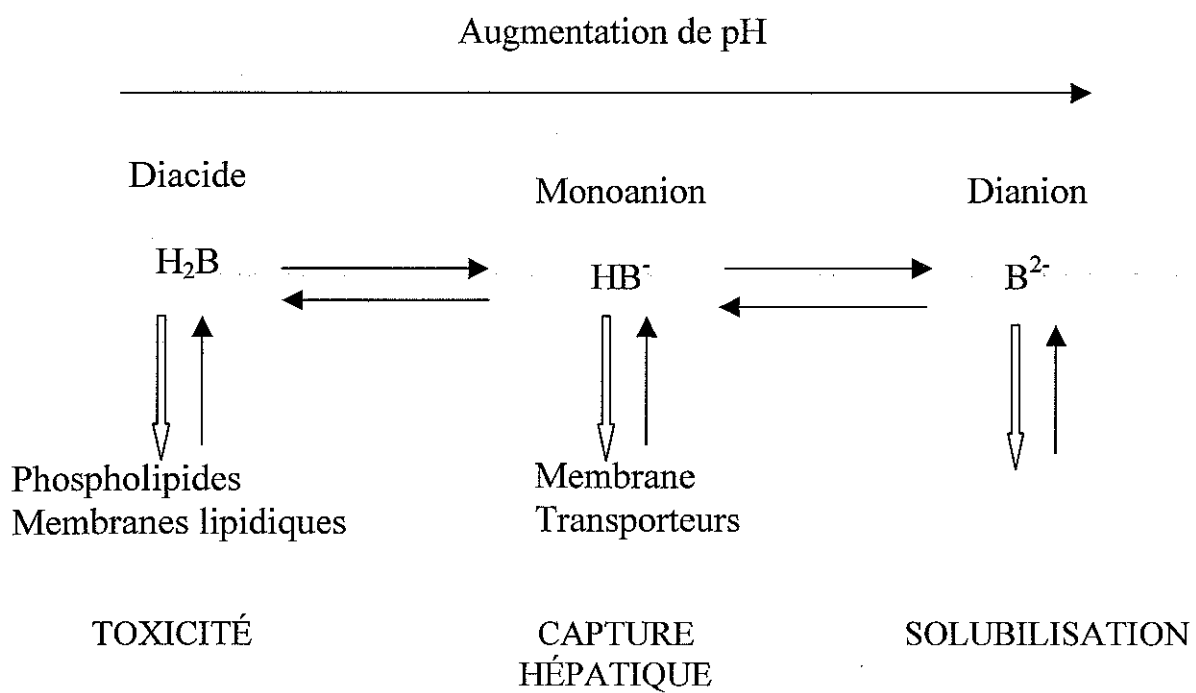


Fig 3 : Schéma des interactions moléculaires des 3 formes de bilirubine non conjuguée (B : bilirubine)

3) METABOLISME

3.1) GENERALITES

La bilirubine provient pour environ 85% de la dégradation de l'hémoglobine (fig 4) et pour les 15% restants, de la dégradation d'autres hémoprotéines comme la myoglobine ou les cytochromes. L'hème libéré au cours de l'hémolyse produira de la bilirubine.

Au cours de sa dégradation, l'hème va être transformé en biliverdine par l'hème oxygénase NADPH-dépendante. La biliverdine sera à son tour transformée en bilirubine libre, insoluble,. Au niveau du plasma, la bilirubine est liée à l'albumine, et conduit à l'obtention d'une molécule soluble. Après conjugaison dans le foie, la bilirubine est sécrétée activement dans les canalicules biliaires. Sous l'effet de bactéries intestinales, la bilirubine est ensuite dégradée en urobilinogène et en stercobilinogène. Ces produits sont éliminés avec les fèces et dans les urines après transformation en urobiline et stercobiline.

Chez le fœtus, le métabolisme s'arrête à la bilirubine libre, forme qui passe le plus facilement la barrière placentaire et est véhiculée vers le foie maternel. La plus grande part de la bilirubine non conjuguée est excrétée par le placenta et conjuguée par le foie maternel. Une petite partie est retrouvée sous forme de produits de dégradation dans le liquide amniotique et les voies biliaires. Le foie foetal maintient le gradient nécessaire au passage foeto-maternel par diffusion de la bilirubine non conjuguée.

En revanche, chez le nouveau-né, le métabolisme est complet, ce qui nécessite une prise en charge par les mécanismes hépatiques.

La période transitoire pose problème. L'immaturation de la voie hépatique du nouveau-né qui doit prendre le relais de la voie maternelle entraîne temporairement des taux de bilirubine libre élevés.

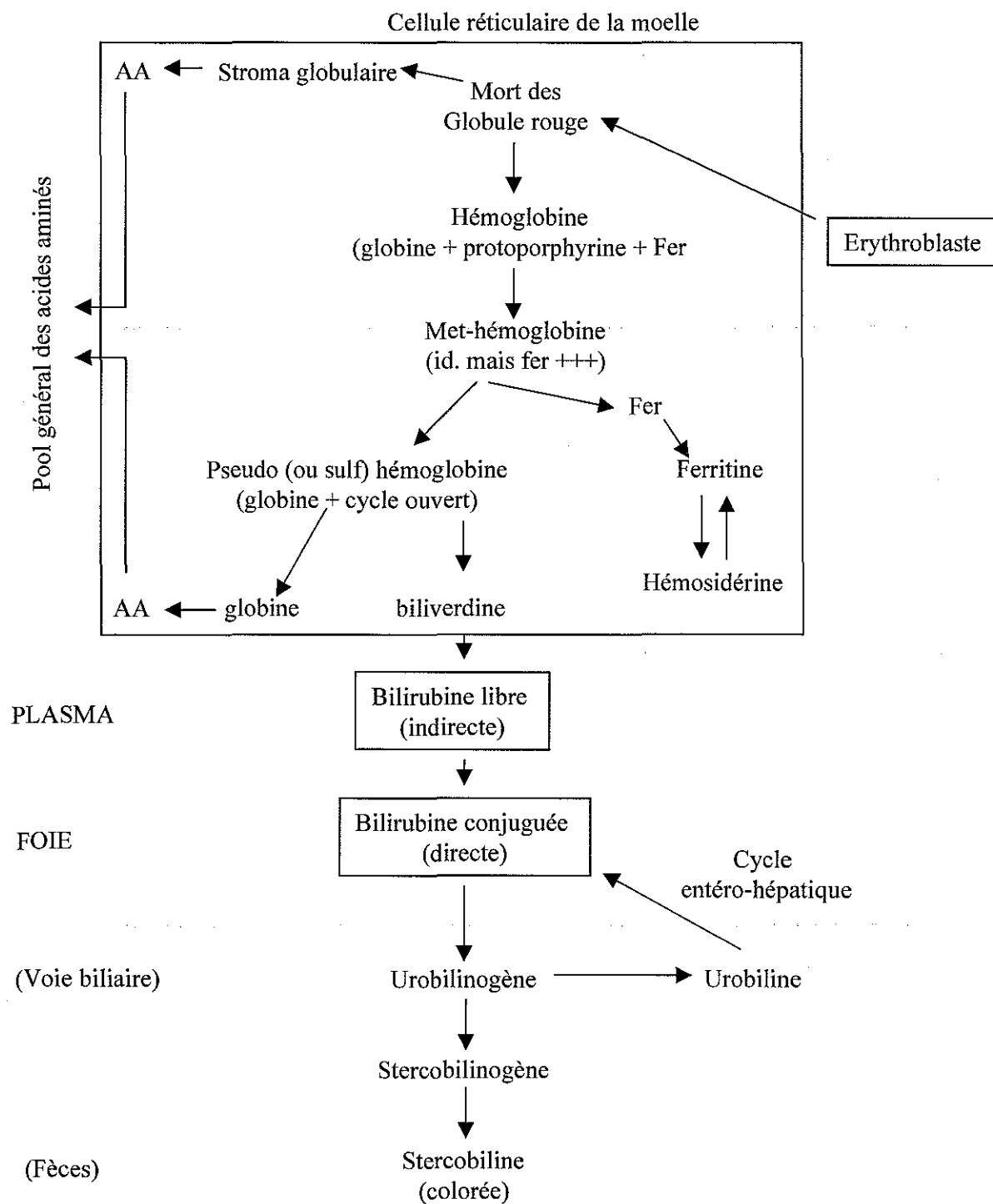


Fig 4 : Destinée des composants de l'hématie

L'adaptation est dépendante de :

- la diminution de la durée de vie des érythrocytes du nouveau-né et de la volémie importante à cet âge
- du déficit transitoire en protéine Y et Z (5 à 20% des taux adultes à la naissance)
- du déficit transitoire de la glucuronoconjugaison
- de la réabsorption digestive de la bilirubine.

3.2) TRANSPORT

La bilirubine (PM= 585) est transportée dans le plasma liée à l'albumine (PM= 69000). L'albumine possède trois sites de fixation pour la bilirubine, avec une affinité plus grande pour le premier site ($k_a = 7 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$).

Le site primaire de fixation se situerait au niveau des anses 3 et 4 de l'albumine, le groupement aminé libre de la lysine 240 étant impliqué dans la liaison avec l'une des fonctions carboxyles de la bilirubine.

En théorie, une mole d'albumine doit se lier avec une forte affinité à une mole de bilirubine. Mais, il a été démontré que l'albumine sérique du nouveau-né avait un pouvoir de fixation réduit de 10 à 50% par rapport à la valeur théorique (Cashore, 1977, 1980), d'autant plus que l'enfant est malade. De plus, il existe des substances qui peuvent entrer en compétition avec la bilirubine au niveau des sites de fixation; notamment lorsque le site de fixation de la bilirubine est occupé par une drogue ou si la géométrie de la molécule d'albumine est modifiée (Walker, 1987).

A titre d'exemple, l'administration à des prématurés d'un bactériostatique de la classe des sulfamides comme le sulfisoxazole a été associée à l'apparition d'ictères nucléaires à des concentrations basses de bilirubine sérique (Silverman *et al.*, 1956).

Depuis, l'utilisation de certains composés (l'hématine, les acides-gras, les salicylates, le benzoates) est contre-indiquée chez les nouveau-nés dans leur première semaine de vie et, par extension chez la femme enceinte dans les dernières semaines de grossesse.

Outre l'albumine, il existe d'autres protéines qui peuvent transporter la bilirubine, notamment la glutathion transférase, l' α -foetoprotéine ou encore les HDL (High Density Lipoproteins).

3.3) CONJUGAISON

La bilirubine liée va être captée par l'hépatocyte au niveau des ligandines Y et Z, des enzymes glutathion S-transférase, pour subir une glucuronoconjugaison. Ces ligandines possèdent 2 sites de fixation pour la bilirubine, un à forte affinité ($k_a=5 \times 10^7 M^{-1}$) et un à plus faible affinité ($k_a=3 \times 10^5 M^{-1}$) (Bhargava *et al.*, 1978).

La catalyse de la conjugaison de la bilirubine par l'uridine diphosphate glucuronate glucuronyltransférase ou UDP-glucuronyltransférase engendre à la fois des monoglucuronides et des diglucuronides de bilirubine. L'activité de cette enzyme peut être induite par la bilirubine elle-même, mais également par les anti-convulsivants dont le phénobarbital et les contraceptifs stéroïdiens (Maddrey *et al.*, 1978 ; Leininger-Muller *et al.*, 1994). Elle peut être inhibée suite à des restrictions caloriques ou protéiques.

Chez l'adulte, la bilirubine est principalement excrétée dans la bile sous forme de diglucuronide de bilirubine (80%) alors que la bile ne contient que 18% de monoglucurionide (Fevery *et al.*, 1977).

Il existe une faible quantité de bilirubine conjuguée présente dans la circulation systémique. Les travaux montrent que chez les nouveau-nés à terme, les taux de bilirubine conjuguée augmentent progressivement dans le plasma, ce qui correspond à la maturation de la glucuronidation de la bilirubine (Muraca *et al.*, 1987 ; Ullrich *et al.*, 1991).

Chez les enfants prématurés, la bilirubine conjuguée est très faible; ce qui est compatible avec une sévère immaturité de la glucuronidation. De plus, les glucuronides de bilirubine peuvent subir une trans-estérification spontanée (non enzymatique) avec un groupe amine de l'albumine et ainsi provoquer une élévation de la bilirubine conjuguée dans le sérum; cette production étant nommée bilirubine delta.

3.4) SECRETION DE LA BILIRUBINE

La bilirubine conjuguée va être sécrétée dans la bile par un mécanisme de transport actif qui limite la vitesse du processus global du métabolisme hépatique de la bilirubine.

Dans les conditions physiologiques, la bilirubine sécrétée dans la bile est exclusivement sous forme conjuguée. En revanche, lorsqu'il y a photothérapie, des quantités importantes de bilirubine non conjuguée peuvent se retrouver dans la bile.

3.5) METABOLISME DE LA BILIRUBINE DANS L'INTESTIN

Après être entrée dans la lumière intestinale, la bilirubine conjuguée va être oxydée par la flore bactérienne en urobilinogènes. Environ 15% de la bilirubine excrétée au niveau biliaire est réabsorbée, après déconjugaison par une β -glucuronidase, par l'intestin sous forme non conjuguée: c'est le cycle entérohépatique. La majorité des urobilinogènes, incolores, sont oxydés en urobiline, composé coloré, et excrétés dans les fèces.

Les nouveau-nés possèdent de grandes quantités de β -glucuronidase qui peut hydrolyser la bilirubine conjuguée en bilirubine (Odell *et al.*, 1980) et leur flore intestinale est moins importante (Silverman *et al.*, 1956) ce qui contribue à diminuer l'élimination dans les fèces au profit de la réabsorption.

4) CARACTERISTIQUES DE L'ICTERE

4.1) DEFINITIONS

Une des manifestations les plus fréquentes de l'hyperbilirubinémie est l'ictère. Le terme de *kernicterus* (Kern, allemand : noyau et Ikterus, grec : jaune) a été utilisé pour la première fois par Schmorl en 1903. Cette pathologie a été rapportée pour la première fois chez un nouveau-né par Hervieux en 1847 et se caractérise par une coloration jaune des noyaux du cerveau, ce qui a donné son nom à l'ictère nucléaire.

La saturation des molécules d'albumine va laisser une fraction non liée de bilirubine : la bilirubine libre dont le danger est sa capacité de diffusion cellulaire. Classiquement, la liaison albumine/bilirubine est défavorablement influencée par de nombreux facteurs : l'âge gestationnel plus faible, les états de détresse vitale, l'acidose et l'hypoxie, l'hypothermie et l'hypoglycémie.

La concentration sérique normale de bilirubine est inférieure à 17 μ M, chez l'adulte. Elle contient en majorité de la bilirubine libre insoluble dans l'eau et soluble dans les lipides. De par ses propriétés, la bilirubine libre est toxique pour certains types cellulaires, notamment pour les neurones.

4.2) CAUSES PRINCIPALES DE L'ICTERE

- Augmentation de la production de bilirubine

Cette première éventualité correspond à l'ensemble des hémolyses par incompatibilité rhesus des groupes sanguins ou à l'occasion de diverses maladies érythrocytaires telles que la Thalassémie ou le déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase.

- Défaut d'élimination

Cette cause relève principalement d'un déficit en une enzyme du métabolisme de la bilirubine, la glucuronyltransférase, du fait de son immaturité chez le nouveau-né. Dans de rares cas, le déficit est pathologique et peut être partiel comme dans la maladie de Gilbert ou total comme dans la maladie de Crigler-Najjar.

- Ictère physiologique

L'ictère physiologique ou ictère simple du nouveau-né correspond quant à lui à l'addition des effets d'une hémolyse transitoire accrue et d'une immaturité des fonctions du système hépatique dans le métabolisme de la bilirubine.

4.3) MANIFESTATIONS DE L'ICTERE NUCLEAIRE

Il est généralement admis qu'une concentration plasmatique de bilirubine totale de 150 à 200 μ M caractérise une hyperbilirubinémie modérée et qu'une concentration supérieure à 340 μ M (soit 20mg/ml) constitue une hyperbilirubinémie sévère nécessitant une photothérapie et parfois une exsanguino-transfusion. Néanmoins, des études ont également révélé l'existence d'ictères nucléaires à des concentrations de bilirubine plus faibles, surtout chez les prématurés de faible poids de naissance (Nakamura *et al.*, 1992 ; Stevenson et Brown, 1991 ; Ritter *et al.* 1982).

Du point de vue anatomopathologique, les régions cérébrales qui accumulent le plus de bilirubine sont le globulus pallidus, l'hippocampe, la substance noire, les noyaux de divers nerfs crâniens, notamment le VIII (Ahdad-Barmada et Moosy, 1984 ; Stern et Cashore, 1985).

Les signes cellulaires de l'ictère nucléaire se manifestent en plusieurs étapes. Dans un premier temps, de 2 à 5 jours, on observe une coloration jaune au niveau du cytoplasme des neurones, la présence de noyaux pycnotiques accompagnée d'une vacuolisation mitochondriale et endoplasmique, une perte des corps de Nissl, tandis que le cytoplasme devient basophile. Un peu plus tard, de 6 à 10 jours, les neurones basophiles présentent une augmentation de leur densité nucléaire. Apparaît ensuite une dissolution cellulaire de certains neurones et une minéralisation granulaire de leurs membranes plasmiques. Enfin, après 10 jours, une perte neuronale est observée, avec une astrocytose ainsi qu'une démyélinisation des tractus optiques (Van Bogaert, 1949 ; Haymaker *et al.*, 1961 ; Malamud, 1961).

Les signes cliniques de l'ictère nucléaire sont un état léthargique, une hypotonie suivie d'une hypertonie musculaire qui se généralise peu à peu à tout le tronc et des troubles végétatifs tels que les apnées ou une instabilité hémodynamique. Des convulsions ou des crises en opisthotonos peuvent apparaître, ainsi que des cris aigus.

En absence de traitement, l'évolution peut être mortelle en quelques jours ou quelques semaines en absence de traitement. Si l'enfant survit, il peut garder de graves séquelles telles que des troubles spastiques, des mouvements choréothétosiques, une surdité, un retard mental, des troubles de la marche et de l'équilibre. De multiples travaux cliniques et électrocliniques, notamment ceux de Nwaesei (1984), ont toutefois montré que certains troubles du tonus ou des troubles auditifs pouvaient être réversibles lorsque les taux de bilirubine dans le plasma reviennent à des valeurs plus modérées.

5) METHODES THERAPEUTIQUES

Les stratégies consistent à limiter la concentration plasmatique de bilirubine indirecte, en particulier à la maintenir en-dessous de 340 $\mu\text{mol/l}$ chez les nourrissons à terme, au moyen de la photothérapie ou de l'exsanguino-transfusion, essentiellement (Valaes, 1992). Bien que l'exsanguino-transfusion ait été courante des années 1950 aux années 1970 et qu'elle soit encore parfois nécessaire, la photothérapie est devenue la prise en charge normale de l'hyperbilirubinémie.

5.1) LA PHOTOTHERAPIE

Cette méthode repose sur la photo-isomérisation de la bilirubine pour donner un composé soluble dans l'eau qui s'élimine par la voie hépatique sans même être conjugué. C'est une technique qui permet de diminuer la concentration plasmatique de la bilirubine non conjuguée. Il permet de faire baisser le taux de bilirubine de 30% en 2 à 4 heures (Sender, 1994). La bilirubine accumulée au niveau des premières couches cellulaires de la peau du nouveau-né peut être atteinte par le rayonnement qui modifie sa structure par des arrangements stériques (Lightner, 1987). Les nouveau-nés sont exposés à la lumière bleue, la longueur d'onde se situant entre 380 et 500 nm avec une efficacité maximale à 460 nm (Dommergues et Danel, 1986). La photothérapie est le traitement le plus habituel dans l'ictère du nouveau-né qui allie le triple avantage de l'efficacité, de l'innocuité et de la simplicité de sa mise en œuvre. Néanmoins, il convient de prendre quelques précautions quant à l'hyperthermie, aux pertes hydriques pouvant survenir à la suite de l'exposition prolongée à un éclairage intense (Dommergues et Danel, 1986). Les yeux doivent être particulièrement protégés en raison de l'effet délétère des radiations ionisantes.

5.2) L'EXSANGUINO-TRANSFUSION

Elle est généralement utilisée lorsque la concentration de bilirubine plasmatique atteint des niveaux élevés notamment lorsqu'elle est associée à une incompatibilité foeto-maternelle.

Dans le cas des nourrissons à terme sans facteur de risque, l'exsanguinotransfusion est envisagée à des concentrations indirectes de bilirubine de 400 à 430 $\mu\text{mol/l}$. Cette technique permet alors d'éliminer des quantités importantes de bilirubine ainsi que les anticorps responsables de l'hémolyse (Ahlfors, 1994).

Il s'agit d'une thérapeutique particulièrement invasive pour le nouveau-né, et qui peut entraîner exceptionnellement de lourdes complications (infection, arrêt cardiaque, embolies gazeuses, perforation vasculaire, entérocolite...).

5.3) LA PERFUSION D'ALBUMINE

Elle permet d'apporter des sites de fixation pour la bilirubine et donc de diminuer la concentration de bilirubine libre. Elle est en général utilisée dans l'attente d'une exsanguinotransfusion.

5.4) TRAITEMENTS PHARMACOLOGIQUES

Différentes substances peuvent être administrées au nouveau-né, comme le phénobarbital qui induit l'activité de la glucuronyltransférase et augmente l'excrétion de la bilirubine. Ce médicament peut être aussi donné à la mère avant la naissance de l'enfant (Wallin et Boreus, 1984) ; il n'est aujourd'hui plus guère prescrit par crainte d'effets déprimeurs associés (Gabilan, 1991).

La glucuronyltransférase peut également être induite par le clofibrate, mais ce traitement ne peut être utilisé lorsque l'hyperbilirubinémie est liée à une incompatibilité sanguine ABO (Sender *et al.*, 1994).

Il est possible de limiter la formation initiale de bilirubine par l'administration de métalloporphyrines. Ces substances jouent le rôle de compétiteur de l'hème vis-à-vis de l'hème oxygénase. D'ailleurs, il a été montré qu'une injection de Sn/mésoporphyrine lors des premières 24 heures de vie de nouveau-nés porteurs d'une incompatibilité ABO, permettait de diminuer de 41% le taux de bilirubine (Valaes *et al.*, 1994).

6) MODELES EXPERIMENTAUX D'HYPERBILIRUBINEMIE

6.1) ETUDES IN VIVO

La plupart des modèles développés ont recours à une perfusion intraveineuse de bilirubine, de concentration variable. Néanmoins, certains auteurs ont réussi à reproduire un ictère nucléaire en provoquant par injection d'antiglobulines hétéroimmunes, une hémolyse chez des chiens et des chats (Eyquem, 1949).

De plus, il existe une souche de rats, les rats Gunn, connue pour développer une hyperbilirubinémie génétique. Il existe différentes lignées de rats Gunn pour lesquelles les taux de fréquence d'ictère nucléaire et de mortalité sont variables (Stobie *et al.*, 1991). Ce rat présente un déficit de conjugaison provoquant une hyperbilirubinémie non conjuguée correspondant à la maladie de Crigler Najjar de type I chez l'homme (Roy Chowdhury *et al.*, 1993). Ce déficit de conjugaison résulte en l'absence d'une ou plusieurs formes d'UDP glucuronyltransférase et/ou de la présence de formes déficientes (Falany et Tephley, 1983; Roy Chowdhury *et al.*, 1986).

Bien que ce modèle soit particulièrement adapté à l'étude de l'ictère nucléaire, l'expérimentation demeure relativement difficile dans la mesure où la survie de cette lignée est limitée.

6.2) ETUDES IN VITRO

La plupart des travaux ont été réalisés sur des cultures tissulaires. De nombreux modèles ont recours à des tissus non neuronaux comme des hépatocytes, des fibroblastes, des érythrocytes, ou encore des leucocytes (Nelson *et al.*, 1974 ; Shimabuku et Nakamura, 1983). Certains auteurs ont étudié les effets de la bilirubine sur des lignées de cellules neuronales, comme les neuroblastomes. Ils ont d'ailleurs démontré l'existence d'une susceptibilité spécifique face à la bilirubine, de lignées différentes de cellules neuronales, variant en fonction du stade de différenciation de la cellule (Notter et Kendig, 1986). Outre ces approches, les synaptosomes (terminaisons nerveuses isolées) représentent de bons modèles pour l'étude des altérations synaptiques engendrées par la bilirubine (Amato *et al.*, 1994).

Néanmoins, l'hétérogénéité des modèles mis en œuvre a apporté des réponses souvent différentes et, par conséquent, rend difficile la compréhension des perturbations liées à l'hyperbilirubinémie.

7) TOXICITE CEREbraLE DE LA BILIRUBINE

7.1) ROLE DE LA BARRIERE HEMATO- ENCEPHALIQUE (BHE)

Pour que la bilirubine puisse agir au niveau du cerveau, elle doit passer la barrière hémato-encéphalique (Diamond *et al.*, 1966). Celle-ci possède une architecture vasculaire particulière (Hammond et Tritsch, 1990). L'endothélium ne contient ni fenestration, ni pores et est entouré d'une couche ininterrompue d'astrocytes. Des jonctions serrées relient de façon continue chaque cellule. La BHE limite et contrôle les mouvements de solutés entre le sang et le cerveau. Elle est imperméable aux macromolécules comme l'albumine. Chez le rat, la perméabilité de la BHE diminue avec sa maturation. En effet, le transfert de l'inuline ou du saccharose accuse une baisse de 40 à 60% entre le 2^{ème} jour et le 18^{ème} jour de vie postnatale (Ferguson et Woodbury, 1969).

Peu de bilirubine passe cette barrière en temps normal et ceci uniquement sous la forme de "bilirubine libre". C'est la raison pour laquelle les concentrations cérébrales de bilirubine sont bien inférieures aux concentrations plasmatiques et qu'il est plus approprié de parler de concentration cérébrale de bilirubine libre dans la gamme nanomolaire, d'autant plus si l'on s'intéresse aux cas des ictères nucléaires à faibles concentrations de bilirubine. Ainsi, Bowen et al, (1959) ont évalué la concentration en bilirubine à 9 nmol/l dans le cerveau de chiots nouveau-nés pour une concentration sérique en bilirubine de 600 μ mol/l. Les mêmes observations ont été faites chez des rats ou des porcelets hyperbilirubinémiques (Bratlid, 1983, 1984). Chez l'homme, Meisels *et al.*, (1981, 1982) ont mesuré la concentration de bilirubine dans le liquide céphalo-rachidien et ont trouvé 5 μ mol/l pour une concentration plasmatique des enfants de 222 μ mol/l. Il convient de préciser que les concentrations de bilirubine, notamment cérébrales, varient beaucoup entre les auteurs en fonction de la technique de dosage utilisée. De plus, les concentrations rapportées ne spécifient pas toujours de quelle forme de bilirubine il s'agit ; or seule la bilirubine libre est toxique.

De plus, il existe au niveau de la barrière une protéine Pgp, codée par le gène *mdr 1a*, qui joue un rôle dans la limitation de l'influx de bilirubine dans le système nerveux central. C'est une glycoprotéine transmembranaire de 170kDa dont l'expression augmente avec le développement postnatal (Matsuoka *et al.*, 1999). Watchko *et al.* (1998) ont montré que la bilirubine était un substrat pour cette protéine. Le mécanisme d'action des Pgp semble être essentiellement une diminution de l'accumulation des cytostatiques intracellulaires par une expulsion active (Azzaria *et al.*, 1989) ou par une redistribution intracellulaire (Willingham *et al.*, 1986) de la substance concernée.

Néanmoins, la capacité à traverser la BHE peut être augmentée dans différentes conditions. Ainsi, Rapoport *et al.* (1984) ont montré que la BHE pouvait être lésée à la suite d'une asphyxie, au moins chez les animaux matures. De plus, l'hypercapnie, souvent associée à l'hypoxie, est en soi un facteur de lésions de la BHE (Johansson et Nilsson, 1977), via une vasodilatation accrue et une augmentation de la circulation sanguine cérébrale.

7.2) TOXICITE CELLULAIRE

a) Liaison de la bilirubine aux cellules

Une fois passée la BHE, la bilirubine est essentiellement présente sous forme libre dans le tissu cérébral.

Les résultats de Wennberg (1988), indiquent que la liaison de la bilirubine aux cellules est directement proportionnelle à la concentration extracellulaire en ions hydrogène. Un simple proton peut permettre la conversion de la bilirubine dianionique en bilirubine monoanionique, molécule hydrophobe à l'exception d'une charge à un pôle qui lui confère un caractère de détergent. D'ailleurs, Vasquez *et al.* (1988) ont montré sur des cultures cellulaires que la bilirubine monoanionique pouvait former un complexe électrostatique avec les groupes lipidiques cationiques des membranes, notamment avec des gangliosides et la sphingomyéline.

Dans des conditions particulières, il peut y avoir addition d'un second proton qui permet l'obtention de bilirubine diacide, forme capable de traverser les membranes. Quand la capacité de la membrane pour la bilirubine est saturée, il se produit des agrégats irréversibles de bilirubine diacide. Il semble que cette entrée de bilirubine puisse être réversible dans les premiers temps par incorporation d'albumine au milieu.

b) Toxicité neuronale

Nous nous intéresserons ici à la toxicité sur les neurones car c'est la dégénérescence de ces cellules qui occasionne le tableau neurologique lié à l'ictère nucléaire.

Il convient toutefois de préciser que la toxicité de la bilirubine n'est pas spécifique aux neurones ; les cellules gliales peuvent aussi subir cette toxicité mais pour des concentrations nettement supérieures.

b1) Processus toxique

Un processus de toxicité de la bilirubine a été décrit ; il se décompose en trois temps.

- La première étape se manifeste par des agrégats de bilirubine au niveau des terminaisons nerveuses qui produisent des potentiels d'action plus faibles. Une diminution du potentiel membranaire a été observée suite à un mécanisme d'altération de la perméabilité aux ions à l'origine d'une diminution de la conduction nerveuse.

- Dans un deuxième temps, la bilirubine se lie à des composants cellulaires et entraîne des déficiences du transport des substrats, de la synthèse de neurotransmetteurs et des fonctions mitochondriales.

- Au cours de la troisième étape, un transport rétrograde de la bilirubine vers le corps cellulaire engendre le dysfonctionnement et la dégénérescence neuronale avec présence de noyaux pycnotiques.

b2) Sites d'action de la bilirubine

Les études *in vivo* ont dévoilé un grand nombre de sites d'action cellulaire de la bilirubine. Ceux-ci diffèrent selon les auteurs et la concentration de bilirubine utilisée.

Des études sur la synthèse de la dopamine ont révélé que de fortes concentrations de bilirubine *in vitro* peuvent inhiber la capture de tyrosine, précurseur de la dopamine, ce qui crée des perturbations de la transmission synaptique. D'autres études ont mis en évidence cet effet délétère au niveau de la conduction nerveuse et de la transmission synaptique. Ainsi, la bilirubine non conjuguée est capable de réduire les potentiels de membrane dans les synaptosomes (Mayor *et al.*, 1986) et de diminuer les potentiels d'action au niveau de coupes cérébrales d'hippocampe (Hansen *et al.*, 1988).

La perturbation du métabolisme énergétique des cellules par la bilirubine est connue depuis longtemps. Katoh-Semba (1976) a observé sur des cultures de neurones issus de rats Gunn, que la bilirubine avait la capacité d'inhiber l'activité glycolytique et d'inhiber des enzymes telles que l'hexokinase, la phosphofructokinase, et la glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase.

De plus, Schutta *et al.* (1967) ont mis en évidence la présence de mitochondries hypertrophiées contenant de grandes vésicules de grains de glycogène. L'inhibition de la chaîne de transport d'électrons, de la *malate déshydrogénase* et la *NAD⁺ isocitrate déshydrogénase* provoquerait une diminution du catabolisme du glucose qui serait ainsi utilisable en plus grande quantité pour la synthèse de glycogène. Toujours au niveau du métabolisme énergétique, la bilirubine entraîne une diminution de l'utilisation cérébrale locale du glucose chez le rat de 10 jours (Roger C *et al.*, 1995). Cette faible utilisation de glucose provoque une diminution de la respiration mitochondriale et de la phosphorylation oxydative (Ernster *et al.*, 1957). Ceci va provoquer une diminution de la quantité d'ATP produit par la voie aérobie. La déplétion en ATP (Seidt *et al.*, 2000) va engendrer une perte de l'homéostasie cellulaire. D'ailleurs, des études sur des neuroblastomes en cultures ont montré que la bilirubine était capable de diminuer l'activité de la Na^+/K^+ -ATPase (Amit *et al.*, 1989), provoquant des perturbations du transport des ions K^+ et Na^+ (Corchs *et al.*, 1982), qui pourraient être à l'origine d'une mort cellulaire retardée. A ce titre, il a été observée dans des modèles de neurones isolés de jeunes rats (Rodrigues *et al.*, 2002) ou sur cultures de cellules endothéliales de cerveaux bovins (Akin *et al.*, 2002) que la bilirubine était capable d'induire l'apoptose.

Au niveau de la transduction du signal apoptotique, la protéine kinase C et la CAM kinase II semblent être toutes deux impliquées (Ohtani *et al.*, 1995 ; Shen et Mayer, 1999). Ainsi, la protéine kinase C protégerait les neurones d'une mort induite par un stress oxydant en modulant les activités de différentes MAPK, notamment par l'activation de ERK et l'inhibition de p38 (Maher, 2001). Or, la bilirubine inhibe l'activité de la protéine kinase C (Sano *et al.*, 1985 ; Amit *et al.*, 1993 ; Wolvetang *et al.*, 1994), et atténue ainsi son éventuelle protection.

De plus, la bilirubine serait capable d'inhiber la recapture du glutamate par les astrocytes (Silva *et al.*, 1999), ce qui suggère une augmentation de la concentration extracellulaire du glutamate, lequel pourra exercer des effets neurotoxiques, comme nous l'exposerons dans la troisième partie de cette introduction.

Dès 1969, Brodersen et Bartels ont montré que le cerveau avait la possibilité de se défendre contre la toxicité de la bilirubine en oxydant cette molécule. Selon Hansen (1997), la fonction d'oxydation de la bilirubine qui permettrait sa dégradation se situe au niveau de la membrane mitochondriale. L'enzyme responsable est cytochrome-c dépendante et aurait la capacité d'oxyder des taux de bilirubine de l'ordre de 100-300pmol/mg de protéine/minute (Hansen et al, 2000). La détoxification est moins importante et plus lente dans le cerveau immature, un processus susceptible d'être à l'origine d'une diminution de la vulnérabilité vis-à-vis de la bilirubine avec l'âge.

B) BILIRUBINE ET HYPOXIE

Dès 1964, Lucey *et al.*, ont suggéré qu'un antécédent hypoxique serait requis pour le développement d'une encéphalopathie consécutive à une hyperbilirubinémie. Les lésions neurologiques associées à l'asphyxie périnatale ont sensiblement la même localisation cérébrale et présentent des manifestations similaires à celles observées dans l'encéphalopathie à la bilirubine (Cowger, 1973 ; Myers, 1979 ; Odell, 1981). En outre, les zones d'accumulation de la bilirubine sont les mêmes que celles qui sont lésées dans le cadre d'une encéphalopathie liée à la bilirubine (Kim *et al.*, 1980) ou d'une asphyxie périnatale (Vannucci et Plum, 1975).

Ainsi, il est généralement admis que l'hypoxie représente un facteur de risque vis-à-vis de l'ictère nucléaire. L'acidose initiée par l'hypoxie pourrait jouer un rôle déterminant, en raison des lésions de la BHE qu'elle engendre et qui facilitent le passage de la bilirubine (Kim *et al.*, 1980). Mayor Jr *et al.* (1985) ont observé une augmentation de la concentration cérébrale en bilirubine durant une période d'anoxie *in vivo* ainsi que dans les jours qui suivent la réoxygénation. De plus, l'acidose interviendrait également sur la solubilité de la bilirubine, en favorisant la forme diacide (H₂B) qui traverse plus facilement les membranes (Brodersen, 1979).

Comme la bilirubine, une agression hypoxique provoque une diminution de l'activité de la Na^+/K^+ -ATPase, (Mayevsky 1992 ; Mishra et Delivoria-Papadopoulos, 1999 ; Qiao *et al.*, 2002), ce qui pourrait accentuer les perturbations de l'homéostasie ionique, ou au moins ralentir la récupération de cette homéostasie.

En outre, lors de la réoxygénation cellulaire qui fait suite à un épisode hypoxique, il se forme des espèces actives de l'oxygène, à l'origine de lésions additionnelles. L'hypoxie, par ailleurs, inactiverait les enzymes thiols impliquées dans la détoxification de ces radicaux (Uto *et al.*, 1995) et il a été suggéré qu'une déficience de l'activité de telles enzymes pourrait jouer un rôle dans la survenue d'une hémolyse néonatale ou d'un ictère (Bracci *et al.*, 1988). De plus, certains auteurs ont montré que le stress oxydant pouvait induire l'hème oxygénase et donc augmenter la synthèse de bilirubine. Keyse *et al.*, (1989) ont montré que l'hème oxygénase était une HSP (Heat Shock Protéin), notamment induite par les UVA ou le peroxyde d'hydrogène. Ces observations ont permis à de nombreux auteurs de voir en la molécule de bilirubine un antioxydant potentiel. Ainsi, selon Dudnik *et al.* (1998), la bilirubine est capable de protéger les membranes lipidiques de l'oxydation par les radicaux libres.

Quoi qu'il en soit, l'hypoxie serait-elle seulement un facteur facilitant l'entrée de la bilirubine dans le cerveau ou bien existe-t-il une quelconque synergie de ces deux types d'agression au niveau cellulaire ? D'autre part, l'hyperbilirubinémie peut-elle influencer la réponse cérébrale, et en particulier celle des neurones, à l'hypoxie ?

III) EXCITOTOXICITE LIEE AU GLUTAMATE, IMPLICATION DANS L'HYPOXIE-ISCHEMIE ET L'HYPERBILIRUBINEMIE

A) INTRODUCTION SUR LE ROLE DU GLUTAMATE

Le glutamate est un acide aminé synthétisé par l'organisme, notamment au niveau du tissu cérébral puisqu'il ne peut franchir la BHE (Fagg et Foster, 1983). Il est considéré, avec l'aspartate comme le représentant essentiel des acides aminés excitateurs (ou AAE). Largement distribué dans le cerveau, ce neurotransmetteur joue un rôle majeur dans le développement du système nerveux central où il intervient comme facteur neurotrophique (Engelsen, 1986). Il est également reconnu pour participer au processus d'apprentissage et à la mémorisation (Collingridge et Lester, 1989 ; Mc Entee et Crook, 1993).

En regard des actions bénéfiques du glutamate, de nombreux travaux ont suggéré que les AAE étaient impliqués dans la genèse de lésions neuronales consécutives à diverses pathologies neurodégénératives, et notamment dans les conséquences des affections vasculaires. A titre d'exemples on implique le glutamate dans la chorée de Huntington, la sclérose latérale amyotrophique (SLA), la maladie d'Alzheimer et les convulsions.

B) METABOLISME ET LIBERATION DU GLUTAMATE

Au niveau du SNC, le glutamate est synthétisé dans les terminaisons nerveuses à partir de l'acide α céto glutarique provenant du cycle de Krebs. Il peut avoir d'autres origines comme la glutamine ou encore l'ornithine. Le glutamate nouvellement synthétisé s'accumule dans les vésicules synaptiques. A l'occasion de l'arrivée d'un train de potentiels d'action, la terminaison présynaptique libère le glutamate qui sera en mesure d'agir sur ses différents récepteurs.

La recapture peut être réalisé par les neurones eux-même ou par les cellules gliales par l'intermédiaire de transporteurs (Danbolt *et al.*, 1994), nommés GLT1 (Pines *et al.*, 1992 ; Rothstein *et al.*, 1999), GLAST (Storck *et al.*, 1992 ; Rothstein *et al.*, 1999) et EAAC1 (Kanai et Hediger, 1992). Ces transporteurs appartiennent à une même famille de protéines ayant en commun dix segments transmembranaires (Vandenberg, 1998). GLAST et GLT-1 sont principalement localisés au niveau des astrocytes (Lehre *et al.*, 1995), alors que EAAC1 serait présent sur les neurones (Rothstein *et al.*, 1994). Les mécanismes du transport ne sont pas connus définitivement (Takahashi *et al.*, 1997), mais il semblerait que la recapture du glutamate utilise le gradient électrochimique du sodium (Zerangue *et al.*, 1996). D'ailleurs, le couplage entre la libération du glutamate et son recaptage par l'astrocyte est tel que le courant sodique lié au recaptage du glutamate reflète fidèlement la libération de glutamate par les terminaisons synaptiques (Bergles *et al.*, 1997). Il apparaît que le transport est électrogénique en générant une charge positive à l'intérieur de la cellule, les apports d'énergie nécessaires étant fournis par les gradients de sodium et potassium maintenus par les pompes Na^+/K^+ -ATPase. Cette pompe Na^+/K^+ -ATPase jouerait aussi un rôle dans le couplage entre l'activité neuronale et l'entrée du glucose dans le cerveau (Pellerin *et al.*, 1997). En effet, Pellerin et Magistretti (1994) ont proposé que la capture du glutamate déclenchait une entrée de glucose dans l'astrocyte. L'augmentation locale de sodium intracellulaire qui accompagne le recaptage du glutamate activerait la Na^+/K^+ -ATPase, et surtout la sous unité $\alpha 2$. Cette activation, associée à l'augmentation de consommation d'ATP aurait pour conséquence d'activer la consommation de glucose. Après avoir été recapturé, le glutamate peut être converti en glutamine ou oxydé en acide α céto glutarique pour rejoindre le pool précurseur du glutamate (fig 5).

Les systèmes neuronaux utilisant le plus le glutamate comme neurotransmetteurs, sont les efférences corticales et cérébelleuses ainsi que les afférences et les efférences hippocampiques (Mahler *et al.*, 1995).

C) RECEPTEURS

Le glutamate apparaît comme un agoniste mixte, capable d'activer différents récepteurs. Ces derniers ont des propriétés physiologiques et pharmacologiques distinctes, et sont répertoriés selon l'agoniste dont la fixation engendre la réponse la plus spécifique (Greenamyre et Porler, 1994) (tableau 3).

On peut regrouper les récepteurs du glutamate en deux catégories majeures: les ionotropes, couplés à des canaux ioniques et les métabotropes, couplés à des protéines G (Monaghan *et al.*, 1989). Les récepteurs ionotropes comprennent le complexe NMDA, les récepteurs AMPA (Acide α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole propionique ou encore appelés quisqualate), kaïnate et les récepteurs présynaptiques L-AP4 (2-amino-4-phosphobutanoate).

1) RECEPTEURS NMDA

Ce type de récepteur correspond à un complexe macromoléculaire associé à un canal ionique essentiellement perméable aux ions Ca^{2+} mais également aux ions Na^+ et K^+ (fig 6). Deux ligands sont nécessaires à l'activation du récepteur : le glutamate et la glycine, chacun ayant son propre site de liaison. La glycine permet d'augmenter la fréquence d'ouverture du canal ionique (Kleckner et Dingledine, 1988). Il existe un troisième site de fixation sur le récepteur correspondant à la liaison des polyamines qui potentialisent l'action du glutamate mais dont la présence n'est pas indispensable au fonctionnement du récepteur (Scatton, 1993).

Deux ions sont importants dans la régulation du récepteur NMDA : le magnésium et le zinc. Le magnésium intervient en bloquant le canal d'une façon voltage-dépendante alors que le zinc le bloque indépendamment du voltage (Siegel *et al.*, 1994). Ainsi, au repos, le canal du récepteur est soumis à une inactivation par le magnésium présent dans le milieu extracellulaire. Une forte dépolarisation est nécessaire pour lever ce blocage et permettre l'activation du canal. Dans des conditions de faibles stimulations, le récepteur NMDA intervient peu dans la transmission synaptique. En revanche, dans des conditions de fortes stimulations, comme c'est le cas lors d'une anoxie, la dépolarisation va lever le blocage du canal par le magnésium et donc induire un influx de calcium dans la cellule.

Le récepteur NMDA possède une structure hétérodimérique, composée de différentes sous-unités. Il existe deux familles de sous-unités : les NMDAR1 et les NMDAR2. La sous-unité NMDAR1 est nécessaire et suffisante pour l'activité du récepteur (Nakanishi, 1992).

Exprimée seule, la sous-unité NMDAR2, possédant 4 isoformes de A à D, ne peut former un récepteur fonctionnel. Chaque isoforme de la sous-unité NMDAR2 peut se combiner à une sous-unité NMDAR1 pour former un récepteur aux propriétés distinctes (Monyer *et al.*, 1992 ; Widdowson *et al.*, 1995). Les sous unités NMDAR1 sont largement présentes dans le cerveau, la distribution des NMDAR2 étant plus hétérogène. A titre d'exemple, les NMDAR2 A se trouvent dans l'hippocampe, le cortex et le cervelet, les NMDAR2B dans l'hippocampe tandis que les NMDAR2 D sont exprimées seulement pendant le développement (Monyer 1992).

Ces récepteurs NMDA paraissent jouer un rôle fondamental au cours du développement cérébral. Au niveau cellulaire, pendant la différenciation, l'activation des récepteurs NMDA favorise la survie des cellules granulaires du cervelet en culture; les anti-NMDA bloquant cet effet trophique (Balazs *et al.*, 1988). Plus récemment, il a été montré que la stimulation des récepteurs du glutamate aurait un effet inhibiteur sur la neurogenèse qui persiste à l'âge adulte au niveau de l'hippocampe du rat, le blocage des récepteurs NMDA stimulant au contraire la production de neurones (Cameron *et al.*, 1995). L'implication des récepteurs NMDA dans le développement cérébral explique en partie les nombreux effets secondaires que peuvent occasionner les antagonistes des récepteurs NMDA chez le sujet en développement, notamment en termes de déficits d'apprentissage ou de mémoire (Whishaw et Auer, 1989 ; Wozniak *et al.*, 1990).

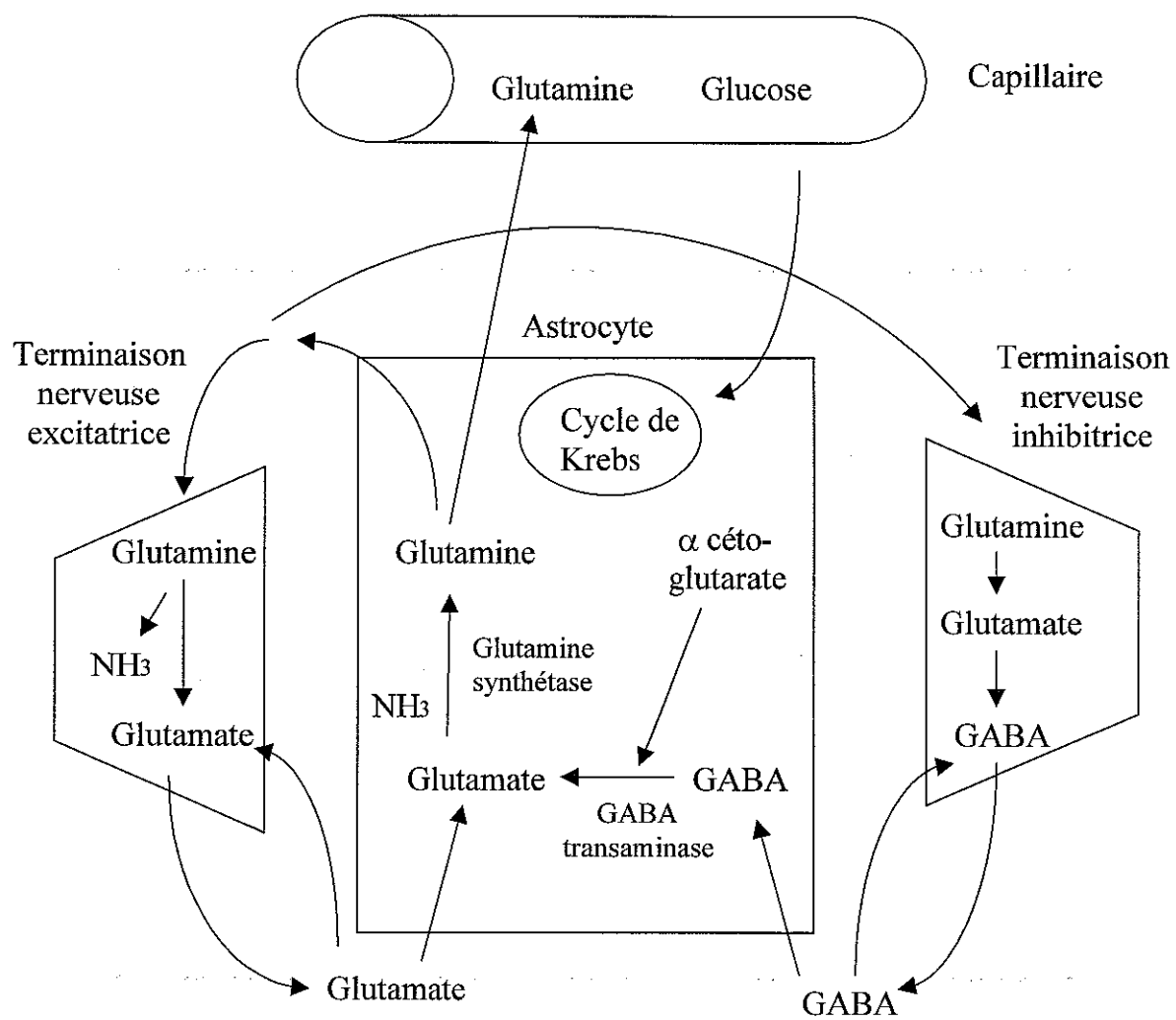


Fig 5 : Cycle glutamate- glutamine

Récepteurs	Agonistes (autre le glutamate)	Antagonistes
NMDA	NMDA, Quisqualate	MK801, PCP, AP5, AP7
AMPA	AMPA, Quisqualate, Kaïnate	CNQX, NBQX
Kaïnate	Kaïnate, Quisqualate, Acide domique	CNQX, NBQX
Métabotropiques	Quisqualate, tACPD	L-AP3/4

Tableau 3 : Principaux agonistes et antagonistes des récepteurs du glutamate

2) RECEPTEURS AMPA

Le récepteur AMPA est associé à un canal perméable aux ions Na^+ , K^+ et éventuellement Ca^{2+} . C'est également un complexe hétérodimérique (fig 7).

Quatre sous-unités ont été mises en évidence, de Glu R1 à R4 ou Glu RA à RD (Wisden et Seeburg, 1993). La combinaison de ces sous-unités constitue des récepteurs aux propriétés distinctes et détermine notamment la perméabilité aux ions Ca^{2+} (Hollman *et al.*, 1991). Ils sont connus pour être responsables de la majorité de la neurotransmission glutamatergiques, où ils assurent la composante voltage-indépendante de la réponse synaptique (Mayer et Miller, 1991 ; Greenamyre et Porter, 1994). L'antagoniste le plus spécifique de récepteur AMPA est le NBQX(6-nitro-7-sulfamoylbenzo-quinoxazoline-2.3-dione) auquel le récepteur NMDA est insensible (Greenamyre et Porter, 1994).

Ils sont principalement localisés dans le télencéphale et au niveau du système limbique, en corrélation étroite avec les récepteurs NMDA (Safieddine et Eybalin, 1992).

3) RECEPTEURS KAÏNATE

Ce récepteur est associé à un canal ionique perméable aux ions Na^+ , K^+ et Ca^{2+} . Wisden et Seeburg (1993), ont mis en évidence cinq sous-unités, de Glu R5 à R7 et KA1, KA2. La localisation majoritairement présynaptique des récepteurs kaïnate, associée à l'ouverture voltage-indépendante de leur canal ionique en réponse à une stimulation, laisse supposer un rôle modulateur de la libération des AAE. Ces récepteurs se trouvent principalement au niveau de la couche CA3 de l'hippocampe, des couches profondes du cortex et dans le cervelet.

4) RECEPTEURS L-AP4

Sa dénomination provient de l'action antagoniste du L-AP4 au niveau de certaines synapses glutamatergiques (Monaghan *et al.*, 1989). Ce récepteur pourrait être un autorécepteur contrôlant la libération du glutamate par les terminaisons nerveuses.

5) RECEPTEURS METABOTROPES

La présence de ces récepteurs est concentrée au niveau télencéphalique et dans les couches CA2 et CA3 de l'hippocampe.

Ces récepteurs sont couplés à une protéine G (fig 8). Nicoletti *et al.* (1986) ont dénombré huit sous-types de récepteurs métabotropes (de mGlu R1 à R8), dont l'activation engendre, selon l'isoforme, une augmentation du métabolisme des phosphoinositides, une libération d'acide arachidonique ou des modifications du taux d'AMP cyclique (Schoepp et Conn, 1993 ; Bockaert *et al.*, 1993 ; Goh et Ballyk, 1993). Cette catégorie de récepteurs peut être stimulée par le glutamate ou le quisqualate mais pas par les agonistes des récepteurs ionotropes comme l'AMPA ou le kaïnate. De nombreux auteurs ont émis l'hypothèse que ces récepteurs participeraient au processus de potentialisation à long terme en modulant la transmission synaptique (Gereau et Conn, 1995). Enfin, selon Schoepp et Conn (1993), ils seraient impliqués dans des mécanismes aussi bien neuroprotecteurs que pathologiques.

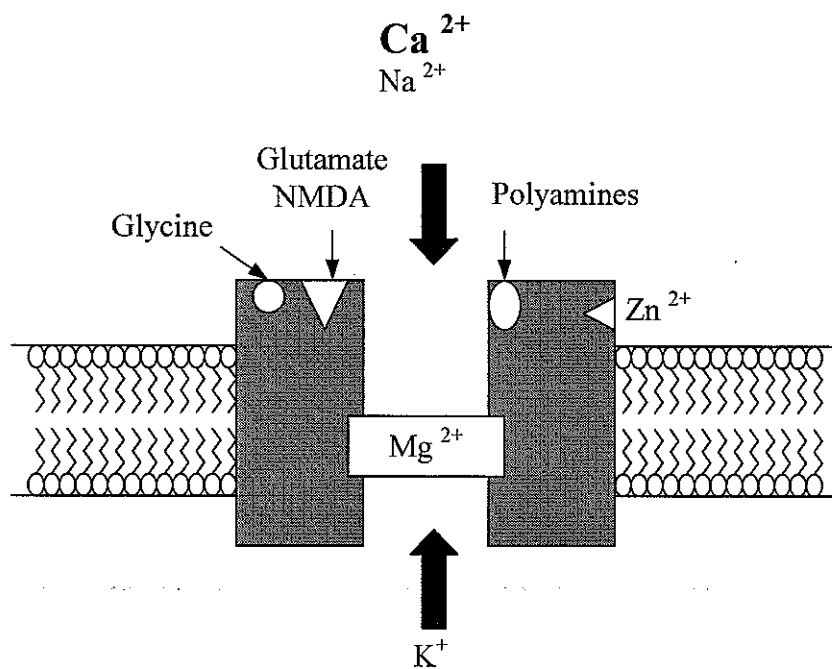


Fig 6 : Schéma de la structure du récepteur de type NMDA

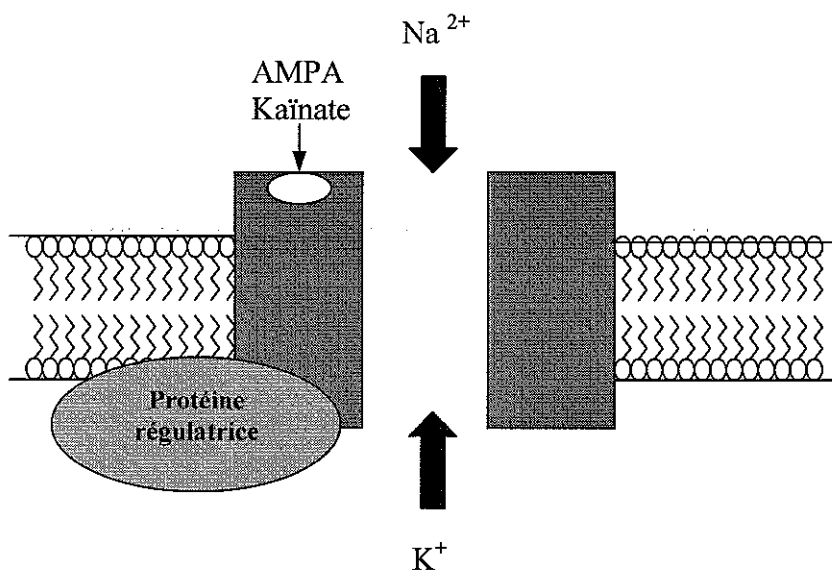


Fig 7 : Schéma de la structure du récepteur de type AMPA

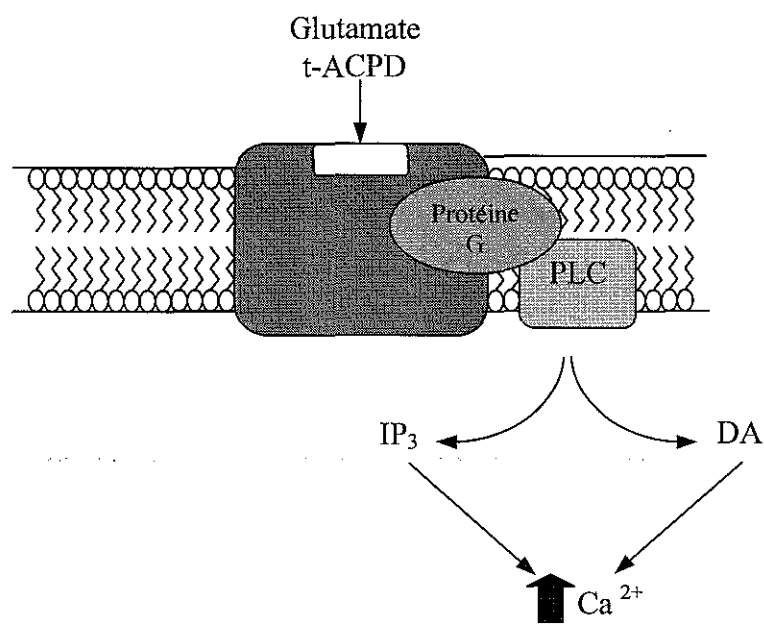


Fig 8 : Schéma de la structure des récepteurs métabotropes, couplés à la phospholipase C

t-ACPD	trans-(+)-1-amino-1,3-cyclopentanedicarboxylate
DAG	diacylglycérol
IP ₃	inositol triphosphate
PLC	phospholipase C

D) NOTION D'EXCITOTOXICITE

1) PRINCIPE

Olney (1971) a employé le terme d'« excitotoxicité » pour décrire le phénomène de libération excessive d'acides aminés excitateurs suivie d'une hyperstimulation des récepteurs, susceptible d'entraîner la mort cellulaire. Le pouvoir cytotoxique du glutamate a ainsi été mis en relation avec la capacité à dépolariser les neurones.

Dans ce contexte, les données de la littérature montrent que l'acide kainique (kainate) représente l'agent le plus efficace, suivi, par ordre d'activité décroissante, du quisqualate, du NMDA, de l'acide homocystéique, de l'aspartate et du glutamate. L'administration de ces agents cytotoxiques est d'ailleurs fréquemment utilisée comme outil pour créer des lésions localisées du système nerveux, par injection locale.

Selon Dessi *et al.* (1994), la toxicité du glutamate repose sur deux principes.

Le premier met en jeu une mort cellulaire brutale. En effet, la dépolarisation membranaire du neurone postsynaptique va entraîner une entrée de Na^+ et Ca^{2+} dans la cellule suivie secondairement d'un influx d'ions Cl^- , eux-même accompagnés d'une entrée d'eau. La cellule va alors gonfler et être lysée (Mc Donald et Johnston, 1990). Cette mort de type nécrotique est généralement obtenue *in vitro* pour des concentrations de glutamate très élevées.

Le deuxième principe met en jeu une cascade de réaction aboutissant à une mort cellulaire retardée. Elle se caractérise par un influx massif d'ions Ca^{2+} dans la cellule résultant provenant essentiellement de l'activation des récepteurs NMDA. Secondairement, ce Ca^{2+} va pouvoir activer différents systèmes enzymatiques, aboutissant à une mort cellulaire retardée (Greenamyre et Young 1989 ; Doble, 1995).

D'après plusieurs études, les mécanismes de la mort neuronale excitotoxique semblent donc impliquer à la fois la nécrose et l'apoptose (Ferrer *et al.*, 1995 ; Lesort *et al.*, 1997 ; Yoon *et al.*, 1998).

L'implication d'un processus apoptotiques dans la mort neuronale induite *in vitro* par un stress excitotoxique est d'ailleurs mise en évidence dans de nombreux travaux (Ikeda *et al.*, 1996 ; Figiel *et al.*, 1996 ; Figiel et Kazmarek, 1997). Ainsi, la fragmentation nucléaire est observée dans les 12 à 24 heures suivant le stress excitotoxique, et elle est précédée de la fragmentation des lamines nucléaires (Ankarcrona *et al.*, 1996). De plus, la mort neuronale par apoptose induite par le glutamate est atténuée, *in vitro* par une surexpression de Bcl-2 (Behl *et al.*, 1993) ou *in vivo* par l'inhibition des caspases (Hara *et al.*, 1997). Uberti *et al.* (1999), ont même suggéré l'existence d'un programme transcriptionnel activé par la stimulation des récepteurs au glutamate dans lequel p50 et p53 joueraient un rôle certain.

Ce processus de mort cellulaire, mis en évidence par exemple au niveau de la région CA1 par Wallis et Panizzon (1995) dépendrait de l'activation des récepteurs NMDA. Il est également envisagé que l'excitotoxicité du glutamate impliquerait initialement une stimulation des récepteurs AMPA/kainate qui induiraient une dépolarisation à l'origine de l'activation secondaire des récepteurs NMDA, eux-même responsables de l'entrée massive de calcium. Mais le glutamate peut aussi activer des récepteurs métabotropes, responsable de l'activation de la Phospholipase C qui hydrolyse les phosphoinositides membranaires pour former des acides gras libres comme l'inositol triphosphate (IP3) et le diacylglycérol ou (DAG). L'IP3 va alors activer la libération dans le cytoplasme du calcium retenu dans le réticulum endoplasmique et le DAG va transloquer la PKC cytosolique vers la membrane et ainsi activer la Phospholipase A2, qui fragilise la membrane plasmique en induisant la formation d'acide arachidonique (Reynolds et Hastings, 1995). Ce dernier est impliqué dans de nombreux processus pathologiques (Farooqui et Horrocks, 1994), et favorise la formation de radicaux oxygénés responsables de la peroxydation membranaire.

Néanmoins, certains auteurs ont décrit une mort neuronale présentant à la fois les caractéristiques de la nécrose et celles de l'apoptose : comme la condensation cytoplasmique ou la fragmentation de la chromatine associés à un gonflement du réticulum endoplasmique et des mitochondries (Regan *et al.*, 1995 ; Isaev *et al.*, 1996). Selon Sohn *et al.* (1998), l'exposition de neurones corticaux de souris au glutamate provoquerait une nécrose atypique, avec notamment fragmentation d'ADN et condensation de la chromatine.

En fait, le profil de mort neuronale consécutif à un stress excitotoxique semble être dépendant de l'intensité de l'agression initiale. Selon Bonfoco *et al.* (1995), l'exposition à de très fortes concentrations d'acides aminés excitateurs entraîne une mort neuronale nécrotique alors qu'un stress plus modéré provoque l'apoptose. De plus, il semble que pour un même stress, le type de mort neuronale varie au cours du temps. La mort survenant juste après l'agression excitotoxique est nécrotique alors que l'apoptose n'est observée que plusieurs heures après (Ankarcrona *et al.*, 1995).

Par ailleurs, les données proposant une mort neuronale programmée à la suite d'un stress excitotoxique ne sont pas confirmées par tous les auteurs (Dessi *et al.*, 1993 ; Yan *et al.*, 1994), peut-être en raison de la disparité des différents modèles utilisés.

2) IMPLICATION DU PROCESSUS EXCITOTOXIQUE DANS L'HYPOXIE-ISCHEMIE

Lors d'une agression hypoxique/ischémique *in vivo*, on assiste à une libération accrue de glutamate en relation avec l'augmentation de la concentration calcique (Wahl *et al.*, 1994). L'entrée de glutamate dans la cellule s'accompagne d'un co-transport de sodium et d'une sortie de potassium (Kanai *et al.*, 1993), les apports d'énergie nécessaires étant fournis par les gradients de sodium et potassium maintenus par les pompes Na^+/K^+ -ATPases. L'épuisement des réserves énergétiques conduit à une inversion du fonctionnement des transporteurs d'AAE, empêchant la recapture du glutamate extracellulaire (Madl et Burgesser, 1993) Ainsi, par un fonctionnement inversé des transporteurs de glutamate consécutivement à une inhibition de la Na^+/K^+ -ATPases, il existerait une potentialisation de l'accumulation extracellulaire de glutamate susceptible d'engendrer un processus de neurodégénérescence (Budd, 1998 ; Rossi *et al.*, 2000). De plus, ce phénomène s'accompagne d'une réduction du transport des AAE au niveau neuronal et glial (Benveniste *et al.*, 1984 ; Hagberg *et al.*, 1985; Bradford *et al.*, 1987 ; Wahl *et al.*, 1991). Il en résulte donc une augmentation considérable des taux de glutamate extracellulaire qui provoque une activation prolongée des récepteurs. Les neurones affectés libèrent à leur tour des AAE et le processus s'étend.

Par ailleurs, en réponse à une hypoxie *in vivo*, les propriétés des récepteurs NMDA sont modifiées (Fritz *et al.*, 1999 ; Hoffman *et al.*, 1994 ; Mishra *et al.*, 1992 ; Cheung *et al.*, 2001), ce qui a pour effet de faciliter l'activation du récepteur et ses conséquences (Zanelli *et al.*, 1999). Les radicaux libres pourraient participer à ce phénomène. En effet, les récepteurs peuvent directement être « attaqués » par ces radicaux (Numagami *et al.*, 1997). Goel *et al.* (1993) ont montré *in vitro* que la peroxydation des membranes synaptiques chez le porcelet provoquait une diminution de l'affinité du récepteur pour son antagoniste, le MK801.

De plus, au niveau du récepteur NMDA, on assiste *in vitro* à une potentialisation persistante des courants (Crépel *et al.*, 1993a et b). Les réponses synaptiques de type NMDA évoquées par la stimulation des afférences des cellules de CA1 sont potentialisées ainsi que les courants générés par l'application de l'agoniste. En outre, les propriétés du récepteur sont modifiées puisque dans le tissu normoxique, le récepteur NMDA est bloqué par le magnésium et de ce fait contribue peu à l'activité synaptique courante; ce qui n'est plus le cas dans le tissu post-hypoxique. En réponse à l'activation prolongée des récepteurs NMDA consécutive à une agression hypoxique, on assiste à une diminution de l'expression des récepteurs NMDA au niveau du gyrus dentelé (Matsuoka *et al.*, 1997) via l'inhibition de la synthèse protéique ou par un phénomène de down-régulation du récepteur. De plus, Hoffman *et al.* (1994) ont montré qu'une hypoxie chez le porcelet modifiait les capacités du récepteur NMDA, au niveau du cortex cérébral, par une augmentation de l'affinité de ce récepteur.

L'hypothèse d'une implication du phénomène d'excitotoxicité dans l'agression hypoxique-ischémique, est renforcée par l'effet protecteur des antagonistes des récepteurs des AAE (Weiss *et al.*, 1986 ; Schurr *et al.*, 1995), notamment du MK801, un antagoniste non compétitif des récepteurs NMDA (Wong *et al.*, 1986) qui se fixe à l'intérieur du canal ionique, ce qui empêche l'établissement du courant ionique (Monaghan *et al.*, 1989). Le MK801 réduit, voire prévient totalement, les lésions hypoxique-ischémiques en fonction du moment où il est administré aussi bien *in vivo* que *in vitro* (Hattori *et al.*, 1989 ; Pringle *et al.*, 1997). Puka-Sundvall *et al.* (2000) ont montré l'atténuation par le MK801 de l'activation de la caspase 3 et de la fragmentation d'ADN consécutives à une hypoxie-ischémie chez le rat de 7 jours.

Pour Kubo *et al.* (2001), la protection de MK801 vis-à-vis d'une ischémie *in vivo* proviendrait d'une atténuation de l'accumulation de calcium uniquement au niveau de CA1, alors que CNQX, un antagoniste des récepteurs non-NMDA, préviendrait cette accumulation aussi bien au niveau de CA1 que CA3 ou du gyrus denté. Matsuoka *et al.*, (1995) ont également observé *in vivo* cette neuroprotection par les antagonistes des récepteurs non-NMDA, à savoir le NBQX, au niveau de CA3 et du gyrus denté. Outre la diminution des flux de calcium, le MK801 pourrait atténuer la transduction du signal aboutissant à la mort cellulaire. En effet, l'influx de calcium intracellulaire, notamment via l'activation des récepteurs NMDA, va activer différentes phosphatases et protéines kinases (Choi, 1995 ; Leist *et al.*, 1997). Ainsi, la CAMkinase II (Fukunaga *et al.*, 1998) a été impliquée *in vitro* dans la transduction du signal aboutissant à la mort cellulaire, notamment par l'activation de la voie des MAPK. D'ailleurs, ERK1/ERK2, appartenant à la famille des MAPK, sont transitoirement activées par la stimulation des récepteurs NMDA, lors de la mort cellulaire induite par le glutamate dans des cultures de neurones corticaux (Jiang *et al.*, 2000a). L'utilisation d'un inhibiteur de MEK1/MEK2 permet de réduire la mort cellulaire en empêchant l'activation de ERK1/ERK2 (Jiang *et al.*, 2000b).

Cependant, le rôle accordé au glutamate dans la mort neuronale d'origine hypoxique est discuté (Uto *et al.*, 1994, 1995). Pour Chow et Haddad (1998), l'excitotoxicité *in vitro* ne mime pas les effets de l'anoxie. De même, Chihab *et al.* (1998 a) ont montré, *in vitro*, que l'excitotoxicité liée au glutamate ne contribuait pas aux dommages cérébraux engendrés par l'hypoxie dans les neurones immatures.

D'autres antagonistes des récepteurs du glutamate comme la phencyclidine, le dextrométhorphan ou la kétamine présentent la même capacité de neuroprotection (Albers *et al.*, 1989 ; Ment *et al.*, 1989). Malgré des résultats prometteurs, ces molécules présentent de lourds effets secondaires, notamment un syndrome schizophrénique associé à des hallucinations auditives et visuelles (Kendell *et al.*, 1991). Seule la mémantine, semble concilier les effets neuroprotecteurs sans effets secondaires (Chen *et al.*, 1986)

3) IMPLICATION DANS L'HYPERBILIRUBINEMIE

Les travaux de Shapiro et Sombati (1991), sur des cultures de neurones hippocampiques de rats de 13 jours, ont montré qu'une concentration de 30 à 50 μ M de bilirubine liée à l'albumine engendrait des perturbations électrophysiologiques semblables à celles induites par le glutamate.

Plus récemment, les récepteurs au glutamate ont été impliqués *in vivo* dans la neurotoxicité de la bilirubine (Hoffmann, 1996 ; Mc Donald *et al.*, 1998). En faveur de cette hypothèse, il a été rapporté que la bilirubine augmentait l'affinité du récepteur NMDA pour le MK801 [3 H] (Hoffman *et al.*, 1996) et il a été montré qu'un traitement par un antagoniste du récepteur NMDA sur des rats Gunn était capable de diminuer les lésions cérébrales.

Néanmoins, Warr *et al.*, (2000) ont suggéré que la bilirubine n'induisait pas la mort neuronale *in vitro* par une action directe sur les récepteurs du glutamate, mais plutôt par une action indirecte en bloquant la recapture de l'AAE. Silva *et al.* (1999) ont mis en évidence *in vitro* cette inhibition par la bilirubine au niveau des astrocytes.

La bilirubine pourrait avoir un effet de stimulation de l'excitotoxicité. Il semble que l'excitotoxicité du glutamate soit dépendante de la maturité des neurones (Mizuta *et al.*, 1998). En effet, Chihab *et al.*, (1998) ont montré que des neurones immatures en culture ne sont pas sensibles à une exposition au glutamate ou au NMDA, mais le deviennent en présence d'un inhibiteur de la PKC. A cet égard, différents travaux réalisés *in vitro* sur des modèles de culture ont attribué l'absence d'effets délétères du glutamate à un défaut d'inhibition de la protéine kinase C (Durkin *et al.*, 1996, 1997). Toutefois, la bilirubine possède la capacité d'inhiber cette kinase (Sano *et al.*, 1985 ; Amit *et al.*, 1993 ; Wolvetang *et al.*, 1994) et donc de rendre les neurones sensibles à l'excitotoxicité du glutamate.

Objectifs

En période périnatale, l'hypoxie-ischémie cérébrale, de par sa fréquence de survenue et ses effets délétères à court- et moyen terme sur le système nerveux central, demeure un problème clinique majeur. Mais la participation de l'hypoxie, seule, reste encore peu documentée. Classiquement, il est considéré qu'une hypoxie sans altération de l'apport en glucose ne provoque que peu de dommages cérébraux chez le nouveau-né. Néanmoins, des résultats précédemment obtenus *in vitro* sur des modèles de cellules en culture ont montré qu'un épisode hypoxique transitoire pouvait engendrer de graves conséquences neuronales (Banasiak et Haddad, 1998 ; Bossenmeyer *et al.*, 1998; Bossenmeyer-Pourie *et al.*, 1999; 2000; Chihab *et al.*, 1998), tandis que quelques études *in vivo* supportent cette conclusion (Matsuoka *et al.*, 1997).

Les principaux objectifs de ce travail consistaient à étudier *in vivo*, sur un modèle de rat nouveau-né, les conséquences lésionnelles de l'exposition à une hypoxie, ainsi que le profil de la mort cellulaire associée, ceci dans le but d'identifier des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la réponse. Par ailleurs, compte tenu du fait que la vulnérabilité du cerveau à l'hypoxie varie en fonction du stade de développement, une étude parallèle a été réalisée sur des animaux plus matures, âgés de 7 jours.

Une meilleure connaissance des mécanismes physiopathologiques associés à l'hypoxie chez le sujet nouveau-né devrait contribuer à l'élaboration de stratégies de neuroprotection. Dans cette perspective, différentes approches ont été testées, à savoir un conditionnement susceptible d'induire un phénomène de tolérance à l'hypoxie, une hypothermie et enfin un traitement par un antagoniste des récepteurs NMDA du glutamate, le MK801, potentiellement capable de s'opposer au processus d'excitotoxicité.

Enfin, les conséquences d'un accident hypoxique cérébral peuvent être défavorablement influencées par d'autres pathologies fréquemment rencontrées en période néonatale, comme l'hyperbilirubinémie. Précédée d'une hypoxie, la possibilité d'évolution de l'hyperbilirubinémie vers un ictère nucléaire, aux conséquences cérébrales graves, est accrue. Dans ce contexte, les effets d'une hyperbilirubinémie associée à l'hypoxie ont été analysés chez le rat nouveau-né. Toutefois, la difficulté d'interprétation des résultats relatifs à cette double agression dans notre modèle *in vivo* nous a conduits à orienter nos travaux vers un modèle cellulaire *in vitro*. La neurotoxicité de la bilirubine puis les conséquences de son association à l'hypoxie ont alors été évaluées sur des cultures de neurones embryonnaires de rats.

In vivo, l'exposition à l'hypoxie a été réalisée en plaçant les animaux âgés de 1 ou 7 jours dans une enceinte thermorégulée où circulait 100% d'azote. L'effet de ce type d'agression sur le développement des individus a été tout d'abord évalué par le suivi du poids corporel et cérébral jusqu'à l'âge adulte.

L'apparition de lésions cérébrales et leur évolution ont été étudiées par des techniques de morphométrie associées à des comptages cellulaires dans différentes régions du cerveau connues pour leur sensibilité à une privation en oxygène. Afin de caractériser la mort cellulaire, une analyse de la morphologie nucléaire a été effectuée après marquage par un fluorochrome, le DAPI. En complément, la fragmentation de l'ADN a été étudiée par électrophorèse sur gel d'agarose et par la méthode TUNEL, tandis que le profil d'expression de différentes protéines spécifiquement impliquées dans l'apoptose a été analysé par immunohistochimie. Une approche de l'activité fonctionnelle cérébrale a consisté à mesurer l'activité de la cytochrome oxydase et à réaliser une étude en IRM de diffusion. Les différents résultats ont été comparés à ceux obtenus chez les sujets témoins qui avaient été exposés à l'air et traités dans les mêmes conditions que les animaux hypoxiques. L'influence des diverses stratégies de neuroprotection envisagées a été appréhendée à l'aide des mêmes paramètres.

Finalement, dans le cadre de l'étude de l'hyperbilirubinémie provoquée par administration intrapéritonéale de bilirubine, un dosage de la concentration cérébrale de bilirubine a été réalisé afin d'évaluer la pertinence du modèle.

En ce qui concerne les études *in vitro*, nous avons eu recours à un modèle de culture de neurones isolés du cerveau antérieur d'embryons de rats de 14 jours précédemment développé au laboratoire. Les conséquences de l'hypoxie et d'une exposition à la bilirubine ont été alors analysées sur les caractéristiques morphologiques, biochimiques et fonctionnelles des neurones.

Dans la seconde partie du mémoire, les approches méthodologiques mises en œuvre seront décrites en détail. La présentation des principaux résultats obtenus sera suivie par une discussion destinée à proposer diverses hypothèses susceptibles de rendre compte de nos observations. Enfin, seront dégagées les principales conclusions issues de ce travail et, dans une démarche prospective, nous envisagerons quelques études qui pourraient venir en prolongement des travaux présentés afin de les compléter.

Section Expérimentale

Méthodologies

I) ANIMAUX

Les travaux ont été réalisés avec des rats de la souche Sprague-Dawley provenant de l'élevage R. Janvier (Le Genest-St-Isle, France). L'expérimentation sur les animaux a été effectuée selon les recommandations décrites dans le "guide for care and use of laboratory animals" (NIH, MD, 1985).

L'identification de la phase du cycle oestral est déterminée par microscopie optique après coloration au Giemsa de prélèvements vaginaux.

Des rates en prooetrus ont été mises en accouplement avec des mâles pendant 24 heures. Elles ont été isolées en condition d'élevage standard (cycle lumineux de 12 heures, avec boisson et nourriture *ad libitum*).

II) APPROCHES IN VIVO

A) EXPOSITION A L'HYPOXIE

Au lendemain de la délivrance, les portées ont été rendues homogènes en réduisant le nombre d'animaux à 10.

L'exposition des ratons à l'hypoxie a été réalisée dans les 24 heures qui suivent la naissance, de façon à obtenir une hypoxie la plus précoce possible, les encéphalopathies survenant dans 90% des cas avant ou pendant l'accouchement.

Les animaux de chaque portée ont été répartis en un groupe "hypoxie" et un groupe "témoin". Après séparation de la mère, les ratons du groupe "hypoxie" ont été placés dans une enceinte thermorégulée à 36°C où circule 100% d'azote pendant 20 mn (planche 1). Passé ce temps, les animaux ont été réoxygénés durant 20 mn sous 21% d'O₂, avant de rejoindre leur mère. Parallèlement, les "témoins" ont été placés sous 21% d'O₂ pendant 40 mn. Le temps de séparation des ratons de leur mère est identique entre les différents groupes.

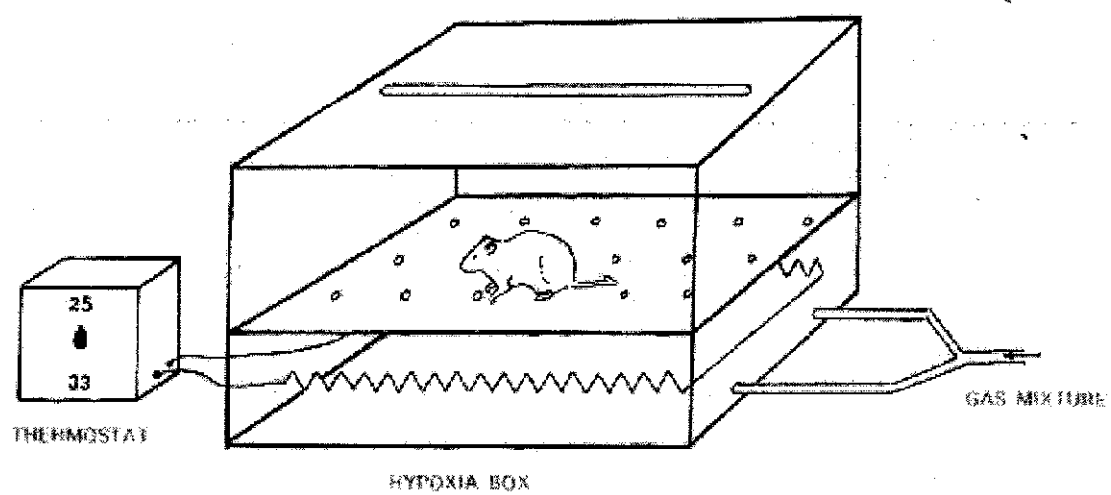


Planche 1 : Schéma de la boîte à hypoxie

B) MODELES DE TOLERANCE A L'HYPOXIE

1) CONDITIONNEMENT

6 heures avant l'hypoxie de base de 20 mn, les rats ont été exposés à une hypoxie de 10mn, les rats retournant auprès de leur mère entre les deux périodes d'hypoxie. Un groupe "témoins conditionnement" a été constitué; les rats subissant 10 mn d'hypoxie (100 % de N₂) avant d'être exposés 6 heures plus tard à 20 mn d'oxygénation sous 21% d'O₂. Enfin, les "témoins" n'ont subi que 20 mn d'exposition à 21% d'O₂, mais le temps de séparation des rats de leur mère reste identique entre les différents groupes.

2) HYPOTHERMIE

Les rats ont été exposés à une hypoxie de 20mn dans une enceinte réglée à 26°C ; la réoxygénation s'est déroulée à la même température, de façon à obtenir une hypothermie suffisante, le thermostat de la boîte à hypoxie dont nous disposons ne permettant pas un réglage extrêmement précis. Par ailleurs, ces choix s'appuient sur différents travaux réalisés sur des animaux plus âgés et au cours desquels les auteurs induisent des hypothermies qui se traduisent par une température rectale aux alentours de 30°C, voire même inférieure (Saeed *et al.*, 1993 ; Towfighi *et al.*, 1994 ; Thoresen *et al.*, 1996 ; Bona *et al.*, 1998).

Compte tenu de la taille des rats à 1 jour après la naissance, leur température corporelle n'a pu être mesurée au cours de notre étude. Le groupe "témoins hypothermie" a subi une oxygénation de 20 mn à 26°C, alors que les "témoins" ont été exposés à une oxygénation à 36°C.

3) TRAITEMENT PAR LE MK801

Une demi-heure avant l'exposition à l'hypoxie, le groupe "hypoxie" a reçu une injection intrapéritonéale d'une solution de MK801.

Deux concentrations de MK801 ont été utilisées : 10mg/kg et 5mg/kg. Les dilutions ont été réalisées dans du sérum physiologique. Le groupe "témoins-MK801" a également reçu l'agent pharmacologique une demi-heure avant l'exposition à 21% d'O₂.

C) INFLUENCE DE LA MATURATION CEREbraLE

1) EXPOSITION A L'HYPOXIE

L'hypoxie a été réalisée en plaçant des animaux âgés de 7 jours dans une enceinte thermorégulée à 36°C où circule de l'azote pur pendant 8 mn.

Avant de retourner auprès de leur mère, les rats ont été réoxygénés pendant 10 mn sous 21% d'O₂. Les "témoins" ont subi 18 mn d'exposition à 21% d'O₂.

2) TRAITEMENT PAR LE MK801

Le groupe "hypoxie" a reçu une demi-heure avant l'exposition à l'hypoxie une injection intrapéritonéale d'une solution de MK801, à raison de 5mg/kg.

Le groupe "témoins-MK801" a également reçu une injection une demi-heure avant l'exposition à 21% d'O₂.

D) EFFET D'UNE HYPERBILIRUBINEMIE, FACTEUR AGGRAVANT DE L'HYPOXIE ?

Une solution de bilirubine de 22,7mM (soit 13,3g/l), préparée extemporanément à l'obscurité, a été utilisée (20mg de bilirubine dissous dans 0,5ml de NaOH 0,1N et dilué dans 1ml de sérum physiologique).

La bilirubine a été administrée par voie intrapéritonéale, à des rats âgés de moins de 24 heures, à raison de 216,6mg/kg. Cette dose provoque, après différents essais de concentrations, une jaunisse caractéristique visible à l'œil nu. Une solution composée de NaOH diluée dans du sérum physiologique a été administrée aux témoins.

Les rats ont ensuite été exposés ou non à une hypoxie de 20mn à 36°C réalisée 10 mn après l'injection de bilirubine.

E) MESURE DES GAZ DU SANG

Afin de vérifier la stabilité physiologique des animaux et les conséquences de l'hypoxie, les gaz du sang ont été contrôlés pendant l'hypoxie puis après réoxygénation. Le sang a été récupéré au moment de la décapitation.

Les paramètres sanguins (pH, PCO₂ et PO₂) ont été mesurés après 10 et 20 mn d'hypoxie, 5 et 10 mn de réoxygénation à l'aide d'un analyseur de gaz du sang (Corning, modèle 158).

F) POIDS CORPORELS ET CEREBRAUX

1) SUIVI DES ANIMAUX

Les animaux ont été laissés avec leur mère jusqu'au sevrage puis placés dans des cages séparées (3 à 5 animaux par cage) jusqu'à 60 jours. Les portées ont été pesées quotidiennement jusqu'à 7 jours post-hypoxie puis à 13 et 20 jours; enfin tous les 10 jours jusqu'à 60 jours. Les résultats ont été obtenus sur trois portées différentes avec un minimum de deux animaux par temps et par traitement pour une même portée.

2) PRELEVEMENT DES CERVEAUX

Les animaux ont été sacrifiés par décapitation, la boîte crânienne incisée caudo-rostralement et les cerveaux ont été soigneusement prélevés, rapidement congelés dans du méthylbutane préalablement refroidi entre -20 et -30 °C puis pesés.

Les cerveaux ont ensuite été conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

Les prélèvements ont été réalisés de 1 à 7 jours post-hypoxie, à 13 et 20 jours puis tous les 10 jours jusqu'à 60 jours.

G) HISTOLOGIE- COLORATION UTILISEE

Des coupes cérébrales transversales sériées de 5µM d'épaisseur ont été réalisées, au niveau de l'hippocampe antérieur suivant l'atlas de Sherwood et Timiras (1970), afin de faire une étude histologique après coloration à la thionine (planche 2).

Les cerveaux congelés ont été enrobés dans du milieu d'inclusion (carboxyméthylcellulose à 4% dans de l'eau) et des coupes de 5µm ont été réalisées à l'aide d'un cryostat (Frigocut 2800, Reichert Jung), dont l'enceinte est maintenue à -20 °C. Les coupes sont recueillies sur des lames de verre puis séchées à température ambiante.

La thionine permet une coloration non spécifique des coupes cérébrales. Cette technique a été utilisée afin de déceler d'éventuelles lésions cellulaires étendues.

Dans un premier temps, les coupes ont été placées pendant 10 mn dans une solution de LMR puis elles ont été réhydratées par des incubations successives de 5 mn dans des bains d'éthanol à 100, 95 et 70%, puis dans de l'eau distillée. Elles ont alors été colorées pendant 7 mn dans une solution de thionine (Sigma, St Louis, MO) à 5g/l dans de l'acide acétique 0.2N et de l'acétate de sodium 0,2N puis rincées par un passage dans de l'eau distillée. Les coupes ont été déshydratées par incubations successives de 3 mn dans des bains d'éthanol à 70, 95 et 100%).

Elles ont alors été incubées dans une solution de LMR puis dans du xylène avant d'être recouvertes.

Une observation des coupes a été réalisée au microscope afin d'apprécier l'intégrité structurale des régions étudiées. La coloration à la thionine a également servi de base à la technique de morphométrie.

H) MORPHOMETRIE

Sur une série de 10 coupes consécutives par animal, les quatre premières et les quatre dernières ont été recueillies pour la morphométrie, la cinquième et sixième pour des comptages cellulaires.

Deux études ont été réalisées: une analyse de l'épaisseur de la couche des cellules pyramidales de l'hippocampe au niveau de CA1, CA3, et du Subiculum et une analyse de densité cellulaire au niveau de CA1, CA3, du Subiculum et du Cortex.

Tous les résultats d'une même portée ont du être traités en même temps car la technique nécessite un réglage et un étalonnage qui se doit d'être identique entre témoins et hypoxiques afin de permettre les comparaisons. Les techniques de morphométrie ont été réalisées à l'aide de logiciels de Biocom version 2-13 (1986-1992) avec un microscope Olympus Bx60.

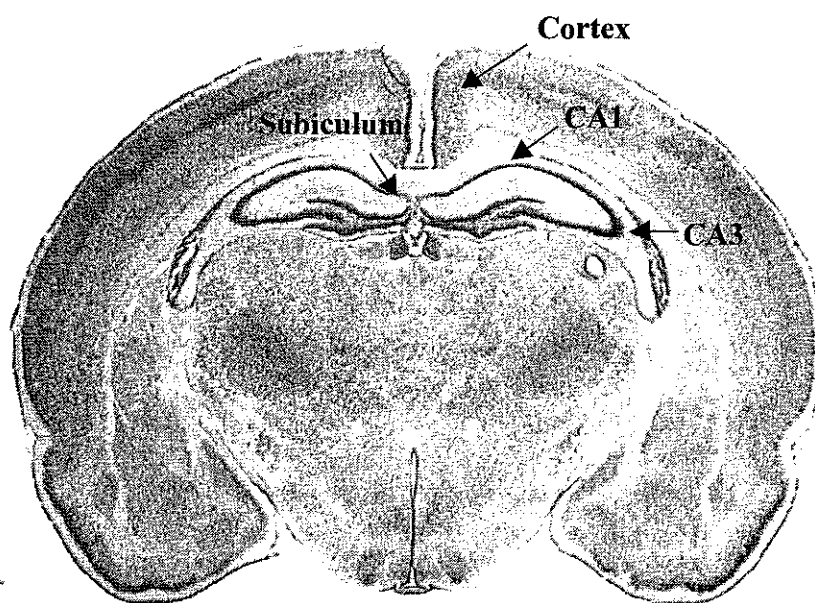
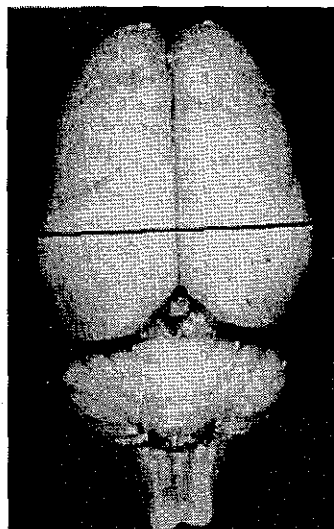
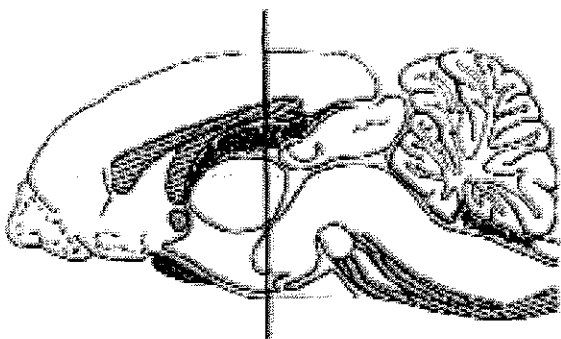


Planche 2 : Localisation des coupes cérébrales

1) EPAISSEUR DE LA COUCHE DES CELLULES PYRAMIDALES

Après réglage de la luminosité et du contraste, un étalonnage a été réalisé sous l'objectif 20x.

L'épaisseur (en μm) de la couche des cellules pyramidales d'une zone définie par une grille oculaire a été évaluée par 7 mesures par coupe et à partir de 8 coupes par animal.

2) DENSITE CELLULAIRE

Les réglages de la luminosité et du contraste restent inchangés. L'étalonnage est réalisé sous l'objectif 40x. Un carré à dimension fixe de $200 \times 200 \mu\text{m}$ est alors utilisé pour sélectionner une zone de la coupe. Un seuillage de la sélection est réalisé afin de différencier les cellules du contexte extra-cellulaire. Cinq sélections sont réalisées par zone et par coupe.

Cette technique permet d'obtenir une surface de corps cellulaires pour une surface donnée, ce qui permet une évaluation de la densité des cellules.

1) EVALUATION DE LA MORT CELLULAIRE

1) MARQUAGE DES COUPES AU DAPI

Les coupes ont été lavées par un passage dans du PBS , puis elles ont été incubées 10 mn dans une solution d'éthanol/acide acétique (3 : 1). Elles ont ensuite été lavées dans de l'eau distillée et séchées à l'air libre.

Le marquage nucléaire a été réalisé dans la pénombre par incubation dans une solution de DAPI ($0,5 \mu\text{g/ml}$, Sigma Chemicals) pendant 10 mn. Après un passage dans de l'eau distillée, une goutte d'Aqua-Polymount a été déposée sur la coupe cérébrale avant d'être recouverte d'une lamelle de verre.

1.1) DISCRIMINATION ENTRE NECROSE ET APOPTOSE

Les cellules saines présentent un noyau rond avec une fluorescence diffuse indiquant une chromatine homogène. Les neurones nécrotiques se caractérisent par un petit noyau très réfringent avec une chromatine uniformément dispersée. Les neurones apoptotiques présentent un noyau avec une chromatine condensée et fragmentée (Gschwind et Huber, 1997).

Le comptage des cellules saines, nécrotiques et apoptotiques a été réalisé sous microscope à fluorescence (Axioskop, Zeiss) à 365 nm, dans les zones CA1, CA3, Subiculum de l'hippocampe et le Cortex.

Les résultats ont été exprimés en pourcentage de cellules par rapport au nombre de cellules totales.

1.2) COMPTAGE CELLULAIRE

Une grille de comptage d'une surface totale de $1/400 \text{ mm}^2$ a été utilisée pour évaluer le nombre de cellules présentes au niveau des couches CA1, CA3, Subiculum et du Cortex.

Les résultats ont été calculés en nombre de cellules par mm^2 et exprimés en pourcentage de variation par rapport aux témoins.

2) FRAGMENTATION DE L'ADN

2.1) TUNEL

Des coupes recueillies sur lame gélatinée, jusqu'alors conservées à -80°C , ont été séchées pendant 30mn avant de passer dans des bains successifs d'alcool croissants de 75 à 100% (Charriaut-Marlangue et Ben-Ari, 1995).

Les coupes ont été perméabilisées 10mn à 37°C par la protéine kinase K ($10\mu\text{g/ml}$). Les peroxydases endogènes ont été inhibées par action de l' H_2O_2 à 2%, puis les coupes ont été rincées dans du PBS 0,1M. Les coupes sont incubées avec le milieu réactif durant 1 heure à 37°C (pour un $500\mu\text{L}$ de milieu : $100\mu\text{l}$ de tampon Tdt, $4\mu\text{l}$ TdT, $3\mu\text{l}$ dUTP-biotine, $393\mu\text{l}$ H_2O). Après un passage des lames dans du PBS/2% BSA pendant 30mn, le signal est amplifié par le complexe streptavidine-peroxydase dans du PBS/2% BSA pendant 1 heure à température ambiante.

La révélation au DAB, après rinçage des coupes au PBS 0,1M, est réalisée à l'obscurité. Les lames sont déshydratées avant d'être montées.

2.2) FRAGMENTATION DE L'ADN SUR GEL D'AGAROSE

Après décapitation des animaux, de 1 à 13 jours après l'épisode hypoxique, les cerveaux sont soigneusement disséqués en vue d'isoler le cortex et l'hippocampe. Chaque région cérébrale est congelée à -80°C jusqu'à utilisation. Chaque échantillon correspond à la dissection d'un seul animal.

Les cerveaux sont ensuite décongelés et chaque échantillon est incubé une nuit à 55°C avec du tampon de lyse (Tris HCl 100mM pH: 8,5; EDTA 5mM; SDS 0,2%; NaCl 200mM; Protéinase K $100\mu\text{g/ml}$).

L'ADN est ensuite précipité sous agitation par ajout d'isopropanol, puis centrifugé à 13000 tr/mn pendant 5 mn en chambre froide. Le surnageant est éliminé et le culot resolubilisé dans du tampon TE (Tris 10mM; EDTA 0,1mM pH: 7,5) pendant 4 à 5 heures à 55°C. Les échantillons sont ensuite traités avec la RNase A (20µg/ml) pendant 2 heures à 37°C.

Le gel est obtenu par chauffage d'une solution d'agarose (1g dans 100ml de TBE : Tris borate 0,045M ; EDTA 0,001M). Après avoir ajouté du bromure d'éthidium, le gel est coulé et laissé à température ambiante pour qu'il polymérise.

A chaque échantillon est ajouté du tampon de charge (bleu de bromophénol 0,25%; glycérol 30%) afin d'alourdir les échantillons et de pouvoir suivre leur migration.

Les échantillons d'ADN sont alors déposés ainsi qu'un marqueur de poids moléculaire. La cuve d'électrophorèse est rempli de tampon TBE et la migration est réalisée sous un courant de 60V pendant 4 heures.

La révélation se fait par transillumination aux UV.

J) DOSAGE DE LA BILIRUBINE

La bilirubine a été dosée par une méthode spectrophotométrique.

La bilirubine est dans un premier temps extraite par le chloroforme. Chaque cerveau, conservé à -80°C, a été décongelé et broyé dans 800µl de sérum physiologique. Après avoir ajouté 1 ml de chloroforme, le broyat est vortexé pendant 30 secondes. L'ensemble est ensuite mis à -20°C pendant 5 mn. Après avoir centrifugé 10 mn à 3500 tr/mn, la phase inférieure est récupérée.

On réalise ensuite un spectre d'absorption entre 300 et 700nm. Sur ce spectre on réalise une dérivée seconde, qui présente l'avantage d'être plus sensible pour discerner les pics. Après avoir obtenu la courbe spectrophotométrique, on trace la tangente entre les densités optiques à 360 et 550nm. Puis, on calcule l'indice optique qui est la différence entre le sommet du pic de bilirubine à 450nm et la tangente. L'indice optique est ensuite reporté sur un diagramme qui permet d'obtenir la concentration de bilirubine correspondante.

K) ANALYSE DE L'EXPRESSION DE PROTEINES SPECIFIQUES

1) ANTICORPS UTILISES

1.1) ANTICORPS PRIMAIRES

p53 est un anticorps polyclonal de chèvre dirigé contre la séquence peptidique correspondante aux acides-amnés 373-391 de la partie carboxy-termnale de la protéine p53 du rat. L'anticorps a été fourni par Santa Cruz Biotechnology.

HSP 105 est un anticorps polyclonal de chèvre dirigé contre la séquence peptidique correspondante aux acides amnés 837-856 de la région carboxy-termnale de la HSP 105 d'origine humaine. L'anticorps a été fourni par Santa Cruz Biotechnology.

Bax est un anticorps polyclonal de lapin dirigé contre la séquence peptidique correspondante aux acides amnés 11-30 de la partie amno-termnale de la protéine Bax (21kDa) d'origine humaine. L'anticorps a été fourni par Santa Cruz Biotechnology.

Bcl-2 est un anticorps polyclonal de chèvre dirigé contre la séquence peptidique correspondante aux acides amnés 4-21 de la partie amno-termnale de la protéine Bcl-2 d'origine humaine. L'anticorps a été fourni par Santa Cruz Biotechnology.

CPP32 p20 (caspase 3) est un anticorps polyclonal de chèvre dirigé contre la séquence peptidique 157-174 de la partie carboxy-termnale du précurseur de la protéase à cystéine de 32 kDa (CPP32) d'origine humaine. L'anticorps a été fourni par Santa Cruz Biotechnology.

NSE est un anticorps polyclonal de lapin dirigé contre l'énolase présente dans les neurones. Il a été fourni par Chemicon International.

GFAP est un anticorps monoclonal de souris, dirigé contre les protéines du cytosquelette des cellules gliales. Il a été fourni par Chemicon International.

- Dilutions utilisées

Bcl-2, p53, HSP ₁₀₅	1/30 ^{ème}
CPP32.....	1/40 ^{ème}
Bax.....	1/40 ^{ème}
NSE.....	1/100 ^{ème}
GFAP.....	1/100 ^{ème}

1.2) ANTICORPS SECONDAIRES

L'anticorps secondaire, couplé à une sonde fluorescente, reconnaît les immunoglobulines de l'espèce productrice de l'anticorps primaire. Il permet la révélation de l'anticorps primaire.

Tous les anticorps secondaires ont été fournis par Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA).

- Descriptif des sondes fluorescentes

-L'isothiocyanate de fluoresceine ou FITC

- longueur d'onde d'excitation : 494 nm

- longueur d'onde d'émission : 520 nm dans le vert

- L'indocarbocyanine ou Cy-3

- longueur d'onde d'excitation : 557 nm

- longueur d'onde d'émission : 576 nm dans le rouge

-L'isothiocyanate de rhodamine ou TRITC

- longueur d'onde d'excitation : 550 nm

- longueur d'onde d'émission : 570 nm dans le rouge

- Dilutions utilisées

L'anticorps anti-chèvre marqué au FITC a été utilisé au 1/100^{ème} pour bcl2, p53, ICE, CPP32

L'anticorps anti-lapin marqué au Cy-3 a été utilisé au 1/80^{ème} pourNSE, Bax,

L'anticorps anti-chèvre marqué a la rhodamine a été utilisé au 1/100^{ème} pour....GFAP, HSP105

2) PROTOCOLE D'IMMUNOHISTOCHIMIE

Tous les anticorps ont été dilués dans du PBS contenant 0,5% de sérum albumne bovine (SAB).

Des coupes de 7µm ont été réalisées au cryostat sur lame de verre et conservées à -80°C jusqu'à utilisation.

Les coupes ont été incubées 10 mn à 4°C dans un bain d'acide acétique/éthanol (1/3) contenant 30% H₂O₂. Après un lavage dans du PBS, elles ont été incubées pendant 20 mn à 4°C avec la SAB à 0,5%.

Après un nouveau lavage dans du PBS, elles ont été séchées puis la coupe cérébrale a été délimitée à l'aide d'un DAKO PEN. Les coupes ont alors été incubées avec l'anticorps primaire à 4°C en ambiance humide pendant 48 heures. Après lavage, elles ont été incubées avec l'anticorps secondaire à 4°C en ambiance humide pendant 2 heures. Les coupes ont alors été lavées et séchées puis après avoir déposé une goutte d'Aqua-polymount, elles ont été recouvertes d'une lamelle de verre.

Une étude semi-quantitative de ces coupes a été réalisée à l'aide d'un microscope à fluorescence (Zeiss, Axioskop). Les plages fluorescentes correspondantes à la zone CA1 de l'hippocampe ou du cortex ont été photographiées et scannées.

L'intensité fluorescente des neurones a été analysée à l'aide d'un logiciel de traitement d'image (Adobe Photoshop, version 5,0). Les résultats ont été obtenus en unités arbitraires de fluorescence pour 100 pixels et exprimés en pourcentage de variation par rapport aux témoins.

Trois portées distinctes ont été utilisées avec deux coupes par animal pour un même anticorps.

Des doubles marquages, DAPI-NSE ou DAPI-GFAP ont été réalisés. Le marquage au DAPI a été effectué après l'immunohistochimie.

L) ETUDE DE L'ACTIVITE FONCTIONNELLE CEREBRALE

1) IRM (IMAGERIE PAR RESONANCE MAGNETIQUE)

1.1) PRINCIPE

a) Généralités

L'IRM est basée sur l'analyse du comportement des protons contenus dans les tissus et soumis d'une part à un champ magnétique et d'autre part à une impulsion de radiofréquence.

Lors de l'excitation du proton par l'onde de radiofréquence, il accumule de l'énergie qu'il restitue à l'arrêt de l'impulsion de radiofréquence sous forme d'un signal. Ce signal est alors analysé puis intégré dans un système référencé dans les trois plans de l'espace et converti en image.

De nouvelles techniques d'IRM, comme l'imagerie de diffusion semblent particulièrement sensible pour le diagnostic très précoce des lésions hypoxiques-ischémiques.

b) Imagerie de diffusion

Le principe de ce type d'imagerie est basée sur l'étude des mouvements aléatoires des molécules d'eau dans un volume. Dans un milieu liquide, les particules d'eau sont agitées selon un mouvement brownien par agitation thermique due à leur énergie cinétique.

Une équation mathématique permet d'établir une relation entre le déplacement moléculaire dans l'eau et le coefficient de diffusion.

$$[r-r']^2 = 2Dt_{\text{dif}}$$

$[r-r']$: distance parcourue par un ensemble de molécules dans une seule dimension

D : Coefficient de diffusion, le coefficient de l'eau pure est de $3.10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$.

t_{dif} : temps nécessaire aux molécules pour parcourir la distance $[r-r']$

Dans les tissus biologiques, la diffusion libre de l'eau est contrariée par des obstacles physiologiques. L'application directe de la formule précédente n'est donc pas valable. On parle alors de "coefficient apparent de diffusion" ou ADC correspondant à une estimation du coefficient de diffusion.

L'imagerie de diffusion correspond à une séquence classique Spin Echo pondérée T2, à laquelle on applique un gradient de champs magnétique de part et d'autre de l'impulsion de radiofréquence à 180°.

Le premier gradient entraîne un déphasage et le second un rephasage des protons. Pour les protons immobiles, il n'existe pas de modification du signal. Pour les protons mobiles, le déphasage accumulé pendant l'application du premier gradient n'est pas compensé par le second, on observe alors une diminution du signal.

Les images brutes de diffusion montrent un hypersignal pour les zones à diffusion moléculaire réduite et un hyposignal pour les zones à diffusion normale.

Le coefficient apparent de diffusion est calculé en comparant pixel par pixel les images obtenues avant et après l'application des gradients de diffusion.

L'atténuation du signal est donné par la relation:

$$SA = e^{-b \cdot ADC}$$

- SA : Atténuation du signal = S/S_0 (S_0 et S : respectivement signal avant et après application des gradients).

- ADC : Coefficient Apparent de Diffusion en mm^2/sec

- b : paramètre permettant de moduler l'intensité des gradients appliqués en sec/mm^2

$$b = \gamma^2 G^2 \delta^2 / 6$$

γ constante gyromagnétique du proton

G amplitude du gradient

δ temps qui sépare les 2 gradients

δ durée d'application du gradient

Le calcul de l'ADC effectué par traitement sur console annexe permet d'obtenir pour chaque plan de coupe, une cartographie de diffusion où chaque pixel est représenté par une couleur en fonction de sa valeur d'ADC.

1.2) PROTOCOLE

Tous les animaux ont été explorés en IRM selon 2 séquences, l'une en pondération T2, l'autre, pondérée en diffusion . Ces examens ont été réalisés à 3 et 6 jours post-hypoxie après anesthésie à l'halothane.

L'IRM a été réalisé avec une antenne "WRIST", émettrice/réceptrice et un imageur General Electric Sigma 1.5T.

Séquence T2 FSEIR (Fast Spin Echo avec inversion/Récupération) en coupes frontales de 3mm tous les 0.3mm.

$$\left\{ \begin{array}{l} \text{TR} = 3600 \\ \text{TE} = 17 \\ \text{ETL} = 10 \end{array} \right. \quad \left\{ \begin{array}{l} 2\text{Nex} \\ \text{Matrice} = 256*256 \\ \text{FOV} = 8*4 \text{ cm (taille du voxel : } 0.75 \text{ mm}^2) \end{array} \right.$$

Séquence de diffusion SE EPI (Spin Echo Echo Planar Imaging) en coupes frontales de 3mm jointives.

$$\left\{ \begin{array}{l} b = 1000 \\ 1 \text{ shot} \\ \text{TE minimum} \end{array} \right. \quad \left\{ \begin{array}{l} \text{FOV} = 8*4 \text{ cm (taille du voxel : } 0.75 \text{ mm}^2) \\ \text{Matrice} = 128*100 \\ \text{TR} = 5000 \end{array} \right.$$

1.3) TRAITEMENT DES DONNEES

Les données des séquences de diffusion sont traitées par le logiciel Functool (GEMS).

Les images brut de diffusion sont étudiées à la recherche d'une éventuelle anomalie de signal puis, une cartographie d'ADC (Apparent Diffusion Coefficient) est réalisée en vue d'une étude quantitative.

2) MESURE DE L'ACTIVITE DE LA CYTOCHROME OXYDASE

La technique sans fixation par perfusion intracardiaque été décrite par Wong-Riley (1979).

Après avoir réalisé des coupes de 20 μ M sur lames gélatinées-chrome-alun, les lames sont conservées à -80°C jusqu'à utilisation.

Après avoir séché les lames à température ambiante, elles sont incubées à 37°C, à l'obscurité, sur agitateur pendant environ 1 heure dans un tampon phosphate 0,1M additionné de 0,22 mg/ml de cytochrome c (SIGMA), de 44,4 mg/ml de saccharose, de 0,2 mg/ml de catalase et de 0,55 mg/ml de DAB-4 HCl.

Après rinçage à froid pendant 5 mnutes au tampon phosphate sucrosé à 10 %, les coupes sont fixées dans un bain de formalin tamponné pendant 30 mnutes. Les coupes sont ensuite rincées 2 fois dans du tampon phosphate puis déshydratées dans des bains successifs d'alcool de 70°, 95° et 100° pour termner dans 2 bains de xylène. Le montage des lames est réalisé à l'Eukitt.

L'étude a été réalisé au niveau de CA1 et CA3 de l'hippocampe ainsi qu'au niveau du cortex moteur et du cortex cingulaire. L'activité enzymatique de l'enzyme est mesurée à l'aide d'un logiciel Biocom version 2-13 (1986-1992) couplé à un microscope Olympus Bx60.

Un étalonnage est réalisée avec des standards d'activité enzymatique connue. Les données sont exprimées en activité par mg de protéines.

III) APPROCHE IN VITRO

A) CULTURE DE NEURONES

1) MISE EN CULTURE

Les cultures ont été réalisées suivant la technique mise au point au laboratoire (Daval *et al.*, 1988, 1991).

Toutes les manipulations ont été effectuées stérilement sous hotte à flux laminaire avec du matériel stérile ou à usage unique.

Les produits utilisés et leur provenance sont regroupés dans le tableau 4. Les compositions des milieux de culture et des différentes solutions utilisées sont répertoriées dans le tableau 5.

- Le jour précédant la culture:

Des boîtes de Pétri 35x10 mm (Falcon, Becton-Dickinson) ont été recouvertes par 2 ml d'une solution stérile de Poly-L-lysine (1mg/ml) et placées dans l'incubateur (37°C, 95% air et 5% CO₂ en atmosphère humide). Cette étape permet d'obtenir un réseau polymérique auquel les cellules adhéreront (Yavin et Yavin, 1974).

- Le jour de la culture:

La solution de Poly-L-lysine a été éliminée et les boîtes ont été rincées par du milieu de base, puis placées dans l'incubateur avec du milieu de base enrichi en sérum de veau fœtal à 5%.

Une rate, à 14 jours de gestation, a été anesthésiée à l'Halothane, son abdomen a été incisé afin de prélever son utérus gravide. Les embryons libérés de leur placenta ont été placés dans du milieu de base enrichi en sérum. La partie supérieure de la tête a été isolée; les méninges et les micro-vaisseaux sanguins ont été éliminés et les amas cellulaires obtenus ont été transférés dans un tube contenant du milieu avec sérum.

Une suspension cellulaire a été obtenue par dissociation mécanique douce à la seringue puis centrifugée à 1250 tr/mn pendant 10 mn. Le surnageant a été remplacé par du milieu de base enrichi en sérum et une nouvelle homogénéisation a été réalisée. La suspension cellulaire obtenue a été passée sur un tamis de Nylon stérile (46µm).

Une évaluation de la densité cellulaire a été réalisée à l'aide d'un hémocytomètre.

Les boîtes ont étéensemencées à 10^6 cellules/boîte et ont été placées dans l'incubateur (37°C, 95% air et 5%CO₂ en atmosphère humide).

Tableau 4 : Produits utilisés pour la culture de neurones

Anesthésie des rates	Halothane	Belamont, Paris, France
Support	Poly-L-lysine	Sigma Chemicals, St Louis, MO, USA
Milieu	DMEM-Ham's F12	ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, CA, USA
de culture	Sérum de veau fœtal	Gibco-Brl, Ichinnan, Scotland
Additifs	L-Glutamine	Sigma Chemicals, St Louis, MO, USA
contenus	Glucose	Sigma Chemicals, St Louis, MO, USA
	Bicarbonate de sodium	Sigma Chemicals, St Louis, MO, USA
	Transferrine Humaine	Sigma Chemicals, St Louis, MO, USA
dans	Insuline Bovine	Sigma Chemicals, St Louis, MO, USA
le	Putrescine	Sigma Chemicals, St Louis, MO, USA
	17'oestradiol	Sigma Chemicals, St Louis, MO, USA
	Sélénium	Sigma Chemicals, St Louis, MO, USA
SATO	Progestérone	Sigma Chemicals, St Louis, MO, USA
	Pénicilline-Streptomycine	Gibco-Brl, Ichinnan, Scotland
Facteurs	bFGF	Sigma Chemicals, St Louis, MO, USA
de croissance	EGF	Sigma Chemicals, St Louis, MO, USA

Tableau 5: Concentration des produits utilisés pour la culture de neurones

	Produits	Concentration
Milieu de base	DMEM-Ham's-F12	11,82 g/L
	Glucose	2 g/L
	Bicarbonate de sodium	2,438 g/L
	Glutamine	300 mg/L
	Pénicilline -Streptomycine	25 mg/L
	pH 7,24	
Milieu enrichi en sérum	Milieu de base	5%
	Sérum de veau foetal	
	Milieu de base	
Milieu enrichi en hormones ou SATO	Transferrine humaine	80 mg/L
	Insuline bovine	5 mg/L
	Putrescine	16 mg/L
	Glutamine	20 mg/L
	17 β oestradiol	1 pM
	Sélénium	30 nM
	Progestérone	10 nM
SATO et facteurs de croissance	SATO	
	FGF	2 ng/ml
	EGF	10 ng/ml

- Après 24 heures:

Le milieu de culture a été remplacé par du milieu enrichi en hormones ou SATO contenant des facteurs de croissance (FGF et EGF).

- Aux quatrième et sixième jours:

Des changements de milieu ont été effectués avec du milieu enrichi en hormones mais sans facteur de croissance.

2) CARACTERISATION DES NEURONES

La morphologie des cellules a été quotidiennement observée à l'aide d'un microscope à contraste de phase (Nikon, modèle Diaphot TMD).

La méthode d'exclusion au Bleu Trypan a permis d'évaluer le nombre de cellules viables dans les cultures ; ce colorant ne pénétrant que dans les cellules mortes.

La caractérisation cellulaire a été obtenue par l'analyse immunohistochimique de la NSE (énolase spécifique des neurones; 1/10, Chemicon International, Temecula, CA) et de la GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein; 1/200, Chemicon International, Temecula, CA).

Parallèlement, les proportions de cellules neuronales et gliales ont été évaluées par un contre-marquage nucléaire au DAPI.

B) EXPOSITION A LA BILIRUBINE ET A L'HYPOXIE

Les expositions des cellules à la bilirubine et/ou à l'hypoxie ont été effectuées au 6^{ème} jour de culture. On est alors en présence de neurones correspondant à un stade néonatal (Dichter, 1969).

L'hypoxie est obtenue en transférant les boîtes de culture dans une chambre d'incubation humide à 37°C où circule un mélange gazeux constitué de 95% N₂ et 5% CO₂.

Le temps d'exposition des neurones à l'hypoxie a été de 3 ou 6 heures. Passé ce temps, les cultures ont été replacées en normoxie (95% air- 5%CO₂) jusqu'à 96 heures, tandis que les témoins ont été continuellement maintenus dans les conditions standards.

Afin d'évaluer la qualité de l'hypoxie, la pression partielle en oxygène (PO₂), en gaz carbonique (PCO₂) et le pH ont été mesuré dans le milieu d'incubation de quelques boîtes de culture à l'aide d'un analyseur des gaz du sang (Corning, Halstead, UK) (Sher, 1990).

L'exposition à la bilirubine a été réalisée au 6^{ème} jour en remplaçant le milieu de culture par un milieu contenant une solution de bilirubine. L'exposition a été maintenue jusqu'à 96 heures. La solution stock de bilirubine (concentration de 1mM) a été préparé à température ambiante à l'abri de la lumière et extemporanément (Nelson *et al.* 1974).

Les différentes concentrations de bilirubine (de 0,25 à 5µM) utilisées ont été obtenues par dilution dans du SATO à partir de la solution stock filtrée.

Pour les neurones exposés à la bilirubine et à l'hypoxie, la mise en présence de bilirubine a été initiale suivie de l'exposition à l'hypoxie.

C) TRAITEMENTS PHARMACOLOGIQUES

1) EXPOSITION A UN INHIBITEUR DE SYNTHÈSE

PROTEIQUE : la cycloheximide

Les cultures de neurones ont été exposées pour une durée de 6 heures à la cycloheximide (CHX, Sigma Chemicals) à la concentration de 1µM, connue pour réduire la synthèse protéique de 90% (Greenberg *et al.*, 1986). Ensuite, le milieu a été renouvelé par du milieu sans CHX, avec ou sans bilirubine.

2) EXPOSITION A DES INHIBITEURS DES CASPASES

Un inhibiteur d'ICE (interleukine 1- β -converting enzyme/caspase-1) et un inhibiteur de CPP32 (Yama/Apopain/caspase-3), deux protéases à cystéine intervenant dans l'apoptose cérébrale, ont été étudiés.

-YVAD-CHO (N-acétyl-Tyr-Val-Ala-Asp-aldéhyde, Biomol Research Laboratories) est un inhibiteur réversible d'ICE (Lin *et al.*, 1995)

-DEVD-CHO (N-acétyl-Asp-Glu-Val-Asp-aldéhyde, Biomol Research Laboratories) est un inhibiteur réversible de CPP32.

Les concentrations ont été choisies en fonction des recommandations du fabricant et des données de la littérature, soit 10 μ M pour chacun des deux inhibiteurs (Margolin *et al.*, 1997).

Ces inhibiteurs ont été ajoutés dans le milieu de culture en même temps que la bilirubine et reste dans le milieu d'incubation pendant 96 heures.

3) EXPOSITION AU GLUTAMATE ET AUX ANTAGONISTES DE SES RECEPTEURS

Au 6^{ème} jour de culture, le milieu a été remplacé, durant 6 ou 3 heures, par du milieu additionné de glutamate (100 μ M, RBI, Natick, MA, USA).

L'exposition des neurones à la bilirubine et/ou à l'hypoxie a par ailleurs été réalisée, en présence d'antagonistes des récepteurs NMDA (dizocilpine maléate ou MK801, à 10 μ M, RBI) ou non NMDA (1,2,3,4-tetrahydroxy-6-nitro-2,3-dioxobenzof)quinoxaline-7-sulfonamide disodium ou NBQX à 10 μ M, RBI). Ces antagonistes ont été incubés dans le milieu de cultures en même temps que la bilirubine mais seulement pendant 6 heures. Ensuite, le milieu a été remplacé par du milieu frais contenant ou non la bilirubine.

D) MESURE DE LA VIABILITE CELLULAIRE

La viabilité a été mesurée par une méthode spectrophotométrique utilisant le MTT (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium bromide).

Dans les cellules vivantes, ce sel de tétrazolium est transformé dans les mitochondries en formazan, qui sous l'action de déshydrogénases forme un précipité violet détectable par spectrophotométrie (Hansen *et al.*, 1989). Cette conversion est directement proportionnelle au nombre de cellules viables.

Les neurones ont été incubés à 37°C pendant 3 heures en présence de MTT (500 µg/ml de milieu, Sigma Chemicals). Ils ont été rincés deux fois avec une solution tampon phosphate (phosphate-buffered saline, PBS : 137mM de NaCl, 6mM de Na₂HPO₄, 1,5mM de KH₂PO₄, pH de 7,4) puis lysés par du DMSO (diméthyl sulfoxyde) pur. La densité optique du lysat obtenu a été mesurée à 519nm et les résultats ont été exprimés en pourcentage de variation par rapport aux témoins auxquels a été attribuée une viabilité de 100%.

E) CARACTERISATION DE LA MORT CELLULAIRE

1) NECROSE ET APOPTOSE

L'analyse de la quantité de cellules nécrotiques ou apoptotiques a été réalisée à l'aide de la technique de marquage de l'état nucléaire, adaptée de Wolvetang *et al.* (1994), utilisant le DAPI (4,6-diamidino-2-phénylindole).

La méthode consiste à laver deux fois les cellules par du PBS et à les fixer pendant 10 mn dans une solution d'éthanol/acide acétique (3 : 1). Elles ont été ensuite lavées dans de l'eau distillée pendant 1 mn et séchées à l'air libre. L'ADN nucléaire a été marqué par le DAPI (0,5 µg/ml, Sigma Chemicals) au cours d'une incubation de 10 mn. Les cellules ont de nouveau été lavées deux fois à l'eau distillée séchées et traitées avec une solution anti-décoloration (10mg/ml, p-phényldiamne dans 90% de glycérol).

Le comptage des cellules saines, nécrotiques et apoptotiques a été réalisé sous microscope à fluorescence (Axioskop, Zeiss) à 365 nm. Les résultats ont été exprimés en pourcentage de cellules par rapport au nombre de cellules totales. Un minimum de trois expériences distinctes, chacune avec des comptages de 5 aires de 100 noyaux par boîtes de cultures ont été utilisées.

2) FRAGMENTATION D'ADN: mesure de la libération de thymidine tritiée

Lorsque des cellules sont exposées simultanément à la thymidine [^3H] et à un traitement inducteur de l'apoptose, leur ADN va se fragmenter, la cellule se lyser avec formation de corps apoptotiques et des petits fragments vont être dispersés dans le milieu. La perte d'ADN des cellules sera reflétée par la réduction de leur marquage radioactif au profit du milieu d'incubation (Mc Gahan *et al.*, 1995).

Avant l'exposition des neurones à l'hypoxie ou à la bilirubine, le milieu de culture a été remplacé par du SATO contenant de la thymidine [^3H] à $0,5\mu\text{Ci/ml}$ (activité spécifique : $3,30\text{TBq/mmol}$, New England Nuclear, Boston, MA).

La durée d'incubation est la même que celle de l'épisode hypoxique augmenté ou non de la période post-hypoxique étudiée.

- Pour la mesure de la fraction extra-cellulaire:

Le milieu contenu dans les boîtes a été récupéré. Des fioles de comptage ont été préparées avec $150\mu\text{l}$ de milieu et 2 ml de scintillant (Optiphase Hisafe II).

- Pour la mesure dans la fraction acido-insoluble:

Les boîtes ont été rincées avec du NaCl 0,9% à 4°C puis elles ont été incubées pendant 20 mn à 4°C avec du TCA à 10%. Après élimination du TCA, les boîtes ont été lavées avec $200\mu\text{l}$ d'éthanol. L'évaporation de l'éthanol se fait à l'air libre.

Les cellules ont été solubilisées avec du NaOH 1N et incubées 1 heure à 37°C. Un prélèvement de 100µl additionné de scintillant Optiphase Hisafe II a été réalisé pour le comptage et un second de 100µl a été utilisé pour la mesure des protéines par la méthode de Bradford (1976).

La radioactivité a été mesurée à l'aide d'un compteur à scintillation (Beckman, LS, 1801).

F) EVALUATION DU TAUX DE SYNTHÈSE PROTÉIQUE

La synthèse protéique a été mesurée par l'incorporation de L-leucine [^3H] (NEN : 50Ci/mmol) dans les cellules en culture.

Juste avant l'exposition des neurones à l'hypoxie ou la bilirubine, le milieu de culture a été remplacé par du SATO contenant la L-leucine [^3H] à 0,5µCi/ml. A chaque temps de mesure, les boîtes ont été rincées deux fois avec du NaCl 0,9% puis ont été incubées dans 1ml de TCA (acide trichloroacétique) 10% glacé et mises à 4°C pendant 20 mn.

- Pour la mesure dans la fraction acido-insoluble:

Les boîtes ont été vidées et rincées avec 200µL d'éthanol; le TCA et l'éthanol de rinçage sont éliminés. L'évaporation de l'éthanol se fait à l'air libre.

Après lavage des boîtes avec une solution de NaCl 0,9%, les cellules ont été traitées comme pour l'étude de l'incorporation de thymidine [^3H].

Les incorporations de thymidine et de L-leucine [^3H] ont été calculées en DPM dans les fractions acido-insolubles. Les résultats sont exprimés en pourcentage de variation par rapport aux témoins.

G) EVALUATION DE L'ACTIVITE FONCTIONNELLE DES NEURONES

L'étude du métabolisme énergétique a été réalisée par incorporation de 2-D- $[^3\text{H}]$ -déoxyglucose, (2dG $[^3\text{H}]$).

Le 2dG $[^3\text{H}]$ est transporté au sein des neurones par le même système de transporteurs que le glucose. Il est transformé par l'hexokinase en 2dG-6-phosphate $[^3\text{H}]$ alors que le glucose est transformé en glucose-6-phosphate. Le métabolisme des deux substances va ensuite différer; le glucose est converti en fructose-6-phosphate puis métabolisé. En revanche, le 2dG $[^3\text{H}]$ ne peut être converti en fructose-6-phosphate et s'accumule dans la cellule.

Les boîtes de cultures ont été rincées deux fois avec du tampon Krebs-Ringer sans glucose et préincubées pendant 15 mn à 37°C. Elles ont été incubées 30 mn à 37°C dans 1,5 ml de la même solution contenant 1mM de 2dG $[^3\text{H}]$ (NEN : 50Ci/mmol) à 1 $\mu\text{Ci/ml}$. Après lavage des boîtes avec une solution de NaCl 0,9%, les cellules ont été solubilisées avec du NaOH 1N et incubées 1 heure à 37°C. Des fioles de comptage ont été préparées avec 100 μl d'échantillon, 400 μl H₂O et 3ml de scintillant Optiphase Hisafe II. La radioactivité a été mesurée à l'aide d'un compteur à scintillation (Beckman, LS 1801). Un dosage des protéines de chaque échantillon a été réalisé par la méthode de Bradford.

L'incorporation de 2dG $[^3\text{H}]$ a été calculée en nmol/mg de protéines et les résultats ont été finalement exprimés en pourcentage de variation par rapport aux témoins.

H) ANALYSES STATISTIQUES

Les résultats obtenus ont été analysés par une analyse de la variance ANOVA, suivie d'un test t *a posteriori* : Test t protégé dont le principe est celui d'un Test t de Student mais modifié du fait que la variance estimée l'est ici sur l'ensemble des échantillons.

Résultats

) ETUDES IN VIVO

A) EFFET D'UNE HYPOXIE TRANSITOIRE CHEZ LE RATON DE 1 JOUR

1) SURVIE

Une hypoxie de 30 mn provoque la mort de 90% des animaux. Réduite à 25 mn, elle engendre encore 60% de mortalité. Par contre, une exposition de 20 mn permet un taux de survie avoisinant les 80% (fig 1), ce qui nous a conduits à choisir cette durée d'hypoxie pour la suite de nos travaux.

2) MESURE DES GAZ DU SANG

Les animaux témoins présentent un pH de 7,4, une PCO_2 de 35 mmHg et une PO_2 de 75 mmHg.

Lors de l'hypoxie, le pH et la PO_2 diminuent progressivement pour atteindre respectivement 6.6 et 12.5 mmHg après 20 mn. En revanche, la PCO_2 est augmentée jusqu'à 130 mmHg.

Le pH, la PO_2 et la PCO_2 retrouvent leur valeur de base après 20 mn de réoxygénation, la PO_2 présentant un pic de pression à 5 mn de réoxygénation (95 mmHg) (fig 2).

3) EVOLUTION DES POIDS CORPORELS ET CEREBRAUX

Aucune incidence sur le poids corporel n'est observée chez le jeune animal; mais une diminution du poids corporel des animaux hypoxiques apparaît plus tard à partir de 40 jours post-hypoxie (fig 3). L'hypoxie engendre une diminution des poids cérébraux à partir de 6 jours post-hypoxie (-9%), laquelle persiste jusqu'à l'âge adulte.

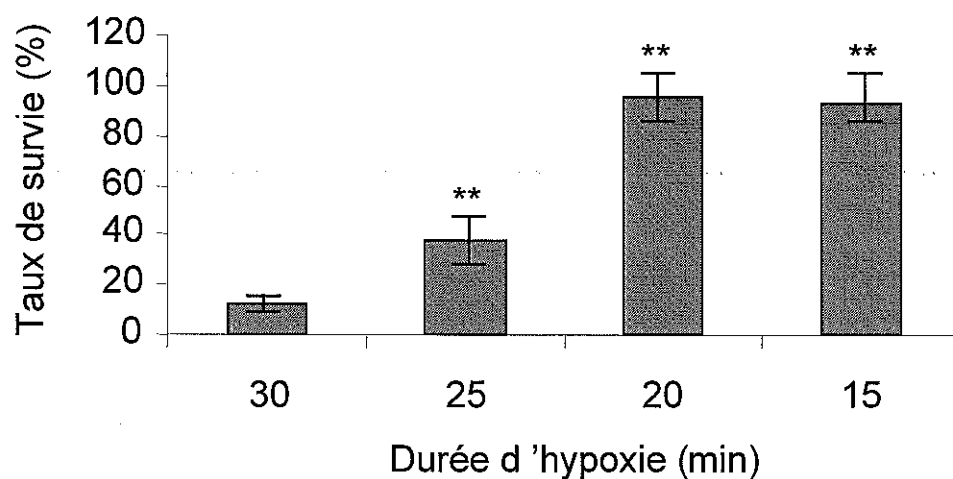


Figure 1 : Courbe de survie des rats de 1 jour exposés à une hypoxie de durée variable.

Valeurs moyennes $\pm$ DS obtenues à partir de 5 animaux minimum.

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ (Test de Student)

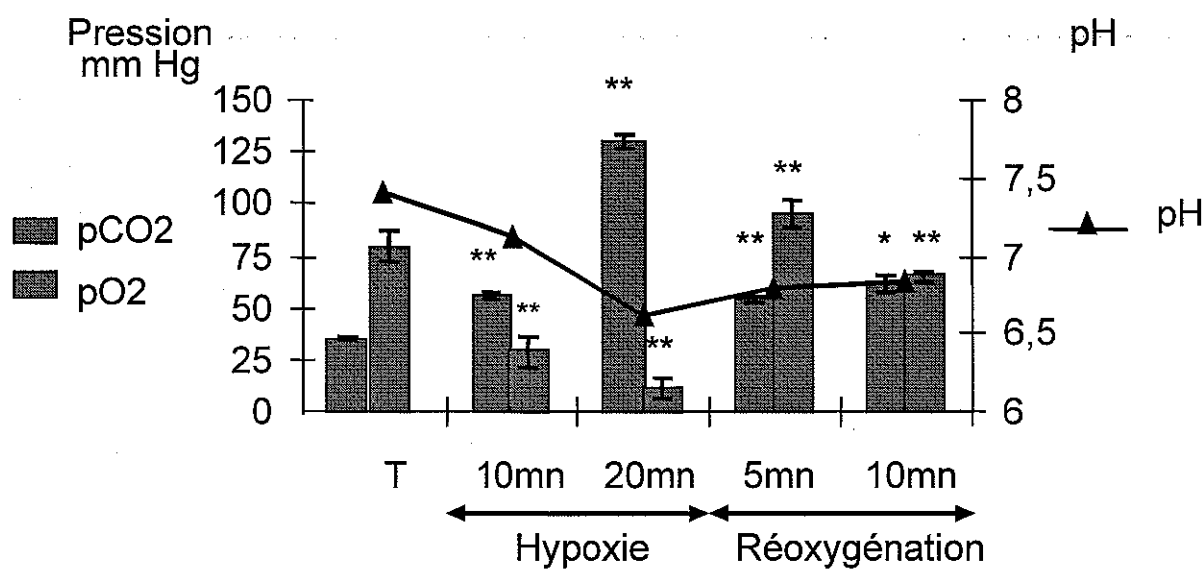


Figure 2 : Variation des paramètres physiologiques (pH, pCO₂, pO₂) lors d'une hypoxie de 20 min puis après réoxygénation.

Valeurs moyennes $\pm$ DS obtenues à partir de 5 animaux minimum.

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ (Test de Student)

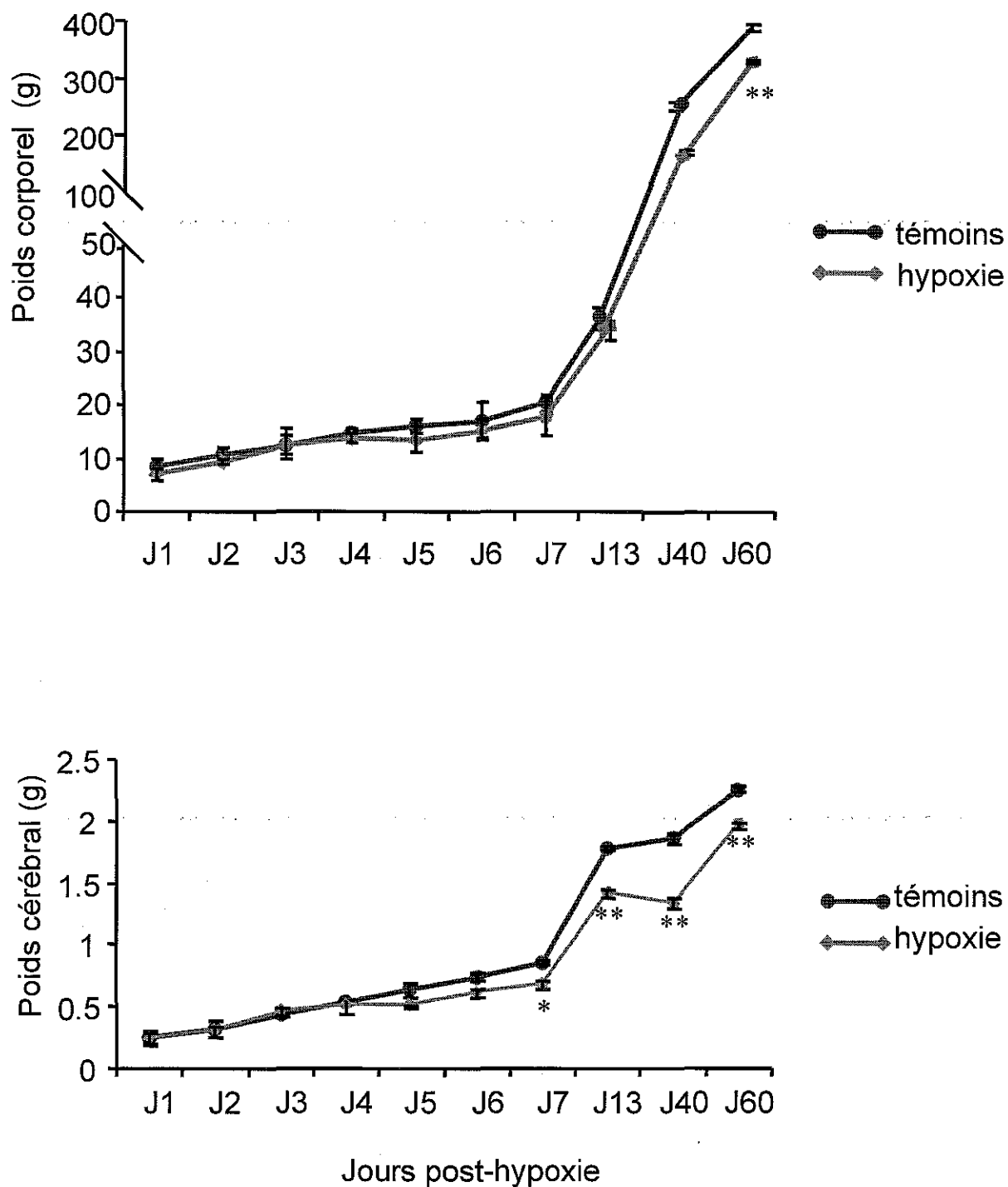


Figure 3 : Evolution des poids corporels et cérébraux des animaux témoins et hypoxiques.

Valeurs moyennes +/- DS obtenues à partir de 5 animaux minimum.

** : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, (Test de Student)*

4) MORPHOMETRIE

4.1) EPAISSEUR DE LA COUCHE DES CELLULES PYRAMIDALES DE L'HIPPOCAMPE

Au niveau de CA1, on constate une diminution de l'épaisseur de la couche des cellules pyramidales qui débute à partir de 4 jours post-hypoxie (-20,6%) et s'accroît jusqu'à 6 jours (-24,6%). L'épaisseur de cette couche cellulaire reste significativement inférieure à celle des témoins jusqu'à 13 jours, alors qu'aucune différence n'est plus observée chez l'adulte (fig 4).

Le profil de perte cellulaire est similaire au niveau de CA3, et du Subiculum, avec un déficit de cellules qui devient significatif à partir de 4 jours et maximale vers 6-7 jours post-hypoxie.

4.2) DENSITE CELLULAIRE AU NIVEAU DE L'HIPPOCAMPE ET DU CORTEX

L'hypoxie provoque, au niveau de CA1, une diminution de la densité cellulaire à partir du 3^{ème} jour post-hypoxie (-9%) avec un maximum atteint vers 5 jours post-hypoxie (-20,2%). La diminution de la densité s'amoindrit ensuite jusqu'à 13 jours; aucune différence significative n'étant observée entre les hypoxiques et les témoins chez l'adulte (planche 3).

Au niveau de CA3, on constate le même profil de diminution de la densité cellulaire.

La perte de densité cellulaire au niveau du Subiculum est retardée de 1 jour par rapport à la zone CA1 et CA3, mais le minimum de densité cellulaire s'observe toujours vers 6 jours post-hypoxie (fig 5).

Au niveau du cortex, la diminution de la densité n'apparaît qu'à partir du 4^{ème} jour et s'accroît progressivement pour culminer à 13 jours post-hypoxie (-16,5%).

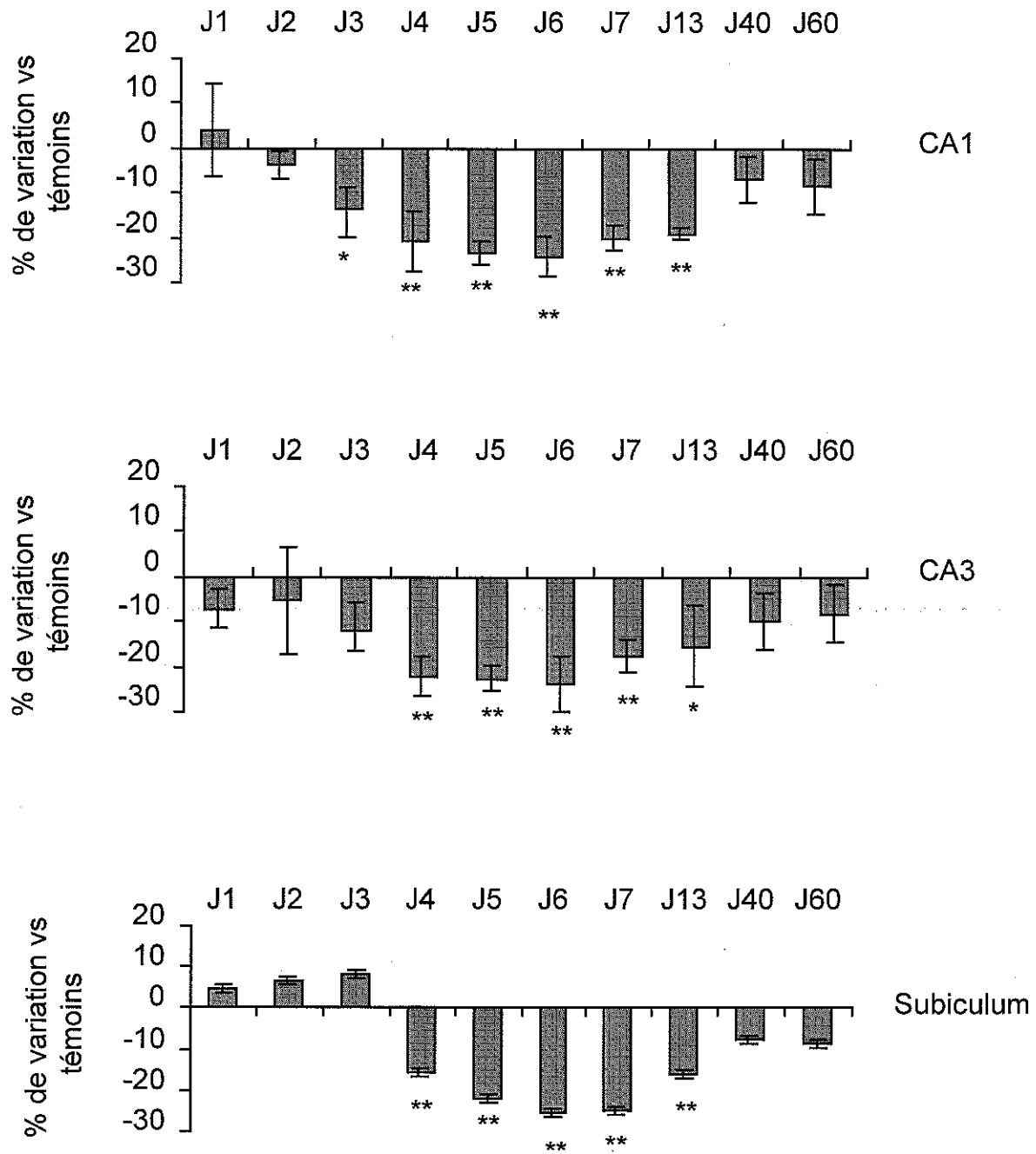
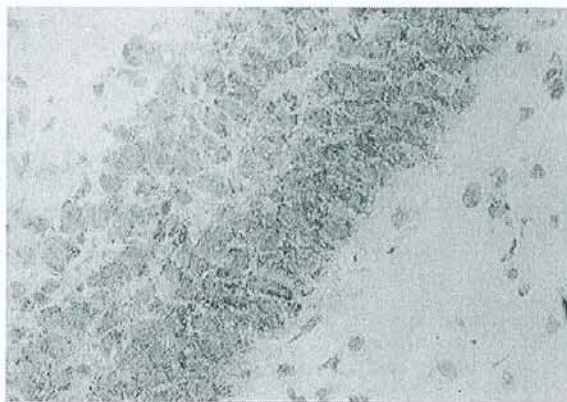


Figure 4 : Epaisseur de la couche des cellules pyramidales de l'hippocampe après une hypoxie de 20 min sur des rats de 1 jour.

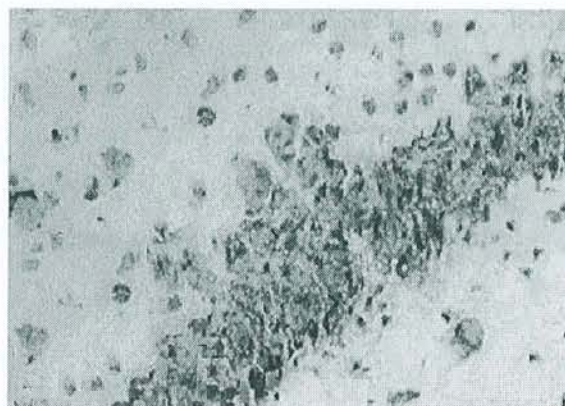
Valeurs moyennes $\pm$ DS obtenues à partir de 5 animaux minimum.

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, (Test de Student)



Témoin-6j

CA1

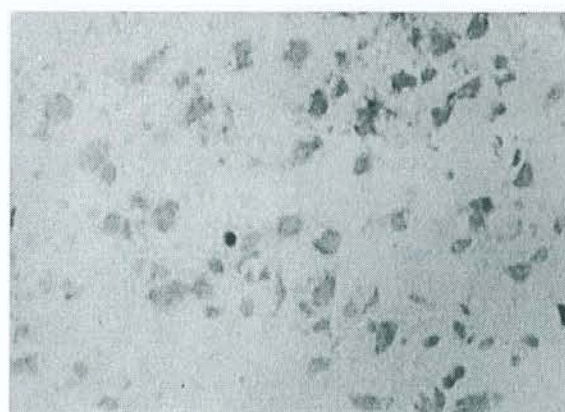


Hypoxie-6j



Témoin-6j

Cortex



Hypoxie-6j

Planche 3 : Coupes cérébrales de l'hippocampe et du cortex, 6 jours après l'épisode hypoxique.

Les coupes sont colorées à la thionine et examinées à l'objectif 40X.

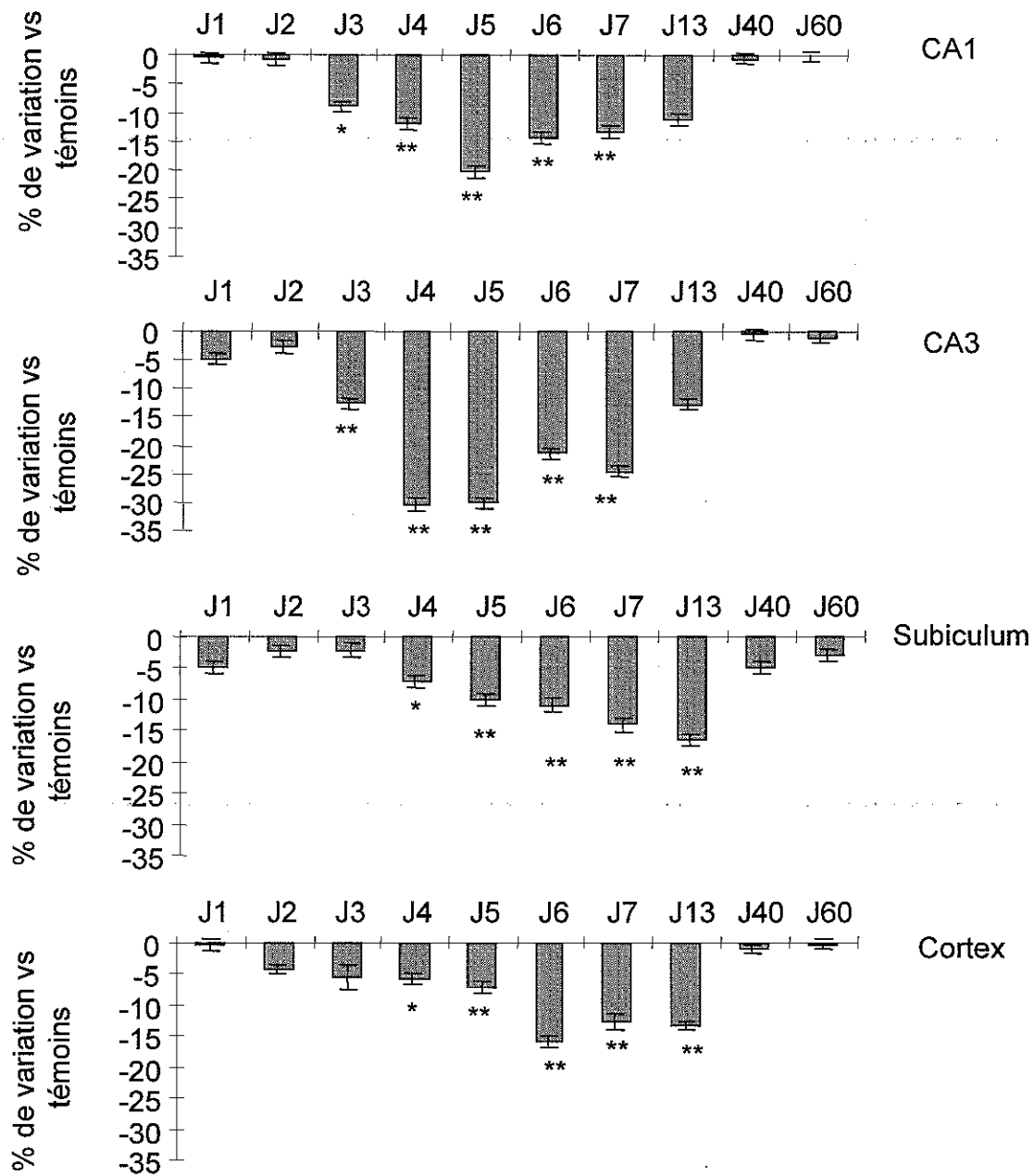


Figure 5 : Densité cellulaire au niveau de l'hippocampe et du cortex après une hypoxie de 20 min sur des rats de 1 jour.

Valeurs moyennes $\pm$ DS obtenues à partir de 5 animaux minimum.

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, (Test de Student)

5) COMPTAGES CELLULAIRES

Une diminution du nombre de cellules est observée au niveau de CA1 à partir du 3^{ème} jour avec une diminution maximale atteinte à 6 jours post-hypoxie (-27,1%). La diminution reste significative (-18,5%) par rapport aux témoins à 13 jours post-hypoxie (fig 6). Le profil est identique au niveau de CA3.

Le Subiculum présente un profil décalé de 1 jour, avec toujours une perte maximale à 6 jours (-35%). L'hypoxie provoque au niveau du cortex une diminution du nombre de cellules à partir du 4^{ème} jour pour atteindre un maximum à 6 jours post-hypoxie (-22,9%).

Aucune différence significative n'apparaît entre les témoins et les animaux hypoxiques adultes.

6) CARACTERISTIQUES DE LA MORT CELLULAIRE

6.1) DAPI

Les témoins présentent pendant les 3 premiers jours de vie des taux de nécrose de l'ordre de 4% et des taux d'apoptose de l'ordre de 5%, toutes zones confondues. Ces valeurs diminuent par la suite (fig 7).

L'hypoxie provoque, au niveau de CA1, une augmentation du nombre de cellules nécrotiques dès 3 jours post-hypoxie (5% vs 2,3% pour les témoins). A partir du 4^{ème} jour, le taux de cellules apoptotiques augmente (5,2% vs 2,5%). Le pic de mort par apoptose est atteint à 7 jours post-hypoxie (13,3% vs 2,3%). Après 13 jours, il n'apparaît plus de trace de cellules apoptotiques alors que persiste de la nécrose.

Le profil est similaire au niveau de CA3.

Lorsque l'on s'intéresse au cortex et au Subiculum, on constate une augmentation du taux de nécrose et d'apoptose qui débute en même temps à 4 jours post-hypoxie. L'apoptose est maximale après 6 jours et comparable aux témoins à 13 jours post-hypoxie alors que les taux de nécrose restent significativement plus élevés que chez les témoins (planche 4).

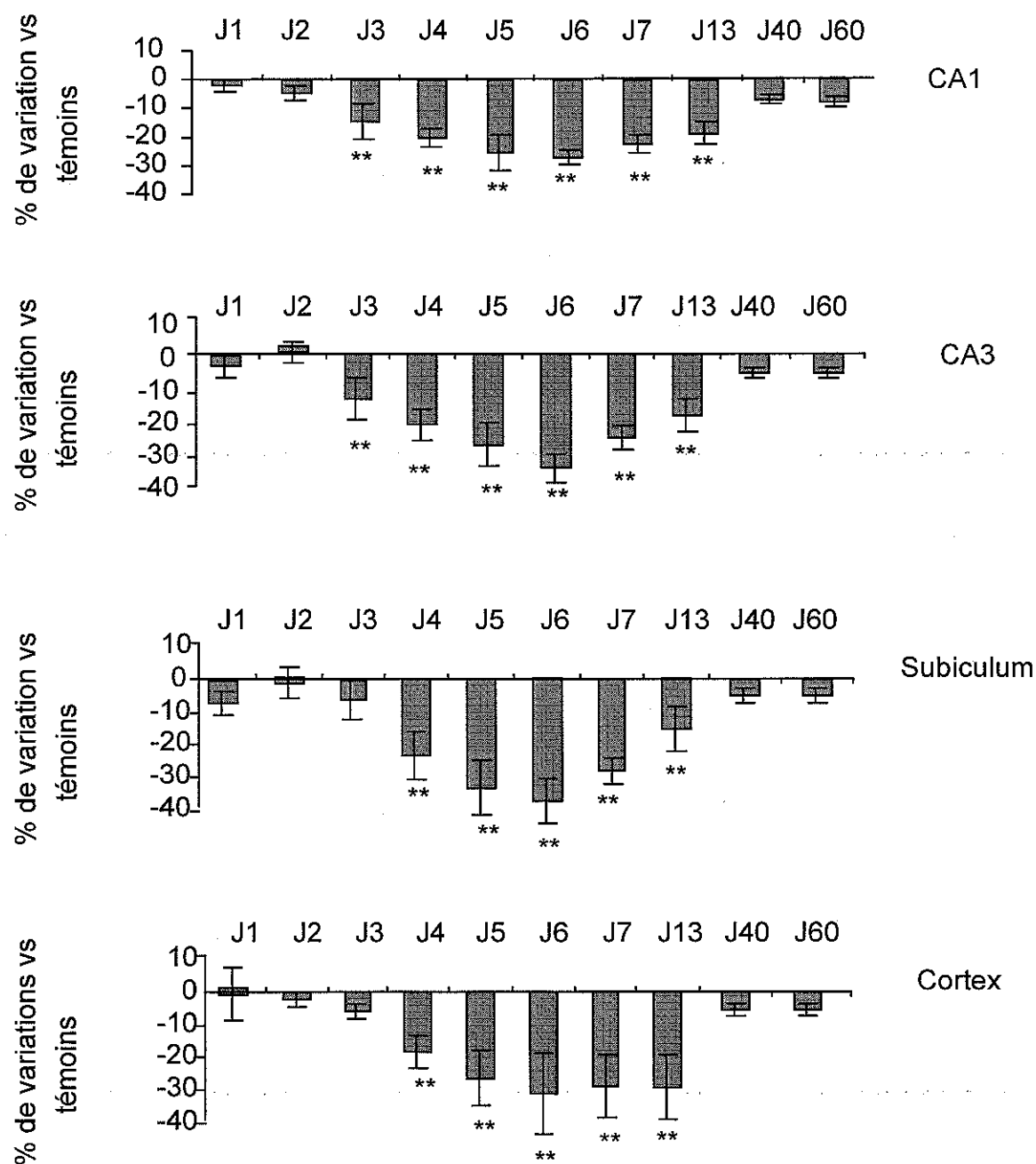


Figure 6 : Comptage cellulaire au niveau de l'hippocampe et du cortex, après une hypoxie de 20 min sur des rats de 1 jour.

Valeurs moyennes $\pm$ DS obtenues à partir de 5 animaux minimum.

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, (Test de Student)

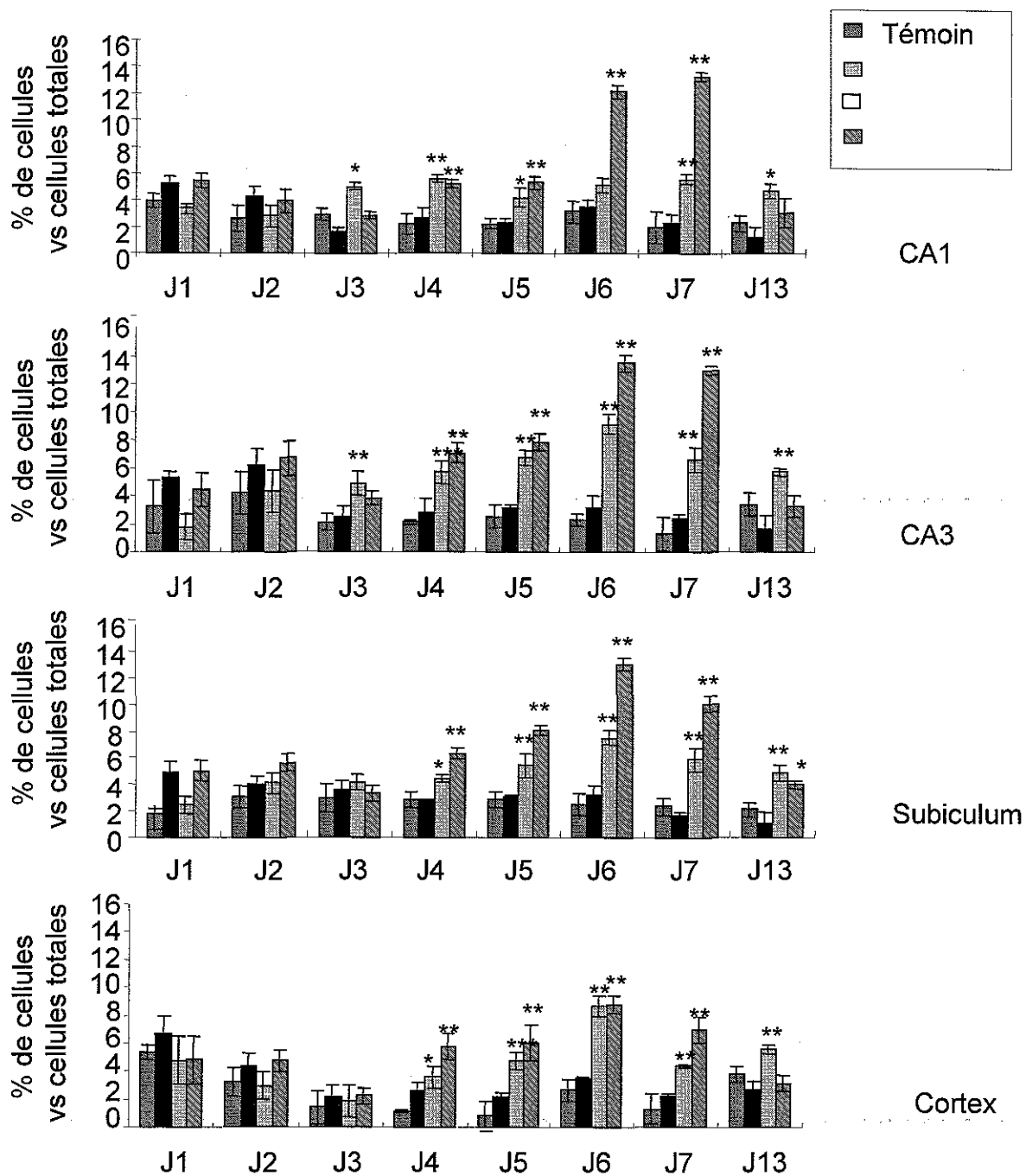


Figure 7 : Evaluation des taux de nécrose et d'apoptose au niveau de l'hippocampe, du subiculum et du cortex après une hypoxie de 20 min sur des rats de 1 jour.

Valeurs moyennes $\pm$ DS obtenues à partir de 5 animaux minimum.

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, (Test de Student)

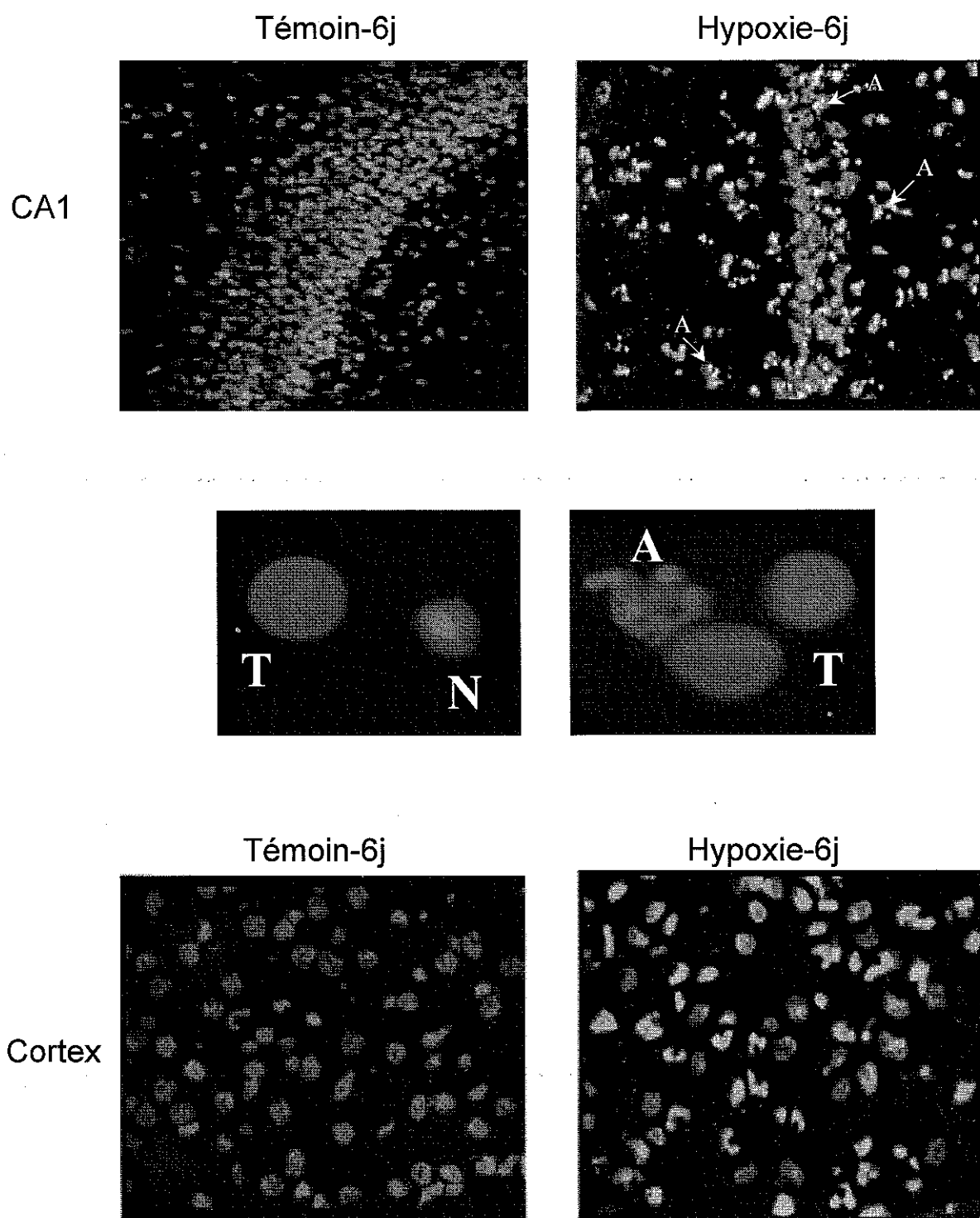


Planche 4 : Caractéristiques de la mort cellulaire, après marquage des coupes au DAPI
T : témoin, N : nécrose, A : apoptose

6.2) TUNEL

Aucun marquage au TUNEL n'est détectable chez les animaux hypoxiques, ni chez les animaux témoins dans les premiers jours de vie.

6.3) FRAGMENTATION D'ADN SUR GEL D'AGAROSE

On observe une fragmentation d'ADN, qui n'est pas en échelle mais qui correspond à des fragments de l'ordre de 200pb, au niveau de l'hippocampe et du cortex aussi bien chez les témoins que chez les hypoxiques pendant les 3 jours suivant le traitement. Par la suite, on ne retrouve plus de fragmentation chez les témoins (fig 8).

L'hypoxie engendre une fragmentation d'ADN, observée après 5 jours post-hypoxie aussi bien dans le cortex et l'hippocampe. La fragmentation persiste jusqu'à 6 jours mais n'apparaît plus à 13 jours post-hypoxie.

7) ACTIVITE DE LA CYTOCHROME OXYDASE (CO)

Après 3 jours, aucune différence de l'activité enzymatique de la cytochrome oxydase n'est mise en évidence entre les témoins et les hypoxiques au niveau de l'hippocampe, alors qu'elle est diminuée par rapport aux témoins au niveau du cortex (-9%).

A partir de 6 jours post-hypoxie, on constate une augmentation significative de l'activité enzymatique de la CO par rapport aux témoins dans les 3 structures (fig 9), laquelle persiste jusqu'à 13 jours post-hypoxie.

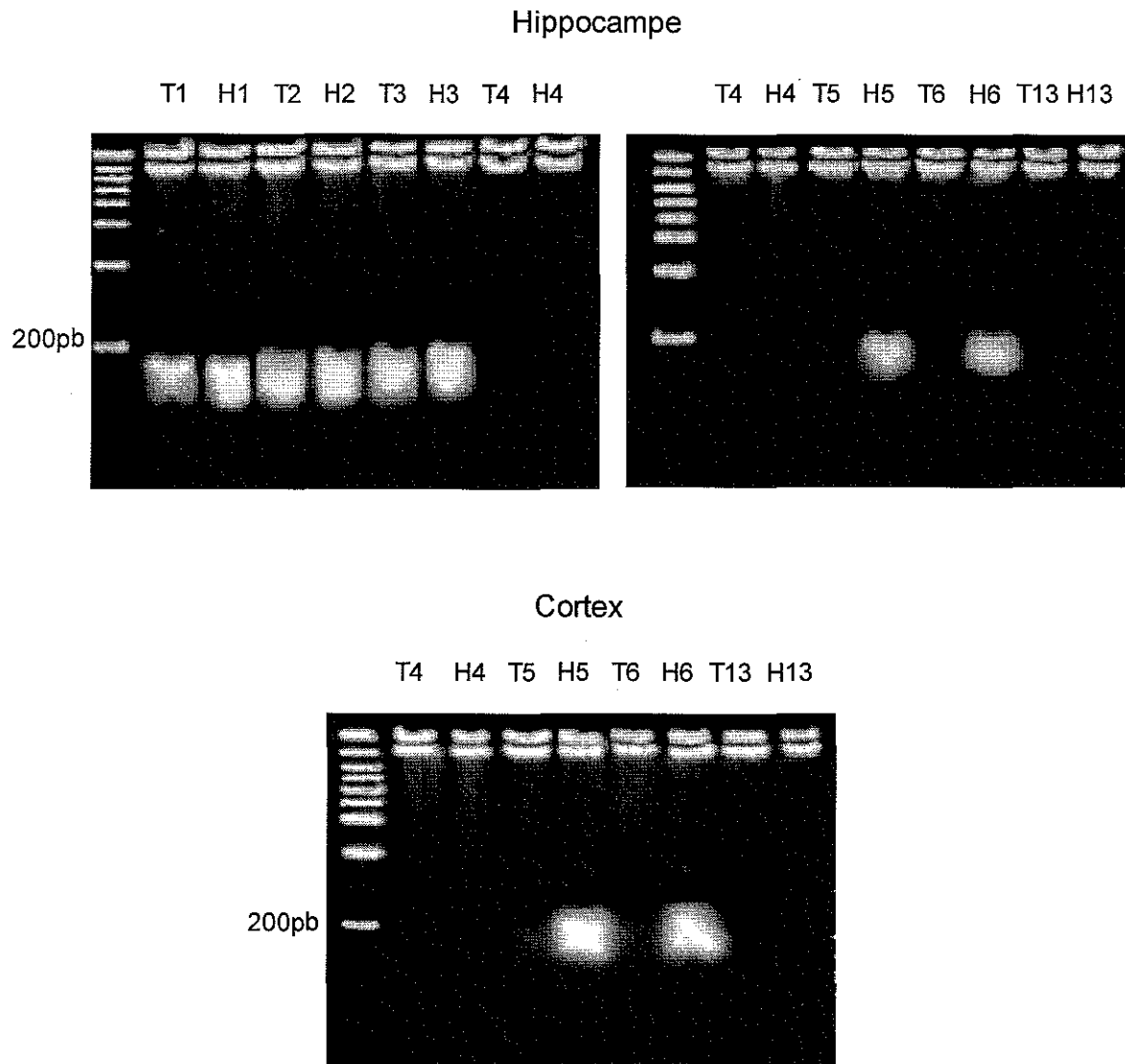


Figure 8 : Fragmentation d 'ADN par électrophorèse sur gel d 'agarose de l 'hippocampe et du cortex après une hypoxie de 20 min sur des ratons de 1 jour.

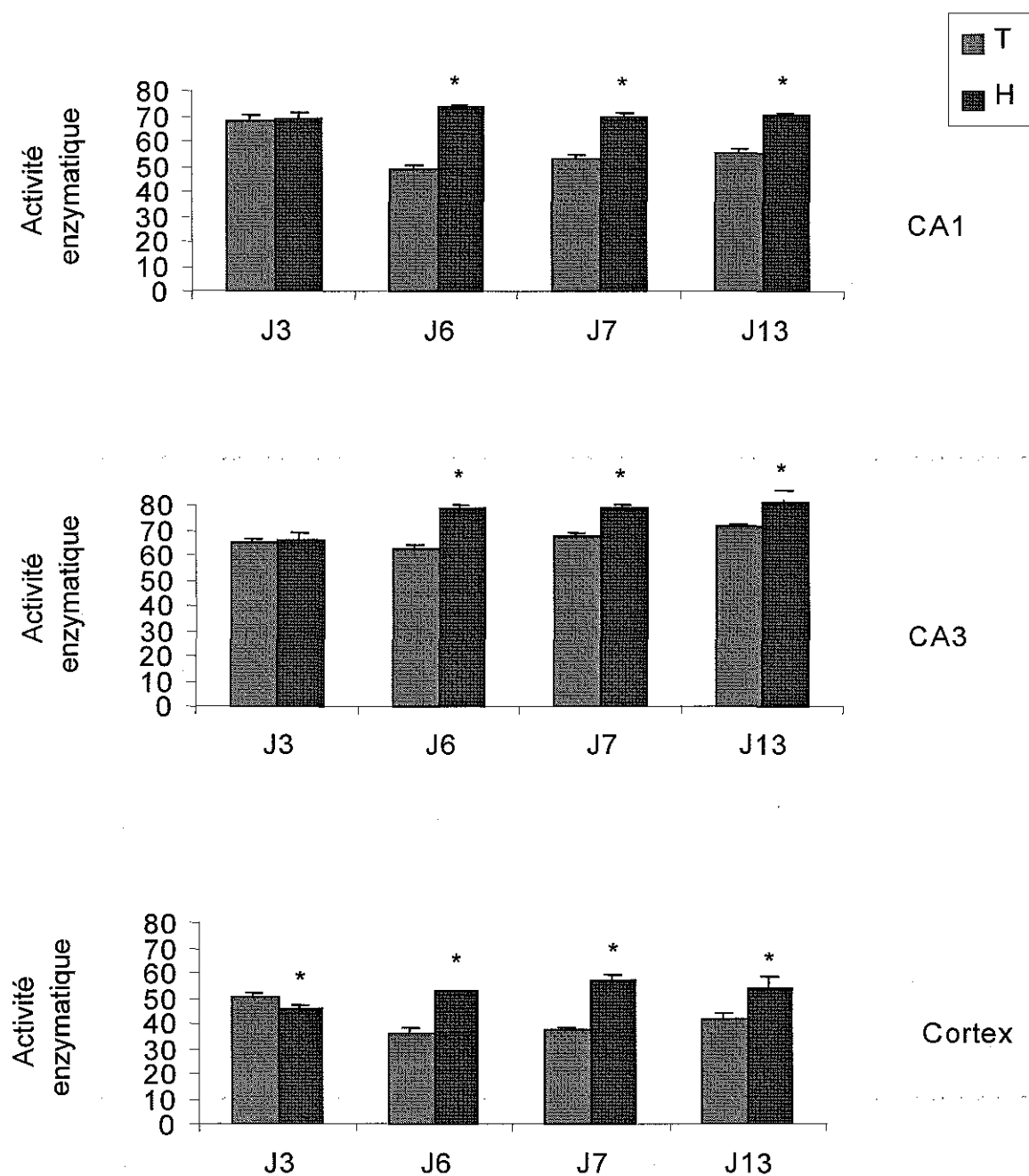


Figure 9: Evaluation de l'activité de la cytochrome oxidase après une hypoxie de 20 min sur des rats de 1 jour.
 Valeurs moyennes $\pm$ DS obtenues à partir de 5 animaux minimum.
 * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, (Test de Student)

8) *EXPRESSION DE PROTEINES SPECIFIQUES*

La protéine Bcl-2 est uniquement surexprimée à 3 jours post-hypoxie avec +108%, son expression devient par la suite inférieure à celle des témoins (avec -37% à 13 jours post-hypoxie).

Le profil d'expression de la protéine Bax est inversé, la protéine étant surexprimée à partir de 6 jours pour atteindre +78% après 13 jours (fig 10).

La protéine CPP32 (caspase 3) présente une expression fortement augmentée à 3 et 6 jours (+110%) qui se stabilise par rapport aux témoins à 13 jours post-hypoxie.

L'hypoxie engendre une augmentation de l'expression de la protéine p53 à 3 jours post-hypoxie (+97%) qui s'atténue par la suite pour être réprimée par rapport aux témoins à 13 jours.

L'expression de la protéine HSP105 est supérieure chez les hypoxiques à 3 jours post-hypoxie et diminue ensuite, pour atteindre à 13 jours -22% par rapport aux témoins.

9) *IRM*

Les valeurs d'ADC des animaux hypoxiques sont globalement diminuées de 25% par rapport aux témoins, au 3ème jour post-hypoxie (planche 5 ; fig 11).

Après 6 jours, les valeurs d'ADC sont inférieures à celles des témoins de l'ordre de 20% et ce quelle que soit la zone étudiée. Il convient de préciser que les témoins à 6 jours présentent des valeurs d'ADC inférieures de 21% par rapport aux témoins à 3 jours.

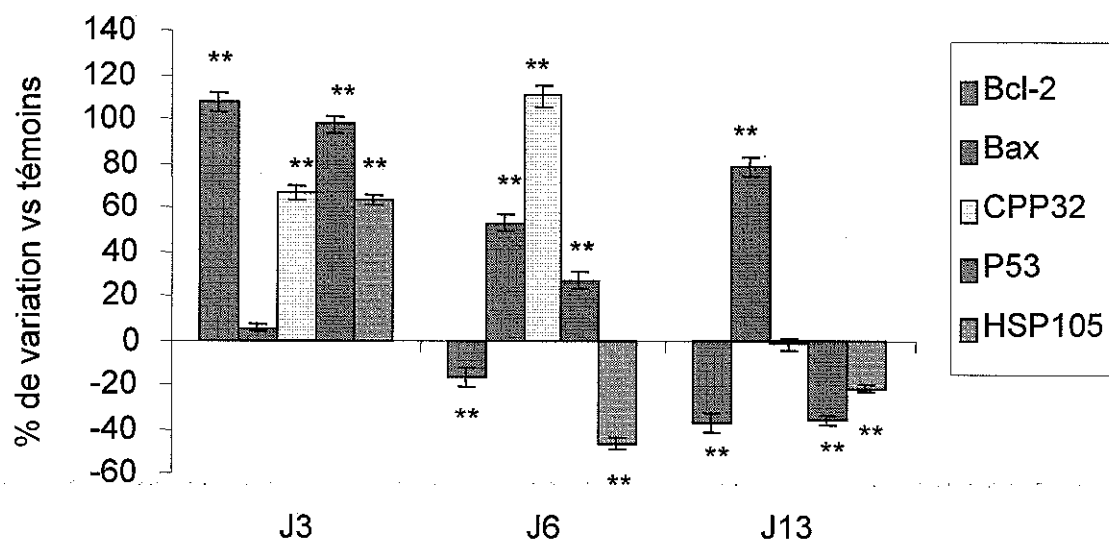
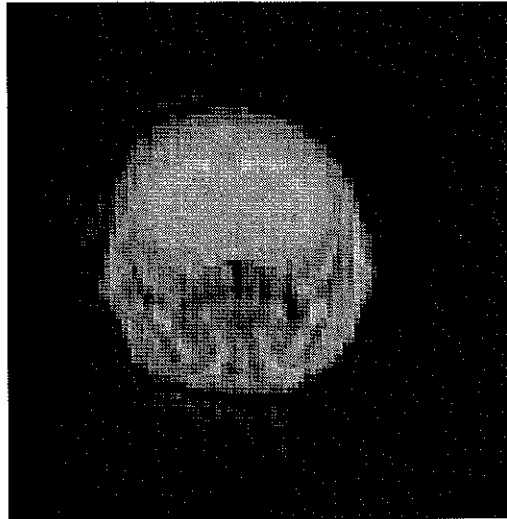


Figure 10 : Expression de diverses protéines par immunofluorescence au niveau de l'hippocampe, après une hypoxie de 20 min sur des rats de 1 jour.

Valeurs moyennes +/- DS obtenues à partir de 5 animaux minimum.

** : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, (Test de Student)*



T2

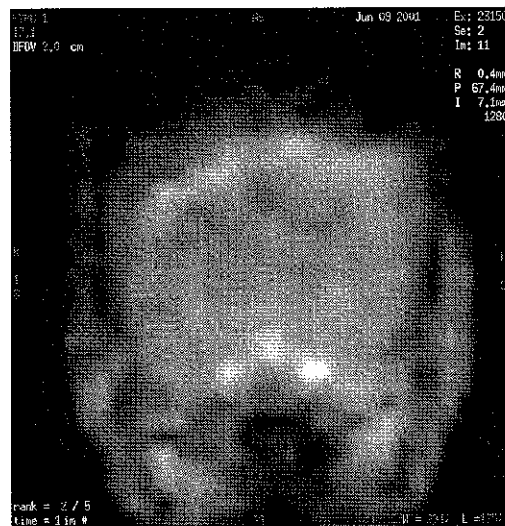
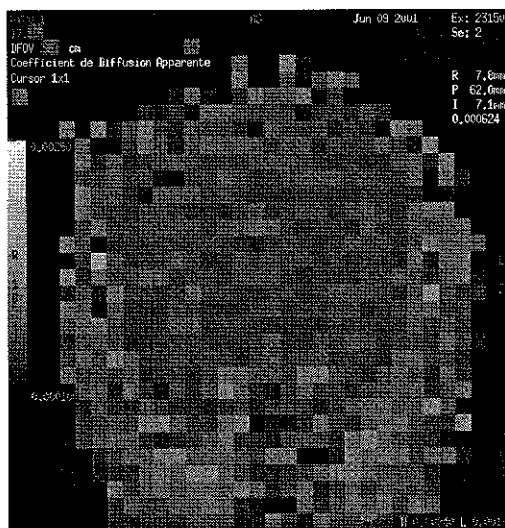


Image brute de diffusion



Séquence pour la mesure de l'ADC

Planche 5 : Illustration des séquences d'IRM

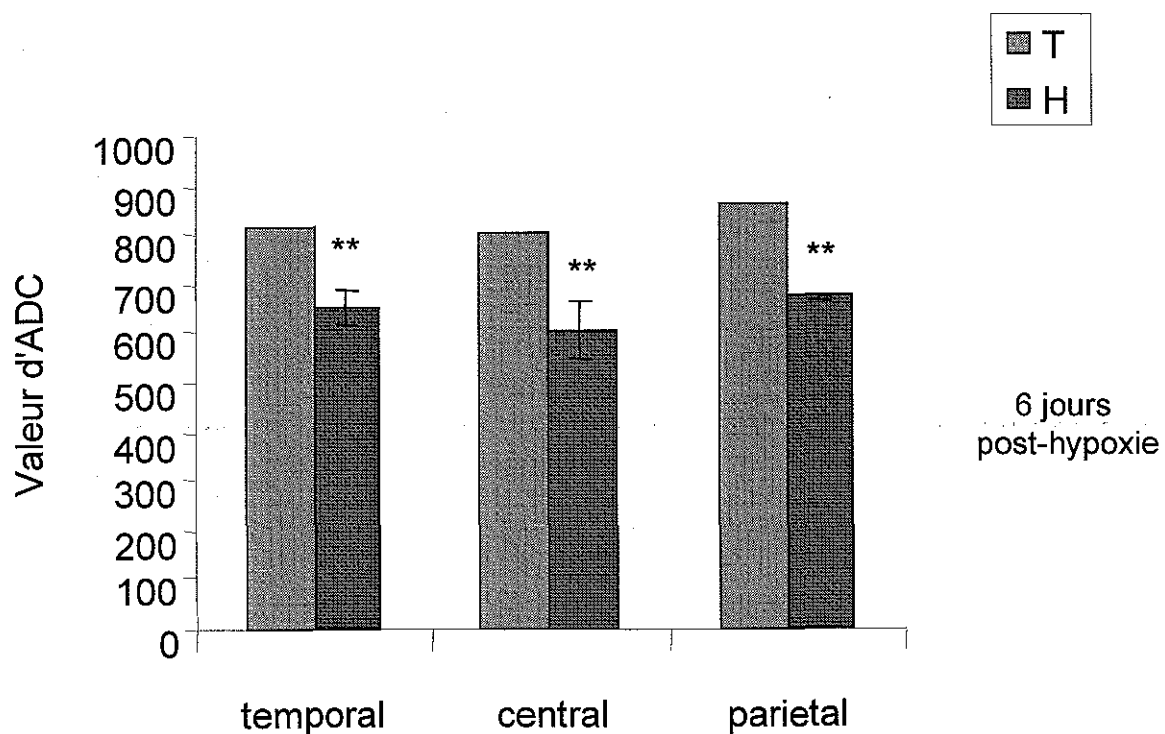
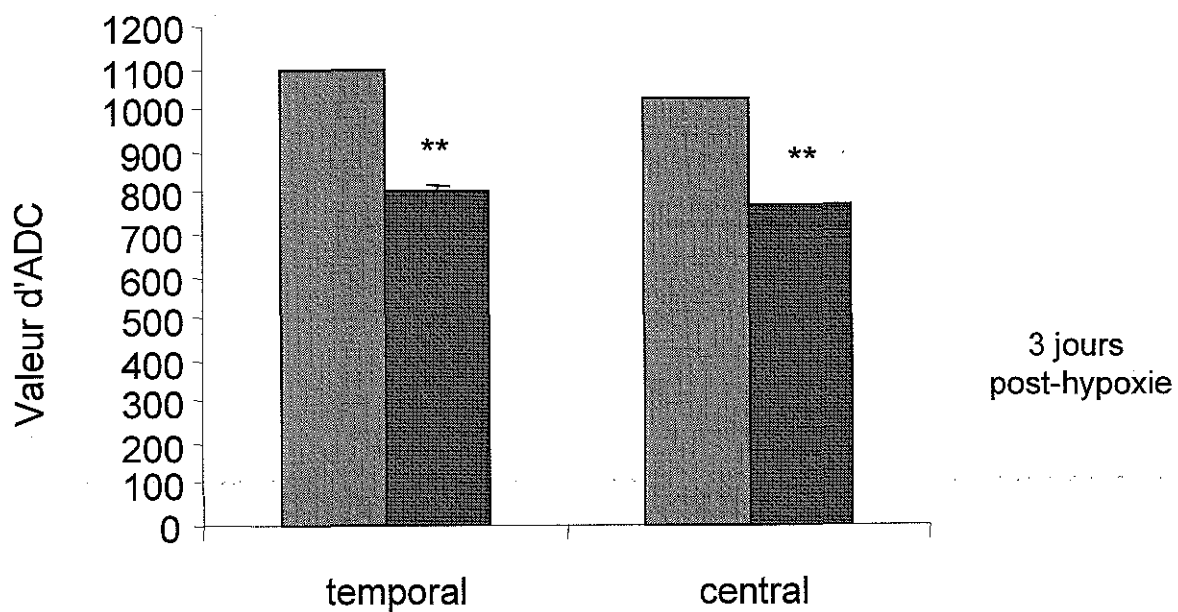


Fig 11 : Etude fonctionnelle des conséquences d'une hypoxie de 20 min sur des rats de 1 jour, par l'IRM de diffusion.

Valeurs moyennes +/- DS obtenues à partir de 3 animaux minimum.

** : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, (Test de Student)*

B) MODELES DE TOLERANCE A L'HYPOXIE

1) CONDITIONNEMENT

1.1) EVOLUTION DES POIDS CORPORELS

ET CEREBRAUX

Le développement corporel et cérébral des animaux témoins conditionnés est similaire à celui des témoins normoxiques (fig 12).

Le conditionnement a permis de conserver les poids cérébraux des animaux hypoxiques comparables aux témoins, contrairement à la perte de poids occasionnée par l'hypoxie seule.

1.2) MORPHOMETRIE : Mesure de la densité cellulaire au niveau de l'hippocampe et du cortex

Le conditionnement a permis aux animaux hypoxiques de conserver une densité cellulaire comparable aux animaux témoins, aussi bien au niveau de l'hippocampe que du cortex (fig 13).

1.3) COMPTAGES CELLULAIRES

Aucune perte cellulaire n'est observée chez les témoins conditionnés par rapport aux témoins non conditionnés (fig 14).

Le comptage cellulaire au niveau de l'hippocampe et du cortex n'a pas permis de mettre en évidence de différence entre les animaux témoins et hypoxiques conditionnés.

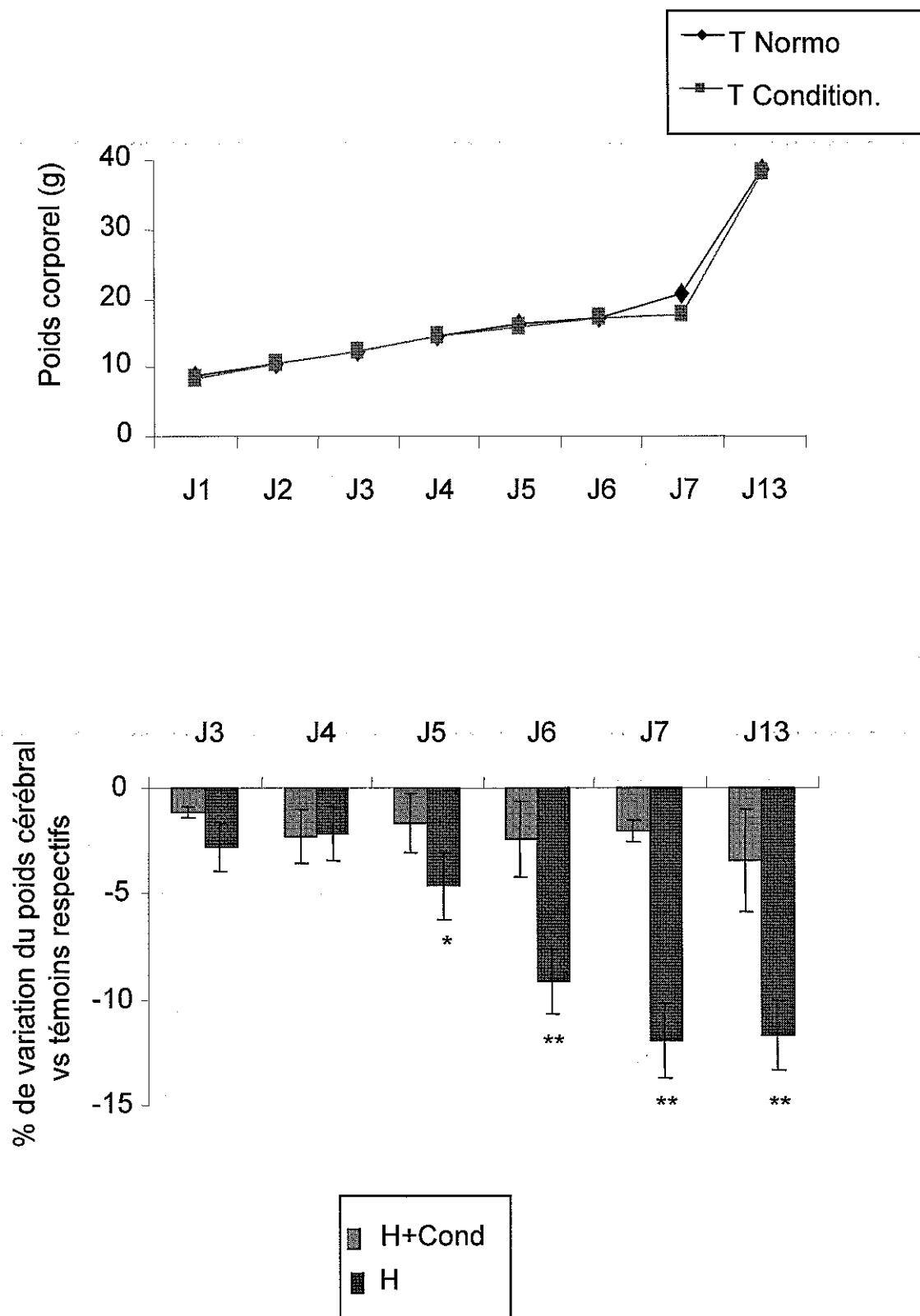


Figure 12 : Evolution des poids corporels et cérébraux des animaux après une hypoxie de 20 min précédée d'un conditionnement sur des rats de 1 jour.

Valeurs moyennes $\pm$ DS obtenues à partir de 5 animaux minimum.

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, (Test de Student)

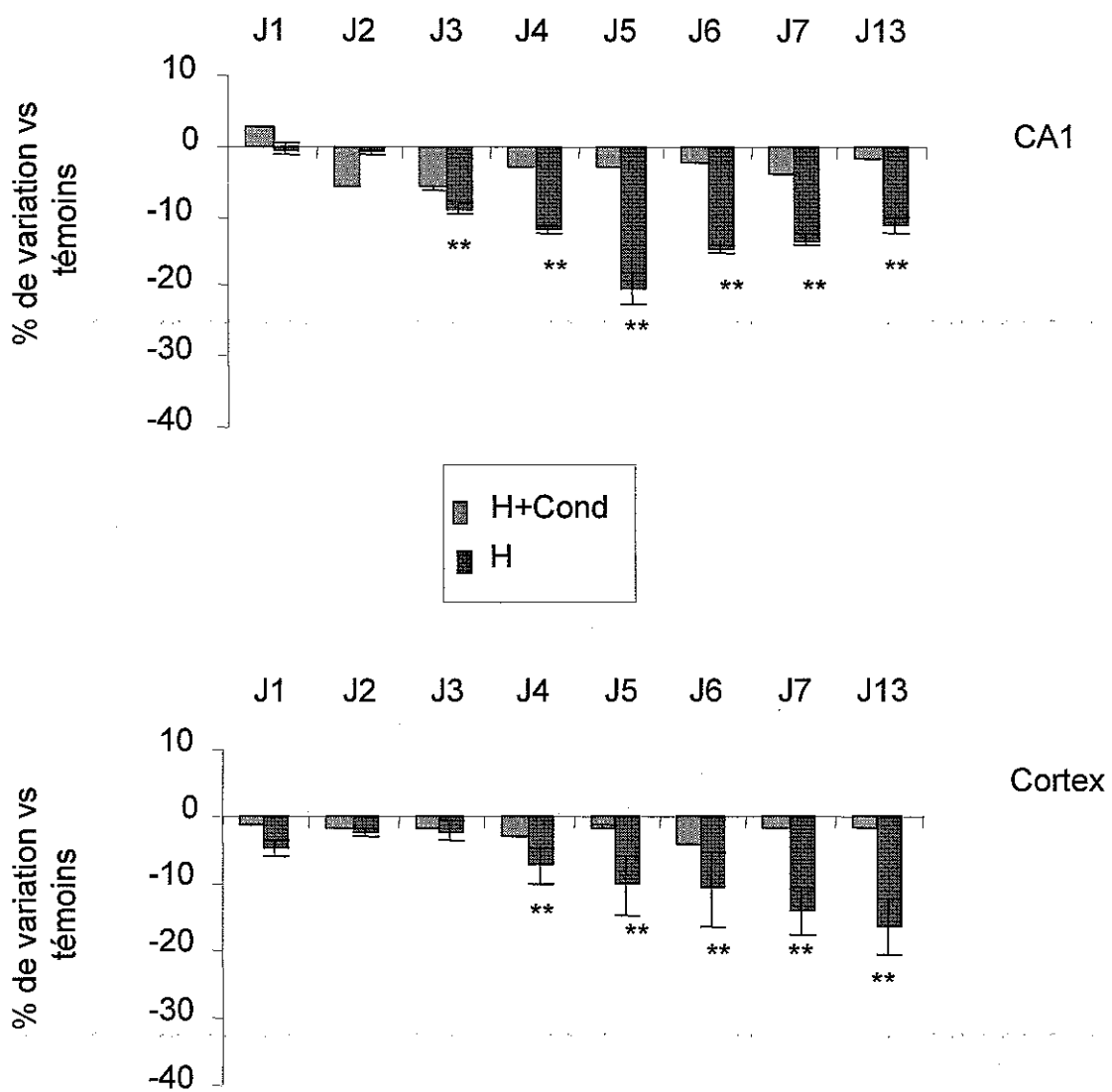


Figure 13: Densité cellulaire au niveau de l'hippocampe et du cortex après une hypoxie de 20 min précédée d'un conditionnement sur des rats de 1 jour.

Valeurs moyennes $\pm$ DS obtenues à partir de 5 animaux minimum.

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, (Test de Student)

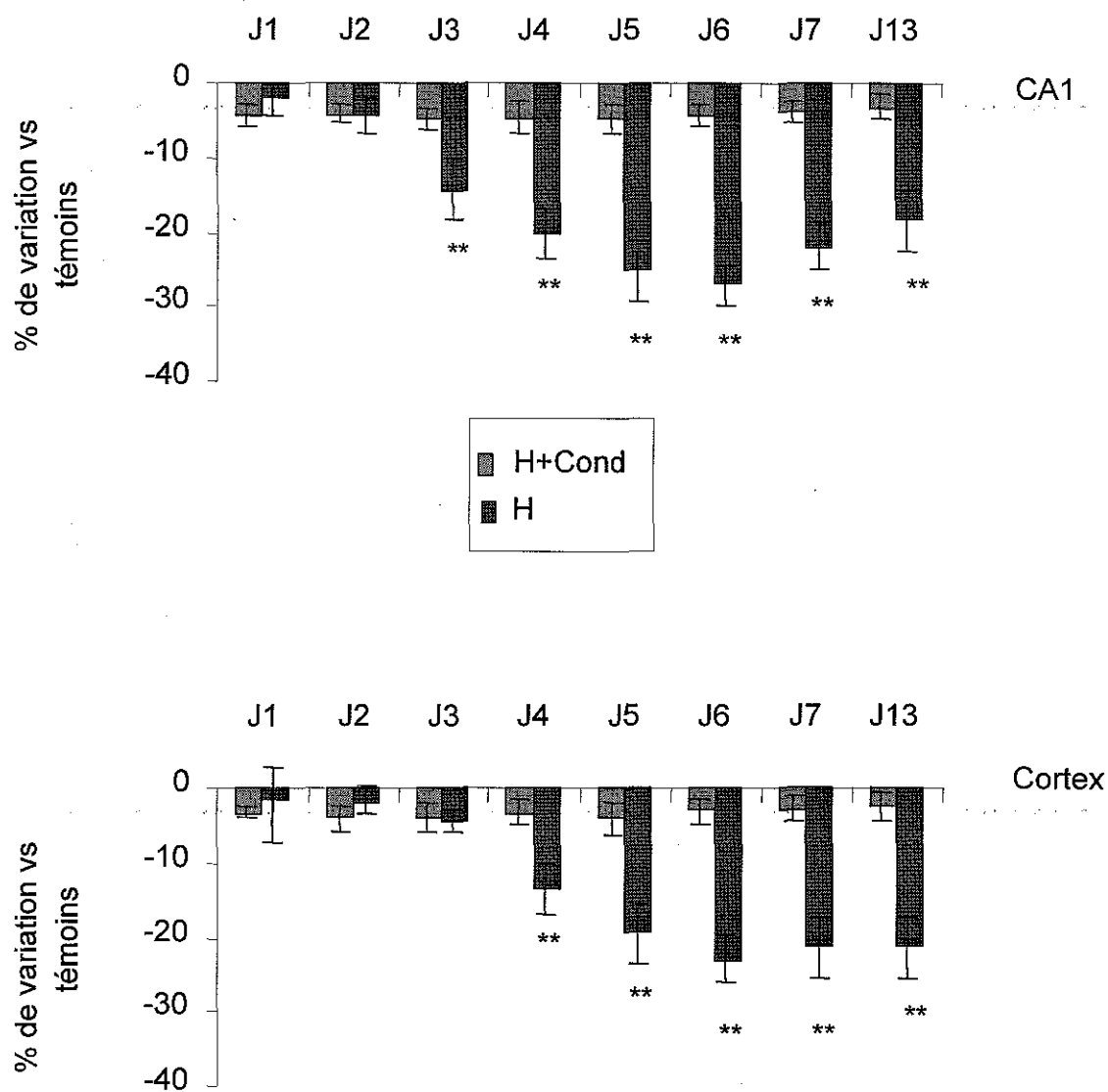


Figure 14 : Comptage cellulaire au niveau de l'hippocampe et du cortex après une hypoxie de 20 min précédée d'un conditionnement sur des rats de 1 jour.

Valeurs moyennes $\pm$ DS obtenues à partir de 5 animaux minimum.

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, (Test de Student)

1.4) CARACTERISTIQUES DE LA MORT CELLULAIRE

Les animaux hypoxiques conditionnés présentent un profil identique aux animaux témoins, avec une mort par apoptose durant les 3 premiers jours de vie et qui régresse par la suite (fig 15).

Les valeurs des taux de cellules nécrotiques sont comparables à celle des animaux témoins.

1.5) EXPRESSION DE PROTEINES SPECIFIQUES

L'expression de la protéine Bcl-2 chez les animaux conditionnés hypoxiques est progressivement augmentée par rapport aux témoins, à partir de 3 jours post-hypoxie (+53.8%) pour atteindre +139% à 13 jours (fig 16).

La protéine Bax est réprimée dès 3 jours (-20%), et jusqu'à 13 jours (-36,6%).

2) HYPOTHERMIE

2.1) EVOLUTION DES POIDS CORPORELS ET CEREBRAUX

L'hypothermie réalisée sur des animaux témoins n'a aucun effet significatif sur leur poids corporel.

Les animaux hypoxiques en hypothermie ont un poids cérébral inférieur de 5%, non significatif à celui des animaux témoins (fig 17).

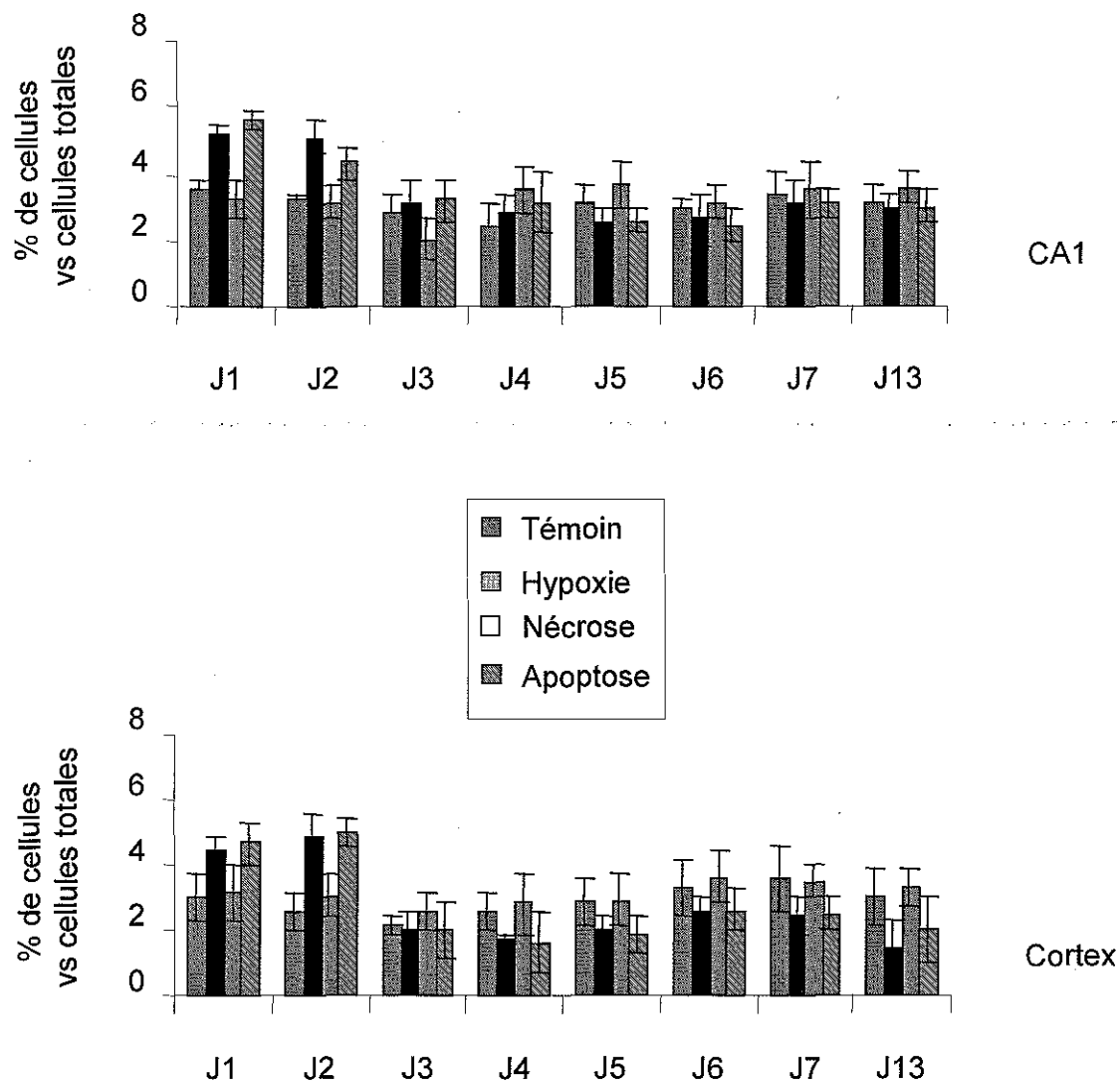


Figure 15 : Evaluation des taux de nécrose et d'apoptose au niveau de l'hippocampe et du cortex après une hypoxie de 20 min précédée d'un conditionnement sur des rats de 1 jour.

Valeurs moyennes $\pm$ DS obtenues à partir de 5 animaux minimum.

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, (Test de Student)

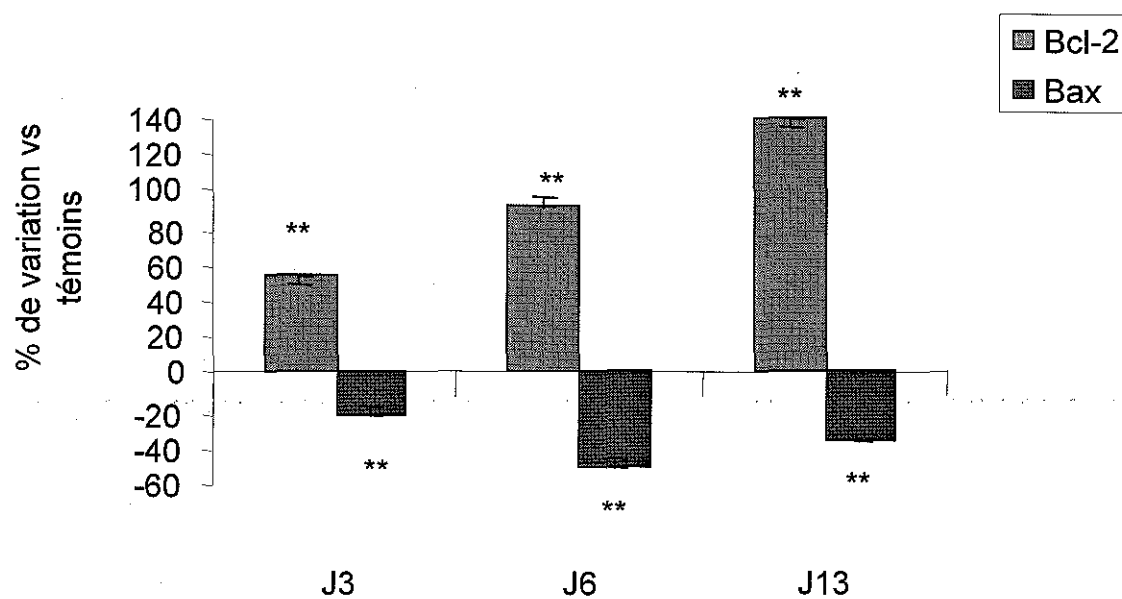
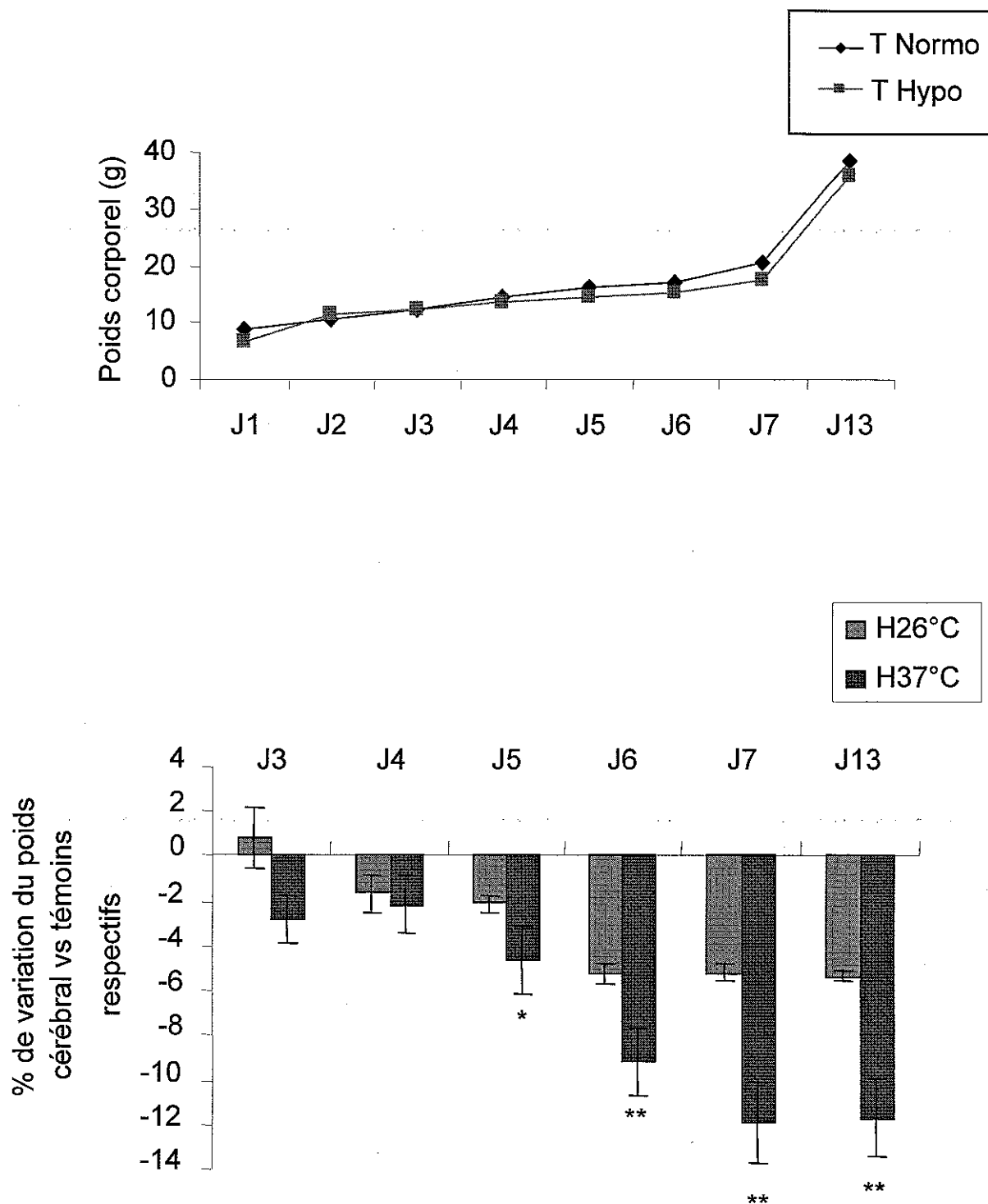


Figure 16 : Expression des protéines Bcl-2 et Bax par immunofluorescence au niveau de l'hippocampe, après une hypoxie de 20 min précédée d'un conditionnement sur des rats de 1 jour.

Valeurs moyennes +/- DS obtenues à partir de 5 animaux minimum.

** : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ (Test de Student)*



2.2) MORPHOMETRIE : Mesure de la densité cellulaire au niveau de l'hippocampe et du cortex

Aucune différence significative entre la densité cellulaire des animaux hypoxiques et témoins n'a pu être mise en évidence, que cela soit au niveau de l'hippocampe ou du cortex (fig 18). Il convient de préciser que les variations intra-groupes sont plus importantes que celle habituellement rencontrées.

2.3) COMPTAGES CELLULAIRES

Le comptage cellulaire n'a pas montré de différence, entre les témoins et les animaux hypoxiques, dans le nombre de cellules au niveau du cortex ou de l'hippocampe (fig 19).

2.4) CARACTERISTIQUES DE LA MORT CELLULAIRE

On observe une apoptose physiologique durant les 3 premiers jours de vie aussi bien chez les animaux témoins que chez les hypoxiques. Ce type de mort cellulaire régresse par la suite pour atteindre des valeurs de 3-4% (fig 20).

Les taux de cellules nécrotiques sont du même ordre de grandeur. Aucune différence dans ce profil n'est mise en évidence entre les différentes structures étudiées.

2.5) EXPRESSION DE PROTEINES SPECIFIQUES

Les valeurs de base de l'expression des protéines Bax ou Bcl-2 des animaux témoins hypothermiques ne peuvent être comparée à celles des animaux témoins normoxiques car les expériences à 26°C ont requis des concentrations d'anticorps primaire plus élevées en raison d'une fluorescence à peine détectable avec les concentrations utilisées habituellement. Le profil d'expression des protéines Bax et Bcl-2 des animaux hypoxiques est comparable à celle des animaux témoins (fig 21).

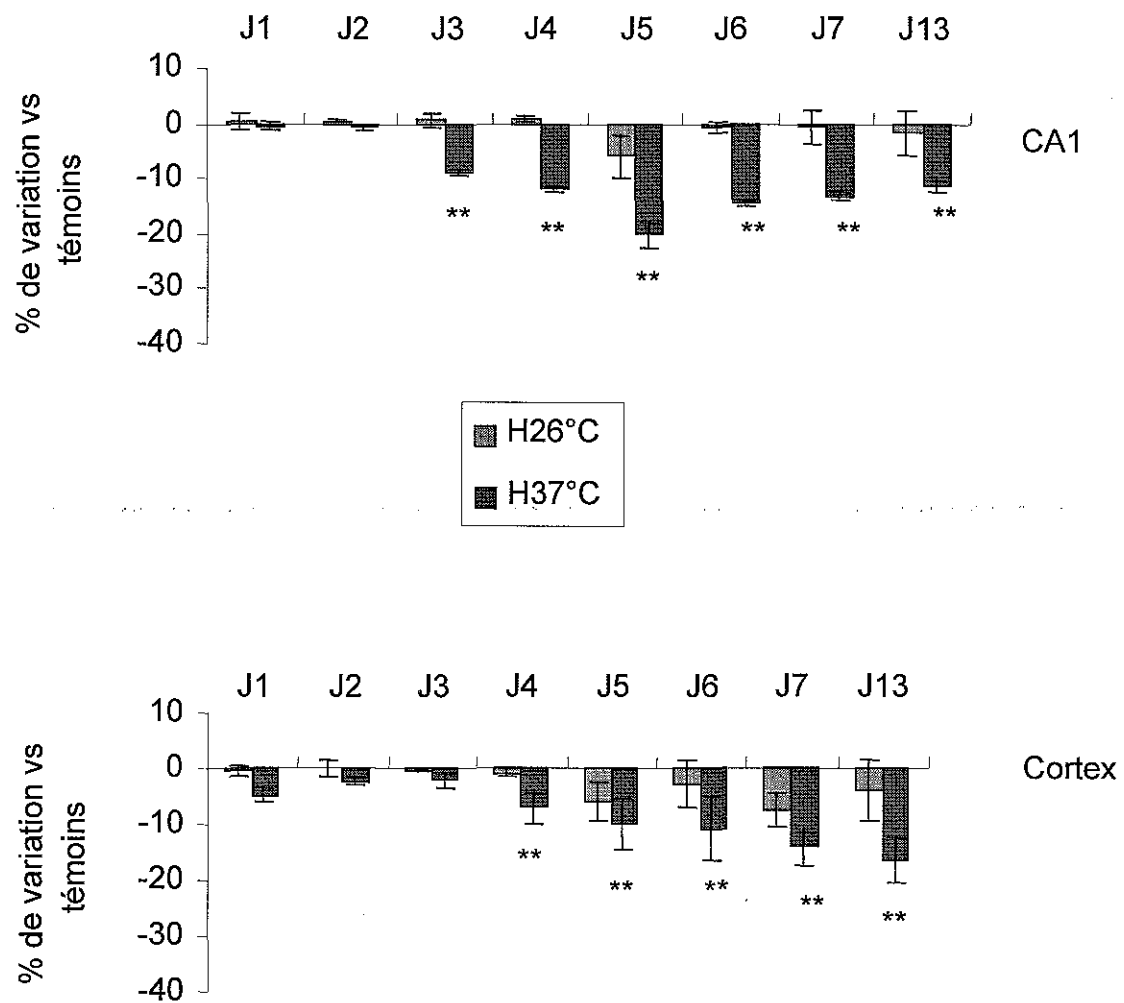


Figure 18 : Densité cellulaire au niveau de l'hippocampe et du cortex après une hypoxie de 20 min en hypothermie sur des rats de 1 jour.

Valeurs moyennes $\pm$ DS obtenues à partir de 5 animaux minimum.

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, (Test de Student)

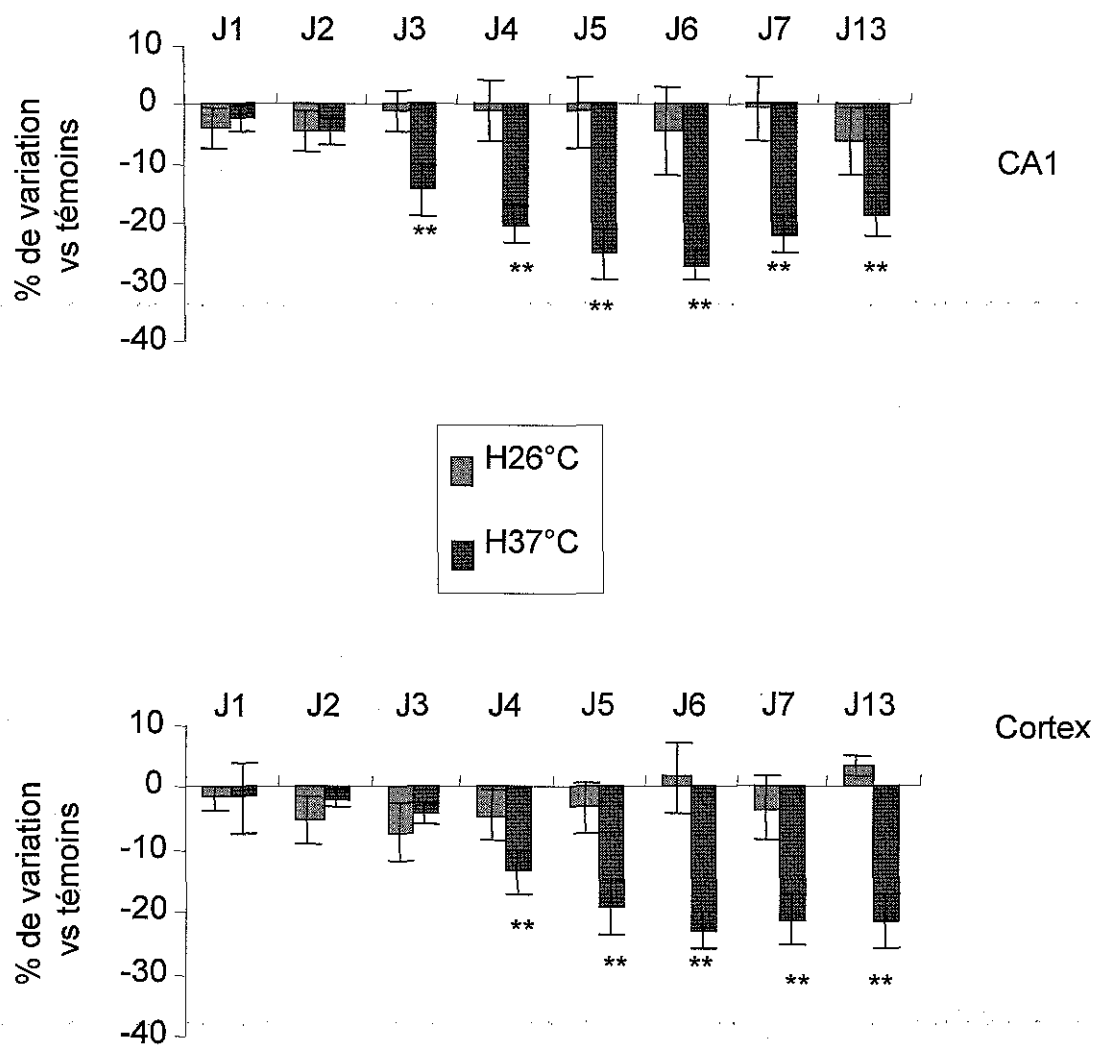


Figure 19 : Comptage cellulaire au niveau de l'hippocampe et du cortex après une hypoxie de 20 min précédée d'un conditionnement sur des rats de 1 jour.
Valeurs moyennes +/- DS obtenues à partir de 5 animaux minimum.
 * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, (Test de Student)

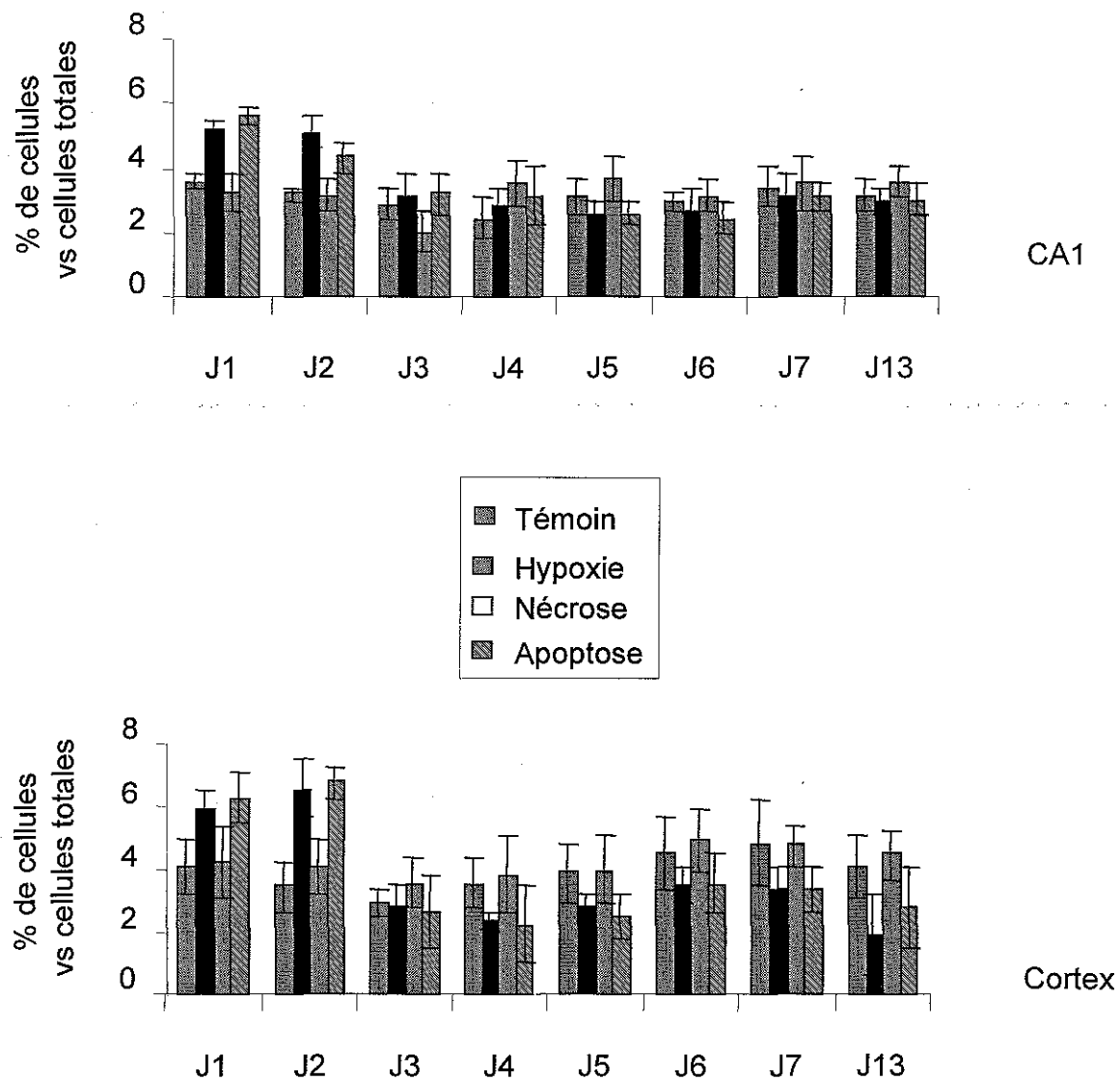


Figure 20 : Evaluation des taux de nécrose et d'apoptose au niveau de l'hippocampe et du cortex après une hypoxie de 20 min en hypothermie sur des rats de 1 jour.

Valeurs moyennes $\pm$ DS obtenues à partir de 5 animaux minimum.

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, (Test de Student)

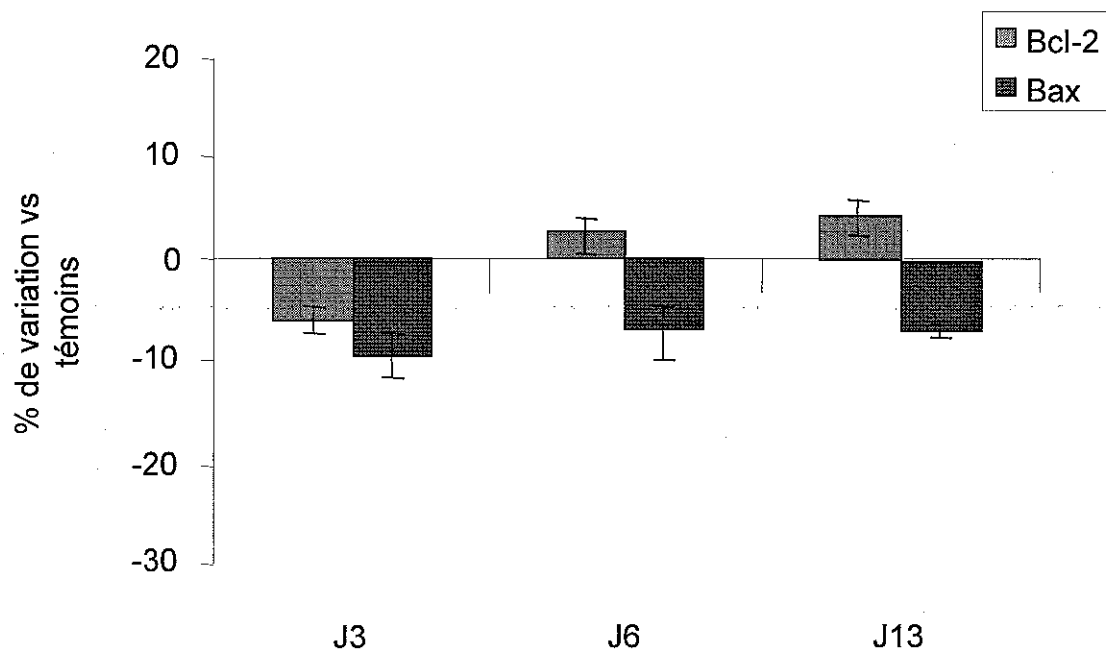


Figure 21 : Expression des protéines Bcl-2 et Bax par immunofluorescence au niveau de l'hippocampe, après une hypoxie de 20 min en hypothermie sur des rats de 1 jour.

Valeurs moyennes $\pm$ DS obtenues à partir de 5 animaux minimum.

* : $p < 0.05$, (Test de Student)

3) TRAITEMENT PAR LE MK801

3.1) EVOLUTION DES POIDS CORPORELS ET CEREBRAUX

Un essai thérapeutique utilisant 10mg/kg ayant provoqué une trop forte mortalité des rats nous a contraint à utiliser une dose plus faible de 5mg/kg. Les animaux témoins, traités par Mk801, présentent un défaut de leur poids corporel dès le 2^{ème} jour post-traitement. De ce fait, lorsque l'on rapporte les poids corporel ou cérébral des animaux hypoxiques à ceux des animaux témoins, on ne met en évidence aucune différence (fig 22).

Compte tenu de l'effet du M801 sur les témoins, les résultats suivants seront exprimés en pourcentage de variation par rapport aux témoins non traités par MK801. Bien que non décrit dans les expériences suivantes, aucune lésion cellulaire n'a pu être mise en évidence chez les témoins traités par MK801.

3.2) MORPHOMETRIE : Mesure de la densité cellulaire au niveau de l'hippocampe et du cortex

Une diminution de la densité cellulaire est observée dès le 5^{ème} ou 6^{ème} jour post-hypoxie selon la région étudiée. La différence de densité à 7 jours est de l'ordre de -30% par rapport aux témoins ; elle reste élevée à 13 jours post-hypoxie avec des valeurs de -25% à -30% (fig 23).

3.3) COMPTAGES CELLULAIRES

Le comptage cellulaire, chez les sujets hypoxiques traités par MK801, a mis en évidence une diminution significative de 12% du nombre de cellules à partir de 5 jours post-hypoxie dans les différentes structures (fig 24).

La perte cellulaire s'accroît avec le temps pour se stabiliser vers 7 jours à -20% par rapport aux témoins.

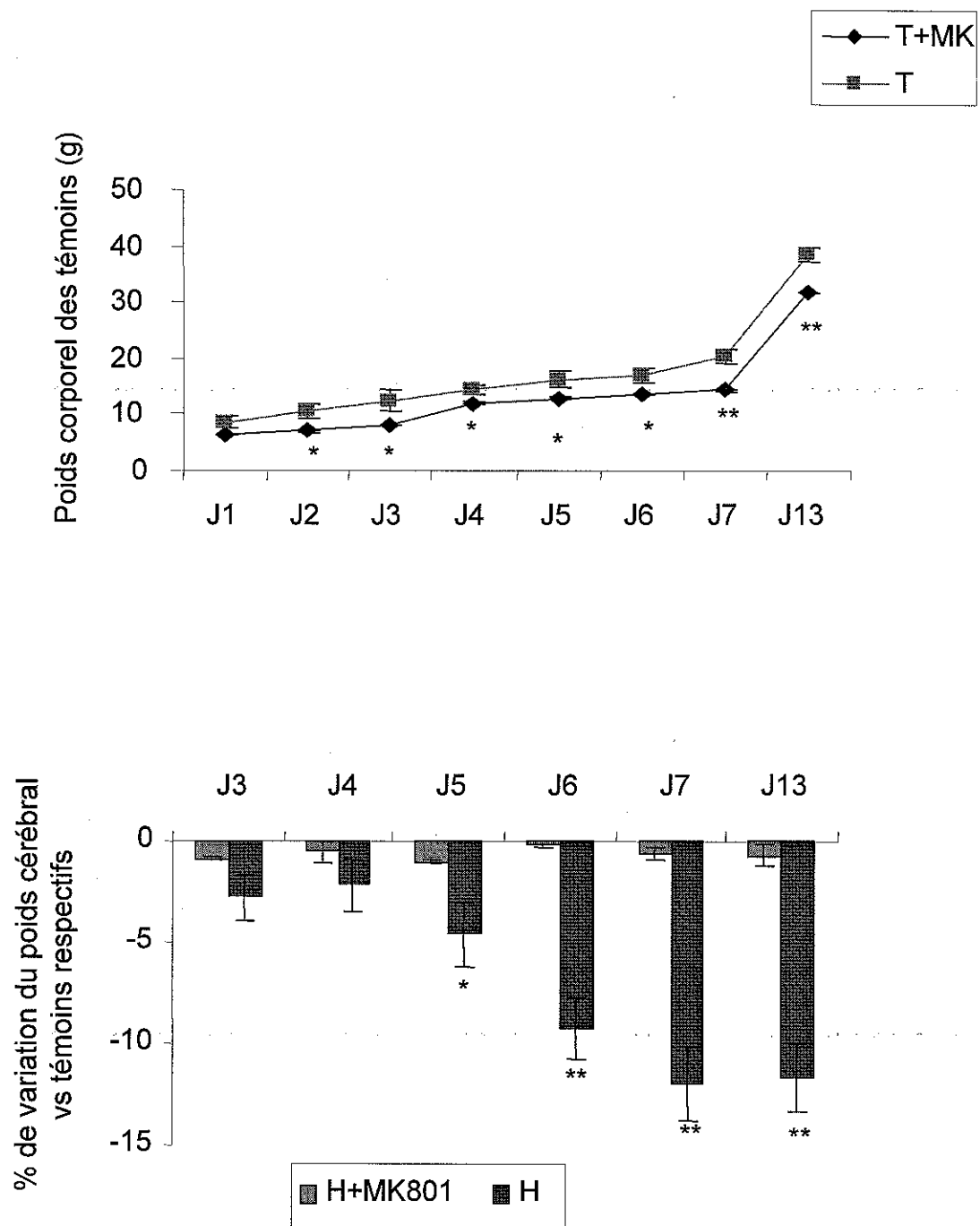


Figure 22 : Poids corporel et cérébral des animaux après une hypoxie de 20 min précédée d'un traitement par MK801, à 5mg/kg, sur des rats de 1 jour.

Valeurs moyennes +/- DS obtenues à partir de 5 animaux minimum.

** : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, (Test de Student)*

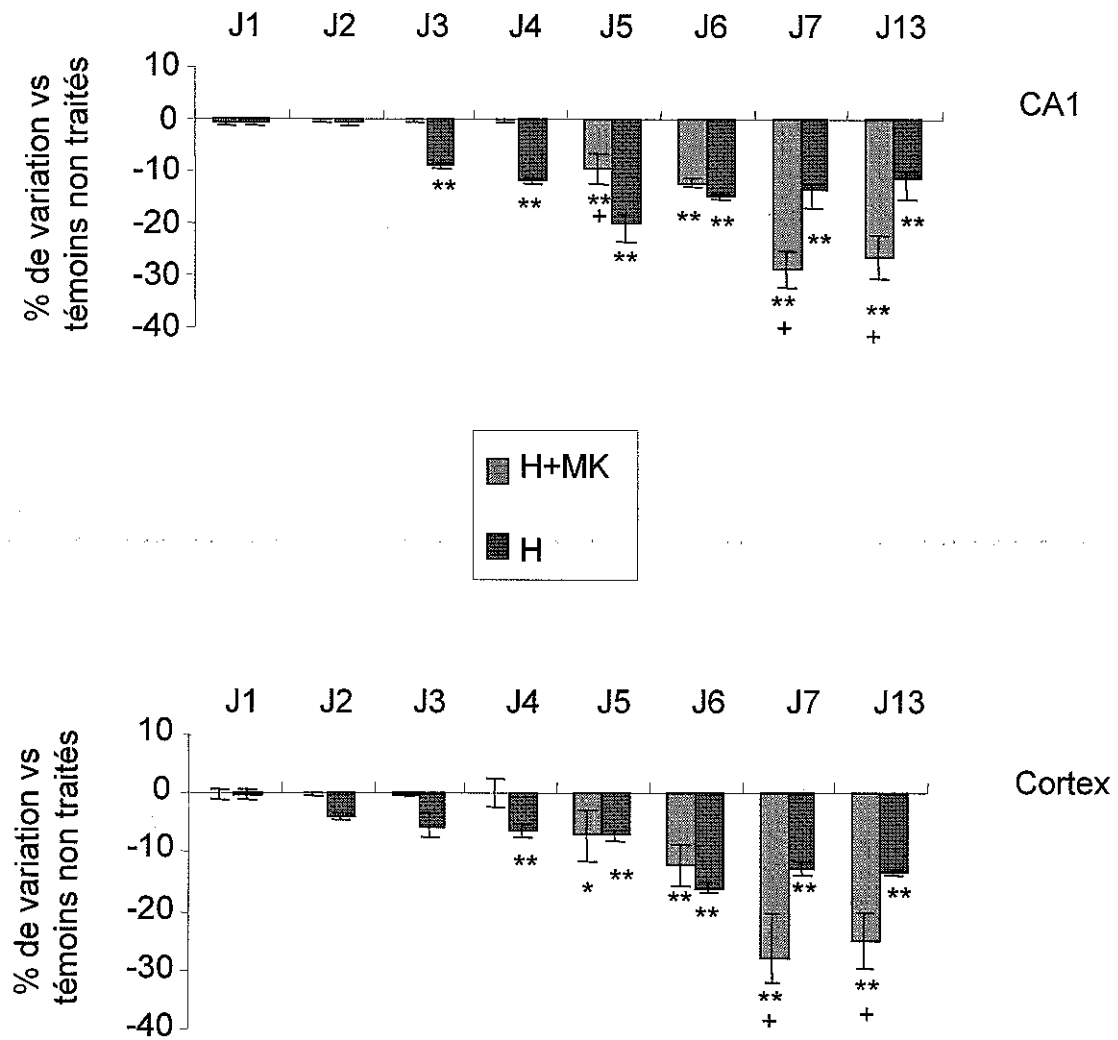


Figure 23: Densité cellulaire au niveau de l'hippocampe et du cortex après une hypoxie de 20 min précédée d'un traitement par MK801 sur des rats de 1 jour.

Valeurs moyennes $\pm$ DS obtenues à partir de 5 animaux minimum.

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, (Test de Student)

+: $p < 0.05$, ++ : $p < 0.01$, (Test de Student)

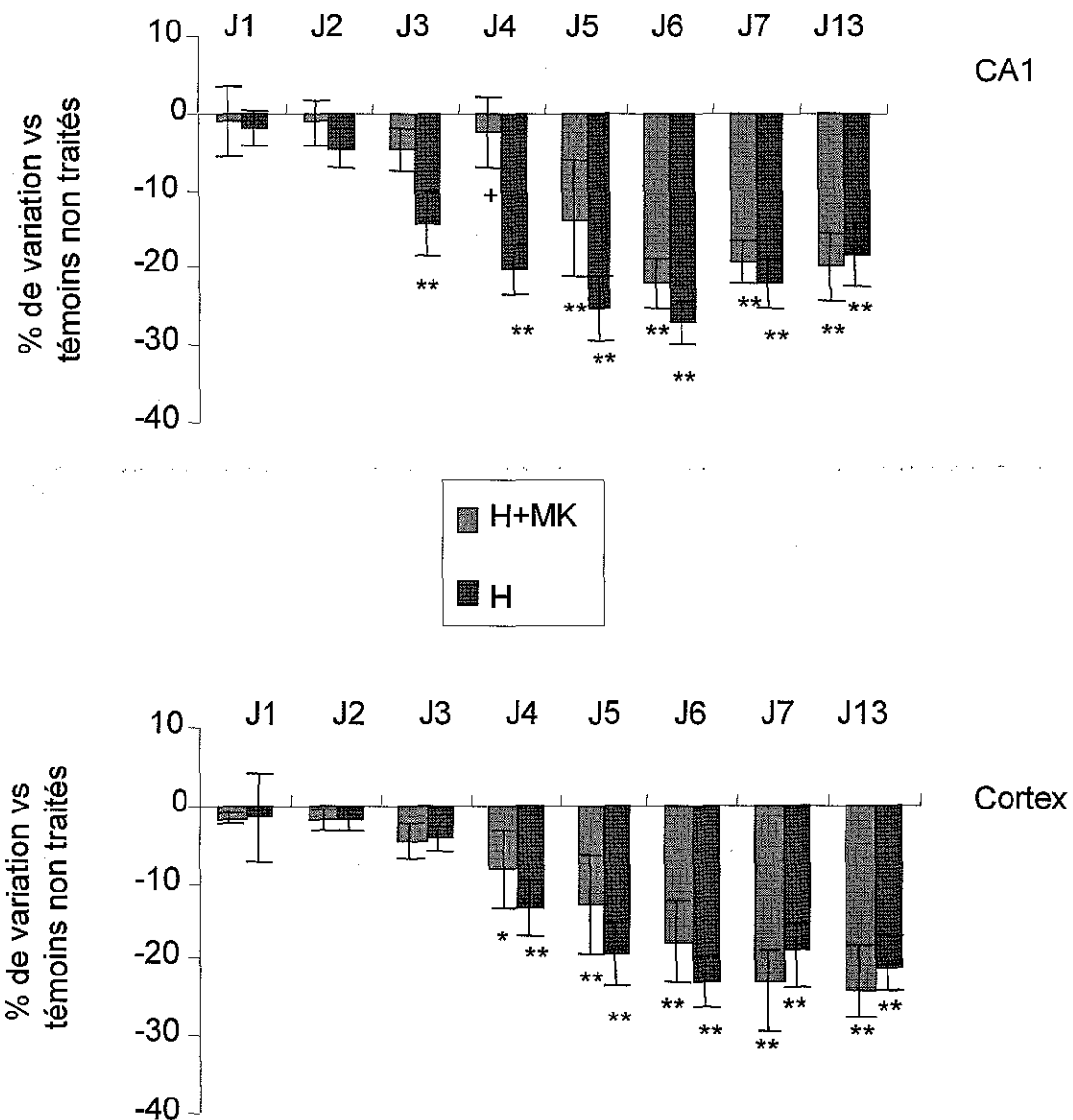


Figure 24 : Comptage cellulaire au niveau de l'hippocampe et du cortex après une hypoxie de 20 min précédée d'un traitement par MK801 sur des rats de 1 jour.

Valeurs moyennes $\pm$ DS obtenues à partir de 5 animaux minimum.

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, (Test de Student)

+: $p < 0.05$, ++ : $p < 0.01$, (Test de Student)

3.4) CARACTERISTIQUES DE LA MORT CELLULAIRE

A 5 jours post-hypoxie, les animaux hypoxiques présentent une augmentation significative du nombre de cellules apoptotiques (5,52% vs 1,52% chez les témoins)(fig 25).

La mort cellulaire de type nécrose ou apoptose progresse jusqu'à 7 jours.

A 13 jours, le pourcentage de cellules apoptotiques régresse, pour devenir comparable à celui des témoins. En revanche, le taux de cellules en nécrose reste élevé (8,53% vs 1,8% chez les témoins).

3.5) EXPRESSION DE PROTEINES SPECIFIQUES

L'expression de la protéine Bcl-2 des animaux hypoxiques est comparable à celle des animaux témoins à 3 jours post-hypoxie, et devient réprimée à 6 et 13 jours avec -42% par rapport aux témoins (fig 26).

Le profil de Bax est opposé, son expression étant supérieure aux témoins à partir de 6 jours pour terminer à 13 jours post-hypoxie avec une augmentation de l'ordre de 84%.

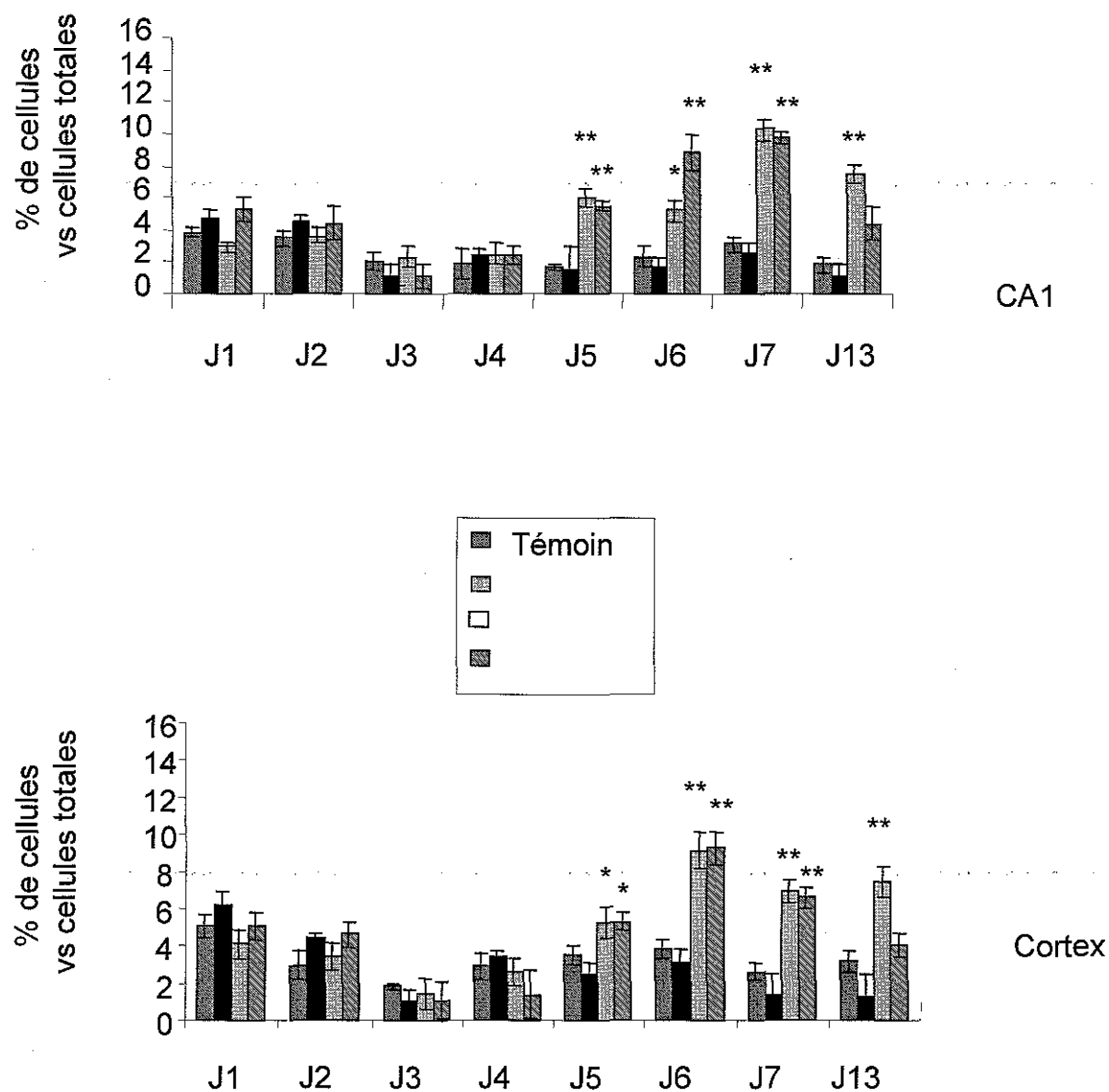


Figure 25 : Evaluation des taux de nécrose et d'apoptose au niveau de l'hippocampe et du cortex après une hypoxie de 20 min précédée d'un traitement par MK801 sur des rats de 1 jour.

Valeurs moyennes $\pm$ DS obtenues à partir de 5 animaux minimum.

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, (Test de Student)

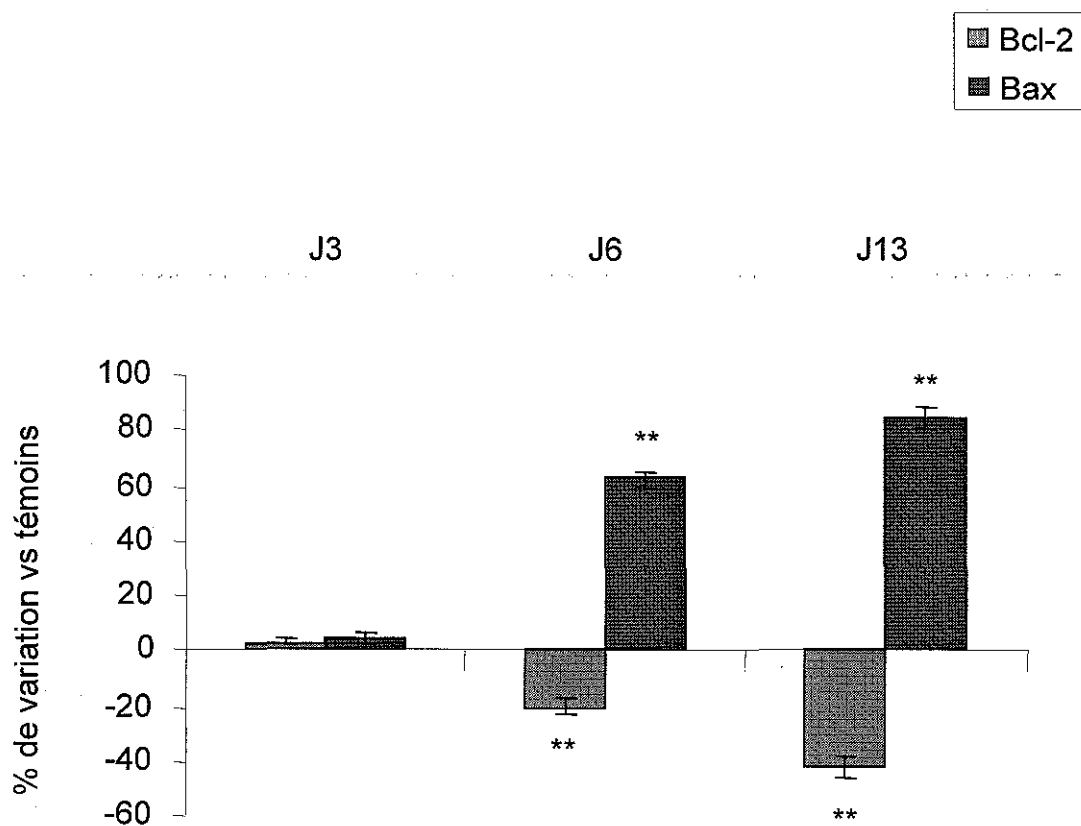


Figure 26 : Expression des protéines Bcl-2 et Bax par immunofluorescence au niveau de l'hippocampe, après une hypoxie de 20 min précédée d'un traitement par MK801 sur des rats de 1 jour.

Valeurs moyennes +/- DS obtenues à partir de 5 animaux minimum.

** : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, (Test de Student)*

C) ETUDE DE LA MATURATION CEREBRALE

1) EFFET D'UNE HYPOXIE TRANSITOIRE CHEZ LE RATON DE 7 JOURS DE NAISSANCE

1.1) SURVIE

L'exposition de rats âgés de 7 jours à une hypoxie de 20 mn provoque une mortalité de 100% (fig 27).

Cette mortalité absolue persiste encore lorsque l'on réduit l'épisode hypoxique à 10 mn. Le taux de survie augmente ensuite progressivement. Il avoisine les 40% pour une durée de 9mn.

Le temps d'exposition choisi de 8 mn correspond à un taux de survie de 80%.

1.2) EVOLUTION DES POIDS CORPORELS ET CEREBRAUX

Dès le jour suivant l'agression, les animaux hypoxiques présentent un défaut de croissance de l'ordre de 12%. Ce déficit de poids corporel s'accroît avec le temps pour atteindre une différence de 28 %, 7 jours après l'agression (fig 28).

Les poids cérébraux, rapportés au poids corporel, des animaux hypoxiques sont significativement inférieurs à ceux des animaux témoins, avec des différences comprises entre 5 % à 1 jour post-hypoxie à 24 % à 7 jours.

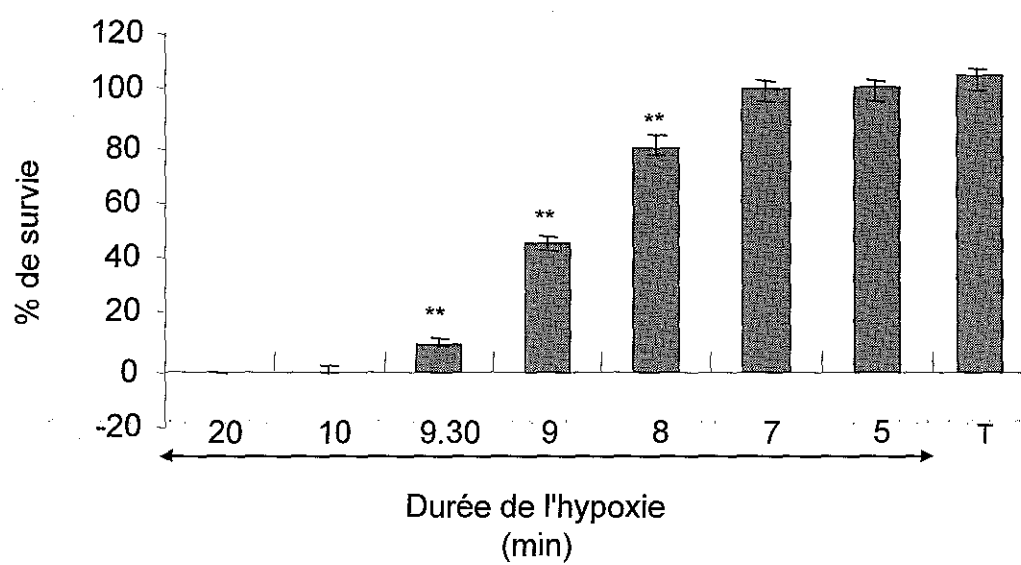


Figure 27: Survie des animaux, âgés de 7 jours, exposés à des durées variables d'hypoxie
Valeurs moyennes +/- DS obtenues à partir de 5 animaux minimum.
 * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, (Test de Student)

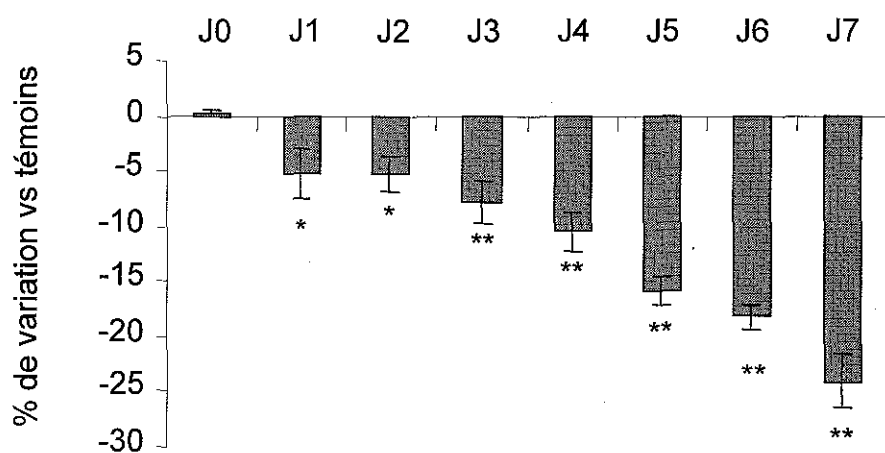
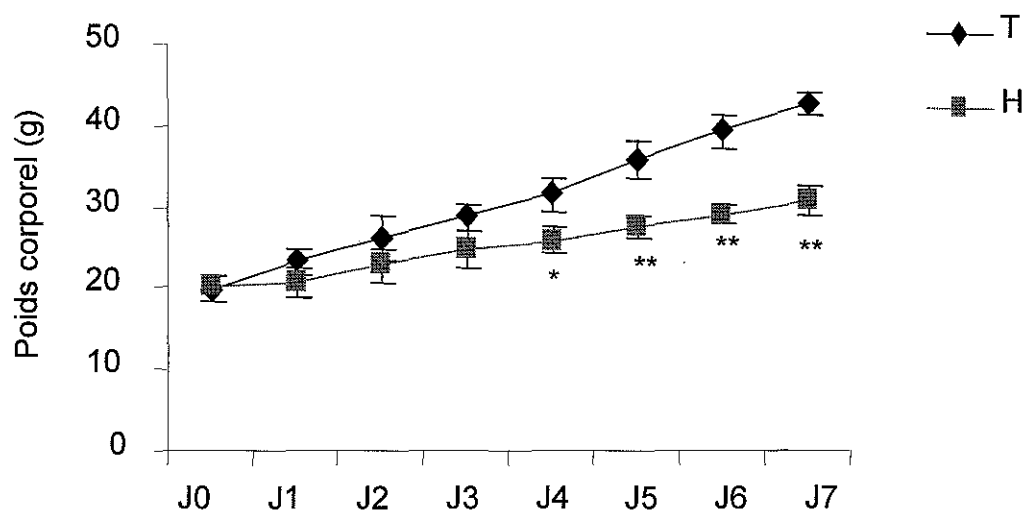


Figure 28 : Poids corporel et cérébral après une hypoxie de 8 min sur des rats de 7 jours.

Valeurs moyennes $\pm$ DS obtenues à partir de 5 animaux minimum.

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, (Test de Student)

1.3) MORPHOMETRIE : Mesure de la densité cellulaire au niveau de l'hippocampe et du cortex

La diminution de la densité cellulaire au niveau de CA1 devient significative chez les animaux hypoxiques au 2^{ème} jour après l'agression (-6,8 % vs témoins) alors qu'il faut attendre le 3^{ème} jour pour qu'elle devienne significative dans le cortex (fig 29).

A 7 jours post-hypoxie, les densités cellulaires au niveau de CA1 et du cortex des animaux hypoxiques sont inférieures d'une vingtaine de pour-cent à celles des témoins.

1.4) COMPTAGES CELLULAIRES

Dès le 2^{ème} jour de l'agression, on observe une perte cellulaire de 12 % au niveau de CA1 alors que le cortex n'est pas encore touché (fig 30).

La diminution du nombre de cellules devient significative dans le cortex à partir du 2^{ème} jour suivant l'hypoxie. Les pertes cellulaires augmentent régulièrement jusqu'à 7 jours, avec des valeurs voisines de 30%, toujours observées à 20 jours post-hypoxie.

1.5) CARACTERISTIQUES DE LA MORT CELLULAIRE

On assiste à une mort cellulaire par nécrose qui évolue dans le temps pour atteindre 10% des cellules totales après 7 jours (fig 31).

Aucune mort par apoptose n'est observée.

En ce qui concerne le cortex, la nécrose débute au 2^{ème} jour post-hypoxie pour représenter à 7 jours un taux de 15% des cellules totales. Là encore, la mort par apoptose ne semble pas intervenir.

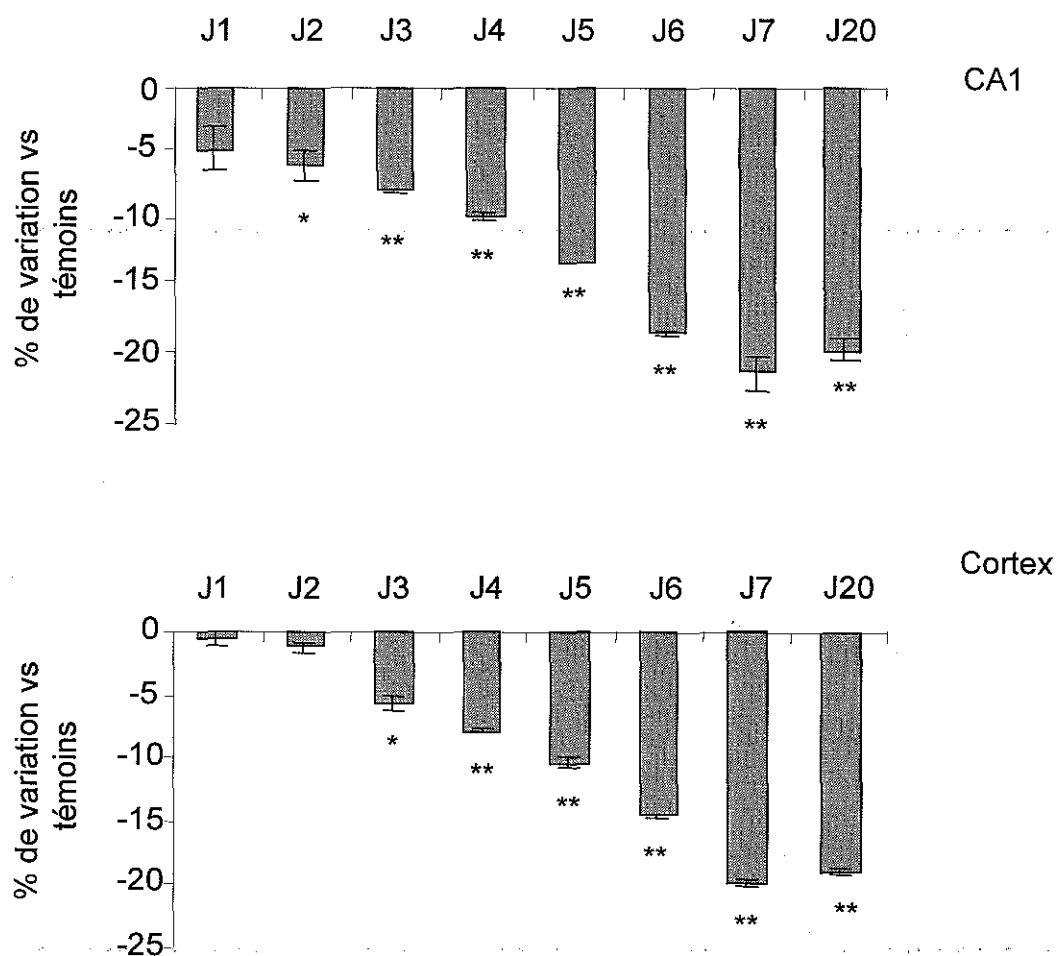


Figure 29 : Densité cellulaire au niveau de l'hippocampe et du cortex après une hypoxie de 8 min sur des rats de 7 jours.

Valeurs moyennes $\pm$ DS obtenues à partir de 5 animaux minimum.

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, (Test de Student)

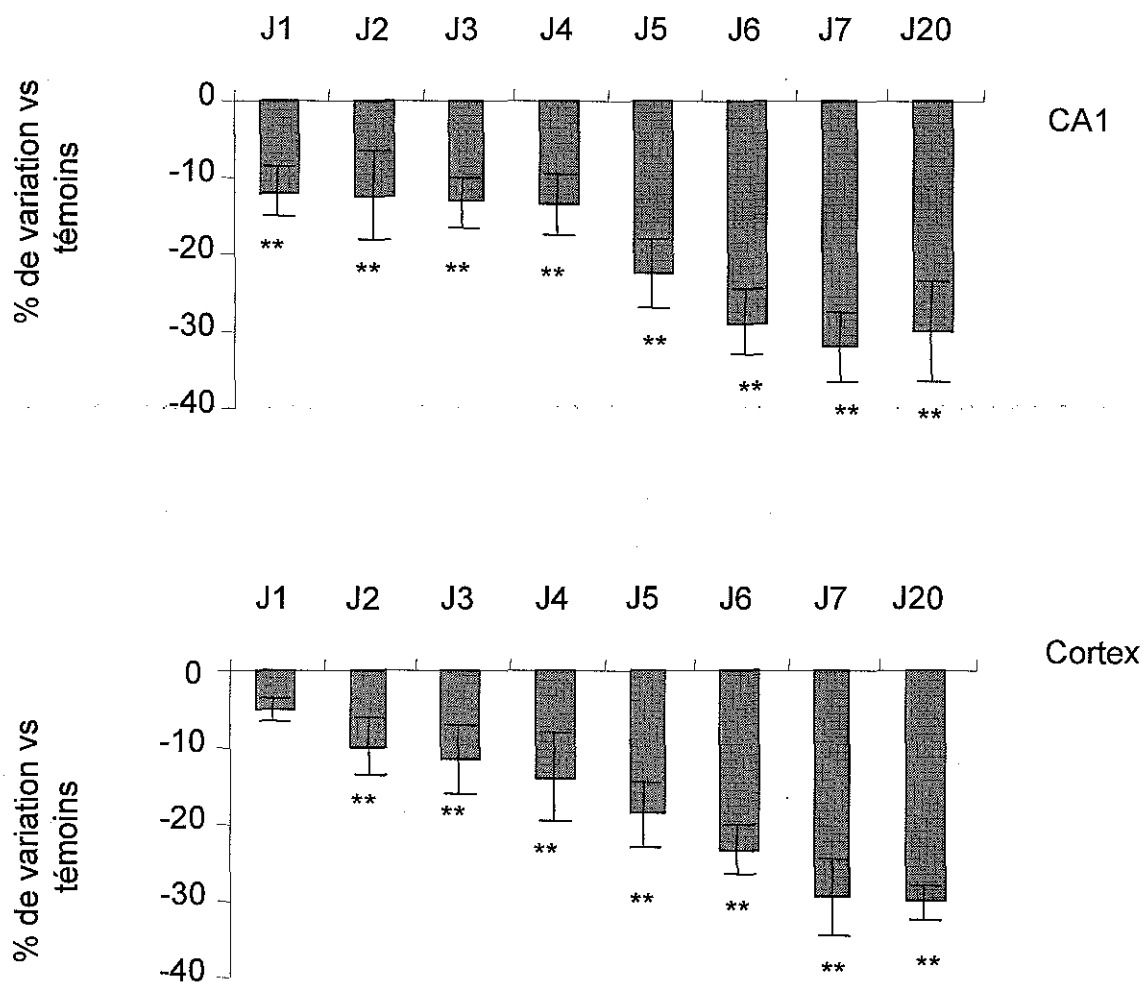


Figure 30 : Comptage cellulaire au niveau de l'hippocampe et du cortex, après une hypoxie de 8 min sur des rats de 7 jours.

Valeurs moyennes $\pm$ DS obtenues à partir de 5 animaux minimum.

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, (Test de Student)

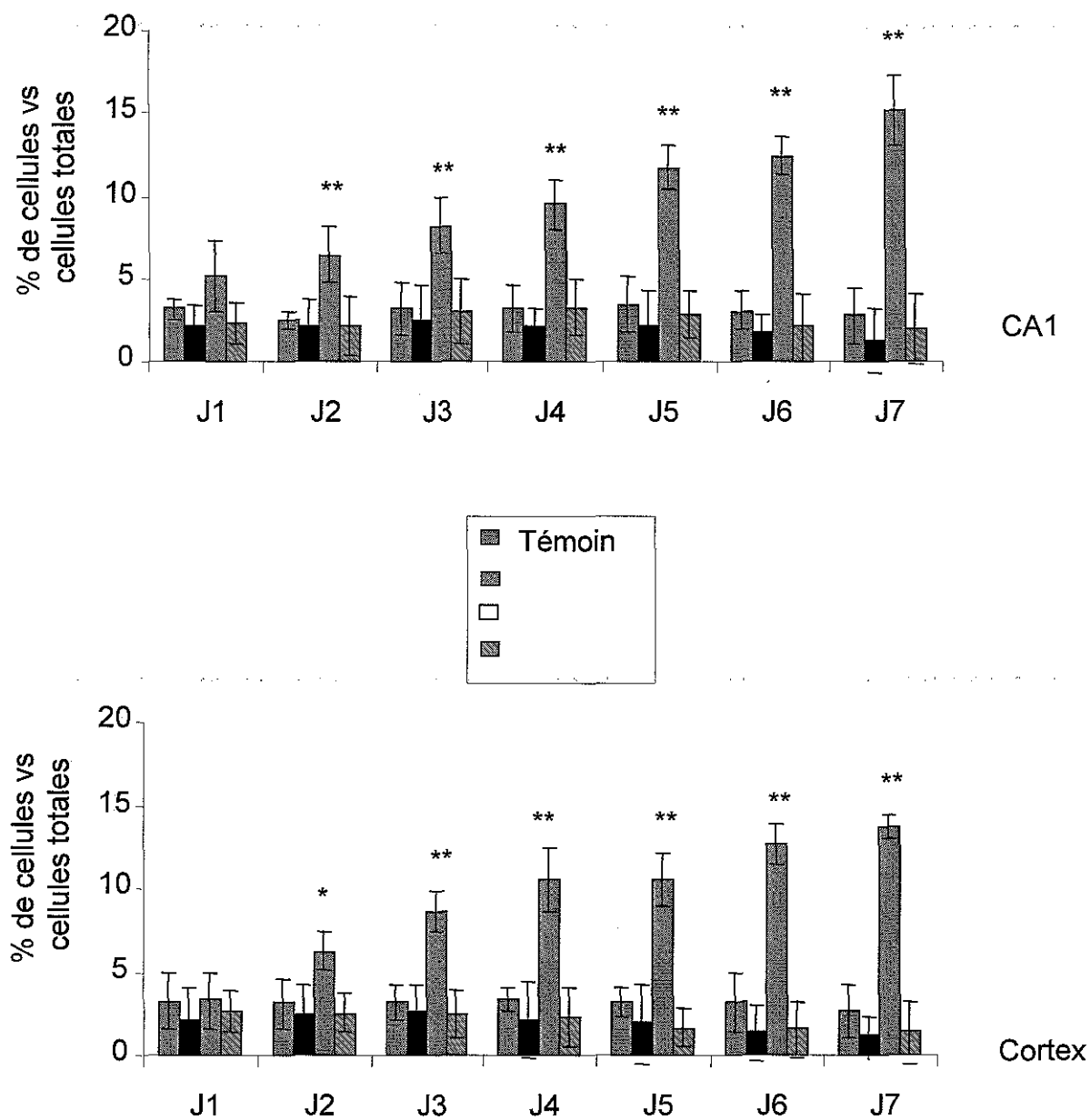


Figure 31: Evaluation des taux de nécrose et d'apoptose au niveau de l'hippocampe et du cortex après une hypoxie de 8 min, sur des rats de 7 jours.
 Valeurs moyennes $\pm$ DS obtenues à partir de 5 animaux minimum.
 *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, (Test de Student)

1.6) EXPRESSION DE PROTEINES SPECIFIQUES

Au 3^{ème} jour suivant l'agression, l'expression de la protéine Bcl-2 est diminuée de 8,5% au niveau de la zone CA1 de l'hippocampe des animaux hypoxiques et devient ensuite comparable aux témoins (fig 32).

En ce qui concerne l'expression de la protéine Bax, les animaux hypoxiques ne présentent pas de différence significative par rapport aux témoins.

2) EFFET D'UN TRAITEMENT PAR LE MK801

2.1) EVOLUTION DES POIDS CORPORELS ET CEREBRAUX

Les animaux témoins exposés au MK801 ont un retard de croissance de 10 % visible dès le jour suivant l'exposition. Ce déficit de poids persiste encore à 7 jours post-hypoxie, avec une diminution de 14,5% par rapport aux témoins non traités (fig 33).

En ce qui concerne le poids cérébral des animaux hypoxiques traités par MK801, on observe une diminution significative par rapport aux témoins, de l'ordre de 6%, le lendemain de l'agression, qui s'atténue par la suite.

Compte tenu de l'effet propre du MK801 sur les animaux, toutes les variables étudiées ultérieurement seront évaluées en pourcentage de variation par rapport aux témoins non traités par le MK801.

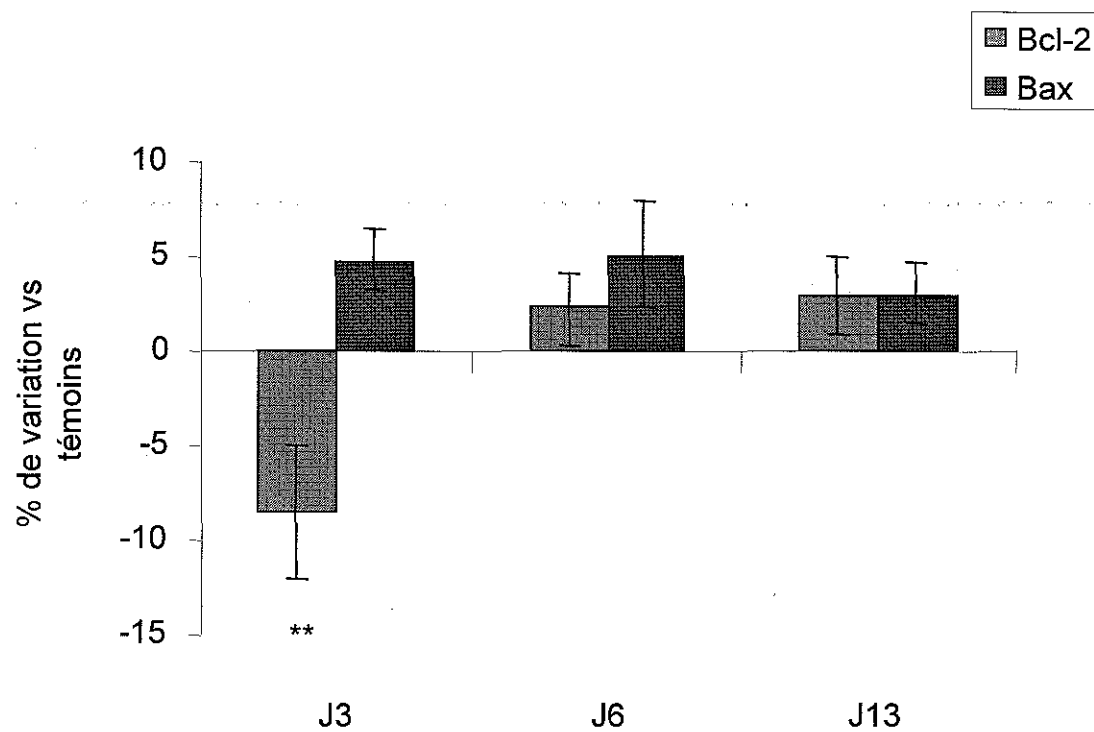


Figure 32 : Expression des protéines Bcl-2 et Bax par immunofluorescence au niveau de l'hippocampe, après une hypoxie de 8 min sur des rats de 7 jours.

Valeurs moyennes $\pm$ DS obtenues à partir de 5 animaux minimum.

** : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, (Test de Student)*

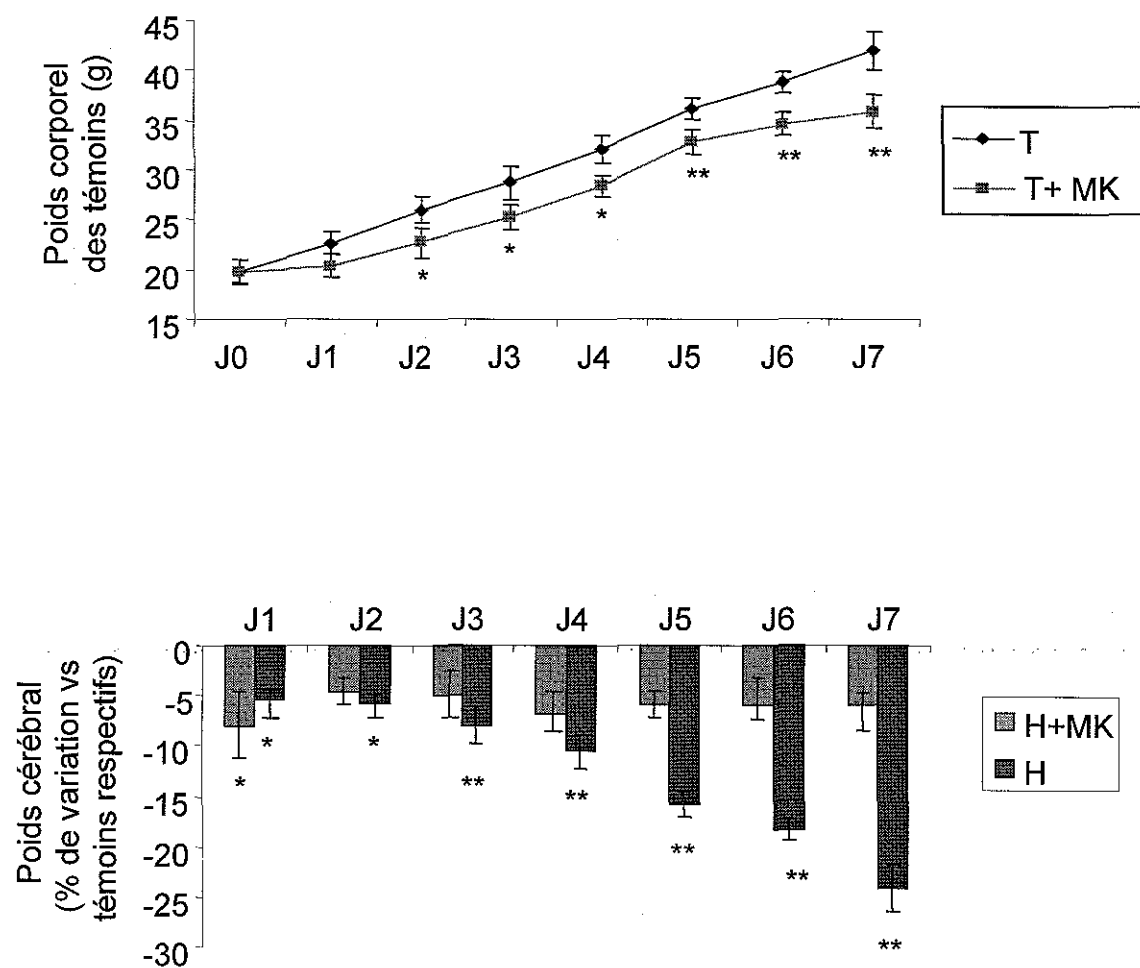


Figure 33 : Poids corporel et cérébral après à une hypoxie de 8mn, précédée d'un traitement par MK801 sur des rats de 7 jours.

Valeurs moyennes +/- DS obtenues à partir de 5 animaux minimum.

**: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, (Test de Student)*

2.2) MORPHOMETRIE : Mesure de la densité cellulaire au niveau de l'hippocampe et du cortex

La densité cellulaire au niveau de l'hippocampe des animaux traités par le MK801, est significativement diminuée le lendemain de l'agression, avec des diminutions de l'ordre de 8 à 9%. Une diminution significative de 6% est observée pour le cortex (fig 34).

Les jours suivants, la densité cellulaire redevient comparable aux témoins.

2.3) COMPTAGES CELLULAIRES

La zone CA1 présente une perte cellulaire significative durant les 2 premiers jours suivant l'exposition (-9,5 et -7,7% par rapport aux témoins), qui régresse par la suite pour atteindre des valeurs non significatives voisines de 4% (fig 35).

La diminution du nombre de cellules au niveau du Cortex est juste significative le lendemain de l'agression, avec -7% par rapport aux témoins.

2.4) CARACTERISTIQUES DE LA MORT CELLULAIRE

Le nombre de cellules apoptotiques au niveau de l'hippocampe et du cortex des animaux hypoxiques est comparable à celui des témoins avec des valeurs comprises entre 1 et 3% des cellules totales (fig 36).

En revanche, le nombre de cellules nécrotiques est significativement augmenté le lendemain de l'exposition, et ce dans toutes les structures étudiées (avec un taux de 6 à 7% des cellules totales comparé à un taux de l'ordre de 3% chez les témoins).

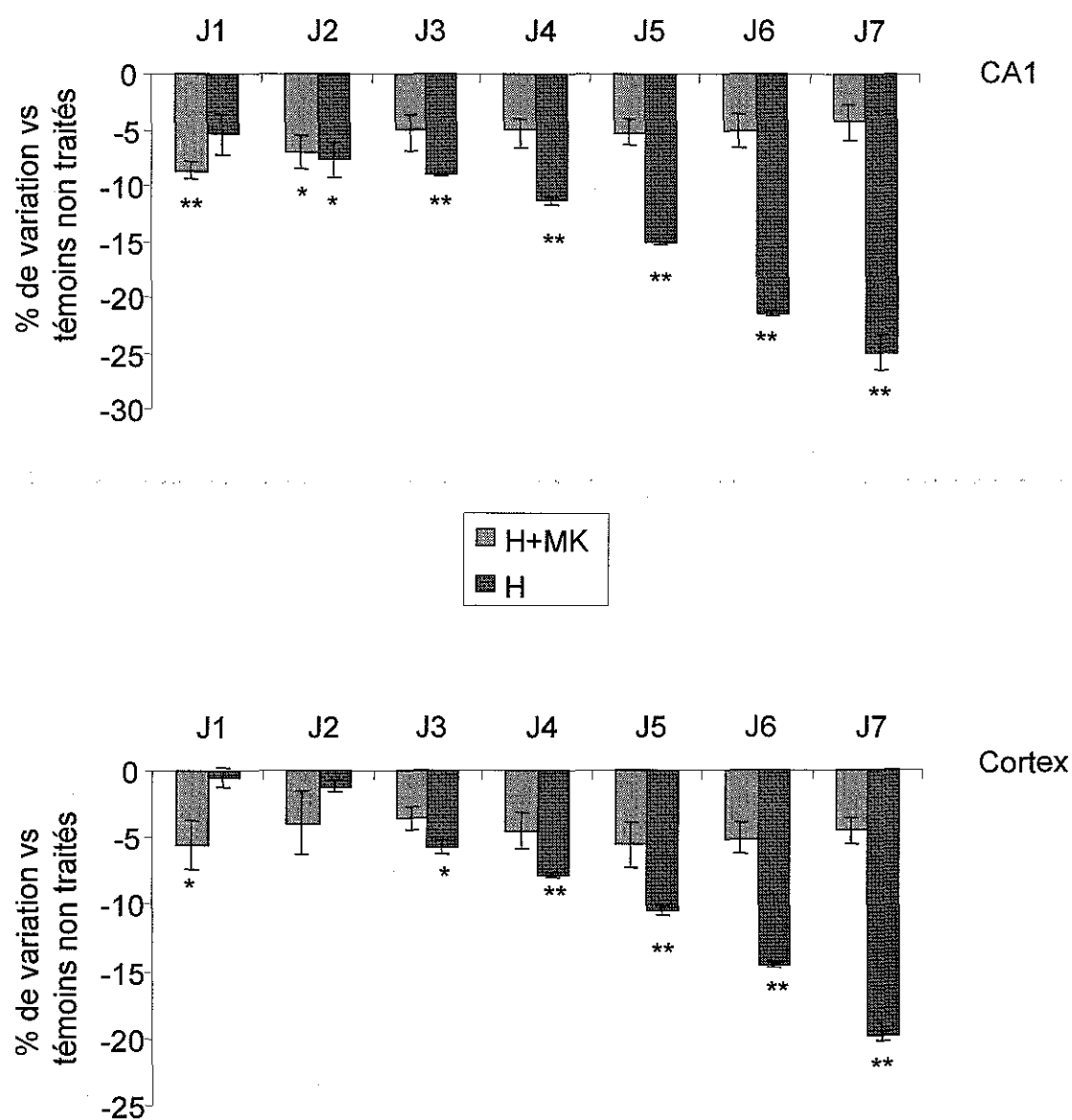


Figure 34 : Densité cellulaire au niveau de l'hippocampe et du cortex après une hypoxie de 8 min précédée d'un traitement par MK801 sur des rats de 7 jours.

Valeurs moyennes $\pm$ DS obtenues à partir de 5 animaux minimum.

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, (Test de Student)

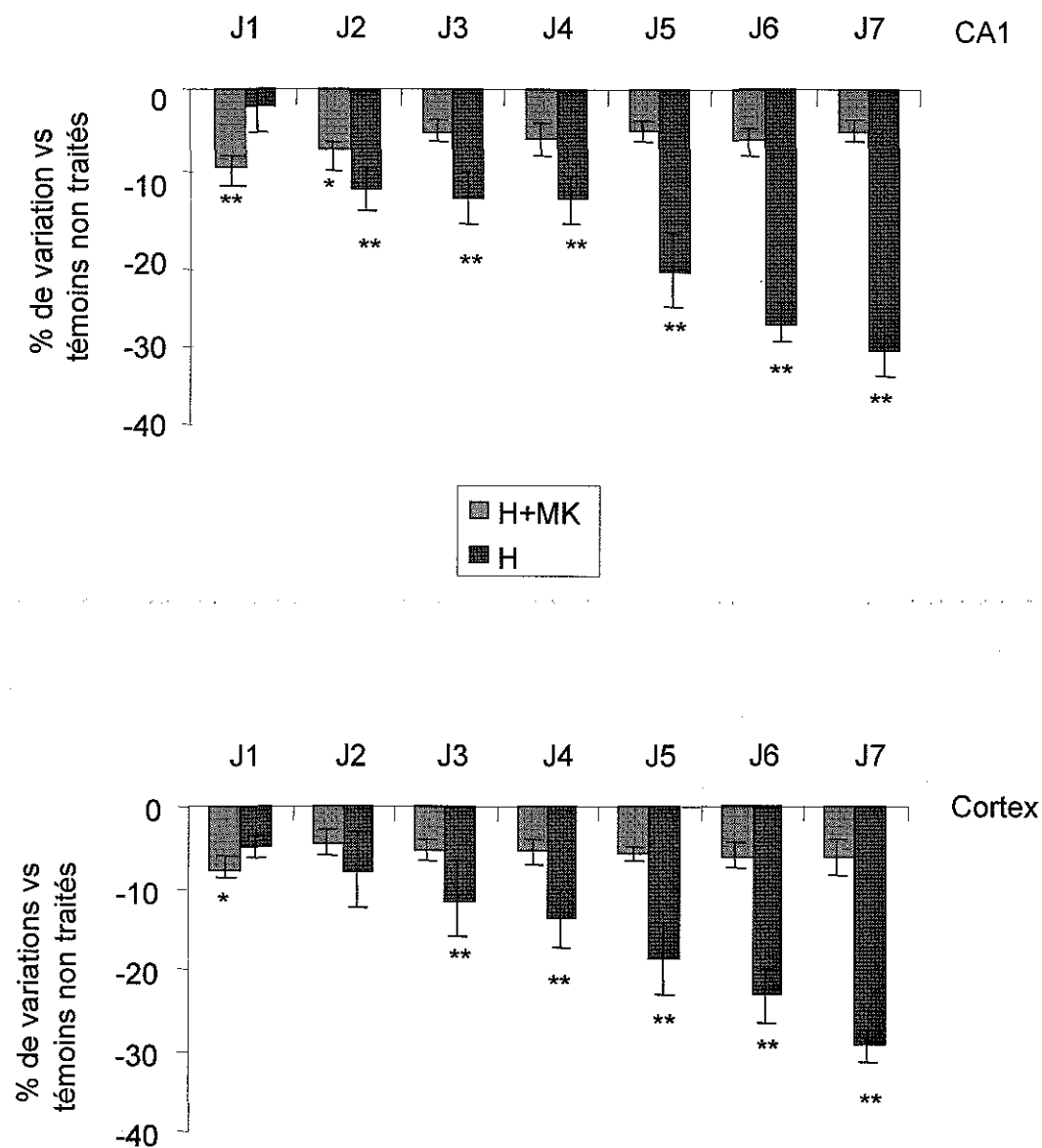


Figure 35 : Comptage cellulaire au niveau de l'hippocampe et du cortex, après une hypoxie de 8 min précédée d'un traitement par MK801 sur des rats de 7 jours.
Valeurs moyennes +/- DS obtenues à partir de 5 animaux minimum.
 * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, (Test de Student)

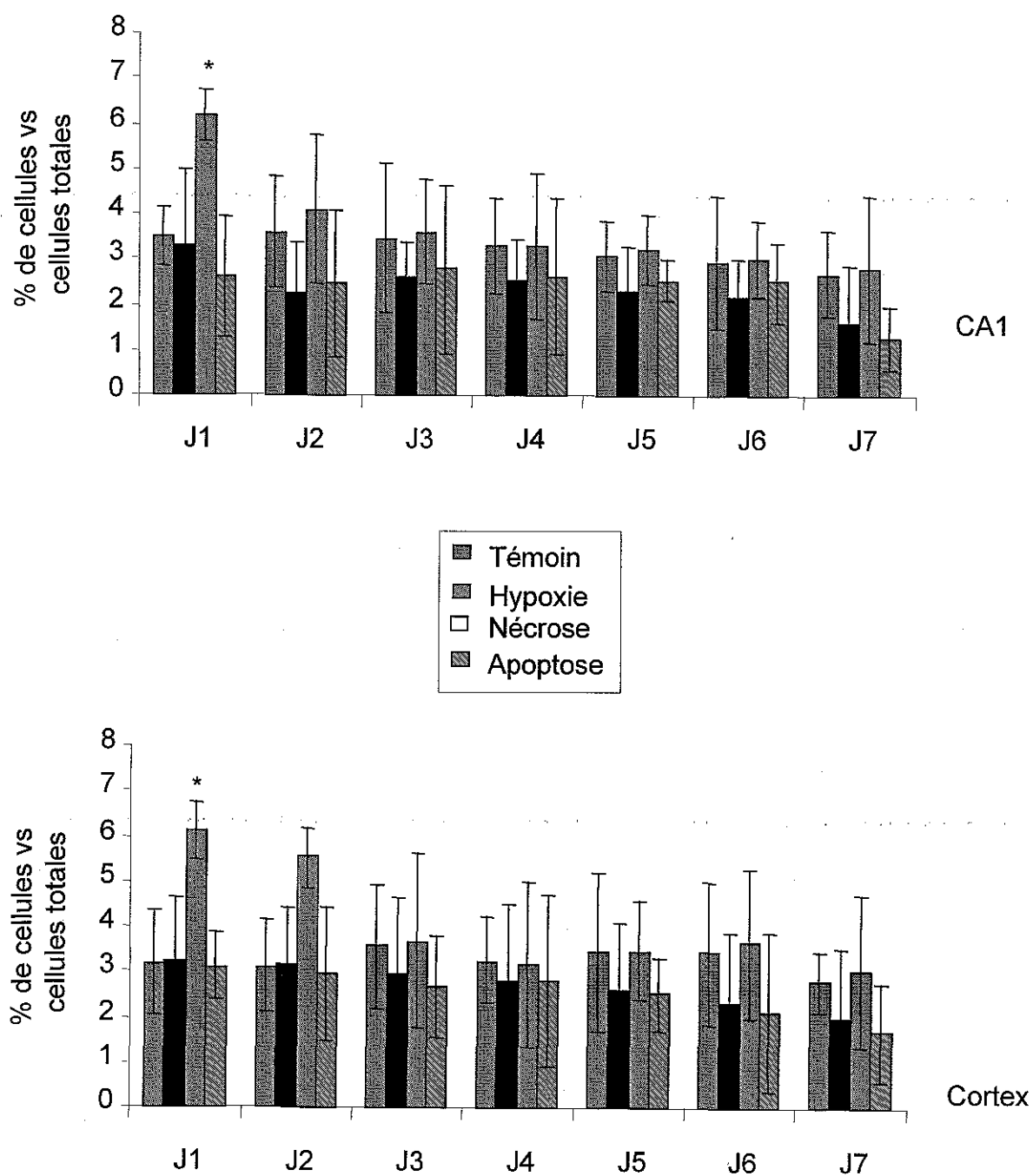


Figure 36 : Evaluation des taux de nécrose et d'apoptose au niveau de l'hippocampe et du cortex après une hypoxie de 8 min, précédée d'un traitement par MK801 sur des rats de 7 jours.

Valeurs moyennes $\pm$ DS obtenues à partir de 5 animaux minimum.

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, (Test de Student)

2.5) EXPRESSION DE PROTEINES SPECIFIQUES

L'expression des protéines Bax et Bcl-2 au niveau de CA1 ne présentent pas de différence significative par rapport aux témoins, leur expression étant augmentée de l'ordre de 2 à 4% (fig 37).

D) EFFET D'UNE ADMINISTRATION INTRAPERITONEALE DE BILIRUBINE ASSOCIEE OU NON A UNE HYPOXIE

1) POIDS CORPOREL ET CEREBRAL

Les animaux ayant reçu une injection intrapéritonéale de bilirubine (216,6mg/kg) ont un poids corporel significativement inférieur à celui des témoins et ce dès le lendemain de l'administration (10,4 g vs 12,5 g pour les témoins).

Ce défaut de croissance persiste encore après 5 jours (12,2 g vs 16,2 g).

En revanche, après 7 jours, il n'apparaît plus de différence significative entre le poids corporel des animaux exposés à une forte concentration de bilirubine et les témoins (fig 38).

Les animaux exposés à la double agression ont un retard de croissance de l'ordre de 30% par rapport aux témoins, leur poids étant significativement inférieur à celui des animaux exposés à la bilirubine ou à l'hypoxie seule.

Cette situation persiste jusqu'à 5 jours. Après 7 jours, les animaux ont un poids, toujours inférieur à celui des témoins mais comparable au poids des animaux hypoxiques.

Lorsque l'on s'intéresse au poids cérébral, aucune différence significative n'apparaît entre les témoins et les animaux ayant reçu la bilirubine, alors que les animaux exposés à la double agression présentent, tout comme les animaux exposés seulement à l'hypoxie, un retard de croissance cérébrale après 7 jours.

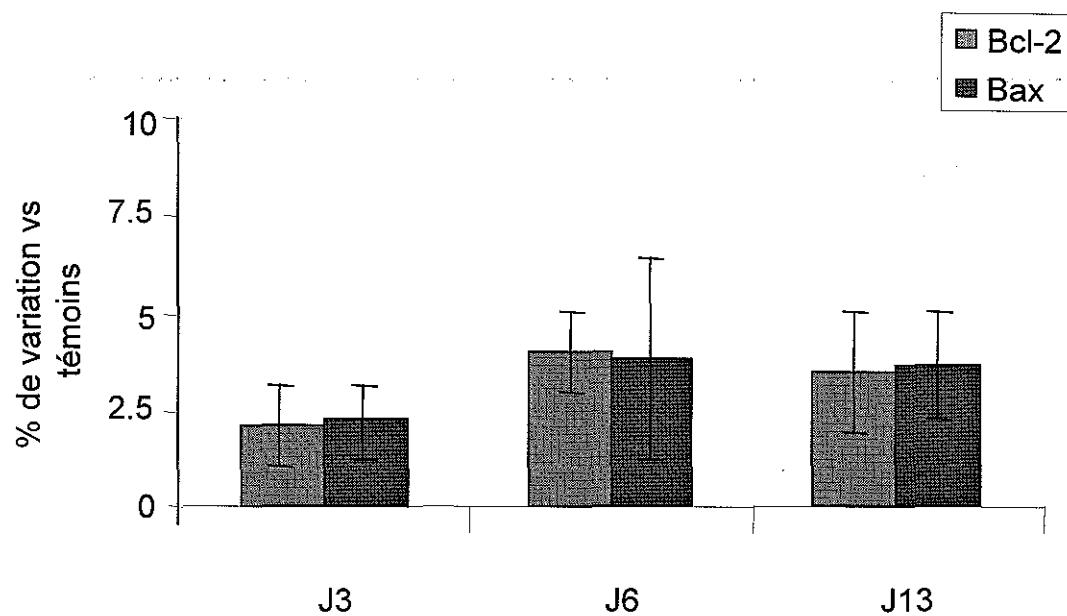


Figure 37 : Expression des protéines Bcl-2 et Bax par immunofluorescence au niveau de l'hippocampe, après une hypoxie de 8 min précédée d'un traitement par MK801 sur des rats de 7 jours.

Valeurs moyennes $\pm$ DS obtenues à partir de 5 animaux minimum.

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, (Test de Student)

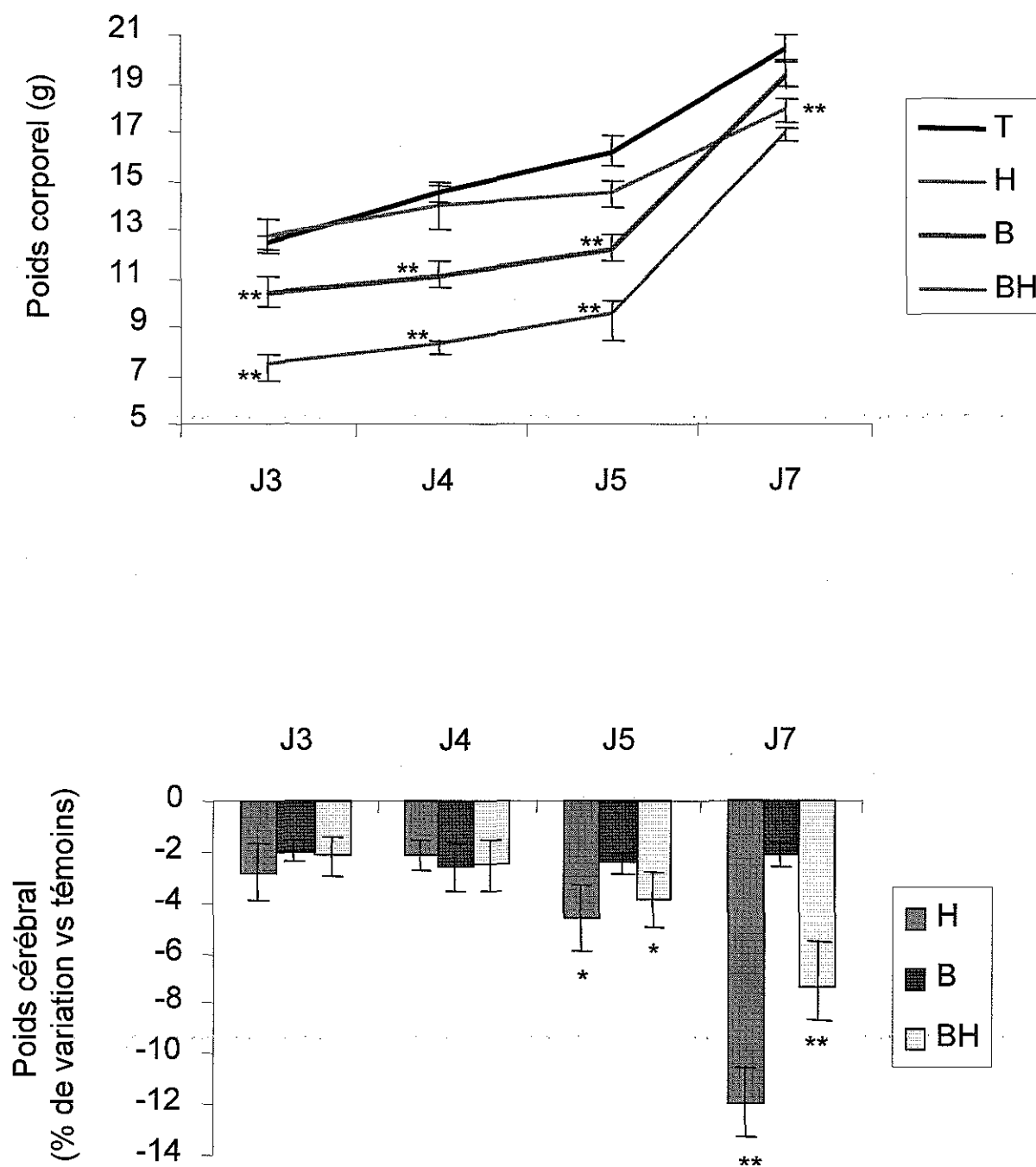


Fig 38: Poids corporel et cérébral d'animaux après une hypoxie de 20 min précédée ou non d'une exposition à la bilirubine sur des rats de 1 jour.
Valeurs moyennes $\pm$ DS obtenues à partir de 5 animaux minimum.
 * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, (Test de Student)

2) ETUDE CELLULAIRE

2.1) COMPTAGES CELLULAIRES

Les animaux ayant reçu l'injection de bilirubine présentent une diminution non significative du nombre de cellules de l'ordre de 2 à 4% selon les structures (fig 39).

Chez les animaux exposés à la bilirubine et à l'hypoxie, on observe après 3 jours, une diminution du nombre de cellules, de 10% dans CA1 et de l'ordre de 5-6% au niveau du cortex. Cette diminution s'accroît après 4 jours.

Les valeurs sont comparables à ce que l'on observe avec l'hypoxie seule.

2.2) CARACTERISTIQUES DE LA MORT CELLULAIRE

Quelles que soit la structure, le nombre de cellules en dégénérescence dans le cerveau des animaux traités à la bilirubine est comparable à celui des témoins.

Chez les animaux exposés à la bilirubine et à l'hypoxie, le nombre de cellules nécrotiques est doublé par rapport aux témoins, à partir du 3^{ème} jour au niveau de CA1 (fig 40), alors qu'il n'est augmenté qu'à partir du 4^{ème} jour au niveau du cortex.

Le pourcentage de cellules apoptotiques est augmenté à partir du 4^{ème} jour dans toutes les structures, avec 5,5% dans CA1 et 6% dans le cortex alors que les témoins présentent 2 à 2,5% de cellules apoptotiques.

Les valeurs de cellules nécrotiques ou apoptotiques, observées chez les animaux exposés à la double agression sont comparables à celle obtenues avec l'hypoxie seule.

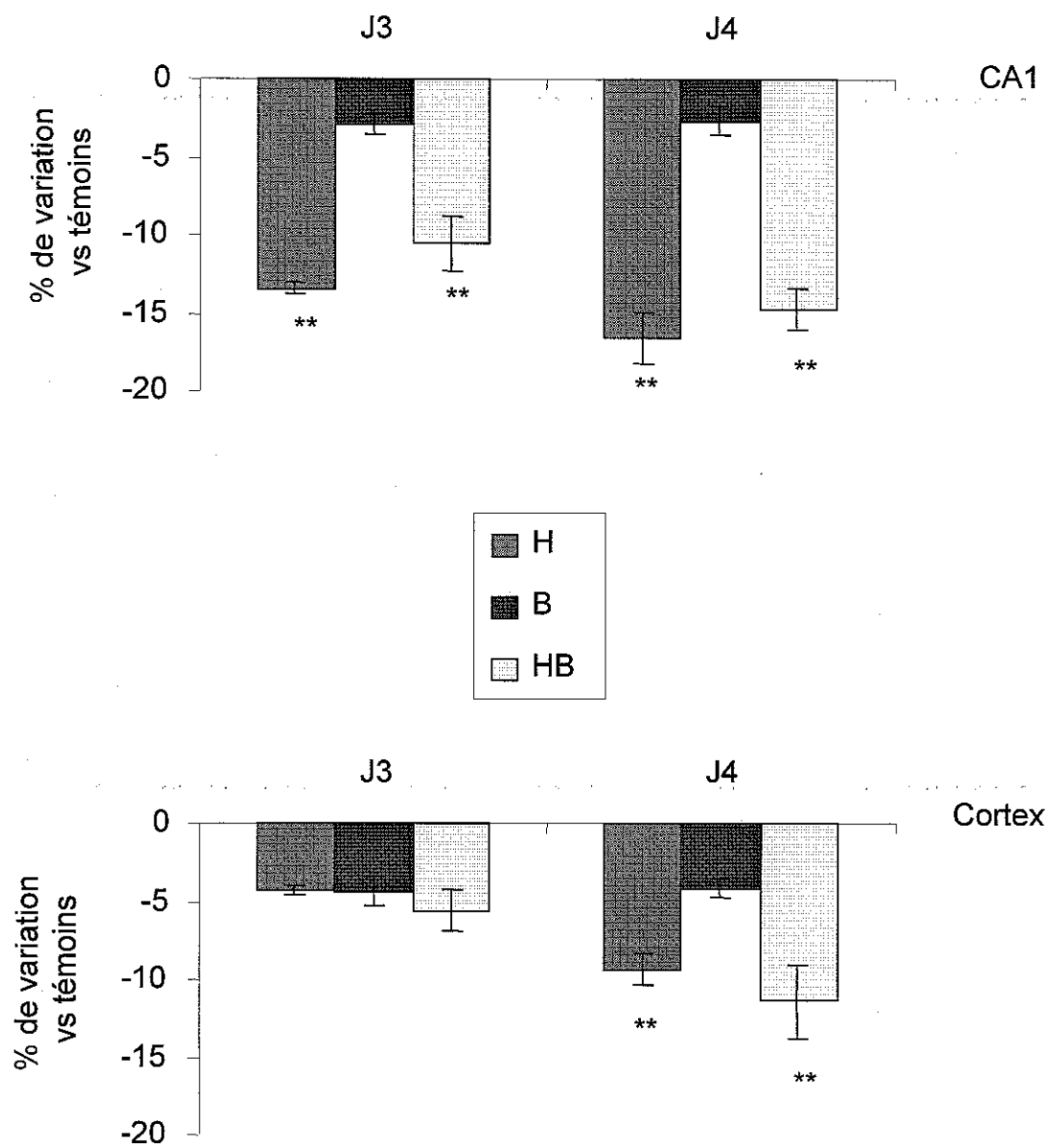


Figure 39 : Comptage cellulaire au niveau de l'hippocampe et du cortex après une hypoxie de 20 min précédée ou non d'une exposition à la bilirubine sur des rats de 1 jour.

Valeurs moyennes $\pm$ DS obtenues à partir de 5 animaux minimum.

** : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, (Test de Student)*

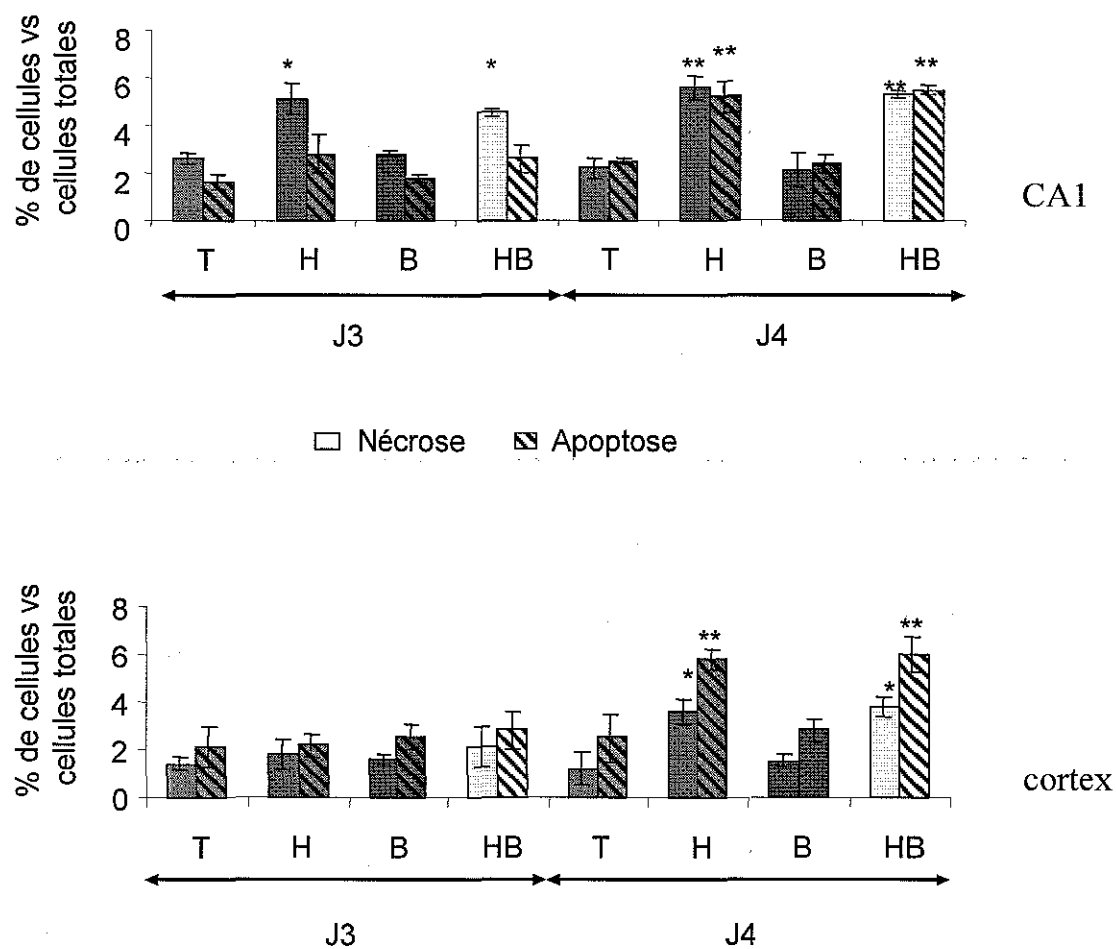


Fig 40 : Evaluation des taux de nécrose et d'apoptose au niveau de l'hippocampe et du cortex après une hypoxie de 20 min précédée ou non d'une exposition à la bilirubine sur des rats de 1 jour.

Valeurs moyennes $\pm$ DS obtenues à partir de 5 animaux minimum.

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, vs témoins

2.3) EXPRESSION DE PROTEINES SPECIFIQUES

L'expression de Bcl-2 des animaux ayant reçu l'injection de bilirubine est comparable à celle des témoins, tout comme l'expression de Bax (fig 41).

En ce qui concerne les animaux exposés à la double agression, le profil est comparable à celui observé chez les animaux exposés uniquement à l'hypoxie.

3) DOSAGE DE LA BILIRUBINE

Le dosage spectrophotométrique n'a pas pu mettre en évidence la présence de bilirubine au niveau cérébrale, aussi bien chez les animaux exposés seulement à la bilirubine ou ceux ayant subi la double agression (fig 42).

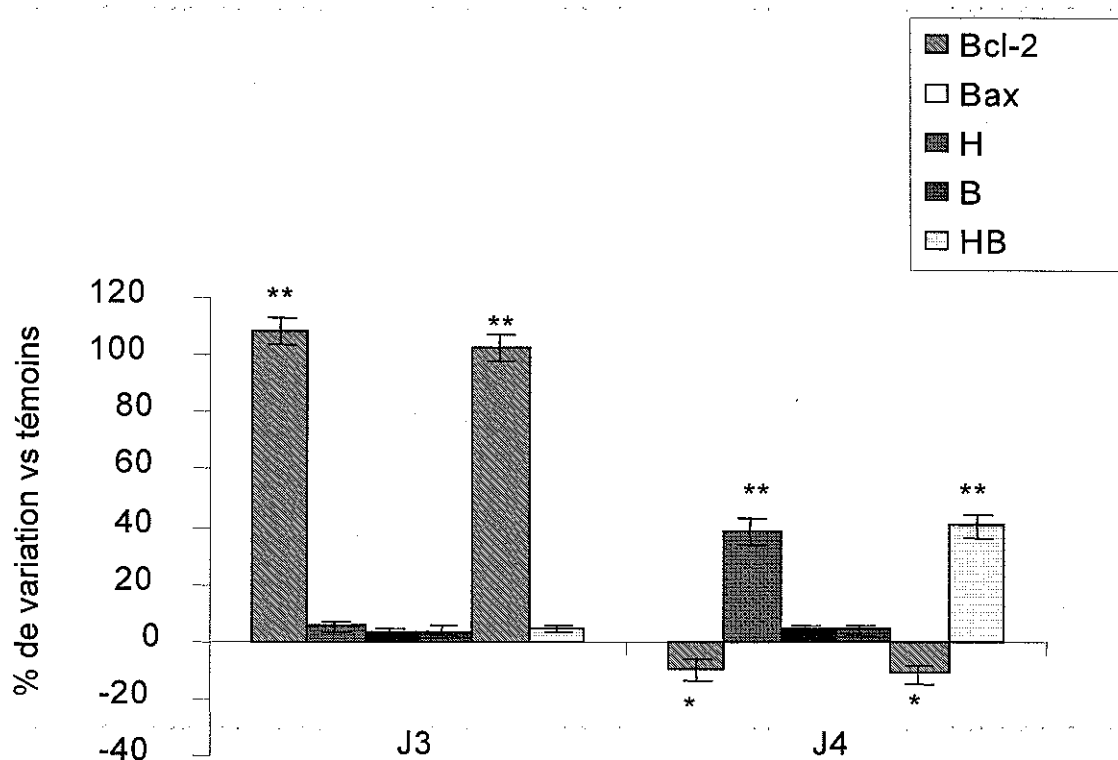
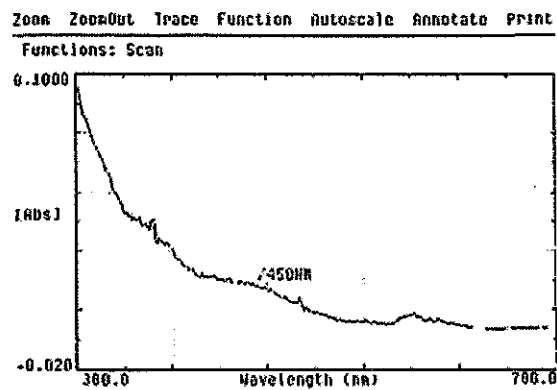


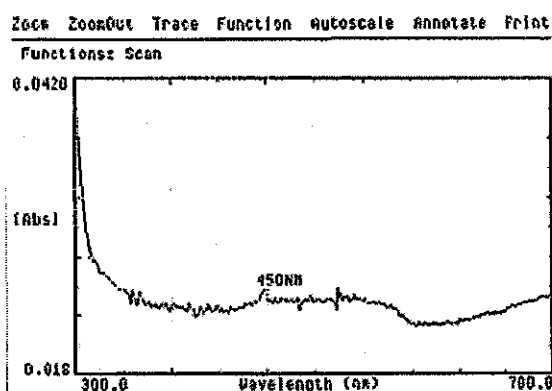
Figure 41: Expression des protéines Bcl-2 et Bax par immunofluorescence au niveau de l'hippocampe, après une hypoxie de 20 min précédée ou non d'une exposition à la bilirubine sur des rats de 1 jour.

Valeurs moyennes $\pm$ DS obtenues à partir de 5 animaux minimum.

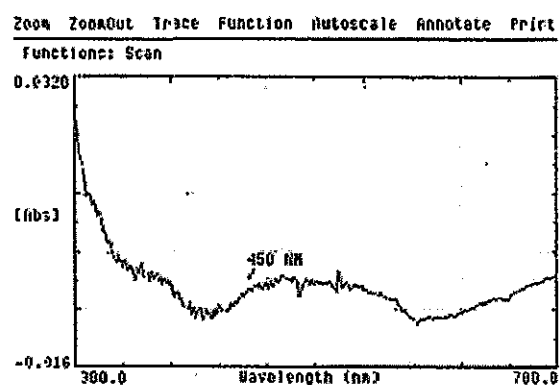
* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, (Test de Student)



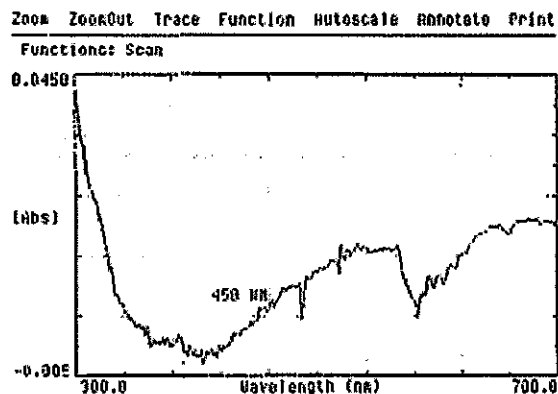
Témoins J3



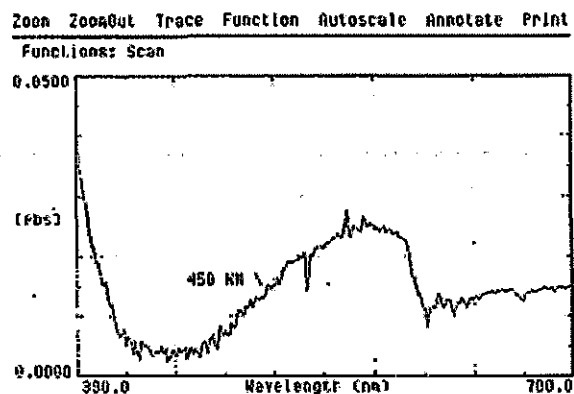
Bilirubine J3



Hypoxie+Bilirubine J3



Bilirubine J4



Hypoxie+Bilirubine J4

Fig 42: Dosage de la bilirubine intracérébrale après injection de bilirubine associée ou non à une exposition à une hypoxie.

II) ETUDES IN VITRO

A) TOXICITE DE LA BILIRUBINE

1) TOXICITE EN FONCTION DE LA DOSE DE BILIRUBINE UTILISEE

La réponse des neurones aux concentrations croissantes de bilirubine a été évaluée au 10^{ème} jour de culture, c'est-à-dire après un contact de 4 jours avec la bilirubine (fig 43).

L'exposition des neurones à la bilirubine engendre une diminution de la viabilité cellulaire. Cette réponse est dose-dépendante vis-à-vis des concentrations de bilirubine, mais elle n'est pas linéaire. La concentration de 0,25µM de bilirubine est sans effet significatif sur la viabilité.

Les concentrations plus élevées provoquent des diminutions significatives de la viabilité cellulaire (une diminution moyenne de 84,5% par rapport aux témoins est observée avec la concentration 5µM).

2) TOXICITE EN FONCTION DU TEMPS POUR UNE DOSE DONNEE

L'administration de 0,5µM de bilirubine provoque une réduction de la viabilité cellulaire par rapport aux témoins dès 48 heures d'exposition.

L'effet s'amplifie à 72 et 96 heures pour atteindre une diminution moyenne de 22,5% (fig 44).

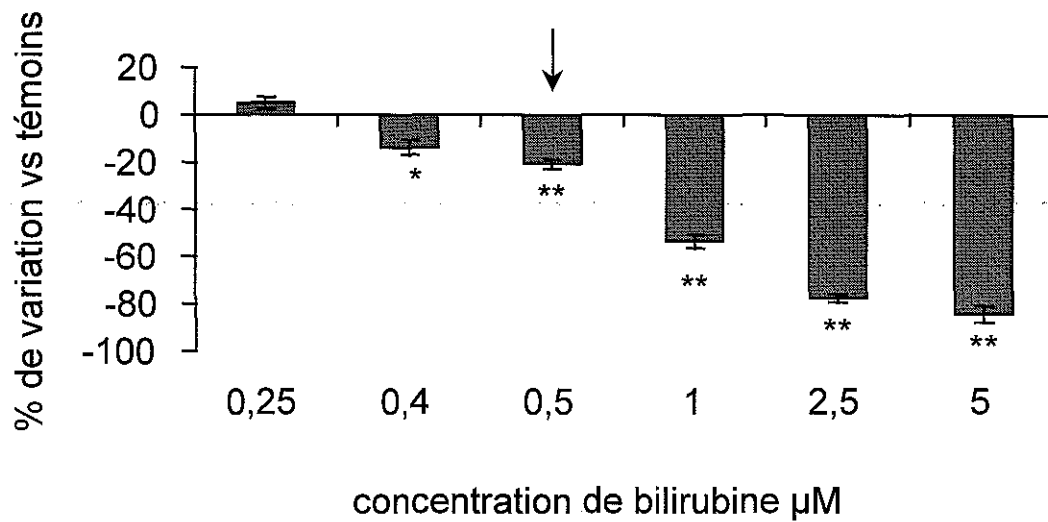


Figure 43: Variation de la viabilité cellulaire des neurones soumis à une exposition de 96 heures à différentes concentration de bilirubine.
Valeurs moyennes $\pm$ DS obtenues à partir de 5 expériences minimum, chacune utilisant plus de 5 boîtes de cultures.
 *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, (Test de Student)

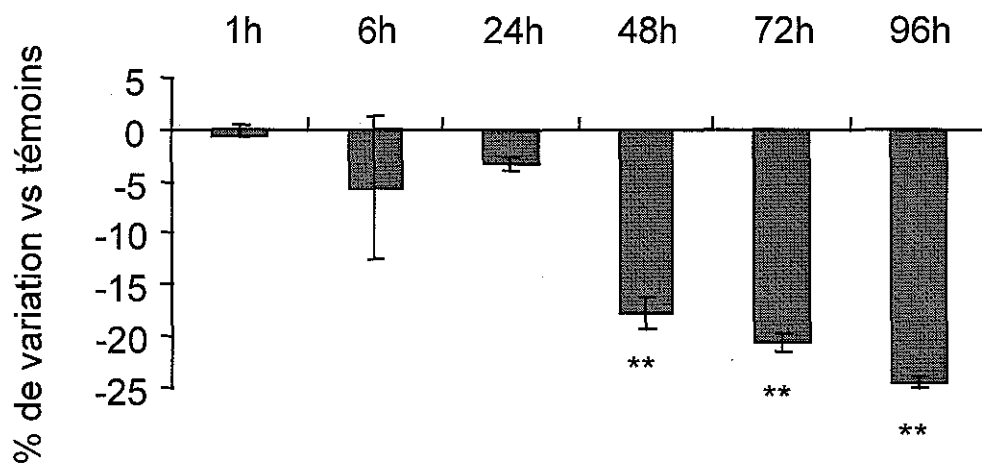


Figure 44 : Cinétique de viabilité cellulaire des neurones soumis à 0.5 μM de bilirubine.
Valeurs moyennes $\pm$ DS obtenues à partir de 5 expériences minimum, chacune utilisant plus de 5 boîtes de cultures.
 *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, (Test de Student)

3) CARACTERISTIQUES DE LA MORT CELLULAIRE

L'administration de cycloheximide (1 μ M), un inhibiteur de la synthèse protéique, protège les neurones de la toxicité de la bilirubine, la viabilité cellulaire redevenant comparable aux cellules témoins. Il en est de même pour l'administration des inhibiteurs de caspases DEVD-CHO et YVAD-CHO (10 μ M) (fig 45).

Les témoins normoxiques présentent une moyenne de 8,0% de cellules nécrosées et 4,4% de cellules apoptotiques (fig 46).

L'exposition à la bilirubine engendre une augmentation du taux de cellules apoptotiques dès 48 heures pour atteindre à 96 heures une moyenne de 15% . Les taux de cellules nécrosées deviennent différents des témoins seulement à 96 heures.

L'administration de CHX conjointement à la bilirubine réduit le nombre de cellules apoptotiques à un taux comparable à celui des témoins (2,82% vs 3,53%). En revanche, aucune diminution significative n'est observée pour les cellules nécrotiques.

Il convient de préciser que la CHX, par elle-même, induit une augmentation significative par rapport aux témoins des taux de cellules nécrosées (10,68% vs 6,28%).

L'administration de l'un ou l'autre des inhibiteurs de caspases provoque une diminution des taux de cellules nécrosées et apoptotiques qui deviennent alors comparables à ceux des témoins.

4) EVOLUTION DE LA SYNTHÈSE PROTÉIQUE

Seule la mesure dans la fraction insoluble caractérise l'incorporation de L-leucine [3 H] dans les protéines.

La synthèse protéique des neurones exposés à la bilirubine est augmentée de 53% après 1 heure d'exposition. Elle diminue ensuite pour augmenter de nouveau à partir de 48 heures et atteindre une augmentation maximale de 79,1% à 72 heures (fig 47).

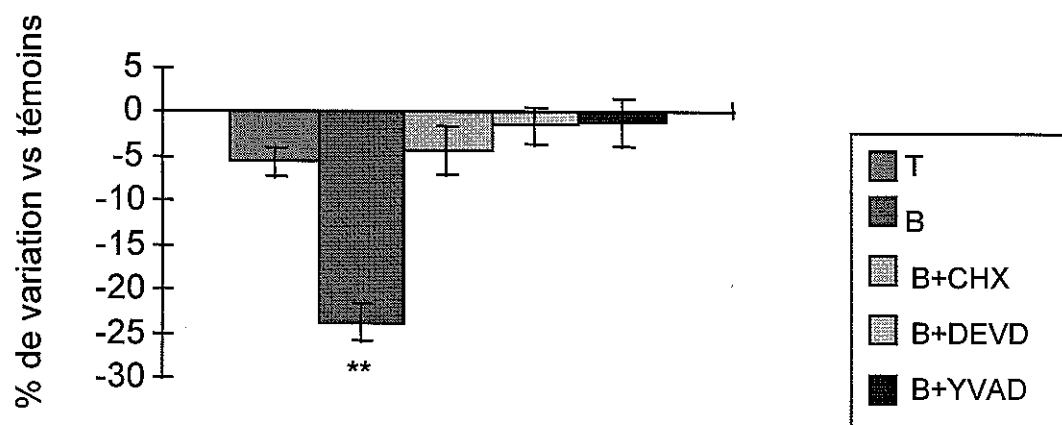


Figure 45 : Conséquences des traitements par la cycloheximide et les inhibiteurs de caspases sur la toxicité de la bilirubine.

Valeurs moyennes $\pm$ DS obtenues à partir de 5 expériences minimum, chacune utilisant plus de 5 boîtes de cultures.

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, (Test de Student)

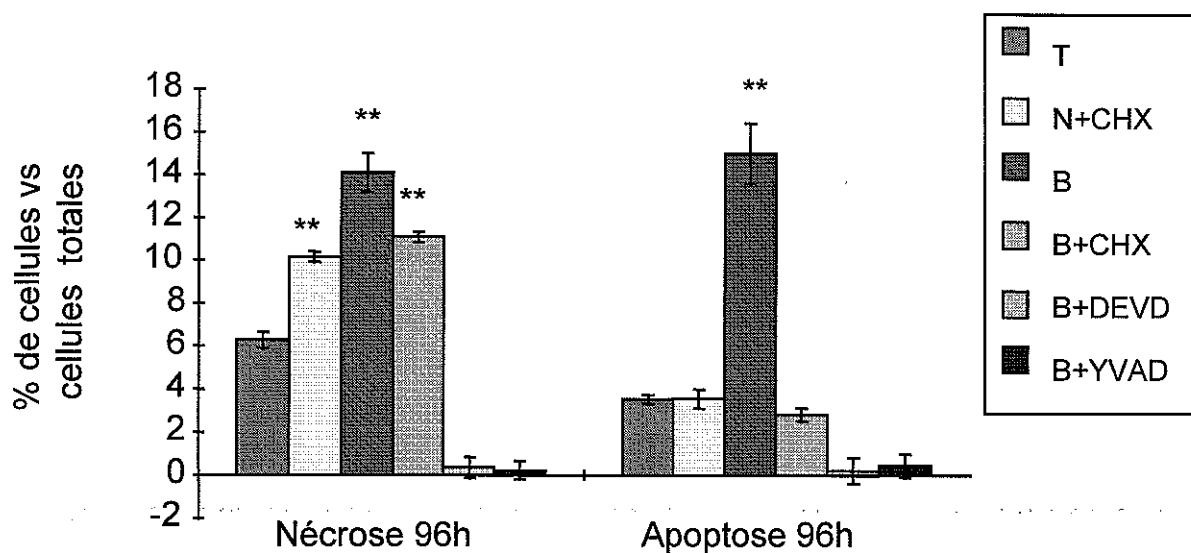


Figure 46 : Effet de la bilirubine sur les taux de nécrose et d'apoptose.

Valeurs moyennes $\pm$ DS obtenues à partir de 5 expériences minimum, chacune utilisant plus de 5 boîtes de cultures.

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, (Test de Student)

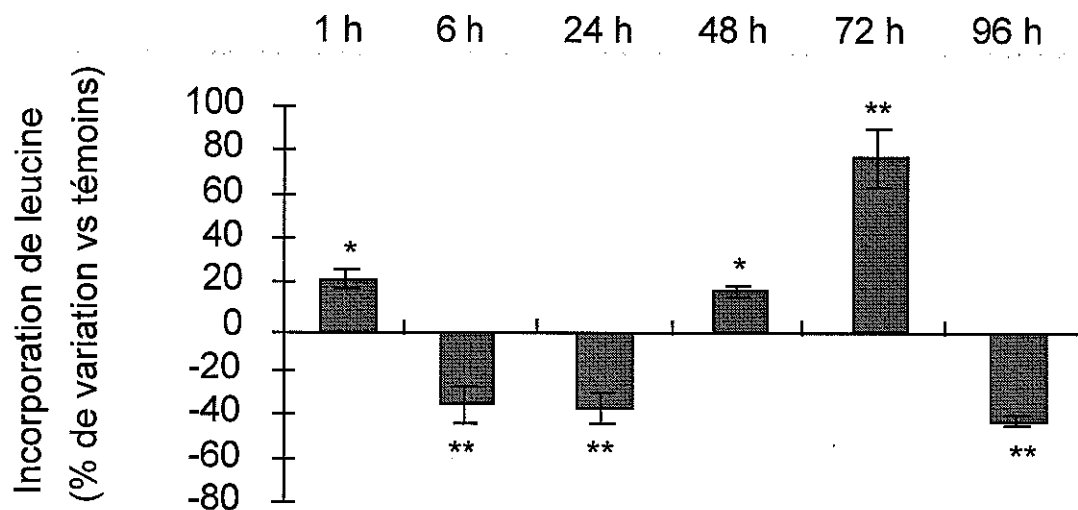


Figure 47 : Variation des taux de synthèse protéique des neurones exposés à la bilirubine, reflétée par l'incorporation de leucine [3H].

Valeurs moyennes +/- DS obtenues à partir de 3 expériences minimum, chacune utilisant plus de 5 boîtes de cultures.

** : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, (Test de Student)*

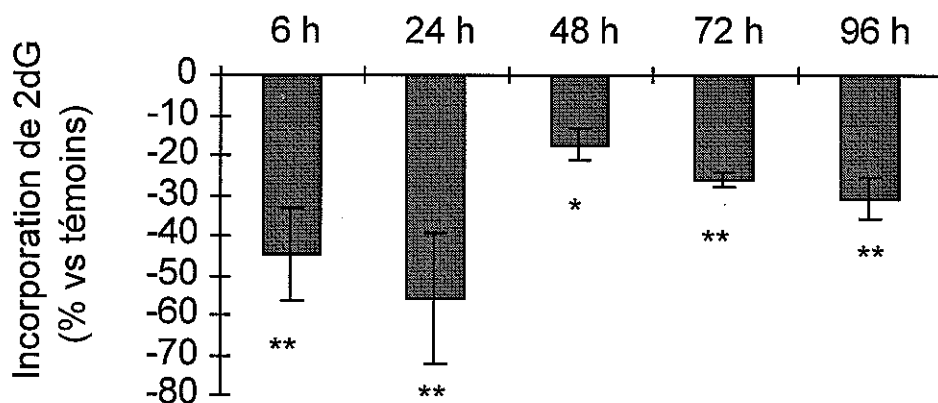


Figure 48 : Evolution du métabolisme énergétique des neurones exposés à la bilirubine, analysé par l'incorporation de 2-dG[3H].

Valeurs moyennes +/- DS obtenues à partir de 3 expériences minimum, chacune utilisant plus de 5 boîtes de cultures.

** : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, (Test de Student)*

5) ETUDE DE L'ACTIVITE FONCTIONNELLE DES NEURONES

Au 6^{ème} jour de culture, les témoins normoxiques présentent un prélèvement de 2dG [³H] de l'ordre de 61 nmol/mg de protéines. Ce taux reste stable jusqu'au 10^{ème} jour de culture. Les neurones soumis à la bilirubine présentent un métabolisme diminué par rapport aux témoins à 6 et 24 heures (-44,8 et -55,8%) qui tend à remonter à 48 heures tout en restant inférieur aux témoins (-17,3%). La diminution du métabolisme tend de nouveau à s'accroître pour atteindre à 96 heures une moyenne de -30,7% (fig 48).

6) FRAGMENTATION DE L'ADN

L'exposition des neurones à la bilirubine provoque une diminution significative du prélèvement et de l'incorporation de thymidine tritiée dès 24 heures pour atteindre -41 et -71% respectivement à 96 heures (fig 49). En parallèle, on observe une augmentation significative du marquage radioactif dans le milieu de culture atteignant 22% à 96 heures.

B) TOXICITE DE LA BILIRUBINE ASSOCIEE A UN EPISODE HYPOXIQUE DE 6 HEURES

1) VIABILITE CELLULAIRE

Sur des neurones au 6^{ème} jour de culture, une hypoxie de 6 heures engendre une diminution significative de la viabilité cellulaire à partir de 72 heures, qui s'amplifie à 96 heures pour atteindre 21% par rapport aux cultures témoins (fig 50). Lors d'une exposition à la bilirubine conjointement à une hypoxie de 6 heures, on enregistre une diminution significative de la viabilité cellulaire par rapport aux témoins dès 48 heures. Elle est significativement différente de celle obtenue avec l'hypoxie ou la bilirubine seule. La diminution de la viabilité s'accroît jusqu'à 96 heures (-34,5%).

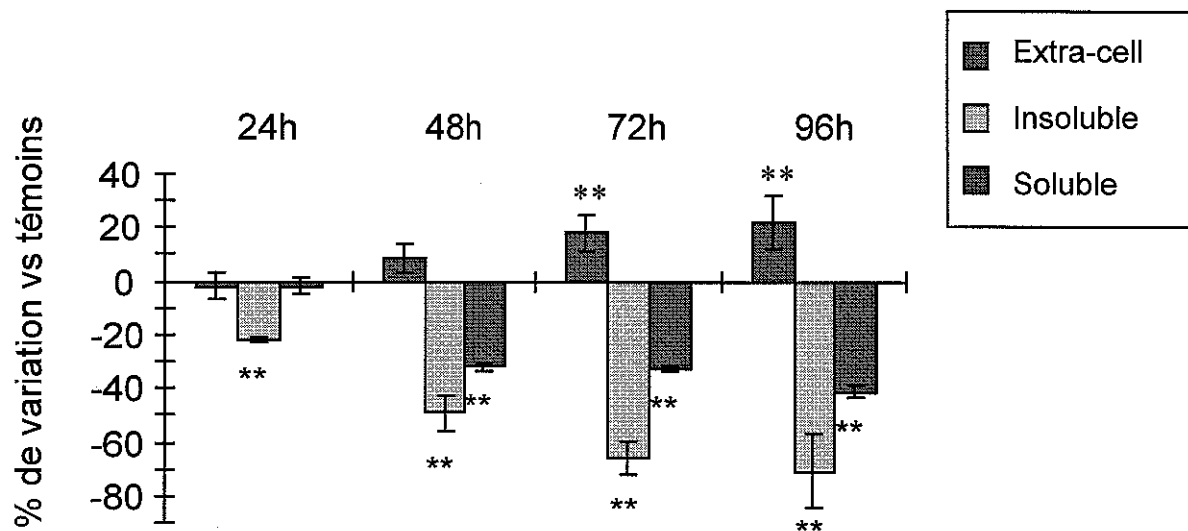


Figure 49 : Conséquences d'une exposition à la bilirubine sur le prélèvement, l'incorporation nucléaire de thymidine tritiée et sa libération dans le milieu de culture.

Valeurs moyennes +/- DS obtenues à partir de 3 expériences minimum, chacune utilisant plus de 5 boîtes de cultures.

** : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, (Test de Student)*

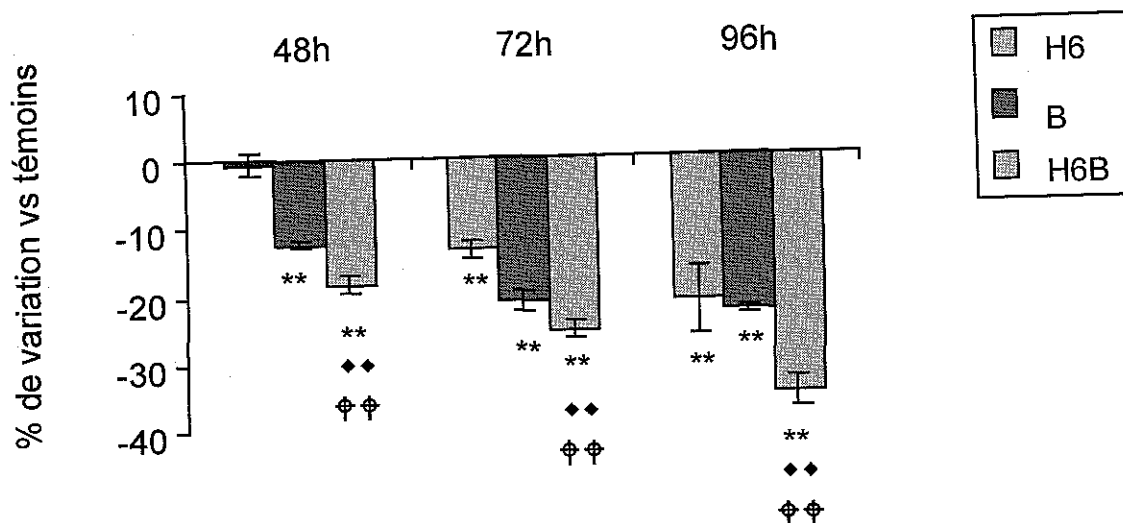


Figure 50 : Conséquence d'une exposition à la bilirubine associée à une hypoxie de 6 heures sur la viabilité cellulaire des neurones.

Valeurs moyennes +/- DS obtenues à partir de 3 expériences minimum, chacune utilisant plus de 5 boîtes de cultures.

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, vs témoins

♦ : $p < 0.05$, ♦♦ : $p < 0.01$, vs bilirubine

⊕ : $p < 0.05$, ⊕⊕ : $p < 0.01$, vs hypoxie

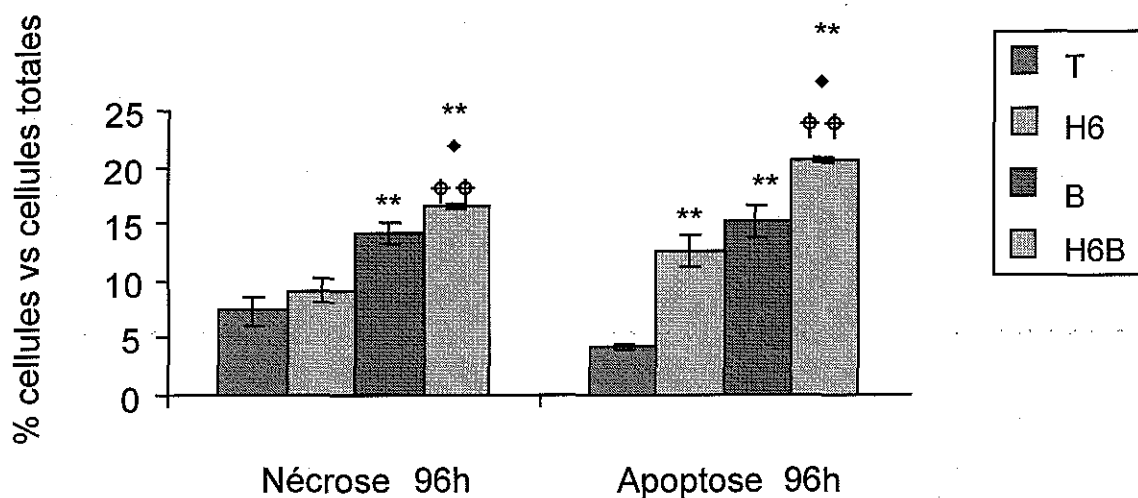


Figure 51 : Effet de la bilirubine associée à une hypoxie de 6 heures sur les taux de nécrose et d'apoptose des neurones.

Valeurs moyennes +/- DS obtenues à partir de 3 expériences minimum, chacune utilisant plus de 5 boîtes de cultures.

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, vs témoins

♦ : $p < 0.05$, ♦♦ : $p < 0.01$, vs bilirubine

⊕ : $p < 0.05$, ⊕⊕ : $p < 0.01$, vs hypoxie

2) CARACTERISTIQUES DE LA MORT CELLULAIRE

L'hypoxie de 6 heures entraîne une augmentation du taux de cellules apoptotiques, de l'ordre de 14% des cellules totales.

Lors d'une exposition à la bilirubine et à une hypoxie de 6 heures, on observe une augmentation significative par rapport aux témoins des taux de cellules nécrosées et apoptotiques, respectivement 17 et 22% des cellules totales.

Les valeurs sont différentes de ce que l'on obtient avec l'hypoxie ou la bilirubine seule (fig 51).

3) EVOLUTION DE LA SYNTHÈSE PROTÉIQUE

Les neurones soumis à une hypoxie de 6 heures présentent une synthèse protéique augmentée de 43,9% par rapport aux témoins dès 1 heure d'hypoxie puis de 50,4% après 48 heures de réoxygénation (fig 52).

Dans les neurones ayant subi la double agression, le taux de synthèse protéique est stimulé de 53% dès 1 heure d'exposition, dans des proportions comparables à ce que l'on obtient avec l'hypoxie seule.

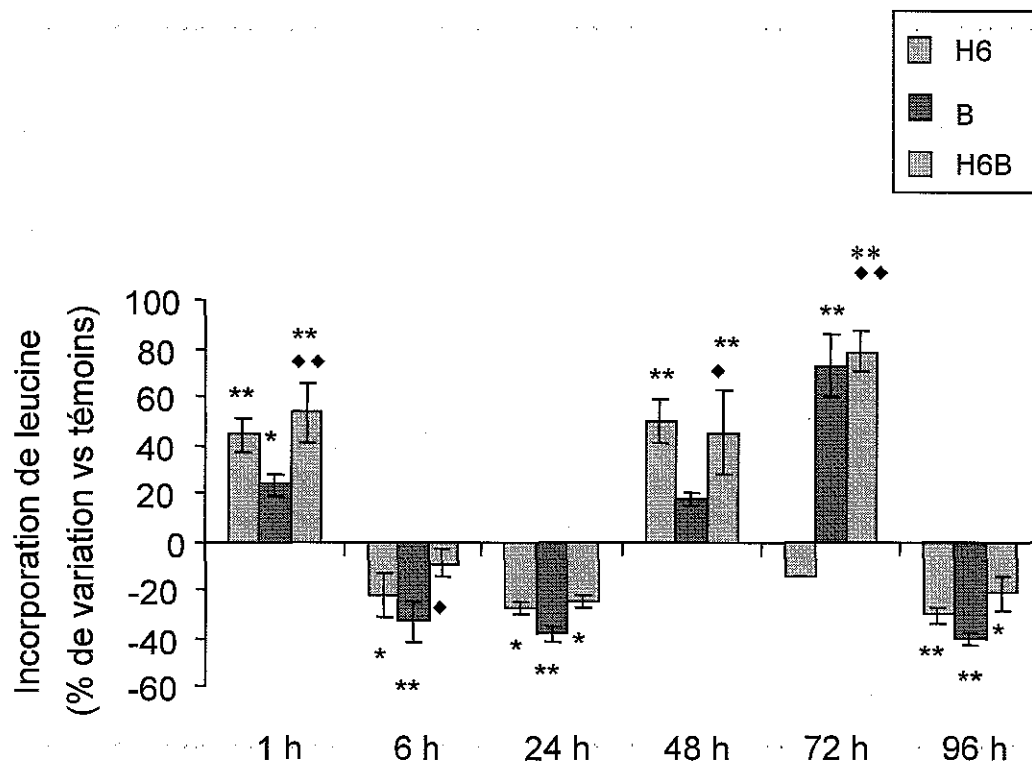


Figure 52 : Variation des taux de synthèse protéique des neurones exposés à la bilirubine et à une hypoxie de 6 heures.

Valeurs moyennes +/- DS obtenues à partir de 3 expériences minimum, chacune utilisant plus de 5 boîtes de cultures.

** : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, vs témoins*

♦ : $p < 0.05$, ♦♦ : $p < 0.01$, vs bilirubine

⬢ : $p < 0.05$, ⬢⬢ : $p < 0.01$, vs hypoxie

4) ETUDE DE L'ACTIVITE FONCTIONNELLE DES NEURONES

Le métabolisme des neurones exposés à l'hypoxie de 6 heures est nettement augmenté par rapport aux témoins à 6 et 24 heures. L'incorporation de 2dG diminue ensuite progressivement jusqu'à atteindre -38,6% à 96 heures (fig 53). Lorsque la bilirubine est associée à une hypoxie de 6 heures, les neurones présentent jusqu'à 24 heures un métabolisme augmenté par rapport aux témoins et les variations sont comparables à celles obtenues avec l'hypoxie seule. L'incorporation de 2dG tend à diminuer à 48 heures et devient significativement différent des valeurs mesurées avec l'hypoxie ou la bilirubine seule. L'incorporation de 2dG est inférieure aux témoins à 96 heures.

C) IMPLICATION DES RECEPTEURS NMDA ET NON-NMDA DU GLUTAMATE DANS LA NEUROTOXICITE DE LA BILIRUBINE ASSOCIEE OU NON A UNE HYPOXIE DE 6 HEURES

1) VIABILITE CELLULAIRE

Le glutamate engendre une diminution de la viabilité cellulaire après 96 heures (-15%) d'exposition. La diminution est significativement réduite en présence de l'antagoniste des récepteurs NMDA, c'est-à-dire de MK801 (fig 54). La baisse de viabilité liée à la bilirubine (-17%) est atténuée par l'administration de MK801, dès 48 heures (-10%) pour devenir comparable aux témoins à 96 heures. La diminution de viabilité à 96 heures après à une hypoxie de 6 heures (-22%) n'est pas significativement atténuée par la présence de MK801 (fig 55).

La diminution de viabilité liée à une exposition au glutamate n'est pas atténuée par la présence d'antagonistes des récepteurs non NMDA, tels que NBQX. L'administration de NBQX conjointement à l'exposition à la bilirubine ou à une hypoxie ne réduit pas la diminution de viabilité cellulaire obtenue pour l'une ou l'autre des agressions (fig 56).

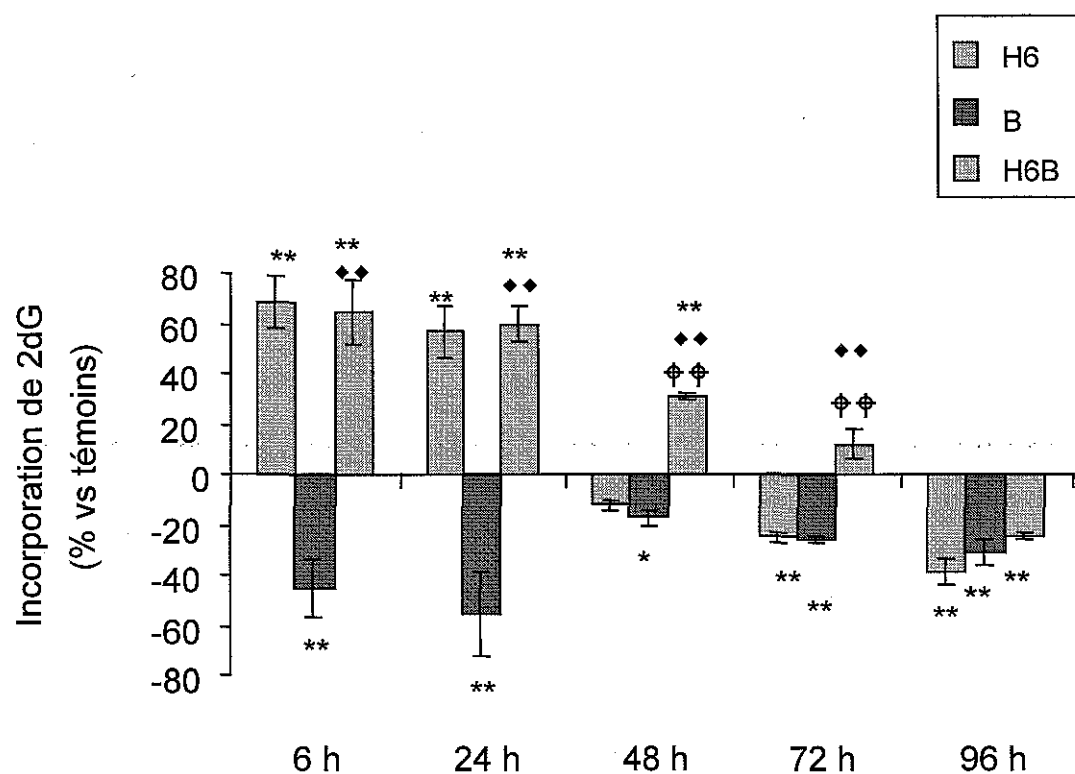


Figure 53 : Evolution du métabolisme énergétique des neurones analysé par l'incorporation de 2dG [^3H] après exposition à la bilirubine et à une hypoxie de 6 heures.

Valeurs moyennes +/- DS obtenues à partir de 3 expériences minimum, chacune utilisant plus de 5 boîtes de cultures.

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, vs témoins

♦ : $p < 0.05$, ♦♦ : $p < 0.01$, vs bilirubine

⚡ : $p < 0.05$, ⚡⚡ : $p < 0.01$, vs hypoxie

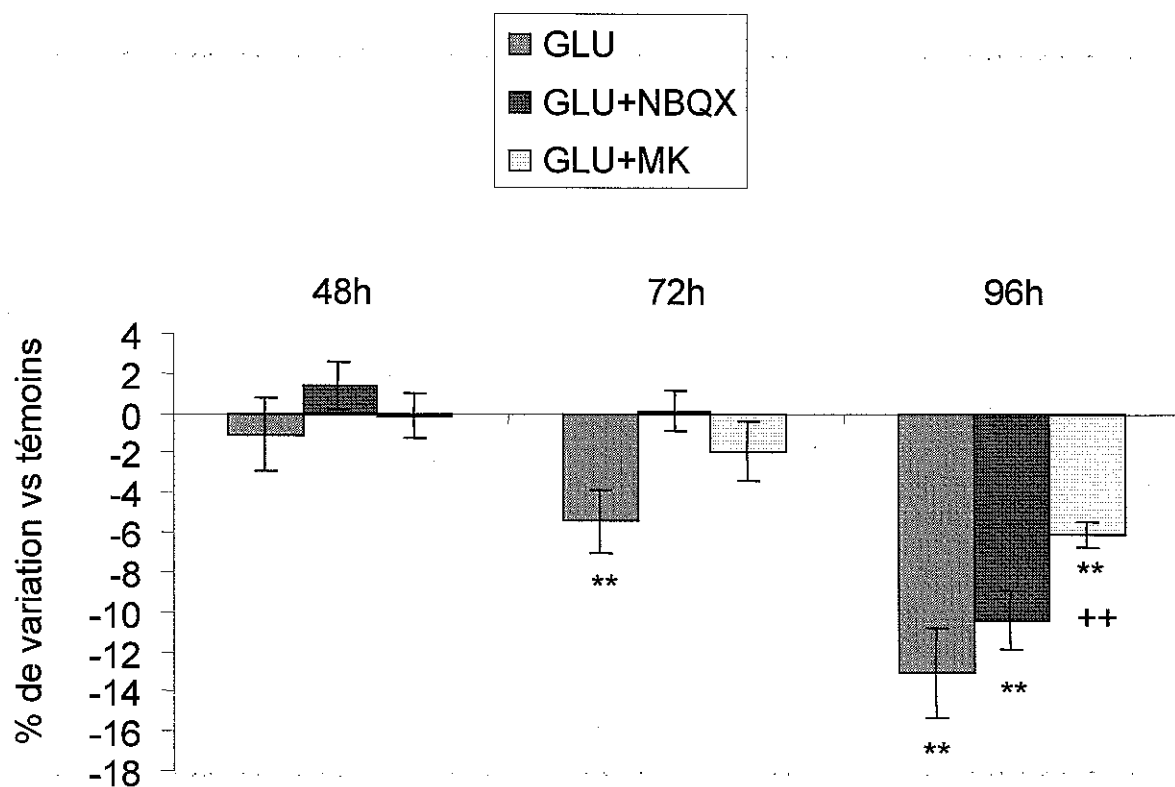


Figure 54 : Effet du glutamate et des antagonistes de ses récepteurs, MK801 et NBQX sur la viabilité des neurones exposés à la bilirubine associée ou non à une hypoxie de 6 heures.

Valeurs moyennes +/- DS obtenues à partir de 3 expériences minimum, chacune utilisant plus de 5 boîtes de cultures.

** : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, vs témoins*

+ : $p < 0.05$, ++ : $p < 0.01$, vs glutamate

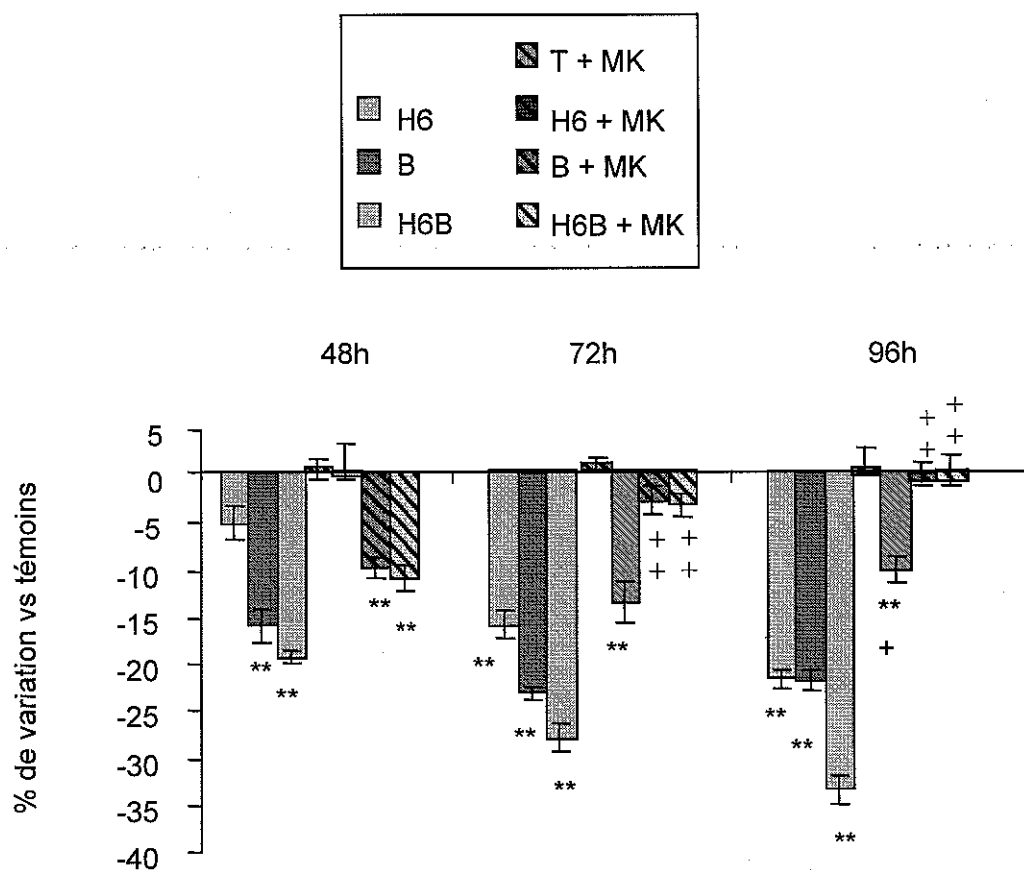


Figure 55 : Effet d'un antagoniste des récepteurs NMDA (MK801) sur la viabilité des neurones exposés à la bilirubine associée ou non à une hypoxie de 6 heures.

Valeurs moyennes +/- DS obtenues à partir de 3 expériences minimum, chacune utilisant plus de 5 boîtes de cultures.

** : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, vs témoins*

+: $p < 0.05$, ++ : $p < 0.01$, vs non traités MK801

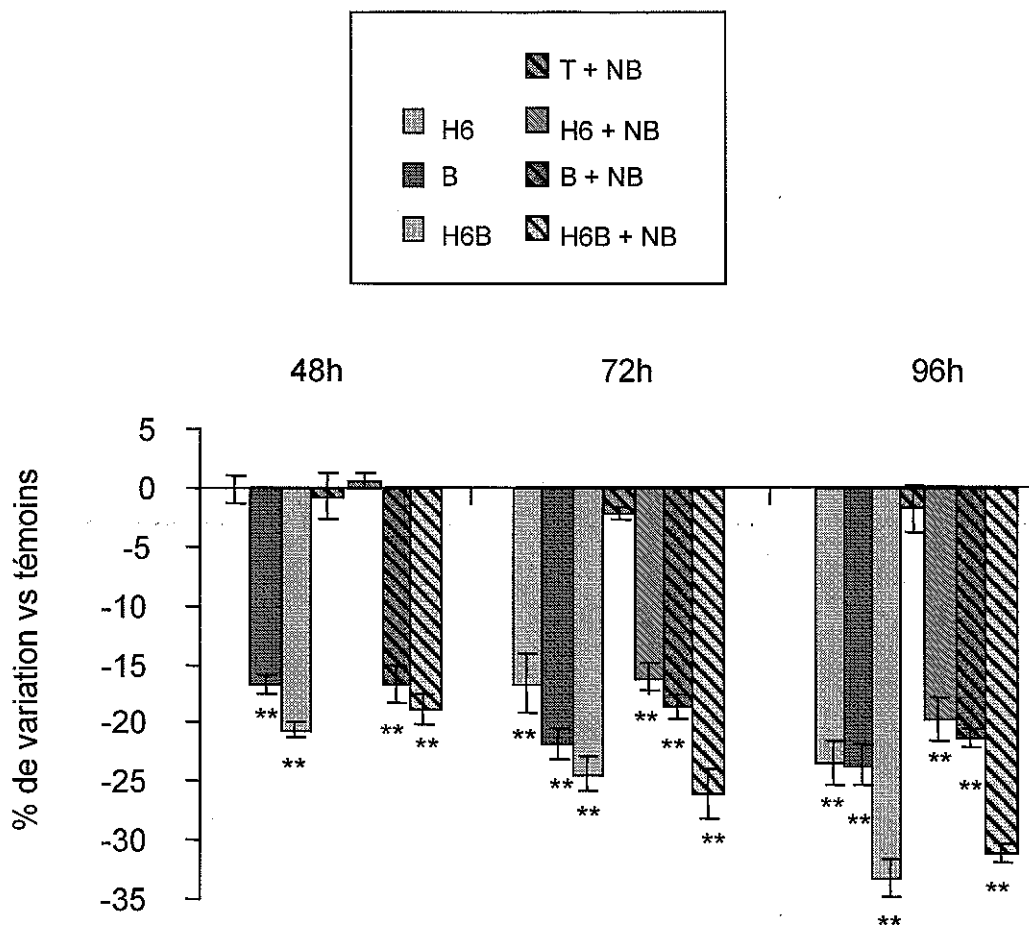


Figure 56: Effet d'un antagoniste des récepteurs non NMDA (NBQX) sur la viabilité des neurones exposés à la bilirubine associée ou non à une hypoxie de 6 heures.

Valeurs moyennes $\pm$ DS obtenues à partir de 3 expériences minimum, chacune utilisant plus de 5 boîtes de cultures.

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, vs témoins

+: $p < 0.05$, ++ : $p < 0.01$, vs non traités NBQX

2) CARACTERISTIQUES DE LA MORT CELLULAIRE

L'augmentation de nécrose et d'apoptose liée à la bilirubine (respectivement 12,5 et 15%) est totalement abolie par la présence de MK80, avec des valeurs comparable aux témoins à 96 heures.

Le MK801 a également un effet bénéfique sur les taux de nécrose et d'apoptose liés à l'association de la bilirubine à une hypoxie de 6 heures (7% et 3,5% vs 17,3 et 23%) alors qu'il n'a pas d'effet sur les taux de cellules dégénérées obtenus avec l'hypoxie seule (fig 57).

En revanche, l'administration de NBQX n'a aucun effet protecteur sur les taux de cellules nécrotiques et apoptotiques augmentés suite à l'exposition à la bilirubine, à l'hypoxie ou à l'association des deux (fig 58).

D) TOXICITE DE LA BILIRUBINE ASSOCIEE A UN EPISODE HYPOXIQUE DE 3 HEURES

1) VIABILITE CELLULAIRE

Contrairement à une hypoxie de 6 heures, l'hypoxie de 3 heures engendre une augmentation de la viabilité cellulaire à partir de 72 heures et qui s'accroît jusqu'à 96 heures pour atteindre en moyenne 31,8% au delà des cultures témoins (fig 59).

Les neurones ayant subi une exposition à la bilirubine et à l'hypoxie de 3 heures présentent une viabilité réduite par rapport aux témoins dès 48 heures. La baisse de viabilité est comparable à celle mesurée avec la bilirubine seule. A 72 et 96 heures, la diminution de viabilité par rapport aux témoins est accentuée et devient significativement différentes de celle obtenue avec la bilirubine seule.

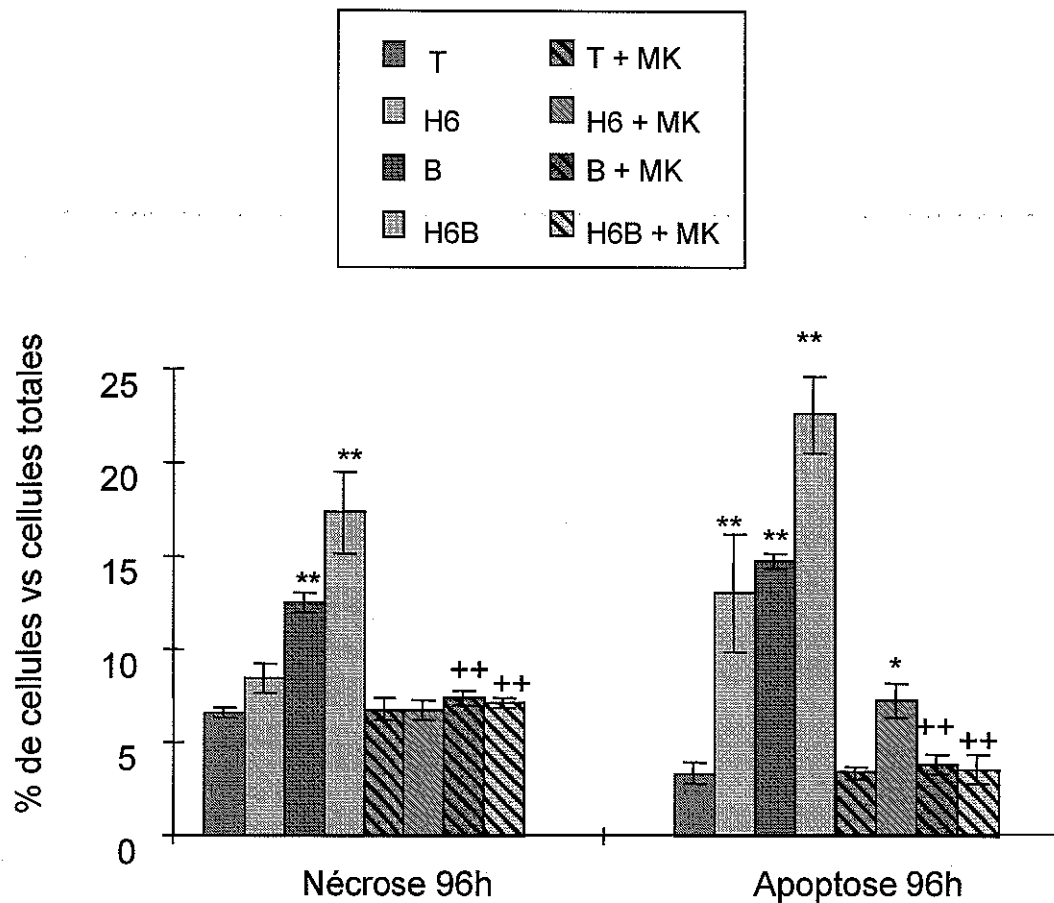


Figure 57: Effet d'un antagoniste des récepteurs NMDA (MK801) sur les taux de nécrose et d'apoptose des neurones exposés à la bilirubine associée ou non à une hypoxie de 6 heures.

Valeurs moyennes +/- DS obtenues à partir de 3 expériences minimum, chacune utilisant plus de 5 boîtes de cultures.

** : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, vs témoins*

+: $p < 0.05$, ++ : $p < 0.01$, vs non traités MK801

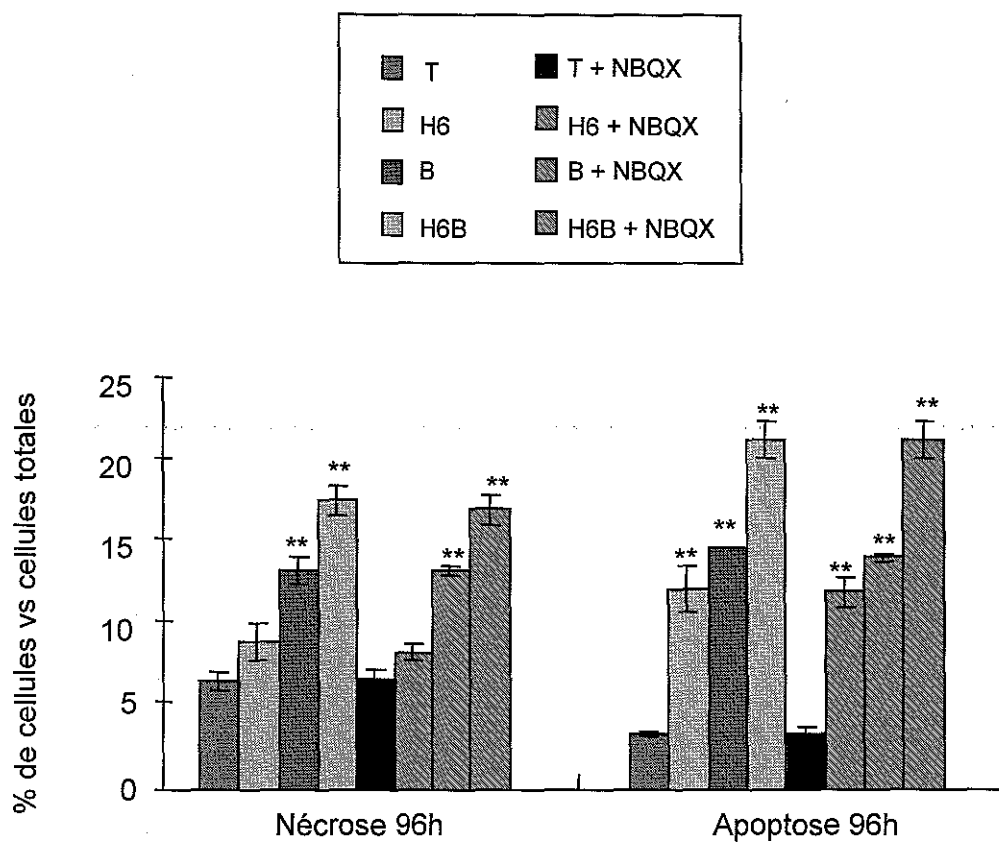


Figure 58 : Effet d'un antagoniste des récepteurs non NMDA (NBQX) sur les taux de nécrose et d'apoptose des neurones exposés à la bilirubine associée ou non à une hypoxie de 6 heures.

Valeurs moyennes +/- DS obtenues à partir de 3 expériences minimum, chacune utilisant plus de 5 boîtes de cultures.

** : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, vs témoins*

+: $p < 0.05$, ++ : $p < 0.01$, vs non traités NBQX

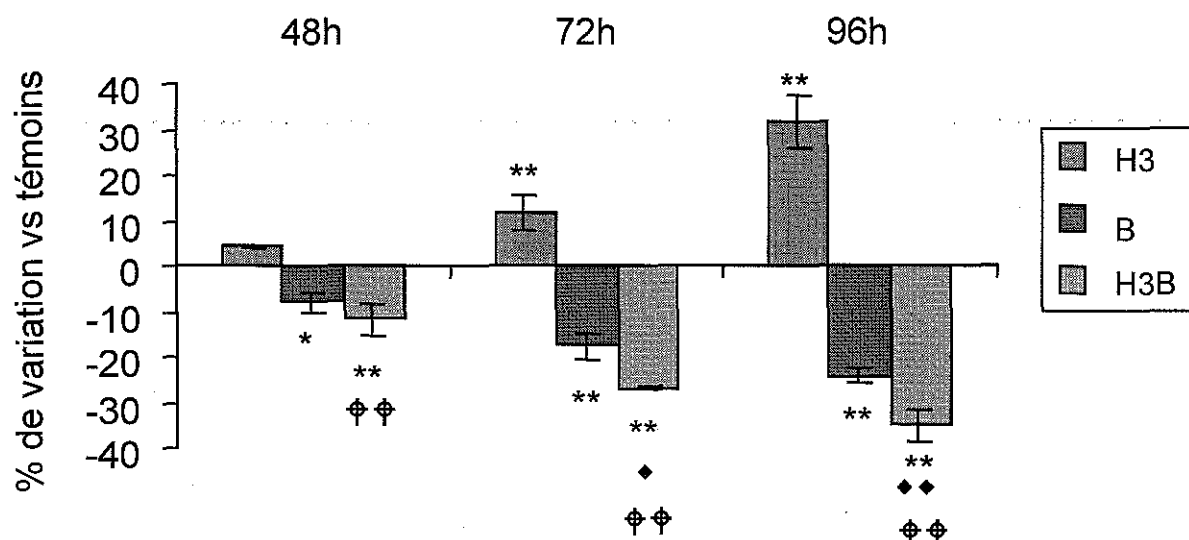


Figure 59 : Conséquence d'une exposition à la bilirubine associée à une hypoxie de 3 heures sur la viabilité cellulaire des neurones.

Valeurs moyennes $\pm$ DS obtenues à partir de 3 expériences minimum, chacune utilisant plus de 5 boîtes de cultures.

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, vs témoins

♦ : $p < 0.05$, ♦♦ : $p < 0.01$, vs bilirubine

⊕ : $p < 0.05$, ⊕⊕ : $p < 0.01$, vs hypoxie

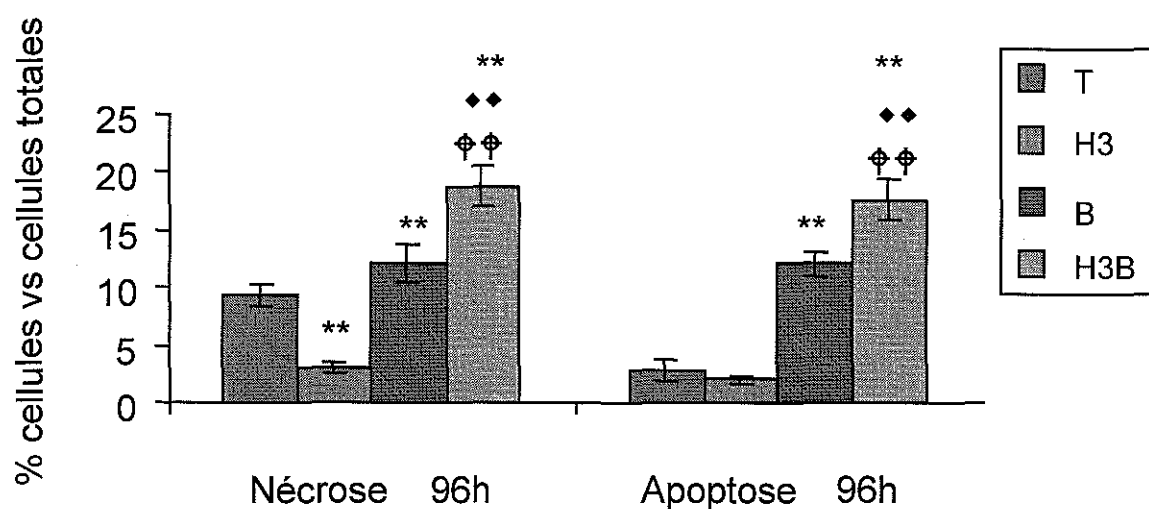


Figure 60 : Effet de la bilirubine associée à une hypoxie de 3 heures sur les taux de nécrose et d'apoptose des neurones.

Valeurs moyennes $\pm$ DS obtenues à partir de 3 expériences minimum, chacune utilisant plus de 5 boîtes de cultures.

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, vs témoins

♦ : $p < 0.05$, ♦♦ : $p < 0.01$, vs bilirubine

⊕ : $p < 0.05$, ⊕⊕ : $p < 0.01$, vs hypoxie

2) CARACTERISTIQUES DE LA MORT CELLULAIRE

Les neurones exposés à 3 heures d'hypoxie présentent un taux de nécrose significativement inférieur aux témoins dès 72 heures post-hypoxie.

Aucune différence n'est à noter entre les taux d'apoptose des cellules exposées à l'hypoxie et les cellules témoins (fig 60).

L'association de la bilirubine à une hypoxie de 3 heures provoque une augmentation du nombre de cellules nécrotiques à partir de 72 heures pour atteindre 18,8% vs 8,3% pour les témoins à 96 heures.

L'apoptose est quant à elle augmentée dès 48 heures pour culminer à 17,6% vs 3,8% pour les témoins à 96 heures.

Les taux de nécrose et d'apoptose, obtenus par combinaison de la bilirubine et d'une hypoxie de 3 heures, sont significativement supérieurs à ceux obtenus avec la bilirubine seule.

3) EVOLUTION DE LA SYNTHÈSE PROTEIQUE

L'hypoxie de 3 heures engendre une augmentation de 34% de la synthèse protéique dès 1 heure après le début de l'hypoxie. Après une diminution de synthèse qui débute dès la réoxygénation et jusqu'à 48 heures, une nouvelle augmentation est observée avec un pic à 72 heures (63,5%).

Le profil de synthèse protéique obtenu suite à l'association bilirubine et hypoxie de 3 heures est comparable à celui obtenu avec l'hypoxie seule (fig 61).

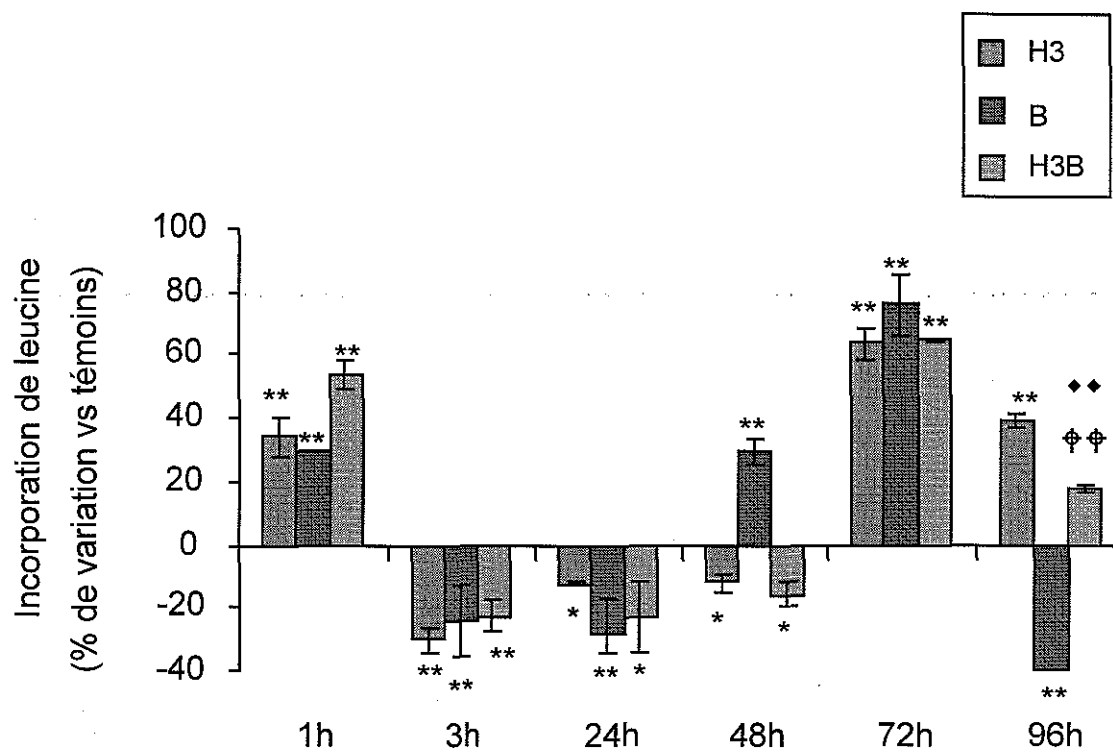


Figure 61 : Variation des taux de synthèse protéique des neurones exposés à la bilirubine et à une hypoxie de 3 heures.

Valeurs moyennes +/- DS obtenues à partir de 3 expériences minimum, chacune utilisant plus de 5 boîtes de cultures.

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, vs témoins

◆ : $p < 0.05$, ◆◆ : $p < 0.01$, vs bilirubine

⋄ : $p < 0.05$, ⋄◆ : $p < 0.01$, vs hypoxie

4) ETUDE DE L'ACTIVITE FONCTIONNELLE DES NEURONES

Le métabolisme des neurones exposés à l'hypoxie de 3 heures est augmenté de 19 % par rapport aux témoins à la fin de l'hypoxie. L'incorporation de 2dG diminue ensuite progressivement jusqu'à atteindre -33,6% à 96 heures (fig 62).

Lorsque la bilirubine est associée à une hypoxie de 3 heures, les neurones présentent un profil de l'activité fonctionnelle similaire à celui de l'hypoxie seule, c'est-à-dire une augmentation à 3 heures pour diminuer ensuite progressivement.

E) IMPLICATION DES RECEPTEURS NMDA ET NON-NMDA DU GLUTAMATE DANS LA NEUROTOXICITE DE LA BILIRUBINE ASSOCIEE OU NON A UNE HYPOXIE DE 3 HEURES

1) VIABILITE CELLULAIRE

L'administration de MK801 avant l'épisode hypoxique inhibe l'augmentation de viabilité constaté avec l'hypoxie seule, dès 48 heures. Administré conjointement à la bilirubine, la viabilité redevient comparable à celle des témoins, à partir de 48 heures.

Lorsque les neurones sont exposés à la double agression, bilirubine et hypoxie, le MK801 permet d'obtenir une viabilité similaire à celle des témoins (-1,5% à 96 heures) (fig 63).

En revanche, l'administration de NBQX au milieu de culture ne protège pas les neurones soumis à la bilirubine, la viabilité étant comparable à ce que l'on obtient avec la bilirubine seule. Lorsqu'il est ajouté avant l'épisode hypoxique, il empêche l'augmentation de viabilité observée suite à l'hypoxie seule. NBQX ne protège pas les neurones exposés à la bilirubine et à l'hypoxie (fig 64).

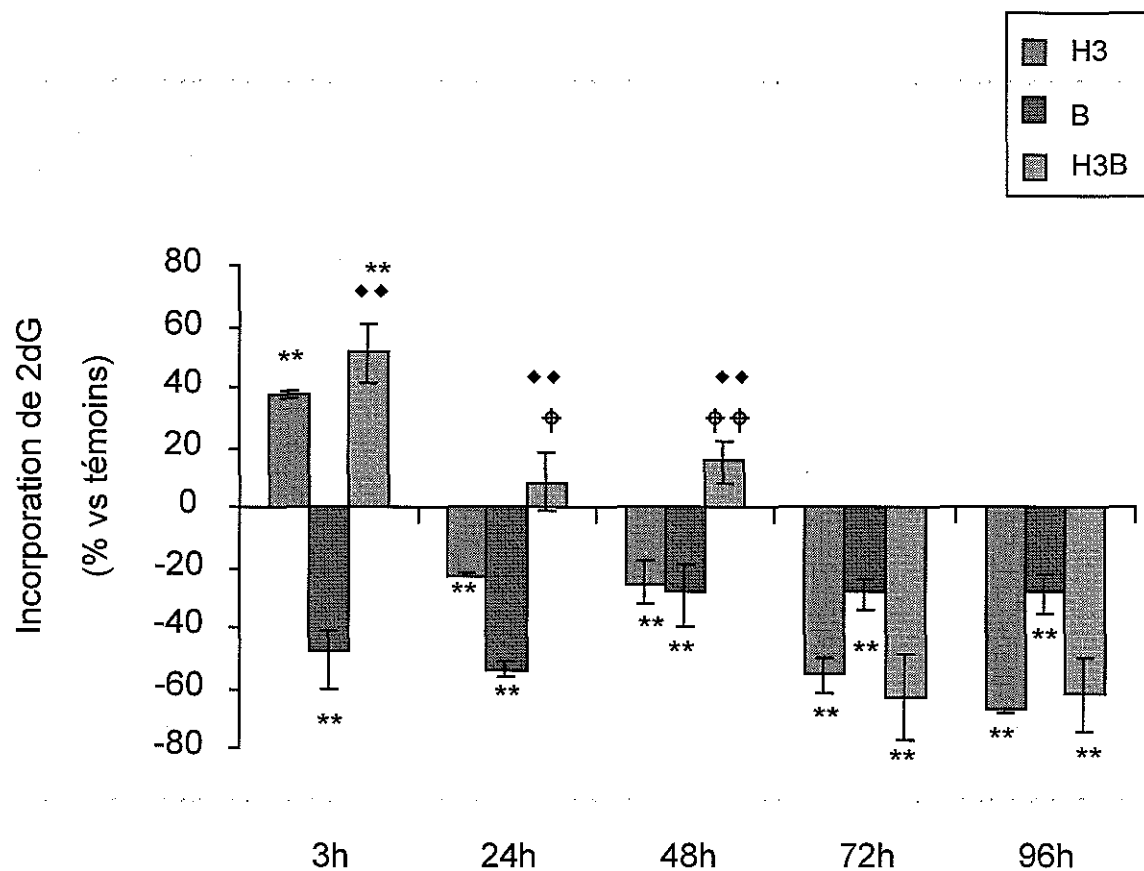


Figure 62 : Evolution du métabolisme énergétique des neurones analysé par l'incorporation de 2dG [^3H] après exposition à la bilirubine et à une hypoxie de 3 heures.

Valeurs moyennes $\pm$ DS obtenues à partir de 3 expériences minimum, chacune utilisant plus de 5 boîtes de cultures.

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, vs témoins

♦ : $p < 0.05$, ♦♦ : $p < 0.01$, vs bilirubine

⊕ : $p < 0.05$, ⊕⊕ : $p < 0.01$, vs hypoxie

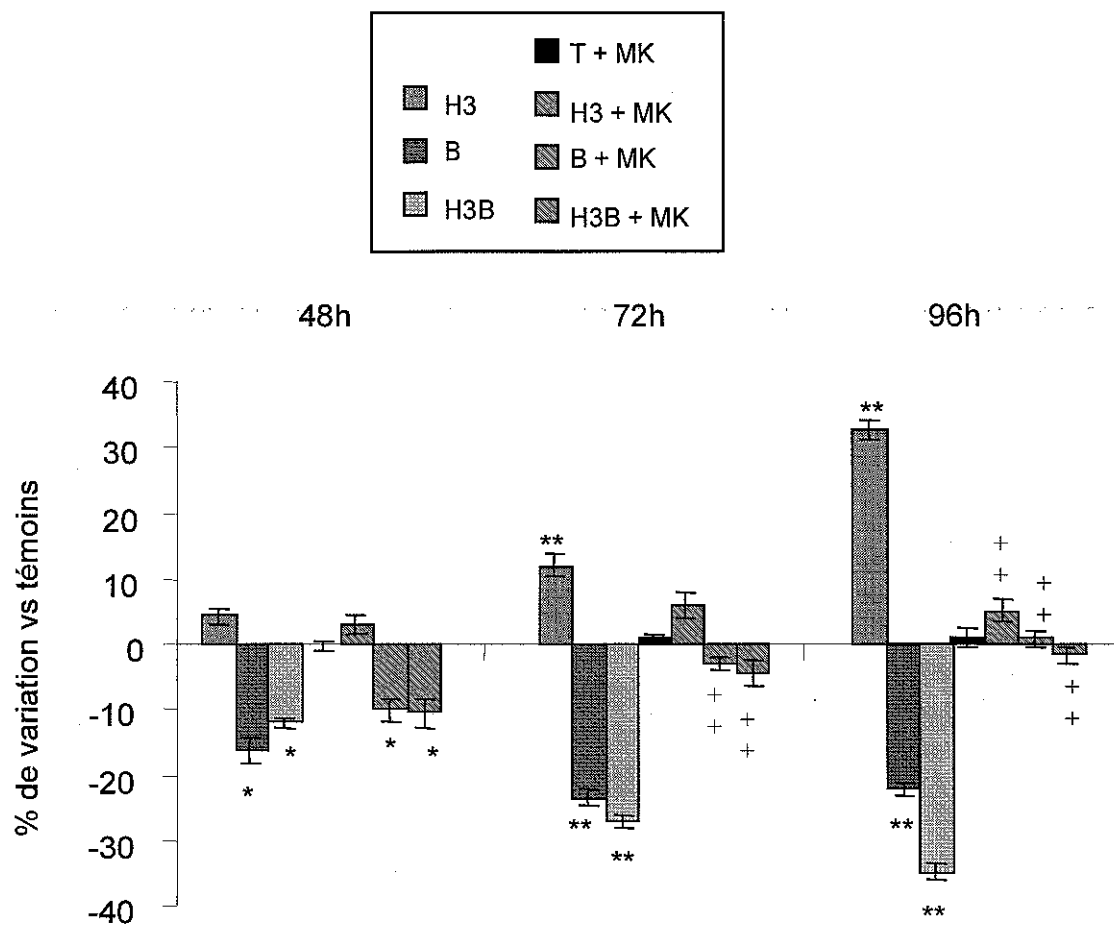


Figure 63 : Effet d'un antagoniste des récepteurs NMDA (MK801) sur la viabilité des neurones exposés à la bilirubine associée ou non à une hypoxie de 3 heures.

Valeurs moyennes $\pm$ DS obtenues à partir de 3 expériences minimum, chacune utilisant plus de 5 boîtes de cultures.

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, vs témoins

+: $p < 0.05$, ++ : $p < 0.01$, vs non traités MK801

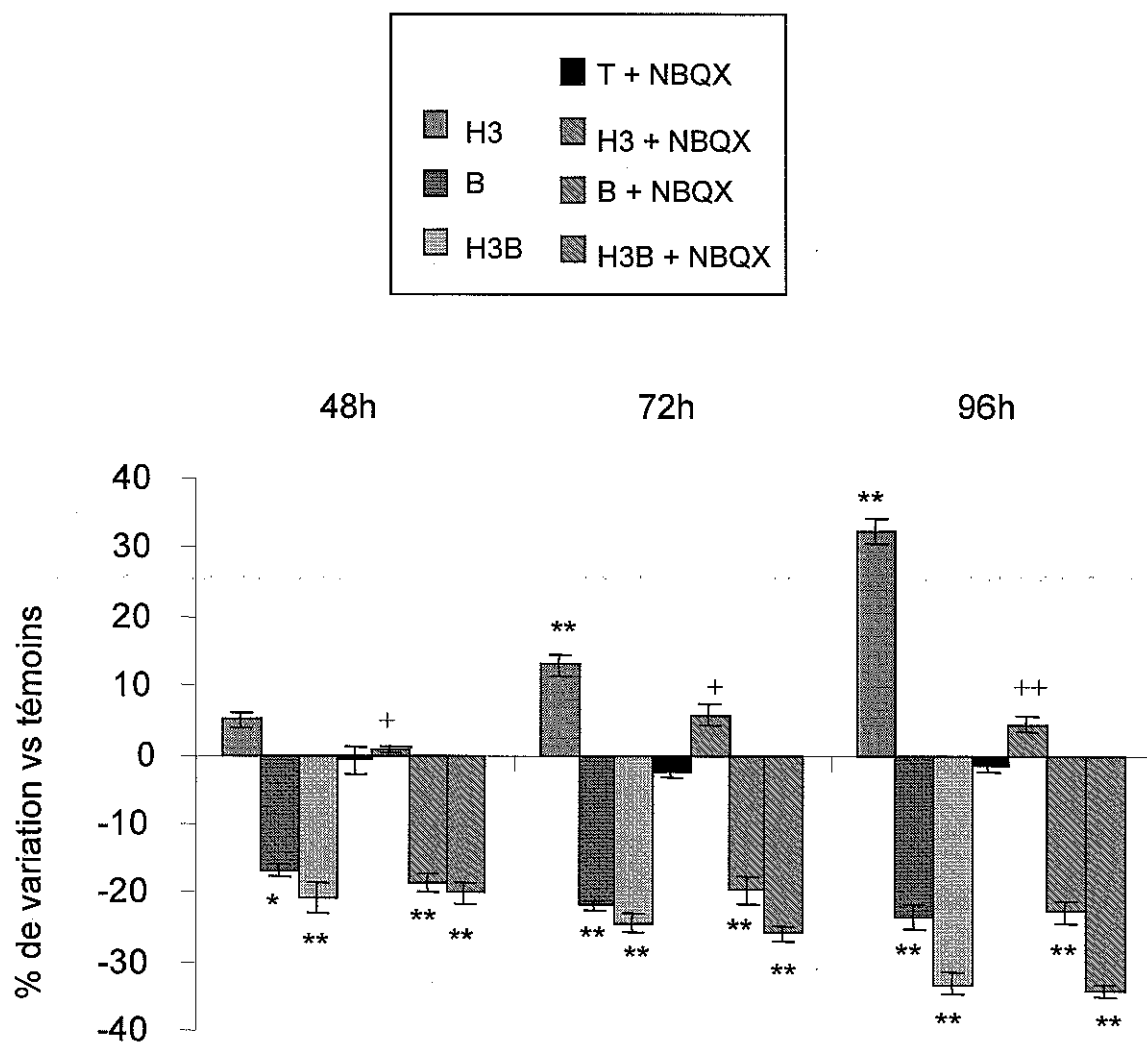


Figure 64 : Effet d'un antagoniste des récepteurs non-NMDA (NBQX) sur la viabilité des neurones exposés à la bilirubine associée ou non à une hypoxie de 3 heures.

Valeurs moyennes +/- DS obtenues à partir de 3 expériences minimum, chacune utilisant plus de 5 boîtes de cultures.

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, vs témoins
+ : $p < 0.05$, ++ : $p < 0.01$, vs non traités NBQX

2) CARACTERISTIQUES DE LA MORT CELLULAIRE

Lorsque MK801 est administré conjointement à la bilirubine, on observe une diminution des taux de nécrose de 12,5 à 7,4% et d'apoptose de 14,8 à 3,8%. Les taux de cellules nécrosées et apoptotiques des neurones exposés à l'hypoxie sont augmentés par le MK801 à des valeurs comparables aux témoins.

Le pourcentage de cellules nécrosées consécutifs à une exposition par la bilirubine et l'hypoxie est lui aussi réduit à des valeurs témoins (de 18,8% à 6,7%) ; tout comme le taux de cellules apoptotiques (de 17,6% à 3,5%) (fig 65).

Le pourcentage de nécrose et d'apoptose ne diminue pas de façon significative avec l'administration de NBQX, aussi bien dans les neurones exposés à la bilirubine ou à l'hypoxie que dans ceux exposés à la double agression (fig 66).

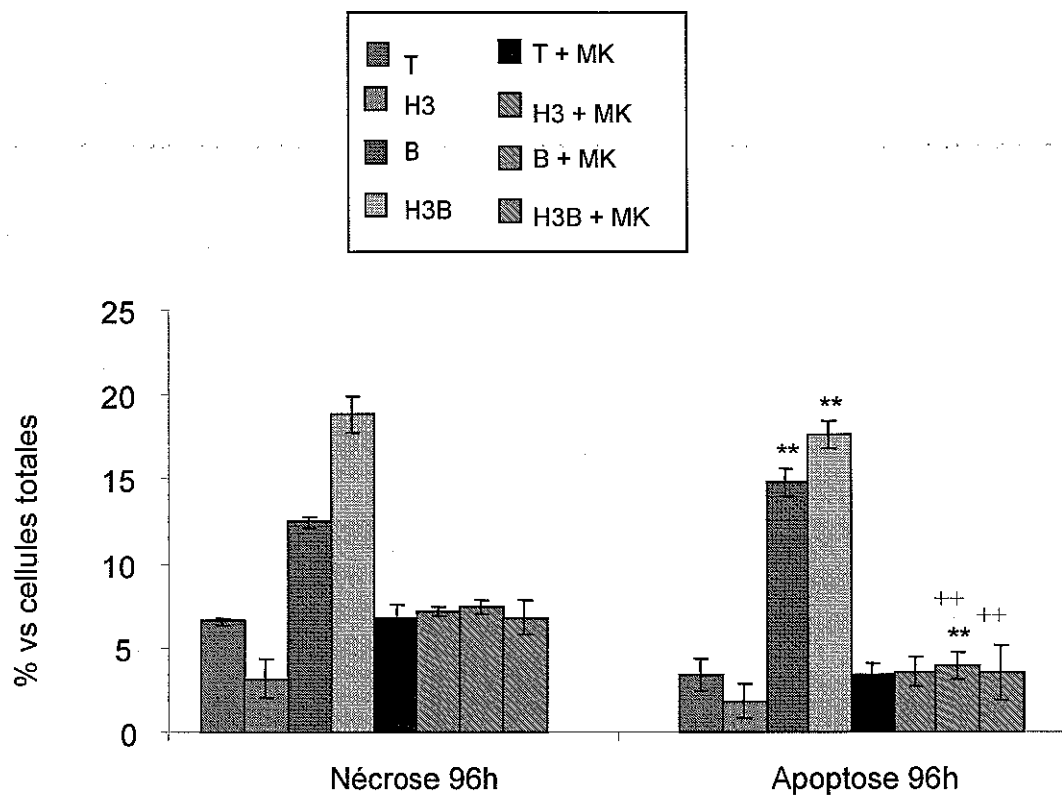


Figure 65 : Effet d'un antagoniste des récepteurs NMDA (MK801) sur les taux de nécrose et d'apoptose des neurones exposés à la bilirubine associée ou non à une hypoxie de 3 heures.

Valeurs moyennes +/- DS obtenues à partir de 3 expériences minimum, chacune utilisant plus de 5 boîtes de cultures.

** : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, vs témoins*

+: $p < 0.05$, ++ : $p < 0.01$, vs non traités MK801

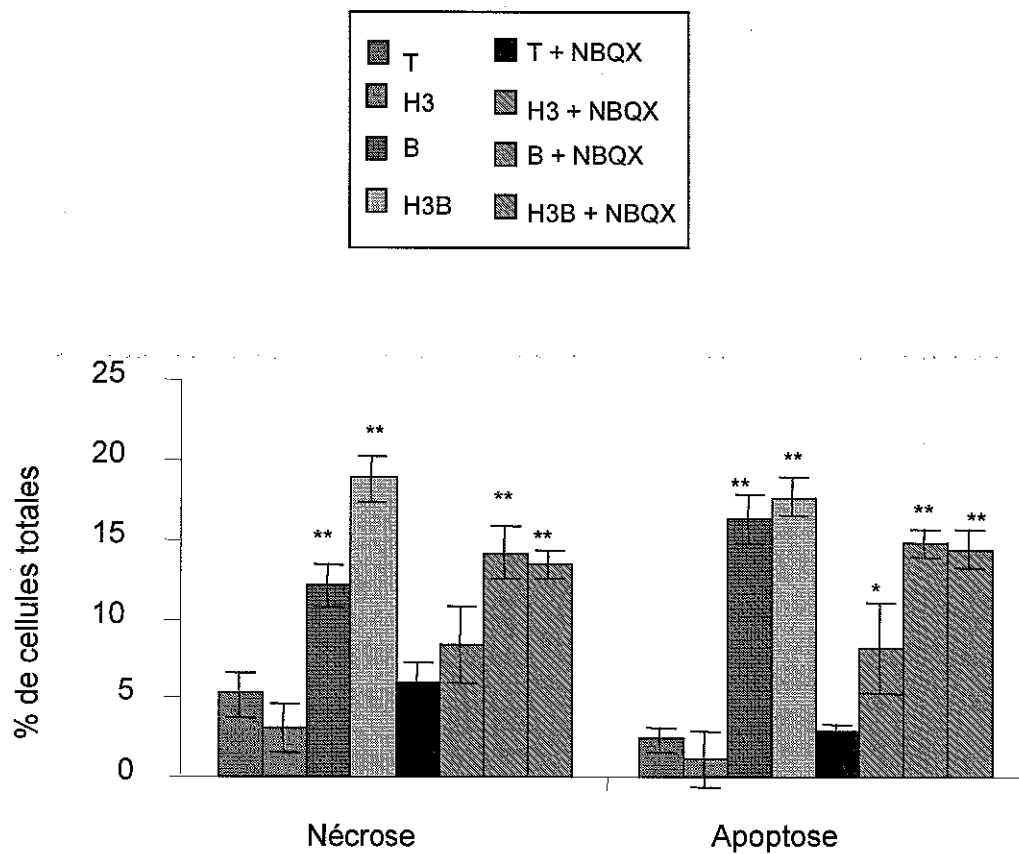


Figure 66 : Effet d'un antagoniste des récepteurs non-NMDA (NBQX) sur les taux de nécrose et d'apoptose des neurones exposés à la bilirubine associée ou non à une hypoxie de 3 heures.

Valeurs moyennes $\pm$ DS obtenues à partir de 3 expériences minimum, chacune utilisant plus de 5 boîtes de cultures.

** : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, vs témoins*

+ : $p < 0.05$, ++ : $p < 0.01$, vs non traités NBQX

DISCUSSION

I) ETUDE IN VIVO D'UNE HYPOXIE CEREBRALE NEONATALE

A) EFFET D'UNE HYPOXIE TRANSITOIRE

1) CHOIX DU MODELE D'ETUDE

Comparés aux modèles *in vitro*, les modèles *in vivo* permettent d'avoir une description globale des phénomènes cérébraux consécutifs à l'agression. Ils prennent en compte la diversité phénotypique et l'influence des mécanismes adaptatifs. En effet, la contribution des cellules gliales en réponse à l'hypoxie/ischémie ne peut être déniée et il a été montré que les cellules gliales en co-culture protégeaient les neurones des conséquences de divers types d'agression (Mattson et Rychlik, 1990 ; Giulan *et al.*, 1993).

Les modèles généralement utilisés pour l'étude *in vivo* des conséquences de l'hypoxie/ischémie sont des adaptations du modèle de Lévine qui consiste à ligaturer une des artères carotides puis à placer l'animal en hypoxie. Ce modèle ne permet pas d'évaluer l'effet de l'hypoxie seule et requiert l'utilisation d'animaux âgés d'au moins une semaine. Pour étudier les méfaits de l'hypoxie sur des rats nouveau-nés, un modèle non invasif semblait plus approprié et a donc été développé au laboratoire. Ce dispositif nécessite une régulation fine de la température ainsi qu'une circulation de l'atmosphère au sein de l'enceinte. Le couvercle en plexiglas de cette chambre permet d'observer le comportement des animaux.

2) CARACTERISTIQUES GENERALES DU MODELE

Le choix de 20 mn d'exposition des rats âgés de 1 jour correspond à une hypoxie sublétales.

Après 5 mn d'hypoxie, les animaux sont très agités pendant une dizaine de minutes puis deviennent totalement apathiques et bleuissent. Cet état est réversible dès la première minute de réoxygénation. L'hypoxie provoque une diminution rapide de la pO_2 et du pH, traduisant une acidose, observée également lors d'une asphyxie chez le fœtus et généralement associée à une augmentation des taux de lactate cérébral (Engidawork *et al.*, 1997).

La cyanose visible durant les 5 dernières minutes d'hypoxie résulte de la désaturation en O₂ de l'hémoglobine. L'augmentation de la pCO₂, significative après 15 mn traduit un état d'hypercapnie, dont le rôle est de compenser transitoirement le déficit en oxygène par augmentation du débit sanguin cérébral et de la ventilation. La réoxygénation va engendrer une pO₂ supérieure à la pression de base, éventuellement à l'origine de radicaux libres dérivés de l'oxygène.

L'hypoxie ne perturbe pas la croissance corporelle des animaux à court terme, ce qui laisse à penser que les animaux hypoxiques ont un comportement identique aux témoins vis-à-vis de leur mère dont ils sont dépendants en ce qui concerne leur alimentation durant les 20 premiers jours de vie précédant le sevrage. Le poids corporel des animaux hypoxiques devient inférieur à celui des témoins vers 40 jours post-hypoxie, conséquence possible d'une hyperactivité en réponse à l'hypoxie (Gross et Lun, 1985 ; Lun *et al.*, 1990).

Le poids cérébral est quant à lui diminué dès 6 jours post-hypoxie, reflet d'un défaut de croissance cérébrale ou d'une perte de tissu cérébral associée à des pertes cellulaires.

3) CARACTERISTIQUES CELLULAIRES DU MODELE

L'hypoxie entraîne une désorganisation progressive de la couche des cellules pyramidales de l'hippocampe, associée à une diminution de la densité cellulaire mise en évidence à partir de 3 jours dans la zone CA1. Dans le cortex cérébral, la réduction de la densité cellulaire est décelable à 4 jours post-hypoxie.

Un marquage à la NSE couplé au DAPI a permis de montrer que les cellules en dégénérescence, aussi bien au niveau du cortex que de l'hippocampe, étaient bien des neurones. La vulnérabilité de la couche CA1 de l'hippocampe avait déjà été rapportée par Dell'Anna *et al.* (1991) suite à une anoxie chez le raton nouveau-né. En revanche, les travaux de Matsuoka *et al.* (1997) chez l'adulte ne permettent pas de mettre en évidence une telle vulnérabilité de CA1 mais plutôt de la couche CA3.

Ces différents résultats soulignent l'importance de l'âge et de la sévérité de l'agression dans les modèles *in vivo* d'hypoxie.

Conformément à notre modèle, l'apoptose et la nécrose peuvent co-exister en réponse à une agression hypoxique-ischémique (Martin et al., 2000 ; Zheng et Xu, 2000), la nécrose observée à partir de 3 jours post-hypoxie pouvant correspondre à la mort des cellules les plus vulnérables, par exemple celles en cours de différenciation ou en mitose. En fonction de la sévérité de l'agression et de la déplétion des taux énergétiques des cellules, un continuum entre l'apoptose et la nécrose a même été proposé (Benchoua et al., 2001 ; Martin et al., 2001). Alors que l'apoptose mise en évidence vers 3 ou 4 jours serait le reflet principal de l'hypoxie sur les cellules cérébrales, l'apoptose observée aussi bien chez les témoins que chez les animaux hypoxiques durant les 2 à 3 premiers jours de vie, traduit une apoptose physiologique. Le cerveau de rat à la naissance est immature et continue de se développer durant les jours suivants. La mort neuronale apoptotique est capitale pour le développement du système nerveux car elle permet l'adaptation du nombre de neurones connectés aux cellules cibles et la correction des erreurs de connexion (Barde, 1989 ; Oppenheim, 1991).

La perte cellulaire observée vers 3-4 jours post-hypoxie, associée à un déficit de densité cellulaire, présente les caractéristiques morphologiques d'une mort par apoptose. En effet, l'une des manifestations de l'apoptose est l'importante condensation du noyau et du cytoplasme, ce qui induit une diminution de volume cellulaire, alors qu'une mort par nécrose se traduit plutôt par un gonflement cellulaire qui va conduire à l'éclatement des membranes. L'analyse de la morphologie nucléaire après marquage au DAPI soutient cette hypothèse. Elle est couplée à la mise en évidence d'une fragmentation d'ADN sur gel d'agarose. Néanmoins, cette fragmentation ne conduit pas à une image caractéristique en échelle, mais à l'accumulation de fragments de l'ordre de 200 paires de bases. La méthode TUNEL n'a mise en évidence aucune cellule TUNEL-positif, aussi bien chez les témoins que chez les animaux hypoxiques. Différents auteurs ont déjà souligné que les noyaux TUNEL-positif étaient peu fréquents au niveau du cerveau de rat en développement (Spreafico et al., 1995 ; Kuan et al., 2000); ce qui suggère une détection de la fragmentation de l'ADN par une méthode plus sensible. Nos résultats suggèrent que l'hypoxie induit des fragments de hauts poids moléculaires, non visualisables sur gel d'agarose, et que les fragments de 200 pb sont probablement le résultat de l'activité d'exonucléases endogènes.

L'apoptose consécutive à l'hypoxie est confirmée par les variations d'expression de protéines spécifiques. La protéine p53 est surexprimée à 3 jours pour être ensuite réprimée à 13 jours. Cette protéine a été impliquée dans l'induction de l'apoptose dans différents modèles d'hypoxie/ischémie cérébrale (Chopp *et al.*, 1992 ; Morrison *et al.*, 1996). Pour Choi (1998), cette surexpression serait consécutive à la perte de l'homéostasie calcique alors que d'autres auteurs l'attribuent à la production des radicaux libres (Lotem *et al.*, 1996) ou encore à l'excitotoxicité (Morrison *et al.*, 1996). Son action porte sur l'induction de l'expression de la protéine Bax (Miyashita et Reed, 1995) et la répression de l'expression de Bcl-2 (Miyashita *et al.*, 1994) ou des protéines de stress de la famille des HSP70 (Agoff *et al.*, 1993). Cette protéine est considérée comme un bon marqueur de lésions irréversibles des cellules post-mitotiques du SNC et les variations de son expression pourraient avoir une signification dans la détermination de la vulnérabilité neuronale sélective (Sakhi *et al.*, 1994 ; Morrison *et al.*, 1996).

Une surexpression de Bcl-2, HSP105 et de la caspase 3 a été observée à 3 jours post-hypoxie. Alors que la caspase 3 reste surexprimée à 6 jours, Bcl-2 et HSP105 sont progressivement réprimées. L'expression de Bax est quant à elle augmentée à partir de 6 jours post-hypoxie. De nombreux auteurs ont déjà souligné ce profil d'expression de Bax et Bcl-2 en réponse à une hypoxie (Ravishankar *et al.*, 2001 ; Gillardon *et al.*, 1996 ; Northington *et al.*, 2001). La surexpression des HSPs, a également été mise en évidence en réponse à une hypoxie transitoire in vivo (Bossenmeyer-Pourie *et al.*, 2002). Cette surexpression uniquement observée à 3 jours post-hypoxie pourrait être attribuée à une tentative d'atténuation de l'augmentation de calcium provoquée par l'hypoxie (Kiang et Koenig, 1996 ; Kiang et Tsokos, 1998).

Tandis que la liaison de Fas/APO1 à son récepteur, régulée positivement par la protéine p53, va engendrer l'activation en cascade des caspases impliquées dans la phase effectrice de l'apoptose (Schlegel *et al.*, 1996 ; Mannick *et al.*, 1999 ; Sun *et al.*, 1999), les variations d'expression de Bax et Bcl-2 contribuent à l'activation de ces caspases, via la libération du cytochrome c qui va interagir avec APAF-1 et induire la pro-caspase 9 pour finalement activer la caspase 3 (Chou *et al.*, 1998 ; Luo *et al.*, 1998 ; Sun *et al.*, 1999). L'activation de cette dernière serait responsable pour une grande part de la mort neuronale (Namura *et al.*, 1998 ; Nath *et al.*, 1998), avec une induction spécifique au niveau des neurones apoptotiques (Armstrong *et al.*, 1997 ; Ochu *et al.*, 1998).

L'action des caspases peut être réprimée par les protéines Bcl-2 et HSPs (Srinivasan *et al.*, 1996). Ces protéines étant réprimées à 6 jours post-hypoxie, elles ne peuvent donc plus interférer avec les propriétés apoptotiques des caspases, ce qui se traduit par une mort cellulaire maximale à ce stade.

On assiste vers 13 jours post-hypoxie à une diminution de la sévérité des lésions. La réalisation de doubles marquages GFAP/DAPI et NSE/DAPI a permis de montrer que la récupération cellulaire observée à partir de 13 jours post-hypoxie n'est pas liée à une augmentation de la proportion des éléments gliaux, mais à une récupération neuronale. Les lésions cellulaires consécutives à l'hypoxie semblent donc être transitoires. D'ailleurs, à 40 et 60 jours post-hypoxie, l'apparence morphologique et la densité cellulaire au niveau des structures étudiées sont comparables aux témoins. Une récupération semblable a été observée par Li *et al.* (1998b), à la suite d'une perte neuronale consécutive à une hypoxie maternelle. Cette récupération apparente pose la question d'une éventuelle neurogénèse. En effet, Jin *et al.* (2001) ont mis en évidence une augmentation de la prolifération cellulaire après une ischémie chez le rat adulte. Les cellules en prolifération, marquées par le BrdU, co-expriment les marqueurs de neurones immatures mais pas les marqueurs de neurones plus matures comme NeuN ou Hu, ce qui suggère une genèse à partir de précurseurs.

Cette prolifération serait directement liée au faible taux d'oxygène, comme l'on démontré Studer *et al.* (2000), en diminuant l'exposition à l'oxygène de neurones en culture, de 20% à 3%. Des cellules souches vont alors proliférer au niveau des zones subventriculaires et subgranulaires du gyrus denté de l'hippocampe.

Ces cellules vont ensuite se différencier en neurones (Kitagawa *et al.*, 2001) qui pourront, au moins partiellement, compenser les pertes neuronales. Bernabeu et Sharp (2000) ont montré une synaptogénèse associée à la neurogénèse, reflétée par l'induction de l'expression de la synapsin I à la suite d'une ischémie chez la gerbille adulte. Toutefois, on peut imaginer que l'induction de la synaptogénèse ne permet pas une compensation totale des circuits neuronaux endommagés par l'hypoxie, ce qui pourrait expliquer les troubles fonctionnels observés à plus long terme après un accident hypoxique.

4) CARACTERISTIQUES FONCTIONNELLES

4.1) IRM

L'arrivée récente de nouvelles techniques d'IRM comme l'imagerie de diffusion a déjà montré leur supériorité dans le diagnostic très précoce des lésions ischémiques (Cowan *et al.*, 1994). Selon Wolf *et al.* (2001), la valeur de l'ADC (Apparent Diffusion Coefficient) fournit une mesure objective de l'étendue des lésions hypoxiques/ischémiques.

En neuropédiatrie, l'IRM pose des problèmes spécifiques, notamment liés à l'évolution des images normales en fonction de la maturation cérébrale. Le cerveau d'un nouveau-né à terme contient 90% d'eau contre 75% quelques années plus tard. La multiplication des fibres nerveuses, des connexions intercellulaires, de l'astroglie et de la myéline, rend compte de ce changement.

Du point de vue de l'imagerie, les modifications les plus frappantes sont celles qui concernent la myélinisation, avec généralement une diminution de la valeur d'ADC avec l'âge (Rutherford *et al.*, 1991 ; Takeda *et al.*, 1997).

Dans notre modèle, la valeur d'ADC des animaux témoins diminue de 22% entre le 4^{ème} et le 7^{ème} jour après la naissance, vraisemblablement en relation avec le développement de la myéline. Chez les animaux exposés à l'hypoxie, une diminution de l'ADC de l'ordre de 25% apparaît dès le 3^{ème} jour post-hypoxie et persiste encore après 6 jours (20%).

Généralement, le profil des modifications de l'ADC est biphasique. Ainsi, on observe une diminution de l'ADC durant l'agression, une récupération au cours des premiers temps de réoxygénation, suivie d'une nouvelle chute transitoire de l'ADC (Rumpel *et al.*, 1997 ; Miyasaka *et al.*, 2000).

La diminution de l'ADC représente une diminution de diffusion dans les tissus consécutive à une accumulation de macromolécules intracellulaires, comme on peut l'observer après une peroxydation lipidique des membranes. Une autre explication consiste en la réduction de l'espace extracellulaire engendrée par un œdème cytotoxique (Huppi *et al.*, 2001). Dans un modèle d'hypoxie-ischémie cérébral chez le jeune rat, la diminution de l'ADC durant la première phase de l'ischémie a été associée à la perturbation énergétique (Benveniste *et al.*, 1992 ; Busza *et al.*, 1992).

Néanmoins, le profil des modifications de l'ADC semble être dépendant de la durée de l'épisode hypoxique/ischémique. D'une durée de 15 mn, il provoque une réduction de l'ADC avec récupération. Au-delà de 15 mn, la récupération est transitoire avec une 2^{ème} chute de l'ADC. A 60 mn, la diminution initiale de l'ADC durant l'agression est permanente et n'est pas suivie d'une récupération (Miyasaka *et al.*, 2000).

L'absence de mesure entre les deux temps choisis (3 et 6 jours) ne permet pas de savoir si on est en présence d'une chute de l'ADC biphasique ou d'une diminution permanente.

4.2) ACTIVITE DE LA CYTOCHROME OXYDASE

L'activité de la cytochrome oxydase est considérée comme un bon marqueur de l'activité neuronale (Wong-Riley, 1989).

Dans notre modèle, on observe, à 3 jours post-hypoxie, une diminution de l'activité de cette enzyme au niveau du cortex, alors qu'au niveau de CA1 et CA3 aucune différence n'est mise en évidence par rapport aux témoins. En revanche, de 6 à 13 jours post-hypoxie, on observe une augmentation de l'activité de la cytochrome oxydase de l'ordre de 40% pour CA1 ou le cortex, à 60% pour CA3.

A la suite d'une hypoxie/ischémie, Il a généralement été rapporté une diminution de l'activité de la CO. Par une mesure quantitative histochimique, une diminution de 30% de l'activité de la CO a été observée suite à une ischémie globale (Dimlich *et al.*, 1990). Cette diminution peut rendre compte d'une perte neuronale, mais l'explication la plus vraisemblable serait un hypométabolisme des neurones (Kreisman *et al.*, 1981).

L'augmentation de l'activité de la CO que l'on observe dans notre modèle pourrait refléter une augmentation de l'activité métabolique des cellules qui survivent à la privation en oxygène, comme cela a été décrit in vitro dans un modèle de neurones en culture (Oillet *et al.*, 1996) ou dans un modèle in vivo chez le chat (Nemoto *et al.*, 1981). Cette augmentation de l'activité peut être associée, au moins en partie, à une augmentation des taux protéiques de la sous-unité 1 de la CO suite à l'hypoxie, ainsi que l'on suggéré Northington *et al.* (2001a).

4.3) ETUDE DU COMPORTEMENT

Approximativement $\frac{1}{4}$ des enfants présentant une encéphalopathie hypoxique-ischémique vont développer à long terme des troubles cognitifs et des dysfonctionnements moteurs (Escobar *et al.*, 1991).

Lors de la mise au point du modèle, une étude comportementale du rat hypoxique a été réalisée, du stade néonatal au stade adulte, basée essentiellement sur la coordination locomotrice et les capacités d'apprentissage et de mémorisation.

Dès le plus jeune âge apparaît une différence dans les performances motrices des animaux témoins et hypoxiques. Les animaux hypoxiques sont plus lents, ce qui peut s'expliquer par le retard de croissance, une force et une résistance musculaire plus faibles. Dans ce modèle, l'hypoxie néonatale semble affecter les capacités d'apprentissage en terme de temps nécessaire pour l'apprentissage. Ces observations sont en adéquation avec des études antérieures concernant les effets néfastes de l'hypoxie sur la mémoire et l'apprentissage (Hershkowitz *et al.*, 1983 ; Nyakas *et al.*, 1989). On retrouve chez l'adulte une certaine lenteur au niveau de la locomotion. Par ailleurs, plusieurs études chez les rongeurs ont révélé une hyperactivité transitoire après une hypoxie néonatale, avec notamment une augmentation des activités ambulatories (Speiser *et al.*, 1983 ; Dell'Anna *et al.*, 1991).

D'une manière générale, on observe que l'hypoxie néonatale n'affecte pas sévèrement les fonctions cérébrales, puisque tous les animaux hypoxiques sont capables de réussir les tests comportementaux, en étant seulement plus lents que les témoins. Ces observations soulignent la plasticité du cerveau nouveau-né, avec notamment des réorganisations des processus cérébraux (Murakami *et al.*, 1992).

B) MODELES DE TOLERANCE

1) CONDITIONNEMENT

Le conditionnement par une hypoxie brève permet une protection totale et persistante vis-à-vis de l'hypoxie létale chez le rat immature. Aucune différence de poids cérébral n'apparaît entre les animaux témoins et hypoxiques conditionnés. De même, aucune lésion cellulaire n'est mise en évidence, ce qui se traduit par un profil de mort cellulaire totalement comparable entre les témoins et les hypoxiques conditionnés.

Dans notre modèle, on ne peut se rallier à l'hypothèse de travail de Kato *et al.* (1992) concernant la médiation de l'effet protecteur du conditionnement par le biais des récepteurs NMDA, après avoir observé l'abolition d'une tolérance à l'ischémie chez la gerbille adulte en présence de MK801. En effet, nous verrons ultérieurement que les récepteurs NMDA ne sont certainement pas fonctionnels chez le rat à ce stade du développement (Burgard et Hablitz, 1993).

Cependant, on peut imaginer que l'effet bénéfique du conditionnement passe par la protection cellulaire de Bcl-2, via la neutralisation de Bax, son action anti-oxydante, ou encore via une protection des fonctions mitochondriales (Myers *et al.*, 1995 ; Shimizu *et al.*, 1995 ; O'Reilly *et al.*, 1996 ; Miyashita *et al.*, 1997 ; Srinivasan *et al.*, 1996, Jensen *et al.*, 2002). En effet, dans notre modèle, le conditionnement engendre une surexpression de la protéine Bcl-2, parallèlement à une répression de la protéine Bax. La cascade apoptotique serait potentiellement bloquée par un remaniement de la balance de l'expression de Bcl-2/Bax en faveur de la survie cellulaire. Souvent associée à la surexpression de Bcl-2, on observe l'induction de gènes associés à la survie-comme les HSPs. Ceci a également été rapporté chez la gerbille ou le rat adultes (Aoki *et al.*, 1993 ; Liu *et al.*, 1992 ; Sakaki *et al.*, 1995), et l'accumulation de ces protéines favoriserait la tolérance aux agressions-ulérieures.

Les protéines les plus souvent induites sont les HSP70 et HSP27 (Kato *et al.*, 1991 ; 1994). Il semblerait que l'action protectrice de HSP70 passe par une atténuation de l'augmentation de calcium provoquée par l'hypoxie (Kiang et Koenig, 1996 ; Kiang et Tsokos, 1998). L'effet anti-apoptotique des HSP70 a été attribué à de nombreux mécanismes dont le blocage du signal conduisant à l'activation des JNK (Mosser *et al.*, 1997 ; Buzzard *et al.*, 1998; Yaglom *et al.*, 1999).

Dans notre modèle, on peut émettre l'hypothèse que les neurones exposés à une brève hypoxie induisent ces HSPs qui vont bloquer le programme d'apoptose au moment où survient une nouvelle agression. Ce mécanisme semble être indépendant de l'activité chaperonne de HSP70 (Yaglom *et al.*, 1999). Certaines études rapportent que l'effet anti-apoptotique de HSP70 est postérieur à l'activation des caspases (Jaattela *et al.*, 1998), puisque les HSP70 ne modifie pas la quantité de caspase activée en dépit d'une augmentation du nombre de cellules survivantes ; alors que d'autre rapportent que HSP70 est capable d'inhiber l'activation de la caspase 3 (Mosser *et al.*, 1997). Au niveau de la cascade apoptotique, HSP27 est capable d'inhiber l'activation de la procaspase 9 par le cytochrome c (Garrido *et al.*, 1999) et capable de réguler négativement l'activation de la caspase 3 (Pandey *et al.*, 2000), sans que la libération du cytochrome c par la mitochondrie ne soit modulée par HSP27. Dans notre modèle, on peut donc émettre l'hypothèse que les neurones exposés à une brève hypoxie, induisent ces HSPs, qui vont bloquer la cascade apoptotique, en vue d'une nouvelle agression.

Bien que différentes hypothèses existent concernant le conditionnement, il semble que ses effets bénéfiques passent par un remaniement génétique du programme apoptotique.

2) HYPOTHERMIE

L'hypothermie protège également des effets délétères de l'hypoxie. Contrairement au conditionnement, le profil d'expression des protéines Bcl-2 et Bax est comparable à celui des témoins.

Cette neuroprotection pourrait être associée à une atténuation de l'acidose engendrée par l'hypoxie. Laptook *et al.*, (1995) ont montré qu'une diminution de la température de 2 à 3°C engendrait une réduction moindre du pH intracellulaire chez les animaux ischémiés en hypothermie que chez les normothermiques, la différence entre les deux groupes étant de l'ordre de 0,15 à 0,20 unités de pH. Chez l'adulte, l'accumulation de lactate et l'acidose sont deux éléments critiques dans le devenir neurologique suite à une ischémie. En revanche, chez le jeune animal, le rôle de l'acidose dans le développement des lésions tissulaires ne semble pas être aussi clair.

En effet, contrairement à l'adulte où le glucose assure le métabolisme énergétique, les corps cétoniques participent dans une proportion importante à ce métabolisme au cours du développement cérébral (Vannucci et Vannucci, 2000 ; Nehlig et Pereira de Vasconcelos, 1993). Ceci est essentiellement dû au fait que chez le nouveau-né, l'ingestion de corps gras issus du lait maternel, induit une cétonémie élevée qui favorise un transport important des composés cétoniques vers les neurones. Par ailleurs, l'augmentation de l'activité de la β -hydroxybutyrate déshydrogénase dans le cerveau en développement augmente sa capacité à métaboliser les corps cétoniques (Bilger et Nehlig, 1992), alors que l'immaturation des transporteurs de glucose limite son apport au cerveau (Vannucci, 1994).

Une autre hypothèse de l'effet protecteur de l'hypothermie consisterait en une réduction de l'activité métabolique globale. A ce titre, dans notre modèle, on observe une plus faible expression des protéines telles que Bax et Bcl-2 chez les témoins hypothermiques comparés aux témoins normothermiques, reflétant une diminution de l'activité de base de la cellule. Aucune différence dans l'expression de ces protéines n'est observable entre les témoins et hypoxiques hypothermiques. En hypothermie, l'animal apparaît comme sous sédation. D'ailleurs l'hyperactivité consécutive à une hypoxie-ischémie chez le jeune animal (Karasawa *et al.*, 1994) est abolie par une hypothermie (Green *et al.*, 1992 ; Nurse et Corbett, 1994).

Alors que la déplétion en ATP semble être requise pour la perte de l'homéostasie cellulaire à l'origine de la dégradation des cellules (Jurkowitz-Alexander *et al.*, 1992 ; Williams *et al.*, 1994), on peut imaginer que l'effet protecteur de l'hypothermie intervient dès ce stade en préservant l'ATP et la phosphocréatine (Young *et al.*, 1983 ; Yager *et al.*, 1996), mais aussi en atténuant les fluctuations en sodium et en potassium (Amorin *et al.*, 1999).

En condition normoxique, les gradients de concentrations de potassium et de sodium, responsables notamment du potentiel de membrane des cellules et des transports de divers acides aminés et du glucose, sont maintenus par la pompe Na^+/K^+ -ATPase. Il s'agit d'une pompe ionique membranaire dont l'activité est liée aux taux d'ATP et grande consommatrice d'énergie, sa fonction consistant à rejeter activement le sodium hors de la cellule tout en pompant le potassium extracellulaire vers l'intérieur, contre le gradient électrochimique.

En hypoxie, la perte de l'homéostasie cellulaire consécutive à la déplétion en ATP va perturber ces gradients, d'autant plus que l'activité de la Na^+/K^+ -ATPase est diminuée dans les tissus cérébraux (Mayevsky 1992 ; Mishra et Delivoria-Papadopoulos, 1999, Qiao *et al.*, 2002). Ceci aboutit, à terme, à des perturbations du transport du glucose et à une altération des potentiels de membranes et des transmissions synaptiques. Toutes ces perturbations sont réduites par l'hypothermie via l'atténuation des fluctuations des concentrations de potassium (Sonn *et al.*, 2002).

Néanmoins, il convient de prendre en considération que l'effet protecteur de cette stratégie est fonction du degré de l'hypothermie. Ainsi, Yager *et al.* (1993) ont montré qu'après une hypoxie-ischémie réalisée à 31°C chez le rat de 7 jours, aucun animal ne présentait de lésion cérébrale, alors qu'à 34 ou 37°C ce sont respectivement 40 et 90% des rats qui présentaient des séquelles.

C) EFFET D'UN PRETRAITEMENT PAR UN ANTAGONISTE DES RECEPTEURS NMDA

Par elle-même, l'administration de MK801, à la dose utilisée, ne provoque aucune lésion cellulaire décelable chez les rats de 1 jour. Toutefois, il est à noter que les rats témoins exposés au MK801 présentent un retard de croissance significatif. Celui-ci peut être attribué à un désintérêt de la mère pour ses petits qui ont un comportement ataxique et une activité réduite. Ces observations sont en accord avec celles de Hattori *et al.* (1989).

Dans notre étude, le MK801, n'exerce pas d'effet protecteur vis-à-vis de l'hypoxie mais il permet de retarder de quelques jours le délai d'apparition des lésions, qui passe alors de 3 à 5 jours. Contrairement à l'hypoxie en absence de traitement, où l'apoptose prédomine sur la nécrose lorsque les lésions cellulaires sont maximales, ici les deux types de mort cellulaire sont de même ampleur. Cette augmentation du taux de nécrose ne peut être attribuée à l'action du MK801 seul puisqu'administré aux témoins il ne perturbe pas le profil de mort cellulaire.

Chez le rat immature, les effets de l'hypoxie responsables de la mort neuronale semblent indépendants de l'activation des récepteurs du glutamate (Nowell *et al.*, 1995). Cette absence d'effet protecteur du MK801 vis-à-vis d'une hypoxie chez le rat de 1 jour pourrait s'expliquer par un défaut de fonctionnalité des récepteurs NMDA. En effet, Burgard et Hablitz (1993) postulent que ces récepteurs ne seraient fonctionnels chez le rat qu'à partir du 3^{ème} jour postnatal (Burgard et Hablitz, 1993), stade auquel apparaîtraient les sites de liaison pour la MK801 (Morin *et al.*, 1989).

Une autre explication peut s'orienter vers l'absence d'inactivation de la protéine kinase C (PKC) chez le raton immature en réponse à la stimulation cellulaire par le glutamate. En effet, la perte de l'activité de la PKC membranaire apparaît être un processus nécessaire à la médiation de la mort neuronale induite par les acides aminés excitateurs dans des neurones en cultures (Durkin *et al.*, 1997). Dans un modèle de culture primaire de neurones d'embryons de rat, Chihab *et al.* (1998) ont montré que, contrairement à des neurones cultivés pendant 13 jours, les cellules après 6 jours *in vitro* n'étaient pas sensibles à une concentration toxique en glutamate, ceci bien que Oillet *et al.* (1995) aient montré sur le même modèle que les récepteurs glutamatergiques étaient présents et fonctionnels.

La sensibilité au glutamate apparaît en présence d'un inhibiteur de la protéine kinase C comme la staurosporine (Chihab *et al.*, 1998). On peut imaginer que les événements cellulaires faisant le lien entre l'influx de calcium induit par le glutamate et l'inactivation de la PKC ne seraient pas développés chez le raton au cours des 24 heures qui suivent la naissance. L'inactivation de la PKC induite par le calcium dans les neurones plus matures dépendrait de la présence de sous unités particulières des récepteurs du glutamate. En faveur de cette hypothèse, Mizuta *et al.* (1998) ont rapporté que des changements dans la composition des sous unités des récepteurs du glutamate, notamment les sous unités zeta 1 et epsilon 2 des récepteurs NMDA participeraient à l'émergence de la neurotoxicité liée au glutamate des neurones de souris en culture primaire.

Bien qu'un effet protecteur du MK801, démontré dans différents modèles, ne soit pas observé dans notre étude, ce traitement mérite que l'on s'y intéresse dans la mesure où il permettrait de retarder l'apparition des dommages cellulaires et donc d'allonger la durée de la fenêtre thérapeutique. Cette observation pourrait s'expliquer dans le fait que le MK801 est susceptible de produire une hypothermie modérée, elle-même neuroprotectrice envers les effets de l'hypoxie (Duhaime et Ross, 1990 ; Warner *et al.*, 1991).

D) INFLUENCE DE LA MATURATION CEREbraLE: HYPOXIE REALISEE CHEZ LE RAT DE 7 JOURS

1) CARACTERISTIQUES DU MODELE

Une exposition à l'hypoxie de 10 mn des rats de 7 jours provoque la mort de tous les animaux. A ce stade du développement, une hypoxie limitée à 8 est suffisante pour obtenir les mêmes effets que 20 mn sur la survie des rats de 1 jour. En effet, il est bien établi que l'animal immature tolère mieux l'hypoxie que l'adulte, tandis que le fœtus est plus résistant que le nouveau-né (Vannucci et Duffy, 1977 ; Maulik *et al.*, 1999).

La résistance plus élevée des neurones immatures à la privation en oxygène repose en partie sur une plus faible consommation d'énergie. Sur des coupes cérébrales de rats, les taux d'ATP consommés par les cellules sont 4 fois plus élevés chez l'adulte que chez le rat âgé de 4 jours (Kawai *et al.*, 1989).

Cette consommation d'ATP coïncide avec l'évolution de la consommation cérébrale de glucose, représentant 3 à 5 % de la valeur adulte à la naissance, puis augmentant de 50 à 100% entre 17 et 21 jours pour devenir comparable à l'adulte vers 35 jours (Nehlig *et al.*, 1993).

En condition hypoxique, il n'y a pas assez d'oxygène pour le métabolisme aérobie du glucose et la glycolyse anaérobie va être activée, avec une production d'ATP 15 fois moindre et une accumulation de lactate entraînant une acidose sévère et une altération des mitochondries (Vannucci, 1990 ; Mitani *et al.* ; 1994). On peut émettre l'hypothèse que les neurones du cerveau de rats âgés de 7 jours nécessitent une consommation d'énergie supérieure à ceux du cerveau du rat de 1 jour. Ceci nécessite une glycolyse anaérobie plus soutenue, favorisant la production de lactate et l'acidose chez le rat plus mature. Or, Ding *et al.* (2000) ont montré in vitro, sur culture de neurones, qu'une acidification du pH intracellulaire de 7,3 à 6,5 suffisait à induire une perte neuronale.

Par comparaison avec l'hypoxie réalisée à 1 jour, les lésions consécutives à une hypoxie sur des animaux de 7 jours sont plus précoces, plus sévères et persistent encore à 20 jours après réoxygénation. Des observations similaires ont été rapportées par Towfighi *et al.* (1997) et Ikonomidou *et al.* (1989) en réponse à une hypoxie-ischémie. Notre modèle d'hypoxie sur le raton de 7 jours correspondrait à des conséquences cérébrales sévères, comme le soulignent également les travaux d'Ikonomidou *et al.* (1989) dans un modèle d'hypoxie/ischémie réalisée à des âges différents, et indiquant le pic de sévérité vers 6 jours de naissance.

Dans notre modèle, les lésions sont associées à une mort cellulaire qui semble être la manifestation d'une nécrose, contrairement au modèle de 1 jour. A ce titre, les protéines régulatrices de l'apoptose Bax et Bcl-2 ont le même profil d'expression que chez les témoins.

Il apparaît donc que les caractéristiques de la mort cellulaire varie avec l'âge du sujet, et ces observations *in vivo* vont dans le même sens que les travaux sur cultures de neurones de Chihab *et al.* (1998) et Andreeva *et al.* (2001) sur culture de neurones qui ont montré qu'une hypoxie sur des neurones des 6-8 jours *in vitro* induisait une mort présentant majoritairement les caractéristiques de l'apoptose, tandis que les neurones plus matures (13-15 jours) mouraient par nécrose.

A l'inverse d'une hypoxie chez le rat de 1 jour, la mort cellulaire à 7 jours pourrait être médiée au moins partiellement par des processus excitotoxiques.

Alors qu'il a été mis en évidence une tendance à la récupération neuronale à la suite d'un accident hypoxique cérébral chez le raton de 1 jour, ce phénomène n'a pu être observé lorsque l'hypoxie a été réalisée chez le raton de 7 jours, peut être en raison des caractéristiques de la mort par nécrose. En condition d'hypoxie-ischémie, il a été décrit une activation de la microglie (Mc Rae *et al.*, 1995 ; Ivacko *et al.*, 1996), associée à une réponse inflammatoire (Bona *et al.*, 1999 ; Cowell *et al.*, 2002). La cytotoxicité de la microglie contribuerait aux lésions neuronales (Banati *et al.*, 1993) via la sécrétion de divers agents cytotoxiques incluant des enzymes protéolytiques, des cytokines ou encore l'oxyde nitrique (Lee, 1993 ; Saliba et Henrot, 2000).

L'activation de cette microglie serait également présente lors de l'hypoxie chez le raton de 1 jour, mais il est connu que les cellules microgliales peuvent prendre part au processus de réparation des lésions tissulaires à travers la sécrétion de diverses molécules comme le TGF β , le NGF, ou encore le NT3 (Prehn et Kriegstein, 1994 ; Mallat *et al.*, 1989 ; Elkabes *et al.*, 1996), qui ont tous des effets neurotrophiques sur le cerveau en développement. On peut imaginer que la microglie, activée suite à une hypoxie-ischémie, sécrète des molécules préférentiellement toxiques lorsqu'elle est associée à une mort par nécrose et plutôt neurotrophiques lorsqu'il s'agit d'une mort par apoptose.

2) EFFET D'UN PRETRAITEMENT PAR UN ANTAGONISTE DES RECEPTEURS NMDA

Le traitement des animaux témoins âgés de 7 jours par l'antagoniste des récepteurs NMDA entraîne un défaut de croissance. La toxicité intrinsèque du MK801 a été rapportée ; Ikonomidou *et al.* (1999) ont mis en évidence une vacuolisation du tissu cérébral et une mort neuronale au niveau du cortex cérébral consécutivement à l'administration de MK801. De même, l'exposition au MK801 de cultures primaires de néocortex de souris provoque l'apparition de vacuoles cytoplasmiques après seulement 24 heures de traitement (Freeman and Goldberg, 1994). Secondairement, une gliose réactive est observée (O'Callaghan, 1994). Toutefois, Auer et Coulter (1994) ont argumenté que ces vacuoles ne traduiraient pas à une forme de dégénérescence neuronale mais serait plutôt un artefact lié à une réaction des neurones perturbés à la fixation par un aldéhyde.

Par ailleurs, dans le modèle de 7 jours, le MK801 s'est révélé avoir un effet protecteur contre les effets de l'hypoxie. A partir du deuxième jour après la réoxygénation, au moment où les dommages cellulaires apparaissent en réponse à l'hypoxie, le MK801 réduit les lésions en limitant la nécrose à des taux comparables aux témoins. Parallèlement, aucune différence n'apparaît entre le profil d'expression des protéines Bax et Bcl-2 chez les animaux hypoxiques traités par MK801 et celui observé chez les témoins non traités.

Ainsi, l'hypoxie chez le raton de 7 jours utiliserait un mécanisme excitotoxique médiée par les récepteurs NMDA, l'action de MK801 protégeant les neurones de la souffrance cellulaire (Pringle *et al.*, 1997). Au niveau cellulaire, l'hypoxie s'accompagne d'une forte augmentation des taux extracellulaires de glutamate. Cet état s'accompagne d'une forte réduction du transport des AAE au niveau glial (Benveniste *et al.*, 1984; Hagberg *et al.*, 1985; Bradford *et al.*, 1987). Il en résulte une activation prolongée des récepteurs, notamment des récepteurs NMDA, suivie d'un flux de calcium (Choi, 1987). La perte de l'homéostasie ionique associée à la surcharge de calcium entraîneraient un œdème cytotoxique, la lyse des cellules, puis la libération de leur contenu, traduisant un processus nécrotique. En accord avec cette hypothèse, Chihab *et al.* (1998) ont montré sur des cultures de neurones maintenues pendant 13 jours *in vitro*, et par conséquent suffisamment matures, qu'une exposition au glutamate provoquait une mort neuronale par nécrose, avec libération accrue de LDH (lactate déshydrogénase) en réponse à la rupture des membranes. La nécrose mise en évidence dans notre modèle *in vivo* pourrait donc être le reflet direct d'une suractivation des récepteurs NMDA qui s'inscrit dans un processus excitotoxique en réponse à l'hypoxie.

Contrairement au modèle de 1 jour, les récepteurs NMDA sont fonctionnels chez le rat de 7 jours et présentent un profil de distribution comparable à celui de l'adulte (Burgard *et al.*, 1993 ; Morin *et al.*, 1989). L'augmentation de sensibilité du cerveau en développement au glutamate a déjà été mise en évidence (Chihab *et al.*, 1998). Elle est associée à une augmentation de la densité de ces récepteurs au cours de la maturation cérébrale (Enomoto R *et al.*, 1996) ; mais également à des altérations dans le fonctionnement d'un ou plusieurs sites régulatoires du récepteur NMDA. Par exemple, Mishra et Delivori-Papadopoulos (1992) ont montré que la potentialisation de la liaison du MK801 au récepteur NMDA, induite par les polyamines, était plus importante chez le jeune rat. Selon Sirca (2000), il existerait deux types de récepteurs NMDA, un immature observé de 1 à 14 jours postnatal et un plus mature observé après 14 jours.

Au niveau du récepteur immature, la liaison de MK801 peut être potentialisée par la spermidine, une polyamine, alors que la glycine semble avoir peu d'effet. En revanche, après 14 jours, la spermidine seule n'est plus suffisante pour augmenter la liaison du MK801. Chez le jeune rat, les sous unités prédominantes sont les sous unités NR1, NR2B et NR2D (Wenzel *et al.*, 1997 ; Shimada *et al.*, 1997).

Or, la liaison de MK801 sur des récepteurs recombinants NR1-NR2B peut être stimulée par la spermidine. A la naissance, les récepteurs NMDA possédant une sous unité NR2A semblent inexistant, et Wenzel *et al.* (1997) ont montré que le récepteur ayant cette sous unité NR2A est insensible aux polyamines.

Cette protection peut s'expliquer par l'atténuation de l'augmentation des concentrations de glutamate consécutive à l'hypoxie, responsable d'une mort par nécrose comme nous l'avons suggéré précédemment. Mais selon Gilland *et al.* (1998), la protection par le MK801 associerait une réduction de l'utilisation de l'énergie et une amélioration des fonctions mitochondriales. On peut imaginer que les neurones utilisant moins d'énergie, les réserves d'ATP leur suffisent à préserver leur fonctions durant les 8 min d'hypoxie.

Les effets neuroprotecteurs du MK801 varient en fonction du délai d'administration. Ainsi, lorsque le MK801 est administré 30mn avant l'hypoxie, la protection observée est totale, alors que les lésions cérébrales ne sont réduites qu'à 76 et 52% lorsque le traitement est respectivement réalisé en même temps que l'hypoxie ou 1 heure après. Enfin, cette neuroprotection semble être également dépendante de la région cérébrale étudiée. Matsuoko *et al.* (1997) ont montré que l'administration de MK801 protège de façon significative le gyrus dentelé des effets nocifs d'une hypoxie, alors qu'elle est dépourvue d'action au niveau de CA3.

En conclusion, bien que les antagonistes des récepteurs NMDA tels que le MK 801 soient neuroprotecteurs dans divers modèles de lésions ischémiques cérébrales, leur toxicité propre rend leur utilisation caduque. De plus, en raison du rôle crucial du glutamate au cours du développement cérébral, des anomalies de l'architecture du cerveau et de son activité peuvent être observées à la suite d'une inhibition des récepteurs NMDA (Ellison, 1994, 1995). Ces différents éléments rendent pratiquement impossible de séparer les effets neuroprotecteurs des effets indésirables.

E) INFLUENCE D'UNE HYPERBILIRUBINEMIE

L'injection intrapéritonéale de bilirubine (216,6mg/kg) à des rats de 1 jour provoque 3 jours plus tard un ictère, caractérisé par une coloration jaune de la peau.

La perte de poids corporel est très prononcée. En cas d'ictère nucléaire du nouveau-né on observe en premier lieu une léthargie et une faiblesse de la succion (Osaki et Naiman, 1972), ce qui pourrait expliquer cette chute de poids. Mais dans ce modèle, la perte de poids serait également liée à un désintérêt de la mère pour ses petits. D'ailleurs, il est à noter que 80% des rats meurent dans les 3 jours consécutifs à l'administration de bilirubine, dévorés par la mère.

Toutefois, le retard de croissance n'est que transitoire. En effet il disparaît 7 jours plus tard. Chez le nouveau-né humain, l'ictère physiologique apparaît habituellement après un intervalle de 24-36 heures avec un taux maximal au 3-4^{ème} jour suivi d'une décroissance rapide et d'une disparition vers 10 jours.

En ce qui concerne le cerveau, aucune coloration de ce dernier n'apparaît à la dissection. Classiquement, à l'examen post-mortem, l'accumulation de bilirubine se traduit par une coloration jaune des régions cérébrales qui accumulent le plus de bilirubine, à savoir le striatum, le globus pallidus et l'hippocampe (Ahbab-Barmada et Moosy, 1984 ; Larroche, 1977). Par ailleurs, dans notre étude, aucune lésion cellulaire n'a été mise en évidence chez les animaux traités par la bilirubine. Il semblerait donc que l'hyperbilirubinémie de ces animaux se traduise par un ictère simple (ou physiologique) mais non par un ictère nucléaire. Lorsque la bilirubine est injectée conjointement à une exposition à l'hypoxie, aucune aggravation de l'état des animaux n'apparaît.

Les lésions consécutives à cette double agression sont comparables à celles observées après l'hypoxie seule, alors qu'il est établi depuis longtemps qu'un antécédent hypoxique est un facteur favorisant le développement d'une encéphalopathie en réponse à l'hyperbilirubinémie (Lucey *et al.*, 1964). Face à l'absence d'ictère nucléaire, on peut émettre l'hypothèse que la bilirubine injectée par voie intrapéritonéale n'a pas franchi la barrière hémato-encéphalique (BHE). Pourtant la bilirubine libre est capable de passer la BHE. De plus, la perméabilité de la BHE est augmentée par l'anoxie (Rapoport *et al.*, 1976) ; c'est l'une des raisons pour lesquelles l'hypoxie est considérée comme facteur de risque.

Le dosage dans le cerveau des animaux révèle un taux non détectable de bilirubine. Il est à noter que la limite de détection par la technique utilisée est de l'ordre de 0,5mg/l. Or, la quantité de bilirubine transférée par l'endothélium capillaire de la BHE est faible, même lorsque la concentration de bilirubine plasmatique est élevée. Après avoir perfusé des chiots nouveau-nés avec de fortes doses de bilirubine, Bowen *et al.* (1959) ont estimé la concentration de bilirubine à 600 μ M dans le sérum, à 100 nmoles/mg dans le foie et seulement 9 nmoles/mg dans le cerveau.

Même si la technique de dosage présente des limites, il semble que la bilirubine, injectée par voie intrapéritonéale ne soit pas parvenue à franchir la BHE, peut être en raison de sa dégradation dans l'organisme. Il est également possible que la bilirubine soit entrée dans le cerveau pour être ensuite expulsée par la glycoprotéine P, dont elle peut être le substrat (Watcko *et al.*, 1998). Le mécanisme d'action des Pgp semble être essentiellement une diminution de l'accumulation des cytostatiques intracellulaires par une expulsion active (Azzaria *et al.*, 1989) ou par une redistribution intracellulaire (Willingham *et al.*, 1986) de la substance intéressée. L'absence de bilirubine au niveau cérébral pourrait aussi s'expliquer par une rapide oxydation de la bilirubine (Brodersen et Bartels, 1969) à raison de 100-300pmol/mg de protéine/minute (Hansen et al, 2000).

Quelle que soit l'explication à l'absence de bilirubine intracérébrale, il est vraisemblable que le mode d'administration de la bilirubine ne soit pas le plus approprié, l'injection par voie intraveineuse étant potentiellement plus efficace, mais impossible à réaliser chez des rats de 1 jour. Face à la difficulté d'étude de la toxicité de la bilirubine dans ce modèle *in vivo*, il a été choisi de poursuivre l'analyse dans un modèle *in vitro* faisant appel à des cultures primaires de neurones.

II) ETUDE IN VITRO DE LA TOXICITE DE LA BILIRUBINE COMME FACTEUR AGGRAVANT D'UNE HYPOXIE

A) ANALYSE DE LA NEUROTOXICITE DE LA BILIRUBINE

1) CARACTERISATION DU MODELE DE CULTURE

Dans ce modèle, les cellules se développent rapidement en une population de neurones à l'aspect homogène. Les prolongements neuritiques commencent à croître à partir de 2^{ème} jour de culture. Après 6 jours in vitro, un réseau dense de cellules est formé, avec de multiples ramifications et quelques agrégats cellulaires.

Le pourcentage de cellules viables a été évalué à 97% après une semaine de culture. L'analyse immunohistochimique de la NSE et GFAP a permis d'estimer la pureté des cultures entre 90 et 93%.

2) CHOIX DU PROTOCOLE DE PREPARATION DE LA BILIRUBINE ET D'EXPOSITION DES NEURONES

La solution de bilirubine a été réalisée à partir du protocole décrit par Nelson *et al.* (1974). Celui-ci présente l'intérêt de limiter au maximum les interactions avec les constituants du milieu de culture et permet néanmoins d'obtenir une solution de bilirubine totalement dissoute et stable. Aucun ajout d'albumine n'est réalisé. La diffusion de cette macromolécule au niveau cérébral est, en effet, limitée par son passage au travers de la barrière hémato-encéphalique (BHE).

Les concentrations de bilirubine testées dans le milieu extracellulaire s'échelonnent de 0,25 à 0,5 μM . Elles ont été choisies en raison de leurs réalités pathologiques et sur la base des travaux de Mayor Jr *et al.* (1985). Ces mêmes travaux ont servi de base de réflexion pour le choix du moment et de la durée d'exposition des neurones à la bilirubine.

Par la suite, une seule concentration de bilirubine, soit 0,5 μM , a été retenue, ceci en raison de l'obtention d'un effet significatif sur les neurones sans qu'il soit toutefois excessif en terme de viabilité résiduelle.

3) TOXICITE NEURONALE DE LA BILIRUBINE

3.1) MORT CELLULAIRE

Il apparaît que les neurones sont sensibles à de très faibles concentrations de bilirubine libre. Les données de la littérature sur la toxicité de la bilirubine reposent sur l'utilisation de concentrations très supérieures à celle utilisée dans cette étude, de 40 à 105 fois supérieures, mais toujours sous forme liée à l'albumine. De plus, la vulnérabilité cérébrale à la bilirubine étant variable selon le type cellulaire (Notter *et al.*, 1986 ; Silberberg *et al.*, 1967), les concentrations de bilirubine utilisées *in vitro* doivent tenir compte de la pureté de la culture.

Dans notre modèle, la bilirubine entraîne une mort neuronale retardée qui présente les caractéristiques de l'apoptose, avec notamment condensation de la chromatine et fragmentation de l'ADN. L'induction de l'apoptose par la bilirubine a d'ailleurs été retrouvée dans d'autres modèles de neurones isolés du cerveau de rat (Rodrigues *et al.*, 2002) ou sur des cultures de cellules endothéliales de cerveaux bovins (Akin *et al.*, 2002). Dans notre modèle, l'hypothèse d'une mort programmée est appuyée par le profil de synthèse protéique. En effet, la nécessité d'une synthèse protéique a souvent été associée à l'apoptose neuronale (Shigeno *et al.*, 1990 ; Pittman *et al.*, 1993). En accord avec ces résultats, l'utilisation d'un inhibiteur de synthèse protéique, la cycloheximide, inhibe la mort cellulaire engendrée par la bilirubine, en empêchant le processus d'apoptose. Elle ne permet toutefois pas une protection totale car elle augmente par elle-même le taux de nécrose, l'inhibition généralisée de la synthèse protéique impliquant aussi bien des protéines tueuses que des protéines de survie cellulaire.

D'autre part, l'effet protecteur des inhibiteurs de caspases, YVAD-CHO et DEVD-CHO, qui inhibent respectivement les caspases 1 et 3, tend à montrer que l'effet toxique de la bilirubine passe par un mécanisme dépendant de ces caspases dont la participation dans la mort neuronale par apoptose a été documentée (Cheng *et al.*, 1998, Tamatani *et al.*, 1998 a et b).

La faible utilisation de glucose engendrée par la bilirubine provoque une diminution de la respiration mitochondriale et de la phosphorylation oxydative (Ernster *et al.*, 1957), qui diminue la quantité d'ATP produit par la voie aérobie. Cette déplétion en ATP va provoquer la perte de l'homéostasie cellulaire à l'origine de la dégradation des cellules (Jurkowitz-Alexander *et al.*, 1992 ; Williams *et al.*, 1994). L'augmentation du calcium intracellulaire suite au déséquilibre ionique va entraîner l'activation de systèmes enzymatiques aux propriétés autolytiques pour la cellule (Mitani *et al.*, 1995), notamment des lipolyses, des protéolyses, des phosphorylations protéiques et la désagrégation de la cytoarchitecture de la cellule.

L'activité fonctionnelle des neurones est fortement altérée pendant les 24 premières heures d'exposition à la bilirubine, pour se stabiliser vers 48 heures. Dans un modèle *in vivo*, Roger *et al.* (1993) ont montré que la bilirubine altère le métabolisme énergétique en diminuant l'utilisation cérébrale locale de glucose. Mais la forte diminution de l'activité fonctionnelle des neurones pendant les 24 premières heures n'est peut-être pas le reflet de l'action directe de la bilirubine sur les cellules. La technique utilisée consiste à mesurer le 2dG[3H] et le 2dG-6-phosphate [3H] accumulés dans la cellule. La bilirubine est connue pour inhiber l'hexokinase, responsable de la transformation du 2dG en 2dG-6-phosphate. Bien que cette inhibition enzymatique ait été observée avec une concentration bien supérieure à celle utilisée dans cette étude (30 μ M), on peut émettre l'hypothèse que la bilirubine inhibe cette enzyme et freine la formation de 2dG-6-phosphate. On obtient alors une accumulation de 2dG dans la cellule qui, par un effet rétroactif réduirait l'incorporation de 2dG supplémentaire d'où une valeur d'incorporation de 2dG plus faible que dans les témoins. Une deuxième hypothèse peut être envisagée. Avant de traverser les membranes cellulaires, la bilirubine forme des complexes électrostatiques avec des lipides membranaires (Vasquez *et al.*, 1988). Ces complexes pourraient gêner transitoirement l'entrée de glucose. A partir de 48 heures, la diminution du métabolisme est plus faible qu'à 6 ou 24 heures ; ceci pourrait traduire une dégradation progressive de la bilirubine par les enzymes mitochondriales (Hansen *et al.*, 1997).

3.2) IMPLICATION DES MECANISMES D'EXCITOTOXICITE LIES AU GLUTAMATE

L'utilisation d'un antagoniste des récepteurs non-NMDA du glutamate, le NBQX, n'a aucun effet sur le devenir des cellules neuronales traitées par la bilirubine. En revanche, le MK801, ~~un~~ antagoniste des récepteurs NMDA, protège les neurones de la toxicité de la bilirubine. Ces résultats suggèrent que la bilirubine induit la mort par apoptose des neurones en cultures via les récepteurs NMDA du glutamate. Supportant cette conclusion, d'autres études ont montré l'implication du glutamate dans la neurotoxicité de la bilirubine, notamment par la mise en jeu des récepteurs NMDA (Hoffman *et al.*, 1996 ; McDonald *et al.*, 1998). L'induction du processus apoptotique par la bilirubine, dans notre modèle, pourrait s'expliquer par le mécanisme d'excitotoxicité liée au glutamate.

Les travaux de Shapiro et Sombati (1991) sur des cultures de neurones hippocampiques de rat de 1 à 3 jours, ont montré qu'une concentration de 3 à 50 μ M de bilirubine liée à l'albumine engendrait des perturbations électro-physiologiques semblables à celles induites par le glutamate.

Dans notre modèle, et en accord avec d'autres études (Walh *et al.*, 1991), les neurones cultivés pendant 6 jours *in vitro* expriment des récepteurs glutamatergiques fonctionnels (Oillet *et al.*, 1995). Cependant, comme nous l'avons évoqué précédemment, des travaux antérieurs ont montré qu'à ce stade de maturation, les neurones n'étaient pas sensibles à la toxicité du glutamate ou de ses analogues, mais devenaient vulnérables au glutamate à la suite d'une inhibition pharmacologique de la protéine kinase C-(Chihab *et al.*, 1998b). La perte de l'activité de la PKC membranaire apparaît être, en effet, un processus nécessaire à la médiation de la mort induite par les acides aminés excitateurs dans les neurones en culture (Durkin *et al.*, 1996, 1997). Or, la bilirubine est bien connue pour inhiber la protéine kinase C (Amit *et al.*, 1993 ; Sano *et al.*, 1985). On peut concevoir que la bilirubine, outre son action délétère sur le métabolisme énergétique des cellules, va activer le mécanisme d'excitotoxicité du glutamate. La recapture du glutamate par les astrocytes étant diminuée par la bilirubine (Silva *et al.*, 1999), sa concentration extracellulaire va augmenter et donc faciliter une activation prolongée des récepteurs NMDA capables de médier la mort cellulaire.

B) EFFET D'UNE EXPOSITION SIMULTANEE DES NEURONES A LA BILIRUBINE ET A UNE HYPOXIE

A titre de rappel, l'hypoxie de 6 heures induit dans ce modèle une mort cellulaire retardée, de type apoptotique (Bossenmeyer *et al.*, 1998; Bossenmeyer-Pouré *et al.*, 1999; 2000; Chihab *et al.*, 1998) corrélée à une augmentation du taux de cellules présentant une condensation puis une fragmentation de la chromatine. En revanche, lorsque les cultures sont exposées à une hypoxie plus courte (3 heures), le nombre de neurones viables est supérieur aux témoins. Ainsi, une hypoxie modérée non seulement induit des protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-2 et les protéines de stress (HSPs) pour sauvegarder les cellules, mais va aussi engendrer une prolifération neuronale via l'activation de facteurs tels que le PCNA, un co-facteur de l'ADN polymérase (Bossenmeyer *et al.*, 1999).

On peut considérer que les lésions cérébrales associées à une asphyxie périnatale ont une distribution régionale et des manifestations cliniques comparables à celles observées dans l'encéphalopathie à la bilirubine (Cowger, 1973 ; Myers, 1979 ; Odell, 1981).

Dans notre modèle, l'association d'une exposition à la bilirubine et à une hypoxie de 6 heures accentue la mort par apoptose. Il est généralement convenu que l'hypoxie accentue la toxicité de la bilirubine en facilitant son passage à travers la BHE, notamment par l'augmentation de perméabilité qu'elle génère (Rapoport *et al.*, 1976). D'ailleurs, Mayor Jr *et al.* (1985), ont montré qu'une hypoxie postnatale sévère engendre une augmentation significative des taux de bilirubine cérébrale. Mais ce modèle permet de s'affranchir de la BHE et permet d'analyser la relation directe entre bilirubine et hypoxie. L'hypoxie, par la diminution de pH qu'elle engendre, favorise la conformation de la bilirubine sous sa forme diacide qui favorise son transport au travers des membranes et, par conséquent, potentialise ses effets délétères. Dans ce contexte, Daval *et al.* (1991) ont bien montré que l'incubation des neurones dans un milieu sans oxygène durant 6 heures réduisait la pO₂ de 80% et le pH de 7,27 à 7,17.

Lorsque l'exposition à la bilirubine est associée à une hypoxie dont la durée est réduite à 3 heures, on enregistre également une diminution de viabilité liée à une augmentation du taux de cellules apoptotiques. La capacité des neurones à entrer dans le cycle cellulaire sous l'influence d'une hypoxie modérée semble être abolie par la bilirubine qui déplacerait l'équilibre en faveur des facteurs induisant l'apoptose.

Quelle que soit la durée de l'hypoxie, son association à la bilirubine engendre une mort cellulaire plus importante que celle induite séparément par la bilirubine ou l'hypoxie, suggérant une synergie des effets propres à chacune des agressions. Cet effet synergique pourrait avoir lieu au niveau du mécanisme d'excitotoxicité du glutamate. En effet, l'hypoxie engendre une libération accrue de glutamate, alors que la bilirubine inhibe sa recapture par les astrocytes (Silva *et al.*, 1999), ce qui a pour effet d'augmenter considérablement les concentrations de glutamate extracellulaire.

De plus, l'hypoxie induit une modification du récepteurs NMDA, comme le soulignent les travaux de Hoffman *et al.* (1994) qui ont étudié la liaison du MK801 [3H] pour évaluer ces modifications. Ils ont montré que l'hypoxie provoque une diminution du K_d, qui reflète une augmentation de l'affinité du récepteur.

La même conclusion a été apportée avec la bilirubine (Hoffman *et al.*, 1996). Ainsi, la double agression provoquerait un renforcement de l'excitotoxicité du glutamate au travers des récepteurs NMDA, comme le confirme l'effet protecteur obtenu dans notre étude en présence de MK801. Là encore, les effets délétères de l'hypoxie pourraient être amplifiés en présence de bilirubine par l'inhibition de la protéine kinase C et la mise en jeu de l'excitotoxicité médiée par les récepteurs NMDA.

Conclusions et Perspectives

L'asphyxie périnatale du nouveau-né à terme reste une cause importante de handicap neurologiques. Son incidence demeure de 2 à 4 pour 1000 naissances. Initialement, sur un modèle de culture de neurones issus du cerveau antérieur d'embryons de rats de 14 jours (Daval *et al.*, 1991), il a été montré qu'une hypoxie transitoire de 6 heures induisait une mort neuronale retardée traduisant un phénomène programmé (Bossenmeyer *et al.*, 1998). Les avantages des cultures cellulaires consistent en la possibilité de reproduire une étape d'un processus complexe pour l'étudier indépendamment des autres mais surtout de s'affranchir de la complexité du cerveau in situ. Néanmoins la simplicité d'un tel modèle pose le problème du réalisme physiologique des phénomènes mis en évidence.

L'objectif de ce travail était d'étudier les conséquences de l'hypoxie cérébrale chez le rat nouveau-né, où la plasticité cérébrale est optimale. Pour ce faire, un modèle non invasif chez des rats de 1 jour après la naissance a été développé.

Dans ce modèle, des lésions cellulaires apparaissent 3 jours après une hypoxie de 20 min avec un maximum de dommages apparaissant à 5-6 jours. Les pertes cellulaires sont associées aux manifestations d'une mort cellulaire par nécrose dans un premier temps suivie d'une mort cellulaire retardée présentant les caractéristiques de l'apoptose. Ainsi, les neurones présentent une condensation puis une fragmentation de leur chromatine, associée à une surexpression de protéines inhibitrices de la progression du cycle cellulaire (p53) et de protéines effectrices de l'apoptose (Bax et CPP32). Les lésions cellulaires sont observées dans l'hippocampe et dans le cortex. Malgré leur sévérité vers 5-6 jours post-hypoxie, ces lésions semblent être transitoires. Vers 40 jours, la récupération cellulaire observée semble totale ; elle est bien d'origine neuronale et non gliale. Une telle constatation a d'ailleurs été rapportée par Li *et al.* (1998b), qui ont montré une perte cellulaire importante dans le cortex dans les 3 jours consécutifs à une hypoxie sur des fœtus de rats de 20 semaines de gestation, suivi d'une restauration complète de la densité neuronale 7 jours plus tard. A ce stade de maturation, une proportion importante de neurones est encore indifférenciée et la neurogénèse n'est pas terminée, spécialement dans l'hippocampe (Reznikov, 1991). D'ailleurs, même chez l'adulte, Arvidsson *et al.* (2001) ont montré qu'une ischémie focale induisait une neurogénèse dans le gyrus dentelé, celle-ci étant médiée par les récepteurs NMDA du glutamate.

Dans le même ordre d'idée, Bernabeu et Sharp (2000), ont montré qu'une ischémie globale induisait, outre la mort cellulaire des neurones dans CA1, une neurogénèse au niveau du gyrus dentelé, totalement abolie en présence d'un antagoniste des récepteurs NMDA. La récupération neuronale observée dans le modèle de 1 jour, mérite que l'on s'y intéresse, notamment en étudiant plus précisément le phénomène de neurogénèse, par injection intrapéritonéale de BrDU, un analogue de la thymidine qui s'incorpore dans l'ADN synthétisé lors de la division cellulaire. Compte tenu du fait que l'hypoxie/ischémie est généralement suivie d'une activation de la microglie (Gehrman *et al.*, 1992), il serait judicieux d'évaluer dans notre modèle ce phénomène par un marquage de la microglie à l'OX-42, un marqueur des récepteurs CR3 des membranes microgliales (Ling *et al.*, 1990), ou encore par un marquage à l'anticorps ED1, un marqueur des macrophages et de la microglie activée (Milligan *et al.*, 1991). Bien que la microglie soit connue pour avoir des fonctions cytotoxiques par le relargage de divers facteurs comme l'oxide nitrique, ou le TNF α (Gehermann et Kreutzberg, 1995), ce qui accentue la dégénérescence neuronale dans les heures qui suivent l'hypoxie ; elle peut aussi prendre part au processus de reconstruction des tissus (Li *et al.* ; 1998b) à travers la sécrétion de certaines cytokines comme le TGF β (Prehn et Kriegstein, 1994), le NGF (Mallat *et al.*, 1989) ou encore le NT-3 (Elkabes *et al.*, 1996), qui ont tous des effets neurotrophiques sur le cerveau en développement.

Les séquelles neurologiques sévères varient de 10 à 25% chez les enfants qui ont présenté des signes cliniques d'encéphalopathie néonatale. Il n'est donc pas étonnant que l'hypoxie-ischémie soit devenue une cible privilégiée des stratégies de neuroprotection. Ce concept sous-entend de s'opposer à la mort cellulaire et plus précisément à la mort neuronale. La mise en évidence d'une mort cellulaire retardée, dans notre modèle, nous a amenés à nous intéresser à diverses thérapeutiques neuroprotectrices, à savoir l'effet de l'hypothermie, d'un conditionnement ou encore d'un traitement par un antagoniste des récepteurs NMDA, le MK801.

Les résultats montrent que l'hypothermie et le conditionnement sont deux stratégies de neuroprotection efficaces, bien qu'elles n'aient pas les mêmes mécanismes d'action. Le conditionnement agirait de façon active par la surexpression de protéines de survie telle que Bcl-2. Ces observations sont en totale adéquation avec ce qui a précédemment été observé *in vitro* (Bossenmeyer *et al.*, 2000). En revanche, l'effet de l'hypothermie serait la résultante d'une diminution du métabolisme de la cellule. Cette hypothèse mériterait d'être plus approfondie, par une étude plus fonctionnelle de l'activité des neurones, notamment par la mesure de l'utilisation cérébrale de glucose, par la méthode d'autoradiographie quantitative au 2dG-(¹⁴C) mise au point chez le rat adulte par Sokoloff *et al.* (1977) et adaptée à l'animal immature par Nehlig *et al.* (1988).

En ce qui concerne le traitement par le MK801, aucune protection vis-à-vis de l'hypoxie n'a pu être observée dans ce modèle, probablement en raison de l'immaturité des récepteurs NMDA (Burgard et Hablitz, 1993 ; Sirca 2000). Il serait judicieux d'étudier l'activité de ces récepteurs afin de savoir s'ils sont fonctionnels, notamment par l'étude de la liaison spécifique de ligands sélectifs, sur des préparations membranaires cérébrales. Malgré l'absence de protection, il mérite que l'on s'y intéresse car il permet d'allonger la durée de la fenêtre thérapeutique, en retardant l'apparition des lésions de quelques jours.

Même si des actions thérapeutiques comme l'hypothermie et le conditionnement se révèlent efficaces dans ce modèle, il convient de préciser qu'elles sont basées sur des stratégies concomitantes à l'agression hypoxique-ischémique, alors qu'il serait préférable de développer des tactiques post-agression. De plus, toutes ces actions peuvent avoir des effets secondaires. Le traitement par les antagonistes des récepteurs NMDA est d'ailleurs bien connu pour engendrer des hallucinations, des déficits d'apprentissages ou de mémoires (Whishaw et Auer, 1989 ; Wozniak *et al.*, 1990). Même les actions non médicamenteuses comme l'hypothermie peuvent avoir des répercussions sur le nouveau-né. A titre d'exemple, l'hypothermie peut provoquer une diminution de la fréquence cardiaque, une augmentation de l'hématocrite et de la viscosité sanguine ou encore une hypertension artérielle pulmonaire (Saliba et Henrot, 2000).

Compte tenu du fait que l'effet de l'hypoxie est dépendant du stade de maturation cérébrale, un des objectifs de ce travail *in vivo*, consistait à étudier l'effet d'une telle agression sur des animaux plus âgés, à 7 jours après la naissance. Contrairement à une hypoxie réalisée sur des rats de 1 jour, nos résultats mettent en évidence des lésions plus précoces apparaissant vers 2-3 jours post-hypoxie. Ces dommages cellulaires sont uniquement associés à la nécrose. Ces résultats confirment les observations *in vitro* de Chihab *et al.* (1998b) sur l'influence de l'état maturationnel du cerveau sur les réponses cellulaires et particulièrement sur l'augmentation de sensibilité du cerveau en développement au glutamate. Cette sensibilité au glutamate serait dépendante des sous unités qui constituent le récepteur NMDA (Delivori-Papadopoulos (1992 ; Sirca 2000), ce qui nous ouvre une perspective de travail intéressante. De plus, il serait nécessaire d'approfondir l'effet de la maturation cérébrale vis-à-vis de l'hypoxie, notamment en s'intéressant à l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique via un test de coloration cérébrale par le Bleu Evans. L'absence d'effet protecteur du MK801 dans le modèle 1 jour nous a amené à récidiver son étude dans le modèle de 7 jours. Dans ces conditions, on observe une réelle protection, ayant pour origine vraisemblable l'effet du MK801 sur la nécrose. Seule une étude comparative de l'état fonctionnel des récepteurs NMDA à 1 et 7 jours pourrait nous renseigner sur l'effet du MK801 selon l'âge postnatal.

Nous avons vu que l'hypoxie est délétère pour le système nerveux central et l'incidence d'une encéphalopathie néonatale chez le nouveau-né est plus élevée chez les enfants présentant un ictère que chez les enfants sains (Kim *et al.*, 1980). De plus, les lésions cérébrales consécutives à l'hypoxie ont une localisation et des manifestations cliniques comparables à celles observées dans l'encéphalopathie à la bilirubine (Cowger 1973 ; Myers 1979 ; Odell 1981). Une tentative a donc été entreprise pour reproduire, dans ce modèle *in vivo*, un ictère nucléaire par injection intrapéritonéale de bilirubine. Bien que la coloration jaune des animaux caractérise bien l'hyperbilirubinémie, ils ne développent pas pour autant un ictère nucléaire. Cette constatation a également été faite lorsque l'injection de bilirubine était associée à une hypoxie, malgré le fait que l'hypoxie soit considérée comme un facteur de risque de développer un ictère nucléaire. Il semble que l'injection intrapéritonéale de bilirubine n'ait provoqué chez les animaux qu'un ictère physiologique, probablement en raison d'une expulsion de la bilirubine par les Pgp (Watcko *et al.*, 1998) ou encore par sa dégradation enzymatique (Hansen *et al.*, 2000).

Face à cet échec d'interprétation de la toxicité de la bilirubine dans un modèle *in vivo*, nous nous sommes donc tournés vers l'utilisation d'un modèle de culture primaire de neurones d'embryons de rats. Après 96 h d'exposition à la bilirubine, la viabilité cellulaire des neurones est réduit d'une vingtaine de pour-cent.

La mort retardée induite par la bilirubine présente les caractéristiques de l'apoptose, avec notamment une évolution séquentielle de la synthèse de protéines, une fragmentation de l'ADN associée à une condensation de la chromatine. L'addition de l'hypoxie et de la bilirubine induit une baisse de la viabilité cellulaire associée à une augmentation du pourcentage de cellules apoptotiques, tous deux significativement plus élevé qu'après exposition à l'hypoxie ou à la bilirubine seules. Ces résultats confirment l'effet délétère de la bilirubine sur la viabilité neuronale, sur la synthèse des protéines et le métabolisme énergétique. La combinaison de la bilirubine et de l'hypoxie provoque un effet néfaste sur les neurones qui est plus important que celui observé avec la bilirubine seule.

Cette conclusion montrant l'effet toxique cumulatif de l'hypoxie et de la bilirubine sur la vitalité des neurones a une signification clinique d'une portée considérable, tant sont fréquentes les situations où ces deux types d'agression sont, soit contemporains, soit séquentiels à court terme. L'hypoxie peut avoir précédé l'hyperbilirubinémie - c'est le cas de l'asphyxie intranatale - l'accompagner en cas d'anémie profonde ou d'apnées récidivantes. De même, cette fragilisation neuronale par l'hypoxie pourrait expliquer des observations de la littérature où un ictère nucléaire est apparu malgré des taux de bilirubine plasmatique en-deça des seuils considérés comme dangereux. Ces observations seraient intéressantes à confirmer sur un modèle *in vivo*, utilisant notamment des rats Gunn, porteurs d'un déficit héréditaire en glucuronyltransférase provoquant une forme d'hyperbilirubinémie non conjuguée. L'utilisation d'un tel modèle permettrait d'exposer les rats à l'hypoxie en l'absence de toute injection invasive de bilirubine.

Annexe

PUBLICATIONS

Bilirubin induces apoptosis via activation of NMDA receptors in developing rat brain neurons. Grojean S, Koziel V, Vert P, Daval JL. *Experimental Neurology*, 2000.

Bilirubin exerts additional toxic effects in hypoxic cultured neurons from the developing rat brain by the recruitment of glutamate neurotoxicity. Grojean S, Lièvre V, Koziel V, Vert P, Daval JL. *Pediatric Research*, 2001.

Toxicité neuronale combinée de la bilirubine et de l'hypoxie. Etude sur des neurones de rat en culture. Vert P, Grojean S, Daval JL. *Bull. Acad. Natle. Méd.*, 2001.

Sequential expression patterns of apoptosis- and cell cycle-related proteins in neuronal response to severe or mild transient hypoxia. Bossenmeyer-Pouricé C, Lièvre V, Grojean S, Koziel V, Pillot T, Daval JL. *Neuroscience*, 2002, in press.

ARTICLES SOUMIS A PUBLICATIONS

Effects of bilirubin on cultured neurons from the developing rat forebrain exposed to lethal or non-lethal hypoxia. Grojean S, Vert P, Daval JL. *Seminars in Perinatology*

Hallmarks of apoptotic-like cell death in response to hypoxia-ischemia differ according to brain immaturity in the developing rat. Daval JL, Grojean S, Joly LM, and Charriaud-Marlangue C. *Molecular Brain Research*.

Histological and behavioral deficits induced by severe neonatal brain hypoxia in the rat pup. Grojean S; Doriat JF, Schroeder H, Bossenmeyer-Pouricé C, Desor D, Daval JL. *Experimental Neurology*

Temporal profile of brain injury after transient asphyxia in the newborn rat. Grojean S, Pouricé G, Charriaud-Marlangue C, Daval JL. *J. Neuroscience Research*.

La toxicité de la bilirubine sur le système nerveux central. Vert P, Grojean S. *Archives de Pédiatrie*.

Bibliographie

Abe K, Kogure K. Selective gene expression after brain ischemia. *Prog. Brain Res.* 1993; 96 : 221-236.

Abraham H, Losonczy A, Czeh G, Lazar G. Rapid activation of microglial cells by hypoxia, kainic acid, and potassium ions in slice preparations of the rat hippocampus. *Brain Res.* 2001 ; 906 :115-1256.

Ackerman BD, Dyer GI, Leydorf MM. Hyperbilirubinemia and kernicterus in small premature infants. *Pediatrics* 1970; 45 : 918-925.

Agoff SN, Hou J, Linzer DIH, Wu B. Regulation of the human HSP70 promoter by p53. *Science* 199 ; 259 : 84-86.

Ahdab-Barmada M, Moossy J. The neuropathology of kernicterus in the premature infant: diagnostic problems. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1984; 43:45-56.

Ahlfors CE. Criteria for exchange transfusion in jaundiced newborns. *Pediatrics* 1994; 3 : 488-494.

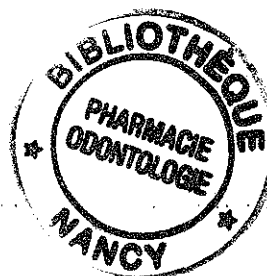
Akai F, Yanagihara T. Identity of the dorsal hippocampal region most vulnerable to cerebral ischemia. *Brain Res.* 1993; 603 : 87-95.

Akao Y, Otsuki Y, Kataoka S, Ito Y, Tsujimoto Y. Multiple subcellular localization of bcl-2 : detection in nuclear outer membrane, endoplasmic reticulum membrane, and mitochondrial membranes. *Cancer Res.* 1994; 54 (9) : 2468-2471.

Akin E, Clower B, Tibbs R, Tang J, Zhang J. Bilirubin produces apoptosis in cultured bovine brain endothelial cells. *Brain Res.* 2002 ; 931 (2) : 168-175.

Alafaci C, Salpietro F, Grasso G, Sfacteria A, Passalacqua M, Morabito A, Tripodo E, Calapai G, Buemi M, Tomasello F. Effect of recombinant human erythropoietin on cerebral ischemia following experimental subarachnoid hemorrhage. *Eur. J. Pharmacol.* 2000 ; 406 (2) : 219-225.

Albers G, Golberg MP, Choi DW. N-methyl-D-aspartate antagonists: Ready for clinical trial in brain ischemia? *Ann. Neurol.* 1989; 25 : 398-403.



Amato MM, Kilguss NV, Gelardi NL, Cashore WJ. Dose-effect relationship of bilirubin on striatal synaptosomes in rats. *Biol. Neonate* 1994; 66 : 288-293.

Ameisen JC. The origin of programmed cell death. *Science* 1996 ; 272 : 1278-1279.

Amit Y, Boneh A. Bilirubin inhibits protein kinase C activity and protein kinase C-mediated phosphorylation of endogenous substrates in human skin fibroblasts. *Clin. Chim. Acta* 1993; 223 :103-111.

Amit Y, Chan G, Fedunec S, Poznansky MJ, Schiff D. Bilirubin toxicity in a neuroblastoma cell line N-115 : I. Effects on Na⁺K⁺ATPase, [3H]-thymidine uptake, L-[35S]-methionine incorporation, and mitochondrial function. *Pediatr. Res.* 1989 ; 25 (4) ; 364-368.

Amorin P, Cottrell JE, Kass IS. Effect of small changes in temperature on CA1 pyramidal cells from rat hippocampal slices during hypoxia : implications about the mechanism of hypothermic protection against neuronal damage. *Brain Res.* 1999; 844 (1-2) : 143-149.

Andreeva N, Heldt J, Leclerc N, Gross J. Differential response of immature and mature neurons to hypoxia rat mesencephalic cultures. *Dev. Neurosci.* 2001 ; 23 (6) : 406-411.

Ankarcrona M, Dypbukt JM, Bonfoco E, Zhivotovsky B, Orrenius S, Lipton SA, Nicotera P. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron* 1995; 15 : 961-973.

Ankarcrona M, Dypbukt JM, Orrenius S, Nicotera P. Calcineurin and mitochondrial function in glutamate-induced neuronal cell death. *FEBS Lett.* 1996; 394 : 321-324.

Antonsson B, Conti F, Ciavatta A, Montessuit S, Lewis S, Martinou I, Bernasconi L, Bernard A, Mermoud JJ, Mazzei G, Maundrell K, Gambale F, Sadoul R, Martinou JC. Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science* 1997; 277 : 370-372.

Aoki M, Abe K, Kawagoe J, Nakamura S, Kogure K. Acceleration of HSP70 and HSC70 heat shock gene expression following transient ischemia in the preconditioned gerbil hippocampus. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1993; 13 : 781-788.

Arends MJ, Morris RG, Wyllie AH. Apoptosis: The role of the endonuclease. *Am. J. Pathol.* 1990; 136 : 593-596.

Armstrong RC, Aja TJ, Gaur S, Bai X, Alnemri ES, Litwack G, Karanawsky DS, Fritz LC, Tamaselli KJ. Activation of the Ced-3/ICE-related protease CPP32 in cerebellar neuron undergoing apoptosis but not necrosis. *J. Neurosci.* 1997 ; (17) : 553-562.

Aronowski J, Grotta JC, Waxham MN. Ischemia-induced translocation of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II: potential role in neuronal damage. *J. Neurochem.* 1992; 58 (5) : 1743-53.

Arrigo AP, Tanaka K, Goldberg AL. Identity of the 19S"prosome" particle with the large multifunctional protease complex of mamalian cells. *Nature* 1988; 331: 192-194.

Arvidsson A, Kokaia Z, Lindvall O. N-methyl-D-aspartate receptor-mediated increase of neurogenesis in adult rat dentate gyrus following stroke. *Eur. J. Neurosci.* 2001; 14 (1) : 10-18.

Auer RN, Coulter KC. The nature and time course of neuronal vacuolation induced by the N-methyl-D-aspartate antagonist MK-801. *Acta Neuropathol. (Berl).* 1994; 87 (1) : 1-7.

Azzaria M, Schurr E, Gros P. Discrete mutations introduced in the predicted nucleotide-binding sites of the *mdr1* gene abolish its ability to confer multidrug resistance. *Mol. Cell Biol.* 1989; 9 (12) : 5289-97.

Bagenholm R, Nilsson UA, Kjellmer I. Formation of free radicals in hypoxic-ischemic brain damage in the neonatal rat, assessed by an endogenous spin trap and lipid peroxidation. *Brain Res.* 1997 ; 773 : 132-138.

Balazs R, Jorgensen OS, Hack N. N-methyl-D-aspartate promotes the survival of cerebellar granule cells in culture. *Neuroscience* 1988 ; 27 (2) : 437-451.

Bana E, Hagberg H, Loberg EM, Bagenholm R, Thoresen M. Protective effects of moderate hypothermia after neonatal hypoxia-ischemia : short and long term outcome. *Pediatr. Res.* 1998; 43 (6) : 738- 745.

Banasiak KJ, Haddad GG. Hypoxia induced apoptosis : effect of hypoxic severity and role of p53 in neuronal cell death. *Brain Res.* 1998 ; 797 (2) : 295-304.

Banasiak KJ, Xia Y, Haddad GG. Mechanisms underlying hypoxia-induced neuronal apoptosis. *Prog. Neurobiol.* 2000 ; 62 : 215-249.

- Barde YA.** Trophic factors and neuronal survival. *Neuron* 1989; 2 (6) : 1525-34.
- Bari F, Errico RA, Louis TM, Busija DW.** Differential effects of short-term hypoxia and hypercapnia on N-Methyl-D-Aspartate-induced cerebral vasodilatation in piglets. *Stroke* 1996; 27 : 1634-1640.
- Barkett M, Xue D, Horvitz HR, Gilmore TD.** Phosphorylation of IkappaB-alpha inhibits its cleavage by caspase CPP32 in vitro. *J Biol Chem.* 1997; 272(47) : 29419-29422.
- Barry MA, Eastman A.** Identification of deoxyribonuclease II as an endonuclease involved in apoptosis. *Arch Biochem Biophys.* 199 ; 300(1) : 440-450.
- Behl C, Hovey L, Krajewski S, Schubert D, Reed JC.** Bcl-2 prevents killing of neuronal cells by glutamate but not by amyloid beta protein. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1993; 197 (2) : 949-956.
- Beilharz EJ, Williams CE, Dragunow M, Sirimanne ES, Gluckman PD.** Mechanisms of delayed cell death following hypoxic-ischemic injury in the immature rat: evidence for apoptosis during selective neuronal loss. *Mol. Brain Res.* 1995; 29 (1) : 1-14.
- Benchoua A, Guégan C, Couraud C, Hosseini H, Sampaio N, Morin D, Onténiente B.** Specific caspase pathways are activated in the two stages of cerebral infarction. *J. Neurosci.* 2001; 21 : 7127-7134.
- Bensaude O, Bellier S, Dubois MF, Giannani F, Nguyen VT.** Heat shock induced protein modifications and modulation of enzymes activities. *Stress inducible cellular responses.* Ed. by U. Feuge, RI Morimoto Iyahara and B Pella Birhauser. Verlag 1996; 199-219.
- Benveniste H, Drejer J, Schousboe A, Diemer NH.** Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J. Neurochem.* 1984; 43 (5) : 1369-1374.
- Benveniste H, Hedlund LW, Johnson GA.** Mechanism of detection of acute cerebral ischemia in rats by diffusion-weighted magnetic resonance microscopy. *Stroke* 1992; 23 (5) : 746-754.
- Bergles DE, Jahr CE.** Synaptic activation of glutamate transporters in hippocampal astrocytes. *Neuron* 1997 ; 19 : 1297-1308.

Bernabeu R, Sharp FR. NMDA and AMPA/kainate glutamate receptors modulate dentate neurogenesis and CA3 synapsin-I in normal and ischemic hippocampus. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2000; 20(12) : 1669-1680.

Berra E, Richard DE, Gothié E, Pouysségur J. HIF-1-dependent transcriptional activity is required for oxygen-mediated HIF-1 α degradation. *FEBS Lett.* 2001 ; 491 : 85-90.

Bhargava MM, Listowsky I, Arias IM. Ligandin. Bilirubin binding and glutathione-S-transferase activity are independent processes. *J. Biol. Chem.* 1978; 253 (12) : 4112-4115.

Bickler PE, Gallego SM, Hansen BM. Developmental changes in intracellular calcium regulation in rat cerebral cortex during hypoxia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1993; 13 : 811-819.

Bicknell GR, Cohen GM. Cleavage of DNA to large kilobase pair fragments occurs in some forms of necrosis as well as apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995; 207 (1) : 40-47.

Bilger A, Nehlig A. Regional cerebral blood flow response to acute hypoxia changes with postnatal age in the rat. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 1993 ; 76 (2) : 197-205.

Bockaert J, Pin J, Fagni L. Metabotropic glutamate receptors: an original family of G protein-coupled receptors. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 1993; 7 (9) : 473-485.

Bômont L, Bilger A, Boyet S, Vert P, Nehlig A. Acute hypoxia induces specific changes in local cerebral glucose utilization at different postnatal ages in the rat. *Dev. Brain Res.* 1992; 66 : 33-45.

Bompard Y, Aufrant C, Massonaud M, Gantzer A. La souffrance cérébrale asphyxique du nouveau-né. *Encycl. Méd. Chir. (Paris, France), Pédiatrie*, 7-1987, p12.

Bonfoco E, Kraine D, Ankarcrona M, Nicotera P, Lipton SA. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 92. 1995 : 7162-7166.

- Bossenmeyer C, Chihab R, Muller S, Schroeder H, Daval JL.** Hypoxia/reoxygenation induces apoptosis through biphasic induction of protein synthesis in central neurons. *Brain Res.* 1998; 787 : 107-116.
- Bossenmeyer-Pouricé C, Koziel V, Daval J.L.** Involvement of caspase-1 proteases in hypoxic brain injury. Effects of their inhibitors in developing neurons. *Neuroscience* 1999; 95 : 1157-1165.
- Bossenmeyer-Pouricé C, Koziel V, Daval JL.** Effects of hypothermia on hypoxia-induced apoptosis in cultured neurons from developing rat forebrain: comparison with preconditioning. *Pediatr. Res.* 2000; 47 : 385-391.
- Bossenmeyer-Pouricé C, Lièvre V, Grojean S, Koziel V, Pillot T, Daval JL.** Sequential expression patterns of apoptosis- and cell cycle-related proteins in neuronal response to severe or mild transient hypoxia. *Neuroscience* 2002, *in press*.
- Bossy-Wetzel E, Bakiri L, Yaniv M.** Induction of apoptosis by the transcription factor c-Jun. *EMBO J.* 1997; 16 (7): 1695-1709.
- Bottenstein JE.** Growth and differentiation of neural cells in defined media. Cell cultures in the neurosciences. *Bottenstein JE, Sato G, editores, New York. Plenum Press.* 1985 ; 1 : 3-43.
- Bottenstein JF, Sato G.** Growth of neuroblastoma cell line in serum-free supplemented medium. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1979; 76 : 514-517.
- Bowen WR, Porter E, Waters WJ.** The protective effect of albumin in bilirubin toxicity in newborn puppies. *Am. J. Dis. Child.* 1959; 48 : 568.
- Bradford HF, Young AM, Crowder JM.** Continuous glutamate leakage from brain cells is balanced by compensatory high-affinity reuptake transport. *Neurosci. Lett.* 1987; 81 (3) : 296-302.
- Bradford MM.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72: 248-254.
- Bralet AM, Beley A, Beley P, Bralet J.** Brain edema and blood-brain barrier permeability following quantitative cerebral microembolism. *Stroke* 1979 ; 10 : 34-38.

- Bratlid D, Cashore WJ, Oh W.** Effect of acidosis on bilirubin deposition in rat brain. *Pediatr.* 1984; 73 : 431-434.
- Bratlid D, Cashore WJ, Oh W.** Hyperosmolality produces opening of the blood-brain barrier for bilirubin in the rat brain. *Pediatr.* 1983; 71 : 909-912.
- Bright J, Khar J, Khar A.** Apoptosis: programmed cell death in health and disease. *Biosci. Reports* 1994; 14 (2) : 67-81.
- Brodersen R, Bartels P.** Enzymatic oxidation of bilirubin. *Eur. J. Biochem.* 1969; 10 (3) : 468-73.
- Brodersen R.** Bilirubin: solubility and interaction with albumin and phospholipid. *J. Biol. Chem.* 1979; 254 : 2364-2369.
- Brown MT, Cooper, JA.** Regulation, substrates and functions of src. *Biochim. Biophys. Acta* 1996 ; 1287 : 121-149.
- Bruick RK.** Expression of the gene encoding the proapoptotic Nip3 protein is induced by hypoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2000 ; 97 (16) : 9082-9087.
- Buchan A, Pulsinelli WA.** Hypothermia but not the N-methyl-D-aspartate antagonist, MK801, attenuates neuronal damage in gerbils subjected to transient global ischemia. *J. Neurosci.* 1990; 10 : 311-316.
- Budd SL.** Mechanisms of neuronal damage in brain hypoxia/ischemia: focus on the role of mitochondrial calcium accumulation. *Pharmacol. Ther.* 1998; 80 (2) : 203-229.
- Burgard EC, Hablitz JJ.** Developmental changes in NMDA and non-NMDA receptor-mediated synaptic potentials in rat neocortex. *J. Neurophysiol.* 1993; 69 (1) : 230-240.
- Busto R, Dietrich WD, Globus MY, Ginsberg MD.** Postischemic moderate hypothermia inhibits CA1 hippocampal ischemic neuronal injury. *Neurosci. Lett.* 1989; 101 : 299-304.
- Busza AL, Allen KL, King MD, van Bruggen N, Williams SR, Gadian DG.** Diffusion-weighted imaging studies of cerebral ischemia in gerbils. Potential relevance to energy failure. *Stroke.* 199. 23 (11) : 1602-1612.
- Buzzard K A, Giaccia AJ, Killender M, Anderson RL.** Heat shock protein 72 modulates pathways of stress-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 1998 ; 273 : 17147-17153.

- Cacciuttolo MA, Trinh L, Lumpkin JA, Rao G.** Hyperoxia induces DNA damage in mammalian cells. *Free Radic. Biol. Med.* 1993; 14 (3) : 267-276.
- Cai Z, Rhodes PG.** Intrauterine hypoxia-ischemia alters expression of the NMDA receptor in the young rat brain. *Neurochem. Res.* 2001 ; 26 (5) : 487-495.
- Cameron HA, Mc Ewen BS, Gould E.** Regulation of adult neurogenesis by excitatory input and NMDA receptor activation in the dentate gyrus. *J. Neurosci.* 1995 ; 15 : 4687-4692.
- Canese R, Fortuna S, Lorenzini P, Podo F, Michalek H.** Transient global brain ischemia in young and aged rats: differences in severity and progression, but not localisation, of lesions evaluated by magnetic resonance imaging. *MAGMA.* 1998; 7 (1) : 28-34.
- Cardell M, Wieloch T.** Time course of the translocation and inhibition of protein kinase C during complete cerebral ischemia in the rat. *J. Neurochem.* 1993; 61 : 1308-1314.
- Carter BS, Haverkamp AD, Merenstein GB.** The definition of acute perinatal asphyxia. *Clin. Perinatol.* 1993; 20 (2) : 287-304.
- Casciola-Rosen L, Nicholson DW, Chong T, Rowan KR, Thornberry NA, Miller DK, Rosen A.** Apopain/CPP32 cleaves proteins that are essential for cellular repair: a fundamental principle of apoptotic death. *J. Exp. Med.* 1996; 183 (5) : 1957-64.
- Cashore WJ, Horwich A, Karotkin EH, Oh W.** The influence of gestational age and clinical status on bilirubin binding capacity in newborn infants determined by Sephadex G-25 gel filtration technique. *Am. J. Dis. Child.* 1977; 131 : 898-905..
- Cashore WJ.** Free bilirubin concentrations and bilirubin binding affinity in term and pre-term infants. *J. Pediatr.* 1980; 96 : 521-529.
- Casiano CA, Martin SJ, Green DR, Tan EM.** Selective cleavage of nuclear autoantigens during CD95 (Fas/APO-1)-mediated T cell apoptosis. *J. Exp. Med.* 1996; 184 (2) : 765-770.
- Cassarino DS, Bennett Jr JP.** An evaluation of the role of mitochondria in neurodegenerative diseases : mitochondrial mutations and oxidative pathology. Protective nuclear responses and cell death in neurodegeneration. *Brain Res. Rev.* 1999 ; 29 : 1-25.

Charriaut-Marlangue C, Dessi F, Ben-Ari Y. Inhibition of protein synthesis by the NMDA channel bloc MK801. *Neuroreport* 1994; 5 (9) : 1110-1112.

Chen HSV, Wang YF, Rayudu PV, Edgecomb P, Neill JC, Segal MM, Lipton SA, Jensen FE. Neuroprotective concentrations of the N-methyl-D-aspartate open-channel blocker memantine are effective without cytoplasmic vacuolation following post-ischemic administration and do not block maze learning or long-term potentiation. *Neuroscience* 1986 ; 86 (4) : 1121-1132.

Cheng Y, Deshmukh M, D'Costa A, Demaro JA, Gidday JM, Shah A, Sun Y, Jacquin MF, Johnson EM, Holtzman DM. Caspase inhibitor afford neuroprotection with delayed administartion in a rat model of neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *J. Clin. Invest.* 1998; 101 (9) : 1992-1999.

Cheung HH, Teyes L, Wallace MC, Gurd JW. Increased phosphorylation of the NR1 subunit of the NMDA receptor following cerebral ischemia. *J. Neurochem.* 2001 ; 78 (5) : 1179-1182.

Chihab R, Bossenmeyer C, Oillet J, Daval JL. Lack of correlation between the effects of transient exposure to glutamate and those of hypoxia/reoxygenation in immature neurons in vitro. *J. Neurochem.* 1998 a; 71 : 1177-1186.

Chihab R, Oillet J, Bossenmeyer C, and Daval JL. Glutamate triggers cell death specifically in mature central neurons through a necrotic process. *Mol. Gen. Metab.* 1998 b; 63 : 142-147.

Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 1995 ; 81 : 505-12.

Chinnaiyan AM. The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. *Neoplasia* 1999; 1 (1) : 5-15.

Choi DW. Calcium mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *J. Neurosci.* 1988; 11 (10) : 465-469.

Choi DW. Cerebral hypoxia: some new approaches and unanswered questions. *J. Neurosci.* 1998; 10: 2493-2501.

Choi DW. Excitotoxic cell death. *J. Neurobiol.* 1992; 23 : 1261-1276.

Chopp M, Knight R, Tidwell CD, Helpert JA, Brown E, Welch KMA. The metabolic effects of mild hypothermia on global cerebral ischemia and recirculation in the cat: comparison to normothermia and hyperthermia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1989; 9 : 141-148.

Chopp M, Li Y, Zhang JS, Graham SH. p53 expression in brain after middle cerebral artery occlusion in the rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 1992; 96 : 615-624.

Chow E, Haddad GG. Differential effects of anoxia and glutamate on cultured neocortical neurons. *Exp. Neurol.* 1998; 150 (1) : 52-9.

Cohen GM. Caspases; the executioners of apoptosis. *Biochem. J.* 1997; 326 : 1-16.

Cohn HE, Sacks EJ, Heymann MA, Rudolph AM. Cardiovascular responses to hypoxemia and acidemia in fetal lambs. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1974; 120 (6) : 817-24.

Colbourne F, Corbett D. Delayed postischemic hypothermia: a six month survival study using behavioral and histological assessments of neuroprotection. *J. Neurosci.* 1995; 15 (11) : 7250-7260.

Collingridge GL and Lester RAJ. Excitatory aminoacid receptors in the vertebrate central nervous system. *Pharmacol. Rev.* 1989; 40 (2) : 143-210.

Conus S, Rosse T, Borner C. Failure of Bcl-2 family members to interact with Apaf-1 in normal and apoptotic cells. *Cell Death Differ.* 2000; 7 (10) : 947-954.

Corbett D, Nurse S, Colbourne F. A global ischemia study using 18- to 20- month-old gerbils. *Stroke* 1997; 28 : 2238-2243.

Corchs JL, Serrani RE, Venera G, Palchick M. Inhibition of potassium (⁸⁶Rb) influx in Ehrlich ascites cells by bilirubin and ouabain. *Experimentia* 1982 ; 38 (9) : 1069-1071.

Cossins AR, Shinitzky M. Adaptation of membranes to temperature, pressure and exogenous lipids. In *Shinitzky M, ed. Physiology of Membrane Fluidity. Boca Raton, Fla : CRC Press ; 1984 : 1-20.*

Cowan FM, Pennock JM, Hanrahan JD, Manji KP, Edwards AD. Early detection of cerebral infarction and hypoxic ischemic encephalopathy in neonates using diffusion-weighted magnetic resonance *Neuropediatrics. 199; 25 (4) : 172-175.*

Cowger ML. Bilirubin encephalopathy. In: Gaull GE (ed) Brain disfunction. *Plenum Press. New-York 1973, 265-293.*

Crépel V, Hammond C, Chinestra P, Diabira D, Ben-Ari Y. A selective LTP of NMDA receptor-mediated currents induced by anoxia in CA1 hippocampal neurons. *J. Neurophysiol. 1993a; 70 (5) : 2045-2055.*

Crépel V, Hammond C, Krnjevic K, Chinestra P, Ben-Ari Y. Anoxia-induced LTP of isolated NMDA receptor-mediated synaptic responses. *J. Neurophysiol. 1993b; 69 (5) : 1774-1778.*

Danbolt NC, Storm-Mathisen J, Ottersen OP. Sodium/potassium-coupled glutamate transporters, a "new" family of eukaryotic proteins: do they have "new" physiological roles and could they be new targets for pharmacological intervention? *Prog. Brain Res. 1994; 100 : 53-60.*

Datta R, Kojima H, Banach D, Bump NJ, Talanian RV, Alnemri ES, Weichselbaum RR, Wong WW, Kufe DW. Activation of a CrmA-insensitive, p35-sensitive pathway in ionizing radiation-induced apoptosis. *J. Biol. Chem. 1997; 272 (3) : 1965-1969.*

Daval JL, Koziel V, Nicolas F. Functional changes in cultured neurons following transient asphyxia. *Neuroreport 1991 ; 2 : 97-100.*

Daval JL, Pereira de Vasconcelos A, Lartaud I. Morphological and neurochemical effects of diazepam and phenobarbital on selective culture of neurons from fetal rat brain. *J. Neurochem. 1988 ; 50 : 665-672.*

Davis PK, Dudek sm, Johnson GVW. Select alterations in protein kinases and phosphatases during apoptosis of differentiated PC12 cells. *J. Neurochem. 1997; 68 : 2338-2347.*

Dell'Anna ME, Calzolari S, Molinari M, Iuvone L, Calimici R. Neonatal anoxia induces transitory hyperactivity, permanent spatial memory deficits and CA1 cell density reduction in developing rats. *Behav. Brain Res.* 1991 ; 45 : 125-134.

Dennery PA, McDonagh AF, Spitz DR, Rodgers PA, Stevenson DK. Hyperbilirubinemia results in reduced oxidative injury in neonatal gunn rats exposed to hyperoxia. *Free Rad. Biol. Med.* 1995; 19 : 395-404.

Dessi F, Ben-Ari Y, Charriaud-Marlangue C. Increased synthesis of specific proteins during glutamate-induced neuronal death in cerebellar culture. *Brain Res.* 1994; 654 (1) : 27-33.

Dessi F, Charriaud-Marlangue C, Ben-Ari Y. Glutamate-induced neuronal death in cerebellar culture is mediated by two distinct component: a sodium-chloride component and a calcium component. *Brain Res.* 1994; 650 : 49-55.

Dessi F, Charriaud-Marlangue C, Khrestchatisky M, Ben-Ari Y. Glutamate-induced neuronal death is not a programmed cell death in cerebellar culture. *J. Neurochem.* 1993; 60 : 1953-1955.

Dickson DW. Apoptosis in the brain: Physiology and pathology. *Am. J. Pathol.* 1995; 146 (5) : 1040-1044.

Didier M, Bursztajn S, Adamec E, Passani L, Nixon RA, Coyle JT, Wei JY, Berman SA. DNA strand breaks induced by sustained glutamate excitotoxicity in primary neuronal cultures. *J. Neurosci.* 1996; 16 (7) : 2238-2250.

Dimlich RV, Showers MJ, Shipley MT. Densitometric analysis of cytochrome oxidase in ischemic rat brain. *Brain Res.* 199; 516 (2) : 181-191.

Ding D, Moskowitz SI, Li R, Lee SB, Esteban M, Tomaselli K, Chan J, Bergold PJ. Acidosis induces necrosis and apoptosis of cultured hippocampal neurons. *Exp. Neurol.* 2000 ; 162 (1) : 1-12

D'Mello SR, Galli C, Ciotti T, Calissano P. Induction of apoptosis in cerebellar granule neurons by low potassium: inhibition of death by insulin-like growth factor I and cAMP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1993; 90 (23) : 10989-10993.

Dobbing J, Sands J. Quantitative growth and development of human brain. *Arch. Dis. Child.* 1973; 48 (10) : 757-767.

Dobbing J. The later growth of the brain and its vulnerability. *Pediatrics.* 1974; 53 (1) : 2-6

Doble A. Excitatory amino acid receptors and neurodegeneration. *Therapie* 1995; 50 : 319-337.

Dommergues JP, Danel P. Free bilirubin jaundice of newborn infants: current aspects. *Rev. Prat.* 1986; 36 (47) : 2745-53.

Dong Z, Saikumar P, Weinberg JM, Venkatachalam MA. Internucleosomal DNA cleavage triggered by plasma membrane damage during necrotic cell death. Involvement of serine but not cysteine proteases. *Am. J. Pathol.* 1997 ; 151 : 1205-1213.

Downward J. Signal transduction. New exchange, new target. *Nature* 1998 ; 396 (6710) : 416-417.

Dubinski JM, Rothman SM. Intracellular calcium concentrations during "chemical hypoxia" and excitotoxic neuronal injury. *J. Neurosci.* 1991; 11 : 2545-2551.

Dudnik LB, Khrapova NG. Characterization of bilirubin inhibitory properties in free radical oxidation reactions. *Membr. Cell Biol.* 1998; 12 (2) : 233-240.

Dugan LL, Creedon DJ, Johnson EM Jr, Holtzman DM. Rapid suppression of free radical formation by nerve growth factor involves the mitogen-activated protein kinase pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997 ; 94 (8) : 4086-4091.

Duhaime AC, Ross DT. Degeneration of hippocampal CA1 neurons following transient ischemia due to raised intracranial pressure: evidence for a temperature-dependent excitotoxic process. *Brain Res.* 1990; 512 (1) : 169-174.

Durkin JP, Tremblay R, Buchan A, Blosser J, Chakravarthy B, Mealing G, Morley P, Song D. An early loss in membrane protein kinase C activity precedes the excitatory amino acid-induced death of primary cortical neurons. *J. Neurochem.* 1996; 66 : 951-962.

Durkin JP, Tremblay R, Chakravarthy B, Mealing G, Morley P, Song D. Evidence that the early loss of membrane protein kinase C is a necessary step in the excitatory amino acid-induced death of primary cortical neurons. *J. Neurochem.* 1997; 68 : 1400-1412.

Eastman A. Apoptosis: a product of programmed and unprogrammed cell death. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1993; 121 : 160-164.

Egea J, Espinet C, Comella JX. Calmodulin modulates mitogen-activated protein kinase activation in response to membrane depolarization in PC12 cells. *J. Neurochem.* 1998 ; 70 (6) : 2554-2564.

Eilers A, Whitfield J, Babij C, Rubin LL, Ham J. Role of the Jun kinase pathway in the regulation of c-Jun expression and apoptosis in sympathetic neurons. *J. Neurosci.* 1998; 18 (5) : 1713-1724.

Eizenberg O, Faber-Elman A, Gottlieb E, Oren M, Rotter V, Schwartz M. p53 plays a regulatory role in differentiation and apoptosis of central nervous system-associated cells. *Mol. Cell Biol.* 1996; 16 (9) : 5178-5185.

Elkabes S, DiCicco-Bloom EM, Black IB. Brain microglia/macrophages express neurotrophins that selectively regulate microglial proliferation and function. *J. Neurosci.* 1996; 16 (8) : 2508-2521.

Ellison G. Competitive and non-competitive NMDA antagonists induce similar limbic degeneration. *Neuroreport* 1994; 5 (18) : 2688-2692.

Ellison G. The N-methyl-D-aspartate antagonists phencyclidine, ketamine and dizocilpine as both behavioral and anatomical models of the brain ischemia. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 1995; 20 (2) : 250-267.

Engidawork E, Chen Y, Dell'Anna E, Goiny M, Lubec G, Ungerstedt U, Andersson K, Herrera-Marschitz M. Effect of perinatal asphyxia on systemic and intracerebral pH and glycolysis metabolism in the rat. *Exp. Neurol.* 1997; 145 (2) : 390-396.

Enomoto R, Ogita K, Kawanami K, Azuma Y, Yoneda Y. Simultaneous determination of binding of a variety of radioligands related to ionotropic excitatory amino acid receptors in fetal and neonatal rat brains. *Brain Res.* 1996; 723 (1-2) : 100-109.

- Ernster L, Herlin L, Zetterstrom R.** Experimental studies on the pathogenesis of kernicterus. *Pediatr.* 1957; 20 : 647-656.
- Escobar GJ, Littenberg B, Petitti DB.** Outcome among surviving very low birthweight infants: a meta-analysis. *Archs. Dis. Child.* 1991; 66 : 204-211.
- Estus S, Zaks WJ, Freeman RS, Gruda M, Bravo R, Johnson EM Jr.** Altered gene expression in neurons during programmed cell death: identification of c-jun as necessary for neuronal apoptosis. *J. Cell. Biol.* 1994; 127 (6/1) : 1717-1727.
- Eyquem A.** L'ictère nucléaire expérimental. *Acta Neurol. Psychiatr.* 1949; 49 : 965-986.
- Fagg GE and Foster AC.** Amino acid neurotransmitters and their pathway in the mammalian central nervous system. *Neurosci.* 1983; 9 : 701-709.
- Falany CN, Tephley TR.** Separation, purification and characterization of 3 isoenzymes of UDP-glucuronosyltransferase from rat liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 1983; 227 : 248-258.
- Falk H.** Molecular structure of bile pigments. In : Bile pigments and jaundice : Molecular, Metabolic and Medical Aspects. *JD Ostrow, Ed. Marcel Dekker, New York, 1986 : 7-27.*
- Farooqui AA, Horrocks LA.** Involvement of glutamate receptors, lipases and phospholipases in long term potentiation and neurodegeneration. *J. Neurosci. Res.* 1994; 38 : 6-11.
- Fazekas JF, Alexander FAD, Himwich HE.** Tolerance of the newborn to anoxia. *Am. J. Physiol.* 1941; 134 : 281-287.
- Fazekas JF, Graves FB, Himwich HE.** Influence of thyroid on cerebral metabolism. *Endocrinology* 1951; 48 : 169-174.
- Ferrer I, Martin F, Serrano T, Reiriz J, Perez-Navarro E, Alberch J, Macaya A, Planas AM.** Both apoptosis and necrosis occur following intrastriatal administration of excitotoxins. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 1995; 90 (5) : 504-510.

Feverly J, Blanckaert N, Heirwegh KP, Preaux AM, Berthelot P. Unconjugated bilirubin and an increased proportion of bilirubin monoconjugates in the bile of patients with Gilbert's syndrome and Crigler-Najjar disease. *J. Clin. Invest.* 1977; 60 (5) : 970-979.

Ficunane DM, Bossy-Wetzel E, Waterhouse NJ, Cotter TG, Green DR. Bax-induced caspase activation and apoptosis via cytochrome c release from mitochondria is inhibitable by Bcl-Xl. *J. Biol. Chem.* 1999 ; 274 : 225-233.

Figiel I, Kaczmarek L. Cellular and molecular correlates of glutamate-evoked neuronal programmed cell death in the in vitro cultures of rat hippocampal dentate gyrus. *Neurochem. Int.* 1997; 31 (2) : 229-240.

Ford LM, Sanberg PR, Norman AB, Fogelson MH. MK-801 prevents hippocampal neurodegeneration in neonatal hypoxic-ischemic rats. *Arch. Neurol.* 1989; 46 (10) : 1090-1096.

Freeman JK, Goldberg MP. Confocal microscopic visualization of MK-801-induced cytoplasmic vacuoles in vitro. *Psychopharmacol Bull.* 1994; 30 (4) : 541-547.

Friedman WF, Kirkpatrick SC. Fetal cardiovascular adaptation to asphyxia. In Gluck L. Intrauterine asphyxia and the developing fetal brains. *Year Book Publishers Inc*, 1977 : 149-165.

Fritz KI, Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos M. Mg²⁺-dependant modification of the N-methyl-D-aspartate receptor following graded hypoxia in the cerebral cortex of newborn piglets. *Neuroscience* 1999 ; 685-692.

Froissard P, Duval D. Cytotoxic effects of glutamic acid on PC12 cells. *Neurochem. Int.* 1994 ; 24 (5) : 485-493.

Fukuda T, Nakano S, Yoshiya I, Hashimoto PH. Persistent degenerative state of non-pyramidal neurons in the CA1 region of the gerbil hippocampus following transient forebrain ischemia. *Neuroscience* 1993; 53 (1) : 23-38

Fukunaga K et Miyamoto E. Role of MAP kinase in neurons. *Mol. Neurobiol.* 1998 ; 16 : 79-95. ;

Fukunaga K, Soderling TR, Miyamoto E. Activation of Ca/calmoduline dependent protein kinase II and protein kinase C by glutamate in cultured rat hippocampal neurons. *J. Biol. Chem.* 1992; 267 (31) : 22527-22533.

Furukawa K, Estus S, Fu W, Mark RJ, Mattson MP. Neuroprotective action of cycloheximide involves induction of bcl-2 and antioxydant pathways. *J. Cell Biol.* 1997; 136 : 1137-1149.

Gabilan JC. Traitement pharmacologique de l'ictère du nouveau-né. *Arch. Fr. Pediatr.* 1991; 48 : 223-225.

Garay M, Gaarde W, Monia BP, Nero P, Cioffi CL. Inhibition of hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis by an antisens oligonucleotide targeted to JNK1 in human kidney cells. *Biochem. Pharmacol.* 2000; 59 : 1033-1043.

Garrido C, Bruey JM, Fromentin A, Hammann A, Arrigo AP, Solary E. HSP27 inhibits cytochrome c-dependent activation of procaspase-9. *FASEB J.* 1999; 13(14) : 2061-2070.

Gehrmann J, Banati RB, Wiessner C, Hossmann KA, Kreutzberg GW. Reactive microglia in cerebral ischaemia: an early mediator of tissue damage? *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 1995; 21 (4) : 277-289.

Gehrmann J, Bonnekoh P, Miyazawa T, Hossmann KA, Kreutzberg GW. Immunocytochemical study of an early microglial activation in ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1992 ; 12 : 257-269.

Gehrmann J, Bonnekoh P, Miyazawa T, Oshlies U, Dux E, Hossmann KA. The microglial reaction in the rat hippocampus following global ischemia : immuno-electron microscopy. *Acta Neuropathol.* 1992 ; 84 : 588-595.

Gereau RW 4th, Conn PJ. Multiple presynaptic metabotropic glutamate receptors modulate excitatory and inhibitory synaptic transmission in hippocampal area CA1. *J. Neurosci.* 1995 a; 15 (10) : 6879-6889.

Gereau RW 4th, Conn PJ. Roles of specific metabotropic glutamate receptor subtypes in regulation of hippocampal CA1 pyramidal cell excitability. *J. Neurophysiol.* 1995 b; 74 (1) : 122-129.

Gething MJ, Sambrook J. Protein folding in the cell. *Nature* 1992 ; 355 (6355) : 33-45.

Ghayur T, Hugunin M, Talanian RV, Ratnofsky S, Quinlan C, Emoto Y, Pandey P, Datta R, Huang Y, Kharbanda S, Allen H, Kamen R, Wong W, Kufe D. Proteolytic activation of protein kinase C delta by an ICE/CED 3-like protease induces characteristics of apoptosis. *J Exp. Med.* 1996; 184 (6) : 2399-2404.

Gidday JM, Fitzgibbons JC, Shah AR, Park TS. Neuroprotection from ischemic brain injury by hypoxic preconditioning in the neonatal rat. *Neurosci. Lett.* 1994; 168 : 221-224.

Gilland E, Hagberg H. NMDA Receptor-dependent increase of cerebral glucose utilization after hypoxia-ischemia in the immature rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1996; 16 (5) : 1005-1013.

Gilland E, Puka-Sundvall M, Hillered L, Hagberg H. Mitochondrial function and energy metabolism after hypoxia-ischemia in the immature rat brain: involvement of NMDA-receptors. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1998; 18 (3) : 297-304.

Gillard F, Lenz C, Waschke KF, Krajewski S, Reed JC, Zimmermann M, Kuschinsky W. Altered expression of Bcl-2, Bcl-X, Bax, and c-Fos colocalizes with DNA fragmentation and ischemic cell damage following middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 1996; 40 (2) : 254-260.

Ginsberg MD, Globus MY, Dietrich WD, Busto R. Temperature modulation of ischemic brain injury--a synthesis of recent advances. *Prog. Brain Res.* 1993; 96 : 13-22.

Giulian D, Vaca K, Corpuz M. Brain glia release factors with opposing actions upon neuronal survival. *J. Neurosci.* 1993 ; 13 : 29-37.

Gobbel GT, Chan TY, Chan PH. Amelioration of hypoxic and hypoglycemic damage to cerebral endothelial cells. Effects of heat shock pretreatment. *Mol. Chem. Neuropathol.* 1995; 24 (2-3) : 107-120.

Goel R, Mishra OP, Razdan B, Delivoria-Papadopoulos M. Modification of NMDA receptor by in vitro lipid peroxidation in fetal guinea pig brain. *Neurosci. Lett.* 1993 ; 151 : 219-223.

Goh JW, Ballyk BA. A cAMP-linked metabotropic glutamate receptor in *Neuroreport*. 1993; 4 (4) : 454-456.

Gould E, Mc Ewen BS. Neuronal birth and death. *Curr. Opin. Neurobiol.* 1993 ; 3 (5) : 676-682.

Gradin Y, Mc Guire J, Wenger RH, Kvietikova L, Whitelaw ML, Toftgard R, Tora L, Gassmann M, Poellinger LA. Functional interference between hypoxia and dioxin signal transduction pathways: competition for recruitment of the ARNt transcription factor. *Mol. Cell. Biol.* 1996; 16 : 5221-5231.

Graves LM, Bornfeldt KE, Krebs EG. Historical perspectives and new insights involving the MAP kinase cascades. *Adv. Second Messengers Phosphoprotein Res.* 1997 ; 31 : 49-62.

Gree D, Kroemer G. The central executioners of apoptosis : caspases or mitochondria? *Trends Cell. Biol.* 1998 ; 8 (7) : 267-271.

Greely HT. Human genome diversity: what about the other human genome project? *Nat. Rev. Genet.* 200; 2 (3) : 222-227.

Green D, Kroemer G. The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? *Trends Cell. Biol.* 1998; 8 (7) : 267-271.

Green DR, Bissonnette RP, Glynn JM, Shi Y. Activation-induced apoptosis in lymphoid systems. *Semin. Immunol.* 1992 ; 4 : 379-388.

Greenamyre JT, Porter RH. Anatomy and physiology of glutamate in the CNS. *Neurology* 1994; 44 (11) : 07-13.

Greenberg ME, Hermanowski AL, Ziff EB. Effect of protein-synthesis inhibitors on growth factor activation of c-fos, c-myc and actin gene transcription. *Mol. Cell. Biol.* 1986; 6 : 1050-1057.

Gross J, Lun A. Hypoxisch bedingte ZNC. Schädigung in der Perinatalperiode. *Z. Klin. Med.* 1985 ; 40 : 1531-1534.

Gschwind M, Huber G. Detection of apoptotic or necrotic death in neuronal cells by morphological, biochemical, and molecular analysis. In: Poirier J (ed) Apoptosis Techniques and Protocols, *Neuromethods* 1997; 29 : 13-31.

Guillouf C, Grana X, Selvajumaran M, De Luca A, Giordano A, Hoffman B, Liebermann DA. Dissection of the genetic programs of p53-mediated G1 growth arrest and apoptosis: blocking p53-induced apoptosis unmasks G1 arrest. *Blood* 1995; 85 (10) : 2691-2698.

Gunn AJ, Mydlar T, Bennet L, Faull RL, Gorter S, Cook C, Johnston BM, Gluckman PD. The neuroprotective actions of a calcium channel antagonist, flunarizine, in the infant rat. *Pediatr. Res.* 1989; 25 (6) : 573-576.

Haddad GG, Jiang C. O₂ deprivation in the central nervous system: on mechanisms of neuronal response, differential sensitivity and injury. *Prog. Neurobiol.* 1993; 40 (3) : 277-318.

Hagberg H, Lehmann A, Sandberg M, Nystrom B, Jacobson I, Hamberger A. Ischemia-induced shift of inhibitory and excitatory amino acids from intra- to extracellular compartments. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 198; 5 (3) : 413-419

Hakem R, Hakem A, Duncan GS, Henderson JT, Woo M, Soengas MS, Elia A, de la Pompa JL, Kagi D, Khoo W, Potter J, Yoshida R, Kaufman SA, Lowe SW, Penninger JM, Mak TW. Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo. *Cell* 1998; 94 : 339-352.

Hakim A. Physiologie et Pathologie de l'ischémie cérébrale. *Rev. Neurol.* 1999 ; 155 (9) : 631-637.

Haldar S, Jena N, Croce CM. Inactivation of Bcl-2 by phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1995; 92 (10) : 4507-4011.

Halterman MW, Federoff HJ. HIF-1 α and p53 promote hypoxia-induced delayed neuronal death in models of CNS ischemia. *Exp. Neurol.* 1999 ; 159 (1) : 65-72.

Ham J, Babij C, Whitfield J, Pfarr CM, Lallemand D, Yaniv M, Rubin LL. A c-Jun dominant negative mutant protects sympathetic neurons against programmed cell death. *Neuron* 1995 ; 14.

Hammond C, Tritsch D. *Neurobiologie cellulaire*. Dion, 1990.

Han BH, D'Costa A, Back SA, Parsadanian M, Patel S, Shah AR, Gidday JM, Srinivasan A, Deshmukh M, Holtzman DM. BDNF blocks caspase-3 activation in neonatal hypoxia-ischemia. *Neurobiol. Of Disease* 2000 ; 7 : 38-53.

Hansen MB, Nielsen SE, Berg K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J. Immunol. Meth.* 1989; 119 : 203-210.

Hansen TWR, Bratlid D, Walaas SI. Bilirubin decreased phosphorylation of synapsin I, a synaptic vesicle-associated neuronal phosphoprotein, in intact synaptosomes from rat cerebral cortex. *Pediatr. Res.* 1988 a; 23 : 219-223.

Hansen TWR, Tommarello S, Allen JW. Oxidation of bilirubin by rat brain mitochondrial membranes- Genetic variability. *Biochem. Mol. Med.* 1997; 62 (1) : 128-131.

Hansen TWR. Bilirubin oxidation in brain. *Mol. Gen. Metab.* 2000; 71 (1/2) : 411-417.

Hara A, Iwai T, Niwa M, Uematsu T, Yoshimi N, Tanaka T, Mori H.

Immunohistochemical detection of Bax and Bcl-2 proteins in gerbil hippocampus following transient forebrain ischemia. *Brain Res.* 1996; 711 (1-2) : 249-253.

Hara H, Friedlander RM, Gagliardini V, Ayata C, Kink K, Huang Z, Shimizu-Sasamata M, Yuan J, Moskowitz MA. Inhibition of interleukine 1beta converting enzyme family proteases reduces ischemic and excitotoxic neuronal damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997; 94 (5) : 2007-2012.

Hara H, Sukamoto T, Kogure K. Mechanism and pathogenesis of ischemia-induced neuronal damage. *Prog. Neurobiol.* 1993; 40 (6) : 645-670.

Hattori H, Morin AM, Schwartz PH, Fujikawa DG, Wasterlain CG. Posthypoxic treatment with MK801 reduces hypoxic-ischemic damage in the neonatal rat. *Neurology* 1989; 39 : 713-718.

Hattori H, Wasterlain CG. Hypothermia does not explain MK801 neuroprotection in a rat model of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Neurology* 1991; 41 : 300.

Haymaker W, Margles C, Pentschew A et al. Pathology of kernicterus and post-icteric encephalopathy, in american academy for cerebral palsy (eds): Kernicterus and its importance in cerebral palsy , eleventh annual meeting, New Orleans, La. Springfield, Ill, Charles C Thomas, 1961 : 21.

Hengartner M O, Horvitz HR. Programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1994 ; 4 : 581-586.

Herren B, Levkau B, Raines EW, Ross R. Cleavage of beta-catenin and plakoglobin and shedding of VE-cadherin during endothelial apoptosis: evidence for a role for caspases and metalloproteinases *Mol. Biol. Cell.* 1998; 9 (6) :1589-1601.

Hershkowitz M, Grim VE, Spencer Z. The effects of postnatal anoxia on behavioral and on the muscarinic and beta-adrenergic receptors in the hippocampus of the developing rat. *Devl. Brain Res.* 1983; 7 : 147-155.

Hervieux JFE. De l'ictère des nouveau-nés. *Thèse de Doctorat en Médecine, Paris, 1847.*

Higashi T, Tanechi H, Uemura Y, Kikuchi H, Nagata K. Differential induction of mRNA species encoding several classes of stress proteins following focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res.* 1994; 650 : 239-248.

Hill A. Current concepts of hypoxic-ischemic cerebral injury in the term newborn. *Pediatr. Neurol.* 1991; 7 : 317-325.

Hirata H, Takahashi A, Kobayashi S, Yonehara S, Sawai H, Okazaki T, Yamamoto K, Sasada M. Caspases are activated in a branched protease cascade and control distinct downstream processes in Fas-induced apoptosis. *J. Exp. Med.* 1998 ; 187 : 587-600.

Hirose K, Chan PH. Blockade of glutamate excitotoxicity and its clinical applications *Neurochem Res.* 1993; 18 (4) : 479-483.

Hoffman DJ, Mc Gowan JE, Marro PJ, Mishra OP, Delivoria Papadopoulos M. Hypoxia induced modification of the NMDA receptor in the brain of the newborn piglet. *Neurosci. Letter* 1994; 167 (1-2) : 156-160.

Hoffman DJ, Zanelli SA, Kubin J, Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos M. The in vivo effect of bilirubin on the N-methyl-D-aspartate receptor/ion channel complex in the brains of newborn piglets. *Pediatr. Res.* 1996; 40 : 804-808.

Hollmann M, Hartley M, Heinemann S. Ca²⁺ permeability of KA-AMPA-gated glutamate receptor channels depends on subunit. *Science.* 1991; 252 (5007) : 851-853.

Hsu H, Xiong J, Goeddel DV. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* 1995 ; 81 : 495-504.

Hsu KS, Huang CC. Characterization of the anoxia-induced long-term synaptic potentiation in area CA1 of the rat hippocampus. *Br. J. Pharmacol.* 1997; 122 (4) : 671-681.

Hu Y, Benedict M A, Wu, D, Inohara N, Nunez G. Bcl-XL interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998; 95 : 4386-4391.

Hunter AJ, Green AR, cross AJ. Animal models of the acute ischaemic stroke: can they predict clinically successful neuroprotective drugs? *Trends Pharmacol. Sci.* 1995; 16 : 123-128.

Huot J, Houle F, Spitz DR, Landry J. Phosphorylation mediated resistance against actin fragmentation and cell death induced by oxidative stress. *Cancer Res.* 1996; 56 : 273-279.

Huppi PS, Inder TE. Magnetic resonance techniques in the evaluation of the perinatal brain: recent advances and future directions. *Semin Neonatol.* 2001 Apr;6(2):195-210. Review.

Ikacko JA, Sun R, Siverstein FS. Hypoxic-ischemic brain injury induces an acute microglia reaction in perinatal rats. *Pediatr. Res.* 1996 ; 39 : 39-47.

Ikonomidou C, Bosch F, Miksa M, Bittigau P, Vockler J, Dikranian K, Tenkova TI, Stefovskaja V, Turski L, Olney JW. Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science.* 1999; 283 (5398) : 70-74.

Ikonomidou C, Mosinger JL, Salles KS, Labruyere J, Olney JW. Sensitivity of the developing rat brain to hypobaric/ischemic damage parallels sensitivity to N-methyl-aspartate neurotoxicity. *J. Neurosci.* 1989 ; 9 : 2809-2819.

Imaizumi K, Morihara T, Mori Y, Katayama T, Tsuda M, Furuyama T, Wanaka A, Takeda M, Tohyama M. The cell death-promoting gene DP5, which interacts with the Bcl-2 family, is induced during neuronal apoptosis following exposure to amyloid beta protein. *J. Biol. Chem.* 1999; 274 : 7975-7981.

Inohara N, Ekhterae D, Garcia I, Carrio R, Merino J, Merry A, Chen S, Nunez G. Mtd, a novel Bcl-2 family member activates apoptosis in the absence of heterodimerization with Bcl-2 and Bcl-XL. *J. Biol. Chem.* 1998 ; 273 : 8705-8710.

Ishikawa T. The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump. *Trends Biochem. Sci.* 1992 ; 17 : 463-468.

Ito T, Deng X, Carr B, May WS. *J. Cell Biochem.* 1997; 273 (39) : 25436-25442.

Itoh N, Tsujimoto Y, Nagata S. Effect of Bcl-2 on Fas antigen-mediated cell death. *J. Immunol.* 1993; 151 (2) : 612-627.

Ivacko JA, Sun R, Siverstein FS. Hypoxic-ischemic brain injury induces an acute microglia reaction in perinatal rats. *Pediatr. Res.* 1996 ; 39 : 39-47.

Iwai T, Hara A, Niwa M, Nozaki M, Uematsu T, Sakai N, Yamada H. Temporal profile of nuclear DNA fragmentation in situ in gerbil hippocampus following transient forebrain ischemia. *Brain Res.* 1995; 671 : 305-308.

Jaattela M, Wissing D, Koholm K, Kallunki T, Egeblad M. Hsp70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like proteases. *EMBO J.* 1998; 17 (21) : 6124-6134.

Jaattela M. Escaping cell death: survival proteins in cancer. *Exp. Cell Res.* 1999; 248 : 30-43.

Jackson DL, Dole WP. Total cerebral ischemia : a new model system for the study of post-cardiac arrest brain damage. *Stroke* 1979 ; 10 (1) : 38-43.

Jacobson MD, Raff MC. Programmed cell death and Bcl-2 protection in very low oxygen. *Nature* 1995; 374 : 814-816.

- Jänicke RU, Sprengart MI, Wati MR, Porter AG.** Caspase-3 is required DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J. Biol. Chem.* 1998; 273 : 9357-9360.
- Jiang Q, Gu Z, Zhang G, Jing G.** Diphosphorylation and involvement of extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2) in glutamate-induced apoptotic-like death in cultured rat cortical neurons. *Brain Res.* 2000 b ; 857 : 71-77.
- Jiang Q, Gu Z, Zhang Gi, Jing G.** N-methyl-D-aspartate receptor activation results in regulation of extracellular signal-regulated kinases by protein kinases and phosphatases in glutamate-induced neuronal apoptotic-like death. *Brain Res.* 2000 a; 887 : 285-292.
- Jin K, Minami M, Lan JQ, Mao XO, Bateur S, Simon RP, Greenberg DA.** Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001 ; 98 (8) : 4710-4715.
- Johansson B, Nilsson B.** The pathophysiology of the blood-brain barrier dysfunction induced by severe hypercapnia and by epileptic brain activity. *Acta Neuropathol. (Berl).* 1977 ; 38 (2) : 153-158.
- Johnson EM, Deckwerth TL.** 1993. Molecular mechanisms of developmental neuronal death. *Annu. Rev. Neurosci.*, 16 : 31-46.
- Johnston MV.** Cellular alterations associated with perinatal asphyxia. *Clin. Invest. Med.* 1993; 16 (2) : 122-132.
- Jordan J, Galindo MF, Prehn JH, Weichselbaum RR, Beckett M, Ghadge GD, Roos RP, Leiden JM, Miller RJ.** P53 expression induces apoptosis in hippocampal pyramidal neuron cultures. *J. Neurosci.* 1997; 17 (4) : 1397-1405.
- Jorgen MB, Diemer NH.** Selective neuron loss after cerebral ischemia in the rat : possible role of transmitter glutamate. *Acta Neurol ; Scand.* 1982 ; 66 : 536-546.
- Jorgensen MB, Diemer NH.** Selective neuron loss after cerebral ischemia in the rat: possible role of transmitter glutamate. *Acta Neurol. Scand.* 1982; 66 : 536-546.
- Juin P, Hueber AO, Littlewood T, Evan G.** c-Myc-induced sensitization to apoptosis is mediated through cytochrome c. *Genes Dev.* 1999; 13 : 1367-1381.

- Jurgensmeier JM, Xie Z, Deveraux Q, Ellerby L, Bredesen D, Reed JC.** Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998; 95 (9) : 4997-5002.
- Kagström E, Smith ML, Siesjö BK.** Local cerebral blood flow in the recovery period following complete ischemia in the rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1983 ; 3 : 170-182.
- Kameyama M, Suzuki J, Shirane R, Ogawa A.** A new model of bilateral hemispheric ischemia in the rat. *Stroke* 1985 ; 16 : 489-493.
- Kanai Y, Hediger MA.** Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. *Nature* 1992; 360 (6403) : 467-471.
- Kanai Y, Smith CP, Hediger MA.** A new family of neurotransmitter transporters: the high-affinity glutamate transporters. *FASEB J.* 1993; 7 (15) : 1450-1459.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM.** Principals of Neural Science. *Appleton and Lange* (3rd edition, 1991).
- Karasawa Y, Hiroaki H, Otomo S.** Changes in locomotor activity and pasive avoidance task performance induced by cerebral ischemia in mongolian gerbils. *Stroke* 1994 ; 25 : 645-650.
- Karibe H, Zarow GJ, Graham SH, Weinstein PR.** Mild intrainischemic hypothermia reduces postischemic hyperperfusion, delayed postischemic hypoperfusion, blood-brain barrier disruption, brain edema and neuronal damage volume after temporary focal cerebral ischemia in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1994; 14 : 620-627.
- Kato H, Kanellopoulos GK, Matsuo S, Wu YJ, Jacquin MF, Hsu CY, Kouchoukos NT, Choi DW.** Neuronal apoptosis and necrosis following spinal cord ischemia in the rat. *Exp. Neurol.* 1997 ; 148 (2) : 464-474.
- Kato H, Liu Y, Araki T, Kogure K.** Mk801, but not anisomycin, inhibits the induction of tolerance to ischemia in the gerbil hippocampus. *Neurosci. Lett.* 1992; 139 : 118-121.
- Kato H, Liu Y, Araki T, Kogure K.** Temporal profil of the effects of pretreatment with brief cerebral ischemia on the neuronal damage following secondary ischemic insult in the gerbil : cumulative damage and protective effects. *Brain Res.* 1991; 553 : 238-242.

Kato H, Liu Y, Kato K. Induction of 27kDa heat shock protein following cerebral ischemia in a rat model of ischemic tolerance. *Brain Res.* 1994 (634): 235-244.

Kato-Semba R. Studies on cellular toxicity of bilirubin : effect on brain glycolysis in the young rat. *Brain Res.* 1976 ; 113 (2) : 339-348.

Kawai S, Yonetani M, Nakamura H, Okada Y. Effects of deprivation of oxygen and glucose on the neural activity and the level of high energy phosphates in the hippocampal slices immature and adult rat. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 1989; 48 (1) : 11-18.

Kayalar C, Ord T, Testa MP, Zhong LT, Bredesen DE. Cleavage of actin by interleukin 1 beta-converting enzyme to reverse DNase I inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996; 93 (5) : 2234-2238.

Ke N, Godzik A, Reed JC. Bcl-B, a novel Bcl-2 family member that differentially binds and regulates Bax and Bak. *J. Biol. Chem.* 2001 ; 276 (16) : 12481-12484.

Kerr JRF, Harmon BV, Tomei LD, Cope FO, editors. Apoptosis. The molecular basis of cell death. *New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press,* 1991 : 5-29.

Kerr JRF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis : a basic biological phenomenon with wide range implications in tissue kinetic. *Br. J. Cancer* 1972; (26) : 239-250.

Keyse SM, Tyrrell RM. Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *Proc. Natl. Sci. USA* 1989; 86 (1) : 99-103.

Kiang JG, Tsokos GC. Heat shock proteins 70 kDa, Molecular Biology, Biochemistry and Physiology. *Pharmacol. Ther.* 1998; 80: 183-201.

Kim MH, Yoon JJ, Sher J, Brown AK. Lack of predictive indices in kernicterus: a comparison of clinical and pathologic factors in infants with or without kernicterus. *Pediatrics* 1980; 66 : 852-858.

Kirino T, Tamura A, Sano K. Delayed neuronal death in the rat hippocampus following transient forebrain ischemia. *Acta Neuropathol.* 1984; 64 : 139-147.

- Kleckner NW, Dingledine R.** Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Science* 1988 ; 241 (4867) : 835-837.
- Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD.** The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 1997; 275 : 1132-1136.
- Kobayashi S, Welsh FA.** Regional alteration of ATP and heat shock protein-72 mRNA following hypoxia-ischemia in neonatal rat brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1995; 15 : 1047-1056.
- Koistinaho J, Hokfelt T.** Altered gene expression in brain ischemia. *Neuroreport* 1997 ; 8 (2).
- Krajewski S, Krajewska M, Ellerby LM, Welsh K, Xie Z, Deveraux QL, Salvesen GS, Breiden DE, Rosenthal Fiskum G, Reed JC.** Release of caspase-9 from mitochondria during neuronal apoptosis and cerebral ischemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 199; 96 (10) : 5752-5727.
- Kramer RS, Sanders AP, Lesage AM, Woodhall B, Sealy WC.** The effect profound hypothermia on preservation of cerebral ATP content during circulatory arrest. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 1968; 56 (5) : 699-709.
- Kreisman NR, Sick TJ, LaManna JC, Rosenthal M.** Local tissue oxygen tension-cytochrome a,a3 redox relationships in rat cerebral cortex in *Brain Res.* 1981; 218 (1-2) : 161-174.
- Kroemer G.** The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nature Med.* 1997; 3 : 614-620.
- Kruman II, Mattson MP.** Pivotal role of mitochondrial calcium uptake in neural cell apoptosis and necrosis. *J Neurochem.* 1999; 72 (2) : 529-540.
- Kuan CY, Roth KA, Flavell RA, Rakic P.** Mechanisms of programmed cell death in the developing brain. *Trends Neurosci.* 2000; 23 : 291-297.
- Kubo T, Yokoi T, Hagiwara Y, Fukumori R, Goshima Y, Misu Y.** Characteristics of protective effects of NMDA antagonist and calcium channel antagonist on ischemic calcium accumulation in rat hippocampal CA1 region. *Brain Res. Bull.* 2001 ; 54 (4) : 413-419.

Kuida K, Haydar TF, Kuan CY, Gu Y, Taya C, Karasuyama H, Su MS, Rakic P, Flavell RA. Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. *Cell* 1998; 94 : 325-337.

Kuida K, Zheng TS, Na S. Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32 deficient mice. *Nature* 1996; 384 : 368-372.

LaManna JC, Kutina-Nelson L, Martin AH, Huang Z, Wong-Riley M. Decreased rat brain cytochrome oxidase activity after prolonged hypoxia. *Brain Res.* 1996; 720 : 1-6.

Landry J, Lambert H, Zhou M, Lavoie JN, Hickey E, Weber LA, Anderson CW. Human HSP27 is phosphorylated at serines 78 and 82 by heat shock and mitogen activated kinases that recognize the same amino acid motif as 56 kinase II. *J. Biol. Chem.* 1992; 267: 794-803.

Laptook AR, Corbett RJT, Burns D, Sterett R. 1995. Neonatal ischemic neuroprotection by modest hypothermia is associated with attenuated brain acidosis. *Stroke*, 26 : 1240-1246.

Laroia G, Cuesta R, Brewer G, Schneider RJ. Control of mRNA decay by heat shock-ubiquitin-proteasome pathway. *Science.* 1999 Apr 16;284(5413):499-502.

Larroche JC. Lésions cérébrales fœtales et néonatales. Quelques aspects méconnus. *Progrès en Néonatalogie* 1991; 11 : 227-230.

Lassen NA. Brain extracellular pH: the main factor controlling cerebral blood flow. *Scand J Clin Lab Invest.* 1968; 22 (4) : 247-251.

Lazebnik YA, Takahashi A, Moir RD, Goldman RD, Poirier GG, Kaufmann SH, Earnshaw WC. Studies of the lamin proteinase reveal multiple parallel biochemical pathways during apoptotic execution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995; 92 : 9042-9046.

Lee N, MacDonald H, Reinhard C, Halenbeck R, Roulston A, Shi T, Williams LT. Activation of hPAK65 by caspase cleavage induces some of the morphological and biochemical changes of apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997; 94 : 13642-13647.

Lehre KP, Levy LM, Ottersen OP, Storm-Mathisen J, Danbolt NC. Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain : quantitative and immunocytochemical observations. *J. Neurosci.* 1995 ; 15 : 1835-1853.

Leininger-Muller B, Siest G, Minn A. La conjugaison des médicaments dans le cerveau. *Thérap.* 1994; 49 : 499-507.

Leist M, Nicotera P. Calcium and neuronal death. *Rev. Physiol. Pharmacol. Biochem.* 1997 ; 132 : 79-125.

Lesort M, Terro F, Esclaire F, Hugon J. Neuronal APP accumulates in toxic membranes blebbings. *J. Neural. Transm.* 1997; 104 (4-5): 497-513.

Levene MI, Evans DH. Medical management of raised intracranial pressure after severe birth asphyxia. *Arch Dis Child.* 1985; 60 (1) : 12-16.

Levene S. Potentially dangerous sleeping environments and accidental asphyxia in infancy and early childhood. *Arch Dis Child.* 1995; 72 (5) : 467.

Levine S, Payan H. Effects of ischemia and other procedures on the brain and retina of the gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Exp. Neurol.* 1966; 16 : 255-262.

Li GC, Werb Z. Correlation between synthesis of heat shock proteins and development of thermotolerance in Chinese hamster fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1982; 79 : 3218-3222.

Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 1998a; 94 : 491-501.

Li YB, Kaur C, Ling EA. Neuronal degeneration and microglial reaction in the fetal and postnatal rat brain after transient maternal hypoxia. *Neurosci. Res.* 1998b; 32 : 137-148.

Lightner DA, Grawronski JK, Wijekoon WMD. Complementary and chiral recognition : enantioselective complexation of bilirubin. *J. Am. Chem. Soc.* 1987; 21 : 6354-6362.

Limbrick DD Jr, Churn SB, Sombati S, DeLorenzo RJ. Inability to restore resting intracellular calcium levels as early indicator of delayed neuronal cell death. *Brain Res.* 1995 ; 690 (2) :145-156.

Linden R. The survival of developing neurons: a review of afferent control. *Neuroscience* 1994; 58 : 671-682.

Lindquist S. The heat-shock response. *Annu. Rev. Biochem.* 1986; 55 : 1151-1191.

- Ling EA, Kaur LC, Yick TY, Wong WC.** Immunocytochemical localization of CR3 complement receptors with OX-42 in amoeboid microglia in postnatal rat. *Anat. Embryol. (Berl)* 1990; 182 (5) : 481-486.
- Liossis SN, Ding XZ, Kiang JG, Tsokos GC.** Overexpression of the heat shock protein 70 enhances the TCR/CD3- and Fas/Apo-1/CD95-mediated apoptotic cell death in Jurkat T cells. *J. Immunol.* 1997; 158 : 5668-5675.
- Liu Y, Kato H, Nakata N, Kogure K.** Protection of rat hippocampus against ischemic neuronal damage by pretreatment with sublethal ischemia. *Brain Res.* 1992; 586 : 121-124.
- Loetscher H, Pan YC, Lahm HW, Gentz R, Brockhaus M, Tabuchi H, Lesslauer W.** Molecular cloning and expression of the human 55 kd tumor necrosis factor receptor. *Cell* 1990; 61 : 351-359.
- Lotem J, Peled-Kamar M, Groner Y, Sachs L.** Cellular oxydative stress and the control of apoptosis by wild-type p53, cytotoxic compounds, and cytokines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996; 93 : 9166-9171.
- Lou HC, Lassen NA, Fris-Hansen B.** Decreased cerebral blood flow after administration of sodium bicarbonate in the distressed newborn infant. *Acta Neurol. Scand.* 1978; 57 (3) : 239-47.
- Louis JC, Magal E, Yavin E.** Protein kinase C alterations in the fetal rat brain after global ischemia. *J. Biol. Chem.* 1988; 263 : 19282-19285.
- Lucey JF, Hibbard E, Behrman RE, Esquivel de Gallardo FO, Windle WF.** Kernicterus in asphyxiated newborn Rhesus monkey. *Exp. Neurol.* 1964; 9 : 43-49.
- Lun A, Dominick B, Gross J.** An animal model of perinatal hypoxic brain damage: behavioural aspects. *Biomed. Biochim. Acta.* 1990; 49 (10) : 1021-1026.
- Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X.** Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 1998; 94 : 481-490.

- Luttrell LM, Daaka Y, Della Rocca GJ, Lefkowitz RJ.** G protein-coupled receptors mediate two functionally distinct pathways of tyrosine phosphorylation in rat 1a fibroblasts. Shc phosphorylation and receptor endocytosis correlate with activation of ERK kinases. *J. Biol. Chem.* 1997 ; 272 (50) : 31648-31656.
- MacDonal JW, Johnston MV.** Physiologic and pathophysiologic roles of excitatory amino acids during central nervous system development. *Brain Res. Rev.* 1990; 15 : 41-70.
- Madl JE, Burgesser K.** Adenosine triphosphate depletion reverses sodium-dependent, neuronal uptake of glutamate in rat hippocampal slices. *J. Neurosci.* 1993; 13 (10) : 4429-4444.
- Maher P.** How protein Kinase C activation protects nerve cells from oxidative stress-induced cell death. *J. Neurosci.* 2001 ; 21 (9) : 2929-2938.
- Malamud N.** Pathogenesis of kernicterus in the light of its sequelae. In : *Kernicterus and its importance in cerebral palsy.* Springfield, Ill, Charles C Thomas, 1961 : 230-245.
- Mallat M, Houlgatte R, Brachet P, Prochiantz A.** Lipopolysaccharide-stimulated rat brain macrophages release NGF in vitro. *Dev. Biol.* 1989; 133 (1) : 309-311.
- Mannick JB, Hausladen A, Liu L, Hess DT, Zeng M, Miao QX, Kane LS, Gow AJ, Stamler JS.** Fas-induced caspase *Science.* 1999; 284 : 651-654.
- Marchenko ND, Zaika A, Moll UM.** Death signal induced localization of p53 protein to mitochondria. *J. Biol. Chem.* 2000 ; 275 (21) : 16202-16212.
- Margolin NM, Raybuck SA, Wilson KP, Chen W, Fox T, Gu Y, Livingston DJ.** Substrate and inhibitor specificity of ICE and related caspases. *J. Biol. Chem.* 1997 ; 272 (11) : 7223-7228.
- Marret S, Mukendi R, Gadisseux JF, Gressens P, Evrard P.** Effect of ibotenate on brain development: an excitotoxic mouse model of microgyria and posthypoxic-like lesions. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1995; 54 (3) : 358-370.
- Marti HJ, Bernaudin M, Bellail A, Scoch H, Euler M, Petit E, Risau W.** Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression precedes neovascularization after cerebral ischemia. *Am. J. Pathol.* 2000; 156 (3) : 965-976.

Martin J, Hartl FU. . Molecular chaperones in cellular protein folding. *Bioessays* 16, 1994 : 689-692.

Martin LJ, Al-Abdulla NA, Brambrink AM, Kirsch JR, Sieber FE, Portera-Cailliau C. Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target deprivation: A perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Brain Res. Bull.* 1998; 46 (4) : 281-309.

Martin LJ, Sieber FE, Traystman RJ. Apoptosis and necrosis occur in separate neuronal populations in hippocampus and cerebellum after ischemia and are associated with differential alterations of metabotropic glutamate receptor signaling pathways. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2000; 20 : 153-167.

Martin LJ. Neuronal cell death in nervous system development, disease and injury. *Int. J. Mol. Med.* 2001; 7 : 455-478.

Martinou JC, Dubois-Dauphin M, Staple JK, Rodriguez I, Frankowski H, Missotten M, Albertini P, Talabot D, Catsicas S, Pietra C. Over-expression of Bcl-2 in transgenic mice protects neurons from naturally occurring cell death and experimental ischemia. *Neuron* 1994; 13 : 1017-1030.

Matsuoka Y, Kitamura Y, Fukunaga R, Shimohama S, Nabeshima T, Tooyama I, Kimura H, Taniguchi T. In vivo hypoxia-induced neuronal damage in dentate gyrus of rat hippocampus: changes in NMDA receptors and the effect of MK-801. *Neurochem Int.* 1997; 30 (6) : 533-42.

Matsuoka Y, Kitamura Y, Fukunaga R, Shimohama S, Nabeshima T, Tooyama I, Kimura H, Taniguchi T. In vivo hypoxia induced neuronal damage in dentate gyrus of rat hippocampus : changes in NMDA receptors and the effect of MK801. *Neurochem. Int.* 1997 ; 30 (6) : 533-542.

Matsuoka Y, Kitamura Y, Tsukahara T, Terai K, Tooyama I, Kimura H, Taniguchi T. Neuroprotective effects of NBQX on hypoxia-induced neuronal damage in rat hippocampus. *Neuroreport* 1995; 6 : 2205-2208.

Mattson MP, Rychlik B. Glia protect hippocampal neurons against excitatory amino acid-induced degeneration: involvement of fibroblast growth factor. *Int. J. Dev. Neurosci.* 1990; 8 (4) : 399-415.

Maulik D, Zanelli S, Numagami Y, Ohnishi ST, Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos M. Oxygen free radical generation during in-utero in the fetal guinea pig brain: the effects of maturity and of magnesium sulfate administration. *Brain Res.* 1999; 817: 117-122.

Mayers ML and Miller RJ. Excitatory amino acid receptors, seconds messengers and regulation of intracellular Ca²⁺ in mammalian neurons. *TIPS Special Report* 1991: 36-42.

Mayevsky A, Frank K, Muck M, Nioka S, Kessler M, Chance B. Multiparametric evaluation of brain functions in the Mongolian gerbil in vivo. *J. Basi Clin. Physiol. Pharmacol.* 1992; 3 (4) : 323-342.

Mayor F Jr, Pagés M, Diez-Guerra J, Valdivieso F, Mayor F. Effect of postnatal anoxia on bilirubin levels in rat brain. *Pediatr. Res.* 1985; 19 : 231-236.

Mc Rae A, Gilland E, Bona E, Hagberg H. Microglia activation after neonatal hypoxia-ischemia. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 1995 ; 84 : 245-252.

McConkey DJ, Hartzell P, Nicotera P, Wyllie AH, Orrenius S. Stimulation of endogenous endonuclease activity in hepatocytes exposed to oxidative stress. *Toxicol Lett.* 1988; 42 (2) : 123-130.

McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med.* 1985; 312 (3) : 159-163.

McDonagh AF, Lightner DA. Hepatic uptake, transport and metabolism of alkylated bilirubins in Gunn rats and Sprague-Dawley rats. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 1994; 40 (7) : 965-74.

McDonald JW, Shapiro SM, Silverstein FS, Johnston MV. Role of glutamate receptor mediated excitotoxicity in bilirubin-induced brain injury in the Gunn rat model. *Exp. Neurol.* 1998; 150 : 21-29.

McGahon AJ, Martins SJ, Bissonnette RP, Mahboubi A, Shi Y, Mogil RJ, Nishioka WK, Green DR. The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro. *In Cell Death*, 1995 : 153-185.

Mehlen P, Kretz-Remy C, Preville X, Arrigo P. Human HSP27, drosophyla HSP27 and human α -crystallin expression-mediated increase in glutathione is essential for the protective activity of these proteins against TNF-induced cell death. *EMBO J.* 1996; 15 : 2695-2706.

Meisel P, Jahrig D, Bleyer H, Jahrig K. Indications for blood exchange transfusion in newborn infants with hyperbilirubinemia. *Kinderarztl. Prax.* 1981; 49 (9) : 449-459.

Meisel P, Jahrig D, Jahrig K. Bilirubin in cerebrospinal fluid of the newborn infant. II. Influencing Factors influencing the bilirubin content of cerebrospinal fluid. *Kinderarztl. Prax.* 1982; 50 (7) : 370-378. *German.*

Meisel P, Jahrig D, Jahrig K. Bilirubin in the cerebrospinal fluid of newborn infants. I. Comparative studies of cerebrospinal fluid in bilirubinemia and CNS disorders *Kinderarztl. Prax.* 1981; 49 (12) : 633-42.

Ment LR, Stewart WB, Petroff OA, Duncan CC, Montoya D. Beagle puppy model of perinatal asphyxia: blockade of excitatory *Pediatr Neurol.* 1989;5 (5) : 281-216.

Merry DE, Veis DJ, Hickey WF, Korsmeyer SJ. Bcl-2 protein expression is widespread in the developing nervous system and retained in the adult PNS. *Development* 1994; 120 (2) : 301-311.

Michenfelder JD, Theye RA. Hypothermia: effect on canine brain and whole-body metabolism. *Anesthesiology.* 1968; 29 (6) : 1107-1112.

Michenfelder JD, Theye RA. The effects of anesthesia and hypothermia on canine cerebral ATP and lactate during anoxia produced by decapitation. *Anesthesiology.* 1970; 33 (4) : 430-439.

Milligan C, Cunningham T, Levitt P. Differential immunochemical markers reveal the normal distribution of brain macrophage and microglia in the developing rat brain. *J. Comp. Neurol.* 1991; 314 : 125-135.

Minn A J, Velez P, Schendel SL, Liang H, Muchmore SW, Fesik SW, Fill M, Thompson CB. Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature* 1997; 385, 353-357.

Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos M. Cellular mechanism of hypoxic injury in the developing brain. *Brain Res. Bull.* 1999 ; 48 (3) : 233-238.

Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos M. Modification of modulatory sites of NMDA receptor in the fetal guinea pig brain during development. *Neurochem. Res.* 1992 ; 17 (12) : 1223-1228.

Mitani A, Kataoka K. Critical levels of extracellular glutamate mediating gerbil hippocampal delayed neuronal death during hypothermia: brain microdialysis study. *Neuroscience* 1991 ;42 (3) :661-670.

Mitani A, Takeyasu S, Yanase H, Nakamura Y, Kataoka. Changes in intracellular Ca^{2+} and energy levels during in vitro ischemia in the gerbil hippocampal slice. *J. Neurochem.* 1994; 62 : 626-634.

Mitani A, Yanase H, Namba S, Shudo M, Kataoka K. In vitro ischemia-induced intracellular Ca^{2+} elevation in cerebellar slices: a comparative study with the values found in hippocampal slices. *Acta Neuropathol.* 1995; 89 (1) : 2-7.

Miyasaka N, Nagaoka T., Kuroiwa T, Akimoto H, Haku T, Kubota T, Aso T. Histopathologic correlates of temporal diffusion changes in a rat model of cerebral hypoxia-ischemia. *Am. J. Neuroradiol.* 2000 : 21 : 60-66.

Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, Wang HG, Lin HK, Hoffman B, Lieberman D, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a regulator of Bcl-2 and Bax in gene expression in vitro and in vivo: *Oncogene* 1994; 9 : 1799-1805.

Miyashita T, U M, Inoue T, Reed JC, Yamada M. Bcl-2 relieves the trans-repressive function of the glucocorticoid receptor and inhibits the activation of CPP32-like cysteine proteases. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 1997; 233 : 781-787.

Mizuta I, Katayama M, Watanabe M, Mishina M, Ishii K. Developmental expression of NMDA receptor subunits and the emergence of glutamate neurotoxicity in primary cultures of murine cerebral cortical neurons. *Cell Mol. Life Sci.* 1998 ; 54 (7) : 721-725.

Molinari E. Experimental cerebral infarction. Selection occlusion of intracranial arteries in the dog. *Stroke* 1970 ; 1 : 224-231.

Monaghan DT, Bridges RJ, Cotman CW. The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1989; 29 : 365-402.

Monyer H, Sprengel R, Schoepfer R, Herb A, Higuchi M, Lomeli H, Burnashev N, Sakmann B, Seeburg P. Heterodimeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Sciences* 1992; 256 : 1217-1221.

Morel Y, Barouki R. Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochem. J.* 1999; 342 (3) : 481-496.

Morgan JJ, Curran T. Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Ann. Rev. Neurosci.* 1991; 14 :421-451.

Morrison RS, Wenzel HJ, Kinoshita Y, Robbins CA, Donehower LA, Schwartzkroin PA. Loss of the p53 tumor suppressor gene protects neurons from kainate-induced cell death. *J. Neurosci.* 1996; 16 (4) : 1337-1345.

Mosser DD, Caron AW, Bourget L, Denis-Larose C, Massie B. Role of the human heat shock protein HSP70 in protection against stress-induced apoptosis. *Mol. Cell Biol.* 1997; 17 : 5317-5327.

Munell F, Burke RE, Bandele A, Gubits RM. Localisation of c-fos, c-jun and HSP70 mRNA expression in brain after neonatal hypoxia-ischemia. *Dev. Brain Res.* 1994; 77 : 111-121.

Muraca M, Fevery J, Blanckaert N. Relationships between serum bilirubins and production and conjugation of bilirubin. Studies in Gilbert's syndrome, Crigler-Najjardisease, hemolytic disorders, and rat models. *Gastroenterology* 1987; 92 (2) : 309-317.

Murakami F, Song WJ, Katsumaru H. Plasticity of neuronal connections in developing brains of mammals. *Neurosci. Res.* 1992 ; 15 : 235-253.

- Muramatsu K, Fukuda A, Togari H, Wada Y, Nishino H.** Vulnerability to cerebral hypoxic-ischemic insult in neonatal but not in adult rats is in parallel with disruption of the blood-brain barrier. *Stroke* 1997; 28 : 2281-2289.
- Muzio M, Chinnaiyan A M, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, Ni J, Scaffidi C, Bretz, JD, Zhang M, Gentz R, Mann M, Krammer PH, Peter ME, Dixit VM.** FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death--inducing signaling complex. *Cell* 1996; 85 : 817-827.
- Myers KM, Kiskum G, Liu Y, Simmens SJ, Bredesen DE, Murphy AN.** Bcl-2 protects neural cells from cyanide/Aglycemia-induced lipid oxydation, mitochondrial injury, and loss of viability. *J. Neurochem.* 1995; 65 : 2432-2440.
- Myers RE.** A unitary theory of causation of anoxia and hypoxia brain pathology. In: Fahn C, Davis JN, Rowland LP (eds) Cerebral hypoxia and its consequences. *Advances in Neurology*, 1979; 26 : 195-213.
- Nagata S.** Apoptosis by death factor. *Cell* 1997; 88, 355-365.
- Nakamura H, Yonctani M, Vetani Y, Funato M, Lee Y.** Determination of serum unbound bilirubin for prediction of kernicterus in low birthweight infants. *Acta Pediatr. Jpn.* 1992; 34 : 642-647.
- Nakanishi S.** Molecular diversity of glutamate receptors and implication for brain function. *Science* 1992; 258 : 597-603.
- Namura S, Zhu J, Fink K, Endres M, Srinivasan M, Tomaselli KJ, Yuan J, Moskowitz MA.** Activation and cleavage of caspase-3 in apoptosis induced by experimental cerebral ischemia. *J. Neurosci.* 1998; 18 : 3659-3668.
- Nath R, Probert A, McGinnis KM, Wang KKW.** Evidence for activation of caspase-3-like proteases in excitotoxin- and hypoxia/hypoglycemia-injured neurons. *J. Neurochem.* 1998; 71 : 186-195.
- Nawashiro H, Shima K, Chigasaki H.** Selective vulnerability of hippocampal CA3 neurons to hypoxia after mild concussion in the rat. *Neurol. Res.* 1995; 17 (6) : 455-460.

Nehlig A, Pereira de Vasconcelos A, Boyet S. Quantitative autoradiographic measurement of local cerebral glucose utilization in freely moving rats during postnatal development. *J. Neurosci.* 1988; 8 : 2321-2333.

Nehlig A, Pereira de Vasconcelos A. Glucose and ketone body utilization by the brain of neonatal rats. *Prog. Neurobiol.* 1993 ; 40 (2) : 163-221.

Nehlig A. Imaging and the ontogeny of brain metabolism. *Baillieres Clin. Endocrinol. Metab.* 1993 ; 7 (3) : 627-642.

Nelson T, Jacobsen J, Wennberg RP. Effect of pH on the interaction of bilirubin with albumin and tissue culture cells. *Pediatr. Res.* 1974 : 963-967.

Nemoto EM, Hossmann KA, Cooper HK. Post-ischemic hypermetabolism in cat brain. *Stroke.* 1981; 12 (5) : 666-676.

Ng K, Shore GC. Bcl-xl cooperatively associated with the Bap31 complex in the endoplasmic reticulum, dependent on pro-caspase-8 and Ced-4 adaptor. *J. Biol. Chem.* 1998; 273 (6) : 3140-3143.

Nguyen M, Millar DG, Yong VW, Korsmeyer SJ, Shore GC. Targeting of Bcl-2 to the mitochondrial outer membrane by a COOH-terminal signal anchor sequence. *J. Biol. Chem.* 1993; 268, 25265-25268.

Ni R, Tomita Y, Matsuda K, Ichihara A, Ishimura K, Ogasawara J, Nagata S. Fas-mediated apoptosis in primary cultured mouse hepatocytes. *Exp. Cell Res.* 1994; 215 : 332- 337.

Nicoletti F, Wroblewski JT, Novelli A, Guidotti A, Costa E. Excitatory amino acid signal transduction in cerebellar cell cultures. *Funct. Neurol.* 1986; 1 (4) : 345-349.

Nishi S, Taki W, Uemura Y, Higashi T, Kikuchi H, Kudoh H, Satoh M, Nagata K. Ischemic tolerance due to the induction of HSP70 in a rat ischemic recirculation model. *Brain Res.* 1993 ; 615 (2) : 281-288.

Noda M, Nakanishi H, Nabekura J, Akaike N. AMPA-Kainate subtypes of glutamate receptor in rat cerebral microglia. *J. Neurosci.* 2000 ; 20 : 251-258.

- Northington FJ, Ferriero DM, Flock DL, Martin LJ.** Delayed neurodegeneration in neonatal rat thalamus after hypoxia-ischemia is apoptosis. *J. Neurosci.* 2001a; 21 (6) : 1931-1938.
- Northington FJ, Ferriero DM, Martin LJ.** Neurodegeneration in the thalamus following neonatal hypoxia-ischemia is programmed cell death. *Dev. Neurosci.* 2001b; 23 (3) : 186-191.
- Norwood WI, Norwood CR, Ingwall JS, Castaneda AR, Fossel ET.** Hypothermic circulatory arrest : 31-phosphorus nuclear magnetic resonance in isolated perfused neonatal rat brain. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 1979 ; 78 : 823-830.
- Notter MFD, Kendig JW.** Differential sensitivity of neural cells to bilirubin toxicity. *Exp. Neurol.* 1986; 94 : 670-682.
- Nowak TSJ, Bond U, Schlesinger MJ.** Heat shock RNA levels in brain and other tissue after hyperthermia and transient ischemia. *J. Neurochem.* 1990; 54 : 451-458.
- Nowak TSJ, Ikeda J, Nakajima T.** 70-kDa heat shock protein and c-fos gene expression after transient ischemia. *Stroke* 1990 ; 21 : 107-111.
- Numagami Y, Zubrow AB, Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos M.** Lipid free radical generation and brain cell membrane alteration following nitric oxide synthase inhibition during cerebral hypoxia in the newborn piglet. *J. Neurochem.* 1997 ; 69 : 1542-1547.
- Nurse S, Corbett D.** Direct measurement of brain temperature during and after intraischemic hypothermia : correlation with behavioral, physiological and histological endpoints. *J. Neurosci.* 1994 ; 14 : 7726-7734.
- Nwaesei CG, Van Aerde J, Boyden M, Perlman M.** Changes in auditory brainstem responses in hyperbilirubinemic infants before and after exchange transfusion.
- Nyakas C, Markel E, Kramers RJK, Gaspar E, Bohus B, Luiten PGM.** Effects of nimodipine on hypoxia-induced learning and memory deficits. In *Nimodipine and Central Nervous System Function: New Vistas*; Eds J Traber and WH Gispen. Schattauer, Stuttgart. 1989 ; 175-194.

Nyakas C, Markel E, Schuurman T, Luiten PGM. Impaired learning and abnormal open-field behaviours of rats after postnatal anoxia and the beneficial effect of the calcium antagonist nimodipine. *Eur. J. Neurosci.* 1991 ; 3 : 168-174.

O'Callaghan JP. Biochemical analysis of glial fibrillary acidic protein as a quantitative approach to neurotoxicity assessment : advantages, disadvantages and application to assessment of NMDA receptor antagonist-induced neurotoxicity. *Psychopharmacology Bulletin* 1994 ; 30 (4) : 549-554.

O'Reilly LA, Huang DC, Strasser A. The cell death inhibitor Bcl-2 and its homologues influence control of cell cycle entry. *EMBO J.* 1996; 15 (24) : 6979-6990.

Obrenovitch TP, Urenjak J, Richards DA, Ueda Y, Curzon G, Symon L. Extracellular neuroactive aminoacid in the rat striatum during ischemia : comparison between penumbra conditions and ischemia with substained anoxic depolarisation. *J. Neurochem.* 1993 ; 61 (1) : 178-186.

Ochu EE, Rothwell NJ, Waters CM. Caspases mediate 6-hydroxydopamine-induced apoptosis but not necrosis in PC12 cells. *J. Neurochem.* 1998 ; 70 : 2637-2640.

Odell GB, Childs B. Hereditary hyperbilirubinemias. *Prog. Med. Genet.* 1980; 4 : 103-134.

Odell GB. Neonatal hyperbilirubinemia. *Grune and Stratton, Inc, New-York*, 1981.

Oehm A, Behrmann I, Falk W, Pawlita M, Maier G, Klas C, Li-Weber M, Richards S, Dhein J, Trauth BC, et al. Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. Sequence identity with the Fas antigen. *J. Biol. Chem.* 1992; 267 : 10709-10715.

Ohtani K, Sakurai H, Oh E, Iwata E, Tsuchiya T, Tsuda M. Involvement of protein kinase C in Ca(2+) signaling pathways to activation AP-1 DNA-binding activity evoked via NMDA- and voltage-gated Ca2+ channels. *J. Neurochem.* 1995; 65 (2) : 605-614.

Oillet J, Koziel V, Vert P, Daval JL. Influence of post-hypoxia reoxygenation conditions on energy metabolism and superoxide production in cultured neurons from the rat forebrain. *Pediatr. Res.* 1996; 39 : 598-603.

Oillet J, Nicolas F, Koziel V, Daval JL. Analysis of glutamate receptors in primary cultured neurons from fetal rat forebrain. *Neurochem. Res.* 1995; 20 : 761-768.

Olney JW. Glutamate-induced neuronal necrosis in the infant mouse hypothalamus. An electron microscopic study. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1971; 30 (1) : 75-90.

Oppenheim RW. Cell death during development of the nervous system. *Ann. Rev. Neurosci.* 1991; 14 : 453-501.

Orrenius S, Nicotera P. The calcium ion and cell death. *J. Neural Transm. Suppl.* 1994 ; 43 : 1-11.

Oski FA, Naiman JL. Hematologic problems in the newborn. *Major. Probl. Clin. Pediatr.* 1972; 4 : 1-400.

Ostrow JD, Mukeyee P, Tiribelli C. Structure and binding of unconjugated bilirubin : relevance for physiological and pathophysiological function. *J. Lipid Res.* 1994; 35 : 1715-1737.

Ostwald K, Hagberg H, Andiné P, Karlsson JO. Upregulation of calpain activity in neonatal rat brain after hypoxic-ichemic. *Brain Res.* 1993 ; 630 (1-2) : 289-294.

Palmer C, Vannucci RC, Towfighi J. Reduction of perinatal hypoxic-ischemic brain damage with allopurinol. *Pediatr. Res.* 1990; 27 : 332-336.

Palmer C, Vannucci RC. Potential new therapies for perinatal cerebral hypoxia-ischemia. *Clinics in Perinatol.* 1993; 20 : 411-432.

Pan G, Bauer JH, Haridas V, Wang S, Liu D, Yu G, Vincenz C, Aggarwal BB, Ni J, Dixit VM. Identification and functional characterization of DR6, a novel death domain-containing TNF receptor. *FEBS Lett.* 1998; 431 : 351-356.

Pan G, O'Rourke K, Dixit VM. Caspase-9, Bcl-XL, and Apaf-1 form a ternary complex. *J. Biol. Chem.* 1998 ; 273 : 5841-5845.

Panahian N, Huang T, Maines MD. Enhanced neuronal expression of the oxidoreductase - biliverdin reductase- after permanent focal cerebral ischemia. *Brain Res.* 1999; 850 : 1-13.

Pandey P, Farber R, Nakazawa A, Kumar S, Bharti A, Nalin C, Weichselbaum R, Kufe D, Kharbanda S. Hsp27 functions as a negative regulator of cytochrome c-dependent activation of procaspase-3. *Oncogene* 2000 ; 19 : 1975-1981.

Park DS, Morris EJ, Greene LA, Geller HM. G1/S cell cycle blockers and inhibitors of cyclin-dependent kinases suppress camptothecin-induced neuronal apoptosis. *J. Neurosci.* 1997; 17 : 1256-1270.

Parsell DA, Lindquist S. The function of heat-shock proteins stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu. Rev. Genet.* 1993; 27 : 437-496.

Patel AJ, Lauritzen I, Lazdunski M, Honore E. Disruption of mitochondrial respiration inhibits volume-regulated anion channels and provokes neuronal cell *J. Neurosci.* 1998; 18 (9) : 3117-3123.

Peitsch MC, Muller C, Tschopp J. DNA fragmentation during apoptosis is caused by frequent single-strand cuts. *Nucleic Acids Res.* 1993 a; 21 (18) : 4206-4209.

Peitsch MC, Polzar B, Stephan H, Crompton T, MacDonald HR, Mannherz HG, Tschopp J. Characterization of the endogenous deoxyribonuclease involved in nuclear DNA degradation during apoptosis (programmed cell death). *EMBO J.* 1993; 12 (1) : 371-7.

Pellerin L, Magistretti PJ. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis : a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994 ; 91 : 10625-10629.

Pellerin L, Magistretti PJ. Glutamate uptake stimulates Na⁺, K⁺ ATPase activity in astrocytes via activation of a distinct subunit highly sensitive to ouabain. *J. Neurochem.* 1997 ; 69 : 2132-2137.

Pines G, Danbolt NC, Bjoras M, Zhang Y, Bendahan A, Eide L, Koepsell H, Storm-Mathisen J, Seeberg E, Kanner BI. Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter *Nature.* 1992 Dec 3;360(6403):464-7.

Pittman RN, Wang S, Di Benedetto AJ, Mills JC. A system for characterizing cellular and molecular events in programmed neuronal cell death. *J. Neurosci.* 1993; 13 : 3669-3680.

Pringle AK, Iannotti F, Wilde GJC, Chad JE, Seeley PJ, Sundstrom LE. Neuroprotection by both NMDA and non-NMDA receptor antagonists in vitro ischemia. *Brain Res.* 1997; 755 : 36-46.

Puka-Sundvall M, Hallin U, Zhu C, Wang X, Karlsson JO, Blomgren K, Hagberg H. NMDA blockade attenuates caspase-3 activation and DNA fragmentation after neonatal hypoxia-ischemia. *Neuroreport* 2000 ; 11 (13) : 2833-2836.

Pulsinelli WA and Brierley JB. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke* 1979; 10 : 499-509.

Pulsinelli WA, Brierley JB, Plum F. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann. Neurol.* 1982; 11 (5) : 491-498.

Qiao M, Maliza KL, Del Bigio MR, Tuor UI. Transient hypoxia-ischemia in rats : changes in diffusion-sensitive MR imaging findings, extracellular space, and Na. *Radiology* 2002 ; 223 (1) : 65-75.

Ravi R, Bedi A, Fuchs EJ. (1998). CD95 (Fas)-induced caspase-mediated proteolysis of NF-kappaB. *Cancer Res.* 1998; 58 :882-886.

Ravishankar S, Ashraf QM, Fritz K, Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos M. Expression of Bax and Bcl-2 proteins during hypoxia in cerebral cortical neuronal nuclei of newborn piglets: effect of administration of magnesium sulfate. *Brain Res.* 2001; 901 (1-2) : 23-29.

Regan RF, Panter SS, Witz A, Tilly JL, Giffard RG. Ultrastructure of excitotoxic neuronal death in murine cortical culture. *Brain Res.* 1995; 705 (1-2) : 188-198.

Reynolds IJ, Hastings TG. Glutamate induces the production of reactive oxygen species in cultured forebrain neurons following NMDA receptor activation. *J. Neurosci.* 1995; 15 (5) 3318-3327.

Reznikov KY. Cell proliferation and cytogenesis in the mouse hippocampus. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* 1991; 122 : 1-74.

Ritter DA, Kenny JD, Norton HJ, Rudolph AJ. A prospective study of free bilirubin and other risk factors in the development of kernicterus in premature infants. *Pediatr.* 1982; 69 : 260-266.

Roberts EL Jr, Chih CP. The influence of age of pH regulation in hippocampal slices before, during, and after anoxia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1997; 17 (5) : 560-566.

Rodrigues CM, Sola S, Brites D. Bilirubin induces apoptosis via the mitochondrial pathway in developing rat brain neurons. *Hepatology* 2002 ; 35 (5) : 1186-1195.

Rodriguez MJ, Ursu G, Bernal F, Cusi V, Mahy N. Perinatal human hypoxia-ischemia vulnerability correlates with brain calcification. *Neurobiol; Dis.* 2001 ; 8 (1) : 59-68.

Roger C, Koziel V, Vert P, Nehlig A. Effects of bilirubin infusion on local cerebral glucose utilization in the immature rat. *Dev. Brain Res.* 1993; 76 : 115-130.

Roger C, Koziel V, Vert P, Nehlig A. Regional cerebral metabolic consequences of bilirubin in rat depend upon post-gestational age at the time of hyperbilirubinemia. *Dev. Brain Res.* 1995; 87: 194-202.

Romijn HJ, Hoffman MA, Gramsbegen A. At what age is the developing cerebral cortex of the rat comparable to that of the full term newborn human baby? *Early Hum. Dev.* 1991; 26 : 61-68.

Rosenbaum DM, Kalberg J, Kessler JA. Superoxide dismutase ameliorates neuronal death from hypoxia in culture. *Stroke* 1994; 25 (4) : 857-863.

Rossi DJ, Oshima T, Attwell D. Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature* 2000; 403 (6767) : 316-321.

Rothstein JD, Martin L, Levey AI, Dykes-Hoberg M, Jin L, Wu D, Nash N Kuncel RW. Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron* 1994 ; 13 : 713-725.

Roy Chowdhury J, Kondapalli R, Roy Chowdhury N. Gunn rat : A model for inherited deficiency of bilirubin glucuronidation. *Adv. Vet. Science. Comp. Med.* 1993; 37 : 149-173.

Roy Chowdhury J, Roy Chowdhury N, Falany CN, Tephley TR, Arias IM. Isolation and characterization of multiple forms of rat liver UDP-glucuronate glucosyl transferase.

Biochem. J. 1986; 233 : 827-837.

Rumpel H, Nedelcu J, Aguzzi A, Martin E. Late glial swelling after acute cerebral hypoxia-ischemia in the neonatal rat: a combined magnetic resonance and histochemical study.

Pediatr. Res. 1997; 42 (1) : 54-59.

Rutherford MA, Cowan FM, Manzur AY, Dubowitz LM, Pennock JM, Hajnal JV, Young IR, Bydder GM. MR imaging of anisotropically restricted diffusion in the brain of neonates and infants. *J. Comput. Assist. Tomogr.* 1991; 15 (2) : 188-198.

Ruvolo PP, Debg X, Carr BK, May WS. A functional role for mitochondrial protein kinase C in Bcl-2 phosphorylation and suppression of apoptosis. *J. Biol. Chem.* 1998; 273 (25) : 25436-25442.

Saeed D, Goetzman BW, Gospe SM Jr. Brain injury and protective effects of hypothermia using triphenyltetrazolium chloride in neonatal rat. *Pediatr. Neurol.* 1993 ; 9 (4) : 263-267.

Safar P, Stezoski W, Nemoto EM. Amelioration of brain damage after 12mn cardiac arrest in dogs. *Arch. Neurol.* 1976 ; 33 : 91-95.

Safieddine S, Eybalin M. Co-expression of NMDA and AMPA/kainate receptor mRNAs in cochlear neurones. *Neuroreport.* 1992 Dec;3(12):1145-1148.

Sakaki T, Yamada K, Otsuki H, Yuguchi T, Kohmura E, Hayakawa T. Brief exposure to hypoxia induces bFGF mRNA and protein and protects cortical neurons from prolonged hypoxic stress. *Neurosci. Res.* 1995; 23 (3): 289-296.

Sakhi S, Bruce A, Sun N, Tocco G, Baudry M, Schreiber SS. P53 induction is associated with neuronal damage in the central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994 ; 91 : 7525-7529.

Saklatvala J, Kaur P, Guesdon F. Phosphorylation of the small heat-shock protein is regulated by interleukine 1, tumor necrosis factor, growth factors, bradykinin and ATP. *Biochem. J.* 1991; 277 : 635-642.

Saliba E, Henrot A. Espoirs thérapeutiques pour la prise en charge de l'asphyxie périnatale du nouveau-né à terme. *SFMP, Journées Nationales 2000*.

Sano K, Nakamura H, Matsuo T. Mode of inhibitory action of bilirubin on protein kinase C. *Pediatr. Res.* 1985; 19:587-590.

Santos MS, Moreno AJ, Carvalho AP. Relationships between ATP depletion, membrane potential, and the release of neurotransmitters in rat nerve terminals. An in vitro study under conditions that mimic anoxia, hypoglycemia, and ischemia. *Stroke* 1996; 27 (5) : 941-950.

Sastry PS, Rao KS. Apoptosis and the nervous system. *J. Neurochem.* 2000; 74 : 1-20.

Scatton B. The NMDA receptor complex. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 1993; 7 : 389-400.

Scheibel T, Siegmund HI, Jaenicke R, Gana P, Lilie H, Buchner J. The charged region of HSP90 modulates the function of the N-terminal domain. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)* 1999; 96: 1297-1302.

Schlegel J, Peters I, Orrenius S, Miller DK, Thornberry NA, Yamin TT, Nicholson DW. CPP32/Apopain is a key interleukin 1 converting enzymes-like protease involved in Fas-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.* 1996 ; 271 (4) : 1841-1844.

Schmorl G. Zur Kenntnis des icterus neonatorum. *Cehr Stoch Ges Pathl.* 1903; 6 : 109-112.

Schoepp D and Conn PJ. Metabotropic glutamate receptor in brain function and pathology. *Trends Pharmacol. Sci.* 1993; 14 : 13-20.

Schuler M, Bossy-Wetzel E, Goldstein JC, Fitzgerald P, Green DR. P53 induces apoptosis by caspase activation through mitochondrial cytochrome c release. *J. Biol. Chem.* 2000; 275 (10): 7337-7342.

Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Riethmann K, Wesselborg S. Regulation of NF-kappaB activation by MAP kinase cascades. *Immunobiology* 1997 ; 198 : 35-49.

Schurr A, Payne RS, Heine MF, Rigor BM. Hypoxia, excitotoxicity, and neuroprotection in the hippocampal slice preparation. *J. Neurosci. Methods.* 1995; 59 (1) : 129-138.

Schutta HS, Johnson J. Bilirubin encephalopathy in the Gun rat. *Exp. Neurol.* 1967; 26 : 377-382.

Sedlak TW, Oltvai ZN, Yang E, Wang K, Boise LH, Thompson CB, Korsmeyer SJ. Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995; 92 : 7834-7838.

Seeburg PH. The TINS/TIPS Lecture. The molecular biology of mammalian glutamate receptor channels. *Trends Neurosci.* 1993; 16 (9) : 359-365.

Seidl R, Stockler-Ipsiroglu S, Rolinski B, Kohlhauser C, Herkner KR, Lubec B, Lubec G. Energy metabolism in graded perinatal asphyxia of the rat. *Life Sci.* 2000 ; 67 (4) : 421-435.

Semenza GL. HIF-1 : Mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J. Appl. Physiol.* 2000 ; 88 : 1474-1480.

Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 : Control of oxygen homeostasis in health and disease. *Pediatr. Res.* 2001 ; 49 (5) : 614-617.

Sender A, Brossard Y, De Lachaux V, Wiese G. Phosphoros. *Lettre trimestrielle de l'Association Photothérapie*, 1994; N°10.

Shao RG, Cao CX, Pommier Y. Activation of PKC α downstream from caspases during apoptosis induced by 7-hydroxystaurosporine or the topoisomerase inhibitors, camptothecin and etoposide, in human myeloid leukemia HL60 cells. *J. Biol. Chem.* 1997; 272 : 31321-31325.

Shapiro SM, Sombati S. Bilirubin toxicity in cultured hippocampal neurons. *Pediatr. Res.* 1991; 29 : 234-239.

Shen K, Meyer T. Dynamic control of CAMKII translocation and localization in hippocampal neurons by NMDA receptor stimulation. *Science* 1999; 284 : 162-165.

Shi Y, Thomas JO. The transport of proteins into the nucleus requires the 70-kilodalton heat shock protein or its cytosolic cognate. *Mol. Cell Biol.* 1992; 12 : 2186-2192.

Shigeno T, Yamasaki Y, Kato G, Kusaka K, Mima T, Takakura K, Graham DI, Furukawa S. Reduction of delayed neuronal death by inhibition of protein synthesis. *Neurosci. Lett.* 1990; 120 : 117-119.

Shimabuku R, Nakamura H. Drug mediated displacement of bilirubin from albumin in cultured cells. *Jap. J. Exp. Med.* 1983; 53 : 215-217.

Shimada A, Mukhin A, Ingram DK, London ED. N-methyl-D-aspartate receptor binding in brains of rats at different ages. *Neurobiol. Aging.* 1997 ; 18 (3) : 329-333.

Shimada N, Graf R, Rosner G, Heiss WD. Ischemia-induced accumulation of extracellular amino acids in cerebral cortex, white matter, and cerebrospinal fluid. *J. Neurochem.* 1993; 60 (1) : 66-71.

Shimizu S, Eguchi Y, Kosaka H, Kamiike W, Matsuda H, Tsujimoto Y. Prevention of hypoxia-induced cell death by Bcl-2 and Bcl-xl. *Nature* 1995; 374 : 811-813.

Siegel SJ, Brose N, Janssen WG, Gasic GP, Jahn R, Heinemann SF, Morrison JH. Regional, cellular, and ultrastructural distribution of N-methyl-D-aspartate receptor subunit 1 in monkey hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994;91 (2) : 564-568.

Siesjö BK. A new perspective on ischemic brain damage ? *Prog. Brain Res.* 1993 ; 96-109.

Siesjö BK. Cell damage in the brain : a speculative synthesis. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1981; 1 (2) : 155-185.

Silberberg DH, Schutta HS. The effects of unconjugated bilirubin and related pigments on cultures of rat cerebellum. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1967; 26 : 572-583.

Silva R, Mata LR, Gulbenkian S, Brito MA, Tiribelli C, Brites D. Inhibition of glutamate uptake by unconjugated bilirubin in cultured cortical rat astrocytes: role of concentration and pH. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 1999; 265 (1) : 67-72.

Silva R, Mata LR, Gulbenkian S, Brito MA, Tiribelli C, Brites D. Inhibition of glutamate uptake by unconjugated bilirubin in cultured cortical rat astrocytes: role of concentration and pH. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1999 ; 265 (1) : 1090-2104.

Silva RF, Rodrigues CM, Brites D. Bilirubin-induced apoptosis in cultured rat neuronal cells is aggravated by chenodeoxycholic acid but prevented by ursodeoxycholic acid. *J. Hepatol.* 2001 ; 34 (3) : 402-408.

Silverberg GD, Reitz BA, Ream AK. Hypothermia and cardiac arrest in the treatment of giant aneurysms of the cerebral circulation and hemangioblastoma of the medulla. *J. Neurosurg.* 1981; 55 (3) : 337-346.

Silverman WA, Andersen DH, Blanc WA, Crozier DN. A difference in mortality rate and incidence of kernicterus among premature infants allotted to two prophylactic antibacterial regimens. *Pediatrics* 1956; 18 : 614-625.

Silverstein FS, Buchanan K, Hudson C. Flunarizine limits hypoxia-ischemia induced morphologic injury in immature rat brain. *Stroke* 1986; 17 : 477-482.

Simon RP, Cho H. The temporal profile of stress protein traduction following global ischemia. *Neurology* 1990; 40 : 383.

Singer D, Bretschneider HJ. Metabolic reduction in hypothermia : pathophysiological problem and natural exemples. *Part 2. Thorac. Cardiovasc. Surgeon.* 1990 ; 38 : 212-219.

Singer D, Bretschneider HJ. Metabolic reduction in hypothermia : pathophysiological problem and natural exemples. *Part 1. Thorac. Cardiovasc. Surgeon.* 1990 ; 38 : 205-211.

Sircar R. Developmental maturation of the N-methyl-D-aspartic acid receptor channel complex in postnatal rat brain. *Int. J. Dev. Neurosci.* 2000; 18 (1) : 121-131.

Slack RS, Belliveau DJ, Rosenberg M, Atwal J, Lochmuller H, Aloyz R, Haghighi A, Lach B, Seth P, Cooper E, Miller FD. Adenovirus-mediated gene transfer of the tumor suppressor, p53, induces apoptosis in postmitotic neurons. *J. Cell Biol.* 1996; 135 (4) : 1085-1096.

Smith JA, Auer RN, Siesjö BK. The density and distribution of ischemic brain injury in the rat following 2-10 min of forebrain ischemia. *Acta Neuropathol.* 1984 ; 64 : 319-332.

Sochocka E, Juurlink BHJ, Code WE, Hertz V, Peng L, Hertz L. Cell death in primary cultures of mouse neurons and astrocytes during exposure to and “recovery” from hypoxia, substrate deprivation and stimulated ischemia. *Brain Res.* 1994; 638 : 21-28.

Sohn S, Kim EY, Gwag BJ. Glutamate neurotoxicity in mouse cortical neurons: atypical necrosis with DNA ladders and chromatin condensation. *Neurosci. Lett.* 1998; 240 (3) : 147-150.

Sokoloff L, Reivich C, Kennedy C, Des Rosiers MH, Patlak CS, Petitgrew KD, Sakurada O, Shinohara M. The [^{14}C] deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: theory, procedure and normal values in the conscious and anesthetized albino rat. *J. Neurochem.* 1977; 28 : 897-916.

Soon J, Granot E, Etziony R, Mayevsky A. Effect of hypothermia on brain multi-parametric activities in normoxic and partially ischemic rats. *Comp. Bioch. Phys. Part A. Molecular and Integrative Physiology.* 2002 ; 132 (1) : 239-246.

Soriano MA, Ferre I, Rodriguez-Farré E, Planas AM. Expression of c-fos and inducible HSP70 mRNA following a transient episode of focal ischemia that had non-lethal effects on the rat brain. *Brain Res.* 1995; 670 : 317-320.

Spector RG. Water content of the immature rat brain following cerebral anoxia and ischemia. *Br. J. Exp. Pathol.* 1962; 43 : 472-479.

Speiser Z, Korczyn AD, Teplitzky I, Gitter S. Hyperactivity in rats following postnatal anoxia. *Behav. Brain Res.* 1983 ; 7 : 379-382.

Spreafico R, Frasoni C, Arcelli P, Selvaggio M, De Biasi S. In situ labeling of apoptotic cell death in the cerebral cortex and thalamus of rat during development. *J. Comp. Neurol.* 1995; 363: 281-295.

Srinivasan A, Foster LM, Testa MP, Ord T, Keane RW, Bredesen DE, Kayalar C. Bcl-2 expression in neural cells blocks activation of ICE/CED-3 family proteases during apoptosis. *J. Neurosci.* 1996; 16 : 5654-5660.

Srinivasan A, Li F, Wong A, Kodandapani L, Smidt R, Krebs JF, Fritz LC, Wu JC, Tomaselli KJ. Bcl-xl functions downstream of caspase-8 to inhibit Fas- and TNF receptor 1-induced apoptosis of MCF7 breast carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* 1998; 273 (8) : 4523-4529.

Stennicke HR, Deveraux QL, Humke EW, Reed JC, Dixit VM, Salvesen GS. Caspase-9 can be activated without proteolytic processing. *J. Biol. Chem.* 1999; 274 : 8359-8362.

Stern L, Cashore WJ. L'hyperbilirubinémie néonatale. In : *Médecine Néonatale*, Eds Vert P, Stern L; Paris : Masson 1985 : 804-822.

Stevenson DR, Brown AR. Observations on neonatal hyperbilirubinemia. *NY State J. Med.* 1991; 11 : 477-478.

Stobie PE, Hansen CT, Hailey J, Levine RL. A difference in mortality between two strains of jaundice rats. *Pediatr.* 1991; 1 : 88-93.

Storek T, Schulte S, Hofmann K, Stoffel W. Structure, expression, and functional analysis of a Na(+)-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992; 89 (22) : 10955-10959.

Stroemer RP, Rothwell NJ. Exacerbation of ischemic brain damage by localized striatal injection of interleukin-1beta in the rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1998; 18 (8) : 833-839.

Sun XM, MacFarlane M, Zhuang J, Wolf BB, Green DR, Cohen GM. Distinct caspase cascades are initiated in receptor-mediated and chemical-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 1999 ; 274 (8) : 5053-5060.

Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E., Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 1999; 397 : 441-446.

Sutter CH, Laughner E, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 alpha protein expression is controlled by oxygen-regulated ubiquitination that is disrupted by deletions and misense mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000 ; 97 (9) : 4748-4753.

Sutton LN, Clark BJ, Norwood CR, Woodford RJ, Welsh FA. Global cerebral ischemia in piglets under conditions of mild and deep hypothermia. *J. Neurosci.* 1991 ; 22 : 1567-1573.

Swain JA, Mc Donald TJ Jr, Balaban RS, Robbins RC. Metabolism of the heart and brain during hypothermic cardiopulmonary bypass. *Ann. Thorac. Surg.* 1991 ; 51 (1) : 105-109.

Takahashi M, Billups B, Rossi D, Sarantis M, Hamann M, Attwell D. The role of glutamate transporters in glutamate homeostasis in the brain. *J. Exp. Biol.* 1997; 200 (2) : 401-409.

Takanashi A, Alnemri ES, Lazebnik YA, Fernades-Alnemri T, Litwack G, Moit RD, Goldman RD, Poirier GG, Kaufmann SH, Earnshaw WC. Cleavage of lamin A by Mch2a but not CPP32: multiple ICE enzyme-related proteases with distinct substrate recognition properties are active in apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996; 93 : 8395-8400.

Takeda K, Nomura Y, Sakuma H, Tagami T, Okuda Y, Nakagawa T. MR assessment of normal brain development in neonates and infants: comparative study of T1- and diffusion-weighted images. *J. Comput. Assist. Tomogr.* 1997; 21 (1) : 1-7.

Tamatani M, Ogawa S, Niitsu Y, Tohyama M. Involvement of Bcl-2 family and caspase-3 like protease in NO-mediated neuronal apoptosis. *J. Neurochem.* 1998 ; 71 : 1588-1596.

Tamatani M, Ogawa S, Tohyama M. Roles of Bcl-2 and caspases in hypoxia-induced neuronal cell death : a possible neuroprotective mechanism of peptide growth factors. *Mol. Brain Res.* 1998 ; 58 : 27-39.

Tamura A, Graham DI, Mc Culloch J, Teasdale TM. Focal cerebral ischemia in the rat. I. Description of technique and early neuropathological consequences following median cerebral artery occlusion. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1981 ; 1 : 53-60.

Tan S, Wood M, Maher P. Oxidative stress induces a form of programmed cell death with characteristics of both apoptosis and necrosis in neuronal cells. *J. Neurochem.*, 1998; 71 : 95-105.

Tanaka M, Sawada M, Yoshida S, Hanaoka F, Marunouchi T. Insulin prevents apoptosis of external granular layer neurons in rat cerebellar slice cultures. *Neurosci. Lett.* 1995; 199 (1) : 37-40.

Tenneti L, D'Emilia DM, Troy CM, Lipton SA. Role of caspases in N-methyl-D-aspartate-induced apoptosis in cerebrocortical neurons. *J. Neurochem.* 1998; 71 (3) : 946-959.

Thoresen M, Bagenholm R, Loberg EM, Apricena F, Kjellmer I. Posthypoxic cooling of neonatal rats provides protection against brain injury. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.* 1996 ; 74 (1) : F3-9.

Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998; 281 (5381) : 1312-1316.

Towfighi J, Housman C, Heitjan DF, Vannucci RC, Yager JY. The effect of local cerebral cooling on perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *Acta Neuropathol. (Berl)* 1994 ; 87 (6) : 598-604.

Towfighi J, Mauger D, Vannucci RC, Vannucci SJ. Influence of age on the cerebral lesions in an immature rat model of cerebral hypoxia-ichemia : a light microscopic study. *Brain Res. Dev. Brain. Res.* 1997 ; 100 (2) : 149-160.

Towfighi J, Yager J, Housman C, Vannucci RC. Neuropathology of remote hypoxic-ischemic damage in the immature rat. *Acta Neuropathol.* 1991; 81 : 578-587.

Trotti D, Rossi D, Rizzini B, Bezzi P, Danbolt N, Racagni G, Volterra A. Molecular mechanism of functional alteration of glutamate transporters and relevance to neuropathology. *Int. Acad. Biomed. Drug Res.* 1996; 11 : 41-48.

Ullrich D, Fevery J, Sieg A, Tischler T, Bircher J. The influence of gestational age on bilirubin conjugation in newborns. *Eur. J. Clin Invest.* 1991; 21 (1) : 83-89.

Uto A, Dux E, Hossmann KA. Effect of serum on intracellular calcium homeostasis and survival of primary cortical and hippocampal CA1 neurons following brief glutamate treatment. *Metab. Brain Dis.* 1994; 9 (4) : 333-345.

Uto A, Dux E, Kusumoto M, Hossmann KA. Delayed neuronal death after brief histotoxic hypoxia in vitro. *J. Neurochem.* 1995; 64 : 2185-2192.

Vaccarino FM, Hayward MD, Le HN, Hartigan DJ, Duman RS, Nestler EJ. Induction of immediate early genes by cyclic AMP in primary cultures of neurons from rat cerebral cortex. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 1993; 19 (1-2) : 76-82.

Valaes T, Petmezaki S, Henschke C, Drummend GS, Kappas A. A control of jaundice in preterm newborns by an inhibitor of bilirubni production: studies with tin-mesoporphyrin. *Pediatrics* 1994; 93 : 1-11.

Van bogaert L. Aspects cliniques et pathologiques des séquelles tardives de l'ictère nucléaire. *Acta Neurologica (Belgia)* 1949; 49 : 961-964.

Van den Ijssel P, Norman DG, Quinlan RA. Molecular chaperones: small heat shock proteins in the timelight. *Current Biology* 1999; 9: 103-105.

Vandenberg RJ. Molecular pharmacology and physiology of glutamate transporters in the central nervous system. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 1998; 25 (6) : 393-400.

Vannucci RC, Duffy TE. Cerebral metabolism in newborn dogs during reversible asphyxia. *Ann. Neurol.* 1977 ; 1 (6) : 528-534.

Vannucci RC, Plum F. Pathophysiology of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. In: Gaull GE (ed) *Biology of brain Disfunction. Plenum Press. New-York, 1975 : 1-45.*

Vannucci RC, Vannucci SJ. Glucose metabolism in the developing brain. *Semin. Perinatol.* 2000 ; 24 (2) : 107-115.

Vannucci RC. Current and potentially new management strategies for perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics* 1990; 85 : 961-968.

Vannucci SJ, Maher F, Koehler E, Simpson IA. Altered expression of GLUT-1 and GLUT-3 glucose transporters in neurohypophysis of water-deprived or diabetic rats. *Am. J. Physiol.* 1994. 267 (4): 605-611.

Varfolomeev EE, Schuchmann M, Luria V, Chiannilkulchai N, Beckmann JS, Mett IL, Rebrikov D, Brodianski VM, Kemper OC, Kollet O, Lapidot T, Soffer D, Sobe T, Avraham KB, Goncharov T, Holtmann H, Lonai P, Wallach D. Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. *Immunity* 1998; 9 : 267-276.

Vasquez J, Garcia-Calvo M, Valdivieso F. Interaction of bilirubin with the synaptosomal plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 1988; 263 : 1255-1265.

Vaux DL, Korsmeyer SJ. Cell death in development. *Cell* 1999 ; 96 (2) : 245-254.

Vekrellis K, Mc Carthy MJ, Watson A, Whitfiels J, Rubin LL, Ham J. Bax promotes neuronal cell death and is downregulated during the development of the nervous system. *Development* 1997 ; 124 (6) : 1239-1249.

Verheij M, Bose R, Lin XH, Yao B, Jarvis WD, Grant S, Birrer MJ, Szabo E, Zon LI, Kyriakis JM, Haimovitz-Friedman A, Fucks Z, Kolesnick RN. Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis. *Nature* 1996; 380 (6569) : 75-79.

Vierck CJ, Meier GW. Effects of prenatal hypoxia upon locomotor activity of the mouse. *Exp. Neurol.* 1963; 7 : 418-425.

Volpes JJ. Neurology of the newborn. 3^{ème} ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1995; 211.

Wahl F, Obrenovitch TP, Hardy AM, Plotkine M, Boulu R, Symon L. Extracellular glutamate during focal cerebral ischemia in rats: time course and calcium dependency. *J. Neurochem.* 1994; 63 (3) : 1003-1011.

Wahl P, Honore T, Drejer J, Schousboe A. Development of binding sites for excitatory amino acids in cultured cerebral cortex neurons. *Int. J. Dev. Neurosci.* 1991; 9 (3) : 287-296.

Walker PC. Neonatal bilirubin toxicity. A review of kernicterus and the implications of drug bilirubin displacement. *Clin. Pharmacokinetics* 1987; 13 : 26-50.

Wallen P, Grillner S. N-methyl-D-aspartate receptor-induced, inherent oscillatory activity in neurons active during fictive locomotion in the lamprey. *J. Neurosci.* 1987; 7 (9) : 2745-2755.

Wallin A, Boreus LO. Phenobarbital prophylaxis for hyperbilirubinemia in preterm infants. *Acta Paediatr. Scand.* 1984; 73 : 488-497.

Wallis RA, Panizzon KL. Delayed neuronal injury induced by sub-lethal NMDA exposure in the hippocampal slice. *Brain Res.* 1995; 674 (1) : 75-81.

Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS Jr. NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 1998; 281 : 1680-1683.

Wang HG, Rapp UR, Reed JC. Bcl-2 targets the protein kinase Raf-1 to mitochondria. *Cell* 1996; 87 : 629-38.

Wang J, Zheng L, Lobito A, Chan FK, Dale J, Sneller M, Yao X, Puck JM, Straus SE, Lenardo MJ. Inherited human Caspase 10 mutations underlie defective lymphocyte and dendritic cell apoptosis in autoimmune lymphoproliferative syndrome type II. *Cell* 1999; 98 : 47-58.

Warner MA, Neill KH, Nadler JV, Crain BJ. Regionally selective effects of NMDA receptor antagonists against ischemic brain damage in the gerbils. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1991; 11 : 600-610.

Warr O, Mort D, Attwell D. Bilirubin does not modulate ionotropic glutamate receptors or glutamate transporters. *Brain Res.* 2000 ; 879 (1-2) : 13-16.

Watchko JF, Daood MJ, Hansen TW. Brain bilirubin content is increased in P-glycoprotein-deficient transgenic null mutant mice. *Pediatr. Res.* 1998; 44 (5) : 763-766.

Watson A, Eilers A, Lallemand D, Kyriakis J, Rubin LL, Ham J. Phosphorylation of c-jun is necessary for apoptosis induced by survival signal withdrawal in cerebellar granule neurons. *J. Neurosci.* 1998; 18 (2) : 751-762.

Watson BD, Dietrich WD, Busto R, Wachtel MS, Ginsberg MD. Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Ann. Neurol.* 1985 ; 17 : 497-504.

Weiss S, Pin JP, Sebben M, Kemp DE, Sldeszek F, Gabrion J, Bockaert J. Synaptogenesis of cultured striatal neurons in serum-free medium: a morphological and biochemical study. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1986; 83 : 2238-2242.

Wennberg RB. The importance of free bilirubin acid salt in bilirubin uptake by erythrocytes and mitochondria. *Pediatr. Res.* 1988; 23 : 443-447.

Wenzel A, Fritschy JM, Mohler H, Benke D. NMDA receptor heterogeneity during postnatal development of the rat brain: differential expression of the NR2A, NR2B, and NR2C subunit proteins. *J. Neurochem.* 1997 ; 68 (2) : 469-478

Whishaw IQ, Auer RN. Immediate and long-lasting effects of MK801 on motor activity, spatial navigation in a swimming pool and EEG in the rat. *Psychopharmacology* 1989 ; 98 : 500-507.

White E. Life, death, and the pursuit of apoptosis. *Genes Dev.* 1996; 10 : 1-15.

Widdowson PS, Trainor A, Lock EA. NMDA receptors in rat cerebellum and forebrain: subtle differences in pharmacology and modulation. *J. Neurochem.* 1995; 64 (2) : 651-661.

Widmann R, Kuroiwa T, Bonnekoh P, Hossmann KA. [¹⁴C]leucine incorporation into brain proteins in gerbils after transient ischemia: relationship to selective vulnerability of hippocampus. *J. Neurochem.* 1991 ; 56 (3) : 789-796.

Wieloch T, Bergstedt K, Hu BR. Protein phosphorylation and the regulation of mRNA translation following cerebral ischemia. *Prog. Brain Res.* 1993; 96 : 179-191.

Wigglesworth JS. Experimental growth retardation in the foetal rat. *J. Path. Bact.* 1964; 88 : 1-33.

Willingham MC, Cornwell MM, Cardarelli CO, Gottesman MM, Pastan I. Single cell analysis of daunomycin uptake and efflux in multidrug-resistant and -sensitive KB cells: effects of verapamil and other drugs. *Cancer Res.* 1986; 46 (11) : 5941-5946.

Wisden W and Seeburg P. Mammalian ionotropic glutamate receptors. *Cur. Opin. Neurobiol.* 1993; 3 : 291-298.

Wolf RL, Zimmermann RA, Clancy R, Haselgrove JH. Quantitative apparent diffusion coefficient measurements in term neonates for early detection of hypoxic-ischemic brain injury : initial experience. *Radiology* 2001 ; 218 (3) : 825-833.

Wolvetang EJ, Johnson KL, Krauer K, Ralph SJ, Linnane AW. Mitochondrial respiratory chain inhibitors induce apoptosis. *FEBS Letters* 1994; 339 : 40-44.

Wong-Riley MTT. Cytochrome oxidase : an endogenous marker for neuronal activity. *Trends Neurosci.* 1989 ; 12 : 94-101.

Woo M, Hakem R, Soengas MS, Duncan GS, Shahinian A, Kagi D, Hakem A, McCurrach M, Khoo W, Kaufman SA, Senaldi G, Howard T, Lowe SW, Mak TW. Essential contribution of caspase 3/CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes. *Genes Dev.* 1998; 12 : 806-819.

Wood KA, Youle RJ. Apoptosis and free radicals. Abstract, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1994; 738 : 400-407.

Wood KA, Youle RJ. The role of free radicals and p53 in neuron apoptosis in vivo. *J. Neurosci.* 1995; 15 (8) : 5851-5857.

Wozniak DF, Olney JW, Kettinger L, Price M, Miller JP. Behavioral effect of MK801 in the rat. *Psychopharmacology (Berl).* 1990; 101 (1) : 47-56.

Yager JY, Towfighi J, Vannucci RC. Influence of mild hypothermia on hypoxic-ischemic brain damage in the immature rat. *Pediatr. Res.* 1993; 34 : 525-529.

Yaglom JA, Gabai VL, Meriin AB, Mosser DD, Sherman MY. The function of HSP72 in suppression of c-Jun N-terminal kinase activation can be dissociated from its role in prevention of protein damage. *J. Biol. Chem.* 1999 ; 274 : 20223-20228.

Yakovlev AG, Ota K, Wang G, Movsesyan V, Bao WL, Yoshihara K, Faden AI. Differential expression of apoptotic protease-activating factor-1 and caspase-3 genes and susceptibility to apoptosis during brain development and after traumatic injury. *J. Neurosci.* 2001; 21 (19) : 7439-7446.

Yamada N, Sawasaki Y, Nakajima H. Impairment of DNA synthesis in Gunn rat cerebellum. *Brain Res.* 1977; 126 : 295-307.

Yan GM, Ni B, Weller M, Wood KA, Paul SM. Depolarization or glutamate receptor activation blocks apoptotic cell death of cultured cerebellar granule neurons. *Brain Res.* 1994; 656 (1) : 43-51.

Yang E, Korsmeyer SJ. Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death. *Blood* 1996; 88 (2) : 386-401.

- Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng TI, Jones DP, Wang X.** Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 1997; 5303 (275) : 1129-1132.
- Ye ZC, Rothstein JD, Sontheimer H.** Compromised glutamate transport in human glioma cells: reduction-mislocalization of sodium-dependent glutamate transporters and enhanced activity of cysteine-glutamate exchange. *J. Neurosci.* 1999; 19 (24): 10767-10777.
- Yeh WC, Pompa JL, McCurrach ME, Shu HB, Elia AJ, Shahinian A, Ng M, Wakeham A, Khoo W, Mitchell K, El-Deiry WS, Lowe SW, Goeddel DV, Mak TW.** FADD: essential for embryo development and signaling from some, but not all, inducers of apoptosis. *Science* 1998; 279 : 1954-1958.
- Yoon KW, Fuse T, Shah PT, Nguyen S, Klein ML.** Indirect glutamate neurotoxicity. *J. Neurotrauma* 1998; 15(2) : 141-147.
- Yoshida H, Kong Y, Yoshida R, Elia AJ, Hakem A, Hakem R, Penninger J, Mak TW.** Apaf-1 is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development. *Cell* 1998; 94 : 739-750.
- Yoshimura SI, Banno Y, Nakashima S, Takenaka K, Sakai H, Nishimura Y, Sakai N, Shimizu S, Eguchi Y, Tsujimoto Y.** Ceramide formation leads to caspase-3 activation during hypoxic PC12 cell death. *J. Biol. Chem.* 1998; 273 (12) : 6921-6927.
- Yu O, Chuang DM.** Neurotrophin protection against toxicity induced by low potassium and nitroprusside in cultured cerebellar granule. *J. Neurochem.* 1997; 68 (1) : 68-77.
- Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR.** The C. elegans cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* 1993; 75 : 641-52.
- Zanelli SA, Numagami Y, McGowan JE, Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos M.** NMDA receptor mediated calcium influx on cerebral cortical synaptosomes of the hypoxic guinea pig fetus. *Neurochem. Res.* 1999. 24 : 437-449.
- Zerangue N, Kavanaugh MP.** Flux coupling in a neuronal glutamate transporter. *Nature* 1996 ; 383 : 634-637.

Zhang Y, Marcillat O, Giulivi C, Ernster L, Davies KJA. The oxidative inactivation of mitochondrial electron transport chain components and ATPase. *J. Biol. Chem.* 1990; 265 : 16330-16336.

Zheng YS, Xu ZC. Co-existence of necrosis and apoptosis in rat hippocampus following transient forebrain ischemia. *Neurosci. Res.* 2000; 37 : 113-125.

Zhu L, Ling S, Yu XD, Venkatesh LK, Subramanian T, Chinnadurai G, Kuo TH. Modulation of mitochondrial Ca²⁺ homeostasis by Bcl-2. *J. Biol. Chem.* 1999; 274 : 33267-33273.

Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X. Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 1997; 94 : 471-480.

Prénom, Nom : **Stéphanie GROJEAN**

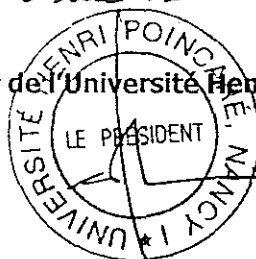
Nature de la thèse :

**Doctorat de l'Université Henri Poincaré, Nancy I
en Biologie - Santé - Environnement**

VU, APPROUVE et PERMIS D'IMPRIMER n° 677

Nancy, le 10 mai 2003

Le Président de l'Université Henri Poincaré, Nancy I



Claude BURLET

RESUME

L'hypoxie cérébrale, par sa fréquence et ses effets délétères, demeure un important facteur de risque en période périnatale.

Les effets d'une hypoxie transitoire ont été évalués à un stade où le cerveau est très immature lorsque sa plasticité est optimale. Des rats de 1 jour ont été exposés pendant 20 mn, à 100% d'azote. Les lésions cérébrales ont été recherchées dans différentes structures par morphométrie et comptage cellulaire. Les caractéristiques de la mort cellulaire ont été évaluées par analyse de la morphologie nucléaire, la fragmentation d'ADN et par l'expression immunohistochimique de protéines spécifiques. Une exploration en IRM de diffusion et la mesure régionale de l'activité de la cytochrome oxydase ont été utilisées en vue d'une approche plus fonctionnelle. Les lésions cérébrales sont apparues au 4^{ème} jour après réoxygénation et étaient d'abord associées aux manifestations d'une nécrose. Le maximum des dommages est atteint vers 6-7^{ème} jours, avec un pic d'apoptose reflété par la condensation et la fragmentation de l'ADN ainsi que la surexpression de protéines pro-apoptotiques telles que p53, Bax et la caspase 3. Ces caractéristiques sont très proches de l'apoptose physiologique observée dans le cerveau de rat nouveau-né. Par la suite, une apparente récupération morphologique a été mise en évidence, tandis que des déficits fonctionnels persistaient à long-terme.

Le but ultime de ces études étant de contribuer au développement de nouvelles stratégies de neuroprotection, l'influence d'un conditionnement par 10 mn d'hypoxie réalisée 6 heures avant l'exposition habituelle ainsi que l'effet d'une hypothermie à 26°C ont été testés. Les résultats ont montré une protection totale des neurones, le conditionnement étant spécifiquement associé à une surexpression de protéines de survie telles que Bcl-2. Par ailleurs, un prétraitement par un antagoniste des récepteurs NMDA, le MK801, a seulement permis de retarder l'apparition des lésions.

La sensibilité à l'hypoxie étant dépendante de l'état maturationnel du cerveau, une étude a été entreprise sur des animaux âgés de 7 jours. Les résultats ont montré que les dommages cérébraux étaient plus importants et plus précoces que dans le modèle précédent, et qu'ils étaient la conséquence d'un processus nécrotique. Dans ces conditions, le MK801 était capable de protéger les neurones.

Un accident hypoxique cérébral peut être associé à une hyperbilirubinémie, une situation fréquemment rencontrée en néonatalogie. Une injection intrapéritonéale de bilirubine chez le rat de 1 jour, associée ou non à une agression hypoxique, a seulement provoqué un ictère physiologique sans répercussions cérébrales.

Ce modèle *in vivo* n'ayant pas permis l'induction d'un ictère nucléaire, une stratégie *in vitro* a été développée. Sur un modèle de culture de neurones issus d'embryons de rats de 14 jours, les effets de la bilirubine non conjuguée ont été évalués sur la viabilité cellulaire, le métabolisme énergétique et la synthèse protéique. La bilirubine a induit une mort neuronale retardée qui peut être évitée en présence d'un inhibiteur de la synthèse protéique, la cycloheximide, et présente les caractéristiques de l'apoptose. Enfin, l'association de l'hypoxie à la bilirubine a cumulé les effets délétères sur les neurones *in vitro*, et l'utilisation d'inhibiteurs sélectifs des récepteurs du glutamate suggère que la neurotoxicité de la bilirubine est médiée par les récepteurs NMDA.