

UNIVERSITE VICTOR SEGALEN BORDEAUX 2

Année 2009

Thèse n°1694

Laboratoire d'accueil (Directeur : Crit Moonen)

Imagerie moléculaire et fonctionnelle : de la physiologie à la thérapie, UMR-CNRS 5231
Université Victor Ségalen Bordeaux 2, 146 rue Léo Saignat
33076 Bordeaux cedex – France.

Thèse pour le Doctorat de l'Université de Bordeaux 2

Mention : Sciences, Technologie, Santé

Option : Biologie cellulaire et Physiopathologie

présentée et soutenue publiquement le 22 décembre 2009

par Olivier BRISSAUD

né le 30 mai 1969

Souffrance hypoxique-ischémique périnatale

- Evaluations neuroradiologique et immunohistochimique précoces sur le modèle animal d'Ischémie-Hypoxie de Vannucci-Rice.
- Étude de la valeur pronostique de l'IRM (incluant l'étude de la Fraction d'Anisotropie) et de la Spectroscopie par Résonance Magnétique, à l'âge de 6 mois, chez des enfants ayant présenté une asphyxie périnatale : Etude BIGHIN.

Jury de Thèse

Mme le Docteur S Chalon (UMR Inserm U930 - CNRS ERL3106 - Université de Tours)

Rapporteur et Examineur

Mr le Professeur JC Rozé (UMR 1280 PhAN – INRA - INSERM CIC004 - Université de Nantes)

Rapporteur et Examineur

Mme le Professeur C Amiel-Tison (Université Paris V)

Examineur

Mme le Professeur M Allard (UMR-CNRS 5231 - Université Bordeaux 2)

Tuteur de Thèse et Examineur

Mr le Professeur V Dousset (EA 2966 - Université Bordeaux 2)

Examineur

Mr le Professeur JF Chateil (UMR-CNRS 5536 - Université Bordeaux 2)

Directeur de Thèse et Examineur

Mme AK Bouzier-Sore (UMR-CNRS 5536 - Université Bordeaux 2)

Membre invitée

UNIVERSITE VICTOR SEGALEN BORDEAUX 2

Année 2009

Thèse n°1694

Laboratoire d'accueil (Directeur : Crit Moonen)

Imagerie moléculaire et fonctionnelle : de la physiologie à la thérapie, UMR-CNRS 5231
Université Victor Ségalen Bordeaux 2, 146 rue Léo Saignat
33076 Bordeaux cedex – France.

Thèse pour le Doctorat de l'Université de Bordeaux 2

Mention : Sciences, Technologie, Santé

Option : Biologie cellulaire et Physiopathologie

présentée et soutenue publiquement le 22 décembre 2009

par Olivier BRISSAUD

né le 30 mai 1969

Souffrance hypoxique-ischémique périnatale

- Evaluations neuroradiologique et immunohistochimique précoces sur le modèle animal d'Ischémie-Hypoxie de Vannucci-Rice.
- Étude de la valeur pronostique de l'IRM (incluant l'étude de la Fraction d'Anisotropie) et de la Spectroscopie par Résonance Magnétique, à l'âge de 6 mois, chez des enfants ayant présenté une asphyxie périnatale : Etude BIGHIN.

Jury de Thèse

Mme le Docteur S Chalon (UMR Inserm U930 - CNRS ERL3106 - Université de Tours)

Rapporteur et Examineur

Mr le Professeur JC Rozé (UMR 1280 PhAN – INRA - INSERM CIC004 - Université de Nantes)

Rapporteur et Examineur

Mme le Professeur C Amiel-Tison (Université Paris V)

Examineur

Mme le Professeur M Allard (UMR-CNRS 5231 - Université Bordeaux 2)

Tuteur de Thèse et Examineur

Mr le Professeur V Dousset (EA 2966 - Université Bordeaux 2)

Examineur

Mr le Professeur JF Chateil (UMR-CNRS 5536 - Université Bordeaux 2)

Directeur de Thèse et Examineur

Mme AK Bouzier-Sore (UMR-CNRS 5536 - Université Bordeaux 2)

Membre invitée

A mon père,

***“If you think research is expensive, try disease.”
— Mary Lasker 1901–1994***

REMERCIEMENTS

Je remercie les examinateurs et rapporteurs du jury qui ont accepté de juger ce travail.

Je remercie aussi Crit Moonen et Jean-Michel Franconi, responsables respectivement des laboratoires CNRS-UMR 5231 et CNRS-UMR 5536 au sein desquels j'ai travaillé pour ce projet de thèse. Merci aussi à Lucille Hardel, Luke Harper, Marion Amirault, Martine Bordessoules, Stéphane Sanchez et Gérard Raffard pour leur disponibilité et leur aide. Je remercie l'équipe de Radiopédiatrie et le SMUR Pédiatrique qui ont pris en charge les nouveau-nés dans le cadre du protocole ainsi que le personnel soignant du service de Réanimation Pédiatrique et Néonatale de Bordeaux pour leur engagement dans la prise en soins de ces bébés. Je remercie l'équipe de l'USMR de Bordeaux pour leur soutien méthodologique fidèle et sans faille. Merci enfin à Pierre Gressens et Catherine Verney pour leur aide dans le choix du modèle animal et la pertinence de leurs conseils.

Je veux particulièrement remercier :

Michèle Allard pour m'avoir accueilli dans son laboratoire ; merci pour ta disponibilité, ton soutien solide et tes jaillissements d'idées ; tu as été d'une grande aide pour finaliser ce projet et une inspiratrice de projets futurs.

Anne-Karine Bouzier-Sore sans qui le projet d'imagerie et d'immunohistochimie sur le raton n'aurait pas existé ; tu m'as appris l'expérimentation sur le petit animal et tu as eu fort à faire ; merci pour ta patience et ta détermination à mener ce projet à son terme.

Frédéric Villega dont les connaissances et le travail ont enrichi considérablement l'ensemble du projet ; je reconnais en toi bien plus qu'un collègue ; tu es un ami ; merci.

Jan Peter Konsman pour son aide sur le travail de recherche en immunohistochimie.

Olivier Périot grâce à qui je suis sorti de l'obscurantisme ; j'ai enfin compris à tes côtés comment on pouvait traiter la DTI sous PRIDE ou FSL ; tu m'as accompagné dans ce projet avec ton calme et ton scepticisme ; j'espère que nous travaillerons ensemble à nouveau.

L'ensemble des médecins de l'équipe de Réanimation ; ils m'ont permis, en m'octroyant du temps, de mener à bien ce travail de recherche ; j'espère que les projets qui naîtront de cette expérience bénéficieront à tous, y compris ceux qui étaient « à la mine » pendant que je réalisais ce travail.

Jean-Michel Pedespan ; je n'en serai peut-être pas là si on ne s'était pas rencontré.

Jean-Louis Demarquez ; merci pour ton soutien indéfectible et tes conseils avisés.

Jean-François Chateil car ce travail est le nôtre ; je suis très fier de l'avoir fait et nous savons toi et moi ce qu'il représente à tant de niveaux ; tu m'as soutenu et accompagné, parfois dans la douleur ; mais aujourd'hui que ce travail est achevé, je comprends mieux l'obstination avec laquelle il fallait le défendre ; tu n'as rien lâché et tu m'as fait confiance ; je t'en suis infiniment reconnaissant.

Ma famille et mes amis ; vous êtes avec moi chaque instant ; c'est bon de vous savoir tout près.

Ma femme, Moïra ; heureusement que tu es là ; je t'aime.

INTRODUCTION	9
SOUFFRANCE HYPOXIQUE ISCHEMIQUE NEONATALE	12
ETAT DE L'ART	
I DEFINITION ET EPIDEMIOLOGIE	13
II PHYSIOPATHOLOGIE	14
1. MECANISMES DE L'AGRESSION HYPOXIQUE-ISCHEMIQUE ET DES LESIONS NEURONALES	14
1.1. FACTEURS DE RISQUES	15
1.2. MARQUEURS DE L'ASPHYXIE PERINATALE	17
2. FACTEURS PRONOSTIQUES ET MOYENS D'EVALUATION DE L'ASPHYXIE PERNATALE ET DE L'EHI	20
2.1. FACTEURS PRONOSTIQUES CLINIQUES	20
2.1.1. La classification de Sarnat	20
2.1.2. La classification d'Amiel-Tison	21
2.2. CRITERES PARACLINIQUES	23
2.2.1. EEG	23
2.2.2. Echographie Transfontanellaire (ETF)	24
2.2.3. Tomodensitométrie (T DM)	25
2.2.4. IRM	25
2.2.4.1. Généralités	25
2.2.4.2. Séquences conventionnelles	26
2.2.4.2.1. IRM conventionnelle et souffrance HI néonatale	26
2.2.4.2.2. Imagerie de diffusion	28
Coefficient apparent de diffusion (ADC)	29
Imagerie de diffusion : principe	29
Isotropie/anisotropie	30
Interprétation du signal	31
Effet T2 (T2 shine through effect)	32
Maturation cérébrale	33
IRM de diffusion et souffrance néonatale HI	33
Les limites	35
2.2.4.3. La Spectroscopie par Résonance Magnétique (SRM)	35
Aspects théoriques et expérimentation animale	35
Résultats chez le sujet sain	37
SRM et souffrance néonatale HI: données sur les différents métabolites	37
Influence du temps d'écho sur la détection et la quantification des métabolites	39
Les limites	39
2.2.4.4. Imagerie des tenseurs de diffusion (Diffusion Tensor Imaging DTI)	42
Aspect théorique et expérimentation animale	42
<u>Aspects théoriques</u>	42
<u>Expérimentation animale</u>	46
DTI et souffrance hypoxique-Ischémique néonatale	47
Les limites	48

III TRAITEMENT DE L'ASPHYXIE PERINATALE	49
1. CIBLES DU TRAITEMENT	49
2. LES THERAPEUTIQUES POSSIBLES	51
2.1. INHIBITEURS DE L'EXCITOTOXICITE	51
2.2. ANTIOXYDANTS	52
2.2.1. Inhibition du nNOS ou iNOS	52
2.2.2. Mélatonine	52
2.2.3. Allopurinol	53
2.2.4. Deferoxamine	53
2.2.5. N-Acétyl-cystéine (NAC)	54
2.3. ANTI-INFLAMMATOIRES	56
2.4. ANTI-APOPTOTIQUES	57
2.5. PRECONDITIONNEMENT	57
2.6. FACTEURS DE CROISSANCE	60
2.7. THERAPIE CELLULAIRE	61
2.8. HYPOTHERMIE	62
2.8.1. Généralités	62
2.8.2. Résultats des études randomisées	63
2.8.2.1. CoolcapTrial	63
2.8.2.2. NICHD Neonatal Research Network	64
2.8.2.3. La méta-analyse de 2007	64
2.8.2.4. L'essai randomisé européen (TOBY study group)	65
2.8.2.5. Synthèse des résultats	65
2.8.3. Prévenir l'aggravation des lésions asphyxiques par une réanimation néonatale optimale	66
ETUDE PRECLINIQUE : TRAVAIL FONDAMENTAL	67
I MISE EN PERSPECTIVE DU TRAVAIL DE RECHERCHE CHEZ L'ANIMAL	68
II LES DIFFERENTS MODELES ANIMAUX	68
1. LE SINGE	69
1.1. LESIONS DE LA SUBSTANCE GRISE	69
1.2. LESIONS DE LA SUBSTANCE BLANCHE	69
2. LE MOUTON	70
2.1. LESIONS DE LA SUBSTANCE GRISE	70
2.2. LESIONS DE LA SUBSTANCE BLANCHE	70
3. LES RONGEURS	71
3.1. LESIONS DE LA SUBSTANCE GRISE	72
3.2. LESIONS DE LA SUBSTANCE BLANCHE	73
4. LE LAPIN	75
5. LE PORCELET	75
6. LES MODELES DE RETARD DE CROISSANCE INTRA-UTERIN (RCIU)	76
7. LIMITES DES MODELES ANIMAUX	77

III ETUDE FONDAMENTALE SUR LE RATON P7/P8	78
Effet à court terme de l'Erythropoïétine sur les lésions cérébrales et expression de l'Aquaporine 4 dans un modèle néonatal d'hypoxie ischémie chez le raton : étude en Imagerie de diffusion et immunohistochimie	
1. INTRODUCTION	78
2. MATERIELS ET METHODES	78
2.1. MODELE ANIMAL	78
2.2. EPO : DOSE ET ADMINISTRATION	80
2.3. IMAGERIE DE L'ANIMAL	80
2.4. ANALYSE DES DONNEES D'IRM	80
2.5. IMMUNOHISTOCHIMIE	81
2.6. ANALYSES STATISTIQUES	82
3. RESULTATS	82
3.1. ANIMAUX	82
3.2. EFFETS DE L'EPO	83
3.3. IMMUNOHISTOCHIMIE	84
4. DISCUSSION	87
4.1. CONSIDERATIONS METHODOLOGIQUES	87
4.2. ADMINISTRATION D'EPO ET AVC	87
4.3. ADMINISTRATION D'EPO ET FA DANS L'AVC	88
4.4. ADMINISTRATION D'EPO ET ADC DANS L'AVC	89
4.5. IMMUNOHISTOCHIMIE : EXPRESSION DES CASPASES-3 ET DES AQP4 DANS LE CERVEAU DES RATONS	89
4.6. LIMITES DE L'ETUDE	91
5. CONCLUSION	91
PARTIE CLINIQUE	92
<u>I RESUME DE L'ETUDE</u>	93
<u>II SCHEMA DE L'ETUDE : MATERIELS ET METHODES</u>	94
1. CRITERES D'INCLUSION	94
2. CRITERES DE NON INCLUSION	95
3. CRITERE DE JUGEMENT PRINCIPAL	95
4. CRITERES DE JUGEMENT SECONDAIRES	96
5. FACTEURS PRONOSTIQUES ETUDIES	96
6. DETERMINANTS DU PRONOSTIC D'ENCEPHALOPATHIE HYPOXIQUE-ISCHEMIQUE	97
6.1. CRITERES PERPARTUM	97
6.2. CRITERES CLINIQUES NEONATAUX	97
6.3. CRITERES PARACLIQUES NEONATAUX	98
6.3.1. Biologiques	98

6.3.2. Electroencéphalographiques	98
6.3.3. Neuroradiologiques	98
7. ASPECTS STATISTIQUES	98
7.1. TAILLE DE LA COHORTE	98
7.2. ANALYSE DES DONNEES	99
8. DEROULEMENT DE L'ETUDE	100
8.1. INCLUSION	100
8.2. DEROULEMENT DU SUIVI	100
8.2.1. Suivi post-natal immédiat	100
8.2.1.1. Généralités	100
8.2.1.2. Imagerie	101
8.2.1.2.1. <i>Acquisition des données</i>	101
8.2.1.2.2. <i>Traitement secondaire des données</i>	103
8.2.1.2.2.1. <i>IRM conventionnelle et diffusion conventionnelle</i>	103
8.2.1.2.2.2. <i>Spectroscopie par Résonance Magnétique (SRM)</i>	104
8.2.1.2.2.3. <i>Post-traitement de la DTI</i>	106
Méthodologie PRIDE	106
Méthodologie FSL	107
8.2.2. Suivi d'observation clinique et de consultations dans la première année	109
8.2.2.1. Consultations Médicales	109
8.2.2.2. Consultations de Psychomotricité	110
8.2.2.3. Autres	110
<u>III. RESULTATS ET DISCUSSION</u>	111
1. DONNEES EPIDEMIOLOGIQUES DE NOTRE POPULATION DE PATIENTS	111
2. RESULTATS A 8 JOURS DE VIE ET DISCUSSION	111
2.1. RESULTATS A 8 JOURS	112
2.1.1. IRM conventionnelle et de diffusion et devenir précoce à J8	112
2.1.2. SRM et devenir précoce à J8	114
2.1.3. DTI et devenir précoce à J8	117
2.1.3.1. Analyse descriptive	117
2.1.3.2. Association entre les données néonatales et les valeurs mesurées en DTI	117
2.1.3.3. Association entre les valeurs des paramètres mesurés en DTI et le devenir neurologique à 8 jours	117
2.2. DISCUSSION SUR LES RESULTATS A 8 JOURS ET LA NEUROIMAGERIE	120
2.2.1. Imagerie conventionnelle	120
2.2.2. La SRM	120
2.2.3. L'imagerie des tenseurs de diffusion	122
3. RESULTATS A 6 MOIS DE VIE ET DISCUSSION	125
3.1. RESULTATS A 6 MOIS	125
3.1.1. Description neurologique et en psychomotricité	125
3.1.2. Comparaison des paramètres neuroradiologiques conventionnels (score IRM) au devenir évalué par le score d'Amiel-Tison et le par le score de Brunet-Lézine Révisé	128
3.1.3. Comparaison des paramètres de SRM au devenir neurologique à 6 mois (Amiel-Tison)	129

3.1.4. Comparaison des paramètres de DTI par la méthode PRIDE avec le devenir évalué par le score d'Amiel-Tison	131
3.1.5. Comparaison des paramètres de DTI par la méthode FSL au devenir évalué par le score d'Amiel-Tison et le Brunet-Lézine Révisé	132
3.1.5.1. Comparaison avec le score d'Amiel-Tison à 6 mois	132
3.1.5.2. Comparaison avec le score de Brunet-Lézine révisé à 6 mois	132
3.2. DISCUSSION SUR LES DONNEES A 6 MOIS	144
3.2.1. Données cliniques	144
3.2.2. Données d'IRM conventionnelle	145
3.2.3. Données de SRM	146
3.2.4. Données DTI (PRIDE et FSL)	149
CONCLUSION	153
REFERENCES	156
ANNEXE 1	171
ANNEXE 2	202

INTRODUCTION

Les anomalies neurologiques graves ou les décès en rapport avec l'asphyxie périnatale dans les pays développés ont une fréquence comprise entre 0,2 et 6 pour 1000 naissances vivantes (Adamson et al., 1995; Ekert et al., 1997; Finer et al., 1981; Shevell, 2004; Smith et al., 2000; Thornberg et al., 1995; Wayenberg et al., 1998). L'anamnèse clinique, le score d'Apgar, le score de Sarnat, l'évaluation neurologique d'Amiel-Tison (Gosselin et al., 2005; Sarnat and Sarnat, 1976), les examens biologiques et électroencéphalographiques, les échographies cérébrales précoces sont autant d'outils efficaces d'évaluation de l'intégrité cérébrale chez les nouveau-nés. L'Imagerie par résonance magnétique (IRM), incluant l'imagerie de diffusion (Diffusion Weighted Imaging : DWI) est l'examen neuroradiologique de choix pour mettre en évidence des anomalies cérébrales dans ce contexte (Barkovich, 2006; Brissaud et al., 2005; Huppi and Amato, 2001; Huppi and Inder, 2001; Rutherford et al., 2004). L'évaluation clinique associée à l'analyse des paramètres IRM classiques est efficace pour distinguer les encéphalopathies hypoxique-ischémiques (EHI) mineures des EHI sévères. Cependant des difficultés subsistent pour préciser le devenir des EHI néonatales modérées. La Spectroscopie par Résonance Magnétique (SRM) est une technique plus ancienne mais les applications pratiques dans l'analyse des lésions hypoxique-ischémiques du nouveau-né datent des années 80 (Cady et al., 1983). Cette technique permet de mesurer in vitro ou in vivo la concentration des différents métabolites constitutifs du milieu étudié. Certains auteurs ont montré l'existence d'une corrélation entre la valeur des différents ratios de métabolites (en particulier au niveau des noyaux gris centraux : NGC) et le devenir neurologique (Barkovich et al., 1999; Chateil, 1999; Huppi and Barnes, 1997; Malik et al., 2002; Ment et al., 2002; Robertson et al., 2000). L'IRM des tenseurs de Diffusion (Diffusion Tensor Imaging : DTI) mesure la diffusion de l'eau dans les tissus cérébraux (Barkovich, 2006; Le Bihan et al., 2001; Malik et al., 2006; Ward et al., 2006). Les paramètres quantitatifs tels que la Fraction d'Anisotropie (FA) et le Coefficient Apparent de Diffusion (ADC) obtenus par une telle technique, renseignent sur les propriétés de la microstructure des zones explorées. La diminution de l'anisotropie est une caractéristique commune des anomalies du tissu cérébral (van Pul et al., 2005; Ward et al., 2006). Des données normales et pathologiques pour la FA et l'ADC au sein des structures cérébrales néonatales sont aujourd'hui disponibles (Bartha et al., 2007; Cascio et al., 2007; Hermoye et al., 2006; Malik et al., 2006; Miller et al., 2007; Mukherjee et al., 2002; Rutherford et al., 2004; Ward et al., 2006). Certains auteurs

ont suggéré que les modifications de valeur de FA dans certaines zones cérébrales pourraient être un facteur de pronostic précoce du devenir.

Les phénomènes physiopathologiques de l'HI périnatale sont de mieux en mieux connus, en grande partie grâce à la neuroimagerie. Cependant, il est toujours très difficile de prédire à moyen et long terme un pronostic fiable pour les EHI dites « intermédiaires ».

C'est la raison pour laquelle, à partir de 2006, nous avons mis en place au CHU de Bordeaux, une étude prospective observationnelle pilote dans le cadre de l'HI périnatale. Nous avons établi un protocole de recherche (protocole BIGHIN) et émis l'hypothèse que les modifications localisées et précoces des paramètres de la DTI (FA et ADC) dans des régions cérébrales choisies *a priori* seraient prédictives du devenir neurologique des nouveau-nés asphyxiques à l'âge de un an. Dans le même temps, parce que l'objectif au delà de l'évaluation pronostique est de développer des thérapeutiques et la « fenêtre de tir » d'utilisation de ces dernières dans le cadre de l'HI, nous avons travaillé sur un modèle animal nouveau-né HI de raton. Les animaux ont reçu un neuroprotecteur : l'érythropoïétine (Epo). Nous avons utilisé l'IRM de diffusion chez ces ratons pour mesurer les effets précoces de cette molécule dans ce modèle.

Nous allons séparer la rédaction de cette thèse de Sciences en trois parties.

La première partie fera l'état des lieux des connaissances sur l'HI périnatale. Nous insisterons sur la partie concernant la neuroimagerie car notre travail de recherche s'appuie sur cette technique. Nous détaillerons aussi sur les différentes possibilités de traitement de l'HI du nouveau-né, incluant notamment l'hypothermie, en rapportant la synthèse des différentes études randomisées sur ce sujet.

Dans une deuxième partie, nous exposerons notre travail de recherche fondamental sur le raton, après avoir rappelé les différents modèles animaux susceptibles d'être utilisés dans ce cadre précis.

Enfin, en troisième et dernière partie, nous rapporterons la méthodologie et les résultats de notre travail de recherche clinique (BIGHIN) en discutant spécifiquement les résultats obtenus précocement (à 8 jours de vie) et à 6 mois. A partir de ces résultats, nous évoquerons dans cette ultime partie, l'intérêt et l'importance de développer des outils ergonomiques pour une lecture aisée et directe des paramètres neuroradiologiques tels que l'ADC ou la FA.

SOUFFRANCE HYPOXIQUE ISCHEMIQUE NEONATALE

ETAT DE L'ART

I DEFINITION ET EPIDEMIOLOGIE

L'HI périnatale correspond à une inadéquation entre les besoins d'oxygène de l'enfant (en particulier au niveau cérébral) et les apports en oxygène à ce dernier aboutissant à un phénomène asphyxique. Ce phénomène correspond à une altération sévère des échanges gazeux utéro-placentaires au niveau de la chambre intervillieuse. Lors des contractions pendant le travail, le fœtus vient puiser l'oxygène au niveau de la chambre intervillieuse dont les réserves peuvent être altérées par de nombreuses pathologies maternelles (vasculaires ou constitutionnelles) ou fœtales. Cette asphyxie entraîne une hypoxie, une hypercapnie et une acidose métabolique avec hyperlactacidémie. On doit distinguer deux situations : l'asphyxie périnatale et l'EHI qui en est la conséquence. Certaines situations autres que l'asphyxie peuvent être responsables d'encéphalopathie néonatale (pathologies génétiques, maladies neuromusculaires, maladies métaboliques) et il est nécessaire d'orienter le diagnostic étiologique de manière précise avant de rattacher l'encéphalopathie à un phénomène asphyxique périnatal. La survenue d'une asphyxie périnatale concerne 0,5 à 5 % des naissances selon les études et les critères retenus pour la définir (Gonzalez de Dios and A., 1996; Thornberg et al., 1995; Wayenberg et al., 1998) tandis que le rôle de l'hypoxie dans la survenue d'une encéphalopathie ne semble impliquée directement que dans 15 à 20 % des cas. L'identification des phénomènes périnataux d'HI passe par la mise en évidence de marqueurs de l'asphyxie tandis que l'EHI se définit selon l'état clinique du nouveau-né. La fréquence de l'EHI du nouveau-né varie selon les études de 1,8 à 12 ‰ naissances dont 30 à 50% sont considérées comme modérées ou sévères (Gonzalez de Dios and A., 1996; Thornberg et al., 1995; Wayenberg et al., 1998). La mortalité et le handicap secondaire liés à l'asphyxie périnatale se situent respectivement entre 0,2 et 0,9 ‰ et 0,2 et 0,6 ‰ naissances vivantes à terme (Gonzalez de Dios and A., 1996; Thornberg et al., 1995; Wayenberg et al., 1998). Le pronostic neurologique des enfants présentant une EHI dépend du stade de cette dernière (Cf. infra). Dans une vaste étude de suivi longitudinal à 3,5 ans, Roberston et al (Robertson and Finer, 1985) ont montré que sur une population de 226 nouveau-nés, 79 présentaient une EHI mineure (tous ont eu une évolution favorable), 119 présentaient une EHI modérée (5% sont morts et 21% des survivants avaient des séquelles neurologiques), et 28 présentaient des signes d'EHI sévère (¾ sont décédés et les 25 % restants ont tous présenté des séquelles neurologiques). La durée pendant laquelle les

anomalies néonatales précoces sont observées est également un élément important. Sarnat et Sarnat (Sarnat and Sarnat, 1976) dans leur étude en 1976 ont mis en évidence que les enfants évalués en stade 2 pendant moins de 5 jours avaient un devenir normal tandis que ceux qui avaient un stade 2 qui durait plus de 5 jours avaient un devenir neurologique mauvais ou décédaient.

La prise en charge des enfants à terme qui présentent une EHI constitue un challenge. Elle se heurte à deux problèmes : la reconnaissance précoce des lésions qui nécessite de développer des outils diagnostiques et pronostiques fiables et la mise en œuvre rapide de thérapies appropriées.

II PHYSIOPATHOLOGIE

1. MECANISMES DE L'AGRESSION HYPOXIQUE-ISCHEMIQUE ET DES LESIONS NEURONALES

Les phénomènes à l'origine des lésions dans le cadre de l'HI sont résumés au travers des figures 1 et 2. Elles permettent de mieux comprendre les cibles attendues dans le cadre de possibles traitements de l'asphyxie périnatale. Il peut s'agir de cibles dites « précoces » (action sur les phénomènes initiaux conduisant à la nécrose ou à l'apoptose : récepteurs NMDA, cascades des caspases) ou « tardives » (action sur la gliose par exemple).

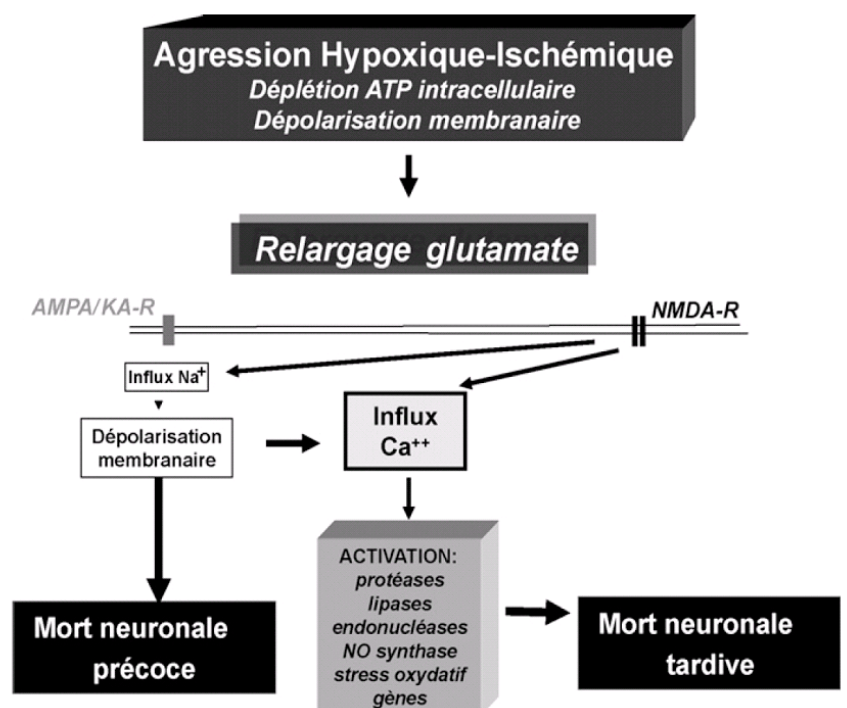
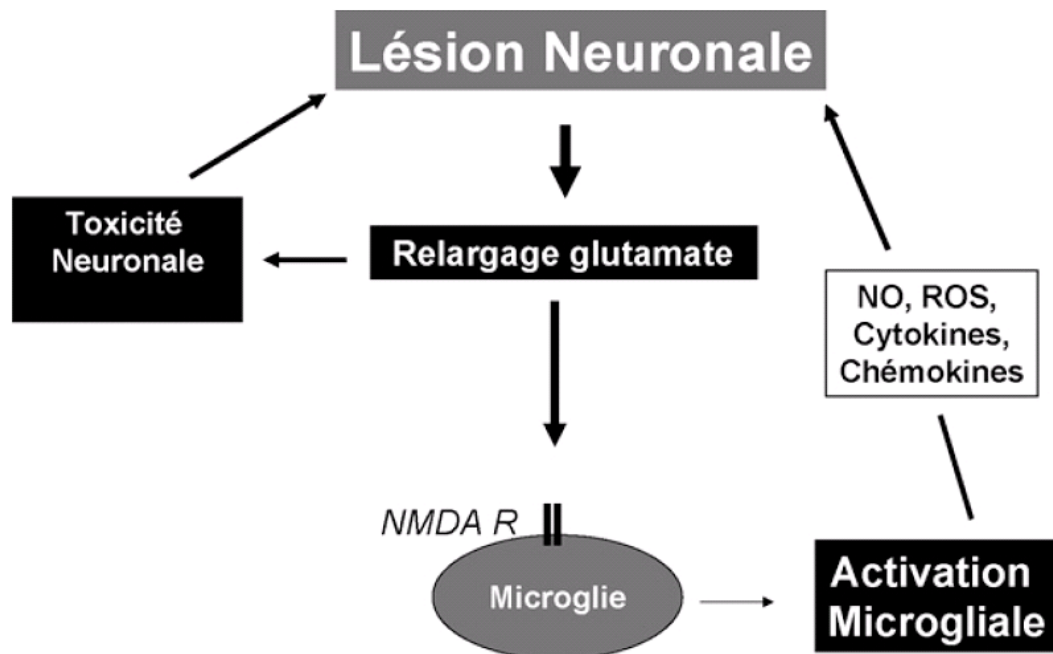


Figure 1 : représentation schématique de la cascade d'événements impliqués lors d'une agression hypoxique et ischémique d'après (Degos et al., 2008a) (R : récepteurs).

Figure 2 : représentation schématique des mécanismes impliqués dans la genèse des lésions neuronales d'après (Degos et al., 2008a) (NMDA R : récepteur au NMDA ; NO : monoxyde d'azote ; ROS : radicaux libres de l'oxygène).



1.1. FACTEURS DE RISQUES

La relation entre le type de phénomène HI, le moment de sa survenue et l'histoire clinique à l'origine de cette HI ont été étudiés et peuvent permettre de repérer les enfants à risque (Sie et al., 2000). Les différentes explications sur la répartition des lésions cérébrales font appel au type d'hypoxie, à la vascularisation des territoires jonctionnels, à la modification de la distribution régionale des synapses excitotoxiques, et aux différences régionales du processus de myélinisation. Les zones touchées lors de l'anoxo-ischémie sont différentes chez le prématuré et le nouveau-né à terme : chez ces derniers, les plus sensibles semblent être celles qui sont myélinisées c'est à dire les putamen et les zones périrolandiques (sensibilité directe liée à la concentration en excès du glutamate) et chez les prématurés, les thalami et les zones périventriculaires (phénomène d'origine vasculaire probable dans ce cas) (Huppi and Amato, 2001).

Trois phénomènes physiopathologiques sont impliqués : la baisse de la perfusion systémique par hypotension et hypovolémie, le saignement intracérébral et la peroxydation des

macromolécules par les radicaux libres lors de la reperfusion. L'intervention secondaire de la réponse inflammatoire (TNF, IL6, IL1) participe également aux processus lésionnels (Huppi and Amato, 2001). Les mécanismes responsables sont résumés dans le tableau 1 (Sie et al., 2000).

L'hypoxie prolongée ou répétée partielle entraîne plutôt une atteinte de la substance blanche (SB). L'hypoxie aiguë ou profonde est plutôt à l'origine de lésions des NGC. Pour Sie (Sie et al., 2000), l'âge post-conceptionnel de naissance n'est impliqué que secondairement. Pour essayer de dater plus précisément les mécanismes, d'autres auteurs (Naeye and Lin, 2001) se sont intéressés à des marqueurs de l'HI fœtale telles que la bradycardie (en rapport avec les études réalisées chez les fœtus primates), la lymphocytose et la thrombopénie. Si la bradycardie a lieu moins de 30 minutes avant la naissance, les lésions prédominent sur les NGC ; si elle dure plus longtemps, les lésions peuvent toucher la substance grise (SG) et la SB.

La lymphocytose ($> 10.000/\text{mm}^3$) débute 25 minutes après le début de la bradycardie et disparaît dans les 14 à 18 heures qui suivent le début de cette dernière.

La thrombopénie ($< 200.000/\text{mm}^3$) apparaît entre la 20^{ème} et la 28^{ème} heure. Ce repérage du délai d'apparition des phénomènes asphyxiques n'a d'intérêt que si leur analyse se fait en fonction du type de lésions cérébrales, de la souffrance néonatale et de l'existence ou non d'une acidose métabolique.

Heinonen et al (Heinonen and Saarikoski, 2001) ont décrit les situations à risque d'anoxie perpartum : anomalies d'insertion placentaire (OR : 3,74 ; IC 95 % [2,15-6,51]), primiparité (3,10 ; IC 95 % [2,57-3,74]), abus d'alcool (1,75 ; IC 95 % [1,18-2,59]), prééclampsie (1,49 ; IC 95 % [1,06-2,08]), sexe masculin (1,48 ; IC 95 % [1,24-1,77]) et RCIU (1,33 ; IC 95 % [1,04-1,70]). Dans les pays défavorisés, s'ajoute aux facteurs précédemment évoqués, un impact fort de l'absence de suivi prénatal, du diabète et de la postmaturité (Ellis et al., 2000).

Tableau 1 : Mécanismes impliqués dans les processus lésionnels des souffrances hypoxiques-ischémiques périnatales.

Moment de l'accident	Type d'hypoxie	Origine physiopathologique
Anténatal	Subaiguë ou chronique	Prééclampsie, infection maternelle, hémorragie du troisième trimestre, RCIU, prématurité
Périnatal	Aiguë	Rupture utérine, rupture cordon ombilical, lésions placentaires, accouchement traumatique, circulaire du cordon, Apgar < 5 à 5', pH < 7 au cordon, Sarnat 2 ou 3
	Subaiguë ou chronique	Diminution des mouvements fœtaux, prématurité, anomalies du monitoring, liquide amniotique méconial, rupture prolongée des membranes.
Postnatal	Aiguë	Etat de mal épileptique, arrêt cardiaque Sepsis, anémie, bradycardie,
	Subaiguë ou chronique	désaturation, ventilation artificielle prolongée, hypotension artérielle, hydrocéphalie post-hémorragique

1.2. MARQUEURS DE L'ASPHYXIE PERINATALE

Ils sont différents des marqueurs potentiellement pronostiques à court, moyen ou long terme des nouveau-nés. En effet, ces marqueurs de l'asphyxie périnatale ont pour seul but de rattacher l'apparition d'un tableau clinique d'encéphalopathie au phénomène asphyxique. La littérature rapporte de nombreux marqueurs de l'asphyxie périnatale. Parmi ces derniers, on retient : le pH à la naissance inférieur à 7, l'acidose métabolique à 30 minutes de vie (Wayenberg et al., 1998), le score d'Apgar à la naissance inférieur à 3 (état de mort apparente) ou le score d'Apgar à 5' de vie inférieur à 5 (Gire et al., 2000; Lamblin et al., 1996; Pressler et al., 2001). D'autres études intègrent dans les critères d'asphyxie périnatale des éléments anamnestiques : hématome rétroplacentaire, procidence du cordon, circulaire serrée du cordon, arrêt des mouvements actifs du fœtus, anomalies du

rythme cardiaque fœtal sur le monitoring (Dip 2, rythme micro-oscillant, bradycardie inférieure à 100/’ ou tachycardie supérieure à 160/’), liquide amniotique méconial, retard de croissance intra-utérin, dépassement de terme (Gire et al., 2000; Lamblin et al., 1996; Pressler et al., 2001).

La mesure du taux sérique du lactate a été évaluée comme marqueur biologique de l’asphyxie. Une étude en 2004 (Shah et al., 2004) sur 61 nouveau-nés à terme présentant des critères de souffrance asphyxique périnatale a permis de mettre en évidence que le taux de lactate mesuré dans l’heure suivant la naissance était significativement plus élevé chez les nouveau-nés qui présentaient une encéphalopathie de stade 2 et 3 de Sarnat par rapport à ceux qui présentaient une encéphalopathie de stade 1. Les auteurs rapportaient une évolution vers un stade 2 ou 3 de Sarnat avec une sensibilité de 94% et une spécificité de 67%, pour une valeur du taux de lactate néonatal \geq à 7,5 mmol/L. Plus que la valeur mesurée, c’est, semble-t-il une cinétique lente de diminution (normalisation > 10 heures) qui est associée à un mauvais pronostic dans cette catégorie de patients (Murray et al., 2008; Shah et al., 2004). L’existence de globules rouges circulants immatures nucléés (> 10/100 globules blancs) ou un taux de plaquettes sanguines < 100.000/mm³ dans les 5 jours qui suivent la naissance peuvent correspondre à un évènement asphyxique aigu périnatal (Phelan et al., 2005). D’autres marqueurs biologiques sériques ou dans le Liquide Cérébro-spinal (LCS) ont été évalués sans que leur utilisation soit à ce jour passer en routine. On peut schématiquement conserver :

- les marqueurs cliniques : score d’Apgar et liquide méconial (ce dernier étant présent dans 50% des asphyxies périnatales, mais aussi dans 10 à 20% des accouchements sans asphyxie (Zupan Simunek, 2008) ;
- les marqueurs biologiques : acidose métabolique et hyperlactacidémie.

La dernière analyse complète de la littérature qui a permis d’affiner les critères diagnostiques de l’asphyxie périnatale émane du Collège Américain de Gynécologie Obstétrique et de l’Académie Américaine de Pédiatrie en 2003 (Hankins and Speer, 2003) et apporte de minimes modifications par rapport à l’International Cerebral Palsy Task Force de 1999 (MacLennan, 1999). Deux groupes de patients sont distingués (tableau 2) : l’un avec 4 critères essentiels qui doivent tous être présents pour relier le tableau neurologique néonatal à une asphyxie périnatale ; l’autre avec 5 critères non spécifiques mais qui, ensemble, orientent vers une origine périnatale du phénomène asphyxique.

Tableau 2 : évolution des critères permettant de rattacher un état neurologique néonatal (encéphalopathie) à un évènement asphyxique périnatal d'après (Hankins and Speer, 2003; MacLennan, 1999)

International Cerebral Palsy Task Force (1999)(MacLennan, 1999);	Collège Américain de Gynécologie Obstétrique (2002) (Hankins and Speer, 2003)
<p>Critères essentiels (devant être tous présents)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Mise en évidence d'une acidose métabolique fœtale perpartum, au cordon sur l'artère ombilicale ou précocement chez le nouveau-né (moins d'une heure de vie) : pH < 7,00 et déficit de base ≥ 12 mmol/l • Encéphalopathie précoce modérée à sévère chez un enfant ≥ 34 semaines d'âge gestationnel • Paralysie cérébrale de type quadriplégie spastique ou de type dyskinétique <p>Critères suggérant ensemble une origine intrapartum mais non spécifiques en eux-mêmes</p> <ul style="list-style-type: none"> • Événement hypoxique sentinelle survenant avant ou pendant le travail • Altération brutale et prolongée du rythme cardiaque fœtal faisant suite à l'événement sentinelle, le tracé précédant l'événement étant normal • Score d'Apgar entre 0 et 6 au-delà de 5 minutes • Altérations multiorganiques précoces • Imagerie néonatale précoce en faveur d'un événement récent (ex., œdème cérébral) 	<p>Critères essentiels (devant être tous présents)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Mise en évidence d'une acidose métabolique fœtale perpartum, au cordon sur l'artère ombilicale ou précocement chez le nouveau-né (moins d'une heure de vie) : pH < 7,00 et déficit de base ≥ 12 mmol/l • Encéphalopathie précoce modérée à sévère chez un enfant ≥ 34 semaines d'âge gestationnel • Paralysie cérébrale de type quadriplégie spastique ou de type dyskinétique • Exclusion des autres causes : traumatisme, troubles de coagulation, pathologie infectieuse, problème génétique <p>Critères suggérant ensemble une origine intrapartum mais non spécifiques en eux-mêmes (si certains des critères suivants sont absents ou contradictoires, l'origine perpartum du processus demeure incertaine)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Événement hypoxique sentinelle survenant avant ou pendant le travail • Altération brutale et prolongée du rythme cardiaque fœtal faisant suite à l'événement sentinelle, le tracé précédant l'événement étant normal ; les anomalies du rythme cardiaque fœtal évocatrices étant une bradycardie ou disparition de la variabilité ou des décélérations tardives ou variables prolongées • Score d'Apgar entre 0 et 3 au-delà de 5 minutes • Altérations multiorganiques précoces (début avant 72 heures de vie) • Imagerie néonatale précoce montrant des anomalies non focales

2. FACTEURS PRONOSTIQUES ET MOYENS D'ÉVALUATION DE L'ASPHYXIE PERINATALE ET DE L'EHF

Il existe actuellement un certain nombre d'éléments cliniques et paracliniques qui tentent de définir au mieux le pronostic à moyen et long terme des asphyxies périnatales. Celui-ci repose sur un faisceau d'arguments cliniques (Gire et al., 2000; Sarnat and Sarnat, 1976; Wayenberg et al., 1998; Zupan Simunek, 2008), électroencéphalographiques (Gire et al., 2000; Pressler et al., 2001) et neuroradiologiques : IRM traditionnelle (Barkovich et al., 1998; Gire et al., 2000; Huppi and Amato, 2001 ; Lamblin et al., 1996; Rutherford et al., 1998), imagerie de diffusion (Liu et al., 2001; Roelants-Van Rijn et al., 2001a; Rutherford et al., 2004; Takeoka et al., 2002 ; Vermeulen et al., 2008) et SRM (Barkovich et al., 1999; Fan et al., 2003; Groenendaal et al., 2001; Huppi, 2001; Huppi and Lazeyras, 2001; Kadri et al., 2003; Liauw et al., 2008; Pu et al., 2000; Robertson et al., 2000; Roelants-Van Rijn et al., 2001a; Roelants-Van Rijn et al., 2001b; Vigneron et al., 2001). Des nouvelles techniques d'imagerie offrent un champ nouveau d'évaluation de l'asphyxie périnatale : c'est le cas de la DTI, technique que nous avons utilisée dans notre travail de recherche.

2.1. FACTEURS PRONOSTIQUES CLINIQUES

Ils correspondent à la classification des nouveau-nés selon le score de Sarnat (Sarnat and Sarnat, 1976) ou celui d'Amiel-Tison (Amiel-Tison and Ellison, 1986; Gosselin et al., 2005).

2.1.1. La classification de Sarnat

Elle repose sur des critères cliniques observés entre 2 et 4 heures de vie et distingue trois stades :

Stade 1 : Hyperexcitabilité, tonus et réflexes archaïques normaux, troubles dysautonomiques sympathiques (mydriase, tachycardie, encombrement modéré), absence de convulsions ;

Stade 2 : Dépression de la conscience, trouble du tonus, réflexes archaïques faibles ou absents, signes dysautonomiques parasympathiques (myosis, bradycardie, encombrement important, diarrhée), convulsions focales ou multifocales ;

Stade 3 : Coma, hypotonie globale, absence de réflexes archaïques, signes dysautonomiques, état de mal convulsif ou non, signes de décérébration.

Les signes du stade 1 disparaissent le plus souvent en 48 heures et le pronostic neurologique est favorable. Le stade 3 est sévère avec un pronostic neurologique sombre avec près de 100% de décès ou de séquelles graves (Gire et al., 2000; Whitelaw and Thorensen, 2002; Zupan Simunek, 2008). Le pronostic dans les EHI de stade 2 est réservé pouvant comporter de 40 à 60% de séquelles (Zupan Simunek, 2008). L'évaluation pronostique des patients en stade 2 de Sarnat nécessite l'utilisation d'autres critères comme l'électroencéphalographie et la neuroradiologie (IRM) (Gire et al., 2000; Pressler et al., 2001). La fréquence des convulsions dans les stades 2 et 3 de Sarnat varie de 11% (Wayenberg et al., 1998) à 100% (Gire et al., 2000). Dans cette dernière série de 26 enfants, un peu plus de la moitié d'entre eux (57,7 %) ont présenté un état de mal convulsif dont l'existence, à elle seule, n'est pas corrélée à un pronostic neurologique spécifique. Pourtant, la persistance de crises cliniques plusieurs jours, malgré un traitement adapté, semble être de mauvais pronostic en dehors de tout autre critère (électriques ou neuroradiologiques) (Gire et al., 2000).

2.1.2. La classification d'Amiel-Tison (Amiel-Tison and Ellison, 1986)

Elle distingue 3 niveaux d'altération précoce sur l'examen du nouveau-né :

- Stade mineur : troubles du tonus avec hyperexcitabilité, absence de troubles de la conscience, réflexes archaïques présents ;
- Stade modéré : troubles du tonus avec dépression neurologique (conscience, réflexes), présence de crises convulsives isolées ;
- Stade majeur : léthargie, état de mal convulsif.

En 2002, C Amiel-Tison propose une version revisitée de son évaluation chez le nouveau-né (Amiel-Tison, 2002) à terme à risque d'EHI en se basant sur de nombreux items chacun côté de 0 à 2 (0 = normal ; 1 = modérément anormal ; 2 = très anormal), en conservant deux grands niveaux de gravité croissant :

- Niveau 1 : absence d'anomalie neurologique ;
- Niveau 2 : présence de signes neurologique à des degrés divers :
 - Mineurs sans dépression du système nerveux central
 - Modérés avec dépression du système nerveux central
 - Sévères avec dépression profonde du système nerveux central et crises convulsives répétées durant plus de 30 minutes.

Ce score définit également l'évolution de l'état du patient sur des examens répétés : état dynamique (traduisant une tendance à l'aggravation après une période d'amélioration) et état statique (pas de modification sur les examens répétés).

Cette version du score d'Amiel-Tison met l'accent sur l'existence de signes évocateurs d'un accident prénatal en recherchant la présence d'un palais ogival, du pouce adductus et d'un chevauchement des sutures.

Une évaluation ne permettant pas de conclure parce que les bonnes conditions d'examen ne sont pas réunies doit également être précisée.

La reproductibilité interobservateur de ce score est bonne avec un coefficient kappa de 0,76 pour la synthèse finale. Ce coefficient varie cependant de 0,23 à 1 selon les items (Deschenes et al., 2004). Sa valeur pronostique sur le devenir à 12-15 mois dépend du score initial. Les enfants initialement classés dans la catégorie « examen normal » ont tous une évolution normale et ceux classés dans la catégorie « anomalie majeure » décèdent ou présentent des séquelles graves. Il existe beaucoup de faux positifs pour les nouveau-nés de la catégorie initiale « anomalies mineures » et qui ont un examen normal à 15 mois (77% dans l'étude de Paro-Panjan et al.). C'est beaucoup moins le cas pour la catégorie « anomalies modérées » (seulement 2 sur 17 dans cette même cohorte d'enfants) (Paro-Panjan et al., 2005a; Paro-Panjan et al., 2005b). Les auteurs ont mis en évidence que tous les enfants présentant un retard neurologique important entre 12 et 15 mois de vie ou décédés avaient un score d'Amiel-Tison à terme de type « anomalies majeures » ; ceux qui avaient un score initial de type « anomalies mineures ou modérées » et qui présentaient des anomalies modérées à trois mois de vie évoluaient à 12-15 mois avec un examen normal (Paro-Panjan et al., 2005b).

D'autres score cliniques ont été élaborés (Bao et al., 1993; Dixon et al., 2002; Lipper et al., 1986; Portman et al., 1990; Thompson et al., 1997). Le score clinique de Thompson (Thompson et al., 1997) fait référence à 9 critères cliniques (tonus, posture, niveau d'éveil, crises, réflexe de Moro, grasping, réflexe de succion, respiration, tension de la fontanelle) chacun chiffrés de 0 à 3 (score de 0 à 12) et est répété plusieurs jours de suite. Les auteurs considèrent la fin de la première semaine comme le moment idéal d'évaluation. Un score de moins de 10 dans les trois premiers jours et normal au 7^{ième} jour promet un avenir neurologique normal à l'enfant. A l'inverse, un score de plus de 15 et qui n'est pas strictement normal au 7^{ième} jour doit imposer de rester prudent dans le discours tenu aux parents en termes de pronostic pour leur enfant. Le score de Lipper inclue 17 items dont le scanner cérébral (Lipper et al., 1986), le score de Bao 20

items et de plus nécessite deux semaines d'apprentissage (Bao et al., 1993). Miller et al ont aussi développé un score d'encéphalopathie chez le nouveau-né (Miller et al., 2004) ; ce dernier se base sur 6 critères côtés 0 ou 1 (alimentation, statut respiratoire, tonus, existence de crises convulsives, vigilance et les réflexes) selon qu'ils sont respectivement normaux ou anormaux. La valeur du score et l'existence ou non de crises convulsives (à J1 ou entre J1 et J3) sont des éléments pronostiques selon les auteurs (courbe de ROC).

L'évaluation à plus long terme est possible avec de nombreux outils cliniques qui n'évalue pas les mêmes aspects du développement neuropsychomoteur et qui peuvent être sources de confusion dans la lecture de la littérature : le score d'Amiel-Tison, le score de Brunet-Lézine révisé, l'échelle motrice de Bayley, les échelles de développement mental de Griffith, la classification de Hempel, le *Movement Assessment Battery for Children*, le *Touwen's examination of the Child with Minor Neurological Dysfunction*, l'échelle de Wechsler ou encore le *Mental Development Index*. Cette liste n'est pas exhaustive.

Malgré l'introduction de techniques sophistiquées pour l'évaluation de plus en plus fine de la souffrance asphyxique périnatale et de ses conséquences, l'examen clinique des nouveau-nés reste un outil incontournable et fiable pour évaluer précocement les enfants avec des anomalies neurologiques.

2.2. CRITERES PARACLINIQUES

La recherche de moyens complémentaires pour repérer plus précocement les lésions anoxo-ischémiques chez le nouveau-né à terme reste une préoccupation d'actualité. Nous rappellerons brièvement l'intérêt de l'EEG, de l'échographie transfontanellaire (ETF), du scanner cérébral (TDM) et des séquences conventionnelles de l'IRM cérébrale. Nous détaillerons, en introduction à notre travail, les séquences de diffusion de l'IRM et la SRM du proton en rappelant les aspects théoriques de ces techniques.

2.2.1. EEG

L'intérêt de l'EEG dans l'EHI date du début des années 70. Les travaux de Dreyfus-Brisac et Pezzani (Dreyfus-Brisac, 1979; Pezzani et al., 1986) ont permis de classer l'organisation des tracés de fond des nouveau-nés ayant présenté une souffrance asphyxique en 4 types :

- Type 1 : tracé normal ou anomalies mineures (excès de rythme thêta, pointes temporales, asymétrie modérée.

- Type 2 : tracé lent pathologique du nouveau-né à terme : activité continue de fréquence delta (0,5 à 1,5 Hz) diffuse de faible amplitude (inférieure à 50 μ volts) présente dans la veille comme dans le sommeil, peu réactive.
- Type 3A et 3B : tracés discontinus avec une activité A ou B de plus de 50 % du tracé :
 - o A : la durée de chaque bouffée est comprise entre 10 et 30 secondes et comporte des éléments physiologiques, des encoches frontales séparées par des intervalles faiblement voltés d'amplitude inférieure à 10 μ volts et de moins de 10 secondes ;
 - o B : les bouffées sont constituées d'éléments thêta dont la durée varie de 10 à 30 secondes et l'amplitude de 30 à 50 μ volts et sont séparées par des intervalles d'amplitude inférieure à 10 μ volts et de durée inférieure à 10 secondes. Ce tracé ne présente ni grapho-élément physiologique, ni organisation spatio-temporelle. Il est peu labile.
- Type 4 : tracé très pathologique, inactif ou paroxystique selon la définition de Dreyfus-Brisac.

Les stades 3 et 4 de l'EEG sont associés à un mauvais pronostic neurologique. La valeur pronostique de l'EEG, selon certains auteurs, nécessite d'attendre le 5^{ème} jour afin d'obtenir des résultats plus fiables (Gire et al., 2000). L'étude très précoce des tracés EEG a fait l'objet de travaux récents (Pressler et al., 2001). Si le tracé EEG est normal dans les 8 premières heures de vie (même avec une sédation ou un anticonvulsivant), l'évolution neurologique des enfants est rassurante. Si le tracé est pathologique mais se normalise dans les 24 heures suivant la naissance, l'évolution peut être satisfaisante. Par contre si le tracé ne se normalise pas, le pronostic neurologique est très sombre (Pressler et al., 2001). Il existe une bonne corrélation entre les stades 1 et 3 de Sarnat et les données EEG. Pour les stades cliniques intermédiaires comme le Sarnat 2, les tracés EEG sont très hétérogènes et il est difficile de conclure en termes de pronostic. L'apport de la neuroradiologie (ETF et IRM) est ici important (Gire et al., 2000; Lamblin et al., 1996).

2.2.2. Echographie Transfontanellaire (ETF)

De Vries a établi une classification en 3 stades des anomalies ETF chez les nouveau-nés ayant présenté une EHI. Le stade 1 correspond à une ETF normale. Le stade 2 montre une hyperéchogénicité périventriculaire durant moins de 7 jours. Dans le stade 3, les anomalies

suivantes peuvent être isolées ou associées : images localisées évoquant un infarctus artériel, hyperéchogénicité thalamique, hyperéchogénicité périventriculaire durant plus de 7 jours et hyperéchogénicité sous-corticale ou corticale durant plus de 7 jours. L'ETF a un intérêt dans les stades intermédiaires de l'EEG. L'observation d'une atteinte thalamique sur l'ETF est de mauvais pronostic et l'évolution défavorable en dehors des aspects cliniques et EEG (Lamblin et al., 1996).

L'ETF a permis pendant 2 décennies de dépister et de suivre les anomalies cérébrales liées à l'EHI. Cet examen est surtout performant si les lésions sont hémorragiques ou importantes, dans les encéphalopathies multikystiques, les lésions d'infarctissement focales et les lésions du thalamus et des NGC. Ses limites sont cependant nombreuses : fenêtre d'exploration trop étroite, difficulté d'observer la fosse postérieure. L'avènement de l'IRM a permis comme nous le verrons plus loin de montrer de nombreuses autres lésions cérébrales non vues par ETF dans le cadre de l'EHI. La réalisation d'une étude hémodynamique en Doppler présente par ailleurs un intérêt, lorsque l'index de résistance artériel est inférieur à 0,5, traduisant une vasodilatation secondaire à une ischémie aiguë (Couture et al., 2001)

2.2.3. Tomodensitométrie(T DM)

Si le TDM cérébral a longtemps représenté un examen complémentaire dans l'exploration des EHI, son indication aujourd'hui se limite à la recherche des lésions d'origine traumatique lorsque le contexte s'y prête (hémorragie méningée, hématome extradural ou sous-dural). Il impose les mêmes difficultés de réalisation que l'IRM chez le petit enfant (déplacement, surveillance SAMU, mise en condition difficile) et il est plus limité pour le diagnostic des lésions HI. Nous ne détaillerons pas les différents résultats tomodensitométriques concernant les nouveau-nés à terme en condition d'HI périnatale.

2.2.4. IRM

2.2.4.1. Généralités

L'IRM cérébrale est utilisée depuis 20 ans dans le diagnostic des lésions cérébrales néonatales. Elle repose sur les capacités d'excitation-relaxation des noyaux d'hydrogène placés dans un champ magnétique. Le moment magnétique des noyaux d'hydrogène s'oriente dans un champ magnétique B_0 . Une onde de radiofréquence est alors appliquée et responsable d'une excitation et d'un transfert d'énergie. À l'arrêt de l'onde de radiofréquence, le retour à

l'équilibre (« relaxation ») permet de recueillir un signal multi fréquentiel caractéristique dont le post-traitement électronique (à base de transformées de Fourier) assure la production d'une information pertinente. Celle-ci dépend de la densité de protons et de la relaxation longitudinale [T1] et transversale [T2] caractéristiques d'une molécule ou d'un tissu organique. La localisation du signal émis fait appel à l'utilisation de gradients de champs magnétiques. Il existe de multiples séquences d'acquisition que nous ne détaillerons pas ici et qui privilégient le recueil de tel ou tel paramètre. Le signal obtenu étant faible, il est nécessaire de répéter les excitations. Parmi les paramètres qui caractérisent les différentes séquences, on distingue le temps de répétition (TR : intervalle de temps entre l'application de 2 excitations) et le temps d'écho (TE : délai séparant chaque excitation de l'instant auquel le signal émis est enregistré). Le pouvoir de résolution de cette technique et sa non-invasivité en font une méthode de choix pour l'exploration du cerveau humain (Barantin et al., 1995; Huppi and Amato, 2001; Huppi and Barnes, 1997; Huppi and Inder, 2001). Elle permet des explorations morphologiques dans les trois plans de l'espace, mais également métaboliques et fonctionnelles inégalées (Huppi and Amato, 2001).

2.2.4.2. Séquences conventionnelles

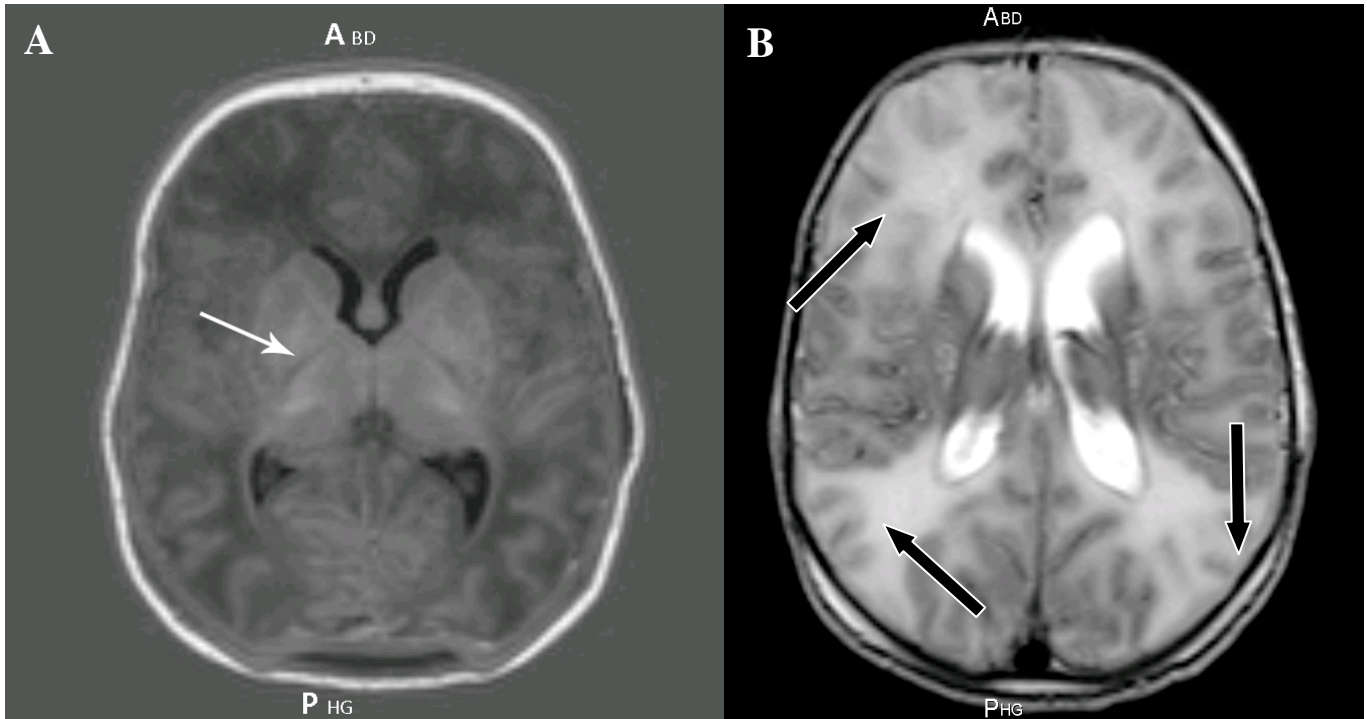
2.2.4.2.1. IRM conventionnelle et souffrance HI néonatale

Les séquences conventionnelles sont dites pondérées en T1 et T2. La première correspond à des TR et des TE courts, la deuxième à des TR longs et des TE longs (Huppi and Inder, 2001). L'IRM permet de mieux apprécier le développement cérébral du fœtus et du nouveau-né, sa différenciation (substances grise et blanche) et les phénomènes de myélinisation dans le temps et l'espace (Huppi and Inder, 2001) comparativement aux autres outils neuroradiologiques tels que l'ETF ou la TDM cérébrale.

L'IRM précise la répartition des lésions cérébrales en fonction du type d'HI et de l'âge post-conceptionnel de l'enfant (tableau 1) (Sie et al., 2000). Son utilisation a permis de révéler des territoires lésés moins connus : lésions cortico-sous-corticales, parasagittales bilatérales, lésions du tronc cérébral, atteinte diffuse du cortex, lésions cérébelleuses, atteintes HI hippocampiques. Ces séquences classiques sont d'une grande utilité pour préciser le pronostic des EHI lorsque les caractères cliniques ou EEG sont intermédiaires (stade 2) (Gire et al., 2000; Lamblin et al., 1996). Des travaux ont montré que la perte de l'hypersignal physiologique du bras postérieur de la capsule interne sur les séquences pondérées T1 (figure 3A, flèche blanche) dans les premiers jours de vie chez des nouveau-nés ayant présenté une HI, représentait un

facteur pronostique très fort d'évolution neurologique défavorable (Rutherford et al., 1998). Cependant ces séquences ne permettent pas toujours, lorsqu'elles sont réalisées tôt (avant le 3^{ème} jour de vie) de mettre en évidence des lésions ischémiques cérébrales. L'atteinte HI des NGC (en particulier thalamus et partie postérieure du putamen) associée à une atteinte HI cortico-sous-corticale est corrélée au devenir neurologique (Barkovich et al., 1998). Les lésions liées à l'asphyxie périnatale chez le nouveau-né à terme peuvent montrer dans les 5 premiers jours de vie, un hypersignal relatif en séquence T1, dont l'interprétation reste très délicate. Ces séquences classiques sont souvent concluantes lorsque les atteintes sont massives (figure 3B, flèches noires). Les recommandations Nord-Américaines propose que l'IRM conventionnelle (séquences pondérées en T1 et T2) soit réalisée chez le nouveau-né à terme ayant présenté une HI périnatale entre le 2^{ème} et le 8^{ème} jour de vie afin d'évaluer de façon optimale les lésions liées à la souffrance (Ment et al., 2002). En dehors de ces situations, des outils diagnostiques permettant d'approcher plus finement les phénomènes HI sont nécessaires. Les limites de l'IRM conventionnelle s'observent aussi dans l'évaluation qualitative des lésions. Certains auteurs ont alors proposé de réaliser des mesures quantitatives d'intensité sur des voxels positionnés sur des séquences pondérées en T1 et T2, dans des zones cérébrales et de corréler les valeurs aux devenir des patients. Cette analyse quantitative s'est révélée moins pertinente que l'analyse qualitative visuelle (Coskun et al., 2001).

Figure 3 : A = perte de l'hyperintensité physiologique en séquence T1 du bras postérieur de la capsule interne (flèche blanche) ; B = hyperintensité diffuse de la substance blanche sous-corticale en séquence pondérée en T2 dans le cadre de l'asphyxie périnatale (flèches noires)



2.2.4.2.2. *Imagerie de diffusion* (Hamon et al., 2005; Huppi and Amato, 2001 ;
Le Bihan et al., 1986)

La diffusion est un processus physique qui décrit les mouvements directionnels des molécules via leurs mouvements Browniens. La mobilité de ces molécules peut être caractérisée par la constante physique D , appelée coefficient de diffusion. Les facteurs influents sur la diffusion d'une molécule en solution (ou sa propre diffusion dans un liquide pur) sont le poids moléculaire, les interactions moléculaires (viscosité) et la température. Les microstructures cellulaires des tissus viennent compliquer cette situation et influencent la mobilité des molécules diffusantes en offrant une multitude de barrières et en créant de nombreux compartiments (intracellulaires, extracellulaires, neurones, glie, axones ...) à l'intérieur du système nerveux central.

Coefficient apparent de diffusion (ADC)

Le coefficient de diffusion mesuré par RMN dans un tissu biologique est appelé coefficient de diffusion apparent (**ADC**) et reflète la mesure de diffusion d'une molécule en interaction avec des structures cellulaires, à l'opposé de **D**, qui est une mesure « intrinsèque » de diffusion d'une molécule.

Imagerie de diffusion : principe

Les séquences de diffusion sont des séquences rapides (type écho de spin) dont l'acquisition échoplanaire permet d'éviter les artéfacts de mouvements. La première séquence de diffusion a été décrite par Stejskal et Tanner en 1965 (Stejskal and Tanner, 1965). Elle est élaborée à partir d'une séquence T2 écho de spin complétée par l'ajout de deux gradients dits « de diffusion », placés symétriquement autour de l'impulsion de 180°, δ étant la durée d'application du gradient de diffusion et Δ la durée de séparation entre ces deux gradients (Le Bihan et al., 1986). L'application de ces deux gradients de forte intensité et symétriques de part et d'autre du pulse de 180° permet d'obtenir une séquence de diffusion par diminution du signal des protons mobiles en raison du changement de phase lié à leur mouvement entre l'application des deux gradients. Cette perte de signal ne concerne pas les protons immobiles car le déphasage des spins provoqué par l'application du premier gradient est parfaitement compensé par le rephasage des spins à l'aide du second gradient. L'importance de l'atténuation du signal est le reflet direct de la mobilité des molécules d'eau. Ainsi, le signal du LCS est fortement hypointense avec ce type de séquence alors que le parenchyme cérébral a un signal plus élevé. Plus les gradients sont intenses, plus la séquence de diffusion peut détecter de faibles amplitudes de diffusion. Cette sensibilité de détection correspond au facteur **b** (facteur d'atténuation qui caractérise la puissance des gradients de diffusion), lui-même fonction des caractéristiques des gradients : amplitude **g**, durée d'application δ et temps séparant l'application de ces deux gradients Δ , et du rapport gyromagnétique γ :

$$b = \gamma^2 \delta^2 g^2 (\Delta - \delta/3)$$

Plus **b** est élevé, plus la séquence est pondérée en diffusion. A l'inverse, pour un **b**=0 s/mm², la séquence correspond alors à une séquence T2 échoplanaire.

La diffusion est calculée à partir d'une telle séquence en mesurant l'atténuation de l'intensité du signal (S) en fonction du facteur de gradient de diffusion b . Après application des gradients de diffusion, pour un b donné, le signal va décroître selon l'équation :

$$S=S_0.e^{-b.adc}$$

avec S correspondant à l'intensité du signal de RMN après application d'un gradient de diffusion ($b \neq 0$) et S_0 correspondant à l'intensité du signal sans gradient de diffusion ($b=0$). L'IRM de diffusion fournit ainsi pour chaque coupe :

- des images pondérées en diffusion selon les trois directions de l'espace,
- une image moyennée, dite image « trace »
- une cartographie ADC.

Isotropie/anisotropie

Dans un liquide pur, ou dans un tissu où les barrières ne sont pas orientées, la diffusion est identique dans toutes les directions de l'espace et est appelée isotropique. En revanche, si la diffusion est prépondérante dans une direction donnée, comme dans un tissu avec des barrières fortement orientées (substance blanche et axones), la diffusion est alors décrite comme anisotropique. Dans le cerveau, au cours du temps d'écho d'une séquence de diffusion (50 à 100 ms), les molécules d'eau parcourent une distance moyenne de 10 à 15 μm , tout en se cognant, traversant ou interagissant avec les nombreux composants tissulaires (membranes, fibres, macromolécules). Lorsque la diffusion est différente selon les directions dans l'espace, la diffusion est dite anisotrope et est fonction de l'orientation variable des structures biologiques. La diffusion est alors plus élevée lorsque les gradients sont orientés dans l'axe des fibres de myéline. Pour s'affranchir de ce phénomène, plusieurs acquisitions successives en appliquant les gradients de diffusion sélectivement, dans trois directions orthogonales de l'espace (xx' , yy' , zz') sont réalisées. À partir de ces trois acquisitions, les signaux mesurés selon chaque axe sont moyennés; la moyenne obtenue, appelée ADC ne dépend plus du système de mesure choisi. Le coefficient apparent de diffusion ou ADC (apparent diffusion coefficient) est dit « apparent » car il résulte des mouvements aléatoires browniens des molécules d'eau mais également d'autres mouvements incohérents (comme la microcirculation capillaire). Par extension de la terminologie, la moyenne des coefficients de diffusion recueillis selon trois axes est également appelé ADC (exprimé en $\mu\text{m}^2/\text{ms}$ ou mm^2/sec). L'analyse du signal peut être représentée sur une image appelée « trace ». Un post-traitement par un logiciel dédié permet, à partir de

l'image $b=0$ s/mm² et de l'image trace, d'obtenir une cartographie ADC afin de s'affranchir de l'effet T2 artéfact de rémanence T2 (correspondant à la rémanence d'un hypersignal T2 présent avant application des gradients). Le signal d'une cartographie d'ADC correspond à la valeur réelle de l'ADC et est indépendant de l'effet T2 et de la valeur de b utilisée. Les valeurs d'ADC sont alors codées selon une échelle de gris ou de couleurs s'étalant du bleu ou noir (faible diffusion) au rouge ou blanc (forte diffusion).

Interprétation du signal

Neil (Neil et al., 1998) a rapporté les valeurs mesurées de l'ADC dans différentes régions du cerveau du nouveau-né sain à terme (tableau 3). Ces valeurs sont plus élevées que celles observées chez l'adulte (en moyenne $0,7 \cdot 10^{-3}$ mm²/sec dans le parenchyme sain) du fait de la plus grande quantité d'eau dans le cerveau du nouveau-né.

Tableau 3 : valeur de l'ADC en fonction de la localisation cérébrale chez l'enfant sain à terme d'après (Neil et al., 1998).

Région anatomique	Valeur de l'ADC ($\mu\text{m}^2/\text{ms}$)
Substance blanche postérieure	1,5 ± 0,1
Substance blanche centrale	1,4 ± 0,14
Substance blanche antérieure	1,45 ± 0,12
Tête du noyau caudé	1,24 ± 0,06
Cortex face médiale hémisphérique	1,18 ± 0,06
Cortex face latérale hémisphérique	1,16 ± 0,05
Putamen et pallidum	1,18 ± 0,03
Bras antérieur de la capsule interne	1,18 ± 0,04
Bras postérieur de la capsule interne	1,06 ± 0,03
Thalamus	1,08 ± 0,07
Hémisphères cérébelleux	1,14 ± 0,071

Le LCS possède une diffusion très élevée (ADC de l'ordre de 3.10^{-3} mm²/sec) se traduisant par un signal élevé sur la cartographie d'ADC et un hyposignal par rapport au parenchyme cérébral normal sur les images pondérées en diffusion (b = 1 000 s/mm²).

En pathologie cérébrale, les zones dans lesquelles la diffusion de l'eau est augmentée (œdème vasogénique, kyste tumoral) auront un signal plus élevé que le parenchyme sain sur la cartographie ADC et un signal iso ou hypointense par rapport au parenchyme normal sur les images pondérées en diffusion (b = 1 000 s/mm²) (perte de signal par déphasage des protons mobiles). Inversement, en cas d'œdème cytotoxique, la diffusion de l'eau est dite restreinte car l'espace extracellulaire est diminué, ceci étant interprété comme la traduction du « gonflement » des cellules. Ce phénomène se traduit par une diminution de signal sur la cartographie ADC, et par un hypersignal sur les images pondérées en diffusion (b = 1 000 s/mm²) (figure 4 A & B). Le calcul de l'ADC semble une mesure quantitative fiable et objective de l'HI cérébrale dans les 12 premiers jours suivant l'asphyxie périnatale chez les nouveau-nés à terme. Il peut permettre une approche plus fiable des lésions que sur l'imagerie de diffusion observée sur l'image de « trace », sujette à d'autres facteurs de contraste (T2) (Wolf et al., 2001).

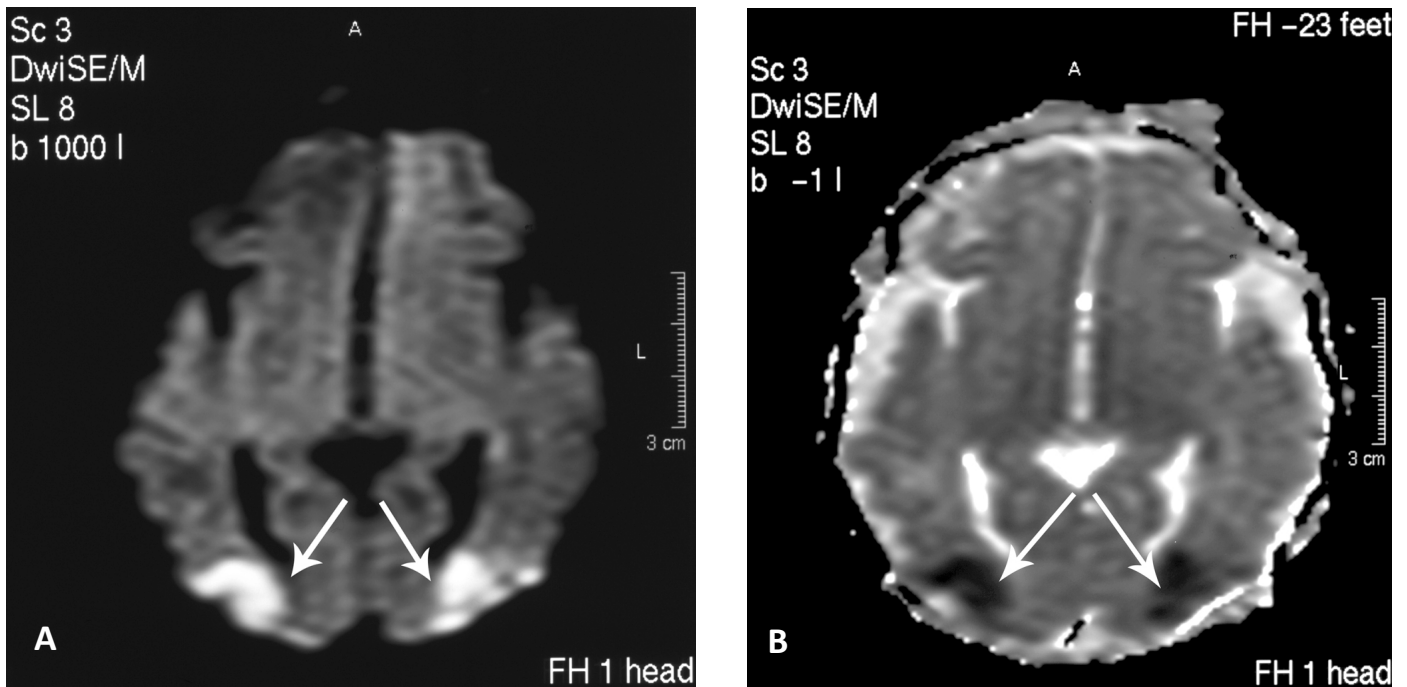
Effet T2 (T2 shine through effect)

Si l'on conserve à l'esprit qu'une séquence de diffusion correspond au départ à une séquence pondérée en T2 sensibilisée à la diffusion par l'application de gradients de diffusion, on saisit davantage l'intrication de ces deux séquences dans l'interprétation des images. Le signal obtenu en séquence de diffusion dépend de deux facteurs principaux : le degré d'intensité en pondération T2, et le degré de diffusion. Ainsi, un allongement du T2 peut se traduire par un hypersignal en séquence de diffusion tandis qu'il n'existe pas de modification de la diffusion : c'est l'effet T2 appelé « T2 shine-through effect ». Cet effet T2 peut aussi se traduire par un hyposignal sur la séquence de diffusion (T2 dark-through effect). Il existe enfin un effet dit « T2 wash-out » qui correspond au fait qu'une lésion peut apparaître isointense en diffusion alors que la diffusion est modifiée. Cette situation s'assimile à une pondération entre la composante hyperintense de l'effet T2 et la chute du signal en rapport avec une majoration de la diffusion. Ces situations rappellent la nécessité de s'affranchir de l'effet T2 en réalisant des cartographies d'ADC. L'image de diffusion (trace) peut permettre le repérage d'anomalies dont les interprétations doivent s'effectuer à la lumière des cartographies d'ADC.

Figure 4 Imagerie de diffusion.

4A : sur l'image de trace, les hyperintensités (flèches blanches) témoignent de la probable restriction de la diffusion de l'eau dans ces régions en relation avec l'existence d'un œdème cytotoxique.

4B : sur la cartographie d'ADC, les signaux apparaissent dans les mêmes régions comme des hypointensités (flèches blanches) témoignant de la valeur abaissée de l'ADC dans ces territoires.



Maturation cérébrale

On note une modification des images de diffusion pendant la première année de vie (Forbes et al., 2002). La valeur de l'ADC chez le nouveau-né est plus élevée que chez l'adulte car la composante hydrique du cerveau du nouveau-né est plus importante. La diminution progressive de l'ADC dans le cerveau des enfants témoigne de la maturation cérébrale normale mais les mécanismes restent complexes. L'anisotropie est plus faible compte tenu de l'importance des zones non myélinisées. Il est donc fondamental d'interpréter les résultats de la diffusion en fonction des cartes d'ADC, elles-mêmes établies en fonction de l'âge de l'enfant. L'ADC diminue d'un tiers à la moitié sur la première année (Forbes et al., 2002).

IRM de diffusion et souffrance néonatale HI

L'IRM de diffusion permet la détection précoce de lésions avant l'existence d'anomalies sur les séquences conventionnelles (Liu et al., 2001; Ment et al., 2002; Wolf et al., 2001). Sur les images de trace, les lésions apparaissent avec un hypersignal relatif (baisse de l'ADC) et sont

parfois plus étendues que celles observées sur les séquences traditionnelles (Chateil, 1999). Il existe une correspondance entre l'imagerie de diffusion et les résultats histopathologiques ou le devenir des images IRM. Il a été observé une bonne corrélation entre l'imagerie de diffusion et les lésions d'œdème cytotoxique et de dommage neuronal chez les enfants qui décèdent. Les contrôles ultérieurs chez les survivants montrent des lésions kystiques moins étendues que ne le laissent supposer les lésions initiales en diffusion. En termes de pronostic, l'imagerie par diffusion est pertinente. Elle permet de repérer des lésions plus précoces non vues sur les séquences standards ainsi que les atteintes bilatérales des NGC, des thalami et les atteintes étendues diffuses multifocales corticales (Roelants-Van Rijn et al., 2001a). Ces dernières sont assorties d'un pronostic beaucoup plus mauvais que les atteintes focales corticales. Les images réalisées dans les 4 premiers jours de vie chez les enfants à terme semblent être les plus performantes (Takeoka et al., 2002). L'imagerie de diffusion permet en outre d'obtenir des données quantitatives (ADC) qui sont également intéressantes en terme de pronostic dans les souffrances asphyxiques périnatales. De nombreux auteurs ont depuis les travaux de Wolf montré l'intérêt de réaliser cette mesure pour mieux définir la gravité de la souffrance néonatale (Barkovich et al., 2006; Hunt et al., 2004; Liauw et al., 2009; Vermeulen et al., 2008). Hunt (Hunt et al., 2004) chez 28 nouveau-nés avec EHI a montré que la valeur de l'ADC au niveau des bras postérieurs des capsules internes étaient statistiquement plus élevée chez les survivants que chez ceux qui décèdent. Barkovich (10 nouveau-nés HI) (Barkovich et al., 2006) et Wolf (13 nouveau-nés HI) (Wolf et al., 2001) rapportent dans leurs séries respectives une très forte réduction (jusqu'à 60 % par rapport aux sujets contrôles) de la diffusion de l'eau au niveau des faisceaux cortico-spinaux et des thalami chez les patients asphyxiques. Vermeulen (Vermeulen et al., 2008) rapporte l'intérêt pronostique à deux ans de la mesure précoce de l'ADC en particulier au niveau des bras postérieurs des capsules internes chez les nouveau-nés HI. Il suggère qu'une valeur d'ADC inférieure à $0,85 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ à ce niveau est associée à un mauvais développement neurologique. L'intérêt de la mesure de l'ADC est renforcé par l'étude de Liauw (Liauw et al., 2009) chez 24 nouveau-nés avec HI qui montre une possible altération de ce marqueur au niveau des NGC et du tronc cérébral sans anomalie visible de l'IRM conventionnelle y compris de l'image de trace en séquence de diffusion.

D'autres régions cérébrales, comme les pédoncules cérébraux, ont été explorées en IRM de diffusion. Groenendaal (Groenendaal et al., 2006) s'est intéressé à la dégénérescence préwallérienne au niveau des pédoncules cérébraux chez 39 nouveau-nés à terme ou proche du

terme en condition d'HI et a montré la forte valeur prédictive positive de l'association d'un hypersignal en IRM de diffusion à la fois sur les bras postérieurs des capsules internes et les pédoncules cérébraux et le retard du développement neurologique. Quatorze des 15 enfants de cette série qui présentaient une dégénérescence préwallérienne avaient une altération du devenir neurologique. Plus récemment, Domi (Domi et al., 2009) a retrouvé chez 14 nouveau-nés présentant un AVC ischémique cortical, un examen neurologique normal à un an chez tous ceux qui n'avaient pas d'anomalie au niveau des faisceaux cortico-spinaux descendants en IRM de diffusion dans le tronc cérébral.

Les limites

Il est complexe de comparer qualitativement les séquences standard et les séquences de diffusion qui ont la double polarité qualitative et quantitative (Coskun et al., 2001). L'interprétation des modifications de la valeur de l'ADC dans les EHI peut être difficile compte tenu de sa variabilité physiologique dans la 1^{ère} année de vie. Par ailleurs la sensibilité de cet examen peut être modifiée par la distribution des lésions cérébrales dans la souffrance HI du nouveau-né. L'exploration de la SG profonde par la diffusion peut donner des faux négatifs (jusqu'à 50 %) (Forbes et al., 2000). Enfin, si l'imagerie de diffusion permet une appréciation qualitative directe, le calcul de l'ADC peut s'avérer fastidieux ; c'est une raison pour laquelle il peut être difficile de l'utiliser en pratique courante et en faire un outil pronostique simple d'utilisation. Les cartes d'ADC, pallient en partie à cette difficulté. Enfin, l'IRM de diffusion trop précoce (avant J1) ou après J8 sont moins sensibles (Ment et al., 2002).

Plusieurs auteurs ont proposé un score basé sur l'analyse de l'imagerie conventionnelle et de diffusion (Brissaud et al., 2005; Liauw et al., 2008). Ces scores sont intéressants car corrélés au devenir neurologique des patients, au moins précoce (J8) (Brissaud et al AJNR 2009 in press).

2.2.4.3. La Spectroscopie par Résonance Magnétique (SRM)

Aspects théoriques et expérimentation animale

La SRM est utilisée depuis plus de 40 ans dans l'analyse biochimique. La SRM utilise les propriétés intrinsèques de différents noyaux d'atomes (^1H , ^{31}P , ^{19}F , ^{13}C) qui ont un nombre de spin non nul et un moment magnétique (Huppi and Barnes, 1997). La fréquence de résonance de chaque noyau de chaque molécule est différente selon son environnement et la densité d'électrons qui l'entoure (shift chimique) ; elle est exprimée en Hz, dépendant de

l'intensité du champ B_0 , ou en ppm (partie par million). L'analyse de l'aire sous la courbe de chaque pic du spectre obtenu permet de calculer la concentration relative de chaque métabolite dans l'échantillon. L'application *in vivo*, plus récente, permet une exploration métabolique d'un volume donné (voxel) sélectionné dans le parenchyme cérébral. Chez le nouveau-né à terme, le voxel est centré sur les NGC compte tenu de la sensibilité de cette zone à l'HI. Les atomes les plus employés dans les études *in vivo* sont le phosphore et surtout le proton. La SRM du phosphore permet de visualiser les composés phosphorylés et assure une approche « énergétique » (Cady et al., 1983). Avec la SRM du proton, du fait de la grande quantité et l'ubiquité de cet atome dans le parenchyme cérébral, on peut visualiser de nombreux métabolites en fonction des paramètres d'acquisition : N-acetyl-aspartate (NAA), Créatine + phosphocréatine (Cr), Choline (Cho) et Lactate (Lac) pour des TE longs, Myoinositol (mi), Glutamine (Gln), Glutamate (Glu), Taurine (Tau), Scylloinositol (scy-ino) et les lipides pour des TE courts (Barantin et al., 1995). *In vivo*, les principes de localisation des spectres se font par les méthodes STEAM et PRESS pour le proton. Ces séquences permettent de recueillir le signal d'un volume donné à partir de 3 impulsions de radiofréquence, par la sélection de 3 plans dont l'intersection correspond au voxel utilisé (Chateil, 1999). L'élimination du signal de l'eau est couplée à ces techniques d'acquisition (Barantin et al., 1995). L'analyse en spectroscopie peut se faire soit à l'aide d'une mesure localisée (un seul voxel qui englobe l'ensemble de la structure à explorée) soit à l'aide d'une mesure multivoxels (Chemical Shift Imaging : CSI), l'opérateur choisissant au sein des différents voxels explorés celui ou ceux qui l'intéressent (figure 5, page 41).

Les études expérimentales d'ischémie chez l'animal ont concerné essentiellement les rats, les porcelets et les lapins. Les premières expériences de Cady consistaient à réaliser une occlusion bilatérale des carotides chez le porcelet en atmosphère appauvrie en oxygène et à mesurer le métabolisme énergétique cérébral (SRM du phosphore) (Cady et al., 1983). Ces études montraient une baisse initiale du taux d'ATP à la phase initiale. Ce taux revenait à la normale dans les 48 heures qui suivaient la remise en condition normoxique. Secondairement Cady observait une chute énergétique traduite par une diminution du rapport Phosphocréatine (PCr)/Phosphore inorganique (Pi) et du taux d'ATP. Cette chute énergétique secondaire était proportionnelle à l'importance de la souffrance initiale. Des études en SRM du proton ont confirmé ces données avec une augmentation initiale du taux de lactate et une diminution du rapport NAA/Cr. Le taux de lactate ne revient pas tout à fait à la normale et augmente de

nouveau lors de la chute énergétique secondaire (Cady et al., 1994). Le glutamate pourrait également être un marqueur pertinent : chez l'animal (cochon d'inde) en condition normale seulement 70 à 80 % du Glx total intracérébral est repéré avec un temps d'écho long ; les 20 ou 30 % qui restent sont intracellulaires ou intramitochondriaux. Lors d'une atteinte cérébrale hypoxique, ce Glx est libéré et devient détectable (Pu et al., 2000).

Résultats chez le sujet sain

Les études in vivo chez le nouveau-né humain sain ont permis de caractériser les différents pics de métabolites en SRM du proton. Le tableau 4 résume la spécificité de ces différents métabolites.

Tableau 4 : Spécificité cérébrale des différents métabolites mesurés en SRM

METABOLITE	SPECIFICITE CEREBRALE
Myoinositol	Glie
Choline	Synthèse et dégradation de la myéline
Créatine	Ubiquitaire, métabolisme énergétique
N-Acétyl-aspartate	Neurones, oligodendrocytes
Lactate	Glycolyse anaérobie (souffrance neuronale) mais aussi de façon physiologique chez le prématuré

SRM et souffrance néonatale HI: données sur les différents métabolites

Les études in vivo chez le nouveau-né ayant présenté une souffrance HI périnatale sont nombreuses. Les résultats sont appréciés, sur un spectre, par la mesure des aires sous la courbe des différents métabolites et donnés sous forme de ratios (Lac/Cr, Lac/Cho, NAA/Cho...). Le métabolite dénominateur est le plus souvent la créatine car selon Cady (Cady et al., 1997) sa concentration est considérée comme stable après une HI. La mesure de la valeur absolue de la concentration du métabolite dans la zone observée est aujourd'hui possible (en mmol/L) ouvrant la perspective de définir un seuil en fonction de l'évolution du patient (Boichot et al., 2006) et est parfois préférée par certains auteurs discutant de la stabilité de la créatine (Cheong et al., 2006).

Le lactate : chez le nouveau-né ayant présenté une HI périnatale, le rapport Lac/Cr est augmenté (Chateil, 1999; Huppi and Barnes, 1997; Malik et al., 2002; Robertson et al., 2000) et sa valeur élevée dans les 18 premières heures est corrélée à un mauvais développement psychomoteur à 1 an (Huppi and Barnes, 1997). D'autres auteurs ont montré une élévation du rapport Lac/Cho dans les NGC à la phase aiguë dans les premiers jours de vie (Barkovich et al., 1999). Une étude récente sur 16 nouveau-nés ayant présenté une HI néonatale (10 contrôles) rapporte également une augmentation statistiquement significative des ratios du lactate dans les thalami dans cette population comparée aux contrôles (Cheong et al., 2006). Les recommandations récentes Nord-Américaines précisent qu'un ratio lactate/créatine >1 dans les 18 premières heures de vie au niveau des NGC en CSI est plus souvent retrouvé chez des nouveau-nés présentant une EHI que chez les témoins (Ment et al., 2002).

Le NAA : les valeurs du NAA/Cho ou NAA/Cr sont abaissés dans l'asphyxie périnatale mais ces ratios semblent avoir un intérêt au-delà des premiers jours de vie (Barkovich et al., 1999; Cheong et al., 2006; Robertson et al., 2000). Il existe une corrélation entre la baisse de ces ratios mesurés à 8 ou 15 jours de vie et le devenir neurologique ultérieur, corrélation qui n'existe pas si ces ratios sont calculés dans les 8 premiers jours de vie (Huppi and Barnes, 1997). Boichot et al ont montré que les nouveau-nés présentant, dans les NGC, une concentration de NAA inférieure à 4 mmol/L sur une SRM réalisée entre le deuxième et le douzième jour de vie, avait une évolution neurologique mauvaise avec une sensibilité de 94% et une spécificité de 93% (Boichot et al., 2006).

Le complexe Glx : parmi les métabolites cérébraux le glutamate occupe, de part son rôle physiopathologique dans la souffrance neuronale, une place intéressante en SRM. Habituellement, les auteurs mesurent le Glx (double pic glutamate + glutamine) et non le glutamate seul. Groenendaal (Groenendaal et al., 2001) a mesuré le Glx avec des temps d'écho courts chez des enfants nouveau-nés ayant présenté une HI périnatale. Les rapports Glx/NAA et Glx/Cho sont significativement plus élevés chez les enfants ayant un Sarnat plus élevé. Pu (Pu et al., 2000) et Malik (Malik et al., 2002) avec des temps d'écho longs, ont montré une majoration de la détection de l'alpha glutamate/glutamine chez les nouveau-nés à terme avec une anoxo-ischémie avec respectivement une corrélation avec la classification de Sarnat et le développement neurologique à 2 ans. D'autres auteurs enfin ont simplement constaté que le pic de Glx était plus fréquemment retrouvé chez les enfants ayant présenté une asphyxie périnatale que chez des sujets contrôles (Fan et al., 2003). Une étude récente chez 46

nouveau-nés ayant présenté une souffrance HI périnatale a permis de mettre en évidence que la valeur du ratio Glx/Cr au niveau des NGC et des thalami était un meilleur marqueur du développement neurologique de ces patients que celle du ratio Lac/Cr (Zhu et al., 2008).

Le myoinositol : sa valeur est augmentée à la phase aiguë d'une HI périnatale (Huppi and Barnes, 1997; Robertson et al., 2001).

Influence du temps d'écho sur la détection et la quantification des métabolites

La corrélation des différents rapports des métabolites avec le devenir neurologique peut être lié au choix du temps d'écho des SRM (Roelants-Van Rijn et al., 2001b). Lorsque TE est long (> 200 ms), un grand nombre de métabolites est invisible car les aimantations correspondantes ne sont plus dans le plan transversal du fait de la relaxation T2. Le spectre du proton se limite alors aux résonances du groupement CH3 du NAA, de la choline et de la Cr. Le doublet du lactate peut également être repéré mais il est nécessaire pour l'observer de choisir un temps d'écho dont la valeur élimine la modulation par le couplage spin-spin ; c'est pourquoi les spectres sont souvent obtenus avec des TE de 135 ms ou 270 ms. Lorsque le temps d'Echo est court (TE = 30 ms), le nombre des métabolites visualisés est beaucoup plus important. Les raies des lipides (CH2, CH3), de la taurine (Tan), du myoinositol (mi) et de l'ensemble glutamate/glutamine (Glx), deviennent également mesurables (Barantin et al., 1995). Selon Van Roelants (Roelants-Van Rijn et al., 2001b), les SRM faites à des temps d'écho plus longs (136 et 272 ms) concernant les rapports NAA/Cho et Lac/NAA sont plus prédictives que celles réalisées à 31 ms (rapports Glx/NAA, Glx/Cho, Myol/NAA et Myol/Cho). Notons cependant que cette dernière étude a été réalisée en moyenne à 8 jours de vie donc tardivement pour apprécier des métabolites comme le glutamate dont l'implication physiopathologique dans les phénomènes anoxo-ischémiques est très précoce.

Les limites

Il existe des faux positifs avec des enfants ayant des ratios élevés concernant le lactate et/ou ceux ayant un NAA abaissé mais avec un développement neurologique normal à un an. Il existe également des faux négatifs avec des enfants ayant des ratios concernant le lactate normaux mais un développement neurologique très altéré (atteinte anténatale ?). Il convient alors de bien observer les valeurs du NAA. Enfin il existe des enfants qui ont des ratios du lactate élevés, un examen neurologique à 3 mois pathologique et un examen neurologique à un 1

normal (notion de plasticité cérébrale ?) (Barkovich et al., 1999). D'autre part, les enfants prématurés ont un rapport Lac/Cr augmenté (présence en petite quantité physiologique de lactate) et NAA/Cr diminué de manière physiologique (faible quantité de NAA) (Barkovich et al., 1999).

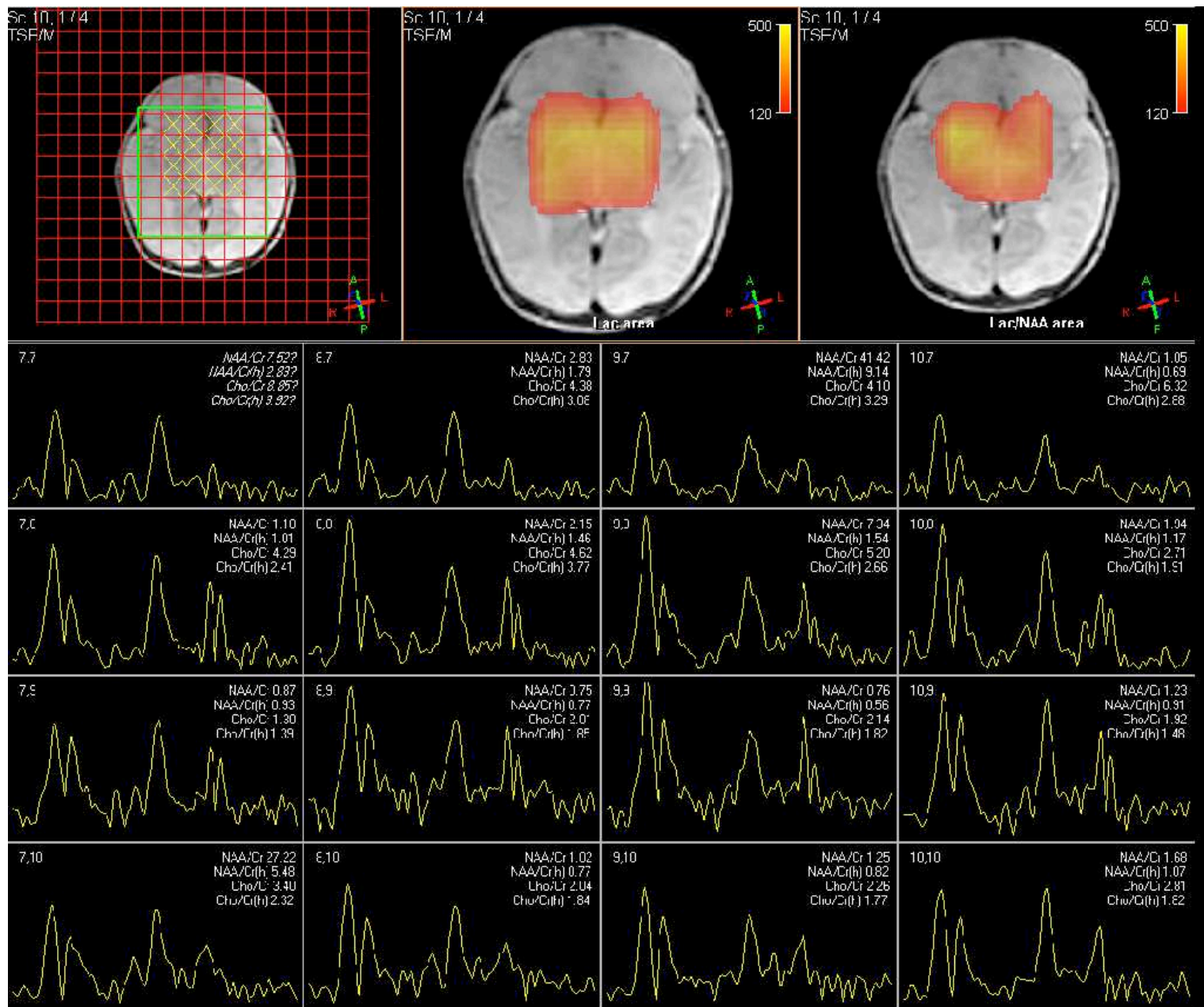


Figure 5: Exploration en Spectroscopie par Résonance Magnétique séquence Chemical Shift Imaging (CSI). Les croix jaunes sur la grille de CSI correspondent aux voxels explorés. Les spectres de chacun des voxels est reporté en dessous. Le calcul automatisé de certains ratios est noté en haut et à droite de chaque spectre. La visualisation des spectres, le post-traitement et les calculs des aires sous la courbe des spectres sont directement accessibles au niveau de la station de travail de l'IRM.

2.2.4.4. *Imagerie des tenseurs de diffusion (Diffusion Tensor Imaging DTI)*

Aspects théoriques et expérimentation animale

Aspects théoriques (Habas, 2004; Le Bihan et al., 2001; Mori and Zhang, 2006; Oppenheim et al., 2007; Oppenheim et al., 2004 ; Pierpaoli and Basser, 1996)

L'IRM des tenseurs de diffusion (Diffusion Tensor magnetic resonance Imaging : DTI) et la tractographie (fiber tractography : FT) explorent la restriction de diffusion de l'eau (ADC) et la direction préférentielle de cette dernière (le plus souvent représentée par la Fraction d'Anisotropie : FA) qui permet d'étudier l'organisation, l'orientation et l'intégrité des faisceaux de la SB.

La mesure de l'ADC selon 3 directions de l'espace (principe de la diffusion conventionnelle) renseigne sur la nature et le degré des processus pathologiques atteignant le système nerveux central (SNC) lorsque les structures cellulaires sont endommagées ou rompues. Comme nous l'avons vu plus haut, l'équation $S=S_0.e^{-b \cdot adc}$ suffit pour décrire les propriétés de diffusion d'un milieu à condition qu'il soit isotrope, (mouvements de diffusion identiques dans toutes les directions de l'espace). L'anisotropie correspond au fait qu'en réalité, les contraintes imposées aux molécules d'eau dans les tissus (ex : fibres myélinisées dans la SB), leur impose une direction préférentielle. La diffusion est un phénomène tridimensionnel et le déplacement des molécules n'est donc habituellement pas identique dans toutes les directions de l'espace (les molécules d'eau se déplacent plus lentement perpendiculairement aux axones que parallèlement aux fibres myélinisées par exemple). La mesure d'un seul ADC ne peut donc pas suffire à appréhender la diffusion anisotrope. Elle peut se représenter en chaque voxel par un ellipsoïde. Un voxel parfaitement isotrope sera représenté par une sphère (figure 6, situation A). En revanche, la forme de l'ellipsoïde sera d'autant plus éloignée d'une sphère que le voxel est anisotrope (figure 6, situation B).

Pour appréhender l'amplitude (ADC) et la direction des mouvements de diffusion pour en déduire une information sur la direction des faisceaux de SB, il est nécessaire d'utiliser un outil mathématique qui décrit les propriétés de diffusion d'un volume : le tenseur de diffusion.

Pour étudier le caractère anisotrope de la diffusion de la SB, il faut appréhender les paramètres de l'ellipsoïde par l'analyse des tenseurs de diffusion. Dans un milieu anisotrope, le coefficient de diffusion est remplacé par le tenseur de diffusion: D. Il se définit selon la matrice 3 x 3 suivante :

$$[D] = \begin{pmatrix} D_{xx} & D_{xy} & D_{xz} \\ D_{yx} & D_{yy} & D_{yz} \\ D_{zx} & D_{zy} & D_{zz} \end{pmatrix}$$

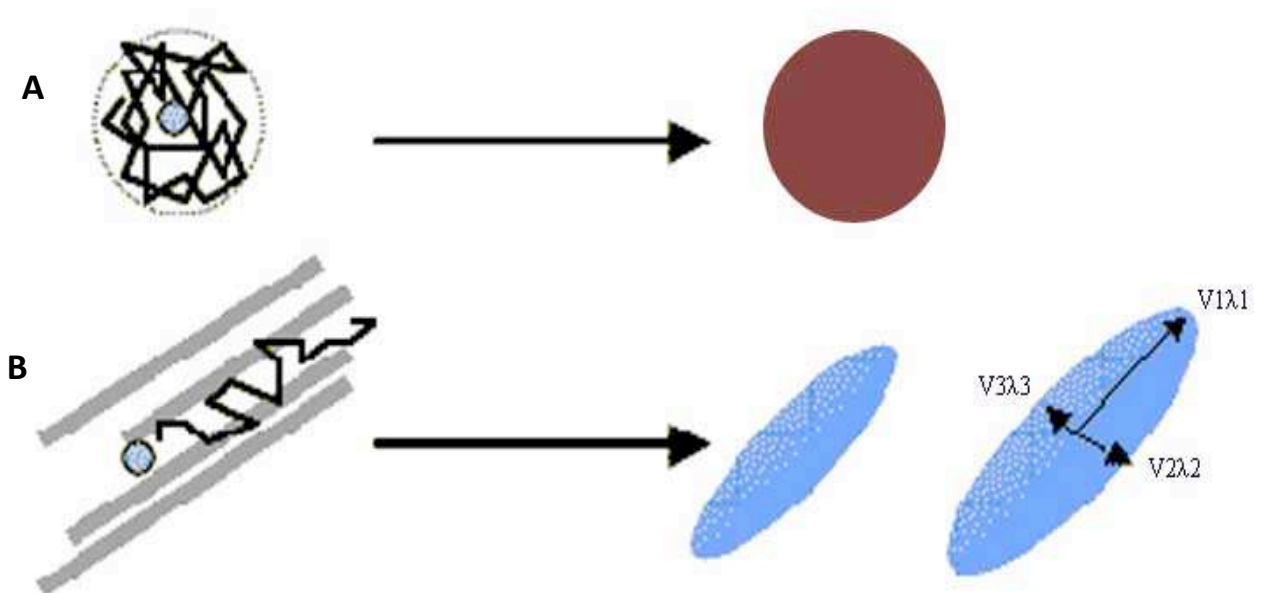
où D_{xx} , D_{yy} et D_{zz} correspondent aux coefficients de diffusion dans les directions principales x, y et z. La matrice est symétrique ($D_{xy} = D_{yx}$, $D_{zx} = D_{xz}$ et $D_{zy} = D_{yz}$). Cette symétrie permet de n'appliquer au minimum les gradients de diffusion que dans 6 directions non colinéaires pour déterminer le tenseur de diffusion. Cependant, l'échantillonnage du signal dans un plus grand nombre de directions (12, 16 directions) permettra une mesure plus précise des mouvements de diffusion dans l'espace, c'est-à-dire un calcul plus précis du tenseur de diffusion. Les mesures étant réalisées dans le référentiel x, y, z de l'IRM, il faut ensuite effectuer un changement de repère pour se placer dans le référentiel du tissu (diagonalisation de la matrice). On obtient alors la direction des vecteurs propres V1, V2, V3 ainsi que leur amplitude, λ_1 , λ_2 , λ_3 (figure 7). Ces paramètres définissent les caractères physiques de l'ellipsoïde, représentation de la diffusion anisotrope. Le vecteur V1 indique la direction principale des mouvements de diffusion. Une diagonalisation permet de passer du système défini par les 6 axes de mesure vers un système défini par les trois vecteurs propres (donnant la direction des trois axes principaux) et les trois valeurs propres (donnant le coefficient de diffusion le long de ces trois axes) de l'ellipsoïde.

La trace du tenseur correspond à la moyenne des valeurs propres. La fraction d'anisotropie (FA) est le paramètre le plus couramment utilisé et le plus représentatif de l'anisotropie. Elle est définie comme le rapport de la composante anisotrope du tenseur de diffusion sur le tenseur de diffusion global. Sa valeur répond à la formule suivante (Pierpaoli and Basser, 1996):

$$FA = \sqrt{\frac{1}{2} \frac{\sqrt{((\lambda_1 - \lambda_2)^2 + (\lambda_2 - \lambda_3)^2 + (\lambda_3 - \lambda_1)^2)}}{\sqrt{\lambda_1^2 + \lambda_2^2 + \lambda_3^2}}}$$

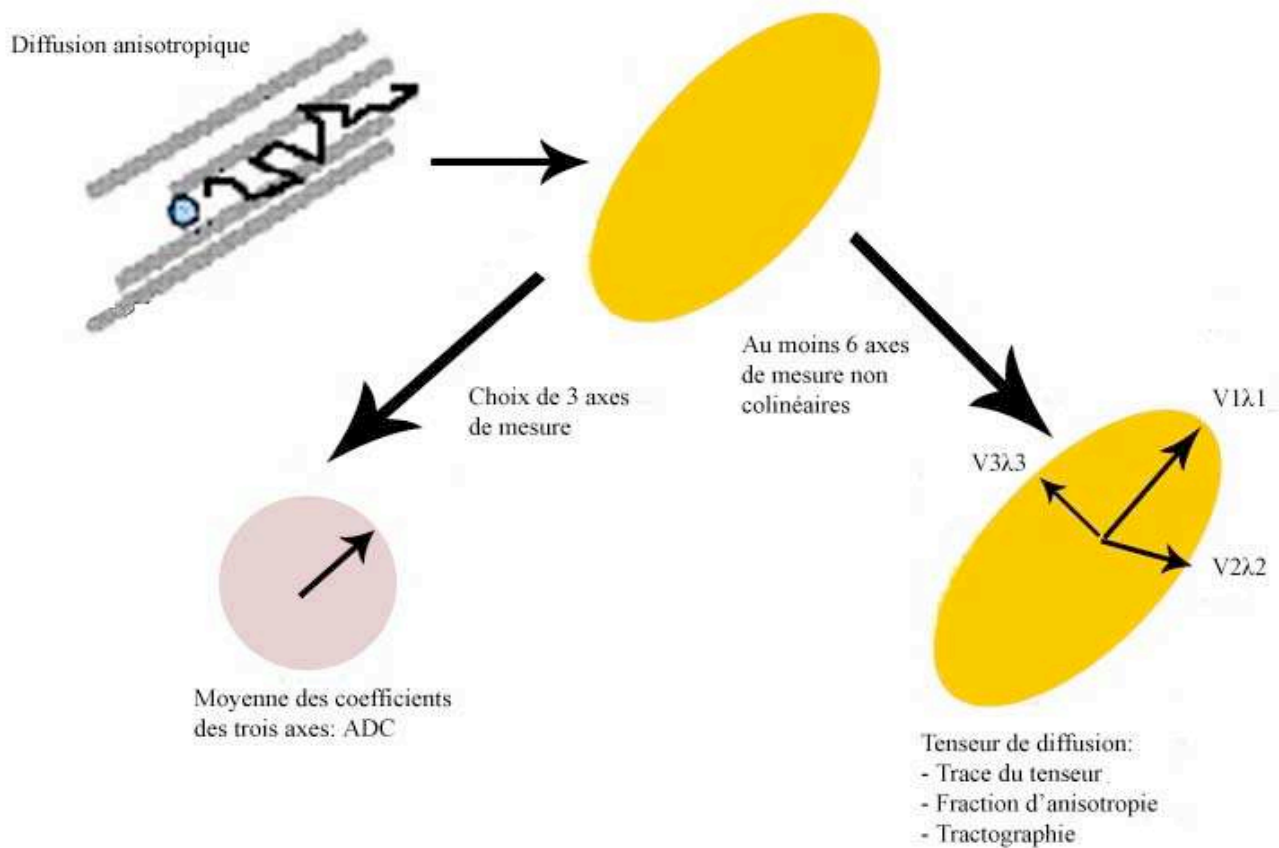
La valeur de la FA est comprise entre 0 et 1. Plus la diffusion est anisotrope, plus la FA est proche de 1. La valeur de la FA n'est pas influencée par le choix des valeurs de b . Une anisotropie égale à 1 signifie que le tissu a une structure à orientation unique. En revanche, une anisotropie égale à 0 correspond à un manque total d'orientation (tissu isotrope comme le LCS). Les cartes 2D d'anisotropie représentent une image paramétrique de la valeur de l'anisotropie en chacun des voxels. En chaque voxel, la direction principale peut être codée en échelle dite Rouge/Vert/bleu avec la brillance des couleurs modulée par les valeurs de FA (plus le voxel est brillant, plus il est anisotrope) (figure 8). Par convention donc les faisceaux cranio-caudaux ou caudo-crâniens sont bleus, les faisceaux latéro-latéraux sont en rouge et les faisceaux antéropostérieurs ou postéro-antérieurs sont en verts.

Figure 6: principe de la diffusion de l'eau dans le cerveau



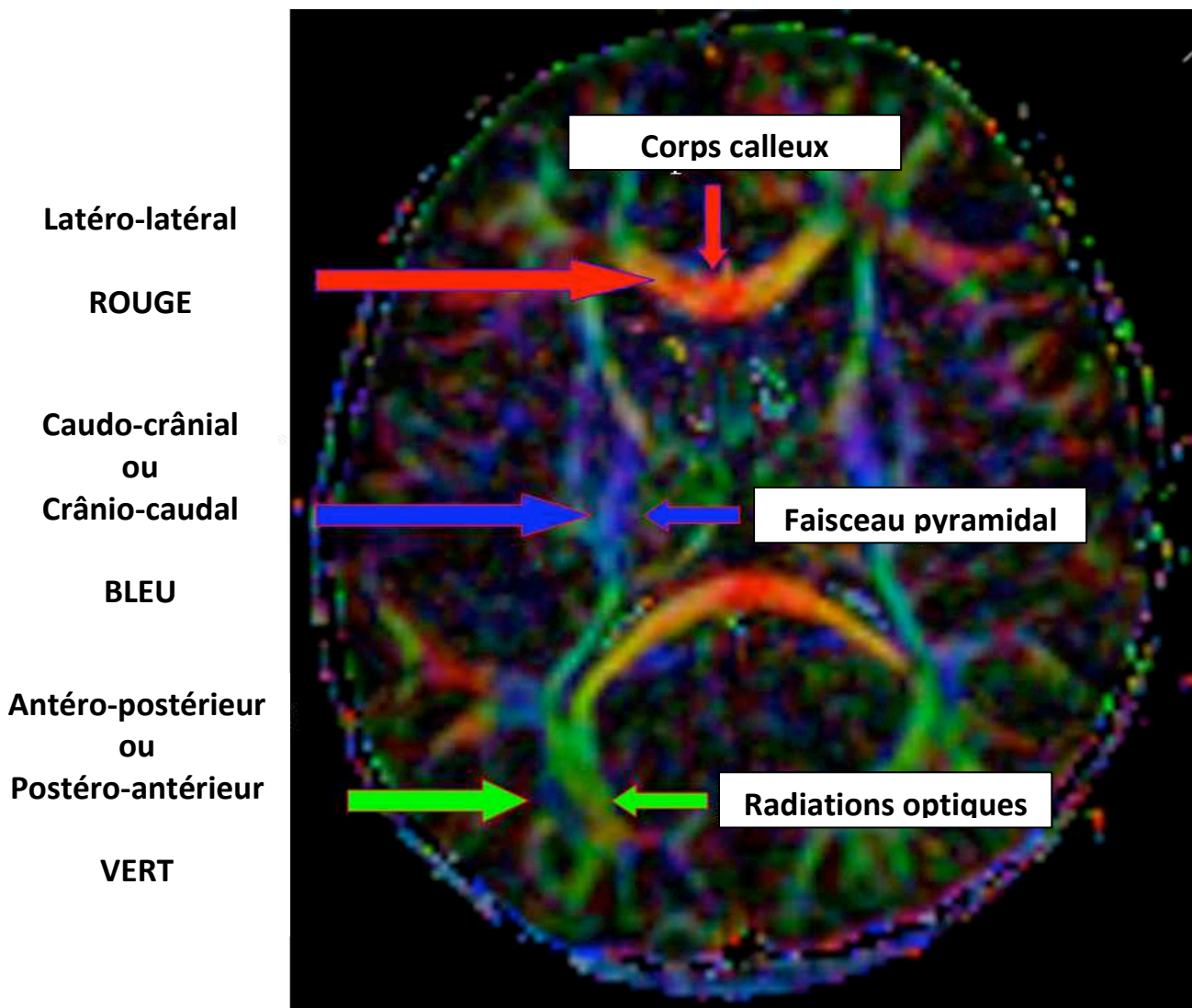
- Dans l'eau libre, la diffusion est isotrope, identique dans toutes les directions de l'espace; quel que soit l'axe de mesure choisi, le coefficient de diffusion (ADC) est constant (situation A)
- Dans la substance Blanche (situation B), les membranes cellulaires, la myéline limitent la diffusion perpendiculairement aux fibres et la facilitent le long des fibres : la diffusion est anisotrope, en forme d'ellipsoïde défini par 3 vecteurs propres (V_1 , V_2 et V_3 de direction des 3 axes de l'ellipsoïde) et 3 valeurs propres (λ_1 , λ_2 et λ_3 , coefficients de diffusion le long des 3 axes de l'ellipsoïde)

Figure 7 : Représentation ellipsoïdale de la diffusion de l'eau. Condition d'obtention de la mesure de l'ADC (3 axes de mesure) et de la FA (6 axes de mesure non-colinéaires au moins).



Le choix du nombre d'axes de mesure détermine les paramètres mesurés ;
 L'utilisation de 3 axes de mesure permet de mesurer l'ADC sans artefact d'anisotropie ;
 L'utilisation d'au moins 6 axes permet de déterminer les paramètres du tenseur de diffusion et notamment l'axe de diffusion principal

Figure 8 : Image en 2 dimensions de la Fraction d'Anisotropie (avec codage couleur) selon la direction principale de la diffusion des mouvements de diffusion.



Expérimentation animale

Les modèles animaux ont le plus souvent fait appel aux rongeurs ou aux porcelets. L'intérêt d'associer à l'IRM conventionnelle (incluant l'Imagerie de Diffusion) et une imagerie apportant d'autres informations quantitatives comme la DTI a été montré dans les modèles animaux sains en développement et en condition d'HI (Huang et al., 2008; Sizonenko et al., 2007; Stone et al., 2008; Wang et al., 2008; Zhang et al., 2005; Zhang et al., 2006). La modification de l'organisation radiaire corticale cérébrale chez la souris au cours de la maturation a été bien mise en évidence par cette technique (Mori et al., 2001; Sizonenko et al., 2007). Huang (Huang et al., 2008) a montré dans le cerveau en développement du raton

à 0, 3, 7, 11 et 19 jours de vie, une diminution progressive des valeurs de FA dans le cortex au cours du temps (Huang et al., 2008). Il donne des valeurs normales de FA chez les animaux sains à 7 jours de vie entre 0,3 et 0,4. Munkeby (Munkeby et al., 2008) s'est intéressé à des marqueurs neuroradiologiques tels que l'ADC, la FA en DTI chez des porcs nouveau-nés. Il a mis en évidence au niveau des NGC des animaux, une diminution significative de l'ADC et une augmentation de la FA comparées aux valeurs avant l'agression. Récemment, Wang (Wang et al., 2008) a exploré les altérations de la SB dans un modèle d'HI néonatale de rongeur (Vannucci-Rice) et a montré l'intérêt des paramètres mesurés en DTI (FA, λ parallèle [$\lambda_{||}$] et λ perpendiculaire [λ_{\perp}]) dans la caractérisation des lésions le jour suivant l'agression tissulaire. Wang a précisé la traduction microstructurale des anomalies des paramètres mesurés, montrant en particulier que dans les lésions modérées, la FA était abaissée, $\lambda_{||}$ était inchangée et λ_{\perp} augmentée (réduction de la myélinisation en histopathologie) tandis que dans les lésions sévères et kystiques de la SB dans ce modèle FA, $\lambda_{||}$ et λ_{\perp} étaient abaissés (nécrose en histopathologie).

DTI et souffrance hypoxique-Ischémique néonatale

Dans les dernières années, les travaux dans le domaine de la DTI et la tractographie in vivo ont permis de mieux définir les séquences à utiliser chez l'humain, en particulier chez le nouveau-né et de définir des valeurs théoriques des paramètres explorés chez le sujet sain en fonction de leur localisation dans le tissu cérébral. De même, ces études ont identifié la mise en place de faisceaux de SB chez le sujet nouveau-né prématurés entre 28 et 40 semaines d'âge post-conceptionnel.

La diminution de la FA est habituelle dans les altérations tissulaire cérébrale (van Pul et al., 2005; Ward et al., 2006). Des valeurs normales et pathologiques selon les situations dans les structures cérébrales néonatales sont disponibles (Bartha et al., 2007; Cascio et al., 2007; Hermoye et al., 2006; Malik et al., 2006; Miller et al., 2007; Mukherjee et al., 2002; Rutherford et al., 2004; Ward et al., 2006). Bartha (Bartha et al., 2007) a exploré les valeurs de FA et d'ADC en DTI dans la SB (radiations optiques, faisceaux cortico-spinaux, SB occipitale et frontale) et la SG (NGC, thalami et cortex) chez 14 nouveau-nés à terme permettant ainsi d'obtenir des valeurs de référence. Certains auteurs suggèrent que les modifications précoces de la valeur de la FA pourraient constituer un facteur pronostique sur le devenir neurologique en particulier fonctionnel des nourrissons ayant présenté une

EHI (Malik et al., 2006). Ward (Ward et al., 2006), chez 20 nouveau-nés en condition d'EHI, a montré que la valeur de la FA restait basse alors que la valeur de l'ADC se pseudonormalisait. Ward précisait que la valeur de la FA ne diminuait pas systématiquement dans toutes les situations d'HI sévères mais dans toutes les situations d'HI modérées suggérant son intérêt discriminant (pseudonormalisation ADC, FA basse) dans ces dernières conditions en comparaison avec les HI sévères. Sotak (Sotak, 2002) chez l'adulte a montré qu'à la phase très aiguë de l'agression tissulaire cérébrale, la FA ne se modifiait au niveau de la SG tandis qu'elle était abaissée dans la SB.

Malik (Malik et al., 2006) a rapporté chez 17 nouveau-nés avec EHI modérée les modifications au cours du temps des valeurs de FA au niveau du bras antérieur de la capsule interne et de la SB périventriculaire. Il a montré une augmentation de cette dernière entre la première et la douzième semaine de vie. Des publications chez l'adulte rapportent des valeurs de FA en condition pathologique au niveau des pédoncules cérébraux. La diminution de la valeur de la FA au niveau des pédoncules cérébraux dans les 2 semaines qui suivent un AVC est associée à un déficit moteur objectivable trois mois plus tard, tandis qu'aucune anomalie n'a été visualisée à ce niveau au moment de l'imagerie initiale en séquence T1, T2 et sur les cartes d'ADC (Sidaros et al., 2008; Thomalla et al., 2004). Ces résultats suggèrent donc que cette région du SNC mérite d'être explorée particulièrement en DTI lors de situations pathologiques.

Limites

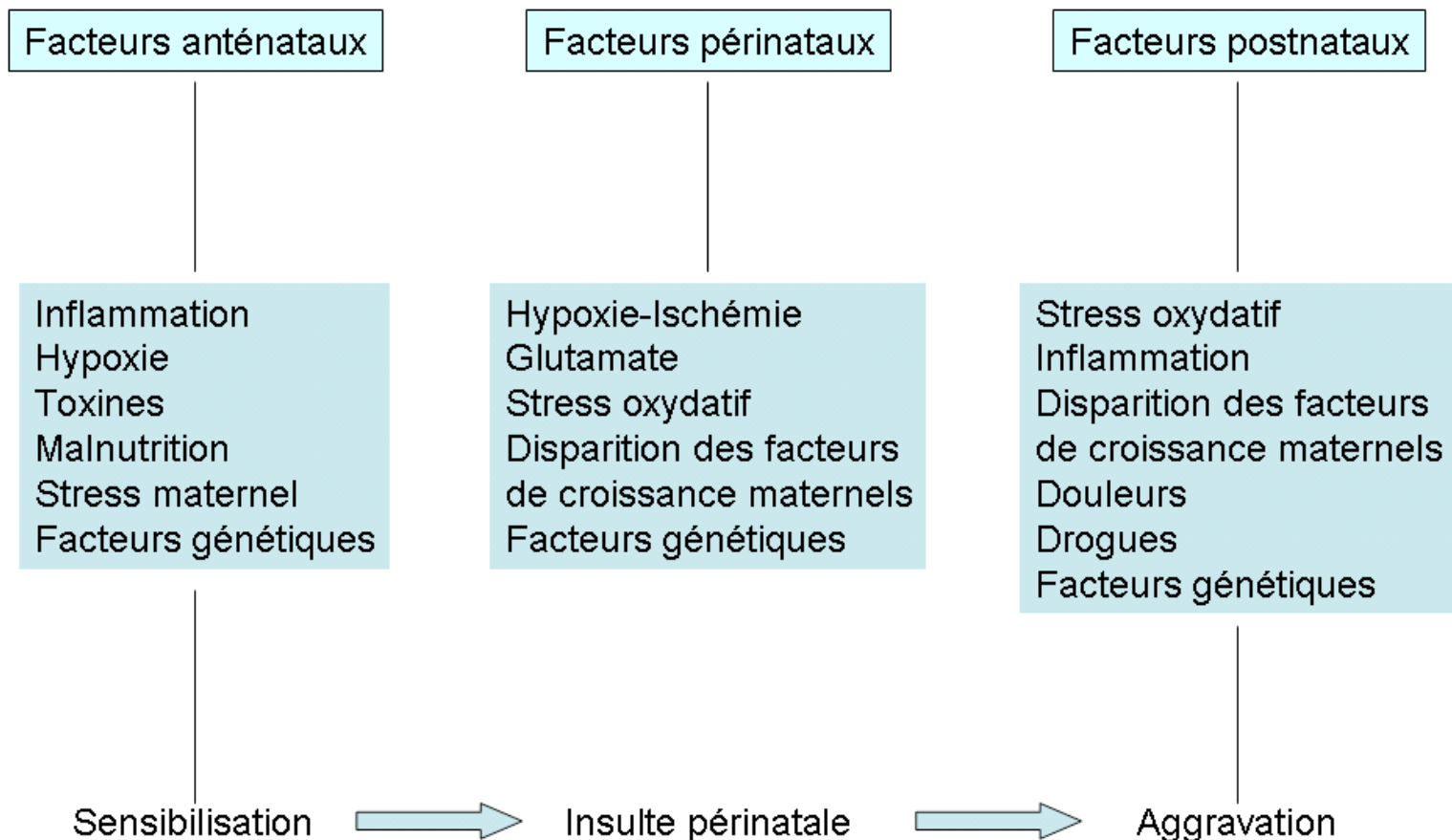
Les valeurs de FA et d'ADC permettent l'évaluation d'altérations microstructurales à la fois au niveau de la SB et de la SG (van Pul et al., 2005; Ward et al., 2006), mais renseignent peu sur les processus au niveau cellulaire.

III TRAITEMENT DE L'ASPHYXIE PERINATALE

1. CIBLES DU TRAITEMENT

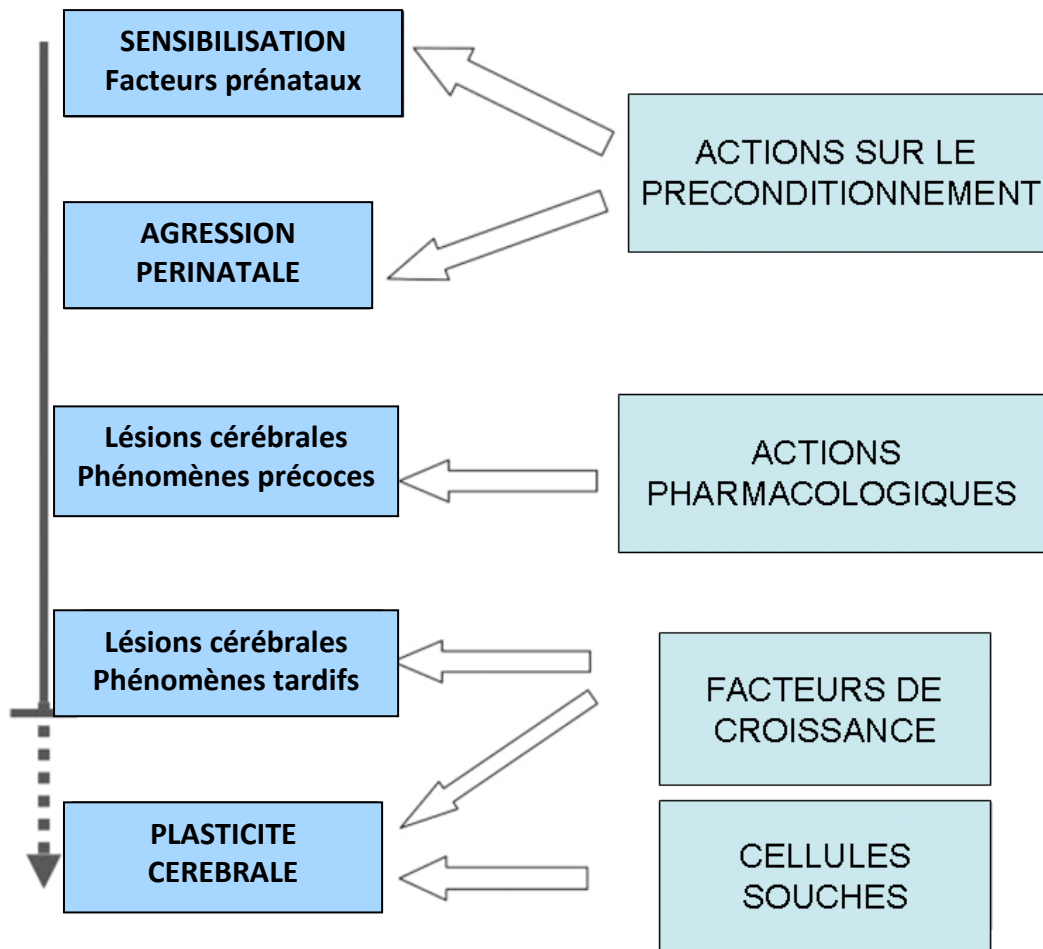
La genèse des lésions cérébrales en relation avec l'HI périnatale chez le nouveau-né est multifactorielle et comporte une répartition temporelle. Comme le montre la figure 9, des phénomènes anté-, per et post-nataux peuvent être à l'origine des anomalies observées dans le tissu cérébral. Le concept de sensibilisation anténatale aux lésions (par des phénomènes inflammatoires), situation physiopathologique faisant le lit d'une éventuelle altération cellulaire lors d'une agression tissulaire secondaire a éclairé d'un jour nouveau les stratégies de neuroprotection du cerveau du nouveau-né. Il en est de même lorsque l'on considère la possible implication de facteurs génétiques prédisposant aux situations de lésions cérébrales asphyxiques périnatales (Degos et al., 2008a; Degos et al., 2008b; Gonzalez and Ferriero, 2008).

Figure 9 : Aspects physiopathologiques anténataux, périnataux et postnataux de l'asphyxie du nouveau-né d'après (Degos et al., 2008a).



Le développement de thérapeutiques de neuroprotection nécessite donc d'affiner sans cesse les mécanismes physiopathologiques impliqués. La figure 10 schématise les cibles potentielles pour la neuroprotection.

Figure 10 : stratégies neuroprotectrices de l'asphyxie périnatale en fonction de cibles potentielles d'après (Degos et al., 2008a)



On peut ainsi schématiser les actions possibles en 9 points : l'inhibition de l'excitotoxicité, l'utilisation d'antioxydants, l'utilisation d'agents anti-inflammatoires, les agents anti-apoptotiques, le preconditionnement, les facteurs de croissance, la thérapie cellulaire, l'hypothermie, la combinaison de plusieurs actions neuroprotectrices.

2. LES THERAPEUTIQUES POSSIBLES

2.1. INHIBITEURS DE L'EXCITOTOXICITÉ

Il s'agit des antagonistes des récepteurs au glutamate (N-méthyl-D-aspartate : NMDA ; alpha-3-amino-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole propioninc acid : AMPA ; kaïnate). L'activation de ces récepteurs par le glutamate provoque une augmentation du calcium intracellulaire, une translocation de gènes proapoptotiques vers la mitochondrie, une augmentation du relargage de cytochrome c dans le cytosol, une activation des caspases-3, une formation de radicaux libres et une peroxydation des lipides (Gonzalez and Ferriero, 2008). Si des molécules comme MK-801, antagoniste non-compétitif des récepteurs NMDA provoquent la mort cellulaire chez le rat, interdisant son utilisation sur le cerveau en développement, d'autres molécules comme le topiramate (anticonvulsivant utilisé chez l'humain), bloquant les récepteurs AMPA et kaïnate, ont montré des effets protecteurs sur les préoligodendrocytes de souris contre l'excitotoxicité et l'HI (Sola et al., 2005). L'altération des préoligodendrocytes constitue une piste dans la genèse des lésions de leucomalacie périventriculaires chez le prématuré.

Le sulfate de magnésium est un inhibiteur des récepteurs NMDA. Son utilisation large depuis de nombreuses années pour la tocolyse des femmes enceintes, n'a pas montré d'effet délétère chez les nouveau-nés des mères traitées. Son efficacité dans la limitation des lésions de la SB chez l'animal a été montrée (Marret et al., 1995a). Un bénéfice au niveau de l'évaluation neurologique des nouveau-nés à l'âge de deux ans est noté dans une étude multicentrique chez des femmes enceintes à risque d'accoucher avant 30 semaines d'aménorrhée (Crowther et al., 2003). Une méta analyse récente (Doyle et al., 2009) rapporte un intérêt de traiter par sulfate de magnésium des femmes à risque d'accouchement prématuré avec en particulier une diminution des séquelles motrices graves chez les nouveau-nés.

D'autres molécules (memantine, antagoniste des récepteurs NMDA ; WIN 55,212-2, agoniste des récepteurs aux cannabinoïdes et limitant le relargage du glutamate) sont explorées sans qu'il existe d'études humaines pour l'instant.

2.2. ANTIOXYDANTS

2.2.1. Inhibition du nNOS ou iNOS (Degos et al., 2008a; Gonzalez and Ferriero, 2008; Perlman, 2006a, b)

Le NO joue un rôle dans les phénomènes de vasodilatation pulmonaire, systémique et cérébrale. Il est produit en réaction à l'augmentation du calcium intracellulaire soit par la nitric oxyde synthase endothéliale (eNOS) dans les cellules endothéliales, soit par la nitric oxyde synthase neuronale (nNOS) dans les astrocytes et les neurones. L'isoforme inductible de la nitric oxyde synthase (iNOS) permet la production de NO en réponse à un stress cellulaire.

Le NO, au contact de superoxyde, peut être converti en peroxynitrite (ONOO⁻) susceptible d'avoir une toxicité cellulaire directe (figure 11). Si le NO endothélial a un rôle potentiellement protecteur en participant au maintien de l'homéostasie circulatoire, le NO neuronal et le NO inductible apparaissent comme des molécules neurotoxiques provoquant la mort cellulaire. Ainsi l'inhibition sélective par un inhibiteur de nNOS et iNOS permet une neuroprotection chez le rat nouveau-né en condition d'HI. La même observation a été faite chez la souris modifiée pour l'expression du gène codant pour la nNOS (Gonzalez and Ferriero, 2008). Les régions cérébrales exprimant nNOS correspondent à celles exprimant les récepteurs au NMDA. Cependant les études cliniques ne montrent pas d'augmentation des lésions cérébrales chez les nouveau-nés prématurés exposés au NO. Certaines études montrent même une diminution des lésions de la SB et des hémorragies intraventriculaires avec un devenir neurologique amélioré (Kinsella et al., 2006; Schreiber et al., 2003).

Ainsi, le NO apparaît tour à tour neurotoxique et neuroprotecteur. Son action au niveau du système nerveux central mérite encore d'être précisée.

2.2.2. Mélatonine

Son effet protecteur à long terme après une HI ou un accident focal cérébral a été mis en évidence chez le raton et le rat adulte, de même que son effet protecteur sur les lésions de la SB périventriculaire chez la souris. Cette molécule présente l'avantage d'être déjà commercialisée et utilisable facilement dans des essais cliniques. Elle est classée selon les auteurs dans la catégorie des molécules agissant sur la plasticité (Degos et al., 2008a) ou protectrice contre la production des radicaux libres (Gonzalez and Ferriero, 2008).

2.2.3. Allopurinol

Des études chez l'animal ont montré que l'allopurinol, inhibiteur de la xanthine oxydase, et son produit métabolique l'oxypurinol pouvaient diminuer la formation de radicaux libres (hydroxyle), chélater le fer libre et limiter la peroxydation lipidique. Ces actions tendent à limiter ainsi la progression des lésions cérébrales d'HI. Il existe des données cliniques de l'utilisation de l'allopurinol : réduction des lésions de reperfusion chez les patients adultes coronariens pontés, diminution des effets indésirables postopératoires neurologiques et cardiaques chez les nourrissons opérés d'une hypoplasie du cœur gauche prétraités par allopurinol avant hypothermie profonde (Chaudhari and McGuire, 2008). Cependant des études contradictoires mettent en évidence le non-bénéfice en termes de morbidité et de mortalité (Benders et al., 2006) de l'utilisation de l'allopurinol dans le traitement de la souffrance HI du nouveau-né tout du moins en post-natal. Les recommandations de la Cochrane database en 2008 restent prudentes (Chaudhari and McGuire, 2008) et considèrent que les données disponibles ne suffisent pas pour conseiller l'utilisation de l'allopurinol dans les souffrances asphyxiques du nouveau-né. Ils proposent de réaliser des essais cliniques où l'allopurinol serait utilisé dans les EHI modérées à sévères en complément de l'hypothermie et dont l'évaluation porterait sur le devenir neurologique à long terme. Torrance et al ont montré le passage transplacentaire de l'allopurinol et l'oxypurinol chez les femme enceinte dont le fœtus présente une asphyxie et les auteurs ont également montré la diminution au sang du cordon et dans le plasma du bébé de la valeur du dosage de la protéine S-100B marqueur de la souffrance cérébrale (Torrance et al., 2009). Un essai clinique est actuellement en cours sur l'utilisation de l'allopurinol en anténatal chez les femmes enceintes dans le cas d'asphyxie fœtale (investigateur Dr Van Bel Utrecht, ClinicalTrials.gov Id. : NCT00189007) et dont l'objectif principal est l'évaluation de la production de radicaux libres chez le nouveau-né ainsi que la mesure des marqueurs biologiques de la souffrance HI cérébrale.

<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00189007?term=allopurinol+neonates&rank=1>).

2.2.4. Deferoxamine

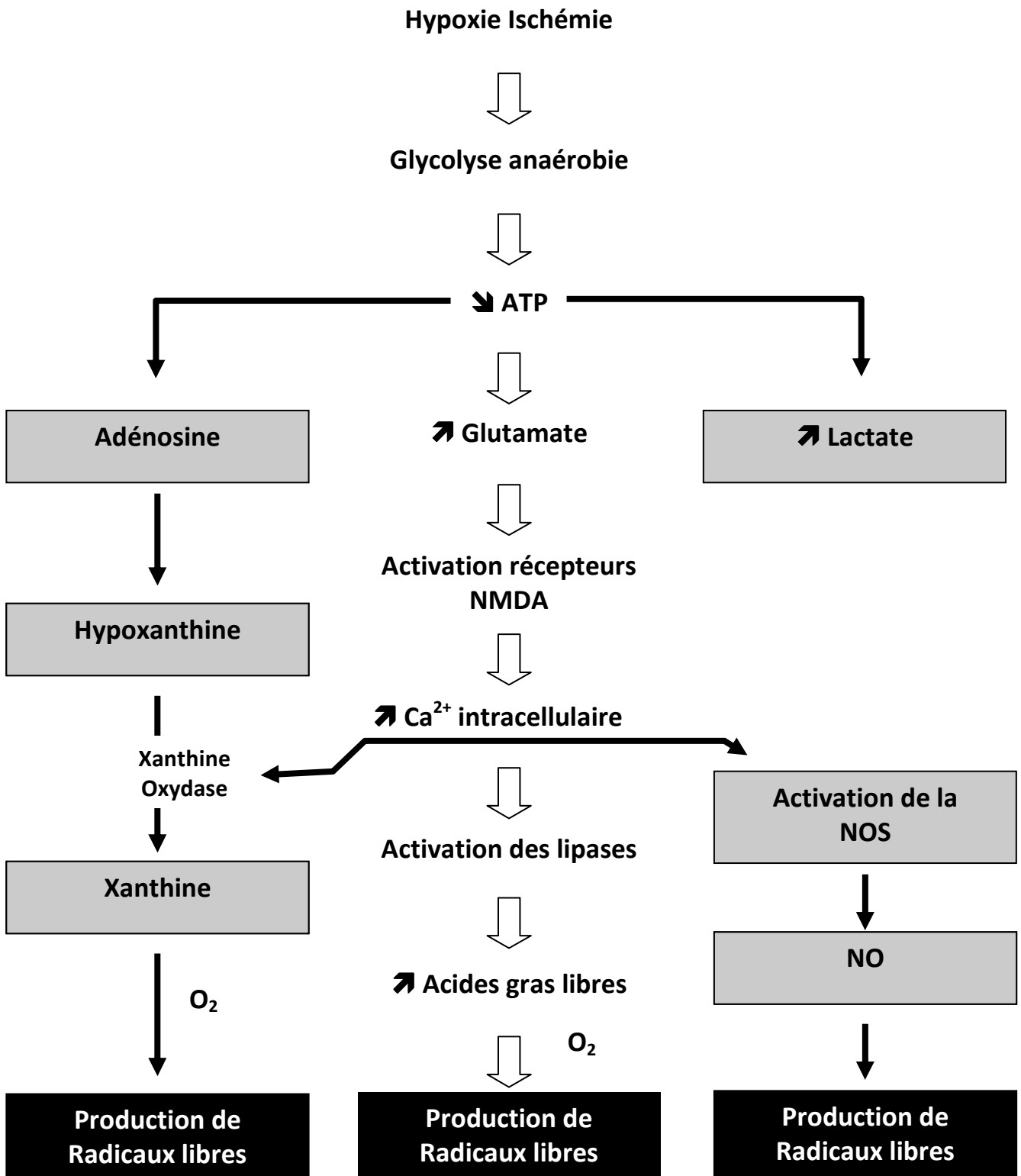
Il s'agit d'un chélateur du fer permettant d'éviter la formation d'ion $\text{OH}\cdot$ à partir de la réaction entre H_2O_2 et Fe^{2+} (réaction de Fenton). La deferoxamine agit également sur la production de gènes protecteurs et réparateurs en condition d'HI, stabilise l'expression du

facteur inducteur de l'hypoxie 1-alpha. Il n'existe pas d'étude clinique chez le nouveau-né asphyxique concernant cette molécule (Gonzalez and Ferriero, 2008).

2.2.5. N-Acétyl-cystéine (NAC)

Le NAC réduit le stress oxydatif, rétablit le taux de glutathion intracellulaire, améliore le potentiel redox cellulaires, diminue l'apoptose et l'inflammation cérébrale dans les modèles animaux d'asphyxie. Jatana et al (Jatana et al., 2006) sur un modèle de type Vannucci, ont montré que l'association NAC + hypothermie, permet une diminution significative du volume de l'accident cérébral comparativement au NAC seul ou l'hypothermie seule. L'effet protecteur est conservé à 4 semaines de l'accident, puisque le groupe avec Hypothermie + NAC possède un volume hémisphérique droit (homolatéral à la ligature carotidienne) comparable aux témoins. Comme la mélatonine, le NAC est une molécule disponible et bien connue ce qui lui confère des qualités importantes pour la réalisation d'essais cliniques.

Figure 11 : Phénomènes impliqués dans la production de radicaux libres dans les situations d'hypoxie-ischémie d'après (Perlman, 2006b):



2.3. ANTI-INFLAMMATOIRES

Deux nombreuses molécules candidates anti-inflammatoires ont été explorées, certaines seulement chez l'animal, d'autres chez l'humain (Tianeptine, Minocycline, IL10, anti-TNF, Chloroquine en association ou pas avec la colchicine, AINS, stéroïdes).

Les tétracyclines ont été considérées comme potentiellement neuroprotectrices au milieu des années 90 grâce aux travaux de Clark sur la doxycycline (Clark et al., 1994). Dans les années 2000, l'intérêt de l'utilisation de la minocycline comme molécule neuroprotectrice chez le nouveau-né a été proposé par Arvin (Arvin et al., 2002) à partir d'un modèle néonatal d'HI type Vannucci-Rice. Arvin a notamment montré que la minocycline possédait des propriétés neuroprotectrices qu'elle soit administrée avant ou après la ligature carotidienne avec hypoxie.

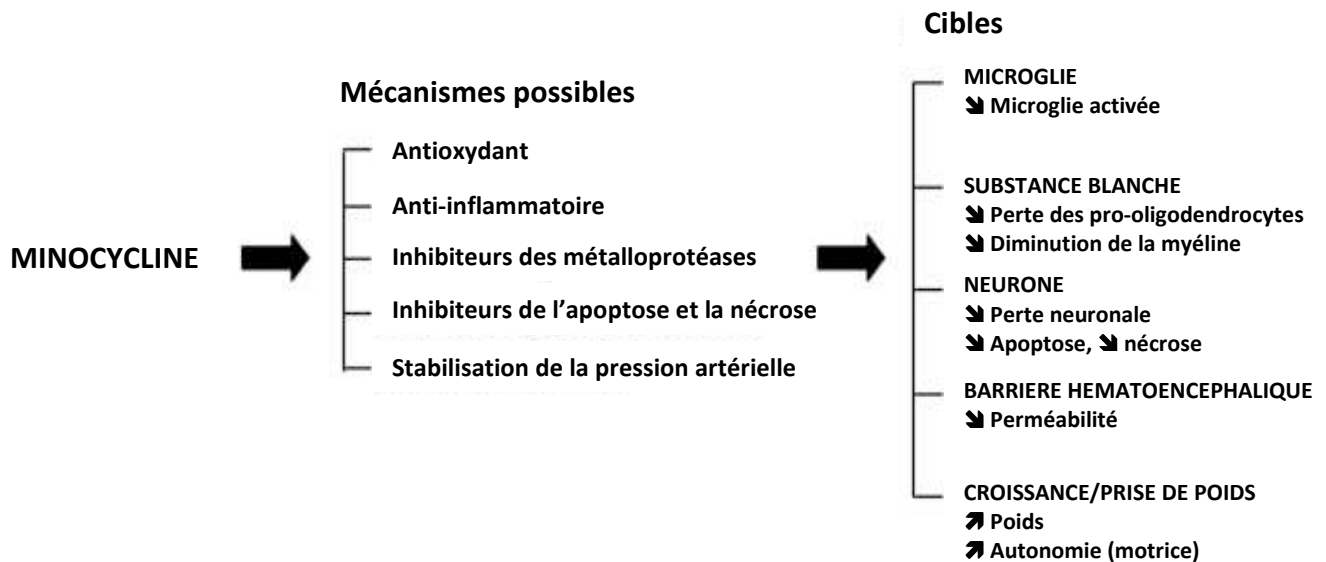
La minocycline a donc une action potentiellement anti-inflammatoire, inhibitrice des métalloprotéases, antiapoptotique et antinérotique, antioxydante et enfin « pro » hémodynamique permettant la conservation d'un bon débit cérébral. Si cette molécule est une bonne candidate pour la neuroprotection cérébrale, en particulier du nouveau-né, son utilisation est controversée dans cette population à cause des effets secondaires sur la croissance osseuse, la pigmentation dentaire et plus récemment montrés chez le rat, des effets sur l'augmentation de la bilirubine, possiblement responsable de lésions cérébrales, d'atteinte vestibulaire et auditive.

Les différents modes d'action possible de la Minocycline (tétracycline de deuxième génération) sont résumés dans la figure 12. La récente mise au point sur ce sujet par Buller en 2009 (Buller et al., 2009) conclut cependant à la nécessité de poursuivre les études précliniques afin de définir précisément la meilleure fenêtre de tir pour l'utilisation de cette molécule chez le nouveau-né.

Les stéroïdes ont montré dans certaines études chez l'homme, un effet potentiellement protecteur contre les atteintes de la SB, notamment chez le prématuré dont la mère a bénéficié de ce traitement avant l'accouchement. Cependant cet état de fait doit être mis en balance avec les risques potentiels sur le développement neurologique (possiblement par inhibition de facteurs de croissance et facilitation de l'apoptose), de l'administration de corticostéroïdes en post-natal chez le prématuré pour le traitement ou la prévention de la dysplasie broncho-pulmonaire. Ces effets délétères des corticostéroïdes concernent la

dexaméthasone. L'hydrocortisone pourrait être une alternative sans effet nocif et la bétaméthasone est mal évaluée (Baud and Sola, 2007; Degos et al., 2008a)

Figure 12 : effets et cibles potentielles de la minocycline dans l'asphyxie périnatale d'après (Buller et al., 2009)



2.4. ANTI-APOPTOTIQUES

L'ensemble des études concernant l'animal. Hagberg et al (Hagberg et al., 2004) se sont intéressés à une polymérase (PARP) activée lors de stress HI et dont l'isoforme PARP-1 participait à l'atteinte neuronale en déplaçant les réserves cellulaires en DNA+ et ATP et en activant la microglie. Le blocage de cette polymérase protège contre l'excitotoxicité et l'agression liées à l'HI. Lors des phénomènes HI, l'activation de PARP-1, qui survient dans les mêmes délais que celle des récepteurs NMDA (dans les 24 premières heures), est sous la dépendance de la translocation dans le noyau cellulaire d'un facteur inducteur d'apoptose (Apoptosis Inducing Factor : AIF), favorise l'activation des caspases et le relargage de cytochrome c. L'utilisation de molécule anti-caspases (calpaïne, MDL 28710) a montré chez l'animal un effet protecteur sur le cerveau des rats après HI. Le contrôle en amont de molécules de la famille de Bcl-2 impliquées dans les phénomènes apoptotiques reste un véritable challenge (Degos et al., 2008a; Gonzalez and Ferriero, 2008; Zhu et al., 2009a).

2.5. PRECONDITIONNEMENT

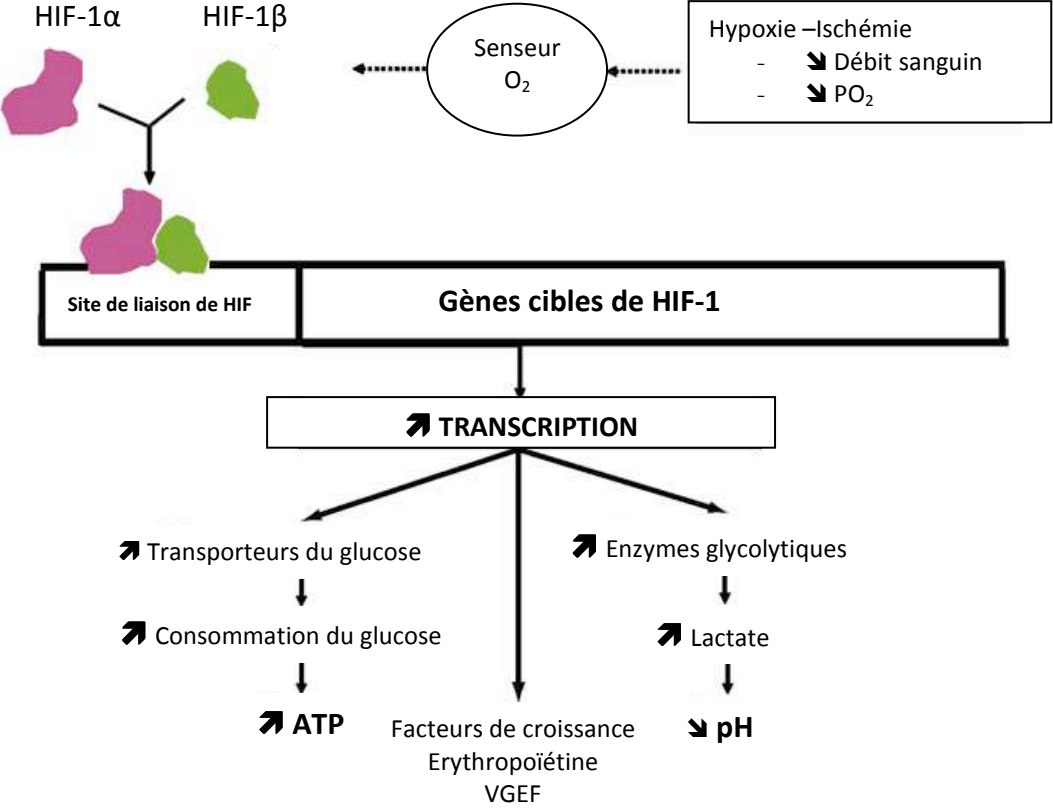
La notion de preconditionnement fait référence à deux concepts liés : *le seuil à franchir pour protéger et celui à ne pas dépasser pour éviter la nocivité*. Il s'agit au fond de la capacité d'un

organisme à générer des réactions physiologiques à son environnement (Baker, 2004). On peut apparenter le phénomène de préconditionnement à celui d'acquisition d'une tolérance d'organe à un évènement traumatique : « Ce qui ne vous tue pas, vous rend plus fort ». Ce préconditionnement repose sur l'activation de nombreux facteurs que l'on peut définir en trois grandes catégories :

- les « senseurs, ou initiateurs », qui capturent le signal de stress et activent une multitude
- de « voies de signalisation intracellulaire, transducteurs membranaires et intracellulaires » qui eux-mêmes convergent vers
- des « effecteurs » de la protection.

Ainsi, il a été montré chez l'animal que l'exposition à l'hypoxie permettait de réduire les lésions cérébrales acquises lors d'une hypoxie réalisée 24 heures après l'exposition et que cette protection persiste entre 1 et 3 semaines. Le Facteur Induit par l'Hypoxie (Hypoxic Inducible Factor-1alpha : HIF-1 α) pourrait être un senseur ou un initiateur dans les phénomènes de préconditionnement du cerveau (figure 13) à l'hypoxie (Chang and Huang, 2006; Gonzalez and Ferrero, 2008).

Figure 13 : Phénomènes liés à l'association de Hypoxic Inducible Factor-1alpha (HIF-1α) et HIF-1β sous l'influence de l'hypoxie. Le complexe ainsi formé va se fixer sur le promoteur de gènes cibles provoquant la transcription d'enzymes et de facteurs de croissance impliqués dans la neuroprotection (d'après (Gonzalez and Ferriero, 2008)).



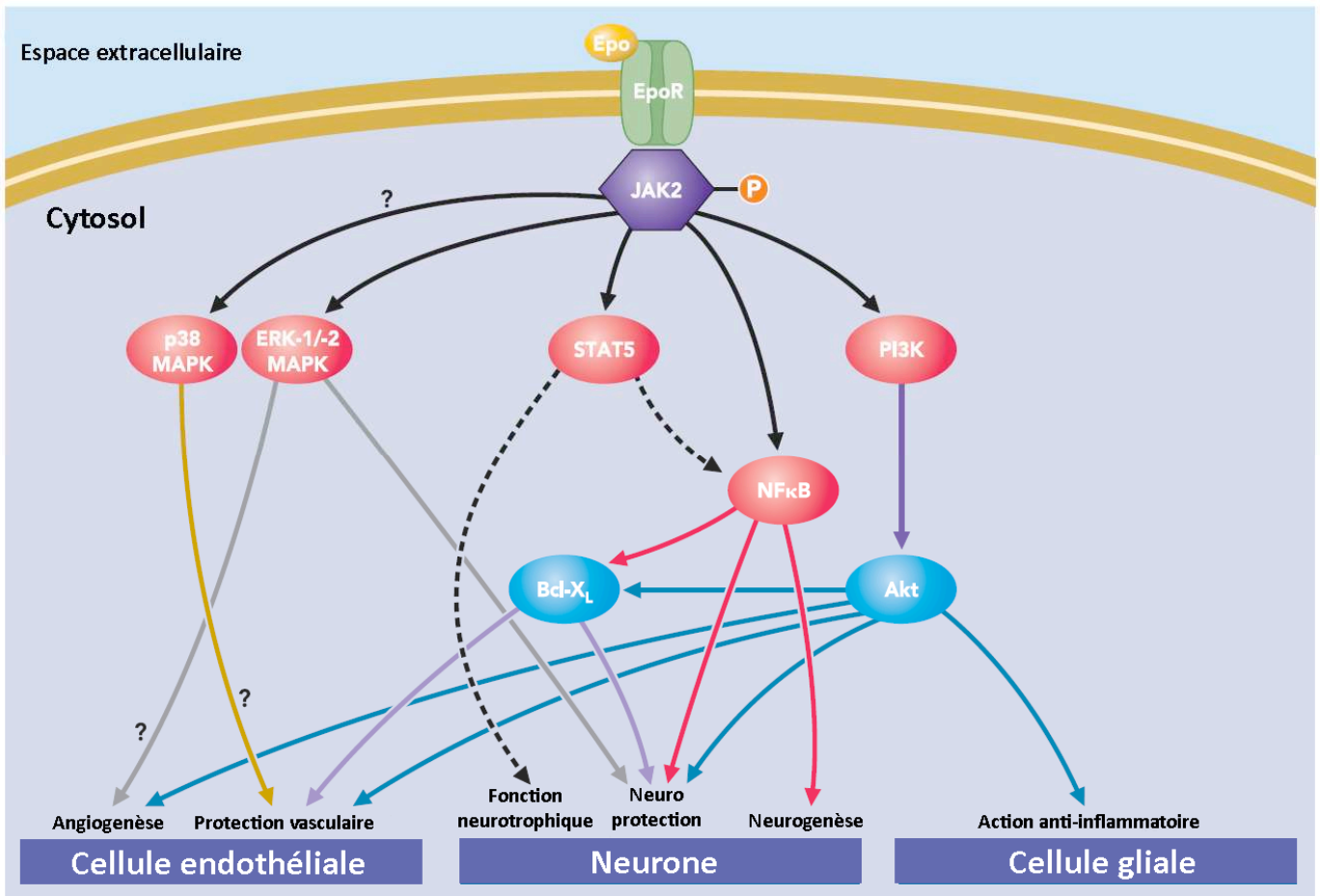
2.6. FACTEURS DE CROISSANCE

Les facteurs de croissance tels que l'Insuline-like Growth Factor (IGF-1), le Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF), le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) ou encore l'Erythropoïétine (Epo) présentent des capacités anti-apoptotiques, comme cela a été montré chez l'animal.

IGF-1 présente une activité anti-caspase-3 et anti-caspase-9 et reste actif même s'il est donné jusqu'à 6 heures après l'hypoxie. Le BDNF pourrait jouer un rôle par l'intermédiaire de son action au niveau mitochondrial. Les souris knock-out pour le VEGF développent des anomalies sévères de la migration neuronale, de la vascularisation et présentent une mortalité élevée. Le VEGF est un régulateur de l'angiogenèse et participe à la prolifération et à la migration neuronale.

L'Epo, facteur de croissance hématopoïétique, est devenu l'un des agents neuroprotecteurs les plus prometteurs en quelques années (Gonzalez et al., 2007; Kumral et al., 2003; Sakanaka et al., 1998; Sola et al., 2005; Spandou et al., 2004a; Spandou et al., 2004b; van der Kooij et al., 2008). Initialement l'Epo a été utilisée pour traiter l'anémie en particulier chez les grands prématurés (Shannon, 1995). Son rôle de médiation humorale dans la maturation et la prolifération des progéniteurs érythroïdes, est connu depuis 1906 (van der Kooij et al., 2008). Les propriétés neuroprotectrices de l'Epo sont connues depuis plusieurs années, même si ses mécanismes sous-jacents demeurent flous (Rabie and Marti, 2008). L'Epo est potentiellement neuroprotectrice, un facteur neurotrophique, un facteur de neurogenèse, anti-inflammatoire, un facteur d'angiogenèse et augmente la perméabilité vasculaire (*in vitro*). Des essais randomisés en clinique humaine commencent à être réalisés et confirment le bénéfice de l'utilisation de l'Epo dans les asphyxies périnatales sur le devenir neurologique au-delà de un an (Zhu et al., 2009b). Des interrogations subsistent pourtant : quel est le mécanisme exact qui permet à l'Epo de traverser la barrière hémato-encéphalique ? Par quel mécanisme l'Epo agit-elle au niveau des cellules gliales (immunomodulation) ? Les cascades intracellulaires provoquées par l'Epo sont-elles les mêmes dans toutes les cellules exprimant les récepteurs à l'Epo ? (Rabie and Marti, 2008). La figure 14 schématise les voies de signalisations cellulaires de l'Epo (Rabie and Marti, 2008).

Figure 14: Voies de signalisation de l'Erythropoïétine au niveau cérébral d'après (Rabie and Marti, 2008)



L'Epo se fixe sur son récepteur Epo-R, permettant l'activation par phosphorylation de la Janus Tyrosine Kinase 2 (JAK-2). L'activation de JAK-2 provoque la mise en place d'une voie de signalisation secondaire par activation de STAT-5, ERK-1/-2 MAPK, PI3K/Akt et l'activation/translocation du NF-κB. Il a été démontré que les protéines ERK-1/-2 étaient essentielles pour la neuroprotection et l'angiogenèse médiée par l'Epo. Par contre, le rôle de STAT-5 tant dans la translocation de NF-κB que dans son action directe sur la neuroprotection est plus controversé. La protéine PI3K, via la phosphorylation d'Akt, a une action anti-inflammatoire, protectrice vasculaire, neuroprotectrice ainsi que sur l'angiogenèse. Bcl-XL est impliqué dans la protection vasculaire et la neuroprotection. Enfin la translocation nucléaire de NF-κB induit l'expression de gènes qui sont impliqués dans la neurogenèse et la neuroprotection.

2.7. THERAPIE CELLULAIRE

Deux types de cellules souches ont particulièrement montré des capacités à générer des cellules gliales ou des neurones : les cellules souches neurales obtenues à partir de tissu neural embryonnaire et les cellules souches embryonnaires multipotentes issues de tissus

embryonnaires très tôt dans le développement (Degos et al., 2008a). Même si des études animales ont pu montrer l'efficacité *in situ* et à distance de l'accident HI de l'injection de cellules souches, cette approche reste à l'état d'ébauche pour des raisons techniques : quel moment pour l'implantation des cellules souches ? Quels effets sur les tissus sains ? Quelle voie d'administration ?

Une autre approche pourrait être de tracer les cellules implantées ou encore de stimuler la production endogène de cellules progénitrices neuronales (Degos et al., 2008a; Gonzalez and Ferriero, 2008).

2.8. HYPOTHERMIE

2.8.1. Généralités

Deux grandes études d'efficacité clinique ont été publiées en 2005 (Gluckman et al., 2005; Shankaran et al., 2005). Ces travaux ont définitivement inscrit l'hypothermie comme thérapeutique potentiellement efficace dans la prise en charge des EHI du nouveau-né à terme. De nombreuses données expérimentales chez l'animal ont permis de poser une base solide pour permettre le passage aux études de faisabilité, d'innocuité et d'efficacité chez l'homme. Des études princeps de protection cérébrale par hypothermie avant l'agression tissulaire ont été publiées dans les années 50 (Thoresen, 2000). Des cas rapportés d'hypothermie thérapeutique après arrêt cardiaque chez l'adulte avec un devenir meilleur que des séries historiques sans hypothermie ont provoqué un certain engouement pour cette pratique dans les années 60 (Thoresen, 2000). Entre 1960 et 1970, la pratique de l'hypothermie par immersion dans l'eau froide dans les souffrances asphyxique du nouveau-né n'a pas permis de confirmer, sur l'ensemble des données publiées une amélioration sur la mortalité des patients en comparaison avec la mortalité observée sans hypothermie (12 à 15% à l'époque). La température centrale des patients pouvait descendre jusqu'à 25°C. Des équipes russes ont modifié la pratique en appliquant une hypothermie sélective en arrosant la tête avec de l'eau froide et en contrôlant la température basse à 30°C. Des travaux postérieurs ont montré la nocivité de la tolérance à l'hypothermie en salle de travail chez les nouveau-nés prématurés et à terme (augmentation de la mortalité et altération de la croissance pondérale) arrétant de fait la poursuite de cette thérapeutique pendant de nombreuses années, jusqu'à ce que des travaux expérimentaux montrent l'évidence du bénéfice de l'hypothermie dans ce contexte (Thoresen, 2000). Ces travaux chez l'agneau, le

cochon et le rat ont permis de définir la fenêtre de tir pour la mise en place de l'hypothermie dans les conditions d'asphyxie néonatale, les objectifs de température à atteindre et la durée même de l'hypothermie. Ainsi l'hypothermie doit être :

- instaurée dans les 6 heures qui suivent l'accident asphyxique
- maintenue suffisamment longtemps (72 heures) pour conserver un bénéfice
- dans une gamme de température assurant une neuroprotection.

Sur ce dernier point les études animales rapportent un effet protecteur lorsque la température cérébrale diminue de 2 à 5°C par rapport à la température de base (Gluckman et al., 2005; Gunn et al., 1998; Shankaran et al., 2005; Thoresen, 2000).

Les essais cliniques humains se sont donc basés sur ces principes en visant une température centrale cible de 33,5°C à 35°C selon les études, une initiation de la thérapeutique dans les 6 premières heures suivant l'accident HI, une durée de 72 heures et un réchauffement de la température centrale progressif de 0,5°C toutes les heures jusqu'à un retour à une température centrale entre 36,5 et 37,5°C (Azzopardi et al., 2009; Gluckman et al., 2005; Higgins and Shankaran, 2009; Jacobs et al., 2007; Shah et al., 2007; Shankaran et al., 2005). La dernière étude publiée est l'étude Européenne (Azzopardi et al., 2009) ; tandis que les premières évaluations des pratiques cliniques de l'hypothermie sont également publiées (Kapetanakis et al., 2009).

2.8.2. Résultats des études randomisées

2.8.2.1. CoolcapTrial

L'étude de Gluckman et al (Coolcap Trial) concernait 234 nouveau-nés (116 dans le groupe hypothermie) inclus dans 25 centres et présentant une EHI modérée à sévère sur des critères cliniques, biologiques et électroencéphalographiques (Gluckman et al., 2005). L'hypothermie était sélective, la température de l'eau circulant dans le casque à 33,5°C et la température rectale cible entre 34 et 35°C. Elle était débutée au maximum 5,5 heures après la naissance et maintenue 72 heures. Les 118 enfants contrôles recevaient une prise en charge classique selon les règles de l'art avec une température corporelle maintenue entre 36,8 et 37,2°C. L'objectif principal était l'observation de la mortalité et le handicap sévère combinés à 18 mois : 55% dans le groupe hypothermie vs. 66% dans le groupe normothermie (OR : 0,61 ; 95% CI 0,34 – 1,09, p=0,1), donc absence de significativité malgré la différence apparente de plus de 10%. L'analyse en sous-groupes (basée sur l'EEG et

distinguuant les atteintes sévère et intermédiaires) montrait une différence significative seulement pour les formes intermédiaires où l'hypothermie amenait un bénéfice avec 48% d'évolution défavorable dans le groupe hypothermie contre 66% dans le groupe normothermie (OR : 0,47 ; 95% CI 0,26 – 0,87 p=0,02).

2.8.2.2. NICHD Neonatal Research Network

L'étude de Shankaran et al (NICHD Neonatal Research Network) concernait 208 enfants (102 dans le groupe hypothermie) inclus dans 16 centres et présentant une EHI modérée à sévère sur des critères cliniques et biologiques (Shankaran et al., 2005). L'hypothermie était globale avec une température centrale cible de 33,5°C +/- 0,5°C. Elle était débutée au maximum 6 heures après la naissance et maintenue 72 heures. Les 106 nouveau-nés contrôles recevaient une prise en charge classique selon les règles de l'art.

L'objectif principal était l'étude de la mortalité et du handicap modéré à sévère combiné à 18 - 22 mois : 44% dans le groupe hypothermie vs. 62% dans le groupe normothermie (OR : 0,72 ; 95% CI 0,54 – 0,95, p=0,01). Cette significativité pouvait se traduire comme suit : il était nécessaire de traiter six enfants par hypothermie dans ces conditions pour observer un enfant supplémentaire avec un meilleur devenir à 18 – 22 mois. Il n'existait pas de différences significatives dans les sous-groupes (en particulier sur les formes sévères), ni sur la mortalité ou le risque de paralysie cérébrale.

2.8.2.3. La méta-analyse de 2007

La méta-analyse de 2007 de Jacobs et al (Jacobs et al., 2007) a repris 8 études et conclut à un effet bénéfique de l'hypothermie dans la souffrance HI du nouveau-né à terme avec une diminution de la mortalité et l'absence d'augmentation du handicap chez les survivants. Les effets délétères à court terme observés dans les études sont compensés largement par le bénéfice sur la mortalité et le devenir neurodéveloppemental des enfants. Les auteurs insistent cependant sur le fait que le nombre total de patients inclus dans les essais est de 829, tandis que les data analysées concernent seulement 638 patients, les résultats des patients restant pouvant modifier les conclusions préliminaires.

2.8.2.4. L'essai randomisé européen (TOBY study group)

L'étude de Azzopardi et al (TOBY Study group) concernait 325 enfants (163 dans le groupe hypothermie) inclus dans 42 hôpitaux et présentant une EHI modérée à sévère sur des critères cliniques et biologiques (Azzopardi et al., 2009). L'hypothermie était globale avec une température centrale cible entre 33 et 34°C. Elle était débutée au maximum 6 heures après la naissance et maintenue 72 heures. Les 162 nouveau-nés contrôles recevaient une prise en charge classique selon les règles de l'art.

L'objectif principal était l'étude de la mortalité et du handicap sévère combiné à 18 mois : 44 enfants sont morts et 42 ont survécu avec un handicap sévère dans le group hypothermie vs. respectivement 42 et 32 dans le groupe normothermie (RR : 0,86 ; 95% CI 0,68 – 1,07, p=0,17). Le taux de survivants sans anomalie neurologique était statistiquement plus élevé dans le groupe hypothermie que dans le groupe normothermie : 44% vs 28% (RR : 1,57 ; 95% CI 1,16 – 2,12, p=0,003). Chez les survivants, le risque de paralysie cérébrale était diminué par l'hypothermie (RR : 0,67 ; 95 CI 0,47 – 0,96, p= 0,03) et les scores d'évaluation neurodéveloppementaux améliorés significativement.

2.8.2.5. Synthèse des résultats

L'ensemble des études publiées montre l'intérêt de l'hypothermie dans la prise en charge de l'asphyxie périnatale et surtout met en évidence le fait qu'avant l'hypothermie, nous n'avions aucun recours thérapeutique possible pour espérer améliorer le taux et la qualité de survie des patients. Les données récentes de l'étude TOBY incite à poursuivre dans cette voie. Cependant la mise en place en routine de l'hypothermie dans la souffrance HI du nouveau-né selon les protocoles proposés par les trois grands essais randomisés (Azzopardi et al., 2009; Gluckman et al., 2005; Shankaran et al., 2005) est difficile et se heurte à des difficultés organisationnelles et de crédibilité. Une étude récente basée sur des questionnaires adressés aux niveaux I, II et III de néonatalogie, fait état de ces difficultés au Royaume-Uni (Kapetanakis et al., 2009). Cent vingt-cinq (sur 195 ; 66%) des unités néonatales ont répondu. Vingt-huit pour cent de l'ensemble des unités seulement sont organisées pour mettre en place l'hypothermie localement (52% des unités de niveau III). Cependant 80 % des répondants utiliseraient cette thérapeutique si elle était facilement disponible. Un peu plus de la moitié des répondants estiment l'hypothermie comme une

thérapeutique efficace ou très efficace, tandis que 43% estiment que davantage de données sont nécessaires.

Des études de cohortes longitudinales sur le long terme permettront également d'évaluer à distance les effets délétères et bénéfiques d'une telle technique chez le nouveau-né asphyxique.

2.8.3. Prévenir l'aggravation des lésions asphyxiques par une réanimation néonatale optimale

La réanimation post-asphyxique doit être rigoureuse et optimale sur la ventilation, la perfusion, l'état d'hydratation, la glycémie, le traitement des crises convulsives, l'équilibre ionique. Le tableau 5 résume les objectifs de cette prise en charge néonatale.

Tableau 5

Ventilation

- **Maintenir un PCO2 artérielle normale**

Circulation

- Traitement agressif des hypotensions artérielles
- Eviter les phénomènes hypertensifs

Etat d'hydratation

- Apports adaptés au bilan entrée – sortie
- Pas de restriction hydrique de principe
- Surveillance de la natrémie et de la diurèse

Glycémie

- Maintenir des taux de glucose normaux
- Eviter les hypoglycémies avec une surveillance des glycémies capillaires

Crises convulsives

- Traiter les crises cliniques
- Evaluer par EEG les états de mal infracliniques et les traiter
- Pas de traitement prophylactique de principe

Equilibre ionique

- Surveillance de la balance hydrosodée
- Surveillance des taux sanguins de calcium et de magnésium

Autres

- Isolement neurosensoriel, éviter la surstimulation liée aux soins agressifs
- Traitement de la douleur mais pas au prix de phénomènes d'hypotension ou de bas débit cérébral
- Positionnement proclive 30°, tête dans l'axe
- Eviter les comorbidités (sepsis, anémie)
- Eviter l'hyperthermie
- Evaluation régulière de l'état neurologique, concertation interdisciplinaire

PARTIE PRECLINIQUE

TRAVAIL FONDAMENTAL

I MISE EN PERSPECTIVE DU TRAVAIL DE RECHERCHE CHEZ L'ANIMAL

La troisième partie de ce travail de thèse consistera à retranscrire le travail de recherche clinique que nous avons réalisé à l'Hôpital des Enfants de Bordeaux sur le nouveau-né asphyxique : protocole BIGHIN. Cette recherche clinique s'intéresse à la mise en évidence de facteurs pronostiques précoces chez ces enfants. Si ce travail montre un intérêt réel dans l'amélioration de la prise en soin des patients et l'affinement des informations apportées aux parents dans le cadre du pronostic, elle représente aussi, la recherche d'une « fenêtre de tir » possible pour la mise en œuvre de thérapeutiques neuroprotectrices. C'est dans cet objectif que nous avons associé à cette recherche clinique, une recherche plus « fondamentale » sur un modèle animal de rat nouveau-né. Ainsi, nous avons réalisé une étude avec le modèle d'HI néonatal du raton de Vannucci-Rice (Rice et al., 1981; Vannucci and Vannucci, 1997). Nous allons dans un 1^{er} temps faire un rappel sur les différents modèles animaux d'HI avant de rendre compte dans un second temps, des résultats de nos travaux sur le raton asphyxique.

II LES DIFFERENTS MODELES ANIMAUX

La description des différents modèles animaux de la souffrance HI périnatale peut reposer sur de nombreux critères : l'animal choisi, la méthodologie (lésion directe ou secondaire), la zone touchée (SB, SG ou les deux) ou encore le moment de l'agression cérébrale (modèle prénatal, post-natal ou anténatal). Les animaux habituellement utilisés pour les modèles d'HI périnataux sont le singe, le mouton, les rongeurs, le lapin et le porcelet (Yager and Ashwal, 2009). Un article de Roohey (Roohey et al., 1997) sur 292 études animales en relation avec l'asphyxie périnatale publiées entre 1955 et 1994, montrait que l'animal le plus utilisé était les rongeurs (26%) suivi respectivement des porcelets (23%) et du mouton (22%). Quarante-cinq études correspondaient à des modèles dits « chroniques » avec évaluation du devenir neurologique à long terme, et 15 d'entre elles concernaient des primates non-humains. Les études concernant les fœtus étaient essentiellement chez le mouton ou le primate tandis que celles chez le nouveau-né concernaient des ratons P7 ou des porcelets entre 1 et 5 jours de vie.

1. LE SINGE

1.1. LESIONS DE LA SUBSTANCE GRISE

Le modèle développé par Myers (dans (Roohey et al., 1997)) consiste à mettre un sac en plastique sur des fœtus de singe à terme après avoir clampé leur cordon au moment de l'accouchement. Cette technique maintenue pendant 12 minutes crée des lésions neurologiques qui siègent de manière prédominante dans le tronc cérébral. Les anomalies neurologiques chez le nouveau-né humain provoquées par l'altération sévère du rythme cardiaque fœtal pendant au moins 17 minutes chez la femme enceinte se rapprochent des anomalies neurologiques observées dans ce modèle de singe. D'autres modèles d'ischémie partielle ont été mis au point en provoquant chez des fœtus in utero une baisse de leur pression partielle en oxygène. La diminution de cette pression partielle en O₂ de 10 % par rapport à la normale pendant au moins 5 heures provoque une hypotension, une bradycardie sévère et une acidose sévère chez le fœtus responsable à la naissance de convulsions, d'un état de décérébration avec des lésions neuropathologiques de nécrose corticale diffuse avec porencéphalie. Myers a précisé dans son modèle le rôle de l'acidose : chez le singe, une hypoxie sévère sans acidose provoque des lésions prédominant sur la SB ; une hypoxie partielle prolongée se terminant par une hypoxie sévère génère des lésions des noyaux gris centraux et des thalami.

1.2. LESIONS DE LA SUBSTANCE BLANCHE

Inder (Inder et al., 2004, 2005) a mis au point un modèle de lésions de la SB chez le fœtus de babouin (terme à 184 jours) en recréant artificiellement des conditions d'accouchement prématuré par hystérectomie chez la femelle gestante à 125, 140 et 160 jours de gestation ce qui correspond pour un fœtus humain respectivement à 26-28, 30-32 et 40 semaines de grossesse. Les fœtus de babouin étaient pris en charge comme des nouveau-nés humains (corticothérapie maternelle, réanimation néonatale, surfactant et ventilation artificielle pendant 2 à 4 semaines). L'observation anatomopathologique des cerveaux de ces animaux a mis en évidence dans plus de la moitié des cas, des anomalies de la SB allant de l'aspect de petites lacunes à des lésions kystiques étendues avec un élargissement des ventricules.

2. LE MOUTON

2.1. LESIONS DE LA SUBSTANCE GRISE

Des modèles de clampage brefs ou prolongés du cordon ont permis de mettre en évidence des anomalies neuropathologiques chez le mouton. Ainsi un clampage de 10 minutes chez le fœtus de mouton proche du terme responsable d'une asphyxie transitoire provoque des lésions au niveau de l'hippocampe (Mallard et al., 1992). La répétition de 3 clampages de 10 minutes à une heure d'intervalle chacun majore de façon importante les lésions tandis qu'un intervalle de 5 heures « déplace » les anomalies essentiellement sur le striatum. Des résultats identiques sont observés en réalisant le clampage de 10 minutes toutes les 30 minutes (Mallard et al., 1995). Un clampage répété toutes les 2,5 à 5 minutes entraîne des lésions diffuses et étendues d'infarctus corticaux parasagittaux, thalamiques et cérébelleux dans 40% des cas et une nécrose neuronale chez les autres animaux. Des asphyxies prolongées de 30, 60 et 120 minutes par clampage de l'artère utérine, montre des anomalies neurologiques préférentiellement au niveau du cortex parasagittal, des thalami, de l'hippocampe et du striatum, inversement proportionnelles à l'hypotension provoquée mais sans lien avec l'hypoxie (De Haan et al., 1997). Ces modèles de mouton ont permis également de montrer les phénomènes de production de radicaux libres à la phase précoce de la reperfusion tissulaire (Bagenholm et al., 1998).

2.2. LESIONS DE LA SUBSTANCE BLANCHE

Le modèle de Ting (Ting et al., 1983) concerne des femelles gestantes exposées en milieu de gestation à une hypoxie de 2 heures dans un environnement à 10 % d'oxygène. Une partie de ces fœtus étaient de plus rendu hypovolémique. Seuls ceux ayant une hypoxie + une hypovolémie (PAM < 30 mm Hg) ont présenté des lésions majoritairement dans la SB tandis que ceux n'ayant pas eu d'hypotension n'ont pas présenté d'anomalie cérébrale. Ting a également montré les modifications et l'intérêt potentiel de la valeur de la mesure du taux de lactate sanguin dans ces situations (taux beaucoup plus élevé et prolongé chez les fœtus présentant des lésions cérébrales). Le modèle de Petersson (Petersson et al., 2002), par occlusion bilatérale et réversible de la carotide chez des fœtus de mouton né à 85% de la gestation a précisé à 48 heures et 72 après reperfusion les lésions de la SB avec l'existence d'une gliose et d'une diminution de la protéine basique de la myéline dans les oligodendrocytes. Un autre modèle intéressant (Reddy et al., 1998) a comparé les lésions

cérébrales provoquées chez des fœtus de mouton ayant subi 30 minutes d'hypoperfusion (occlusion bilatérale des carotides par ballonnets gonflés, vérification par l'existence d'un tracé isoélectrique) et nés à 65 % ou 90 % de la gestation. Le nouveau-né prématuré présentait plus spécifiquement des lésions de la SB comparé à celui amené jusqu'au terme. Des modèles endotoxiniques (création de lésions inflammatoires) par injection de toxine bactérienne ou de lipopolysaccharides (LPS) associés ou non à des épreuves d'asphyxie par clampage du cordon ont également participé à préciser les lésions neuropathologiques de la SB chez le fœtus de mouton précisant dans le même temps l'implication de molécules de l'inflammation telles que l'IL6 ou encore le TNF α (Duncan et al., 2002; Mallard et al., 2003) ; chez l'homme, il a été montré que les taux d'IL6, de TNF α ou encore d'IL1 mesurés au sang du cordon du nouveau-né sont corrélés aux lésions de leucomalacie périventriculaire ou de paralysie cérébrale chez le prématuré (Nelson et al., 1998; Yoon et al., 1996). Certains de ces modèles ont montré que les endotoxines telles que les LPS pouvaient provoquer une réponse inflammatoire et hypoxique par le biais des modifications du débit placentaire mais surtout par diminution de la délivrance locale de l'oxygène dans la SB et la SG (Dalitz et al., 2003). L'étude précise des débits locaux cérébraux et le marquage des progéniteurs des oligodendrocytes a permis dans le modèle de Back de préciser la fragilité de la SB chez le fœtus et ce d'autant plus qu'il est prématuré faisant des progéniteurs des oligodendrocytes une cible physiopathologique potentielle (Back et al., 2006; Back et al., 2007).

3. LES RONGEURS

C'est le modèle le plus fréquent de l'exploration de l'asphyxie périnatale. En modifiant la technique de Levine de 1960, Vannucci et Rice (Rice et al., 1981) ont mis au point un modèle très usité aujourd'hui tant dans l'exploration des pathologies de la SB que de la SG. Une ligature unilatérale de la carotide commune est réalisée sous anesthésie chez le raton de 7 jours puis l'animal est installé dans une ambiance hypoxique à 8 % d'oxygène. La distribution des lésions dans ce modèle suit le territoire de l'artère cérébrale moyenne. Des modifications de ce modèle ont été apportées pour affiner les recherches en neuropathologie en particulier au niveau de la SB.

3.1. LESIONS DE LA SUBSTANCE GRISE

L'utilisation du modèle de Vannucci a permis au cours des années d'apprécier très précisément les anomalies de la SG et les mécanismes d'apparition de ces lésions. Ce modèle montre que le raton HI maintient, malgré l'augmentation de l'acide lactique, un pH normal du fait de l'hypocapnie par hyperventilation. Durant le phénomène HI, la pression artérielle moyenne chute d'approximativement 30 % par rapport à la normale tandis que le débit sanguin régional cérébral diminue jusqu'à 40 % comparé aux contrôles. Les phénomènes métaboliques associent une diminution intracellulaire de glucose contemporaine de la production d'acide lactique et une chute majeure de l'ATP dans l'hémisphère ipsilatéral à la ligature. L'ATP remonte rapidement avant de décliner de façon majeure dans les 24 à 48 heures suivant la ligature. Ce modèle permet aussi de mettre en évidence le rôle respectif de l'ischémie (ligature, diminution d'apport de substrats) et l'hypoxie ; en effet l'hémisphère controlatéral soumis à la seule hypoxie reste normal. D'un point de vue neuropathologique, dans ce modèle, les lésions cérébrales débutent environ 60 minutes après l'Ischémie-Hypoxie et la nécrose aboutissant à un infarctus à partir de la 90^{ème} minute. L'œdème cérébral atteint son pic vers la 72^{ème} heure. L'exploration dans ce modèle de la réponse inflammatoire est intéressante : dans les 24 premières heures, on observe une augmentation importante d'interleukine 1, de TNF α , de chemokines et de protéines inflammatoires macrophagiques. Les lésions sont colonisées dans les 12 à 24 heures qui suivent successivement par des neutrophiles, des cellules microgliales, des macrophages et des astrocytes (ces derniers persistant jusqu'au 42^{ème} jour après l'agression tissulaire). Des lymphocytes sont observables dans les lésions à la fin de la première semaine qui suit l'agression tissulaire et des L_T Natural Killer apparaissent dès la 12^{ème} heure post-agression. Renolleau et al (Renolleau et al., 1998) ont adapté le modèle de Vannucci-Rice en réalisant une ischémie sans hypoxie, avec un modèle d'électrocoagulation de l'artère cérébrale moyenne et d'une ligature non permanente de l'artère carotide commune ipsilatérale chez le raton P7. Ils ont exploré les phénomènes inflammatoires, de gliose et de mort neuronale lors de la reperfusion cérébrale entre 2 heures et 3 mois après le déclampage de la carotide. Des résultats identiques ont été observés par d'autres auteurs sur le même modèle (Derugin et al., 2000). Un modèle d'ischémie sévère par occlusion bilatérale des carotides communes (Schwartz et al., 1992), mais ne décrivant les anomalies neuropathologiques qu'à 72 heures

après la ligature, a montré une meilleure reproductibilité mais avec une mortalité avant 3 jours très importante rendant ce modèle difficile d'utilisation.

3.2. LÉSIONS DE LA SUBSTANCE BLANCHE

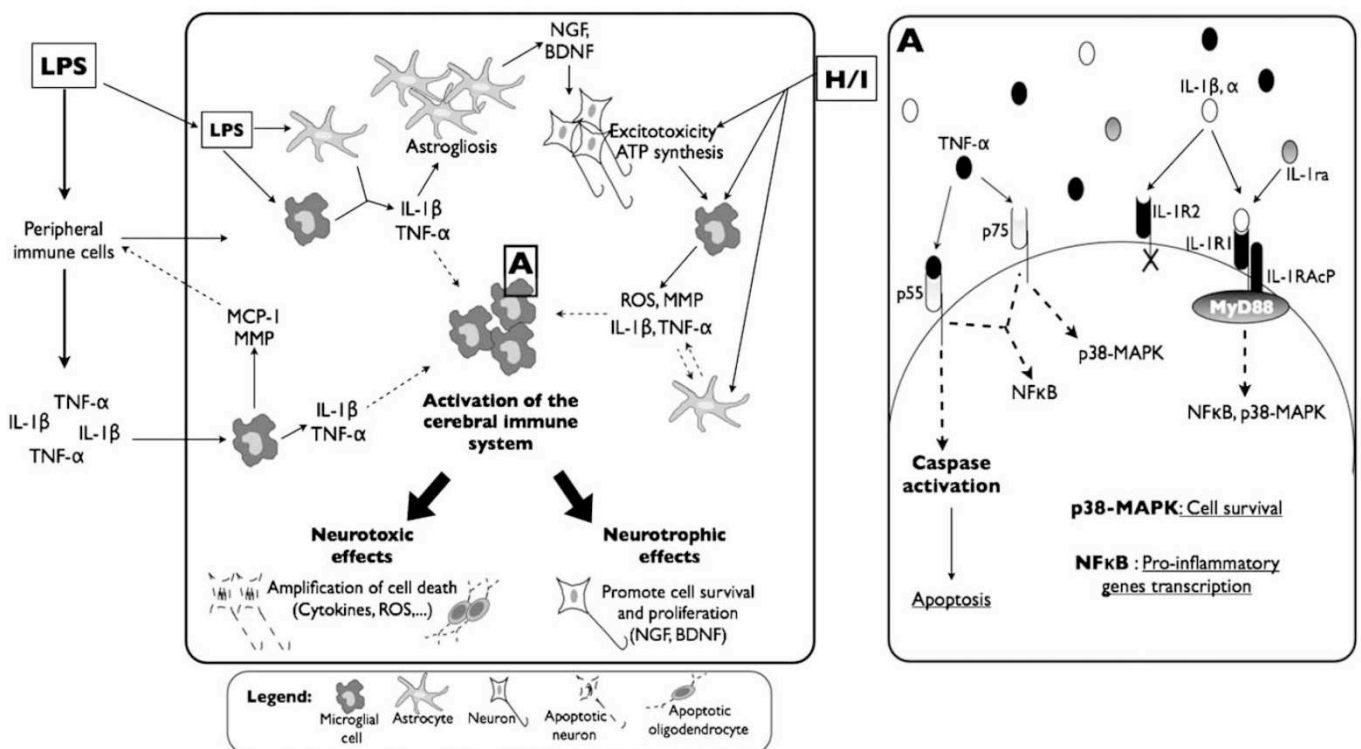
Des modèles de rongeurs pour mettre en évidence spécifiquement les lésions de la SB ont été mis au point soit par la seule occlusion réversible unilatérale de la carotide commune chez le raton P7 durant 5 à 10 minutes (Jelinski et al., 1999), soit par ligature permanente unilatérale chez des ratons P5 (Uehara et al., 1999) ou bilatérale chez des ratons P1 (Cai et al., 2001) associée à une hypoxie de durée variable. Ces modèles ont permis de préciser la vulnérabilité des préoligodendrocytes en particulier chez les ratons les plus jeunes et de leur sensibilité aux radicaux libres lors des phénomènes de reperfusion. D'autres auteurs (Back et al., 2001; Back et al., 2007; Craig et al., 2003), dans ce type de modèle, ont pu mettre en évidence une correspondance entre la maturation oligodendrocytaire et l'apparition de lésions de leucomalacie périventriculaire, la période la plus à risque de leucomalacie périventriculaire correspondant à la période de prémyélinisation riche en préoligodendrocytes. La chute du risque de LMPV est contemporaine de la maturation des préoligodendrocytes en oligodendrocytes immatures vers la 32^{ième} semaine chez l'homme (avant le 5^{ième} jour chez le rat nouveau-né).

Larouche (Larouche et al., 2005) a développé un modèle associant une agression anténatale inflammatoire (injection de LPS dans la cavité péritonéale de la femelle gestante) et une HI néonatale chez les ratons P1 exposés en anténatal (ligature de la carotide droite et hypoxie à 8% d'oxygène). Ce modèle a permis de montrer l'implication des cascades cytokiniques dans la genèse des lésions périnatales. Une revue récente par les mêmes auteurs (Girard et al., 2009) a fait la synthèse de ces travaux. Ils peuvent être résumés dans la figure 15.

Des modèles d'excitotoxicité par introduction intracérébrale de substances agonistes glutaminergiques ont été mis au point. Le glutamate est un effecteur central dans la constitution des lésions de la SB du nouveau-né prématuré et du cortex cérébral à terme. Des analogues du glutamate (NMDA ou Iboténate) sont utilisés chez le rongeur pour reproduire ces lésions (Marret et al., 1995b; McDonald et al., 1988). Ainsi, l'administration intracérébrale d'Iboténate (agoniste glutaminergique des récepteurs métabotropiques et inotropiques de type NMDA) à des stades déterminés du développement cérébral de la souris entraîne des lésions cortico-sous-corticales mimant les lésions post-hypoxiques

foétales et néonatales connues en pathologie humaine (Marret et al., 1995b). En particulier, l'administration au 5^{ème} jour postnatal (P5) reproduit les lésions de la SB du nouveau-né prématuré en suivant une séquence précise : activation microgliale et mort astrocytaire immédiates suivies de la mort oligodendrocytaire et de ruptures axonales, puis formation d'une cicatrice ou d'une cavité kystique et troubles secondaires de la myélinisation. Les lésions créées par l'Iboténate sont prévenues en présence d'antagonistes du récepteur NMDA (Marret et al., 1995b). Ce type de modèle d'excitotoxicité a permis également la mise en évidence de la vulnérabilité des oligodendrocytes. En effet, l'injection intracérébrale d'AMPA chez le raton P7 provoque une atteinte sélective de la SB, affectant particulièrement les préoligodendrocytes (Follett et al., 2000).

Figure 15 : Voies de signalisation moléculaires dans le système nerveux central néonatal de la lésion cérébrale périnatale ayant pour conséquence des effets neurotoxiques ou neurotrophiques (d'après (Girard et al., 2009).



ATP : adénosine triphosphate; BDNF : brain-derived neurotrophic factor; H/I : hypoxie-ischémie, IL : interleukine; LPS : lipopolysaccharide; MAPK : mitogen-activated protein kinase; MCP : Protéines Chimiotactiles monocytaires; MMP : Métalloprotéase; , MyD88 : protéine adaptatrice 88; NFκB : nuclear factor κ B; NGF : facteur de croissance nerveuse, p : protéines, R : récepteur; ra : antagoniste des récepteurs; RAcP, récepteur de protéine accessoire; ROS : radicaux libres de l'oxygène; TNF : tumeur necrosis factor.

4. LE LAPIN

Des modèles inflammatoires et infectieux ont également participé à la meilleure compréhension de l'apparition des lésions de la SB périventriculaire chez le nouveau-né, suggérant le rôle possible de la chorioamniotite dans la genèse des anomalies (Debillon et al., 2003; Debillon et al., 2000; Yoon et al., 1997). Plus récemment, un modèle très complet utilisant l'IRM a apporté des informations importantes sur la compréhension des mécanismes d'altération cérébrale en particulier par atteinte de la SB. Les auteurs ont réalisé une ligature de l'aorte descendante chez la femelle gestante. Ils ont ensuite chez les lapins nouveau-nés réalisés des IRM de diffusion et de tenseurs de diffusion et défini un seuil des marqueurs neuroradiologiques (ADC et FA) en deçà duquel les animaux développaient des anomalies neurologiques en particulier une hypertonie (Derrick et al., 2007; Derrick et al., 2004; Drobyshevsky et al., 2007; Drobyshevsky et al., 2006). Ces modèles se rapprochent des objectifs en recherche clinique d'obtention de marqueurs pronostiques neuroradiologiques précoces chez le nouveau-né à terme comme nous le détaillerons plus tard dans notre protocole de recherche BIGHIN.

5. LE PORCELET

Les modèles chez le porc sont néonataux essentiellement. LeBlanc (LeBlanc et al., 1991) a développé un modèle de porcelet nouveau-nés entre 0 et 3 jours chez qui étaient réalisées une ligature de carotide bilatérale réversible associée à une hypotension provoquée par saignée (à 2/3 de la valeur normale) pendant 30 minutes durant lesquelles les animaux après la ligature étaient ventilés à 6 % d'oxygène. Soixante-dix à 80 % des animaux survivants présentaient des anomalies neurologiques avec déficit moteur. Rootwelt (Rootwelt et al., 1992) a exploré à l'aide d'un modèle de cochons nouveau-nés âgés de 2 à 5 jours, l'effet d'une hypoxémie par ventilation artificielle à 8% d'oxygène, suivie d'une réoxygénation soit à 21 soit à 100% d'oxygène. Les lésions sont identiques dans les deux groupes et la reventilation à 100% d'oxygène ne permet pas d'améliorer plus rapidement la pression artérielle, la fréquence cardiaque, le base-déficit et l'hypoxanthine plasmatique. Des modèles plus récents intégrant l'IRM ou la SRM ont été mis au point (Lorek et al., 1994; Munkeby et al., 2008; Vial et al., 2004). L'expérience de Lorek (Lorek et al., 1994) consistait à réaliser une occlusion bilatérale des carotides chez le porcelet en atmosphère appauvrie en

oxygène et à mesurer le métabolisme énergétique cérébral (SRM du phosphore). Ces études montraient une baisse initiale du taux d'ATP à la phase initiale. Ce taux revenait à la normale dans les 48 heures qui suivaient la remise en condition normoxique. Secondairement on observait une chute énergétique traduite par une diminution du rapport Phosphocréatine (PCr)/Phosphore inorganique (Pi) et du taux d'ATP. Cette chute énergétique secondaire était proportionnelle à l'importance de la souffrance initiale. Des études en SRM du proton ont confirmé ces données avec une augmentation initiale du taux de lactate et une diminution du rapport NAA/Cr. Le taux de lactate ne revient pas tout à fait à la normale et augmente de nouveau lors de la chute énergétique secondaire. Plus récemment Munkeby (Munkeby et al., 2008) s'est intéressé à des marqueurs neuroradiologiques tels que l'ADC, la FA en DTI en plus des ratios observables en SRM chez des porcs nouveau-nés. Les animaux étaient ventilés pendant 30 minutes avec une ambiance appauvrie en O₂ (8%) avec une ligature bilatérale temporaire des deux carotides communes. Après 30 minutes d'expérience, les animaux étaient réoxygénés à 21 % d'O₂ et les clamps carotidiens ôtés ; ils étaient surveillés ainsi pendant 7 heures. L'IRM était réalisée avant l'agression et 7 heures après le début de la réoxygénation et de la reperfusion. Ensuite les animaux étaient sacrifiés et les cerveaux conditionnés pour une évaluation neuropathologique et immunohistochimique. Les auteurs ont pu mettre en évidence au niveau des NGC des animaux une diminution significative de l'ADC et des ratios du NAA et une augmentation de la FA comparées aux valeurs avant l'agression tandis que les ratios du lactate étaient significativement augmentés dans les mêmes régions comparés à leur valeur de base. La diminution de l'ADC et la présence de lactate étaient positivement corrélées à la présence de nécrose histologique. Ce type de modèle peut être particulièrement utile pour la recherche de marqueurs neuroradiologiques précoces de la souffrance HI périnatale.

6. LES MODELES DE RETARD DE CROISSANCE INTRA-UTERIN (RCIU)

De nombreux modèles ont essayé de mettre en évidence la relation existante entre le RCIU et les anomalies cérébrales (en particulier de la SB). Ces recherches ont une concordance avec l'observation en clinique humaine dans laquelle on note un risque majoré de souffrance HI périnatale et d'altération du devenir neurologique chez les enfants nés avec un RCIU (Yanney and Marlow, 2004). Les modèles correspondent chez des rongeurs (rats et cochons d'Inde) soit à des ligatures utérines uni- ou bilatérales de femelles gestantes à des moments

variables de la gestation (Olivier et al., 2007; Olivier et al., 2005; Trescher et al., 1990), soit à des expositions anténatale des femelles gestantes à une hypoxie sur une période donnée de la gestation (Baud et al., 2004; Mallard et al., 2000). L'association d'une hypoxie anténatale à une agression néonatale directe de type excitotoxique a permis de montrer le rôle possiblement protecteur d'un RCIU modéré par rapport à un RCIU sévère (Olivier et al., 2007).

7. LIMITES DES MODELES ANIMAUX (Rooney et al., 1997 ; Yager and Ashwal, 2009)

Le primate non-humain est très coûteux et ne correspond pas à toutes les explorations dans le cadre de l'HI périnatale ; les animaux ne sont pas toujours disponibles et les problèmes éthiques subsistent toujours pour cette catégorie de modèle. Le cerveau serait plus mature chez le singe rhésus et le babouin en comparaison du terme. Pour le mouton, certains laboratoires évitent ce modèle par peur de la fièvre Q ; le cerveau serait plus mature que chez le nouveau-né humain. De plus l'HI est difficile à réaliser et l'évaluation de l'altération du système nerveux central et du comportement à long terme des animaux ne sont pas bien standardisés. Chez le rongeur, le fait que la maturation cérébrale soit de manière univoque comparable à l'humain, n'est pas établi. La petite taille de l'animal constitue une contrainte pour la surveillance d'autres organes au cours de l'asphyxie contrairement au mouton par exemple ; la maturation néonatale est très rapide et le cerveau du raton est très résistant à l'asphyxie ; enfin durant longtemps, les lésions de la SB ont été difficiles à produire chez le raton ce qui n'est plus le cas. Enfin, chez le cochon la maturation cérébrale est très rapide et sa comparaison à celle de l'humain n'est pas formellement établie.

Même si aucun modèle ne restitue à lui seul l'ensemble des phénomènes observés lors de l'HI périnatale chez l'homme, il est indispensable de continuer à travailler avec cette diversité. En effet, la complexité des anomalies repérées dans cette situation d'asphyxie réside dans sa chronologie, sa durée et sa localisation. C'est la multiplicité des modèles qui a permis les avancées spectaculaires dans la compréhension des phénomènes neuropathologiques, moléculaires et génétiques de l'asphyxie périnatale.

III ETUDE EXPERIMENTALE SUR LE RATON P7/P8

Effet à court terme de l'Erythropoïétine (Epo) sur les lésions cérébrales et expression de l'Aquaporine 4 (AQP4) dans un modèle néonatal d'hypoxie ischémie chez le raton : étude en Imagerie de diffusion et immunohistochimie.

1. INTRODUCTION

Notre travail de recherche clinique (Protocole BIGHIN) nous a permis (cf. infra) d'explorer *in vivo* des marqueurs neuroradiologiques précoces de l'HI périnatale chez le nouveau-né humain. Nous avons souhaité compléter ce travail avec une partie expérimentale axée à la fois sur l'imagerie précoce (comme dans BIGHIN) mais aussi sur la neuroprotection. Notre objectif était de mettre en évidence l'effet de l'Erythropoïétine (Epo) à un temps précoce après l'accident asphyxique et montrer ainsi son efficacité dans une fenêtre de tir proche de la naissance si l'on transpose les travaux à l'homme. L'ensemble des manipulations a été réalisé dans l'unité CNRS UMR 5536 dans le laboratoire de Résonance des Systèmes Biologiques de Jean-Michel Franconi sous la direction de Mme Anne-Karine Bouzier-Sore. L'ensemble des travaux a été rassemblé dans un manuscrit soumis à Journal of Neurochemistry (Annexe 1).

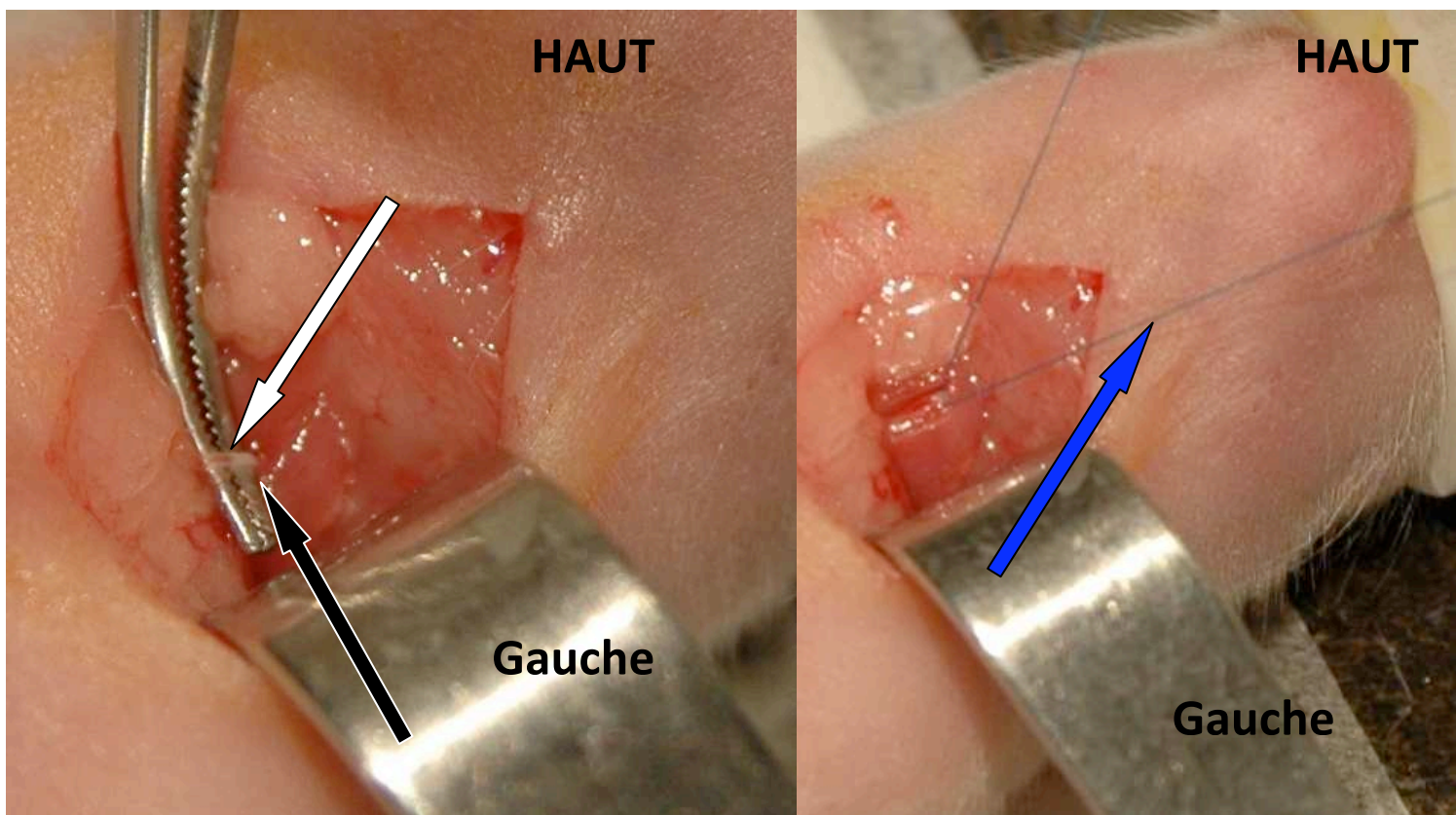
2. MATERIELS ET METHODES

2.1. MODELE ANIMAL

Trente-huit ratons âgés de 7 et 8 jours (P7/P8) ont été divisés en 3 groupes : Groupe I : groupe contrôle (n = 5, 2 P7 et 3 P8); Groupe II : groupe Hypoxique-Ischémique (HI) (Ischémie puis Hypoxie 2 heures, n = 16, 8 P7 et 8 P8) ; Groupe III : groupe HI + Epo (ischémie puis injection intrapéritonéale d'Epo puis Hypoxie 2 heures, n = 17, 8 P7 et 9 P8). Les ratons ont été conditionnés selon le protocole de Vannucci-Rice (Rice et al., 1981). Les ratons étaient anesthésiés avec de l'isoflurane à 4% de concentration à l'induction puis maintenus durant la procédure à 1,5% de concentration. Après une incision médiane au niveau de la partie ventrale du cou sous anesthésie locale (bupivacaïne 0,5%), la carotide commune gauche était repérée et isolée (figure 16) puis ligaturée de façon permanente par un fil Vicryl® 7/0. La durée de l'ensemble de la procédure de ligature n'excédait pas 20 minutes.

Les rats ont été ensuite remis dans leur cage durant une demi-heure avec d'éviter leur refroidissement puis placés dans l'enceinte hypoxique de 840 cm³ (15 x 7 x 8 cm) pendant deux heures dans une atmosphère hypoxique contenant 7,9 à 8,1% d'oxygène (monitorage par un oxymètre Airox© BioMS, Pau, France). La température de l'enceinte était contrôlée et maintenue entre 31 et 33 °C et l'humidité supérieure à 80%. Après 2 heures d'hypoxie, les rats étaient de nouveau remis dans leur cage pendant 30 minutes avant la réalisation de l'IRM. Cette dernière avait donc lieu 3 heures après la ligature.

Figure 16 : instant précédant la ligature de la carotide gauche commune chez un raton P7. La carotide est repérée (flèche noire), isolée et ligaturée par du fil Vicryl® 7/0 (flèche bleue). Noter le sang (flèche blanche) présent dans le vaisseau dont la pulsativité disparaît une fois la ligature réalisée.



2.2. EPO : DOSE ET ADMINISTRATION

L'érythropoïétine recombinante humaine (r-hu-Epo, Eprex® 4000UI/4ml, Janssen-Cilag, Issy-les-Moulineaux, France) a été administrée par voie intrapéritonéale juste après la ligature de la carotide de l'animal et avant l'hypoxie. La dose administrée était de 30.000 UI/kg (soit environ 600 UI/20g). La dose choisie repose sur l'analyse de la littérature (Kellert et al., 2007).

2.3. IMAGERIE DE L'ANIMAL

Pour l'IRM, les rats étaient anesthésiés avec de l'isoflurane® respectivement à 4% de concentration en induction et 1,4% de concentration en entretien par un masque nasal. La température du raton était maintenue grâce à la circulation d'eau chaude dans les bobines de gradients. Le monitoring du raton se faisait grâce à une électrode respiratoire ventrale rattachée au moniteur de surveillance. L'appareil d'IRM était un Spectro-imageur horizontal Bruker Biospec 47/50 (Bruker, Ettlingen, Allemagne) opérant à 4,7 T et piloté par une station Silicon Graphics Indy. Cet appareil est équipé d'un fourreau de gradient additionnel (6 cm de diamètre, type BG-6) d'une puissance maximale de 950mT/m et permettant de réaliser des séquences d'acquisition rapides sur petits animaux. Les mesures ont été réalisées grâce à une antenne (cage de résonance, 80 mm de longueur et 35 mm de diamètre) accordée à 200,3 MHz. Les images cérébrales coronales en séquences T2 ont été obtenues en utilisant des séquences RARE avec les paramètres suivant : 3 coupes de 2mm d'épaisseur, FOV = 2,5 x 2,5 cm, TE = 100 ms, TR = 5000 ms, facteur RARE = 8, matrice = 128 x 128. Les images de diffusion ont été réalisées avec un gradient pulsé type écho de spin avec les paramètres suivant : coupe coronale au niveau des noyaux caudés, épaisseur de coupe 2 mm, FOV = 2,5 x 2,5 cm, TE = 20 ms, TR = 1800 ms, matrice = 128 x 128, 12 directions de l'espace avec valeurs de b de 0 – 400 – 1000 ms, δ = 5ms et Δ = 8,598 ms. La durée de la séquence de diffusion était de 96 minutes.

2.4. ANALYSE DES DONNEES D'IRM

Les images de diffusion et les cartographies d'ADC ont été exportées sur un ordinateur personnel pour analyse des données par le logiciel CCHIPS® sous Linux®. La coupe était chargée par le logiciel. Après la réalisation d'un masque binaire sur la coupe, le logiciel fournissait l'image d'ADC et de FA. L'accident vasculaire cérébral (AVC) était dessiné à main

levée grâce à la souris de l'ordinateur et le logiciel donnait la surface en nombre de pixels. Le logiciel mesurait dans le même temps, au niveau de la surface de l'AVC, la valeur moyenne de l'ADC et de la FA ainsi que les écarts-types. L'unité de mesure de l'ADC est en mm^2/s et le logiciel CCHIPS rendait les résultats en cm^2/s (figure 17). Nous avons calculé la variabilité inter et intraobservateur pour la surface de l'AVC et de fait pour les valeurs de l'ADC et de la FA. Les mesures ont été effectuées par deux opérateurs indépendants (F Villega ; O Brissaud) pour les 10 premiers rats avec trois mesures séparées d'un mois chacune. La variabilité intraindividuelle a été vérifiée selon le même protocole (une mesure à un mois d'intervalle, répétée 3 fois pour les 10 premiers rats). Nous n'avons pas noté de différence significative entre les différents observateurs ou pour le même observateur dans notre étude.

2.5. IMMUNOHISTOCHEMIE

Sur l'ensemble des rats, 15 ont été sacrifiés par décapitation juste après l'IRM (groupe I, $n = 4$; groupe II, $n = 6$; groupe III, $n = 5$). Les cerveaux ont été rapidement prélevés, rincés au PBS (Phosphate-Buffered Saline), fixés par immersion dans du paraformaldéhyde pendant une nuit. Les cerveaux ainsi fixés, avant congélation, ont été rincés dans une solution de PBS-glucose 10%. Des coupes coronales de $20 \mu\text{m}$ ont été réalisées au cryostat 1 mm en avant et 1 mm en arrière de Bregma et conditionnées pour effectuer la détection en immunohistochimie des protéines caspases-3 (Cysteinyl aspartate-specific proteinase-3) et aquaporine-4 (AQP4). Brièvement, les coupes sont postfixées dans du PFA (4% dans PBS, 10 min, 4°C) puis rincées deux fois dans du PBS (10 min) et lavées dans une solution de gélatine-triton (gélatine 2%, triton 0,25% dans PBS, 10 min). Ensuite les coupes sont incubées toute une nuit à température ambiante avec les anticorps primaires anti-aquaporine4 ou anti-caspase3 (anticorps de lapin, Sigma-Aldrich, dilution au $1/500^{\text{ème}}$ dans une solution PBS-sérum d'âne 2%). Après deux rinçages dans le même tampon, les coupes ont été exposées pendant 30 min à 0,3% de peroxyde d'hydrogène et ensuite de nouveau lavées dans du PBS. Les coupes ont ensuite été incubées 90 minutes avec l'anticorps secondaire anti-lapin biotinylé (dilution 1:200, Immunoresearch Jackson Laboratories INC) puis 90 minutes avec un complexes streptavidine-biotine-peroxydase (dilution 1:1000, Vector Laboratories, USA) avec rinçages intermittents. Ensuite, les sections ont été immergées dans une solution saline tamponnée de Tris (0,05 M) pendant 10 min puis dans une solution d'acétate de sodium (0,1 M, $\text{pH} = 6$) pendant 10 min. Les coupes ont alors été

colorées à l'aide de diaminobenzidine (qui prend une couleur brune sous l'activité de la peroxydase) comme chromogène en présence d'ions nickel. Enfin, les coupes ont été séchées à l'air, déshydratées dans des solutions d'éthanol, dégraissées dans le xylène et montées dans du Depex® (Milieu de montage) (VMR International Ltd, Poole, Angleterre). Les sections colorées ont été observées au microscope optique (Nikon Eclipse E400®, Champigny sur Marne, France). Les images ont été capturées par une caméra haute définition CCD (Nikon® DMX1200, Champigny sur Marne, France) et copiées sur un ordinateur personnel. Le traitement des images a été réalisé sur une version PC du logiciel d'imagerie NIH, Scion Image® (Scion, Frederick, MD, USA) à partir d'images enregistrées en niveau de gris en définissant la luminosité et le seuil au-delà duquel la valeur du marquage était considérée comme significative. Une fois établis, ces paramètres restaient inchangés. Les images étaient ensuite converties en images binaires. L'immunomarquage des caspases-3 et des AQP4 a été quantifié dans le cortex somatosensoriel. Le rendu en photomicrographies pour les illustrations a été pris selon les mêmes critères. Le logiciel Adobe Photoshop® CS2 (Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA, USA) a été utilisé pour ajuster le contraste et la luminosité.

2.6. ANALYSES STATISTIQUES

Les résultats sont donnés en moyenne +/- les déviations standards ou médianes. Dans le cadre des analyses sur les images IRM, les comparaisons des surfaces d'AVC et des valeurs moyennes de FA et d'ADC dans les AVC entre les groupes II et III, nous avons utilisé le test-t de Student. Pour l'analyse immunohistochimique, les aires marquées ont été exprimées en pourcentage de la surface totale explorée. La comparaison des groupes II et III en immunohistochimie a été réalisée avec des tests de Mann-Whitney. Un $p < 0,05$ était considéré comme statistiquement significatif.

3. RESULTATS

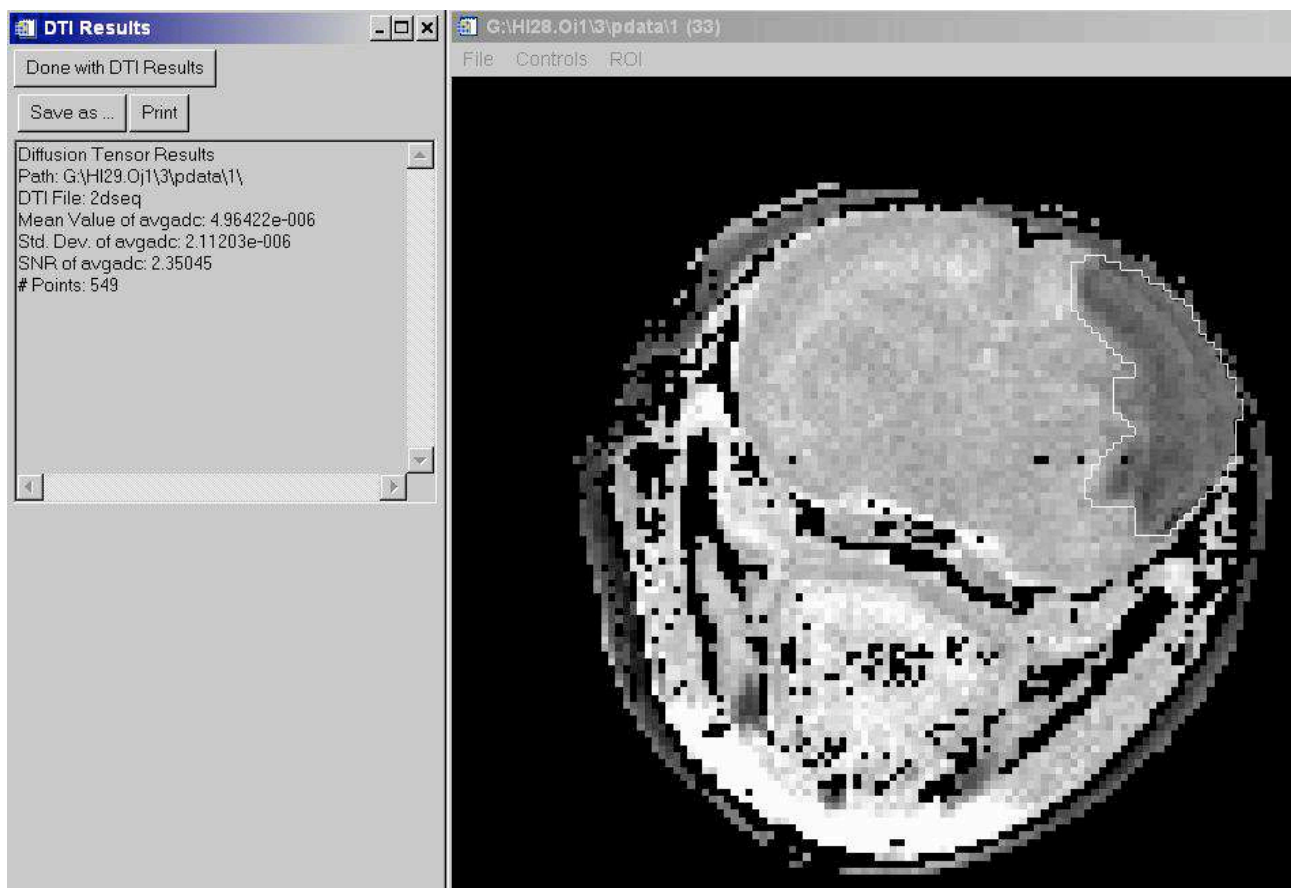
3.1. ANIMAUX

Trente-huit rats ont été inclus dans l'étude. Aucune différence statistique n'a été notée concernant le poids corporel entre les groupes (groupe I: $20,9 \pm 1,6$ g, Groupe II: $19,9 \pm 2,6$ g; Groupe III: $19,4 \pm 1,8$ g).

3.2. EFFETS DE L'EPO

L'AVC apparaît comme un hyposignal facilement identifiable par rapport à l'ensemble du cerveau, permettant de tracer facilement ses limites avec une souris d'ordinateur (figure 17).

Figure 17 : Traitement informatisé des images de diffusion chez les rats P7/8. A droite, on observe l'image paramétrique d'ADC avec l'AVC nettement délimité. A gauche sont inscrits les résultats concernant la région d'intérêt explorée : surface de l'AVC = 549 pixels; valeur moyenne de l'ADC dans l'AVC = 4.96×10^{-6} cm²/s (ADC : Coefficient Apparent de Diffusion de l'eau, AVC : Accident Vasculaire Cérébral).

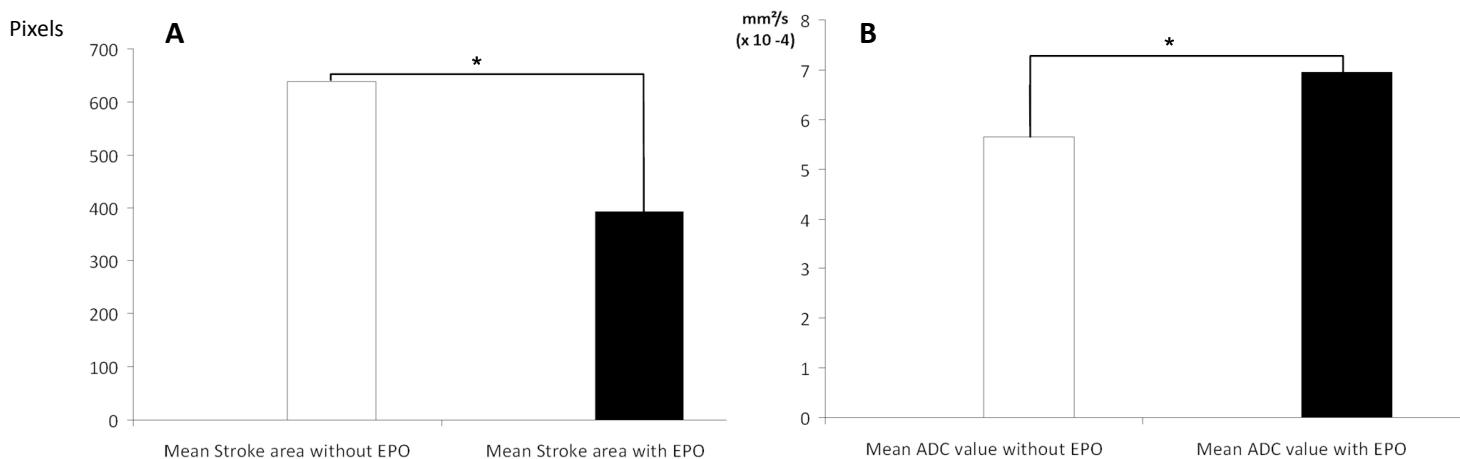


Les comparaisons des surfaces de l'AVC, des valeurs moyennes de l'ADC et la FA dans l'AVC dans les groupes II et III sont présentées dans la figure 18. Les valeurs moyennes de surface d'AVC dans les groupes II et III étaient respectivement de $638,68 \pm 348,76$ pixels et $393,7 \pm 270,5$ pixels ($p = 0,03$), indiquant une plus petite lésion dans le cerveau des rats traités par Epo. Les surfaces des lésions cérébrales sont significativement réduites de 40% lorsque les animaux bénéficiaient d'une injection intra péritonéale de 30 UI/g d'Epo entre la ligature de la carotide et les deux heures d'hypoxie.

Les valeurs moyennes de FA dans les AVC des groupes II et III étaient respectivement de $0,305 \pm 0,065$ et $0,304 \pm 0,06$ ($p = 0,95$). Il n'existe donc aucune différence concernant les valeurs de FA entre les groupes II et III.

Les valeurs moyennes d'ADC dans les AVC des groupes II et III étaient respectivement de $0,565 \times 10^{-3} \pm 0,086 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ et $0,695 \times 10^{-3} \pm 0,06 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ ($p = 0,006$). Par rapport à la valeur moyenne de l'ADC constatée chez les contrôles ($0,99 \pm 0,09 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$) une diminution de 45% était observée dans le groupe II tandis qu'une diminution de seulement 30% était constatée entre le groupe contrôle et le groupe III, indiquant que la chute de la valeur de l'ADC dans la lésion est moindre après administration de l'Epo.

Figure 18 : Comparaison des valeurs moyennes de surface de l'Accident Vasculaire Cérébral (A) et de Coefficient de Diffusion Apparent de l'eau dans l'Accident Vasculaire Cérébral (B) chez les rats traités ou non par Erythropoïétine (EPO) (* $p < 0.05$)

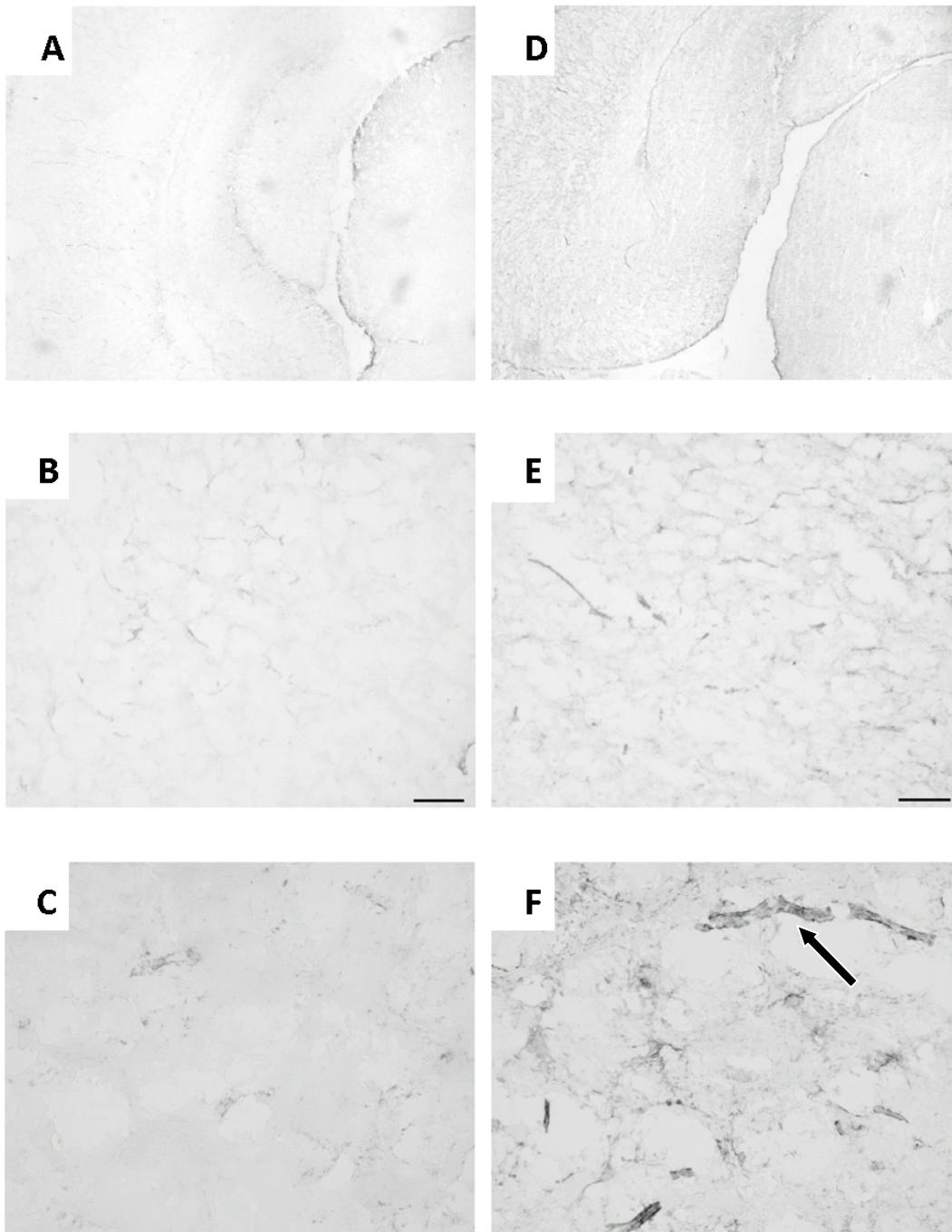


3.3. IMMUNOHISTOCHEMIE

Dans les cerveaux contrôles, le marquage pour la Caspases-3 est absent, tandis que seul un petit nombre d'anticorps anti-caspase-3 a été identifié dans les groupes II et III, sans différence significative entre les deux groupes (figure 19). Cette absence de marquage peut être liée à la précocité de l'observation, le sacrifice des animaux ayant eu lieu 3 heures après l'accident HI. Chez les animaux contrôles, nous avons observé un immunomarquage faible pour l'AQP4 au niveau des plexus choroïdes et du cortex somatosensoriel (Figure 19, A, B et C). Dans les groupes II et III, l'immunomarquage pour les AQP4 était positif particulièrement

autour de petits vaisseaux à la fois dans la substance blanche et la substance grise. Au niveau du cortex somatomoteur primaire homolatéral à la lésion, l'intensité de l'immunomarquage pour les AQP4 est significativement plus élevée dans le groupe III comparé au groupe II (médiane de 4,5% vs 0,5%, $p = 0,01$). En revanche, aucune différence dans l'intensité de l'immunomarquage pour les AQP4 n'a été trouvée entre les groupes II et III dans le cortex controlatéral sain. Au sein du groupe III, nous avons observé une différence significative dans l'immunomarquage pour les AQP4 entre le cortex homolatéral à la lésion et le cortex controlatéral à la lésion avec respectivement une médiane à 4,5% vs 0,6%, $p = 0,028$. Cette différence n'a pas été retrouvée dans le groupe II.

Figure 19 : Immunohistochimie. Photographie microscopique du marquage de l'Aquaporine 4 au niveau du cortex somatomoteur des rats du groupe asphyxique sans Erythropoïétine (A grossissement x2, B x10, C x40) et du groupe asphyxique avec Erythropoïétine (D grossissement x2, E x10, F x40). On note que le marquage est significativement plus important sur les clichés D, E et F et qu'il s'effectue préférentiellement autours de petits vaisseaux cérébraux (flèche noire sur F).



4. DISCUSSION

4.1. CONSIDERATIONS METHODOLOGIQUES

L'évaluation tardive (au-delà de 24 heures) en IRM de diffusion chez le rat nouveau-né HI a déjà été rapportée dans la littérature (Ashwal et al., 2007; Wang et al., 2007; Wang et al., 2006; Yang and Wu, 2007). Nous avons choisi d'explorer les ratons, précocement après l'HI en IRM. Des travaux se sont intéressés à l'évaluation précoce en IRM des lésions causées par l'HI dans des modèles néonataux de rats (Fau et al., 2007; van der Zijden et al., 2008; Wendland et al., 2008). En 1995, Rumpel et al. (Rumpel et al., 1995) ont utilisé l'IRM de diffusion pour explorer le cerveau de rat nouveau-né après un accident HI afin d'en évaluer, à court et à long terme, les conséquences. Ils ont montré que la ligature carotidienne unilatérale maintenant une ischémie de plus de 30 minutes provoque un œdème cytotoxique sans équivoque, suivie d'un œdème vasogénique plus étendu, 12 à 24 heures avant que ne soit visibles les marqueurs histologiques de l'infarctus cérébral. En outre, ils ont confirmé qu'une ligature carotidienne unilatérale à elle seule ne conduit pas à des anomalies cérébrales détectables par l'IRM de diffusion. L'intérêt de cette technique pour détecter les lésions HI dans le cerveau de rats nouveau-nés peu de temps après l'accident a été bien documenté dans l'article de Fau et al (Fau et al., 2007). Cependant, à notre connaissance, aucune publication n'a encore rapporté sur l'évaluation précoce en IRM de diffusion des effets neuroprotecteurs de l'Epo dans un modèle néonatal de rat HI.

4.2. ADMINISTRATION D'EPO ET AVC

De nombreuses études ont rapporté des résultats histologiques ou immunohistochimiques après administration d'Epo dans des modèles néonataux de rats HI (Demers et al., 2005; Kellert et al., 2007; Kim et al., 2008; Kumral et al., 2007; Kumral et al., 2006; Kumral et al., 2003; McPherson et al., 2007; Meng et al., 2006; Pacary et al., 2006; Rumpel et al., 1995; Statler et al., 2007; Sun et al., 2005; van der Kooij et al., 2008; Yis et al., 2008), mais aucune étude n'a encore montré des résultats d'imagerie *in vivo* chez des ratons HI traités ou non par Epo. Chez le rat adulte, l'injection d'Epo (5 U/g), avant et jusqu'à trois heures après une ischémie cérébrale focale, réduit l'atteinte neurologique respectivement de 60 et 55% (Brines et al., 2000). Dans une étude histologique menée par Wang et al. sur des ratons P7, les auteurs ont montré que le volume de l'infarctus était réduit de 50% si l'Epo (10 U/g) était injectée 4 heures avant une ligature des carotides et une hypoxie de 50 minutes (Wang et

al., 2004). Dans cette même étude, les auteurs ont démontré que l'injection de deux doses de 5U/g respectivement 24 heures et 4 heures avant l'ischémie étaient inefficaces en termes de neuroprotection. Cela indique qu'une dose élevée de l'Epo est nécessaire pour obtenir un effet thérapeutique chez les nouveau-nés. Cette donnée a été confirmée par Kellert et al. qui ont déterminé la dose optimale d'Epo à administrer après un accident HI dans un modèle de rats P7 (Kellert et al., 2007). Ils ont montré que l'effet neuroprotecteur de l'Epo était dose-dépendant et que le principal effet a été obtenu pour une dose de 30U/g. Ces données justifient notre choix d'utiliser une dose unique de 30U/g d'Epo. Toutefois, même si des doses élevées d'Epo ont été signalées comme sûres (Kellert et al., 2007; Statler et al., 2007), nous reconnaissons qu'elles n'apparaissent pas compatibles avec des études cliniques chez l'homme.

4.3. ADMINISTRATION D'EPO ET FA DANS L'AVC

Aucune différence n'a été observée entre les valeurs FA des groupes II et III. En mesurant la valeur de la FA dans le cerveau en développement chez le rat, Huang et al. a montré une diminution progressive de cette dernière dans les zones corticales chez les rats sains nouveau-nés à 0, 3, 7, 11 et 19 jours de vie (Huang et al., 2008). Ces données peuvent servir de références en termes de normalité et permettent, par comparaison avec les valeurs de FA trouvées dans un modèle pathologique, la détection d'anomalies dans le développement cortical. Dans cette étude, les valeurs normales de FA dans le cerveau sain du rat nouveau-né P7 étaient de 0,3 à 0,4, des valeurs identiques à celles obtenues dans notre modèle HI. En clinique humaine, Sotak et al. (Sotak, 2002) ont constaté qu'à un stade précoce de constitution des lésions cérébrales HI chez l'homme, les valeurs de FA n'étaient pas différentes de celles de témoins. Cette absence de différence pourrait être due au moment de la réalisation de l'IRM de diffusion peu de temps après les phénomènes asphyxiques. Nos résultats sont concordants avec cette hypothèse car, dans la zone de l'AVC chez nos rats, 3 heures après la ligature de la carotide, les valeurs moyennes de FA dans les groupes II et III étaient égales à 0,3, valeur identique à celle trouvée par Huang (Huang et al., 2008) dans son étude chez le rat sain. La diminution de la valeur de FA survient habituellement plus tard (24 heures après l'agression asphyxique). Une étude récente de Wang et al. (Wang et al., 2008) a décrit les anomalies de la SB en IRM des tenseurs de diffusion au premier jour de vie dans un modèle de rat nouveau-né HI. Les auteurs ont montré que les paramètres de DTI (FA, trace,

λ parallèle et λ perpendiculaire) sont pertinents et utiles dans la caractérisation des lésions de la SB (en termes de gravité des lésions), $\lambda_{||}$ et λ_{\perp} permettant en particulier de différencier les lésions axonales structurelles et/ou fonctionnelles (transport), des anomalies histologiques irréversibles.

4.4. ADMINISTRATION D'EPO ET ADC DANS L'AVC

La cinétique des variations de la valeur de l'ADC chez le rat nouveau-né HI est bien connue (Derugin et al., 2000; Meng et al., 2005; Meng et al., 2006). Meng et al (Meng et al., 2005) ont montré que, dans le cortex cérébral lésé de rats HI, les valeurs d'ADC diminuent précocement après l'accident asphyxique avec une différence statistique entre la lésion et l'hémisphère controlatéral ou les animaux contrôles. Dans cette même étude, les auteurs ont confirmé cette différence statistique 24 heures après l'accident HI. Wang (Wang et al., 2008) a exploré les valeurs d'ADC dans l'hémisphère homolatéral à la lésion asphyxique en les comparant avec celles de l'hémisphère controlatéral afin de prédire au mieux la taille finale de l'AVC dans un modèle HI de rats nouveau-nés. Les auteurs ont considéré que l'observation d'une valeur de l'ADC, 1 à 2 heures après l'accident HI, de 80% inférieure dans l'hémisphère homolatéral à la lésion à celle mesurée dans l'hémisphère controlatéral, correspondait à la valeur la plus fiable pour délimiter la surface finale de l'AVC. Quelques jours à quelques semaines après l'accident asphyxique, les valeurs ADC se pseudonormalisent dans la lésion ; ce phénomène est le reflet de la destruction des tissus entraînant une augmentation de l'isotropie (Meng et al., 2006; van der Zijden et al., 2008). Dans notre étude, les rats ont subi un examen d'IRM de diffusion 3 heures après l'ischémie. Nos données concernant les valeurs de l'ADC pour les rats HI sont conformes à celles observées dans la littérature (van der Zijden et al., 2008; Wang et al., 2008): la valeur moyenne de l'ADC dans l'AVC était significativement plus faible que dans l'hémisphère controlatéral (respectivement $0,565 \pm 0,086 \times 10^{-3}$ vs. $0,98 \pm 0,08 \times 10^{-3}$ $p > 10^{-6}$).

4.5. IMMUNOHISTOCHIMIE : EXPRESSION DES CASPASES-3 ET DES AQP4 DANS LE CERVEAU DES RATONS

Dans notre étude, l'Epo a eu un effet non seulement sur la taille (surface) des lésions cérébrales, mais aussi sur les valeurs de l'ADC au sein de la lésion. Le mécanisme par lequel l'Epo modifie la diffusion de l'eau demeure incertain. Pour tenter d'expliquer les

phénomènes observés (valeur plus élevée de l'ADC dans l'AVC chez les rats traités par Epo), nous avons décidé de chercher la présence de l'AQP4 par immunohistochimie au sein des cerveaux de nos animaux. Les AQP, impliquées dans le contrôle de l'homéostasie et du passage de l'eau à travers la membrane plasmique et la barrière hématoencéphalique, sont des protéines transmembranaires (poids moléculaire environ de 30.000 D). L'AQP4 est principalement exprimée au niveau des pieds des astrocytes péricapillaires et constitue une voie de passage (canal) majeure pour les mouvements d'eau intracérébraux (Badaut et al., 2002; Fu et al., 2007; Gunnarson et al., 2009; Hirt et al., 2009; Nielsen et al., 1997; Tait et al., 2008). Dans notre travail, l'expression des AQP4 est augmentée dans et autour des zones endommagées par l'asphyxie chez les rats traités par Epo et cela dès la troisième heure après l'évènement HI. Plusieurs études ont déjà montré la forte implication de l'AQP4 dans l'œdème cytotoxique et vasogénique au niveau cérébral, dans la migration des cellules gliales et dans la transduction du signal neuronal (Verkman et al., 2006). Tourdias et al, dans une étude récente, ont émis l'hypothèse d'une surexpression des AQP4 dans le cerveau, en réponse à une hydrocéphalie. Cette régulation pourrait participer à l'élimination de l'excès de liquide vers le flux sanguin (Tourdias et al., 2009). Cette étude a été l'une des premières montrant la corrélation entre les modifications de la valeur de l'ADC dans l'œdème périventriculaire en relation avec un phénomène HI et l'expression spatiale et temporelle des AQP4. Les auteurs ont rapporté que plus les valeurs d'ADC en périventriculaire étaient élevées plus l'expression des AQP4 dans cette zone l'était aussi. Nos résultats montrent une association identique entre la valeur moyenne de l'ADC dans l'AVC et l'expression des AQP4 dans le cortex homolatéral à la lésion chez les rats traités par Epo.

Il serait intéressant d'explorer l'expression des récepteurs à l'Epo (Epo-R) chez le rat nouveau-né HI traité par Epo afin d'observer s'il existe une relation positive entre la surexpression des Epo-R et l'expression des AQP4 dans l'hémisphère homolatéral à la lésion, et s'il existe une différence avec l'hémisphère controlatéral (médiation via les Epo-R ou non). Dans le cerveau immature et mature, l'hypoxie peut réguler l'expression de l'Epo et des Epo-R. Une augmentation de l'ARNm de l'Epo et de l'Epo-R a été rapportée dans le cerveau de rongeurs et d'humains après ischémie (Spandou et al., 2004a). Ainsi, l'expression de l'ARNm des Epo-R augmentait de façon spectaculaire immédiatement et jusqu'à 24 heures après l'HI chez les rats asphyxiques tandis qu'aucune modification n'avait été notée chez les rats contrôles. La différence d'expression de l'ARNm pour l'Epo entre les rats exposés et les

contrôles n'apparaît quant à elle qu'au-delà de 24 heures après l'accident asphyxique. Une explication possible de ces résultats pourrait être que les Epo-R sont précocement exprimés lors d'une HI dans le cerveau mais que les protéines endogènes Epo sont, elles, exprimées seulement à partir de la 24^{ième} heure post-accident. Ainsi, l'administration d'Epo exogène (r-hu-Epo) immédiatement après ligature carotidienne, juste avant l'hypoxie et en quantité suffisante pour franchir la barrière hématoencéphalique, pourrait compenser le délai existant entre l'expression des Epo-R et celle de l'Epo endogène expliquant l'action neuroprotectrice de cette molécule dans le cerveau asphyxique.

4.6. LIMITES DE L'ETUDE

Compte tenu de considérations techniques, il n'était pas possible d'explorer plus d'une coupe en IRM de diffusion chez le raton. Nous n'avons donc pas pu évaluer la distribution spatiale de l'ADC et de la FA. Les mesures des valeurs moyennes de FA et d'ADC ont été réalisées uniquement au niveau de l'AVC car il n'était pas possible de créer, avec logiciel utilisé, des masques reproductibles et déplaçables nous permettant de mesurer ADC et FA dans d'autres régions. Ainsi, il aurait été intéressant de mesurer ces paramètres dans des zones en apparence normales sur l'IRM de diffusion ou les séquences pondérées en T2.

5. CONCLUSION

L'Epo a un effet protecteur cérébral chez le raton hypoxique et ischémique, probablement lié à une surexpression des AQP4. Cet effet semble être précoce, alors que les effets neuroprotecteurs de l'Epo, classiquement décrits, sont plutôt tardifs. Un des mécanismes possibles de limitation de l'œdème cérébral en condition asphyxique chez nos ratons ayant reçu de l'Epo pourrait être une meilleure élimination de l'eau du tissu cérébral vers la circulation sanguine grâce à la production accrue d'AQP4. Il serait intéressant d'envisager une étude longitudinale avec les mêmes groupes de ratons et les mêmes explorations radiologiques et immunohistochimiques afin d'observer les effets neuroprotecteurs de l'Epo à long terme.

PARTIE CLINIQUE

Le protocole BIGHIN (Besoin d'Imagerie Généré par l'Hypoxie-Ischémie Néonatale) correspond à l'ensemble du projet de recherche clinique sur l'HI périnatale élaboré dans le cadre de l'appel d'offre interne (AOI) pour la période 2006 – 2008 au CHU de Bordeaux. Son intitulé exact était le suivant : « Étude de la valeur pronostique de l'IRM (incluant l'étude de la Fraction d'Anisotropie) et de la SRM, à l'âge de un an, chez des enfants ayant présenté dans la période périnatale des anomalies pouvant conduire à une encéphalopathie hypoxique-ischémique (EHI) ».

Nous rapportons dans cette troisième partie de la Thèse, la méthodologie du protocole, tel qu'il a été déposé lors de l'AOI. Nous développerons ensuite la mise en place pratique du protocole ainsi que les résultats. Une partie des résultats (à 8 jours) a été soumise pour publication et accepté dans American Journal of Neuroradiology (annexe 2). Nous rappellerons les résultats à 8 jours et donnerons les résultats à 6 mois dans notre population. Une analyse complémentaire (en cours) nous permettra prochainement de produire les résultats à un an pour notre cohorte.

I RESUME DE L'ETUDE

L'objectif principal de cette étude était d'étudier la valeur pronostique sur le **degré d'altération de l'examen neurologique** à l'âge de un an, des anomalies des valeurs de fraction d'anisotropie (FA) et du coefficient apparent de diffusion (ADC) en IRM des tenseurs de diffusion sur des régions d'intérêt (« region of interest » : ROI's) sélectionnées dans le cerveau (bras postérieurs des capsules internes, putamen/pallidum et pédoncules cérébraux) mesurées entre J1 et J8 de vie chez les nouveau-nés ayant présenté une asphyxie périnatale.

Les objectifs secondaires étaient les suivants :

- Etudier la valeur pronostique sur le **degré d'altération de l'examen psychomoteur** observé chez l'enfant à l'âge de un an, des anomalies des valeurs de FA et d'ADC mesurées entre J1 et J8 de vie en IRM des tenseurs de diffusion sur les ROI's sélectionnées chez les nouveau-nés ayant présenté une asphyxie périnatale ;
- Etudier la valeur pronostique sur le **taux global de mortalité** à un an, des anomalies des valeurs de FA et d'ADC mesurées entre J1 et J8 de vie en IRM des tenseurs de

diffusion sur les ROI's sélectionnées de vie chez les nouveaux nés ayant présenté une asphyxie périnatale ;

- Etudier en **spectroscopie par résonance magnétique** la valeur pronostique sur le degré d'altération de l'examen neurologique, de l'examen psychomoteur observé chez l'enfant à l'âge de un an et sur le taux global de mortalité à l'âge de un an :
 - des rapports NAA/Cr, Cho/Cr et Lac/Cr mesurés à la partie supérieure du tronc cérébral entre J1 et J8 de vie en Spectroscopie par Résonance Magnétique (SRM) chez les nouveaux nés ayant présenté une asphyxie périnatale ;
 - des rapports NAA/Cr, Cho/Cr et Lac/Cr mesurés au niveau des NGC entre J1 et J8 de vie en SRM multivoixels (Chemical Shift Imaging : CSI) chez les nouveau-nés ayant présenté une asphyxie périnatale.

II SCHEMA DE L'ETUDE : MATERIELS ET METHODES

Il s'agissait d'une étude exploratoire de marqueurs additionnels aux marqueurs déjà connus dans l'exploration de l'asphyxie périnatale dont le schéma d'étude retenu était celui d'une cohorte observationnelle prospective, monocentrique.

Les enfants éligibles ont été inclus consécutivement pendant une période d'inclusion de 18 mois et ont été pris en charge par le réanimateur en insu des marqueurs étudiés (étude soin courant). Compte tenu de la taille d'étude nécessairement limitée (soit environ trente patients initialement prévus et finalement 25 inclus), cette étude se voulait volontairement exploratoire sur le rôle pronostique que pourraient avoir des marqueurs mesurés en IRM et qui semblaient, au vu de l'expérience clinique, neuroradiologique et de la littérature, potentiellement intéressants en plus des marqueurs et facteurs pronostiques déjà connus.

1. CRITERES D'INCLUSION

- Tous les enfants nés ≥ 37 semaines d'aménorrhée **et** :
- présentant des anomalies pouvant conduire à une EHI définies par :
 - anomalies sévères du monitoring per partum (tracé plat prolongé plus de 30 minutes) ou
 - score d'Apgar < 5 à 5 minutes de vie ou

- o état de mort apparente à la naissance (score d'Apgar < 4) en dehors d'une anesthésie générale ou
- o bradycardie < 80/minutes à 5 minutes de vie ou
- o arrêt cardiocirculatoire ou
- o utilisation d'adrénaline IV ou intra-trachéale.

2. CRITERES DE NON INCLUSION

- Toute souffrance périnatale post-traumatique ou toute infection périnatale avec atteinte du système nerveux central (encéphalite, méningo-encéphalite, méningite) ou
- Processus expansif intracrânien ou
- Instabilité hémodynamique, thermique, respiratoire incompatible avec le transport de l'enfant ou
- Toute anomalie du développement embryonnaire.

3. CRITERE DE JUGEMENT PRINCIPAL

Le critère de jugement principal était le niveau d'altération de l'examen neurologique à un an. Il est mesuré par le score d'Amiel-Tison (Amiel-Tison, 2002). Cette grille permet de classer les enfants en 3 niveaux de gravité sur l'examen neurologique à 1 an :

- Examen neurologique normal ou anomalies mineures ;
- Anomalies neurologiques modérées ;
- Anomalies neurologiques sévères.

La grille d'évaluation neurologique d'Amiel-Tison se définit à chaque examen par l'évaluation d'un certain nombre de paramètres cliniques. Pour chaque item de l'examen neurologique, il est possible de coder différentes valeurs : 0, 1 ou 2. Le code 0 indique l'aspect typique pour l'âge dans les limites de la normale ; le code 1 indique une zone modérément déviante pour l'âge ; le code 2 indique un résultat nettement pathologique. A l'intérieur de chaque section, c'est le code le plus élevé qui est assigné à l'ensemble de la section (autrement dit, ce n'est pas l'addition des codes obtenus pour chaque item à l'intérieur de la section).

4. CRITERES DE JUGEMENT SECONDAIRES

Les critères de jugement secondaires étaient :

- Le développement psychomoteur à 1 an selon la grille d'évaluation du Brunet-Lézine Révisé (BLR). Cette échelle permet de mettre en évidence les capacités motrices générales d'un enfant de 2 à 30 mois, et de dépister précocement certaines anomalies du développement psychomoteur. Elle permet d'obtenir un quotient de développement (score) dont la valeur moyenne est 100 (plus ou moins 15 : écart-type). La catégorisation des enfants à un an s'effectue selon l'écart type par rapport à la normale : ± 1 écart-type : examen psychomoteur normal ; de -1 écart-type à -2 écarts-types (70 à 85) : examen psychomoteur « limite » ; en deçà de 2 écarts-types : examen psychomoteur déviant de manière importante.
- La survie à 1 an.

5. FACTEURS PRONOSTIQUES ETUDIÉS

L'étude a essentiellement étudié les marqueurs neuroradiologiques suivants :

- Les anomalies des valeurs de FA mesurées entre J1 et J8 de vie en IRM des tenseurs de diffusion sur les ROI's sélectionnées à la suite de l'observation de critères prédictifs d'une EHI chez le nouveau-né en période périnatale. Elle n'a pas d'unité car c'est une fraction, c'est une variable de nature quantitative.
- Les anomalies de l'ADC mesurées entre J1 et J8 de vie en IRM des tenseurs de diffusion sur les ROI's sélectionnées à la suite de l'observation de critères prédictifs d'une EHI chez le nouveau-né en période périnatale. Il est mesuré en mm^2/s , c'est une variable de nature quantitative.
- Les modifications des rapports de Lac/Cr, NAA/Cr et Cho/Cr en SRM monovoxel (tronc cérébral) et CSI (NGC) entre J1 et J8 de vie à la suite de l'observation de critères prédictifs d'une EHI chez le nouveau-né en période périnatale.

6. DETERMINANTS DU PRONOSTIC D'ENCEPHALOPATHIE HYPOXIQUE-ISCHEMIQUE

Il s'agit de l'ensemble des données que nous avons recueillies de manière prospective au cours de l'étude BIGHIN, concernant les enfants inclus. Le recueil de données a pu être facilité car nous avons développé un cahier informatisé de recueil (e-CRF) disponible sur une page internet (<https://ssl2.isped.u-bordeaux2.fr/USMR/2006-051/Index.asp?act=1.00>; site de démonstration : mot de passe **DEMO**, login : **BIGHIN**). L'ensemble des déterminants pronostics de cette étude sont décrits ci-dessous :

6.1. CRITERES PERPARTUM

- Perturbations hémodynamiques maternelles ; hématome rétroplacentaire ; procidence du cordon ; circulaire serrée du cordon ; arrêt des mouvements actifs foetaux.
- Anomalies du rythme cardiaque fœtal : Dip 2, rythme micro-oscillant, bradycardie <100'', tachycardie >160'' ; RCIU ; Post-terme.
- Mode de délivrance (voie basse, césarienne) ; type d'anesthésie durant l'accouchement.

6.2. CRITERES CLINIQUES NEONATAUX

- Liquide méconial à la naissance ; Score d'APGAR à 1, 5 et 10 minutes ; notion d'un arrêt cardiocirculatoire à la naissance ; état clinique de l'enfant dans les premières heures.
- Nécessité d'un massage cardiaque externe lors de la réanimation néonatale ; nécessité d'adrénaline intraveineuse ou intra-trachéale ; nécessité d'intubation et la ventilation.
- Existence de convulsions et leur délai par rapport à la naissance ; type de sédation utilisée.

6.3. CRITERES PARACLINIQUES NEONATAUX

6.3.1. Biologiques

- Valeur du pH à l'arrivée en réanimation ou mieux dans les 30 premières minutes suivant la réanimation néonatale ;
- Taux de lactate à J1, J2 et le jour de l'IRM ;
- Taux de TGO et TGP à J1 et J2 ;
- Taux de bicarbonates dans les premières 24 heures.

6.3.2. Electroencéphalographiques

Un EEG informatisé 8 plumes a été réalisé au chevet du patient dans les 24 premières heures, un dans la première semaine et un après l'arrêt de toute sédation depuis 48 heures. Les tracés de fond ont été interprétés par un électroencéphalographe compétent en néonatalogie et selon la classification de Dreyffus-Brisac et Pezzani. L'existence d'activité critique et leur rythme ont été également notés.

6.3.3. Neuroradiologiques

- Echographie transfontanellaire dans les 72 premières heures.
- IRM conventionnelle et de diffusion entre J1 et J8 de vie.

7. ASPECTS STATISTIQUES

7.1. TAILLE DE LA COHORTE

Les anomalies pouvant conduire à une EHI sont de 2 à 8 pour mille naissances vivantes. En réanimation néonatale environ 1/3 de ces enfants décède, 1/3 a des séquelles (dont 2/3 de séquelles lourdes) et 1/3 survit sans séquelle. En considérant ces données, nous avons estimé à environ 55% d'enfants avec des séquelles lourdes ou décédés. S'agissant d'une étude exploratoire, il était difficile de justifier de manière formelle la taille de l'étude. D'après notre expérience de praticien, nous avons proposé le chiffre de 30 à 35 enfants au total qui auraient pu être inclus pendant une période de 12 mois dans notre étude.

7.2. ANALYSE DES DONNEES

L'objectif principal était d'étudier la valeur pronostique sur le degré d'altération de l'examen neurologique à l'âge de un an, des anomalies des valeurs de FA d'une part et de l'ADC d'autre part en IRM des tenseurs de diffusion. La variable d'intérêt était le degré d'altération neurologique (Amiel-Tison) défini par : absence d'anomalie neurologique, anomalies mineures, anomalies neurologiques modérées, anomalies neurologiques sévères.

Compte tenu de la faible taille de la cohorte, il était plus pertinent de proposer deux groupes évolutifs pour analyser l'objectif principal : absence d'anomalie neurologique, anomalies mineures et anomalies neurologiques modérées d'une part et anomalies neurologiques sévères et décès d'autre part. En pratique nous avons, en fait, réalisé la recherche d'une association entre les paramètres neuroradiologiques étudiés et l'évolution des patients. Le même type de démarche a été réalisé avec les objectifs secondaires.

Cependant, afin de comparer l'évolution clinique et en psychomotricité des patients entre le huitième jour de vie et 6 mois de vie, nous avons conservé, et uniquement dans ce cadre-là, une classification à trois niveaux : pas d'anomalie ou anomalie mineures (groupe A), anomalies modérées (groupe B) et anomalies majeures ou décès (groupe C). Nous avons pu ainsi comparer le score d'Amiel-Tison précoce et à 6 mois et également le score d'Amiel-Tison précoce et le score de Brunet-Lézine Révisé à 6 mois.

Les comparaisons entre les variables quantitatives ont été réalisées par des tests exacts de Fisher. Les comparaisons au sein des groupes de patients ont été réalisées selon les paramètres étudiés avec un Wilcoxon Signed-Rank Test for paired sample, un ANOVA ou un Test de Kruskal-Wallis. Les comparaisons entre les données quantitatives et le devenir neurologique à 8 jours et à 6 mois ont été effectuées en utilisant un test non paramétrique de Mann-Whitney. Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel NCSS (Jerry Hintze, NCSS2001, Kaysville, Utah, USA). Un $p < 0,05$ était considéré comme statistiquement significatif. Dans le cadre des tests de Kruskal-Wallis, les différences de médianes étaient considérées comme significatives pour une valeur de $z > 2.39$ (correction de Bonferroni).

Les comparaisons et la recherche d'erreurs inter et intraobservateur pour les mesures des valeurs de FA et d'ADC ont été réalisées en calculant le coefficient de variabilité (Déviation standard/moyenne) en répétant les mesures chez 8 nouveau-nés pour la variabilité

interobservateur et en répétant la mesure trois fois de suite à un mois d'intervalle pour la variabilité intraobservateur.

8. DEROULEMENT DE L'ETUDE

Les inclusions ont débuté en juin 2007. Chaque patient inclus a été suivi sur douze mois et la période d'inclusion a duré 18 mois. Aucun bilan spécifique à l'étude n'a été nécessaire, ni au moment de l'inclusion, ni au cours du suivi. Les patients ont bénéficié de bilans conformes à leur prise en charge médicale standard définie par les médecins de l'unité de réanimation néonatale.

8.1. INCLUSION

L'inclusion dans la cohorte par le réanimateur avait lieu au moment du diagnostic d'anomalies en période périnatale pouvant conduire à une EHI (cf. déterminants du pronostic), après vérification de l'ensemble des critères d'éligibilité. Les parents des enfants dont les données étaient recueillies, ont été informés de l'informatisation des données les concernant et de leurs droits d'accès, d'opposition, et de rectification, par l'intermédiaire d'une note d'information présentée aux parents des patients par voie d'affichage ; une affichette a été placée dans les lieux de prise en charge de ces patients dans le service pour la période considérée. Par ailleurs, même si ce protocole prévoyait un suivi conforme aux recommandations en vigueur pour le suivi des patients atteints de cette pathologie et qu'aucun examen supplémentaire n'était prévu, le recueil du consentement écrit d'un des détenteurs de l'exercice de l'autorité parentale de l'enfant a été demandé après soumission du protocole BIGHIN au CPP. Lors de l'inclusion, le recueil des données qui concernaient les antécédents familiaux et personnels, l'histoire de la maladie, les signes cliniques et biologiques ont été reportés sur l'e-CRF.

8.2. DEROULEMENT DU SUIVI

8.2.1. Suivi post-natal immédiat

8.2.1.1. Généralités

Il a été effectué selon les règles de l'art dans le cadre de la surveillance des enfants asphyxiques. La prise en charge de ces patients n'a pas différée de notre prise en charge habituelle y compris concernant les possibles décisions éthiques qui ont pu émailler le parcours de ces enfants (choix ou non de poursuivre la réanimation par exemple). Les

enfants ont bénéficié des différents prélèvements proposés dans le protocole (cf. déterminants), d'une ETF précoce avec évaluation des vélocimétries sur les artères cérébrales antérieures, d'un EEG comme proposé dans le protocole. Nous avons regretté de ne pas inclure de score de gravité des patients à l'entrée (SNAP II par exemple).

8.2.1.2. Imagerie

8.2.1.2.1. Acquisition des données

Pour la réalisation de l'IRM, les enfants étaient systématiquement pris en charge et transportés jusqu'à l'IRM par le SMUR pédiatrique (transport médicalisé) intubés et ventilés si nécessaire. La société Médipréma® a mis à disposition de l'investigateur pour la durée de l'étude, un ventilateur spécifique pour l'IRM (amagnétique). Ce matériel a été supervisé par le service biomédical avant sa mise en fonction. Durant l'examen IRM, les enfants bénéficiaient d'un monitoring continu avec mesure de la fréquence cardiaque et de la saturation en oxygène (conditions habituelles de surveillance). Le médecin du SMUR pédiatrique restait sur place durant l'examen.

Une IRM cérébrale a été réalisée entre le premier et le huitième jour de vie ; cet examen comprenait :

- une séquence spin écho (SE) en sagittal T1 (temps d'écho (TE)/temps de récupération (TR) : 479/17ms) ;
- Une séquence en axial T1 inversion récupération (TR/Temps d'Inversion/TE : 2097/850/14 ms) ;
- Une séquence turbo SE en axial T2 (TR/TE : 4409/135 ms) et coronal T2 (TR/TE : 4258/130 ms) ;
- Une séquence de diffusion echoplanar (TR/TE : 2367/88 ms; 16 coupes; NSA: 2; valeurs de b : 0/800 s/mm²; épaisseur de coupe: 5 mm; FOV: 250 x 250; Matrice : 112 x 90).
- Une acquisition spectroscopique Chemical Shift Imaging au niveau des NGC et des capsules internes et une acquisition spectroscopique localisée (ou monovoxel) sur la partie supérieure du tronc cérébral ;
- Une séquence IRM des tenseurs de diffusion echoplanar (TR/TE : 7000/81 ms; 40 coupes; NSA : 3; valeurs de b : 0/700 s/mm²; épaisseur de coupe : 2.2 mm; FOV : 176 x 176; Matrice : 80 x 80).

Concernant la SRM, nous avons choisi deux localisations :

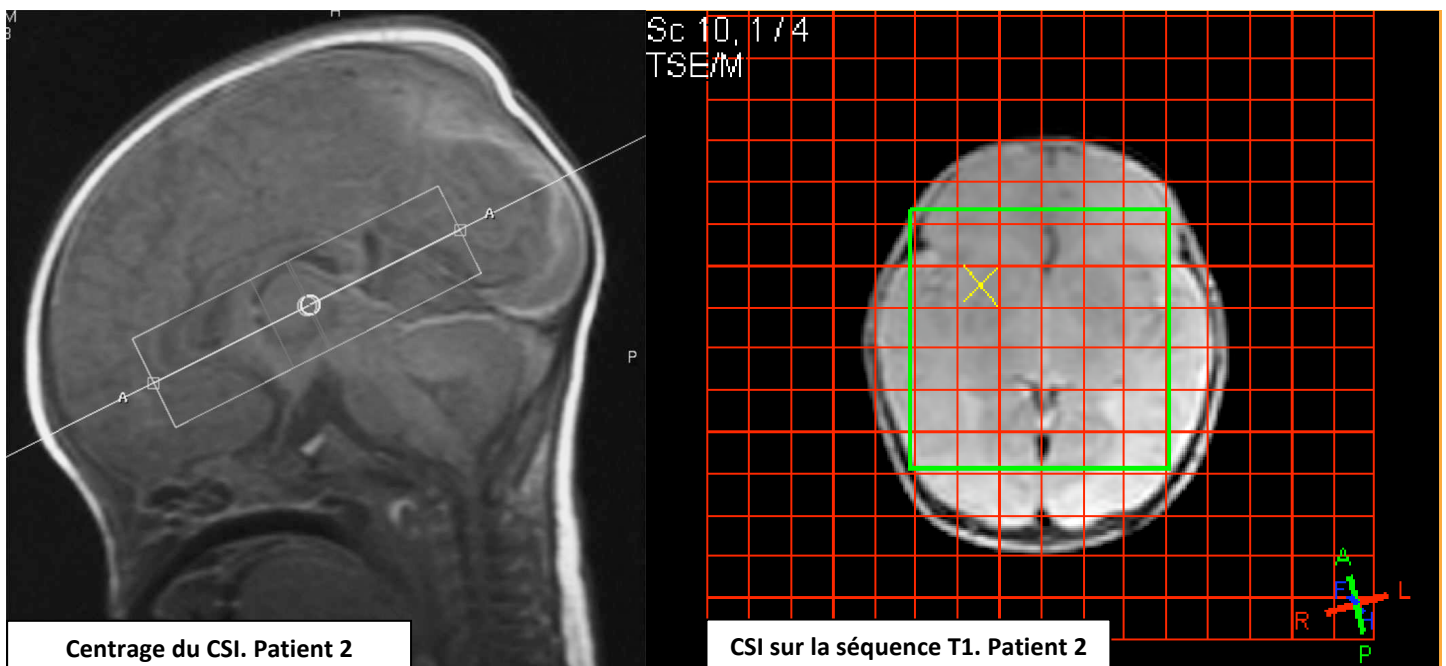
- une localisation monovoxel dont le volume était de $2\text{ cm} \times 2\text{ cm} \times 3\text{ cm}$ soit 12 cm^3 centré sur la partie supérieure du tronc cérébral au niveau des pédoncules cérébraux (figure 20, flèches blanches).

Figure 20 : Centrage du monovoxel. Le rectangle rouge (flèches blanches) correspond au voxel sur à le tronc cérébral dans les 3 plans de l'espace sur la séquence pondérée en T2



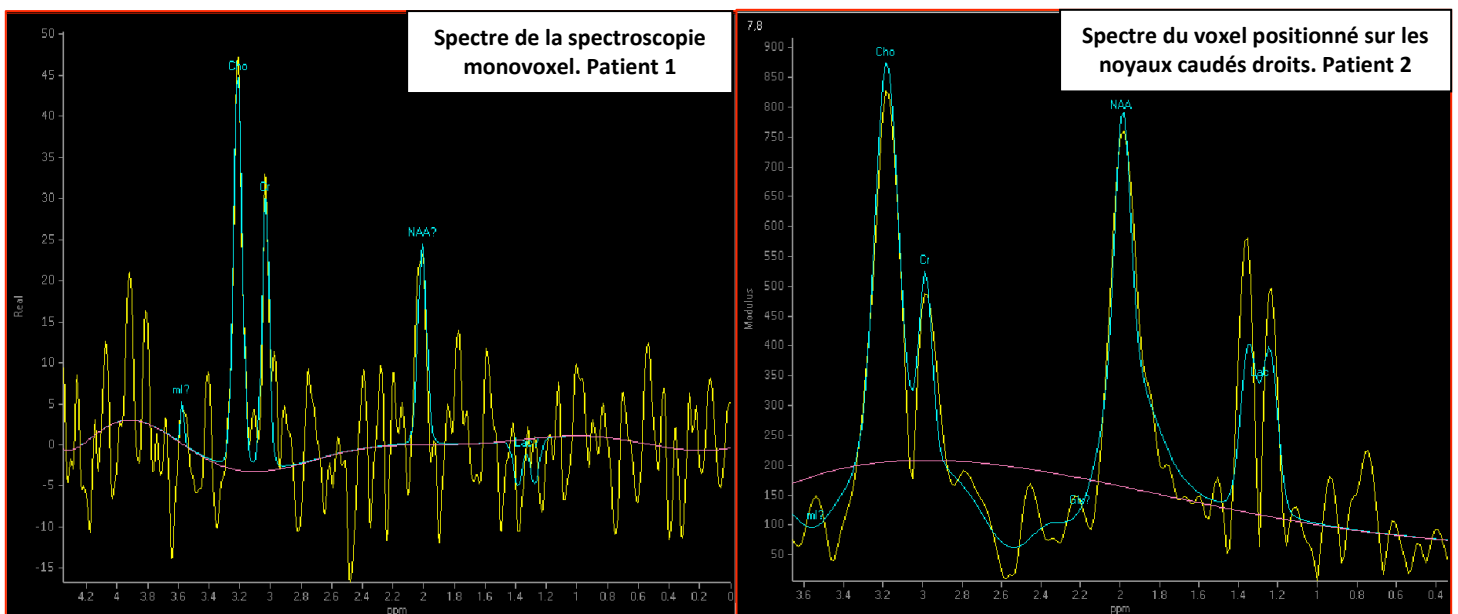
- un plan d'acquisition CSI de $7\text{ cm} \times 7\text{ cm} \times 2\text{ cm}$ soit 98 cm^3 au niveau d'une coupe passant par les noyaux gris centraux (Figure 21)

Figure 21 : Centrage de la SRM multivoxels (CSI): à gauche le centrage au niveau des NGC (rectangle blanc) ; à droite la grille de CSI « posée » sur la séquence pondérée en T1 ; il est possible de choisir d'un « clic » de souris d'ordinateur, le voxel pour lequel on souhaite observer le spectre (croix jaune).



La sélection du volume étudié était réalisée selon le mode PRESS. Nous avons choisi d'utiliser un TE long, de 136 ms et un TR à 2000 ms. La séquence de SRM monovoxel et de CSI duraient respectivement 4 mn et 8 mn 30 sec. chacune. Le nombre de voxels obtenus par le CSI étaient de 36 voxels, les 18 voxels centraux étant correctement analysables. Le choix des spectres correspondant aux voxels localisés sur les putamen et pallidum était effectué manuellement lors du post traitement (figure 22).

Figure 22 : à gauche : spectre acquis sur le tronc cérébral, patient 1 ; à droite : spectre localisé au niveau du striatum droit (croix jaune sur la figure 21), patient 2.



La séquence de DTI durait 6 minutes et l'ensemble de l'examen dans l'IRM n'excédait pas 45 minutes.

8.2.1.2.2. Traitement secondaire des données

8.2.1.2.2.1. IRM conventionnelle et diffusion conventionnelle

Les images ont été analysées par un radiologue senior expérimenté dans l'interprétation des images IRM du cerveau néonatal en condition normale et asphyxique (JFC). Cet opérateur était en aveugle non seulement de l'état clinique des patients mais aussi des analyses réalisées sur les images de DTI. Le score d'imagerie a été établi à partir de l'analyse des images conventionnelles et de diffusion conventionnelle. Ce score (qui va de 0 à 22 ; 22 étant le niveau de gravité le plus élevé) a été réalisé en accord avec les données de la littérature concernant les anomalies observées en IRM conventionnelle et de diffusion chez

le nouveau-né asphyxique (Brissaud et al., 2005; Meyer-Witte et al., 2008). Plus le score était élevé, plus le niveau d'altération neurologique était grand (tableau 6).

8.2.1.2.2. *Spectroscopie par Résonance Magnétique (SRM)*

Les spectres ont été automatiquement traités sur la console de l'IRM au niveau de la station de travail. Le logiciel de post-traitement, après filtration, phasage et modélisation mathématique (« fit ») du spectre, fournissait les valeurs des ratios du NAA, de la Choline et du Lactate par rapport à la Créatine (aire sous la courbe). Les mesures ont été effectuées sur la partie supérieure du tronc cérébral, à droite et à gauche au niveau des putamen et pallidum. Le choix des spectres en CSI a été réalisé par deux opérateurs (OB, JFC) au cours d'une seule et même séance et tous les spectres ont été analysés le même jour.

Tableau 6: Score IRM (Brissaud et al., 2005; Meyer-Witte et al., 2008) et son codage pour le calcul (NGC : noyaux gris centraux). Chaque item est côté selon les cas 0, 1 ou 2 (B, C, D, E, G, H, J, K et L) ou bien 0 ou 2 (A) ou bien encore 0 ou 1 (I). La somme de la valeur de chaque item constitue le score IRM :

A	Œdème cérébral : 0 non ; 2 oui
B	Différentiation gris/blanc : 0 Présente; 1 absente dans une localisation; 2 absente dans plus d'une localisation
C	Hyperintensité en séquence T1 sur les bras postérieurs des capsules internes 0 Normal; 1 faiblement diminué; 2 absent
D	Hyperintensité en séquence T1 sur les NGC et les thalami: 0 Présente; 1 absente dans une localisation; 2 absente dans plus d'une localisation
E	Hyperintensité en séquence T2 sur les NGC et les thalami: 0 Présente; 1 absente dans une localisation; 2 absente dans plus d'une localisation
F	Anomalies du tronc cérébral en séquences T1 ou T2: 0 Non; 1 oui
G	Anomalies corticales en séquences T1 ou T2: 0 Non; 1 une localisation; 2 plus d'une localisation
H	Pétéchies dans la substance blanche : 0 Non; 1 une localisation; 2 plus d'une localisation
I	Hémorragies sous-arachnoïdiennes : 0 Non; 1 oui
J	Anomalies de la substance blanche en séquences de diffusion ; 0 Non; 1 une localisation; 2 plus d'une localisation
K	Anomalies des NGC en séquence de diffusion: 0 Non; 1 une localisation; 2 plus d'une localisation
L	Anomalies corticales en séquence de diffusion : 0 Non; 1 une localisation; 2 plus d'une localisation

8.2.1.2.2.3. Post-traitement de l'acquisition DTI

Nous avons utilisé deux types de post-traitements pour la DTI :

- Un post-traitement dit « *à priori* » et qui constitue l'essentiel du travail de calcul pour l'ensemble des données DTI rapportées dans ce travail. Il a été réalisé avec le logiciel PRIDE© (Philips®).
- Un post-traitement dit « sans *a priori* » que nous avons utilisé essentiellement pour l'observation du devenir des patients à 6 mois et qui a servi, d'une certaine manière, à valider la méthodologie « *a priori* ». En effet, les zones choisies « *a priori* » du fait de leur sensibilité à l'HI en période périnatale sont bien celles que le modèle « sans *a priori* » rapporte comme présentant une association entre les marqueurs étudiés et le devenir des patients. Nous avons utilisé pour cette méthodologie le logiciel FSL®.

Méthodologie PRIDE

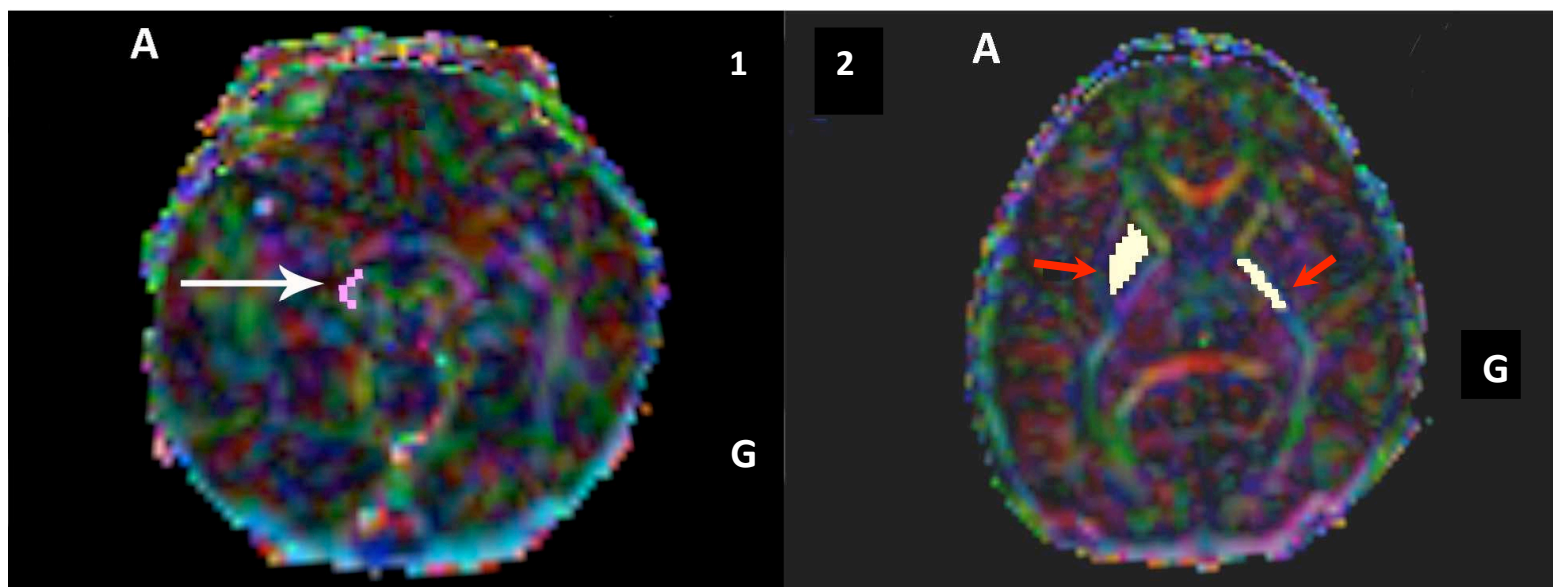
Les données de DTI ont été post-traitées après transfert des fichiers x.PAR et x.REC sur un ordinateur personnel. La quantification des valeurs d'ADC et de FA a été réalisée en utilisant le logiciel PRIDE fiber-tracking tool (Philips Research Integrated Development Environment, Best, the Netherlands). L'image couleur de DTI a été définie à partir des valeurs de FA (cf. chapitre I) et selon la méthode de Pajevic and Pierpaoli (Pajevic and Pierpaoli, 1999). Le positionnement des voxels pour l'analyse était réalisé directement sur la carte de FA (repérage des faisceaux selon le code couleur), comme cela avait déjà été décrit dans la littérature (Wakana et al., 2004), par deux opérateurs (OB, MA) en insu de l'état clinique des patients et de leur devenir. Les Régions d'intérêt choisies ont été les suivantes:

- Les bras postérieurs des capsules internes (BPCI) : l'image était choisie au niveau des NGC et où l'angle entre les deux BPCI était le plus aigu ;
- Les Putamen et Pallidum (PP) : sur la même coupe que celle ayant servi au positionnement des voxels pour les BPCI ;
- Les pédoncules cérébraux (PC) : nous avons d'abord repéré la coupe anatomique où les PC étaient les mieux visibles ; nous avons affiné le positionnement des voxels entre les colliculi inférieurs et supérieurs. Nous avons ensuite positionné les voxels sur la carte de FA.

Le logiciel PRIDE permettait dans le même temps de mesurer les valeurs de FA et d'ADC dans les ROI's sélectionnées, à droite et à gauche. Il donnait les valeurs moyennes de ces

paramètres ainsi que les écarts-types et le nombre total de voxels sélectionnés. Les régions choisies pour le positionnement des voxels l'ont été pour leur vulnérabilité particulière à l'asphyxie périnatale (BPCI et PP). Le positionnement des voxels sur les cartes de FA (figure 23 ; 1 & 2) a été réalisé selon deux méthodes de traçage : « *single point* » pour les PC (positionnement voxel par voxel sur la carte de FA ; flèche blanche, image 1) et « *manual* » pour les PP et les BPCI (positionnement d'un trait ou d'une surface à main levée sur la carte de FA ; flèches rouges, image 2). Le choix d'explorer les PC a été motivé par l'existence de données pertinentes observées dans des séries d'adultes traumatisés crâniens et l'absence de données néonatales en condition d'asphyxie.

Figure 23 : Carte de FA avec positionnement des voxels sur le pédoncule cérébral droit (image 1 flèche blanche), le putamen/pallidum droit et le bras postérieur de la capsule interne gauche (flèches rouges, image 2) (A : antérieur, G : gauche)



Méthodologie FSL

Le logiciel FSL (FMRIB [Functional Magnetic Resonance Imaging of the Brain] Software Library) est une bibliothèque complète d'outils d'analyse pour l'IRM fonctionnelle et les données d'imagerie cérébrale DTI. FSL permet de comparer entre elle les images d'une cohorte de sujets après une normalisation. Cette comparaison peut se faire soit *a priori* en définissant les zones que l'on souhaite explorer soit *sans a priori* : le logiciel compare alors

entre elles les images et détermine les degrés de différence des valeurs moyennes de FA ou de l'ADC existant sous forme de code couleur. Les cartes de FA et d'ADC sont construites à partir du logiciel FSL. Ce logiciel dispose d'un algorithme de recalage non linéaire utilisant FNIRT (FMRIB's Nonlinear Image Registration Tool) pour recaler les différentes cartes sur un cerveau de référence. Une fois tous les cerveaux dans le même espace de travail, deux types d'analyses peuvent être conduites :

- Une analyse statistique voxel-à-voxel des valeurs de FA et d'ADC dans la SB sur l'ensemble des cerveaux en utilisant le module TBSS de FSL (Tract-Based Spatial Statistics),
- Une analyse par région d'intérêt, consistant à placer sur les cerveaux recalés des masques correspondants aux ROI's choisies et d'extraire pour tous les sujets la valeur moyenne de la FA ou de l'ADC à l'intérieur de ces régions.

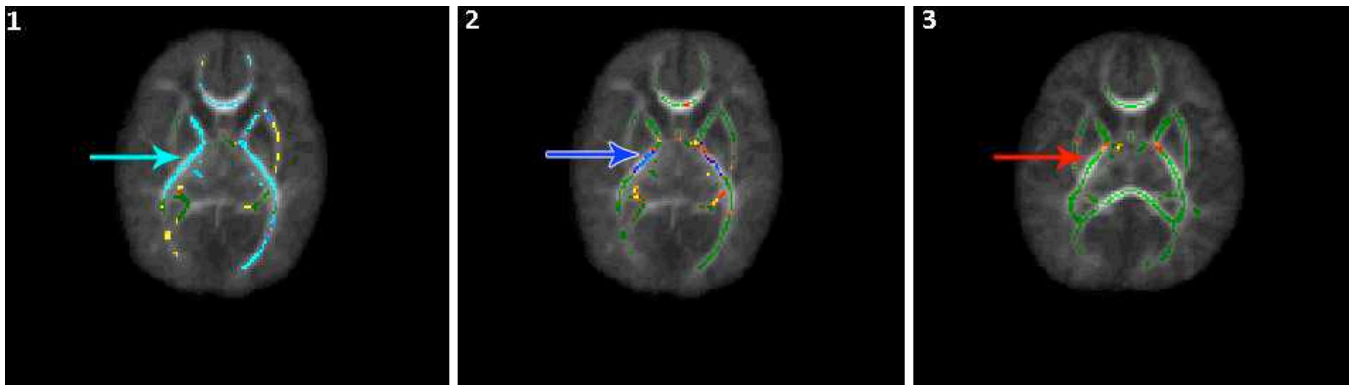
Ces outils statistiques permettent de transformer les données quantitatives numériques comparatives (comparaison de moyenne, régression linéaire) en une donnée qualitative visuellement représentée par des couleurs (squelette de FA ou squelette d'ADC). Les différentes couleurs et leur intensité sur les squelettes obtenus dépendent de la robustesse et la significativité de l'analyse statistique.

En pratique, la couleur du squelette peut être vert (pas d'association significative), aller du rouge au jaune (échelle « chaude », association significative non corrigée des comparaisons multiples), ou allant du bleu foncé au bleu clair (échelle froide, association statistiquement significative corrigée des comparaisons multiples, de plus en plus forte). La figure 24 montre trois situations de significativité décroissante au niveau des capsules internes. Le bleu clair correspond à la significativité la plus forte.

Dans notre étude, les explorations avec FSL ont été faite exclusivement sur la SB. Cette technique permet de visualiser les zones où il existe une association significative entre l'altération des valeurs des paramètres mesurés en DTI (FA/ADC) et soit le devenir neurologique des patients selon le score d'Amiel-Tison (deux groupes, comparaison de moyenne), soit le devenir en psychomotricité selon le score de BLR (variables continues, régression linéaire).

D'un point de vue strictement statistique, un $p < 0,05$ correspond au bleu foncé. Plus la corrélation est forte plus le bleu est clair.

Figure 24 : exemple de mesure par TBSS sous FSL et représentation couleur des résultats.



Les trois exemples ci-dessus montrent

- 1 : le degré d'association entre la valeur de l'ADC et la valeur du BLR chez les patients BIGHIN au niveau des BPCI. Cette corrélation est forte (bleu clair, flèche bleu clair) ; plus l'ADC est élevé, plus le BLR est élevé.
- 2 : la comparaison des moyennes des valeurs de l'ADC au niveau des BPCI entre les patients du groupe A et du groupe B. Il s'agit de la probabilité pour que les patients du groupe A aient une valeur moyenne de l'ADC supérieure dans ces zones à celle des patients du groupe B. La significativité est bonne (bleu foncé, flèche bleue foncée).
- 3 : le degré d'association entre la valeur de la FA et la valeur du BLR chez les patients BIGHIN au niveau des BPCI. Cette association est absente (vert, flèche rouge).

8.2.2. Suivi d'observation clinique et de consultation dans la première année

Les suivis faisant l'objet d'un recueil de données ont compris une visite réalisée au 8^{ième} jour de vie ou aussi rapidement que possible après que l'enfant ait été extubé et la sédation diminuée, puis des visites respectivement à 3 mois, 6 mois, 9 mois et 12 mois. Le suivi des enfants a continué après l'étude selon les recommandations standards. Les consultations sur les deux premières années se sont organisées de la façon suivante :

8.2.2.1. Consultations Médicales

Les enfants ont été suivis cliniquement en service de réanimation compte tenu de leur état clinique (intubation-ventilation) puis en service de néonatalogie tout au long de leur hospitalisation. Un examen médical dans la première semaine de vie et au plus tard une

semaine après l'extubation a été effectué par le médecin investigateur coordonnateur (score d'Amiel-Tison).

Le rythme de surveillance médicale a suivi, ensuite, au cours de la première année, le calendrier suivant : entre 2 et 3 mois, entre 5 et 6 mois, entre 8 et 9 mois et entre 11 et 12 mois.

Après la première année, le rythme de surveillance dépendait de l'état clinique de l'enfant et de l'orientation de ce dernier. Une consultation pouvait être envisagée à 18 mois et une dernière à 24 mois. Ces consultations permettaient une appréciation clinique précise de l'enfant, de son développement global et neurologique.

Le score d'Amiel Tison a permis de classer les enfants soit en deux soit en trois groupes tout au long de leur évaluation clinique (cf. aspects statistiques). Un compte rendu codifié et reproductible pour chaque enfant a été réalisé à chaque consultation détaillant organe par organe l'examen réalisé (neurologique, cardiovasculaire, pulmonaire etc.). L'ensemble des données était rapporté dans le cahier électronique d'observation (e-CRF). La nécessité de réaliser une nouvelle IRM face à des observations cliniques non expliquées par l'imagerie initiale pouvait être discutée entre le 12^{ième} et le 24^{ième} mois.

8.2.2.2. Consultations de Psychomotricité

Une surveillance par un examen de psychomotricité avec l'échelle d'évaluation du BLR était réalisée au cours des 2 premières années. Il a été proposé 4 évaluations psychomotrices couplées à la consultation du pédiatre selon le même calendrier : entre 2 et 3 mois, entre 5 et 6 mois, entre 8 et 9 mois et entre 11 et 12 mois. Les détails de la classification des enfants en psychomotricité ont été déjà expliquées dans le chapitre « schéma de l'étude » : ± 1 écart-type : examen psychomoteur normal ; de -1 écart-type à -2 écarts-types (70 à 85) : examen psychomoteur limite ; en deçà de 2 écarts-types : examen psychomoteur déviant de manière importante. Ces 4 évaluations ont été rapportées dans l'e-CRF.

8.2.2.3. Autres

Tous les acteurs participants à la prise en charge des enfants ayant présenté des anomalies en période périnatale pouvant conduire à une EHI pouvaient être à un moment ou un autre, sollicités pour intervenir auprès du patient (kinésithérapeute, psychologue, rééducateur fonctionnel etc.). Leur sollicitation a été faite en fonction de l'état clinique de l'enfant et

selon les règles de bonnes pratiques de prise en charge des enfants ayant présenté une anoxie périnatale à l'Hôpital des Enfants de Bordeaux.

III. RESULTATS ET DISCUSSION

Nous allons dans ce chapitre décrire les résultats de notre travail (données épidémiologiques globales de la population étudiée, résultats précoces à 8 jours de vie et résultats à 6 mois de vie). Nous avons choisi dans un souci de cohérence dans la rédaction de ce travail de réaliser les discussions respectivement après les résultats précoces et les résultats à 6 mois.

1. DONNEES EPIDEMIOLOGIQUES DE NOTRE POPULATION DE PATIENTS

Le tableau 7 résume les données descriptives épidémiologiques des patients inclus dans le protocole BIGHIN. Vingt-cinq nouveau-nés ont été inclus prospectivement dans l'étude, dont 10 garçons ; le poids de naissance moyen était de 3195 +/- 573 grammes (médiane 3070 grammes) ; l'âge gestationnel moyen était de 39,4 +/- 9,5 semaines d'aménorrhée (médiane : 40 SA). Treize enfants sont nés par voie basse (dont deux avec aide de spatules), les autres par césarienne (48 %). Les patients ont bénéficié de leur IRM en moyenne au 4^{ième} jour (+/- 2 jours, médiane 4 jours). Le score médian d'Apgar était de 1 [0- 6] à une minute et 5 [0-10] à 5 minutes. La valeur médiane du score de Sarnat était de 3. Neufs enfants (36%) ont présenté un arrêt cardiaque et 10 enfants ont reçu de l'épinéphrine. Quinze enfants (60 %) ont présenté des crises convulsives dans les 48 heures qui ont suivi la naissance.

2. RESULTATS A 8 JOURS DE VIE ET DISCUSSION

L'essentiel des résultats précoces ont été rapporté dans un article accepté pour publication dans American Journal of Neuroradiology (annexe 2). A 8 jours de vie ou le plus tôt possible après l'extubation des patients et la diminution de la sédation, les résultats concernant l'évaluation neurologique selon le score d'Amiel-Tison avec une classification en deux groupes sont les suivants : groupe A : 19 patients (10 filles, 9 garçons) ; groupe B : 6 patients (5 filles, 1 garçon). La classification avec 3 niveaux de gravité donnait les résultats suivants : groupe A : 9 patients (6 filles, 3 garçons); groupe B : 10 patients (4 filles, 6 garçons) ; groupe C : 6 patients (5 filles, 1 garçon). Sur l'ensemble de notre cohorte, 5 patients sont décédés en moyenne à 9,2 +/- 7 jours (médiane 6 jours). Ces patients décédés ont toujours été inclus

dans les calculs pour les comparaisons avec le score d'Amiel-Tison (catégorie B pour la classification en deux groupes et catégorie C pour la classification en trois groupes). Ils n'ont pas été inclus, naturellement, dans les calculs réalisés lors des comparaisons avec le score de BLR.

2.1. RESULTATS A 8 JOURS

2.1.1. IRM conventionnelle et de diffusion et devenir précoce à J8

L'analyse descriptive de l'imagerie conventionnelle (incluant la diffusion, cf. score IRM, tableau 6) est rapportée dans le tableau 8. La perte partielle ou totale de l'hyperintensité physiologique en séquence T1 des bras postérieurs des capsules internes (21 enfants) et les anomalies diffuses de la SB en séquence de diffusion (19 enfants) étaient les anomalies les plus fréquemment retrouvées. La présence d'un œdème cérébral et d'anomalies pétéchiales de la SB étaient rares (4 enfants seulement pour chacune de ces anomalies dans notre série). Neufs enfants présentaient des anomalies du tronc cérébral. Le score IRM moyen était de 6,52 +/- 4,6 (médiane 6 ; [1 – 18]).

Aucune association statistiquement significative n'a été retrouvée entre la valeur du score IRM et celle du score d'Apgar à 5 minutes ou le score de Sarnat. Par contre, la valeur du score IRM médian était significativement différente entre les deux groupes évolutifs à 8 jours : 4 dans le groupe A et 10 dans le groupe B ($p=0,03$).

Tableau 7 : Principales caractéristiques épidémiologiques des 25 patients inclus dans le protocole BIGHIN (PN : poids de naissance ; ScSa : Score de Sarnat ; AT : Amiel-Tison ; ND : non réalisé)

Cas	Jour de l'IRM	Sexe	Poids naissance	Age gestationnel (semaines + jours)	Histoire anténatale	Accouchement	Apgar 1 mn	Apgar 5 mn	Arrêt cardiaque	Utilisation d'épinéphrine	Crise convulsive	ScSa	AT J8 2 niveaux	AT J8 3 niveaux	AT 6 mois 2 niveaux	AT 6 mois 3 niveaux
1	6	F	3050	41 + 2	Liquide méconial (LM)	Voie basse	1	5	OUI	NON	OUI	3	B	C	B	C
2	5	F	3000	41 + 3	Anomalie du rythme cardiaque fœtal (ARCF)	Voie basse	1	1	NON	OUI	OUI	3	B	C	B	C
3	4	F	3730	40 + 2	ARCF, LM	Césarienne	3	10	NON	NON	OUI	2	A	B	A	A
4	3	F	3070	40	Rétention tête dernière, siège, circulaire cordon	Voie basse, Spatules	1	3	NON	NON	NON	2	A	A	A	A
5	5	F	3040	40 + 5	ARCF, LM	Voie basse, Spatules	2	9	NON	NON	OUI	3	A	B	B	C
6	2	F	4000	39	circulaire cordon	Voie basse	0	ND	OUI	OUI	NON	3	A	A	A	A
7	4	M	2380	39	ARCF, retard de croissance intra-utérin	Césarienne	6	7	NON	NON	OUI	2	A	B	B	C
8	3	M	3620	41	Aucune	Voie basse	2	8	OUI	NON	OUI	1	A	A	A	A
9	4	M	3760	40	Dystocie des épaules, LM	Voie basse	1	3	NON	NON	OUI	3	A	B	A	A
10	5	M	3510	40	ARCF	Césarienne	0	ND	NON	OUI	OUI	3	B	C	B	C
11	5	M	2800	39	ARCF	Césarienne	5	8	NON	NON	NON	1	A	B	A	A
12	8	F	2620	37	LM	Césarienne	3	7	NON	NON	OUI	2	A	B	A	A
13	6	F	3700	41	ARCF	Voie basse	3	3	NON	NON	OUI	3	B	C	B	C
14	5	M	3450	39 + 2	circulaire cordon	Voie basse	1	5	NON	NON	OUI	2	A	B	A	A
15	7	F	3000	40	LM	Voie basse	0	0	OUI	OUI	OUI	2	A	B	A	A
16	4	F	2575	37+4	Aucune	Voie basse	0	ND	OUI	OUI	NON	3	A	A	A	A
17	3	F	2570	37	ARCF	Césarienne	2	6	NON	NON	NON	3	A	A	A	A
18	3	M	4480	40+4	Aucune	Césarienne	1	4	NON	NON	NON	3	A	A	A	A
19	1	F	3100	40+2	ARCF	Césarienne	0	0	OUI	OUI	NON	3	B	C	B	C
20	1	F	3000	38	ARCF, circulaire cordon	Césarienne	1	1	OUI	OUI	NON	3	B	C	B	C
21	1	M	3570	38+1	ARCF	Voie basse	2	10	OUI	OUI	OUI	2	A	B	A	B
22	7	M	3794	39	ARCF	Césarienne	0	3	OUI	OUI	OUI	3	A	B	A	B
23	6	F	2560	41+3	ARCF	Voie basse	5	7	OUI	OUI	NON	2	A	A	A	A
24	3	M	3450	38+2	Aucune	Césarienne	1	2	NON	NON	OUI	3	A	A	A	B
25	1	F	2050	38	Retard de croissance intra-utérin	Césarienne	2	6	NON	NON	NON	2	A	A	A	A

Tableau 8: Résultats du score IRM pour les 25 patients inclus dans le devenir à 8 jours

Cas	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	Total	Devenir
1	2	2	2	1	0	1	2	0	0	2	0	0	12	B
2	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	2	0	4	B
3	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	A
4	0	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	3	A
5	0	1	0	0	0	0	1	0	0	2	1	2	7	A
6	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2	A
7	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	A
8	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	4	A
9	0	0	1	0	2	1	0	0	1	2	0	0	7	A
10	2	0	2	0	2	1	2	0	1	2	2	2	16	B
11	0	0	0	1	1	1	0	2	0	2	0	0	7	A
12	0	0	1	2	0	1	1	2	0	1	0	1	9	A
13	2	2	2	0	2	1	2	0	1	2	2	2	18	B
14	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	4	A
15	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	A
16	0	0	2	2	0	0	0	2	1	2	0	0	9	A
17	0	0	2	2	0	0	0	0	0	2	0	0	6	A
18	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	A
19	0	0	2	0	0	0	0	0	0	2	2	0	6	B
20	0	1	0	0	2	0	1	0	0	2	2	0	8	B
21	0	1	1	1	0	0	1	0	1	2	0	1	8	A
22	0	0	2	2	2	0	2	0	1	2	2	0	13	A
23	0	0	1	1	0	0	0	0	0	2	0	0	4	A
24	0	0	0	2	2	1	0	0	0	2	2	0	9	A
25	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2	0	0	3	A

2.1.2. SRM et devenir précoce à J8

Les valeurs obtenues pour les patients ayant bénéficié d'une SRM sont récapitulées dans le tableau 9. Vingt-trois patients ont donc été inclus dans cette analyse car 2 patients sur 25 n'ont pas eu de SRM (raisons techniques). Nous avons comparés les valeurs des ratios obtenus en fonction de l'évolution précoce des patients à 8 jours (Amiel-Tison) dans les différentes zones explorées. Les résultats sont rassemblés dans le tableau 10. Il existait une association statistiquement significative entre la valeur des ratios du lactate et le devenir des patients dans toutes les régions explorées avec un ratio plus élevé chez les patients classés B (anomalies majeures ou décès). Au niveau des putamen/pallidum, les ratios de la Choline étaient plus élevés chez les patients ayant une mauvaise évolution (groupe B). Cette observation n'était pas retrouvée au niveau du tronc cérébral. Enfin concernant les ratios du NAA, seuls les putamen/pallidum à gauche montraient un ratio plus élevé statistiquement chez les patients ayant une évolution favorable (groupe A). Cette observation n'était pas

constatée au niveau des putamen/pallidum droits et du tronc cérébral. Lorsque l'on réalise la moyenne des valeurs des ratios à droite et à gauche, l'ensemble des ratios présentait une association significative avec le devenir du patient : ratios du lactate plus élevés, ratios de la choline plus élevés et ratio du NAA plus bas pour les patients du groupe B vs groupe A avec un p respectivement à 0,03, 0,002 et 0,002.

Tableau 9 : Résultats en SRM au niveau du tronc cérébral et des putamen/pallidum (AT : Amiel-Tison ; A : évolution neurologique favorable, B évolution neurologique défavorable ou décès).

Patients	Tronc cérébral			putamen/pallidum Droits			putamen/pallidum Gauches			Devenir J8 (AT)
	NAA/Cr	Cho/Cr	lac/Cr	NAA/Cr	Cho/Cr	lac/Cr	NAA/Cr	Cho/Cr	lac/Cr	
1	0,50	1,72	0,17	0	6,03	0,76	0,63	7,56	3,43	B
2	0,78	1,62	0,24	X	X	X	0,64	5,18	0,36	B
3	1,43	2,99	0,42	4,33	4,33	0,78	2,92	3,55	0,19	A
4	1,06	2,42	0,25	0,59	1,24	0,06	1,3	2,3	0,15	A
5	2,7	10,65	0,07	0,97	1,89	0,27	0,7	0,92	0,25	A
6	0,73	3,2	0,3	1,88	2,41	0,1	1,88	2,24	0,14	A
7	0,94	1,71	0,06	4,20	5,94	0,74	2,78	2,12	0,04	A
8	1,05	1,64	0,16	1,40	2,02	0,04	1,52	2,45	0	A
9	1,22	2,04	0,72	1,58	4,11	0,42	0,69	2,26	0,28	B
10	0,7	2,54	0,17	1,09	2,11	0,14	0,85	2,39	0,19	A
11	0,53	1,35	0,52	0,91	2,34	0,51	0,95	2,15	0,42	A
12	1,68	4,5	0,55	0,42	3,46	0,86	0,75	4,49	1,57	B
13	1,32	2,03	0,12	1,88	3,14	0,08	1,45	2,53	0,13	A
14	0,86	1,04	0,28	1,99	2,81	0,21	1,66	2,49	0,18	A
15	0,72	1,43	0,02	1,47	2,37	0,25	1,79	3,64	0,2	A
16	1,01	5,58	0,21	0,86	3	0,19	0,86	1,92	0,13	A
17	1,04	1,88	0,54	0,72	4,16	3,1	0,79	3,75	2,26	B
18	0,84	1,64	0,38	1,98	3,34	1,18	1,52	2,76	0,86	B
19	1,17	2,29	0,29	1,39	2,18	0,06	1,29	2,5	0,05	A
20	1,2	2,17	0,14	1,25	2,06	0,35	0,7	1,16	0,19	A
21	1,85	2,47	0,62	X	X	X	X	X	X	A
22	1,16	2,43	0	X	X	X	X	X	X	A
23	1,08	2,09	0,03	0,74	1,16	0,15	1,88	2,89	0,46	A

NAA : N Acétyl-Aspartate ; Cr : créatine ; Cho : Choline ; lac : lactate ; P : patients ; X : examen non disponible

Tableau 10 : Comparaison des résultats obtenus en SRM sur le tronc cérébral et les putamen/pallidum avec le devenir neurologique précoce des nouveau-nés (score d'Amiel-Tison ; A : évolution neurologique favorable ; B évolution neurologique défavorable ou décès)

Tronc cérébral						
	NAA/Cr	p	Cho/Cr	p	Lac/Cr	p
	Moyenne (médiane) +/- DS		Moyenne (médiane) +/- DS		Moyenne (médiane) +/- DS	
A	1,15(1,06) +/-0,5	0,6	2,82(2,29) +/-2,25	0,34	0,21(0,17) +/-0,17	0,03
B	1,01(0,94) +/-0,4		2,23(1,8) +/-1,12		0,43(0,46) +/-0,2	

putamen/pallidum droits						
	NAA/Cr	p	Cho/Cr	p	Lac/Cr	p
	Moyenne (médiane) +/- DS		Moyenne (médiane) +/- DS		Moyenne (médiane) +/- DS	
A	1,66(1,39) +/-1,13	0,23	2,6(2,34) +/-1,2	0,007	0,26(0,19) +/-0,24	0,003
B	0,94(0,72) +/-0,82		4,22(4,11) +/-1,07		1,26(0,86) +/-1,06	

putamen/pallidum gauches						
	NAA/Cr	p	Cho/Cr	p	Lac/Cr	p
	Moyenne (médiane) +/- DS		Moyenne (médiane) +/- DS		Moyenne (médiane) +/- DS	
A	1,5(1,45) +/-0,68	0,01	2,35(2,39) +/-0,72	0,008	0,18(0,18) +/-0,12	0,001
B	0,84(0,72) +/-0,34		4,33(4,12) +/-1,91		1,46(1,21) +/-1,22	

putamen/pallidum moyenne droits/gauches						
	NAA/Cr	p	Cho/Cr	p	Lac/Cr	p
	Moyenne (médiane) +/- DS		Moyenne (médiane) +/- DS		Moyenne (médiane) +/- DS	
A	1,58(1,34) +/-0,87	0,03	2,47(2,32) +/-0,75	0,002	0,22(0,189) +/-0,14	0,002
B	0,86(0,7) +/-0,5		4,35(3,96) +/-1,41		1,28(1,11) +/-1,28	

NAA : N Acétyl-Aspartate ; Cr : créatine ; Cho : Choline ; lac : lactate ; P : patients ; D : devenir ; DS : Déviation Standard

2.1.3. DTI et devenir précoce à J8

2.1.3.1. Analyse descriptive

L'ensemble des valeurs de DTI sur les régions explorées est rapporté dans le tableau 11. La variabilité intraobservateur pour les mesures de FA et d'ADC était $< 3\%$; la variabilité interobservateur pour ces mêmes paramètres était $< 4\%$, $< 5\%$ et $< 4\%$ respectivement pour les BPCI, les putamen/pallidum et les pédoncules cérébraux. Le nombre médian de voxels positionnés sur les BPCI était 16 [12 – 24] à gauche et 18 [11 – 33] à droite. Le nombre médian de voxels positionnés sur les putamen/pallidum était de 80 [46 – 110] à gauche et 76 [48 – 101] à droite. Le nombre médian de voxels positionnés sur les pédoncules cérébraux était de 9 [4 – 15] à gauche et de 9 [5 – 14] à droite. Aucune différence significative n'a été mise en évidence dans la mesure de valeurs moyennes de FA et d'ADC entre la droite et la gauche pour une région d'intérêt déterminée.

2.1.3.2. Association entre les données néonatales et les valeurs mesurées en DTI

Nous avons défini deux groupes en fonction de l'Apgar à 5 minutes : groupe bon Apgar (valeur > 5) et groupe mauvais Apgar (valeur ≤ 5). Ce dernier avait une valeur moyenne de l'ADC statistiquement plus basse au niveau des BPCI et des putamen/pallidum (capsule interne droite $p = 0,05$; capsule interne gauche $p = 0,002$; putamen/pallidum droits $p = 0,05$; putamen/pallidum gauches $p = 0,01$) mais pas des pédoncules cérébraux. Aucune association significative n'a été trouvée entre le score d'Apgar à 5 minutes et les valeurs moyennes de FA. Aucune association n'a non plus été observée entre la valeur du score de Sarnat et les paramètres mesurés en DTI (FA et ADC).

2.1.3.3. Association entre les valeurs des paramètres mesurés en DTI et le devenir neurologique à 8 jours

Les résultats sont synthétisés dans le tableau 12. La valeur moyenne de la FA était significativement plus basse au niveau des bras postérieurs des capsules internes et pédoncules cérébraux (mais pas des putamen/pallidum) chez les patients du groupe B comparativement à ceux du groupe A. La valeur moyenne de l'ADC était significativement plus basse au niveau des BPCI et putamen/pallidum (mais pas des pédoncules cérébraux) chez les patients du groupe B comparativement à du groupe A.

Tableau 11 : Résultats (IRM des tenseurs de diffusion) des valeurs moyennes mesurées de Fraction d'Anisotropie (FA) et de Coefficient Apparent de Diffusion de l'eau (ADC ; $\times 10^{-3}$ mm/s²) pour chacun des 25 patients du protocole BIGHIN dans les régions d'intérêt.

Cas	bras postérieurs capsules internes droites		bras postérieurs capsules internes gauches		Moyennes		putamen/pallidum droits		putamen/pallidum gauches		Moyennes		péduncules cérébraux droits		péduncules cérébraux gauches		Moyennes	
	FA	ADC	FA	ADC	FA	ADC	FA	ADC	FA	ADC	FA	ADC	FA	ADC	FA	ADC	FA	ADC
1	0,28	0,67	0,21	0,72	0,25	0,69	0,14	0,73	0,11	0,71	0,13	0,72	0,21	2,22	0,27	1,50	0,24	1,86
2	0,38	0,77	0,36	0,75	0,37	0,76	0,13	0,80	0,12	0,78	0,12	0,79	0,33	1,45	0,24	1,52	0,29	1,48
3	0,40	1,14	0,44	1,10	0,42	1,12	0,12	1,14	0,13	1,15	0,12	1,15	0,33	1,80	0,39	1,50	0,36	1,65
4	0,47	1,10	0,41	1,06	0,44	1,08	0,18	1,14	0,13	1,13	0,15	1,14	0,39	1,46	0,33	1,42	0,36	1,44
5	0,33	1,07	0,45	1,00	0,39	1,04	0,14	1,11	0,14	1,06	0,14	1,08	0,37	1,46	0,37	1,07	0,37	1,27
6	0,45	1,19	0,37	1,13	0,41	1,16	0,15	1,29	0,16	1,28	0,15	1,28	0,38	1,67	0,35	1,32	0,37	1,49
7	0,44	1,15	0,42	1,12	0,43	1,14	0,12	1,20	0,13	1,19	0,13	1,20	0,38	1,93	0,39	1,31	0,38	1,62
8	0,47	1,16	0,50	1,10	0,48	1,13	0,19	1,15	0,20	1,13	0,19	1,14	0,41	1,26	0,39	2,03	0,40	1,64
9	0,45	1,06	0,51	1,03	0,48	1,05	0,15	1,14	0,16	1,11	0,15	1,13	0,43	1,26	0,44	1,08	0,44	1,17
10	0,41	0,73	0,46	0,70	0,43	0,72	0,13	0,88	0,18	0,84	0,16	0,86	0,30	1,71	0,32	1,51	0,31	1,61
11	0,42	1,14	0,49	1,12	0,46	1,13	0,17	1,29	0,19	1,25	0,18	1,27	0,38	1,61	0,35	1,33	0,37	1,47
12	0,46	0,96	0,46	0,97	0,46	0,97	0,15	1,09	0,15	1,11	0,15	1,10	0,26	1,36	0,26	1,41	0,26	1,38
13	0,42	0,60	0,45	0,54	0,44	0,57	0,21	0,59	0,20	0,56	0,20	0,58	0,31	0,64	0,29	0,72	0,30	0,68
14	0,55	1,08	0,53	1,07	0,54	1,08	0,15	1,17	0,17	1,15	0,16	1,16	0,42	1,52	0,38	1,39	0,40	1,45
15	0,50	1,10	0,50	1,09	0,50	1,10	0,20	1,11	0,18	1,12	0,19	1,12	0,42	1,81	0,38	1,55	0,40	1,68
16	0,47	1,15	0,47	1,14	0,47	1,14	0,14	1,26	0,15	1,28	0,14	1,27	0,38	1,59	0,36	1,78	0,37	1,59
17	0,48	1,13	0,46	1,10	0,47	1,12	0,15	1,26	0,15	1,28	0,15	1,27	0,35	1,16	0,37	1,20	0,36	1,18
18	0,51	1,10	0,43	1,07	0,47	1,08	0,14	1,22	0,15	1,16	0,15	1,19	0,44	1,37	0,45	1,35	0,44	1,36
19	0,44	0,57	0,34	0,56	0,39	0,56	0,16	0,54	0,18	0,54	0,17	0,54	0,33	0,89	0,39	1,07	0,36	0,98
20	0,42	0,71	0,40	0,74	0,41	0,73	0,12	0,90	0,13	0,90	0,13	0,90	0,39	1,31	0,31	1,53	0,35	1,42
21	0,57	1,05	0,48	1,09	0,53	1,07	0,18	1,19	0,15	1,18	0,17	1,19	0,40	1,03	0,41	1,51	0,40	1,27
22	0,47	1,09	0,43	1,05	0,45	1,07	0,16	1,18	0,14	1,19	0,15	1,19	0,53	1,43	0,42	1,48	0,47	1,45
23	0,44	1,07	0,45	1,08	0,44	1,07	0,15	1,16	0,14	1,14	0,15	1,15	0,34	1,18	0,36	1,59	0,35	1,39
24	0,43	1,14	0,38	1,07	0,40	1,11	0,14	1,15	0,19	1,13	0,16	1,14	0,33	1,22	0,30	1,54	0,32	1,38
25	0,50	0,88	0,53	0,85	0,51	0,87	0,15	0,98	0,15	0,99	0,15	0,99	0,36	1,00	0,40	1,15	0,38	1,08
Moyenne	0,45	0,99	0,44	0,97	0,44	0,98	0,15	1,07	0,16	1,05	0,15	1,06	0,37	1,41	0,36	1,39	0,36	1,40
DS	0,06	0,20	0,07	0,19	0,06	0,19	0,02	0,21	0,03	0,21	0,02	0,21	0,06	0,35	0,06	0,26	0,05	0,25

Tableau 12: comparaison des valeurs de FA et d'ADC au niveau des régions d'intérêt explorées avec l'évolution neurologique à 8 jours de vie (score d'Amiel-Tison)

		Groupe A	Groupe B	p
		évolution favorable J8	évolution défavorable J8	
Bras postérieurs	ADC Droit (moyenne (médiane) +/- DS)	1.101 (1.115) +/- 0.071	0.676 (0.692) +/- 0.079	0.00002
	ADC Gauche (moyenne (médiane) +/- DS)	1.074 (1.082) +/- 0.068	0.665 (0.706) +/- 0.093	0.00002
capsules internes	FA Droite (moyenne (médiane) +/- DS)	0.461 (0.458) +/- 0.057	0.391 (0.413) +/- 0.057	0.006
	FA Gauche (moyenne (médiane) +/- DS)	0.457 (0.455) +/- 0.047	0.369 (0.378) +/- 0.091	0.02
Putamen	ADC Droit (moyenne (médiane) +/- DS)	1.177 (1.162) +/- 0.077	0.74 (0.763) +/- 0.14	0.00002
	ADC Gauche (moyenne (médiane) +/- DS)	1.163 (1.153) +/- 0.08	0.722 (0.749) +/- 0.14	0.00002
Pallidum	FA Droite (moyenne (médiane) +/- DS)	0.151 (0.149) +/- 0.019	0.148 (0.134) +/- 0.32	0.49
	FA Gauche (moyenne (médiane) +/- DS)	0.155 (0.150) +/- 0.021	0.154 (0.156) +/- 0.035	0.74
Pédoncules	ADC Droit (moyenne (médiane) +/- DS)	1.391 (1.369) +/- 0.265	1.370 (1.376) +/- 0.565	0.91
Cérébraux	ADC Gauche (moyenne (médiane) +/- DS)	1.4 (1.367) +/- 0.26	1.3 (1.5) +/- 0.339	0.85
	FA Droite (moyenne (médiane) +/- DS)	0.382 (0.383) +/- 0.033	0.312 (0.316) +/- 0.058	0.006
	FA Gauche (moyenne (médiane) +/- DS)	0.385 (0.381) +/- 0.043	0.3 (0.3) +/- 0.05	0.003

2.2. DISCUSSION SUR LES RESULTATS A 8 JOURS ET LA NEUROIMAGERIE

2.2.1. Imagerie conventionnelle

Comme cela a déjà été montré (Brissaud et al., 2005; Liauw et al., 2008; Meyer-Witte et al., 2008), le score IRM incluant l'IRM conventionnelle et l'imagerie de diffusion présente une association significative avec le devenir précoce des nouveau-nés asphyxiques à 8 jours de vie. Une publication récente de Liaw et al (Liauw et al., 2008) supporte l'idée d'utiliser ce genre de scores pour évaluer les lésions en contexte HI périnatal.

2.2.2. La SRM

Nos résultats sont intéressants et en accord avec ce qui décrit dans la littérature. Nous avons montré que les ratios du lactate quelle que soit la zone explorée (tronc cérébral, putamen/pallidum) sont d'autant plus élevés que le patient présente un état neurologique mauvais, apprécié sur le score d'Amiel-Tison à 8 jours de vie. Les résultats concernant les ratios de NAA sont plus difficile à interpréter car l'association significative entre un ratio élevé et un devenir bon à 8 jours n'est pas constante selon les régions explorées. C'est le cas pour les putamen/pallidum à gauche mais pas à droite, ni sur le tronc cérébral. Lorsque l'on ne fait pas la distinction droite-gauche sur les putamen/pallidum (moyennage des valeurs), les ratios de NAA sont alors associés significativement et positivement à un devenir neurologique meilleur. Pour la choline, les résultats sont plus constants que ceux du NAA, avec une association significative au niveau des putamen/pallidum à droite comme à gauche mais pas sur le tronc cérébral. Cependant, compte tenu de grands écarts de mesure concernant les ratios de la Choline dans notre étude, il faut rester prudent car les résultats peuvent être sujets à caution. Certains semblent en effet aberrants.

La littérature concernant la SRM chez le nouveau-né ayant présenté une souffrance asphyxique est riche. Cependant si des données sont disponibles sur les valeurs des différents ratios examinés chez le nouveau-né asphyxique dans les premiers jours de vie, la littérature ne cherche pas à corrélérer ces valeurs au devenir précoce du patient dans la première semaine de vie. Chez le nouveau-né ayant présenté une souffrance asphyxique néonatale, le rapport Lac/Cr est augmenté (Chateil, 1999; Huppi and Barnes, 1997; Malik et al., 2002; Robertson et al., 2000) et sa valeur dans les 18 premières heures est corrélée au développement psychomoteur à 1 an (Huppi and Barnes, 1997). D'autres auteurs ont montré une élévation du rapport Lac/Cho dans les NGC à la phase aiguë dans les premiers

jours de vie (Barkovich et al., 1999). Une étude récente sur 16 nouveau-nés ayant présenté une HI périnatale (10 contrôles) rapporte également une augmentation statistiquement significative des ratios du lactate dans les thalami dans cette population comparée aux contrôles (Cheong et al., 2006). Les recommandations récentes Nord-Américaines précisait qu'un ratio Lac/Cr >1 dans les 18 premières heures de vie au niveau des NGC en CSI était plus souvent retrouvé chez des nouveau-nés présentant une EHI que les témoins. D'autres études ont confirmé l'élévation des ratios du lactate (Lac/Cr, Lac/NAA, Lac/Cho) chez les enfants présentant une EHI dans les 15 jours suivant la naissance (Ment et al., 2002). Les valeurs du NAA/Cho ou NAA/Cr sont abaissées dans la souffrance HI mais ces différents ratios semblent avoir de la valeur au-delà des premiers jours de vie (Barkovich et al., 1999; Cheong et al., 2006; Robertson et al., 2000). Il existe une corrélation entre la baisse de ces ratios mesurés à 8 ou 15 jours de vie et le devenir neurologique ultérieur, corrélation qui n'existe pas si ces ratios sont calculés dans les 8 premiers jours de vie (Huppi and Barnes, 1997). Boichot et al ont montré que les nouveau-nés présentant dans les NGC une concentration de NAA inférieure à 4 mmol/L sur une SRM réalisée entre le deuxième et le douzième jour de vie, avait une évolution neurologique mauvaise avec une sensibilité de 94% et une spécificité de 93% (Boichot et al., 2006). La littérature rapporte donc aussi des valeurs abaissées des ratios du NAA dans les premiers jours de vie comme dans notre étude. On peut s'interroger sur la signification de ce type de résultats. Une explication possible à nos résultats concernant cette baisse mesurée précocement des ratios du NAA, est le fait que l'agression asphyxique soit survenue en anténatal. Une autre explication pourrait être qu'en définitive, l'atteinte neuronale est peut-être plus précoce que ne le laisse supposer certains auteurs qui estiment qu'il faut attendre au moins la fin de la première semaine pour voir ces ratios diminuer.

Concernant la choline, nos résultats montrent un taux significativement plus élevé chez les patients du groupe B à droite comme à gauche si l'on s'intéresse au devenir à 8 jours. Shu et al (Shu et al., 1997) ont eux observé dans leur série hétérogène de patients (37 nouveau-nés, cf. supra) que les ratios Cho/Cr au niveau pariétal et occipital étaient corrélés au devenir neurologique à 15 mois des patients. Cependant l'analyse précise de valeur des ratios pour chaque patient concernant la Choline nous fait entrevoir l'hypothèse que certaines mesures aberrantes (très élevées) par difficulté du logiciel à calculer l'aire sous la courbe (difficulté à bien individualiser les pics de choline et créatine) pourraient altérer les résultats.

2.2.3. L'imagerie des tenseurs de diffusion

Dans notre étude, nous avons montré que la valeur de l'ADC et sa variation au niveau des putamen/pallidum BPCI (mais pas des pédoncules cérébraux) dans les premiers jours suivant une asphyxie périnatale semblent être un marqueur sensible pour évaluer le devenir neurologique précoce de ces enfants par le score d'Amiel-Tison. Plus la valeur ADC dans ces régions est basse, pire est le devenir neurologique à 8 jours. Nos résultats sont cohérents avec la littérature. Hunt et al (Hunt et al., 2004) chez 28 nouveau-nés asphyxiques ont montré que la valeur de l'ADC au niveau des bras postérieurs des capsules internes était significativement plus élevée chez les patients survivants que chez les nouveau-nés décédés. Barkovich et al (10 nouveau-nés HI)(Barkovich et al., 2006) and Wolf et al (13 nouveau-nés HI)(Wolf et al., 2001) ont rapporté une diminution importante et précoce de la diffusion de l'eau chez les nouveau-nés HI (jusqu'à 60% en comparaison des contrôles) dans des zones bien spécifiques cérébrales (faisceaux cortico-spinaux et les thalami). Vermeulen and al (Vermeulen et al., 2008) ont eu aussi mis en évidence l'intérêt de mesurer la valeur de l'ADC particulièrement au niveau des BPCI pour définir le pronostic neurologique de ces enfants à l'âge de 2 ans. Les auteurs proposent même une valeur seuil d'ADC dans cette région ($0,85 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$) en dessous de laquelle le devenir neurologique est compromis. Dans notre étude, tous les nouveau-nés inclus dans le groupe B à 8 jours avaient une valeur d'ADC inférieure à $0,8 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ au niveau des BPCI et à $0,9 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ au niveau des putamen/pallidum. Plus récemment, Liauw et al (Liauw et al., 2009) chez 24 nouveau-nés HI, ont mesuré les variations des valeurs d'ADC dans des régions sans anomalies visibles en IRM conventionnelle ou de diffusion. Leurs résultats suggèrent l'existence d'altérations neurologiques tissulaires même si l'IRM apparaît normale, en particulier au niveau des NGC et du tronc cérébral.

Bartha et al (Bartha et al., 2007) ont exploré chez 14 nouveau-nés sains les paramètres DTI (FA et ADC) dans la SB (radiations optiques, faisceaux cortico-spinaux, SB postérieure et frontale) et la SG (NGC, thalami, cortex occipital), permettant de disposer de valeurs de référence. Il faut noter que la littérature est pauvre concernant l'évaluation des variations de la mesure des valeurs de FA chez les nouveau-nés asphyxiques dans des zones spécifiques cérébrales. Ward et al (Ward et al., 2006) chez 20 nouveau-nés asphyxiques, ont observé que la FA et l'ADC étaient des marqueurs neuroradiologiques pertinents : la FA restait basse tandis que l'ADC se « pseudonormalisait » au cours du temps. La diminution de la FA dans

leur série concernait les enfants que présentait une EHI sévère avec atteinte des NGC et de la SB mais aussi ceux ayant une EHI modérée. Les auteurs suggéraient lors que la FA pourrait être, comparativement à l'ADC, un marqueur discriminant pour les EHI modérées (surtout en cas de valeurs d'ADC normales). Nous n'avons pas, dans notre travail réalisé d'étude longitudinale avec contrôle dans le temps des IRM cérébrales de nos patients.

Malik and al (Malik et al., 2006) ont montré que la FA était initialement diminuée chez des nouveau-nés asphyxiques, et augmentait progressivement entre la fin de la première semaine de vie et la 12^{ième} semaine de vie postnatale. Dans notre étude, nous avons montré que les valeurs de FA mesurées au niveau des BPCI et des pédoncules cérébraux (mais pas des putamen/pallidum) étaient associées significativement avec le devenir neurologique précoce des nouveau-nés ; plus la valeur de FA était basse dans ces régions, plus mauvais était le devenir neurologique des nouveau-nés. Nous avons aussi montrés une différence d'association entre la valeur de l'ADC et de la FA au niveau des pédoncules cérébraux et le devenir neurologique précoce. En effet, pour l'ADC, il n'existe pas d'association significative. L'exploration de la FA au niveau des pédoncules cérébraux chez des nouveau-nés HI n'a jamais été, à notre connaissance, rapportée dans la littérature. Chez l'adulte, il a été montré une diminution significative de la valeur de FA au niveau des pédoncules cérébraux dans les 2 premières semaines suivant un accident vasculaire cérébral. Cette modification de FA dans cette région était corrélée avec le déficit moteur des patients précocement (au moment de l'imagerie initiale) mais aussi, 3 mois plus tard lors de l'imagerie de contrôle. Un fait intéressant chez ces patients est l'absence d'anomalie observée en séquence T1, T2 et sur les cartes d'ADC au niveau des pédoncules cérébraux (Sidaros et al., 2008; Thomalla et al., 2004). Ces résultats chez des patients adultes, mettent en évidence l'intérêt potentiel de la mesure de la FA, dans des conditions HI, particulièrement au niveau des pédoncules cérébraux. Les études explorant les pédoncules cérébraux chez des nouveau-nés asphyxiques ont été réalisées avec de l'imagerie de diffusion conventionnelle. Groenendaal et al (Groenendaal et al., 2006) ont exploré, en IRM de diffusion, la dégénérescence préwallérienne sur les pédoncules cérébraux de 39 nouveau-nés HI. Les auteurs ont montré une valeur prédictive positive très élevée des anomalies de diffusion au niveau des pédoncules cérébraux (et des BPCI) et l'altération neurologique des patients : 14 des 15 nouveau-nés avec un aspect de dégénérescence pré wallérienne avaient un devenir neurologique altéré. Plus récemment, Domi et al (Domi et al., 2009) ont reporté des

modifications de signal en IRM de diffusion, au niveau des pédoncules cérébraux, des faisceaux cortico-spinaux descendants chez 14 nouveau-né avec un accident vasculaire cérébral artériel. Ils ont ainsi montré que les patients sans anomalie de signal dans ces régions dans ce contexte, avaient un examen neurologique considéré comme normal à 1 an. La FA et l'ADC sont des marqueurs d'imagerie couramment utilisées pour étudier les anomalies microstructurales de la SB et la SG (van Pul et al., 2005; Ward et al., 2006), mais ils fournissent des renseignements limités pour la détermination spécifique des processus pathologiques au niveau cellulaire.

Les associations entre les différentes valeurs de FA et d'ADC mesurées dans notre étude, dans les différentes zones cérébrales et les différences d'association de ces paramètres avec le devenir neurologique à 8 jours pourraient refléter des différences dans les processus physiopathologiques dans les BPCI, les putamen/pallidum et les pédoncules cérébraux.

- La faible valeur de FA dans notre étude au niveau des BPCI et des pédoncules cérébraux des patients du groupe B à 8 jours de vie pourraient être la traduction d'une perte précoce de l'intégrité structurelle des faisceaux des fibres nerveuses.
- La concordance des anomalies de la FA et de l'ADC au niveau des BPCI pourrait être le reflet de la gravité des anomalies présentées par ces enfants (zone très sensible et exprimant d'emblée des anomalies mixtes et importantes).
- L'observation d'une diminution isolée de la valeur de la FA au niveau des pédoncules cérébraux chez nos patients dont le devenir neurologique précoce est altéré pourrait s'expliquer en suggérant l'existence d'un équivalent de dégénérescence préwallérienne des faisceaux cortico-spinaux descendants dans ces zones comme cela a été suggéré dans certaines agressions tissulaires chez le nouveau-né et l'adulte (Domi et al., 2009; Groenendaal et al., 2006; Sidaros et al., 2008).

Les paramètres mesurés en séquence DTI dans des zones spécifiques cérébrales sont fortement associés au devenir neurologique précoce des nouveau-nés asphyxiques.

Ces associations peuvent refléter des phénomènes physiopathologiques différents selon les paramètres (FA/ADC) et les localisations (BPCI - putamen/pallidum - pédoncules cérébraux).

Ces résultats incitent à évaluer la pertinence des paramètres DTI sur le pronostic à long terme des nouveau-nés particulièrement pour ceux présentant une EHI modérée.

L'utilisation de ces paramètres peut nous permettre l'évaluation de thérapeutiques dans ce contexte.

3. RESULTATS A 6 MOIS DE VIE ET DISCUSSION

Nous avons observé l'évolution des patients entre le 8^{ème} jour et le 6^{ème} mois de vie en consultations bidisciplinaires dans le cadre de l'étude BIGHIN. Nous avons choisi de manière arbitraire de conserver deux niveaux selon le score d'Amiel-Tison pour les comparaisons aux marqueurs neuroradiologiques mais de distinguer trois niveaux d'altération neurologiques pour les comparaisons cliniques entre J8 et 6 mois (cf. aspects statistiques).

3.1. RESULTATS A 6 MOIS

3.1.1. Description neurologique et en psychomotricité

L'observation et la comparaison des évolutions purement cliniques des patients ont donc été réalisées en conservant trois niveaux d'altération neurologique selon le score d'Amiel-Tison (figures 25 et 26). Les trois niveaux alors décrits sont : A : Absence d'anomalie ou anomalies mineures ; B : anomalies modérées ; C : anomalies majeures ou décès.

La figure 25 montre que 90 % des patients qui sont classé A à J8 le restent à 6 mois (8 patients sur 9). Un seul passe de la catégorie A à la catégorie B. La totalité des patients classés C au départ le reste (mais il y a 5 décès). Concernant les patients dans la situation intermédiaire B (N=10), 60% passe dans la catégorie A à 6 mois soit 6 patients, 20% dans la catégorie C soit 2 patients et enfin 20% reste dans la catégorie B soit 2 patients. Aucun patient classé initialement en A ne passe en C. Au total, 16 patients sur 25 soit 64%, ne change pas de catégorie.

Nous avons également comparé le niveau d'altération neurologique à 8 jours de vie (Amiel-Tison) et le devenir en psychomotricité à 6 mois de vie (BLR).

La figure 26 montre des résultats très proches de ceux observés dans la figure 24. Près de 90 % des patients classés A à J8 sont avec un BLR normal à 6 mois (> 85). Ces résultats sont incomplets car il existe un perdu de vue qui était classé A. Le patient vivant classé C évolue à 6 mois avec une BLR très altéré (< 71). Concernant les patients classés dans le groupe B au départ, 62,5% (5/8) évoluent à 6 mois avec un BLR normal, un seul évolue vers un BLR intermédiaire à -1DS et 2 (25%) évoluent vers un BLR très altéré.

Figure 25 : Evolution clinique des patients entre le 8^{ème} jour de vie et le 6^{ème} mois de vie selon le score d'Amiel-Tison. Cette figure illustre la difficulté de faire un pronostic fiable précoce clinique pour les formes intermédiaires (score B d'Amiel-Tison).

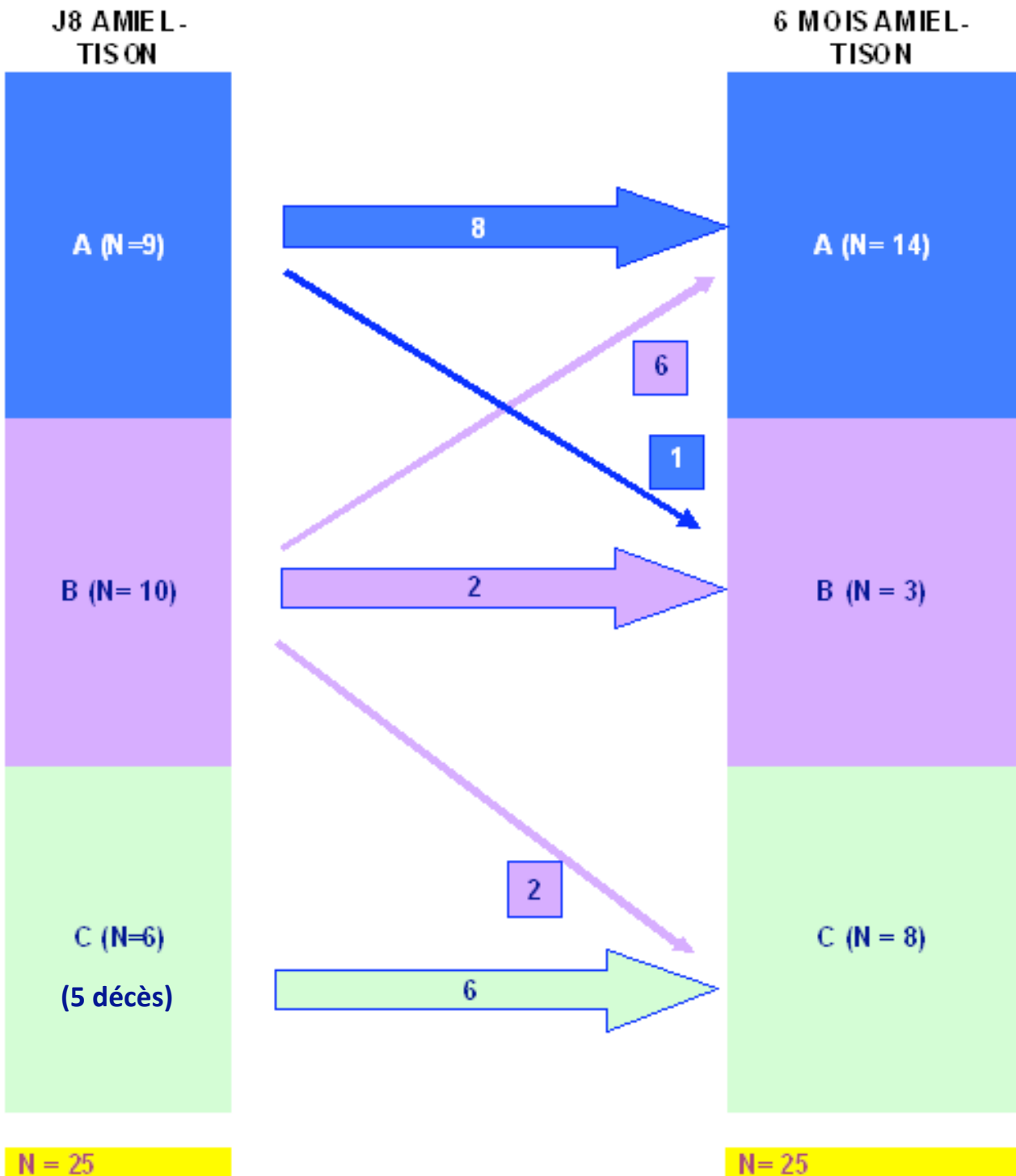
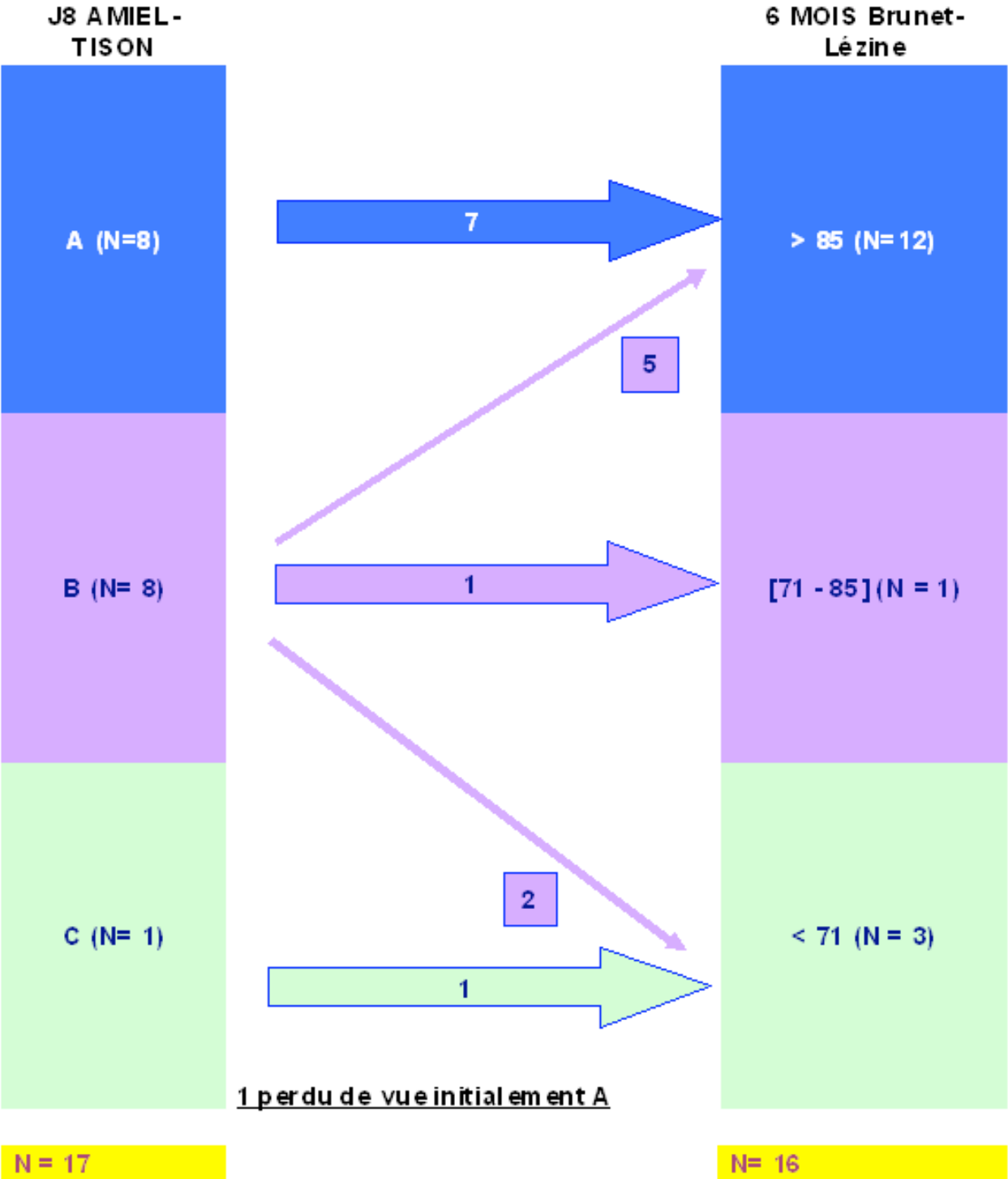


Figure 26 : Evolution des patients en psychomotricité (Brunet-Lézine Révisé) à l'âge de 6 mois comparée à l'évaluation neurologique précoce à 8 jours de vie (Amiel-Tison). Cette figure illustre la difficulté de faire un pronostic fiable précoce clinique sur l'évolution psychomotrice des enfants identifiés par un score B d'Amiel-Tison précocement après la naissance.

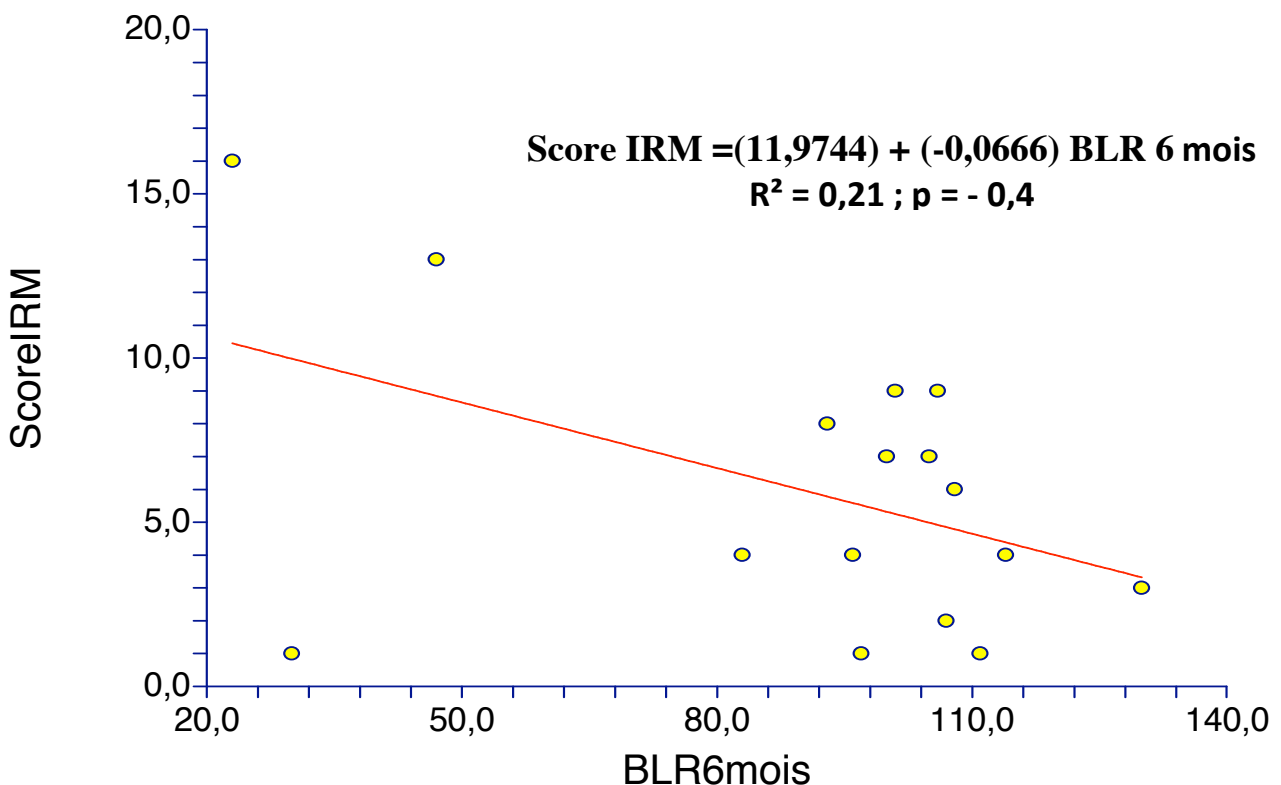


3.1.2. Comparaison des paramètres neuroradiologiques conventionnels (score IRM) au devenir évalué par le score d'Amiel-Tison et par le score de Brunet-Lézine Révisé

Nous avons comparé le score IRM avec l'évolution des patients à 6 mois selon le score d'Amiel-Tison d'une part (deux niveaux d'altération neurologique ; test de Man-Whitney) et le score de BLR d'autre part (trois niveaux de score BLR ; régression linéaire).

La médiane du score IRM du groupe A était de 4 [3 – 8], celle du groupe B de 7,5 [1 – 16], $p = 0,15$. Pour mémoire, les résultats concernant l'évolution à 8 jours montraient respectivement pour les groupes A et B des valeurs médianes de score IRM statistiquement différentes de 4 vs 10 ($p = 0,03$). La comparaison par régression linéaire du score IRM et du score de BLR (figure 27) montre qu'il n'existe pas de corrélation significative entre ces deux paramètres.

Figure 27 : Comparaison (régression linéaire) du score IRM et du score de Brunet-Lézine Révisé (BLR) des patients à 6 mois de vie



3.1.3. Comparaison des paramètres de SRM au devenir neurologique à 6 mois

(Amiel-Tison)

Nous avons une nouvelle fois conservé la classification d'Amiel-Tison avec deux niveaux d'altération neurologique (Cf. aspects statistiques) à 6 mois de vie et nous avons comparé ces groupes avec les ratios mesurés en SRM dans les premiers jours de vie. Les résultats sont rapportés dans le tableau 13.

Nous constatons, à la différence de ce que nous avons vu avec la comparaison avec l'évolution neurologique à 8 jours, qu'aucune association significative n'est retrouvée au niveau du tronc cérébral entre les ratios NAA/Cr, Cho/Cr et Lac/Cr et l'évolution neurologique à 6 mois. Il persiste par contre une relation statistiquement significative entre l'augmentation des ratios du lactate au niveau des putamen/pallidum tant à droite qu'à gauche et l'altération neurologique à 6 mois. Il existe également sur les putamen/pallidum, uniquement pour le coté gauche, un ratio NAA/Cr statistiquement plus bas chez les enfants ayant une évolution neurologique défavorable à 6 mois. De même, le ratio de la Choline est statistiquement plus élevé à gauche, mais pas à droite, au niveau des putamen/pallidum chez les enfants ayant une évolution neurologique défavorable.

Tableau 13 : Comparaison des résultats obtenus en Spectroscopie par Résonance Magnétique sur le tronc cérébral et les putamen/pallidum droits et gauches avec le devenir neurologique à 6 mois des nouveau-nés (Amiel-Tison).

Tronc cérébral						
	NAA/Cr	p	Cho/Cr	p	lac/Cr	p
	Moyenne (médiane) +/- DS		Moyenne (médiane) +/- DS		Moyenne (médiane) +/- DS	
A	1,06 (1,06) +/- 0,33	1	2,38 (2,29) +/- 1,06	0,62	0,23 (0,21) +/- 0,18	0,31
B	1,21 (0,99) +/- 0,7		3,22(1,8) +/- 3,15		0,34 (0,31) +/- 0,24	

putamen/pallidum droits						
	NAA/Cr	p	Cho/Cr	p	lac/Cr	p
	Moyenne (médiane) +/- DS		Moyenne (médiane) +/- DS		Moyenne (médiane) +/- DS	
A	1,51 (1,39) +/- 0,95	0,53	2,4 (2,34) +/- 0,84	0,01	0,22 (0,15) +/- 0,21	0,002
B	1,41 (0,97) +/- 1,4		4,1 (4,11) +/- 1,47		1,04(0,76) +/- 0,95	

putamen/pallidum gauches						
	NAA/Cr	p	Cho/Cr	p	lac/Cr	p
	Moyenne (médiane) +/- DS		Moyenne (médiane) +/- DS		Moyenne (médiane) +/- DS	
A	1,46 (1,45) +/- 0,59	0,03	2,47 (2,45) +/- 0,64	0,27	0,18 (0,18) +/- 0,12	0,01
B	1,06 (0,72) +/- 0,75		3,63 (3,25) +/- 2,09		1,13 (0,61) +/- 1,2	

putamen/pallidum moyenne droits/gauches						
	NAA/Cr	p	Cho/Cr	p	lac/Cr	p
	Moyenne (médiane) +/- DS		Moyenne (médiane) +/- DS		Moyenne (médiane) +/- DS	
A	1,49(1,34) +/-0,73	0,07	2,44(2,32) +/-0,6	0,01	0,2(0,165+/-0,14	0,002
B	1,18(0,8) +/-1,02		3,94(3,96) +/-1,5		1,04(0,705) +/-0,91	

NAA : N Acétyl-Aspartate ; Cr : créatine ; Cho : Choline ; lac : lactate ; P : patients ; D : devenir ; DS : Déviation Standard

3.1.4. Comparaison des paramètres de DTI par la méthode PRIDE avec le devenir évalué par le score d'Amiel-Tison

Comme nous l'avons fait pour le score d'Amiel-Tison à J8, nous avons comparé les valeurs des marqueurs neuroradiologiques (ADC et FA) au niveau des BPCI, des putamen/pallidum et des pédoncules cérébraux avec le devenir neurologique à 6 mois (deux niveaux d'altération neurologique A et B). Les résultats sont résumés dans le tableau 14. Nous retrouvons, comme à 8 jours, une association statistiquement significative entre la gravité de l'altération neurologique et une plus faible valeur de l'ADC au niveau des putamen/pallidum et des BPCI mais pas au niveau des pédoncules cérébraux. Nous retrouvons également une association statistiquement significative entre une valeur basse de la FA au niveau des BPCI et des pédoncules cérébraux et la gravité de l'altération neurologique des enfants à 6 mois. Pour la FA, cette corrélation n'est pas retrouvée au niveau des putamen/pallidum.

Tableau 14 : Comparaison entre les valeurs du Coefficient Apparent de Diffusion (ADC) et de la Fraction d'Anisotropie (FA) values au niveau droits et gauches du cerveau des nouveau-nés avec le devenir neurologique à 6 mois (DS: déviation standard ; ADC en mm²/s).

		Groupe A	Groupe B	p
Bras postérieur de la capsule interne	ADC Droit (moyenne (médiane) +/- DS)	1.09 (1.09) +/- 0.076	0.785 (0.722) +/- 0.21	0.003
	ADC Gauche (moyenne (médiane) +/- DS)	1.066 (1.07)+/-0.067	0.764(0.727)+/-0.2	0.001
	FA Droite (moyenne (médiane) +/- DS)	0.473(0.466)+/- 0.045	0.39(0.413)+/- 0.057	0.0003
	FA Gauche (moyenne (médiane) +/- DS)	0.46(0.463)+/-0.046	0.38(0.409)+/-0.082	0.01
putamen/pallidum	ADC Droit (moyenne (médiane) +/- DS)	1.172(1.15)+/- 0.077	0.843 (0.83)+/-0.23	0.0008
	ADC Gauche (moyenne (médiane) +/- DS)	1.164(1.15)+/-0.07	0.823(0.811)+/-0.22	0.0008
	FA Droite (moyenne (médiane) +/- DS)	0.156(0.15)+/- 0.02	0.144(0.13)+/-0.03	0.09
	FA Gauche (moyenne (médiane) +/- DS)	0.157(0.15)+/-0.021	0.149(0.137)+/-0.031	0.28
pédoncules cérébraux	ADC Droit (moyenne (médiane) +/- DS)	1.39(1.37)+/-0.24	1.45 (1.45) +/-0.51	0.66
	ADC Gauche (moyenne (médiane) +/- DS)	1.45(1.42)+/-0.22	1.28(1.4)+/-0.29	0.26
	FA Droite (moyenne (médiane) +/- DS)	0.385(0.384)+/-0.057	0.327(0.33) +/-0.057	0.01
	FA Gauche (moyenne (médiane) +/- DS)	0.373(0.375)+/-0.047	0.322(0.317)+/-0.055	0.049

3.1.5. Comparaison des paramètres de DTI par la méthode FSL au devenir évalué par le score d'Amiel-Tison et le Brunet-Lézine Révisé

3.1.5.1. Comparaison avec le score d'Amiel-Tison à 6 mois

Les figures 28 A (1, 2 et 3) et 28 B (1, 2 et 3) montrent respectivement la comparaison des valeurs d'ADC et de FA en fonction des valeurs du score d'Amiel-Tison à 6 mois pour les patients inclus dans le protocole BIGHIN. Plus l'association est statistiquement forte entre un score d'Amiel-Tison haut et une valeur d'ADC ou de FA haute, plus le signal en couleur est bleu clair. Le bleu foncé signe une association statistiquement significative ($p < 0,05$), le signal rouge une tendance sans significativité et enfin le signal vert l'absence d'association. On observe donc une forte association entre une haute valeur d'ADC et une bonne évolution neurologique groupe A au niveau de la corona radiata, de l'ensemble des capsules internes, du corps calleux, une association au niveau des capsules externes surtout à gauche, de même qu'au niveau des pédoncules cérébraux également à gauche (squelette d'ADC bleu clair). On observe par ailleurs une bonne association entre une évolution neurologique favorable (groupe A) à 6 mois et une valeur haute de FA sur les IRM initiales des patients au niveau des BPCI et des pédoncules cérébraux (squelette de FA bleu foncé). On ne retrouve pas cette corrélation au niveau de la corona radiata, ni au niveau des bras antérieurs des capsules internes ou encore du corps calleux.

3.1.5.2. Comparaison avec le score de BLR à 6 mois

Les figures 29 C (1, 2 et 3) et 29 D (1, et 2) montrent respectivement la comparaison des valeurs d'ADC et de FA en fonction des valeurs du score de BLR à 6 mois pour les patients inclus dans le protocole BIGHIN. Plus l'association entre un haut score de BLR et une haute valeur moyenne de FA ou d'ADC est significative, plus le signal est bleu clair. L'absence d'association se traduit par un signal vert sur le squelette de FA ou d'ADC.

On remarque sur les squelettes d'ADC (figures 29 C ; 1, 2 et 3) que l'association positive entre le haut score de BLR à 6 mois et une valeur élevée de l'ADC est la plus forte au niveau de l'ensemble des faisceaux cortico-spinaux (corona radiata, ensemble des capsules internes, plus faiblement sur les pédoncules cérébraux [bleu foncé]), des capsules externes, et sur le corps calleux. Pour la FA (figures 29 D ; 1 et 2), cette association positive n'est pas retrouvée, et la quasi-totalité des structures décrites ci-dessus apparaissent en vert sur le squelette de FA.

28 A /1

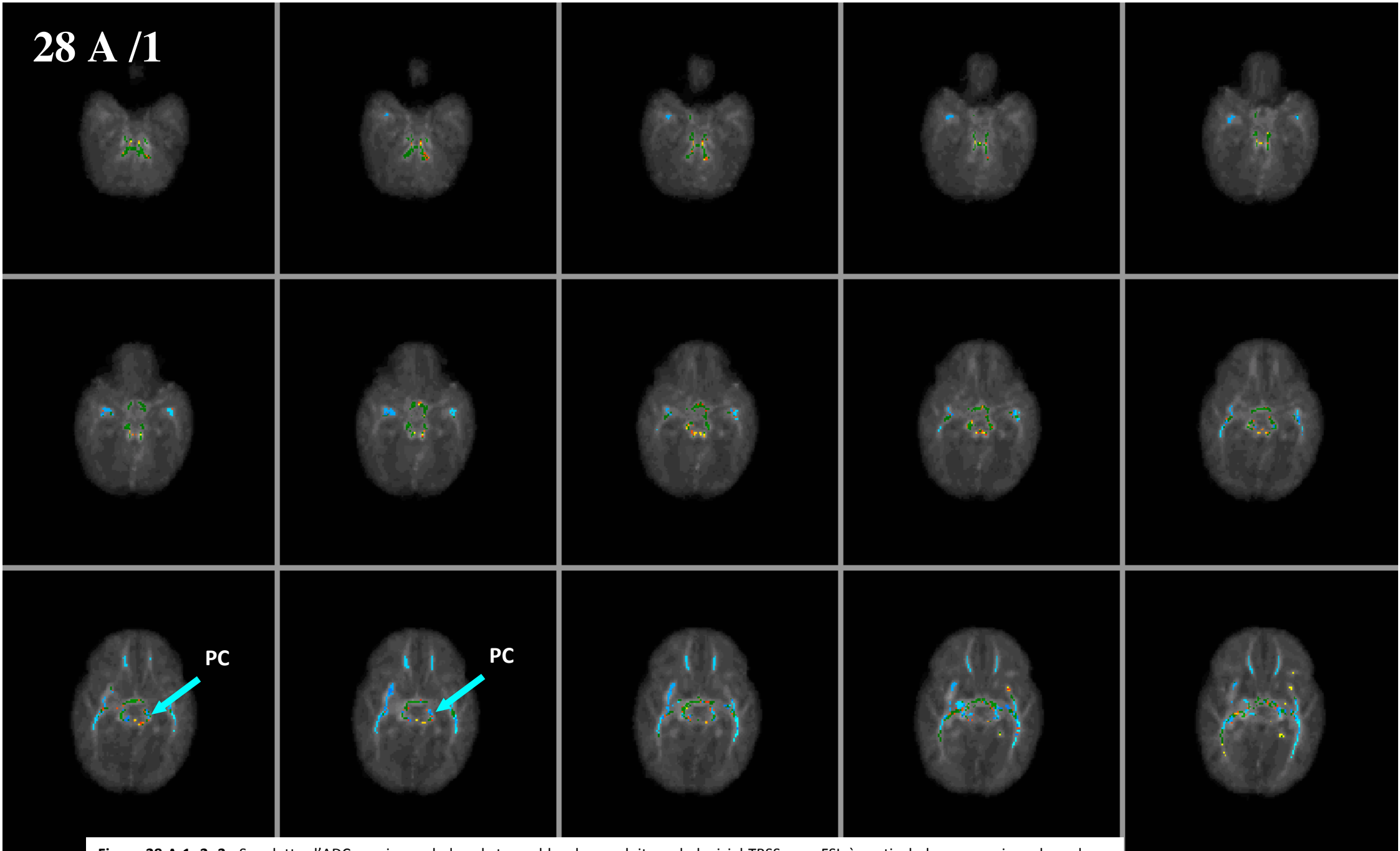
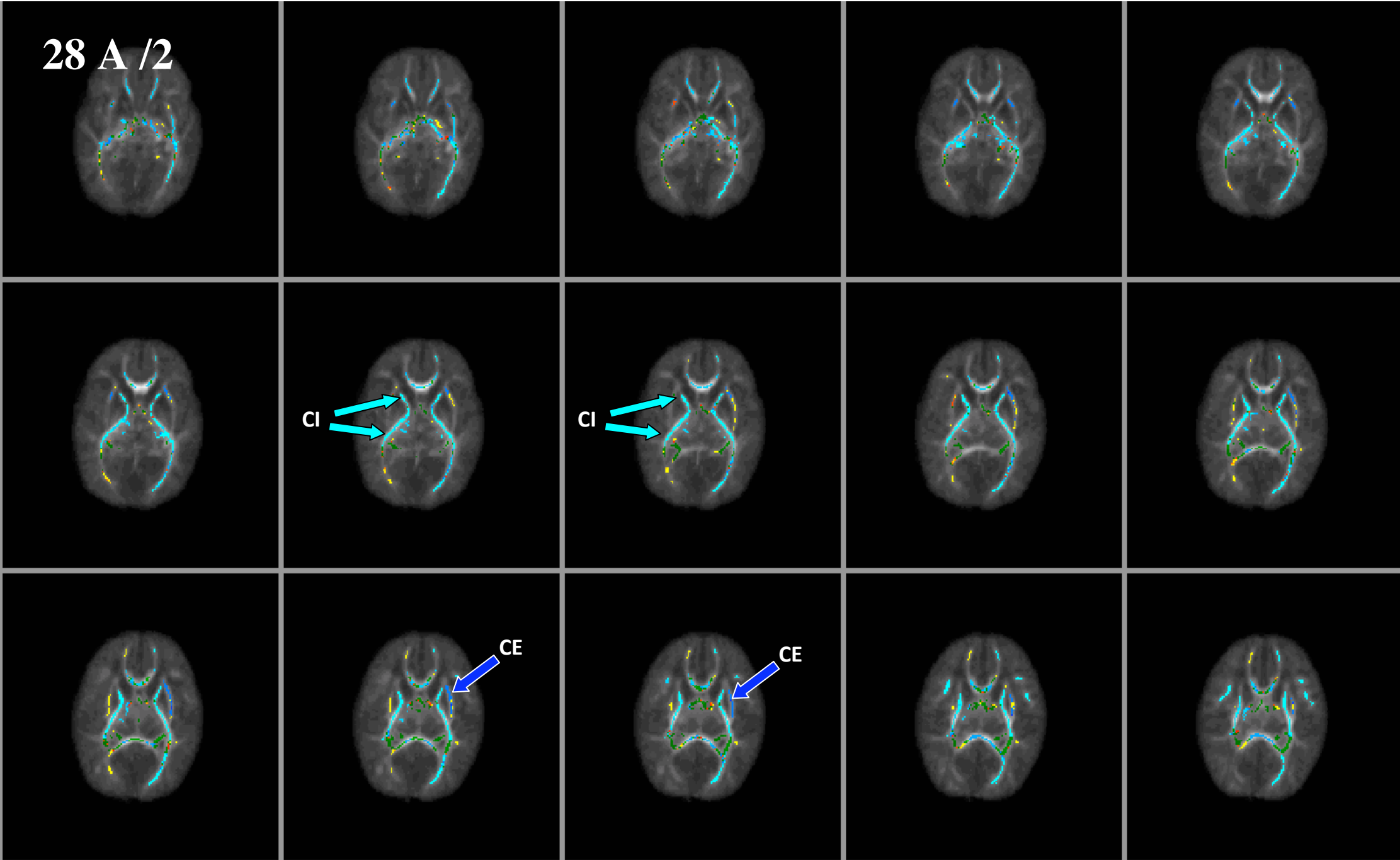
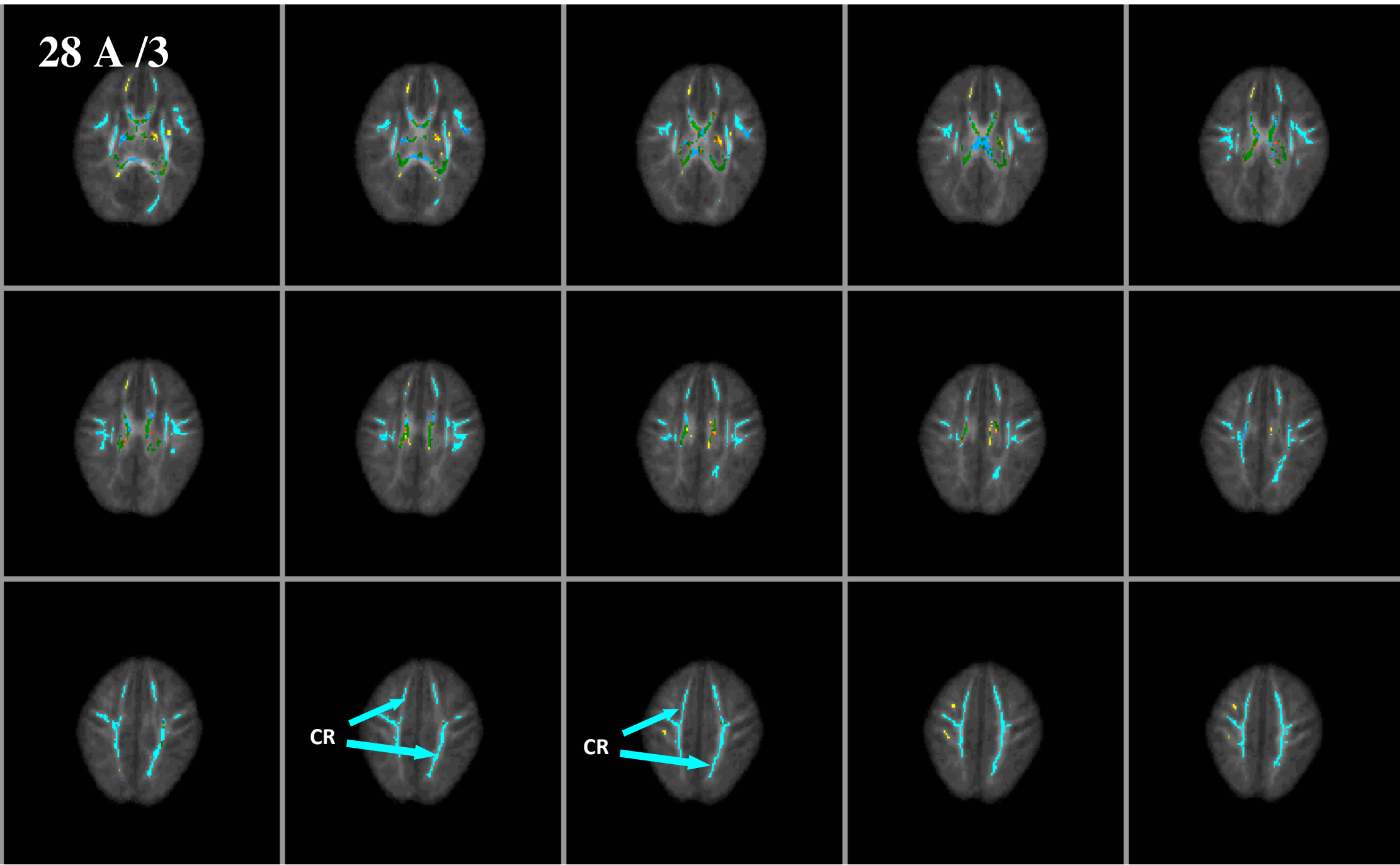


Figure 28 A 1, 2, 3 : Squelette d'ADC au niveau de la substance blanche produit par le logiciel TBSS sous FSL à partir de la comparaison des valeurs moyennes d'ADC dans les deux groupes évolutifs selon le score d'Amiel-Tison à 6 mois. Plus le signal est bleu clair, plus l'association entre une valeur d'ADC élevée et une évolution neurologique favorable (groupe A) est forte (corona radiata : CR, capsules internes : CI, corps calleux : CC, capsules externes gauche : CE, Pédoncules Cérébraux plutôt à gauche : PC ; flèches bleues). Un signal vert traduit l'absence d'association.

28 A /2



28 A /3



28 B /1

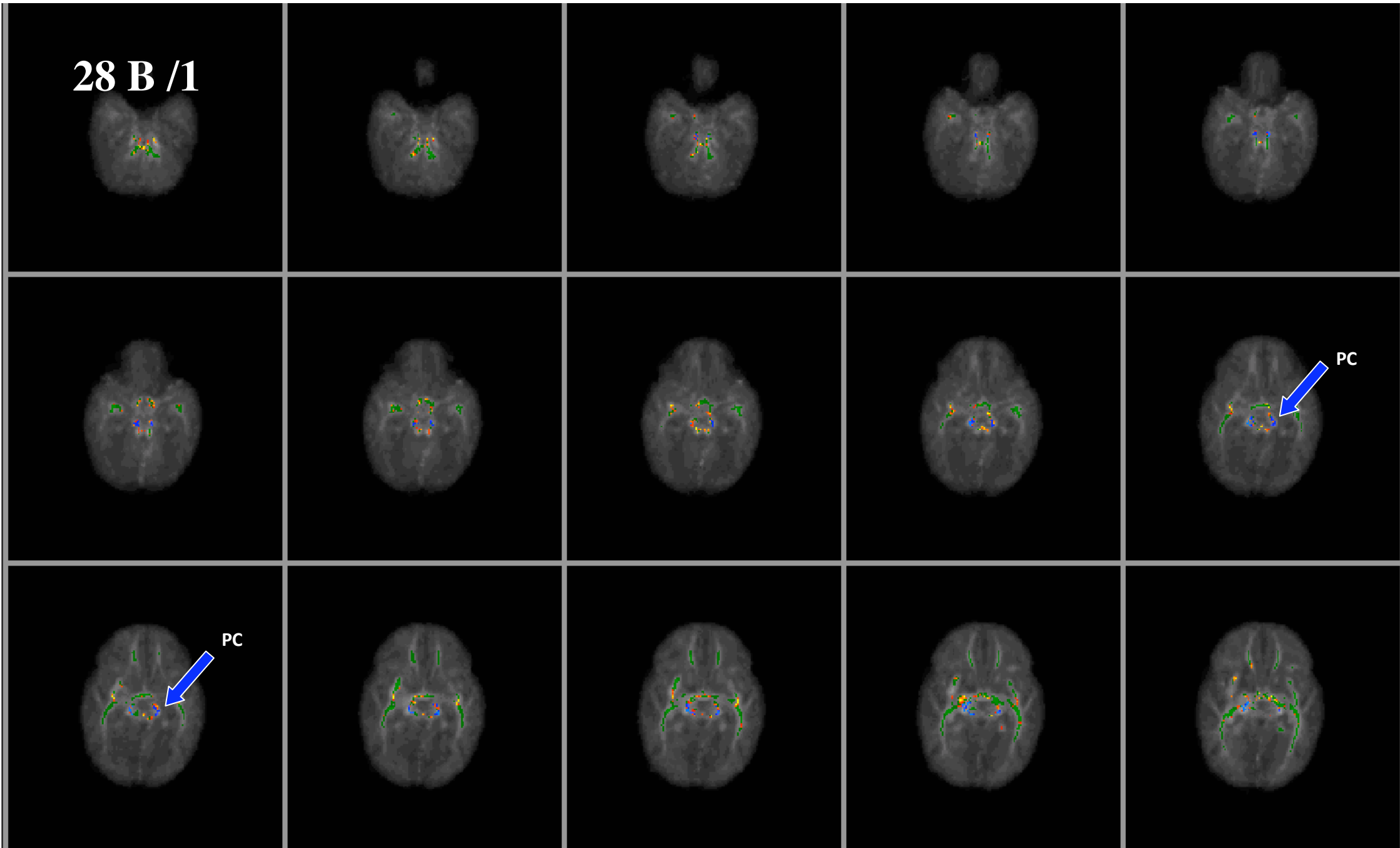
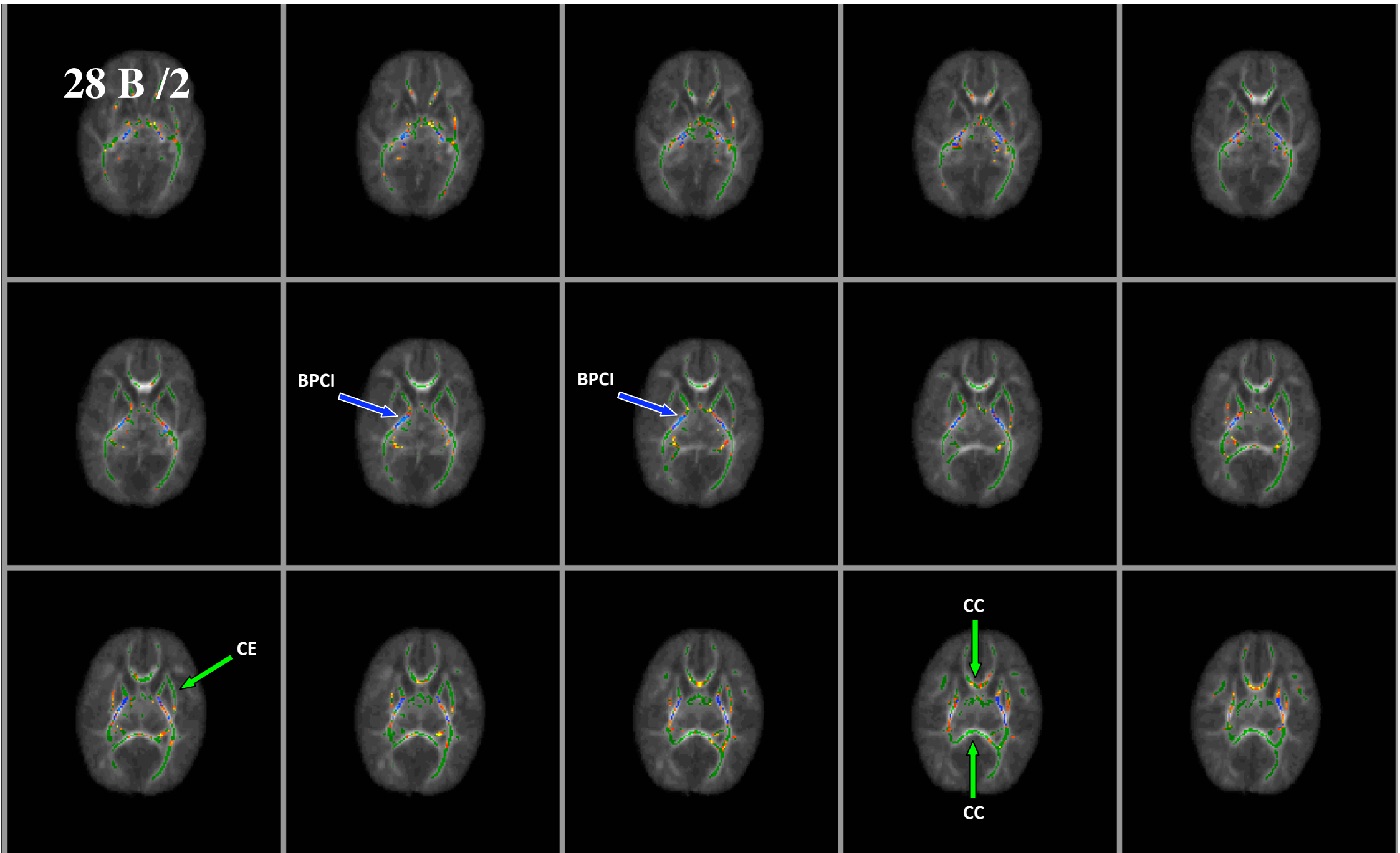
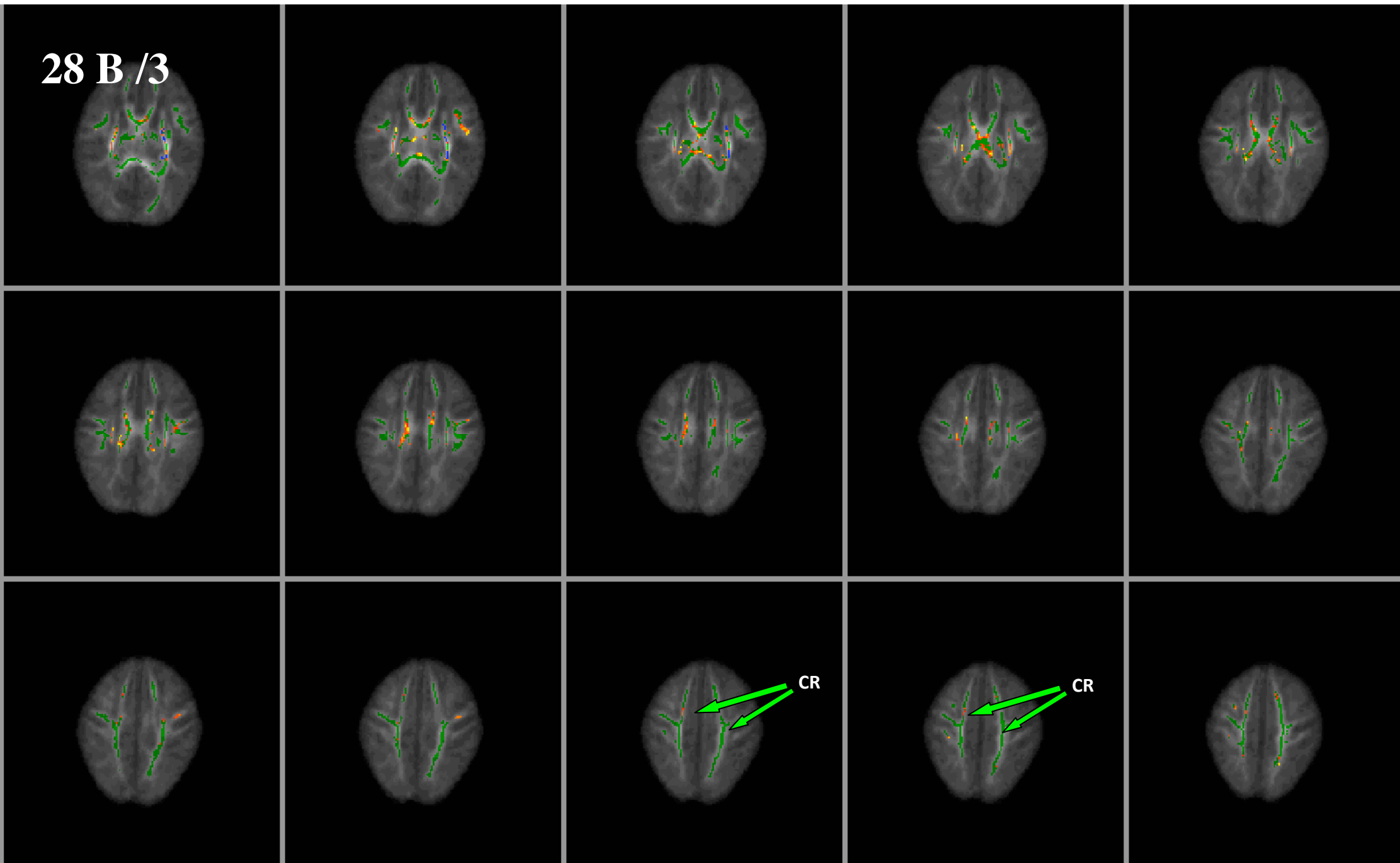


Figure 28 B (1, 2 et 3): Squelette de FA au niveau de la substance blanche produit par le logiciel TBSS sous FSL à partir de la comparaison des valeurs moyennes de FA dans les deux groupes évolutifs selon le score d'Amiel-Tison à 6 mois. On note une association forte (squelette de FA bleu foncé) entre une valeur de FA élevée et une évolution neurologique favorable (groupe A) au niveau des Bras postérieurs des Capsules internes : BPCI et des Pédoncules Cérébraux: PC ; **flèches bleues**) mais pas au niveau de la corona radiata (CR), des bras antérieurs des capsules internes (BACI) et du le corps calleux (CC) : (**flèches vertes**)

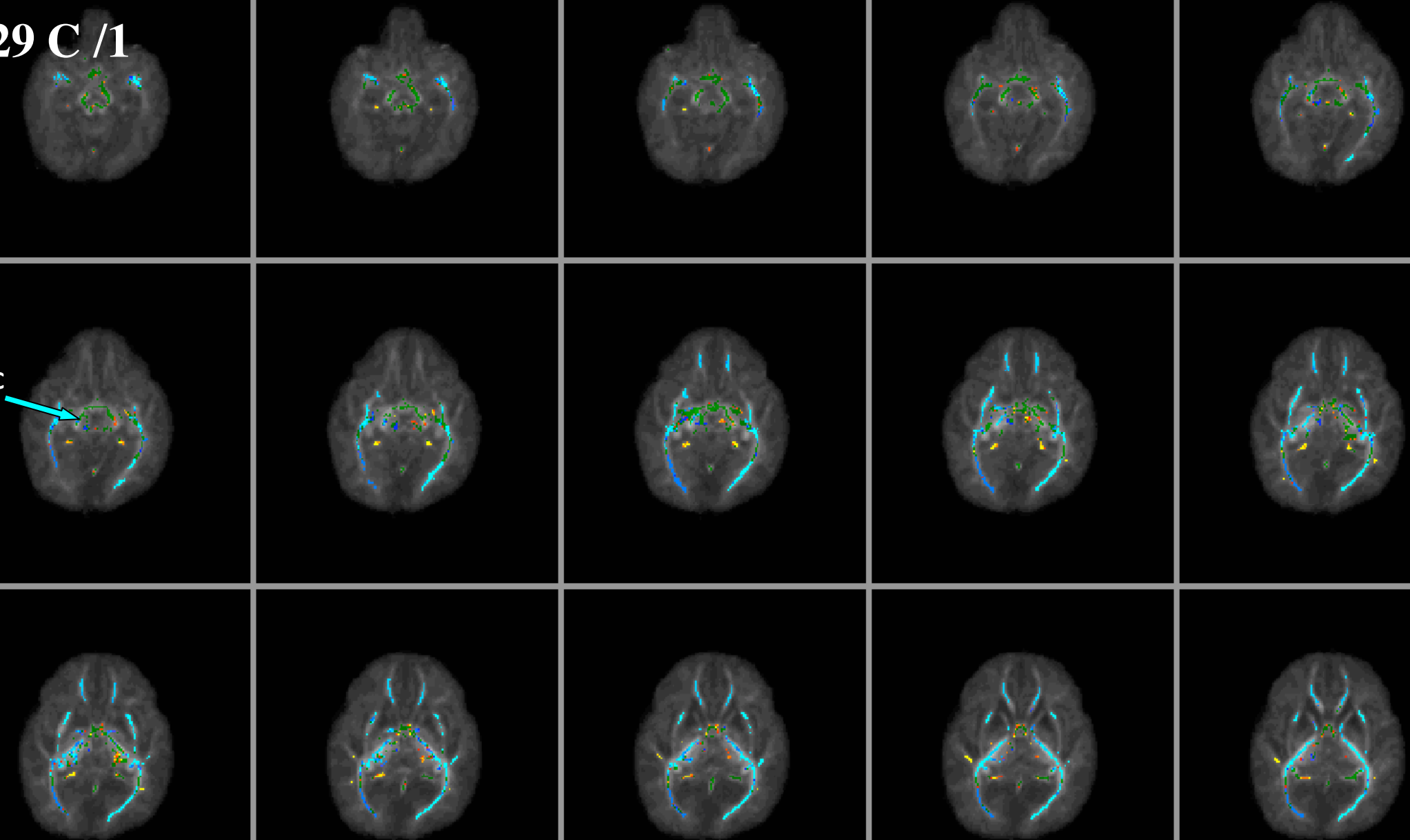


28 B /3



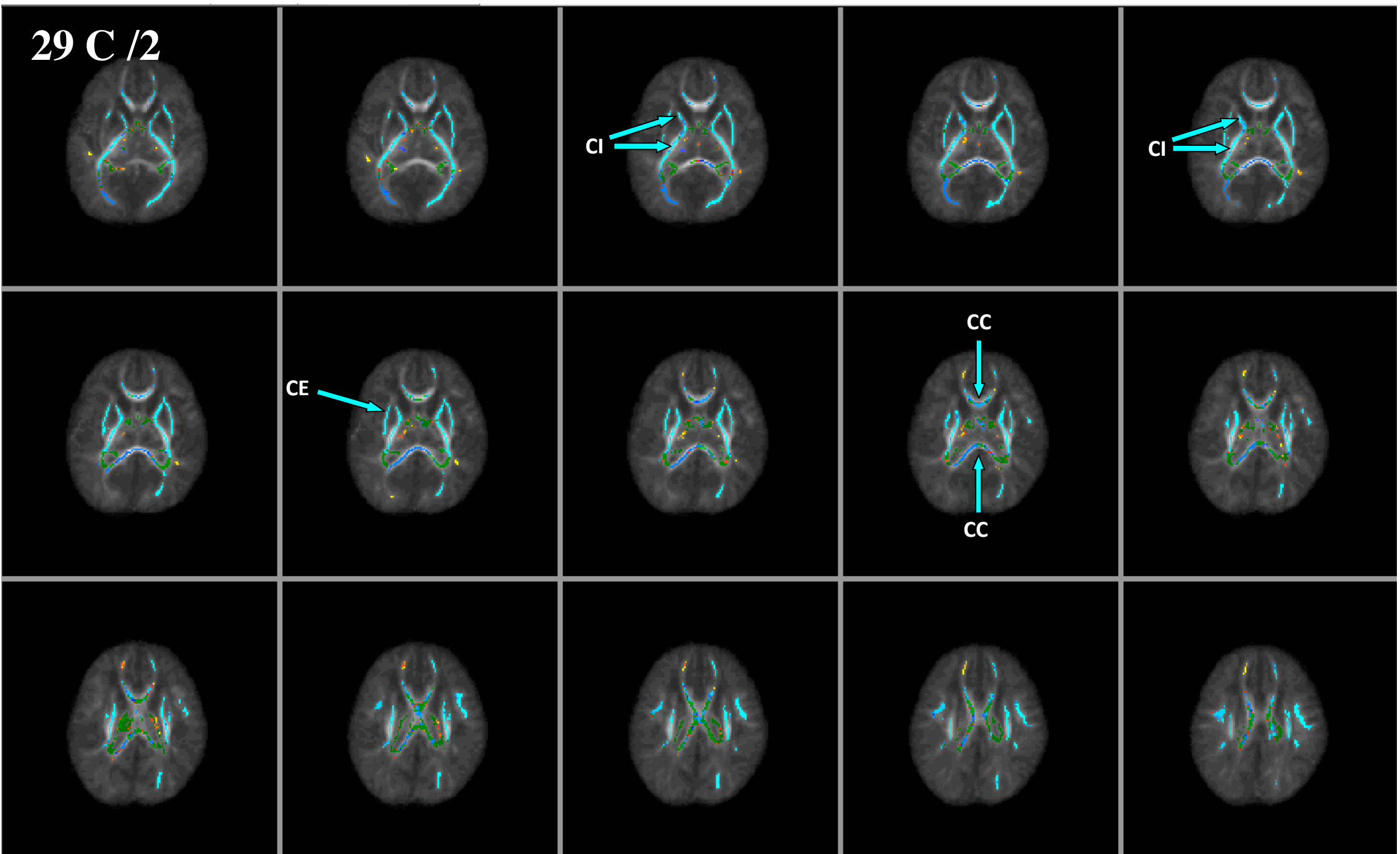
29 C /1

PC

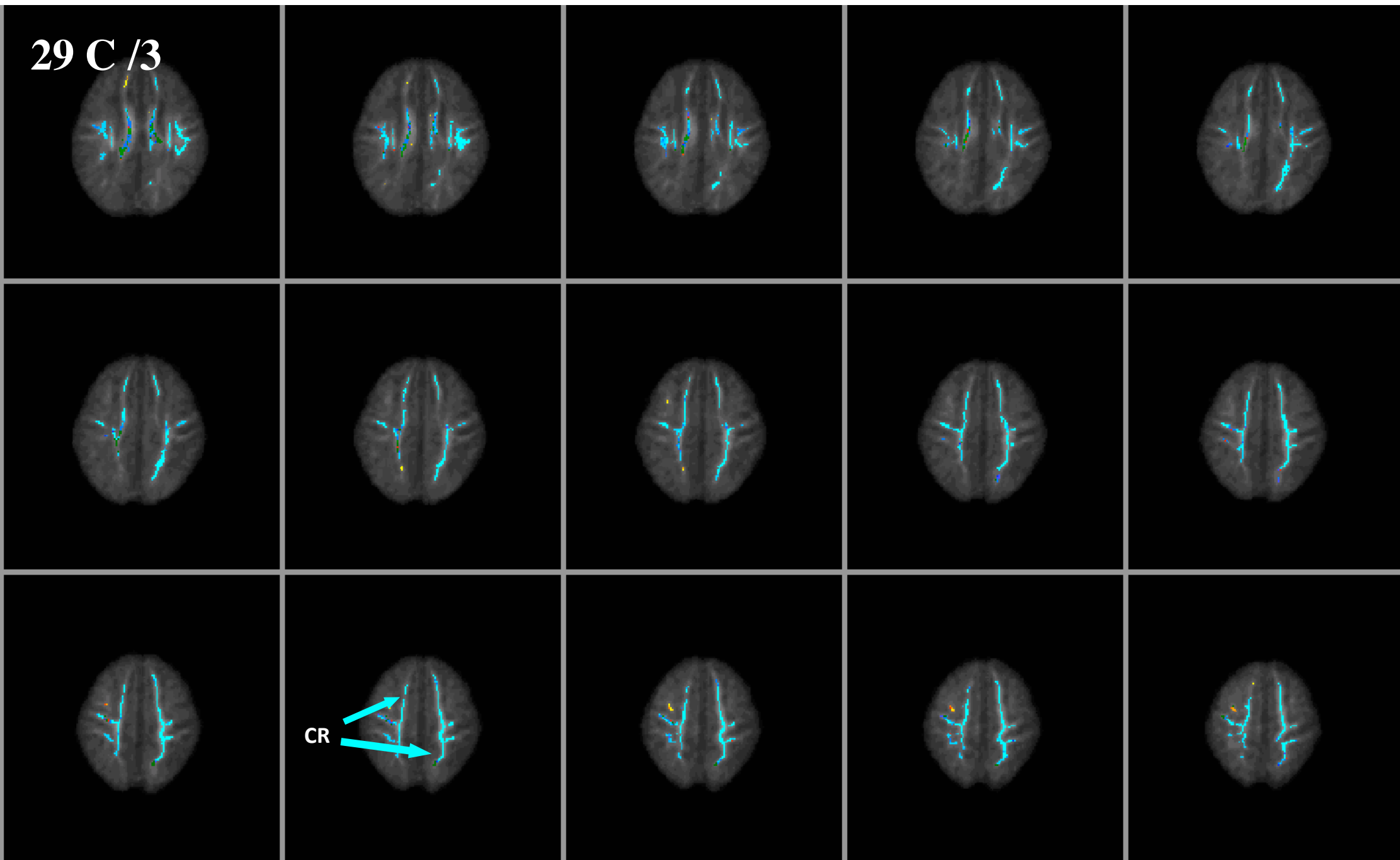


Figures 29 C (1, 2 et 3): Squelette d'ADC au niveau de la substance blanche produit par le logiciel TBSS sous FSL à partir de la comparaison des valeurs moyennes d'ADC et le score de Brunet-Lézine Révisé à 6 mois (régression linéaire). Plus le signal est bleu clair, plus l'association entre une valeur d'ADC élevée et une évolution en psychomotricité favorable est forte (corona radiata : CR, Capsules Internes : CI, Capsules Externes : CE, Corps Calleux : CC, Pédoncules Cérébraux à droite : PC; **flèches bleues**). Un signal vert traduit l'absence d'association.

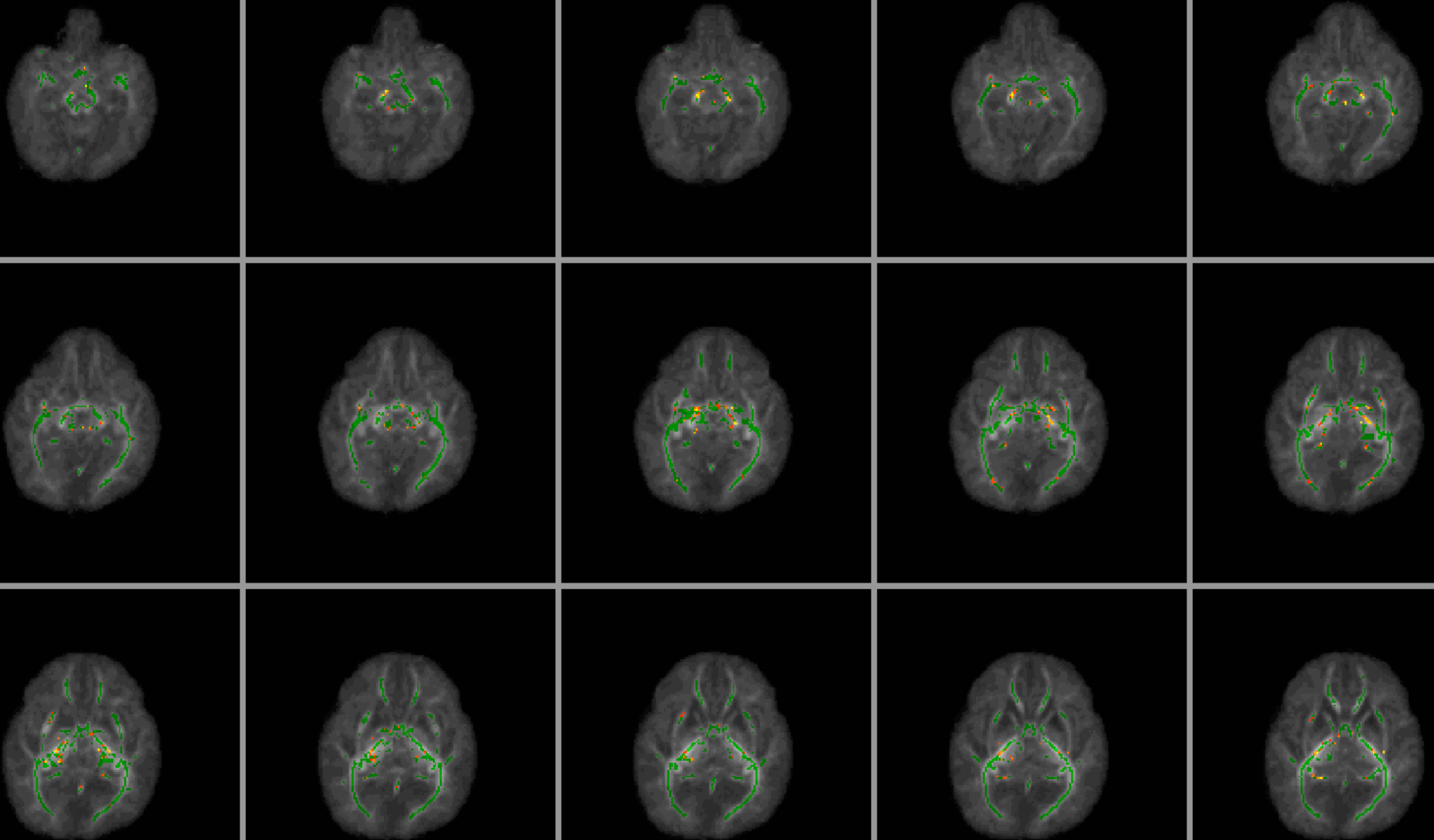
29 C / 2



29 C /3

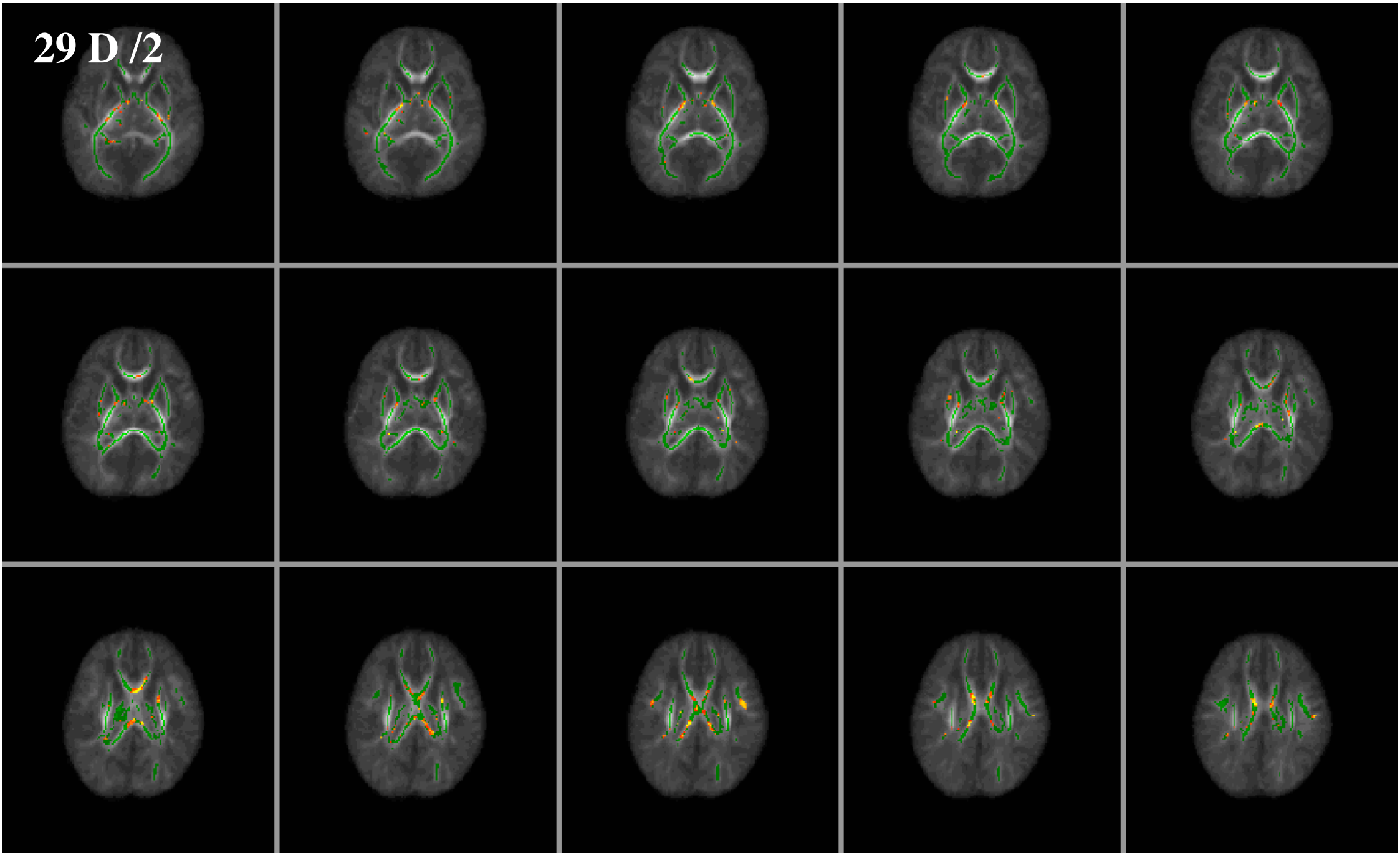


29 D /1



Figures 29 D (1 et 2) : Squelette de FA au niveau de la substance blanche produit par le logiciel TBSS sous FSL à partir de la comparaison des valeurs moyennes de FA et le score de Brunet-Lézine Révisé à 6 mois (régression linéaire). Plus le signal est bleu clair, plus l'association entre une valeur de FA élevée et une évolution en psychomotricité favorable est forte. Nous observons quasi-exclusivement un marquage vert des zones de la substance blanche témoignant de l'absence de significativité.

29 D /2



3.2. DISCUSSION SUR LES DONNEES A 6 MOIS

3.2.1. Données cliniques

Le résultat principal de notre observation des patients à 6 mois de vie est la difficulté d'évaluer le devenir des enfants qui vont présenter un état dit « intermédiaire » lors de leur examen clinique aux alentours du huitième jour de vie. Les mêmes difficultés sont observées avec la classification de Sarnat dans les premières heures de vie, le plus difficile étant de préciser l'évolution à moyen et long terme des enfants qui sont classés en Sarnat 2. La littérature rapporte dans ces EHI dites « intermédiaires » une évolution défavorable dans 20 à 50 % selon les séries (Carli et al., 2004). Dans cette même revue (Carli et al., 2004), les auteurs rapportent leur expérience avec 36 % des patients présentant initialement une encéphalopathie modérée qui évoluent avec un handicap sévère ou qui décèdent. Dans notre étude, seuls deux patients en Sarnat 2 ont évolué défavorablement soit 8 % ; cependant nos résultats ne sont donnés qu'à 6 mois. Si l'on regarde l'évolution des patients entre J8 et 6 mois par rapport au score d'Amiel-Tison, on observe respectivement dans notre étude que 60 % des patients classés B (anomalies modérées) à J8 sont classés A à 6 mois et 20 % sont classés C, 20 % restent B. Là encore, cela confirme la difficulté sur l'examen clinique précoce, pour les formes intermédiaires, de donner un pronostic fiable aux parents même s'il semble que la majorité de ces enfants évolue favorablement. Les résultats à un an nous permettront de préciser ces données.

Barnett et al (Barnett et al., 2002) ont suivi une cohorte d'enfants ayant présenté une asphyxie périnatale jusqu'à l'âge de 5 – 6 ans. Sur 68 nouveau-nés, 30 présentaient une encéphalopathie modérée type Sarnat 2 soit 44 %. Sur ces 30 enfants, 18 ont eu une évolution défavorable (décès ou handicap sévère soit 60 %) et 12 ont eu une évolution favorable permettant une scolarisation. Sur ces 12 patients, 5 (soit près de 15 %) ont présenté des anomalies importantes de l'évaluation de Touwen et du score Movement ABC. Onze des douze enfants avaient des anomalies mineures de la SB sur l'imagerie initiale.

Paro-Panjan et al (Paro-Panjan et al., 2005a) ont montré des résultats intéressants concernant l'évaluation des patients entre 8 jours de vie et 12-15 mois de vie avec le score d'Amiel-Tison. Les auteurs ont divisé les patients nouveau-nés asphyxiques, non pas en trois catégories comme nous l'avons fait mais en 4 catégories d'évaluation : normal, déficit mineur, déficit modéré, déficit sévère. Dans ces 4 catégories, à la fin de la première semaine, les enfants (N = 52) se répartissaient respectivement comme suit : 9, 18, 17, 8. A 12-15 mois

la répartition des mêmes enfants (N = 47) était respectivement dans chaque catégorie : 25, 5, 5 et 12. Il était intéressant de noter que 14 patients sur 18 passaient de la catégorie déficit mineur à normal (aucun des patients déficit mineur ne se retrouvait dans une catégorie plus grave) tandis que 11 patients sur 17 de la catégorie déficit modéré à 8 jours de vie restaient à 12-15 mois avec un déficit modéré (4 patients) ou appartenaient à la catégorie déficit sévère (7 patients). Les mêmes auteurs dans une publication ultérieure (Paro-Panjan et al., 2005b) ont précisé leurs données en comparant l'évolution à 8 jours, 3 mois et 12-15 mois. Ils ont mis en évidence que la majorité des patients avec des anomalies mineures à modérées 8 jours de vie et ceux ayant des anomalies mineures à 3 mois évoluent normalement à 12-15 mois tandis que ceux ayant des anomalies sévères à 8 jours de vie et des anomalies modérées ou sévères à 3 mois évoluent tous défavorablement.

Nous avons également comparé l'évaluation neurologique à 8 jours par le score d'Amiel-Tison et le devenir des patients à 6 mois avec l'évaluation du score de Brunet-Lézine révisé. Il est intéressant de noter qu'une nouvelle fois, il s'agit bien des enfants inclus dans la catégorie intermédiaire à 8 jours qui se distribue à 6 mois majoritairement vers la normalité (BLR >75). Cependant il ne faudrait pas, de ce fait emprunter un raccourci qui consisterait à dire que, au final, l'Amiel-Tison et le BLR évaluent les mêmes anomalies. Si le quotient de développement global donné par l'échelle de BLR semble suivre l'évolution du score d'Amiel-Tison (à 6 mois tout du moins), l'analyse dans le détail des composantes montrera sans doute des subtilités à prendre en compte (posture, coordination visio-spatiale, langage, sociabilité).

L'ensemble des données de la littérature et nos résultats confirment l'impériosité de réaliser des consultations précoces pour ces enfants avec des examens cliniques reproductibles et selon un calendrier rigoureux (au moins 4 consultations dans la première année), de façon à adapter si nécessaire la prise en charge ; en effet, l'évaluation clinique précoce n'est pas suffisante pour approcher de manière fiable le pronostic à moyen et long terme des EHI périnatales, particulièrement dans les catégories intermédiaires (Sarnat 2 ou Amiel-Tison classe B).

3.2.2. Données d'IRM conventionnelle

Nos résultats ont montré que la valeur du score IRM dont le calcul s'opère à partir de l'évaluation en IRM conventionnelle (incluant l'imagerie de diffusion) n'est plus corrélée

avec le devenir neurologique des patients de notre étude à 6 mois tandis que cette valeur était corrélée avec le devenir de ces mêmes patients à 8 jours de vie. Il convient de rester prudent sur les interprétations d'une telle modification au regard de la littérature qui, depuis longtemps a montré l'intérêt pronostique de l'imagerie (en particulier de diffusion) dans ces conditions (Barkovich et al., 2001; Forbes et al., 2000; Hunt et al., 2004; Huppi and Amato, 2001; Huppi and Barnes, 1997; Rutherford et al., 2004; Rutherford et al., 1998). Seule l'évolution de nos patients à 1 voire 2 ans permettra d'affiner la place d'un tel score dans l'évaluation des nouveau-nés asphyxiques. Il est possible que le score IRM perde de sa pertinence du fait d'une certaine « dilution ». En effet, parmi tous les critères inclus dans ce score, certains sont sans nul doute très discriminants (perte de l'hyperintensité des BPCI en séquence T1 par exemple) et d'autre peut-être moins (hémorragies sous-arachnoïdiennes ou pétéchies dans la SB).

Il n'existe pas, par ailleurs, de corrélation entre la valeur du score IRM mesuré précocement à partir de l'imagerie et la valeur du score de Brunet-Lézine révisé à 6 mois chez les patients de notre cohorte. Une nouvelle fois, il conviendra de comparer les résultats à 1 voire 2 ans pour définir le degré réel de corrélation entre ces deux méthodes d'évaluation.

3.2.3. Données de SRM

L'essentiel de la discussion de l'intérêt pronostique de la SRM chez les nouveau-nés HI a été fait dans la discussion sur les résultats à 8 jours. Nous constatons que nos résultats sur les ratios du lactate, de la choline et du NAA mesurés au niveau des putamen/pallidum en CSI et à la partie supérieure du tronc cérébral en SRM chez nos patients sont légèrement différents si on les compare à l'évolution des patients à 8 jours ou à 6 mois. En SRM au niveau du tronc cérébral, seuls les ratios du lactate montre un intérêt pronostique sur l'appréciation de l'état neurologique à 8 jours. Les autres ratios ne montrent aucune significativité. A 6 mois, aucune significativité n'est observée entre les ratios sur le tronc cérébral et le devenir des patients. La littérature n'est pas très contributive dans ce domaine et à notre connaissance, c'est la première étude qui rapporte l'exploration en SRM de cette région chez des nouveau-nés HI. La perte de significativité des ratios du lactate à 6 mois nous amène à relativiser sa valeur pronostique dans ces conditions.

Concernant les putamen/Pallidum, comme nous l'avons dit plus haut, dans la discussion sur le devenir neurologique à 8 jours, nos résultats sont concordants avec ceux rapportés dans la

littérature (Chateil, 1999; Huppi and Barnes, 1997; Malik et al., 2002; Robertson et al., 2000) avec des ratios du lactate significativement plus élevés dans la population des enfants qui évoluent défavorablement et cela qu'ils soient évalués à 8 jours ou à 6 mois dans notre étude. Les ratios du lactate conservent donc une robustesse dans le temps au niveau des putamen/pallidum.

Hanrahan et al (Hanrahan et al., 1999) ont montré l'intérêt pronostique à un an de la mesure des ratios du lactate au niveau des NGC dans les 18 heures suivant la naissance chez le nouveau-né ayant présenté une asphyxie périnatale. Fan et al en 2003 (Fan et al., 2003) ont proposé que le ratio Lac/Cr > 1,5 soit une valeur seuil au-delà de laquelle le pronostic neurologique des nouveau-nés asphyxiques puisse être considéré comme gravement altéré. Une étude récente sur 16 nouveau-nés ayant présenté une HI périnatale (10 contrôles) rapporte également une augmentation statistiquement significative des ratios du lactate dans les thalami dans cette population comparée aux contrôles (Cheong et al., 2006). Les mêmes résultats sont obtenus au niveau des thalami par Da Silva et al chez des nouveau-nés explorés autour du 13^{ième} jour de vie (da Silva et al., 2006). D'autres auteurs ont montré une élévation du rapport Lac/Cho dans les NGC à la phase aiguë dans les premiers jours de vie (Barkovich et al., 1999; Meyer-Witte et al., 2008). Kadri et al (Kadri et al., 2003) ont eu l'originalité de placer les régions d'intérêt en dehors des zones visiblement lésées chez 33 nouveau-nés asphyxiques. Ils ont observé au niveau du cortex occipital, une augmentation significative du ratio Lac/Cr mesuré à 6 jours de vie chez les enfants ayant une altération de l'état neurologique à 24 mois. Les recommandations récentes Nord-Américaines précisent qu'un ratio lactate/créatine >1 dans les 18 premières heures de vie au niveau des NGC en CSI était plus souvent retrouvé chez des nouveau-nés présentant une EHI que les témoins. D'autres études ont confirmé l'élévation des ratios du lactate (Lac/Cr, Lac/NAA, Lac/Cho) chez les enfants présentant une EHI dans les 15 jours suivant la naissance (Ment et al., 2002).

Nous avons aussi constaté que les ratios du NAA/Cr à gauche mais pas à droite étaient statistiquement plus bas chez les enfants du groupe B que ceux du groupe A et cette différence restait significative à 6 mois de vie. Nous n'avons pas constaté cela du côté droit, ni à 8 jours de vie, ni à 6 mois de vie. Ce résultat est surprenant car la littérature fait état d'une diminution significative des ratios du NAA au niveau des NGC généralement après la première semaine. Les valeurs du NAA/Cho ou NAA/Cr sont abaissés chez les patients

nouveau-nés ayant présenté une souffrance asphyxique et la différence est significative au delà des premiers jours de vie (Barkovich et al., 1999). Il existe une corrélation entre la baisse de ces ratios mesurés à 8 ou 15 jours de vie et le devenir neurologique ultérieur, corrélation qui n'existe pas si ces ratios sont calculés dans les 8 premiers jours de vie (Huppi and Barnes, 1997). Boichot et al ont montré que les nouveau-nés présentant dans les NGC une concentration de NAA inférieure à 4 mmol/L sur une SRM réalisée entre le deuxième et le douzième jour de vie, avait une évolution neurologique mauvaise avec une sensibilité de 94% et une spécificité de 93% (Boichot et al., 2006). Cependant Cheong et al rapporte une valeur pronostique des ratios NAA/Cho et NAA/Cr meilleure que ceux du Lactate chez 17 patients présentant une souffrance asphyxique néonatale et ce dans les trois premiers jours de vie, date de réalisation de l'examen de spectroscopie par résonance magnétique (Cheong et al., 2006). Meyer-Witte et al (Meyer-Witte et al., 2008) ont montré que les ratios du NAA étaient significativement plus bas chez les patients décédés dans une série de 26 nouveau-nés ayant présenté une souffrance asphyxique et ayant bénéficié d'une SRM entre le premier et le neuvième jour de vie. Kadri et al (Kadri et al., 2003) ont montré chez des nouveau-nés asphyxiques ayant bénéficié d'une SRM au 6^{ème} jour que la valeur du ratio NAA/Cho était pronostique sur le devenir à 24 mois tandis que le ratio NAA/Cr ne l'était pas. Da Silva (da Silva et al., 2006) et al n'ont pas montré de différence significative des valeurs du ratio NAA/Cr au niveau thalamique mesurés à 13,6+/-4 jours chez des nouveau-nés asphyxiques en fonction de leur neurodéveloppement à 6 mois. Cependant leur résultat est à la limite de la significativité et leur nombre de patients faible (N = 11). On peut supposer qu'avec davantage de patients, les ratios du NAA dans leur série pourraient représenter un facteur pronostique sur le développement neurologique des patients examinés. Shu et al (Shu et al., 1997) ont également montré dans une population de 37 nouveau-nés (SRM à 6 jours de vie, série de patients hétérogène : traumatisme, méningite, asphyxie, maladie métabolique) au niveau de la SG occipitale et la SB pariétale que les ratios NAA/Cho étaient significativement corrélés au devenir neurologique à 15 mois tandis que les ratios NAA/Cr ne l'étaient pas.

Concernant la choline, nos résultats montre un taux significativement plus élevé chez les patients du groupe B à droite comme à gauche si l'on s'intéresse au devenir à 8 jours et seulement à droite si l'on observe le devenir des patients à 6 mois. Cependant nos résultats concernant la Choline, nous l'avons déjà dit, méritent d'être pris avec précaution du fait de

certaines mesures en apparence aberrantes. Da Silva et al (da Silva et al., 2006) n'ont pas observé à 6 mois sur leur cohorte de 11 patients une significativité de la valeur des ratios de la Choline en fonction de l'évolution des patients. Shu et al (Shu et al., 1997) ont eux observé dans leur série hétérogène de patients (37 nouveau-nés, cf. supra) que les ratios Cho/Cr au niveau pariétal et occipital étaient corrélés au devenir neurologique à 15 mois des patients. Ainsi, dans l'évaluation précoce des patients, nous notons que l'intérêt pronostique de l'IRM conventionnelle (incluant l'imagerie de diffusion) peut manquer de significativité tandis les mesures effectuées en SRM ou CSI particulièrement concernant les ratios du lactate apparaissent plus pertinentes. Ces ratios, spécifiquement, semblent conserver un intérêt pronostique dans le temps (résultats confirmés à 6 mois) sur les putamen/pallidum. Cet intérêt pronostique trouve tout son sens, notamment, dans l'évaluation des patients les plus graves. C'est avec ces critères (associés à tous les déterminants du pronostic des EHI que nous avons détaillés auparavant) qu'aujourd'hui, le clinicien et le neuroradiologue jugent de la gravité de la situation chez le nouveau-né asphyxique. Ce sont aussi l'ensemble de ces critères (cliniques, paracliniques, neuroradiologiques) qui peuvent amener au choix de ne pas poursuivre une réanimation. C'est pour cette raison qu'il convient de rester prudent sur le pronostic à moyen et long terme des patients avec ces paramètres car ce biais persiste et les patients les plus graves, habituellement décèdent.

Pour apprécier le pronostic les formes intermédiaires d'EHI et de certaines considérées comme peu graves ou bénignes, il apparaît important alors d'obtenir de nouveaux paramètres neuroradiologiques. Ceux fournis par l'IRM des tenseurs de diffusion peuvent constituer une piste dans cette réflexion.

3.2.4. Données DTI (PRIDE et FSL)

En conservant la même méthodologie d'évaluation avec le logiciel PRIDE V4, nous avons observé les mêmes résultats à 8 jours et à 6 mois en termes de significativité des valeurs moyennes de FA et d'ADC dans les zones définies pour l'exploration de ces paramètres c'est-à-dire les putamen/pallidum, les BPCI et les pédoncules cérébraux.

Ainsi la valeur moyenne de la FA est significativement plus basse au niveau des BPCI et des pédoncules cérébraux (mais pas des putamen/pallidum) chez les enfants du groupe B comparativement à ceux du groupe A et la valeur moyenne de l'ADC est significativement plus basse au niveau des BPCI et des putamen/pallidum (mais pas des pédoncules cérébraux)

chez les enfants du groupe B comparativement à ceux du groupe A. La persistance dans le temps de la significativité de ces paramètres nous confirme leur robustesse. Ces résultats devront être confirmés avec l'évolution à 1 voire 2 ans des enfants inclus dans BIGHIN. Il serait surtout très important de confirmer ces données sur une cohorte prospective beaucoup plus volumineuse de 150 ou 200 patients.

Les données obtenues par TBSS sous FSL confirment celles que nous avons obtenues avec PRIDE. Les différences significatives, alors que le logiciel a travaillé sans *a priori*, sont observées dans les zones que nous avons définies avec PRIDE. La robustesse et la puissance de la significativité sont aussi superposables. Par exemple, les comparaisons des valeurs moyennes d'ADC et le devenir à 6 mois avec le score d'Amiel-Tison montrent sur le squelette du bleu très clair au niveau des BPCI, témoin d'une forte significativité ; les valeurs obtenues avec PRIDE dans ces zones avec l'ADC sont avec un $p = 0,003$ à droite et $0,001$ à gauche. Cela confirme les travaux réalisés il y a 10 ans par Mary Rutherford (Rutherford et al., 1998) mais leur donne un sens physiopathologique. Au niveau des pédoncules cérébraux, pour la même comparaison, le squelette de l'ADC apparaît en vert, témoin de l'absence de différence significative des valeurs moyennes de ce paramètre entre les deux groupes d'évolution. Ceci est retrouvé avec PRIDE dans ces régions pour l'évolution à 6 mois avec respectivement à droite et à gauche un $p = 0,66$ et $0,26$. Les mêmes observations peuvent être rapportées pour la mesure de la valeur moyenne de la FA et l'évolution à 6 mois des patients : bleu foncé au niveau des BPCI avec un aspect nettement plus homogène à droite avec respectivement à droite et à gauche avec PRIDE des $p = 0,0003$ et $0,01$. On observe également du bleu foncé, là encore plus homogène à droite qu'à gauche au niveau des pédoncules cérébraux avec TBSS et une concordance avec PRIDE avec $p = 0,01$ à droite et $p = 0,049$ à gauche.

La comparaison entre les paramètres neuroradiologiques précoces et le BLR n'a été faite que par TBSS sous FSL. Nous observons une forte association significative entre les valeurs moyennes d'ADC et la valeur du BLR dans notre série au niveau de l'ensemble des capsules internes mais pas des pédoncules cérébraux. La significativité est aussi très forte au niveau de la corona radiata, des capsules externes et du corps calleux.

Ce point est intéressant car il est nouveau, pas tant sur la notion d'une altération du corps calleux dans les phénomènes asphyxiques du nouveau-né, mais potentiellement sur la compréhension physiopathologique du phénomène. Manerù et al (Manerù et al., 2003) ont

montré que des adolescents ayant présenté à la naissance une asphyxie périnatale, possède un corps calleux plus fin que des sujets contrôles. Kubota (Kubota et al., 2008) à partir d'un cas rapporté d'un nouveau-né présentant des convulsions a observé des anomalies au niveau du corps calleux en IRM de diffusion (hyperintensité témoignant de la restriction de la diffusion de l'eau à cet endroit). Tegkul (Tekgul et al., 2004) a rapporté la fréquence des anomalies du corps calleux en IRM (réalisée entre 4 et 12 mois) chez des patients ayant présenté une asphyxie périnatale et rattaché cette anomalie à la distribution des lésions HI dans le cerveau. Les anomalies observées chez les 65 nouveau-nés à terme de cette étude étaient les suivantes : leucomalacies périventriculaires : 21 enfants (32%), atrophie corticale sévère : 17 enfants (26%), encéphalopathie multikystique : 10 enfants (15%), Altération de la SG profonde : 8 enfants (12%), Anomalies corticales focales : 6 enfants (9%), retard de myélinisation : 3 enfants (5%). Ce qui était notable dans la publication de Tegkul est la proportion d'enfants présentant un corps calleux fin (27 sur 65). Dans la catégorie de ceux qui avaient une atrophie corticale sévère, 59 % d'entre eux présentaient une atrophie du corps calleux. Cette association entre atrophie corticale et atrophie du corps calleux supporte la théorie de la dégénérescence préwallérienne des fibres interhémisphériques en réponse à l'HI hémisphérique comme Groenendaal (Groenendaal et al., 2006) l'a évoqué concernant l'atteinte des pédoncules cérébraux dans l'HI périnatale. Cependant les résultats de notre étude pourraient défendre l'idée que l'atteinte du corps calleux est primitive, d'emblée présente, et non secondaire à une atteinte hémisphérique.

Lorsqu'on compare la valeur moyenne de la FA et le devenir des patients à 6 mois avec le BLR, aucune zone n'est significativement marquée.

L'utilisation du logiciel FSL et de TBSS pour les analyses statistique ont donc permis de confirmer les hypothèses *a priori* posées lors de notre travail et vérifiées par le logiciel PRIDE par une méthode sans *a priori*. La lecture par FSL des anomalies est comparable sur le principe avec l'imagerie de diffusion. Il n'est pas nécessaire de repasser par le calcul de la FA ou l'ADC pour identifier les anomalies sur les squelettes. Cet aspect est très intéressant et amène la réflexion suivante : serait-il possible d'utiliser FSL et TBSS exactement comme l'imagerie de diffusion conventionnelle ? En effet, à la différence avec l'imagerie de diffusion conventionnelle qui peut être lue de façon individuelle pour chaque patient, il est nécessaire à TBSS pour « travailler » de disposer préalablement d'une banque de données, Le logiciel comparant alors entre elles les images. L'objectif d'un travail de recherche serait d'essayer

de réaliser une banque de données sous FSL de cerveaux de nouveau-nés sains et d'utiliser cette banque de données comme référence pour la comparer à la séquence DTI d'un nouveau-né suspect d'asphyxie périnatale. Le rendu en couleur pourrait permettre d'identifier chez le patient suspect les zones statistiquement différentes de la normalité pour la valeur moyenne de la FA tout autant que pour la valeur moyenne de l'ADC.

Les résultats concernant les paramètres DTI et leur association avec le devenir à court terme des nouveau-nés asphyxiques est confirmé sur les analyses à 6 mois.

Il est indispensable de développer des outils d'évaluation neuroradiologiques des nouveau-nés asphyxiques présentant des critères intermédiaires d'encéphalopathie HI périnatale et de les évaluer sur une large cohorte prospective multicentrique.

L'analyse actuellement des images des IRM des tenseurs de diffusion ne permet pas une lecture ergonomique et directe de la Fraction d'Anisotropie ou du Coefficient Apparent de Diffusion de l'eau libre.

La possibilité de lire les images d'IRM des tenseurs de diffusion comme les images de trace en diffusion conventionnelle permettrait une utilisation plus large de cette technique.

CONCLUSION

Les conséquences de la souffrance asphyxique périnatale ne doivent pas être une fatalité. Les progrès importants qui ont été réalisés dans les 30 dernières années ont permis de comprendre un peu mieux les mécanismes intimes de ces phénomènes d'Hypoxie-Ischémie. L'enjeu est de taille car les séquelles et la mortalité restent élevées dans la population des enfants qui présentent ces anomalies. Les modèles animaux ne sont pas parfaits et ne reflètent qu'incomplètement les mécanismes intriqués de trouble de l'oxygénation et de perfusion. La promotion de thérapeutiques applicables chez l'humain a révolutionné, sinon la prise en charge, tout au moins l'idée qu'on se faisait de cette dernière. Nous disposons aujourd'hui de traitements efficaces pour lutter contre les conséquences de l'asphyxie périnatale. L'hypothermie, par exemple, est d'autant plus intéressante qu'elle semble être particulièrement efficace sur les encéphalopathies néonatales asphyxiques modérées. L'érythropoïétine est également utilisée maintenant en clinique humaine dans l'asphyxie périnatale et les résultats sont encourageants après 18 mois de suivi. Notre étude animale a montré que l'action de cette molécule (à des doses certes non applicables actuellement chez l'humain) peut être très précoce et possiblement médiée par l'augmentation de l'expression de molécules régulatrices des flux hydriques cellulaires, les Aquaporines.

Le pronostic de l'encéphalopathie hypoxique-ischémique du nouveau-né est difficile à préciser particulièrement pour les formes dites intermédiaires (score de Sarnat à 2, score d'Amiel-Tison avec des anomalies modérées). Nos travaux ont montré qu'il était possible d'utiliser des marqueurs neuroradiologiques précoces en IRM (dans les premiers jours de vie) tels que la Fraction d'Anisotropie ou le Coefficient Apparent de Diffusion de l'eau dans des régions cibles du cerveau (capsules internes, striatum, pédoncules cérébraux) pour préciser le pronostic des nouveau-nés asphyxiques. L'interprétation des résultats de notre travail est limitée par la petitesse de notre cohorte. Cette limite est d'autant plus pénalisante qu'elle ne nous permet pas d'apprécier correctement l'impact de la mesure de ces marqueurs sur les formes modérées d'encéphalopathies. Des études complémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre les processus physiopathologiques conduisant à une atteinte cérébrale dans l'HIE. La mise en place d'une cohorte de suivi plus importante, multicentrique avec les mêmes critères d'inclusion que BIGHIN, dans le cadre d'un projet de PHRC national est en cours d'élaboration. Cette étude prospective pourrait permettre de répondre aux interrogations suscitées par la variabilité des évolutions des encéphalopathies

néonatales asphyxiques « intermédiaires » pour évaluer la pertinence des variations du Coefficient Apparent de Diffusion de l'eau ou de la Fraction d'Anisotropie dans des régions cérébrales cibles et distinguer les enfants dont l'évolution risque d'être défavorable.

Références

- Adamson, S.J., Alessandri, L.M., Badawi, N., Burton, P.R., Pemberton, P.J., Stanley, F., 1995. Predictors of neonatal encephalopathy in full-term infants. *Bmj* 311, 598-602.
- Amiel-Tison, C., 2002. Update of the Amiel-Tison neurologic assessment for the term neonate or at 40 weeks corrected age. *Pediatr Neurol* 27, 196-212.
- Amiel-Tison, C., Ellison, P., 1986. Birth asphyxia in the fullterm newborn: early assessment and outcome. *Dev Med Child Neurol* 28, 671-682.
- Arvin, K.L., Han, B.H., Du, Y., Lin, S.Z., Paul, S.M., Holtzman, D.M., 2002. Minocycline markedly protects the neonatal brain against hypoxic-ischemic injury. *Ann Neurol* 52, 54-61.
- Ashwal, S., Tone, B., Tian, H.R., Chong, S., Obenaus, A., 2007. Comparison of two neonatal ischemic injury models using magnetic resonance imaging. *Pediatr Res* 61, 9-14.
- Azzopardi, D.V., Strohm, B., Edwards, A.D., Dyet, L., Halliday, H.L., Juszczak, E., Kapellou, O., Levene, M., Marlow, N., Porter, E., Thoresen, M., Whitelaw, A., Brocklehurst, P., 2009. Moderate hypothermia to treat perinatal asphyxial encephalopathy. *N Engl J Med* 361, 1349-1358.
- Back, S.A., Luo, N.L., Borenstein, N.S., Levine, J.M., Volpe, J.J., Kinney, H.C., 2001. Late oligodendrocyte progenitors coincide with the developmental window of vulnerability for human perinatal white matter injury. *J Neurosci* 21, 1302-1312.
- Back, S.A., Riddle, A., Hohimer, A.R., 2006. Role of instrumented fetal sheep preparations in defining the pathogenesis of human periventricular white-matter injury. *J Child Neurol* 21, 582-589.
- Back, S.A., Riddle, A., McClure, M.M., 2007. Maturation-dependent vulnerability of perinatal white matter in premature birth. *Stroke* 38, 724-730.
- Badaut, J., Lasbennes, F., Magistretti, P.J., Regli, L., 2002. Aquaporins in brain: distribution, physiology, and pathophysiology. *J Cereb Blood Flow Metab* 22, 367-378.
- Bagenholm, R., Nilsson, U.A., Gotborg, C.W., Kjellmer, I., 1998. Free radicals are formed in the brain of fetal sheep during reperfusion after cerebral ischemia. *Pediatr Res* 43, 271-275.
- Baker, A., 2004. Ischemic preconditioning in the brain. *Can J Anaesth* 51, 201-205.
- Bao, X.L., Yu, R.J., Li, Z.S., 1993. 20-item neonatal behavioral neurological assessment used in predicting prognosis of asphyxiated newborn. *Chin Med J (Engl)* 106, 211-215.
- Barantin, L., Akoka, S., Tranquart, F., Saliba, E., Pourcelot, L., 1995. La spectroscopie par résonance magnétique nucléaire: Méthodologie et applications à l'étude de l'asphyxie périnatale. *Neurophysiol Clin* 25, 115-129.
- Barkovich, A.J., 2006. MR imaging of the neonatal brain. *Neuroimaging Clin N Am* 16, 117-135, viii-ix.
- Barkovich, A.J., Baranski, K., Vigneron, D., Partridge, J.C., Hallam, D.K., Hajnal, B.L., Ferriero, D.M., 1999. Proton MR spectroscopy for the evaluation of brain injury in asphyxiated, term neonates. *AJNR Am J Neuroradiol* 20, 1399-1405.
- Barkovich, A.J., Hajnal, B.L., Vigneron, D., Sola, A., Partridge, J.C., Allen, F., Ferriero, D.M., 1998. Prediction of neuromotor outcome in perinatal asphyxia: evaluation of MR scoring systems. *AJNR Am J Neuroradiol* 19, 143-149.
- Barkovich, A.J., Miller, S.P., Bartha, A., Newton, N., Hamrick, S.E., Mukherjee, P., Glenn, O.A., Xu, D., Partridge, J.C., Ferriero, D.M., Vigneron, D.B., 2006. MR imaging, MR spectroscopy, and diffusion tensor imaging of sequential studies in neonates with encephalopathy. *AJNR Am J Neuroradiol* 27, 533-547.

Barkovich, A.J., Westmark, K.D., Bedi, H.S., Partridge, J.C., Ferriero, D.M., Vigneron, D.B., 2001. Proton spectroscopy and diffusion imaging on the first day of life after perinatal asphyxia: preliminary report. *AJNR Am J Neuroradiol* 22, 1786-1794.

Barnett, A., Mercuri, E., Rutherford, M., Haataja, L., Frisone, M.F., Henderson, S., Cowan, F., Dubowitz, L., 2002. Neurological and perceptual-motor outcome at 5 - 6 years of age in children with neonatal encephalopathy: relationship with neonatal brain MRI. *Neuropediatrics* 33, 242-248.

Bartha, A.I., Yap, K.R., Miller, S.P., Jeremy, R.J., Nishimoto, M., Vigneron, D.B., Barkovich, A.J., Ferriero, D.M., 2007. The normal neonatal brain: MR imaging, diffusion tensor imaging, and 3D MR spectroscopy in healthy term neonates. *AJNR Am J Neuroradiol* 28, 1015-1021.

Baud, O., Daire, J.L., Dalmaz, Y., Fontaine, R.H., Krueger, R.C., Sebag, G., Evrard, P., Gressens, P., Verney, C., 2004. Gestational hypoxia induces white matter damage in neonatal rats: a new model of periventricular leukomalacia. *Brain Pathol* 14, 1-10.

Baud, O., Sola, A., 2007. Corticosteroids in perinatal medicine: how to improve outcomes without affecting the developing brain? *Semin Fetal Neonatal Med* 12, 273-279.

Benders, M.J., Bos, A.F., Rademaker, C.M., Rijken, M., Torrance, H.L., Groenendaal, F., van Bel, F., 2006. Early postnatal allopurinol does not improve short term outcome after severe birth asphyxia. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 91, F163-165.

Boichot, C., Walker, P.M., Durand, C., Grimaldi, M., Chapuis, S., Gouyon, J.B., Brunotte, F., 2006. Term neonate prognoses after perinatal asphyxia: contributions of MR imaging, MR spectroscopy, relaxation times, and apparent diffusion coefficients. *Radiology* 239, 839-848.

Brines, M.L., Ghezzi, P., Keenan, S., Agnello, D., de Lanerolle, N.C., Cerami, C., Itri, L.M., Cerami, A., 2000. Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 10526-10531.

Brissaud, O., Chateil, J.F., Bordessoules, M., Brun, M., 2005. Chemical shift imaging and localised magnetic resonance spectroscopy in full-term asphyxiated neonates. *Pediatr Radiol* 35, 998-1005.

Buller, K.M., Carty, M.L., Reinebrant, H.E., Wixey, J.A., 2009. Minocycline: a neuroprotective agent for hypoxic-ischemic brain injury in the neonate? *J Neurosci Res* 87, 599-608.

Cady, E.B., Amess, P., Penrice, J., Wylezinska, M., Sams, V., Wyatt, J.S., 1997. Early cerebral-metabolite quantification in perinatal hypoxic-ischaemic encephalopathy by proton and phosphorus magnetic resonance spectroscopy. *Magn Reson Imaging* 15, 605-611.

Cady, E.B., Costello, A.M., Dawson, M.J., Delpy, D.T., Hope, P.L., Reynolds, E.O., Tofts, P.S., Wilkie, D.R., 1983. Non-invasive investigation of cerebral metabolism in newborn infants by phosphorus nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Lancet* 1, 1059-1062.

Cady, E.B., Lorek, A., Penrice, J., Wylezinska, M., Cooper, C.E., Brown, G.C., Owen-Reece, H., Kirkbride, V., Wyatt, J.S., Osmund, E., et al., 1994. Brain-metabolite transverse relaxation times in magnetic resonance spectroscopy increase as adenosine triphosphate depletes during secondary energy failure following acute hypoxia-ischaemia in the newborn piglet. *Neurosci Lett* 182, 201-204.

Cai, Z., Pang, Y., Xiao, F., Rhodes, P.G., 2001. Chronic ischemia preferentially causes white matter injury in the neonatal rat brain. *Brain Res* 898, 126-135.

Carli, G., Reiger, I., Evans, N., 2004. One-year neurodevelopmental outcome after moderate newborn hypoxic ischaemic encephalopathy. *J Paediatr Child Health* 40, 217-220.

Cascio, C.J., Gerig, G., Piven, J., 2007. Diffusion tensor imaging: Application to the study of the developing brain. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 46, 213-223.

- Chang, Y.C., Huang, C.C., 2006. Perinatal brain injury and regulation of transcription. *Curr Opin Neurol* 19, 141-147.
- Chateil, J.F., 1999. Etude par résonance magnétique nucléaire des lésions anoxo-ischémiques du système nerveux central. Bordeaux 2, Bordeaux.
- Chaudhari, T., McGuire, W., 2008. Allopurinol for preventing mortality and morbidity in newborn infants with suspected hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Cochrane Database Syst Rev*, CD006817.
- Cheong, J.L., Cady, E.B., Penrice, J., Wyatt, J.S., Cox, I.J., Robertson, N.J., 2006. Proton MR spectroscopy in neonates with perinatal cerebral hypoxic-ischemic injury: metabolite peak-area ratios, relaxation times, and absolute concentrations. *AJNR Am J Neuroradiol* 27, 1546-1554.
- Clark, W.M., Calcagno, F.A., Gabler, W.L., Smith, J.R., Coull, B.M., 1994. Reduction of central nervous system reperfusion injury in rabbits using doxycycline treatment. *Stroke* 25, 1411-1415; discussion 1416.
- Coskun, A., Lequin, M., Segal, M., Vigneron, D.B., Ferriero, D.M., Barkovich, A.J., 2001. Quantitative analysis of MR images in asphyxiated neonates: correlation with neurodevelopmental outcome. *AJNR Am J Neuroradiol* 22, 400-405.
- Couture, A., Veyrac, C., Baud, C., Saguintaah, M., Ferran, J.L., 2001. Advanced cranial ultrasound: transfontanellar Doppler imaging in neonates. *Eur Radiol* 11, 2399-2410.
- Craig, A., Ling Luo, N., Beardsley, D.J., Wingate-Pearse, N., Walker, D.W., Hohimer, A.R., Back, S.A., 2003. Quantitative analysis of perinatal rodent oligodendrocyte lineage progression and its correlation with human. *Exp Neurol* 181, 231-240.
- Crowther, C.A., Hiller, J.E., Doyle, L.W., Haslam, R.R., 2003. Effect of magnesium sulfate given for neuroprotection before preterm birth: a randomized controlled trial. *JAMA* 290, 2669-2676.
- da Silva, L.F., Hoefel Filho, J.R., Anes, M., Nunes, M.L., 2006. Prognostic value of 1H-MRS in neonatal encephalopathy. *Pediatr Neurol* 34, 360-366.
- Dalitz, P., Harding, R., Rees, S.M., Cock, M.L., 2003. Prolonged reductions in placental blood flow and cerebral oxygen delivery in preterm fetal sheep exposed to endotoxin: possible factors in white matter injury after acute infection. *J Soc Gynecol Investig* 10, 283-290.
- De Haan, H.H., Gunn, A.J., Williams, C.E., Gluckman, P.D., 1997. Brief repeated umbilical cord occlusions cause sustained cytotoxic cerebral edema and focal infarcts in near-term fetal lambs. *Pediatr Res* 41, 96-104.
- Debillon, T., Gras-Leguen, C., Leroy, S., Caillon, J., Roze, J.C., Gressens, P., 2003. Patterns of cerebral inflammatory response in a rabbit model of intrauterine infection-mediated brain lesion. *Brain Res Dev Brain Res* 145, 39-48.
- Debillon, T., Gras-Leguen, C., Verielle, V., Winer, N., Caillon, J., Roze, J.C., Gressens, P., 2000. Intrauterine infection induces programmed cell death in rabbit periventricular white matter. *Pediatr Res* 47, 736-742.
- Degos, V., Loron, G., Mantz, J., Gressens, P., 2008a. Neuroprotective strategies for the neonatal brain. *Anesth Analg* 106, 1670-1680.
- Degos, V., Teissier, N., Gressens, P., Puybasset, L., Mantz, J., 2008b. Inflammation et lésions cérébrales aiguës en anesthésie réanimation. *Ann Fr Anesth Reanim* 27, 1008-1015.
- Demers, E.J., McPherson, R.J., Juul, S.E., 2005. Erythropoietin protects dopaminergic neurons and improves neurobehavioral outcomes in juvenile rats after neonatal hypoxia-ischemia. *Pediatr Res* 58, 297-301.

Derrick, M., Drobyshevsky, A., Ji, X., Tan, S., 2007. A model of cerebral palsy from fetal hypoxia-ischemia. *Stroke* 38, 731-735.

Derrick, M., Luo, N.L., Bregman, J.C., Jilling, T., Ji, X., Fisher, K., Gladson, C.L., Beardsley, D.J., Murdoch, G., Back, S.A., Tan, S., 2004. Preterm fetal hypoxia-ischemia causes hypertonia and motor deficits in the neonatal rabbit: a model for human cerebral palsy? *J Neurosci* 24, 24-34.

Derugin, N., Wendland, M., Muramatsu, K., Roberts, T.P., Gregory, G., Ferriero, D.M., Vexler, Z.S., 2000. Evolution of brain injury after transient middle cerebral artery occlusion in neonatal rats. *Stroke* 31, 1752-1761.

Deschenes, G., Gosselin, J., Couture, M., Lachance, C., 2004. Interobserver reliability of the Amiel-Tison neurological assessment at term. *Pediatr Neurol* 30, 190-194.

Dixon, G., Badawi, N., Kurinczuk, J.J., Keogh, J.M., Silburn, S.R., Zubrick, S.R., Stanley, F.J., 2002. Early developmental outcomes after newborn encephalopathy. *Pediatrics* 109, 26-33.

Domi, T., deVeber, G., Shroff, M., Kouzmitcheva, E., MacGregor, D.L., Kirton, A., 2009. Corticospinal tract pre-wallerian degeneration: a novel outcome predictor for pediatric stroke on acute MRI. *Stroke* 40, 780-787.

Doyle, L.W., Crowther, C.A., Middleton, P., Marret, S., 2009. Antenatal magnesium sulfate and neurologic outcome in preterm infants: a systematic review. *Obstet Gynecol* 113, 1327-1333.

Dreyfus-Brisac, 1979. Neonatal electroencephalograph, New York.

Drobyshevsky, A., Derrick, M., Wyrwicz, A.M., Ji, X., Englof, I., Ullman, L.M., Zelaya, M.E., Northington, F.J., Tan, S., 2007. White matter injury correlates with hypertonia in an animal model of cerebral palsy. *J Cereb Blood Flow Metab* 27, 270-281.

Drobyshevsky, A., Robinson, A.M., Derrick, M., Wyrwicz, A.M., Ji, X., Englof, I., Tan, S., 2006. Sensory deficits and olfactory system injury detected by novel application of MEMRI in newborn rabbit after antenatal hypoxia-ischemia. *Neuroimage* 32, 1106-1112.

Duncan, J.R., Cock, M.L., Scheerlinck, J.P., Westcott, K.T., McLean, C., Harding, R., Rees, S.M., 2002. White matter injury after repeated endotoxin exposure in the preterm ovine fetus. *Pediatr Res* 52, 941-949.

Ekert, P., Perlman, M., Steinlin, M., Hao, Y., 1997. Predicting the outcome of postasphyxial hypoxic-ischemic encephalopathy within 4 hours of birth. *J Pediatr* 131, 613-617.

Ellis, M., Manandhar, N., Manandhar, D.S., Costello, A.M., 2000. Risk factors for neonatal encephalopathy in Kathmandu, Nepal, a developing country: unmatched case-control study. *Bmj* 320, 1229-1236.

Fan, G., Wu, Z., Chen, L., Guo, Q., Ye, B., Mao, J., 2003. Hypoxia-ischemic encephalopathy in full-term neonate: correlation proton MR spectroscopy with MR imaging. *Eur J Radiol* 45, 91-98.

Fau, S., Po, C., Gillet, B., Sizonenko, S., Mariani, J., Meric, P., Charriaut-Marlangue, C., 2007. Effect of the reperfusion after cerebral ischemia in neonatal rats using MRI monitoring. *Exp Neurol* 208, 297-304.

Finer, N.N., Robertson, C.M., Richards, R.T., Pinnell, L.E., Peters, K.L., 1981. Hypoxic-ischemic encephalopathy in term neonates: perinatal factors and outcome. *J Pediatr* 98, 112-117.

Follett, P.L., Rosenberg, P.A., Volpe, J.J., Jensen, F.E., 2000. NBQX attenuates excitotoxic injury in developing white matter. *J Neurosci* 20, 9235-9241.

Forbes, K.P., Pipe, J.G., Bird, C.R., 2002. Changes in brain water diffusion during the 1st year of life. *Radiology* 222, 405-409.

Forbes, K.P., Pipe, J.G., Bird, R., 2000. Neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy: detection with diffusion-weighted MR imaging. *AJNR Am J Neuroradiol* 21, 1490-1496.

Fu, X., Li, Q., Feng, Z., Mu, D., 2007. The roles of aquaporin-4 in brain edema following neonatal hypoxia ischemia and reoxygenation in a cultured rat astrocyte model. *Glia* 55, 935-941.

Girard, S., Kadhim, H., Roy, M., Lavoie, K., Brochu, M.E., Larouche, A., Sebire, G., 2009. Role of perinatal inflammation in cerebral palsy. *Pediatr Neurol* 40, 168-174.

Gire, C., Nicaise, C., Roussel, M., Soula, F., Girard, N., Somma-Mauvais, H., Lagier, P., Dejode, J.M., Farnarier, G., Garnier, J.M., 2000. Encephalopathie hypoxo-ischemique du nouveau-ne a terme. Apport de l'electroencephalogramme et de l'IRM ou de la TDM a l'evaluation pronostique. A propos de 26 observations. *Neurophysiol Clin* 30, 97-107.

Gluckman, P.D., Wyatt, J.S., Azzopardi, D., Ballard, R., Edwards, A.D., Ferriero, D.M., Polin, R.A., Robertson, C.M., Thoresen, M., Whitelaw, A., Gunn, A.J., 2005. Selective head cooling with mild systemic hypothermia after neonatal encephalopathy: multicentre randomised trial. *Lancet* 365, 663-670.

Gonzalez de Dios, J., A., M., 1996. Perinatal asphyxia, hypoxic-ischemic encephalopathy and neurological sequelae in full-term newborns: an epidemiological study. *Rev Neurol* 24, 812-819.

Gonzalez, F.F., Ferriero, D.M., 2008. Therapeutics for neonatal brain injury. *Pharmacol Ther* 120, 43-53.

Gonzalez, F.F., McQuillen, P., Mu, D., Chang, Y., Wendland, M., Vexler, Z., Ferriero, D.M., 2007. Erythropoietin enhances long-term neuroprotection and neurogenesis in neonatal stroke. *Dev Neurosci* 29, 321-330.

Gosselin, J., Gahagan, S., Amiel-Tison, C., 2005. The Amiel-Tison Neurological Assessment at Term: conceptual and methodological continuity in the course of follow-up. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 11, 34-51.

Groenendaal, F., Benders, M.J., de Vries, L.S., 2006. Pre-wallerian degeneration in the neonatal brain following perinatal cerebral hypoxia-ischemia demonstrated with MRI. *Semin Perinatol* 30, 146-150.

Groenendaal, F., Roelants-Van Rijn, A.M., van Der Grond, J., Toet, M.C., de Vries, L.S., 2001. Glutamate in cerebral tissue of asphyxiated neonates during the first week of life demonstrated in vivo using proton magnetic resonance spectroscopy. *Biol Neonate* 79, 254-257.

Gunn, A.J., Gunn, T.R., Gunning, M.I., Williams, C.E., Gluckman, P.D., 1998. Neuroprotection with prolonged head cooling started before postischemic seizures in fetal sheep. *Pediatrics* 102, 1098-1106.

Gunnarson, E., Song, Y., Kowalewski, J.M., Brismar, H., Brines, M., Cerami, A., Andersson, U., Zelenina, M., Aperia, A., 2009. Erythropoietin modulation of astrocyte water permeability as a component of neuroprotection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 1602-1607.

Habas, C., 2004. Fondements physiques élémentaires de la tractographie en tenseur de diffusion. *J Radiol* 85, 281-286.

Hagberg, H., Wilson, M.A., Matsushita, H., Zhu, C., Lange, M., Gustavsson, M., Poitras, M.F., Dawson, T.M., Dawson, V.L., Northington, F., Johnston, M.V., 2004. PARP-1 gene disruption in mice preferentially protects males from perinatal brain injury. *J Neurochem* 90, 1068-1075.

Hamon, M., Coskun, O., Courtheoux, P., Theron, J., Leclerc, X., 2005. IRM de diffusion du système nerveux central: applications cliniques. *J Radiol* 86, 369-385.

Hankins, G.D., Speer, M., 2003. Defining the pathogenesis and pathophysiology of neonatal encephalopathy and cerebral palsy. *Obstet Gynecol* 102, 628-636.

Hanrahan, J.D., Cox, I.J., Azzopardi, D., Cowan, F.M., Sargentoni, J., Bell, J.D., Bryant, D.J., Edwards, A.D., 1999. Relation between proton magnetic resonance spectroscopy within 18 hours of birth asphyxia and neurodevelopment at 1 year of age. *Dev Med Child Neurol* 41, 76-82.

Heinonen, S., Saarikoski, S., 2001. Reproductive risk factors of fetal asphyxia at delivery: a population based analysis. *J Clin Epidemiol* 54, 407-410.

Hermoye, L., Saint-Martin, C., Cosnard, G., Lee, S.K., Kim, J., Nassogne, M.C., Menten, R., Clapuyt, P., Donohue, P.K., Hua, K., Wakana, S., Jiang, H., van Zijl, P.C., Mori, S., 2006. Pediatric diffusion tensor imaging: normal database and observation of the white matter maturation in early childhood. *Neuroimage* 29, 493-504.

Higgins, R.D., Shankaran, S., 2009. Hypothermia for hypoxic ischemic encephalopathy in infants ≥ 36 weeks. *Early Hum Dev*.

Hirt, L., Ternon, B., Price, M., Mastour, N., Brunet, J.F., Badaut, J., 2009. Protective role of early aquaporin 4 induction against postischemic edema formation. *J Cereb Blood Flow Metab* 29, 423-433.

Huang, H., Yamamoto, A., Hossain, M.A., Younes, L., Mori, S., 2008. Quantitative cortical mapping of fractional anisotropy in developing rat brains. *J Neurosci* 28, 1427-1433.

Hunt, R.W., Neil, J.J., Coleman, L.T., Kean, M.J., Inder, T.E., 2004. Apparent diffusion coefficient in the posterior limb of the internal capsule predicts outcome after perinatal asphyxia. *Pediatrics* 114, 999-1003.

Huppi, P.S., 2001. MR imaging and spectroscopy of brain development. *Magn Reson Imaging Clin N Am* 9, 1-17, vii.

Huppi, P.S., Amato, M., 2001. Advanced magnetic resonance imaging techniques in perinatal brain injury. *Biol Neonate* 80, 7-14.

Huppi, P.S., Barnes, P.D., 1997. Magnetic resonance techniques in the evaluation of the newborn brain. *Clin Perinatol* 24, 693-723.

Huppi, P.S., Inder, T.E., 2001. Magnetic resonance techniques in the evaluation of the perinatal brain: recent advances and future directions. *Semin Neonatol* 6, 195-210.

Huppi, P.S., Lazeyras, F., 2001. Proton magnetic resonance spectroscopy (^1H -MRS) in neonatal brain injury. *Pediatr Res* 49, 317-320.

Inder, T., Neil, J., Yoder, B., Rees, S., 2004. Non-human primate models of neonatal brain injury. *Semin Perinatol* 28, 396-404.

Inder, T., Neil, J., Yoder, B., Rees, S., 2005. Patterns of cerebral injury in a primate model of preterm birth and neonatal intensive care. *J Child Neurol* 20, 965-967.

Jacobs, S., Hunt, R., Tarnow-Mordi, W., Inder, T., Davis, P., 2007. Cooling for newborns with hypoxic ischaemic encephalopathy. *Cochrane Database Syst Rev*, CD003311.

Jatana, M., Singh, I., Singh, A.K., Jenkins, D., 2006. Combination of systemic hypothermia and N-acetylcysteine attenuates hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Pediatr Res* 59, 684-689.

Jelinski, S.E., Yager, J.Y., Juurlink, B.H., 1999. Preferential injury of oligodendroblasts by a short hypoxic-ischemic insult. *Brain Res* 815, 150-153.

Kadri, M., Shu, S., Holshouser, B., Deming, D., Hopper, A., Peverini, R., Ashwal, S., 2003. Proton magnetic resonance spectroscopy improves outcome prediction in perinatal CNS insults. *J Perinatol* 23, 181-185.

Kapetanakis, A., Azzopardi, D., Wyatt, J., Robertson, N.J., 2009. Therapeutic hypothermia for neonatal encephalopathy: a UK survey of opinion, practice and neuro-investigation at the end of 2007. *Acta Paediatr* 98, 631-635.

Kellert, B.A., McPherson, R.J., Juul, S.E., 2007. A comparison of high-dose recombinant erythropoietin treatment regimens in brain-injured neonatal rats. *Pediatr Res* 61, 451-455.

Kim, S.S., Lee, K.H., Sung, D.K., Shim, J.W., Kim, M.J., Jeon, G.W., Chang, Y.S., Park, W.S., 2008. Erythropoietin attenuates brain injury, subventricular zone expansion, and sensorimotor deficits in hypoxic-ischemic neonatal rats. *J Korean Med Sci* 23, 484-491.

Kinsella, J.P., Cutter, G.R., Walsh, W.F., Gerstmann, D.R., Bose, C.L., Hart, C., Sekar, K.C., Auten, R.L., Bhutani, V.K., Gerdes, J.S., George, T.N., Southgate, W.M., Carriedo, H., Couser, R.J., Mammel, M.C., Hall, D.C., Pappagallo, M., Sardesai, S., Strain, J.D., Baier, M., Abman, S.H., 2006. Early inhaled nitric oxide therapy in premature newborns with respiratory failure. *N Engl J Med* 355, 354-364.

Kubota, T., Kidokoro, H., Ito, M., Oe, H., Hattori, T., Kato, Y., Ogawa, O., Natsume, J., Okumura, A., 2008. Diffusion-weighted imaging abnormalities in the corpus callosum after neonatal seizure: a case report. *Brain Dev* 30, 215-217.

Kumral, A., Baskin, H., Yesilirmak, D.C., Ergur, B.U., Aykan, S., Genc, S., Genc, K., Yilmaz, O., Tugyan, K., Giray, O., Duman, N., Ozkan, H., 2007. Erythropoietin attenuates lipopolysaccharide-induced white matter injury in the neonatal rat brain. *Neonatology* 92, 269-278.

Kumral, A., Genc, S., Ozer, E., Yilmaz, O., Gokmen, N., Koroglu, T.F., Duman, N., Genc, K., Ozkan, H., 2006. Erythropoietin downregulates bax and DP5 proapoptotic gene expression in neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Biol Neonate* 89, 205-210.

Kumral, A., Ozer, E., Yilmaz, O., Akhisaroglu, M., Gokmen, N., Duman, N., Ulukus, C., Genc, S., Ozkan, H., 2003. Neuroprotective effect of erythropoietin on hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Biol Neonate* 83, 224-228.

Lamblin, M.D., Racoussot, S., Pierrat, V., Duquennoy, C., Ouahsine, T., Lequien, P., Guieu, J.D., 1996. Encéphalopathie anoxo-ischémique du nouveau-né à terme. Apport de l'électroencéphalogramme et de l'échographie transfontanelle à l'évaluation pronostique. A propos de 29 observations. *Neurophysiol Clin* 26, 369-378.

Larouche, A., Roy, M., Kadhim, H., Tsanaclis, A.M., Fortin, D., Sebire, G., 2005. Neuronal injuries induced by perinatal hypoxic-ischemic insults are potentiated by prenatal exposure to lipopolysaccharide: animal model for perinatally acquired encephalopathy. *Dev Neurosci* 27, 134-142.

Le Bihan, D., Breton, E., Lallemand, D., Grenier, P., Cabanis, E., Laval-Jeantet, M., 1986. MR imaging of intravoxel incoherent motions: application to diffusion and perfusion in neurologic disorders. *Radiology* 161, 401-407.

Le Bihan, D., Mangin, J.F., Poupon, C., Clark, C.A., Pappata, S., Molko, N., Chabriat, H., 2001. Diffusion tensor imaging: concepts and applications. *J Magn Reson Imaging* 13, 534-546.

LeBlanc, M.H., Vig, V., Smith, B., Parker, C.C., Evans, O.B., Smith, E.E., 1991. MK-801 does not protect against hypoxic-ischemic brain injury in piglets. *Stroke* 22, 1270-1275.

Liauw, L., van der Grond, J., van den Berg-Huysmans, A.A., Palm-Meinders, I.H., van Buchem, M.A., van Wezel-Meijler, G., 2008. Hypoxic-ischemic encephalopathy: diagnostic value of conventional MR imaging pulse sequences in term-born neonates. *Radiology* 247, 204-212.

Liauw, L., van Wezel-Meijler, G., Veen, S., van Buchem, M.A., van der Grond, J., 2009. Do apparent diffusion coefficient measurements predict outcome in children with neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy? *AJNR Am J Neuroradiol* 30, 264-270.

Lipper, E.G., Voorhies, T.M., Ross, G., Vannucci, R.C., Auld, P.A., 1986. Early predictors of one-year outcome for infants asphyxiated at birth. *Dev Med Child Neurol* 28, 303-309.

Liu, A.Y., Zimmerman, R.A., Haselgrove, J.C., Bilaniuk, L.T., Hunter, J.V., 2001. Diffusion-weighted imaging in the evaluation of watershed hypoxic- ischemic brain injury in pediatric patients. *Neuroradiology* 43, 918-926.

Lorek, A., Takei, Y., Cady, E.B., Wyatt, J.S., Penrice, J., Edwards, A.D., Peebles, D., Wylezinska, M., Owen-Reece, H., Kirkbride, V., et al., 1994. Delayed ("secondary") cerebral energy failure after acute hypoxia-ischemia in the newborn piglet: continuous 48-hour studies by phosphorus magnetic resonance spectroscopy. *Pediatr Res* 36, 699-706.

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

Malik, G.K., Pandey, M., Kumar, R., Chawla, S., Rath, B., Gupta, R.K., 2002. MR imaging and in vivo proton spectroscopy of the brain in neonates with hypoxic ischemic encephalopathy. *Eur J Radiol* 43, 6-13.

Malik, G.K., Trivedi, R., Gupta, R.K., Hasan, K.M., Hasan, M., Gupta, A., Pandey, C.M., Narayana, P.A., 2006. Serial quantitative diffusion tensor MRI of the term neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE). *Neuropediatrics* 37, 337-343.

Mallard, C., Loeliger, M., Copolov, D., Rees, S., 2000. Reduced number of neurons in the hippocampus and the cerebellum in the postnatal guinea-pig following intrauterine growth-restriction. *Neuroscience* 100, 327-333.

Mallard, C., Welin, A.K., Peebles, D., Hagberg, H., Kjellmer, I., 2003. White matter injury following systemic endotoxemia or asphyxia in the fetal sheep. *Neurochem Res* 28, 215-223.

Mallard, E.C., Gunn, A.J., Williams, C.E., Johnston, B.M., Gluckman, P.D., 1992. Transient umbilical cord occlusion causes hippocampal damage in the fetal sheep. *Am J Obstet Gynecol* 167, 1423-1430.

Mallard, E.C., Williams, C.E., Johnston, B.M., Gunning, M.I., Davis, S., Gluckman, P.D., 1995. Repeated episodes of umbilical cord occlusion in fetal sheep lead to preferential damage to the striatum and sensitize the heart to further insults. *Pediatr Res* 37, 707-713.

Maneru, C., Junque, C., Salgado-Pineda, P., Serra-Grabulosa, J.M., Bartres-Faz, D., Ramirez-Ruiz, B., Bargallo, N., Tallada, M., Botet, F., 2003. Corpus callosum atrophy in adolescents with antecedents of moderate perinatal asphyxia. *Brain Inj* 17, 1003-1009.

Marret, S., Gressens, P., Gadisseux, J.F., Evrard, P., 1995a. Prevention by magnesium of excitotoxic neuronal death in the developing brain: an animal model for clinical intervention studies. *Dev Med Child Neurol* 37, 473-484.

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

McDonald, J.W., Silverstein, F.S., Johnston, M.V., 1988. Neurotoxicity of N-methyl-D-aspartate is markedly enhanced in developing rat central nervous system. *Brain Res* 459, 200-203.

McPherson, R.J., Demers, E.J., Juul, S.E., 2007. Safety of high-dose recombinant erythropoietin in a neonatal rat model. *Neonatology* 91, 36-43.

Meng, S., Qiao, M., Foniok, T., Tuor, U.I., 2005. White matter damage precedes that in gray matter despite similar magnetic resonance imaging changes following cerebral hypoxia-ischemia in neonatal rats. *Exp Brain Res* 166, 56-60.

Meng, S., Qiao, M., Scobie, K., Tomanek, B., Tuor, U.I., 2006. Evolution of magnetic resonance imaging changes associated with cerebral hypoxia-ischemia and a relatively selective white matter injury in neonatal rats. *Pediatr Res* 59, 554-559.

Ment, L.R., Bada, H.S., Barnes, P., Grant, P.E., Hirtz, D., Papile, L.A., Pinto-Martin, J., Rivkin, M., Slovis, T.L., 2002. Practice parameter: neuroimaging of the neonate: report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the Practice Committee of the Child Neurology Society. *Neurology* 58, 1726-1738.

Meyer-Witte, S., Brissaud, O., Brun, M., Lamireau, D., Bordessoules, M., Chateil, J.F., 2008. Apport pronostique de la resonance magnetique cerebrale dans l'encephalopathie hypoxique-ischemique du nouveau-ne a terme : score d'imagerie, spectroscopie. Etude de 26 cas. *Arch Pediatr* 15, 9-23.

Miller, S.P., Latal, B., Clark, H., Barnwell, A., Glidden, D., Barkovich, A.J., Ferriero, D.M., Partridge, J.C., 2004. Clinical signs predict 30-month neurodevelopmental outcome after neonatal encephalopathy. *Am J Obstet Gynecol* 190, 93-99.

Miller, S.P., McQuillen, P.S., Hamrick, S., Xu, D., Glidden, D.V., Charlton, N., Karl, T., Azakie, A., Ferriero, D.M., Barkovich, A.J., Vigneron, D.B., 2007. Abnormal brain development in newborns with congenital heart disease. *N Engl J Med* 357, 1928-1938.

Mori, S., Itoh, R., Zhang, J., Kaufmann, W.E., van Zijl, P.C., Solaiyappan, M., Yarowsky, P., 2001. Diffusion tensor imaging of the developing mouse brain. *Magn Reson Med* 46, 18-23.

Mori, S., Zhang, J., 2006. Principles of diffusion tensor imaging and its applications to basic neuroscience research. *Neuron* 51, 527-539.

Mukherjee, P., Miller, J.H., Shimony, J.S., Philip, J.V., Nehra, D., Snyder, A.Z., Conturo, T.E., Neil, J.J., McKinstry, R.C., 2002. Diffusion-tensor MR imaging of gray and white matter development during normal human brain maturation. *AJNR Am J Neuroradiol* 23, 1445-1456.

Munkeby, B.H., De Lange, C., Emblem, K.E., Bjornerud, A., Kro, G.A., Andresen, J., Winther-Larsen, E.H., Loberg, E.M., Hald, J.K., 2008. A piglet model for detection of hypoxic-ischemic brain injury with magnetic resonance imaging. *Acta Radiol* 49, 1049-1057.

Murray, D.M., Boylan, G.B., Fitzgerald, A.P., Ryan, C.A., Murphy, B.P., Connolly, S., 2008. Persistent lactic acidosis in neonatal hypoxic-ischaemic encephalopathy correlates with EEG grade and electrographic seizure burden. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 93, F183-186.

Naeye, R.L., Lin, H.M., 2001. Determination of the timing of fetal brain damage from hypoxemia-ischemia. *Am J Obstet Gynecol* 184, 217-224.

Neil, J.J., Shiran, S.I., McKinstry, R.C., Scheff, G.L., Snyder, A.Z., Almlie, C.R., Akbudak, E., Aronovitz, J.A., Miller, J.P., Lee, B.C., Conturo, T.E., 1998. Normal brain in human newborns: apparent diffusion coefficient and diffusion anisotropy measured by using diffusion tensor MR imaging. *Radiology* 209, 57-66.

Nelson, K.B., Dambrosia, J.M., Grether, J.K., Phillips, T.M., 1998. Neonatal cytokines and coagulation factors in children with cerebral palsy. *Ann Neurol* 44, 665-675.

Nielsen, S., Nagelhus, E.A., Amiry-Moghaddam, M., Bourque, C., Agre, P., Ottersen, O.P., 1997. Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain. *J Neurosci* 17, 171-180.

Olivier, P., Baud, O., Bousslama, M., Evrard, P., Gressens, P., Verney, C., 2007. Moderate growth restriction: deleterious and protective effects on white matter damage. *Neurobiol Dis* 26, 253-263.

Olivier, P., Baud, O., Evrard, P., Gressens, P., Verney, C., 2005. Prenatal ischemia and white matter damage in rats. *J Neuropathol Exp Neurol* 64, 998-1006.

Oppenheim, C., Ducreux, D., Rodrigo, S., Hodel, J., Tourdias, T., Charbonneau, F., Pierrefitte, S., Meder, J., 2007. Imagerie en tenseur de diffusion et tractographie de l'encéphale et de la moëlle. *J Radiol* 88, 510-520.

Oppenheim, C., Rodrigo, S., Poupon, C., Dumas de la Roque, A., Naggara, O., Meder, J.F., Fredy, D., 2004. Imagerie en tenseur de diffusion et système nerveux central. Pour quelles applications cliniques? *J Radiol* 85, 287-296.

Pacary, E., Petit, E., Bernaudin, M., 2006. Erythropoietin, a cytoprotective and regenerative cytokine, and the hypoxic brain. *Neurodegener Dis* 3, 87-93.

Pajevic, S., Pierpaoli, C., 1999. Color schemes to represent the orientation of anisotropic tissues from diffusion tensor data: application to white matter fiber tract mapping in the human brain. *Magn Reson Med* 42, 526-540.

Paro-Panjan, D., Neubauer, D., Kodric, J., Bratanic, B., 2005a. Amiel-Tison Neurological Assessment at term age: clinical application, correlation with other methods, and outcome at 12 to 15 months. *Dev Med Child Neurol* 47, 19-26.

Paro-Panjan, D., Sustersic, B., Neubauer, D., 2005b. Comparison of two methods of neurologic assessment in infants. *Pediatr Neurol* 33, 317-324.

Perlman, J.M., 2006a. Intervention strategies for neonatal hypoxic-ischemic cerebral injury. *Clin Ther* 28, 1353-1365.

Perlman, J.M., 2006b. Summary proceedings from the neurology group on hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics* 117, S28-33.

Petersson, K.H., Pinar, H., Stopa, E.G., Faris, R.A., Sadowska, G.B., Hanumara, R.C., Stonestreet, B.S., 2002. White matter injury after cerebral ischemia in ovine fetuses. *Pediatr Res* 51, 768-776.

Pezzani, C., Radvanyi-Bouvet, M.F., Relier, J.P., Monod, N., 1986. Neonatal electroencephalography during the first twenty-four hours of life in full-term newborn infants. *Neuropediatrics* 17, 11-18.

Phelan, J.P., Martin, G.I., Korst, L.M., 2005. Birth asphyxia and cerebral palsy. In: Hermansen, C.C. (Ed.), *Clinics in perinatology*. Elsevier, Philadelphia, pp. 61 - 76.

Pierpaoli, C., Basser, P.J., 1996. Toward a quantitative assessment of diffusion anisotropy. *Magn Reson Med* 36, 893-906.

Portman, R.J., Carter, B.S., Gaylord, M.S., Murphy, M.G., Thieme, R.E., Merenstein, G.B., 1990. Predicting neonatal morbidity after perinatal asphyxia: a scoring system. *Am J Obstet Gynecol* 162, 174-182.

Pressler, R.M., Boylan, G.B., Morton, M., Binnie, C.D., Rennie, J.M., 2001. Early serial EEG in hypoxic ischaemic encephalopathy. *Clin Neurophysiol* 112, 31-37.

Pu, Y., Li, Q.F., Zeng, C.M., Gao, J., Qi, J., Luo, D.X., Mahankali, S., Fox, P.T., Gao, J.H., 2000. Increased detectability of alpha brain glutamate/glutamine in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *AJNR Am J Neuroradiol* 21, 203-212.

Rabie, T., Marti, H.H., 2008. Brain protection by erythropoietin: a manifold task. *Physiology (Bethesda)* 23, 263-274.

Reddy, K., Mallard, C., Guan, J., Marks, K., Bennet, L., Gunning, M., Gunn, A., Gluckman, P., Williams, C., 1998. Maturation change in the cortical response to hypoperfusion injury in the fetal sheep. *Pediatr Res* 43, 674-682.

Renolleau, S., Aggoun-Zouaoui, D., Ben-Ari, Y., Charriaut-Marlangue, C., 1998. A model of transient unilateral focal ischemia with reperfusion in the P7 neonatal rat: morphological changes indicative of apoptosis. *Stroke* 29, 1454-1460; discussion 1461.

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

Robertson, C., Finer, N., 1985. Term infants with hypoxic-ischemic encephalopathy: outcome at 3.5 years. *Dev Med Child Neurol* 27, 473-484.

Robertson, N.J., Kuint, J., Counsell, T.J., Rutherford, T.A., Coutts, A., Cox, I.J., Edwards, A.D., 2000. Characterization of cerebral white matter damage in preterm infants using 1H and 31P magnetic resonance spectroscopy. *J Cereb Blood Flow Metab* 20, 1446-1456.

Robertson, N.J., Lewis, R.H., Cowan, F.M., Allsop, J.M., Counsell, S.J., Edwards, A.D., Cox, I.J., 2001. Early increases in brain myo-inositol measured by proton magnetic resonance spectroscopy in term infants with neonatal encephalopathy. *Pediatr Res* 50, 692-700.

Roelants-Van Rijn, A.M., Nikkels, P.G., Groenendaal, F., van Der Grond, J., Barth, P.G., Snoeck, I., Beek, F.J., de Vries, L.S., 2001a. Neonatal Diffusion-Weighted MR Imaging: Relation with Histopathology or Follow-Up MR Examination. *Neuropediatrics* 32, 286-294.

Roelants-Van Rijn, A.M., van der Grond, J., de Vries, L.S., Groenendaal, F., 2001b. Value of (1)H-MRS using different echo times in neonates with cerebral hypoxia-ischemia. *Pediatr Res* 49, 356-362.

Roohey, T., Raju, T.N., Moustogiannis, A.N., 1997. Animal models for the study of perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy: a critical analysis. *Early Hum Dev* 47, 115-146.

Rootwelt, T., Loberg, E.M., Moen, A., Oyasaeter, S., Saugstad, O.D., 1992. Hypoxemia and reoxygenation with 21% or 100% oxygen in newborn pigs: changes in blood pressure, base deficit, and hypoxanthine and brain morphology. *Pediatr Res* 32, 107-113.

Rumpel, H., Buchli, R., Gehrman, J., Aguzzi, A., Illi, O., Martin, E., 1995. Magnetic resonance imaging of brain edema in the neonatal rat: a comparison of short and long term hypoxia-ischemia. *Pediatr Res* 38, 113-118.

Rutherford, M., Counsell, S., Allsop, J., Boardman, J., Kapellou, O., Larkman, D., Hajnal, J., Edwards, D., Cowan, F., 2004. Diffusion-weighted magnetic resonance imaging in term perinatal brain injury: a comparison with site of lesion and time from birth. *Pediatrics* 114, 1004-1014.

Rutherford, M.A., Pennock, J.M., Counsell, S.J., Mercuri, E., Cowan, F.M., Dubowitz, L.M., Edwards, A.D., 1998. Abnormal magnetic resonance signal in the internal capsule predicts poor neurodevelopmental outcome in infants with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics* 102, 323-328.

Sakanaka, M., Wen, T.C., Matsuda, S., Masuda, S., Morishita, E., Nagao, M., Sasaki, R., 1998. In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4635-4640.

Sarnat, H.B., Sarnat, M.S., 1976. Neonatal encephalopathy. Following foetal distress. A clinical and electroencephalography study. *Arch Neurol* 33, 696-705.

Schreiber, M.D., Gin-Mestan, K., Marks, J.D., Huo, D., Lee, G., Srisuparp, P., 2003. Inhaled nitric oxide in premature infants with the respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 349, 2099-2107.

Schwartz, P.H., Massarweh, W.F., Vinters, H.V., Wasterlain, C.G., 1992. A rat model of severe neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Stroke* 23, 539-546.

Shah, P.S., Ohlsson, A., Perlman, M., 2007. Hypothermia to treat neonatal hypoxic ischemic encephalopathy: systematic review. *Arch Pediatr Adolesc Med* 161, 951-958.

Shah, S., Tracy, M., Smyth, J., 2004. Postnatal lactate as an early predictor of short-term outcome after intrapartum asphyxia. *J Perinatol* 24, 16-20.

Shankaran, S., Laptook, A.R., Ehrenkranz, R.A., Tyson, J.E., McDonald, S.A., Donovan, E.F., Fanaroff, A.A., Poole, W.K., Wright, L.L., Higgins, R.D., Finer, N.N., Carlo, W.A., Duara, S., Oh, W., Cotten, C.M., Stevenson, D.K., Stoll, B.J., Lemons, J.A., Guillet, R., Jobe, A.H., 2005. Whole-body hypothermia for neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy. *N Engl J Med* 353, 1574-1584.

Shannon, K., 1995. Recombinant human erythropoietin in neonatal anemia. *Clin Perinatol* 22, 627-640.

Shevell, M.I., 2004. The "Bermuda triangle" of neonatal neurology: cerebral palsy, neonatal encephalopathy, and intrapartum asphyxia. *Semin Pediatr Neurol* 11, 24-30.

Shu, S.K., Ashwal, S., Holshouser, B.A., Nystrom, G., Hinshaw, D.B., Jr., 1997. Prognostic value of 1H-MRS in perinatal CNS insults. *Pediatr Neurol* 17, 309-318.

Sidaros, A., Engberg, A.W., Sidaros, K., Liptrot, M.G., Herning, M., Petersen, P., Paulson, O.B., Jernigan, T.L., Rostrup, E., 2008. Diffusion tensor imaging during recovery from severe traumatic brain injury and relation to clinical outcome: a longitudinal study. *Brain* 131, 559-572.

Sie, L.T., van der Knaap, M.S., Oosting, J., de Vries, L.S., Lafeber, H.N., Valk, J., 2000. MR patterns of hypoxic-ischemic brain damage after prenatal, perinatal or postnatal asphyxia. *Neuropediatrics* 31, 128-136.

Sizonenko, S.V., Camm, E.J., Garbow, J.R., Maier, S.E., Inder, T.E., Williams, C.E., Neil, J.J., Huppi, P.S., 2007. Developmental changes and injury induced disruption of the radial organization of the cortex in the immature rat brain revealed by in vivo diffusion tensor MRI. *Cereb Cortex* 17, 2609-2617.

Smith, J., Wells, L., Dodd, K., 2000. The continuing fall in incidence of hypoxic-ischaemic encephalopathy in term infants. *Bjog* 107, 461-466.

Sola, A., Rogido, M., Lee, B.H., Genetta, T., Wen, T.C., 2005. Erythropoietin after focal cerebral ischemia activates the Janus kinase-signal transducer and activator of transcription signaling pathway and improves brain injury in postnatal day 7 rats. *Pediatr Res* 57, 481-487.

Sotak, C.H., 2002. The role of diffusion tensor imaging in the evaluation of ischemic brain injury - a review. *NMR Biomed* 15, 561-569.

Spandou, E., Papoutsopoulou, S., Soubasi, V., Karkavelas, G., Simeonidou, C., Kremenopoulos, G., Guiba-Tziampiri, O., 2004a. Hypoxia-ischemia affects erythropoietin and erythropoietin receptor expression pattern in the neonatal rat brain. *Brain Res* 1021, 167-172.

Spandou, E., Soubasi, V., Papoutsopoulou, S., Karkavelas, G., Simeonidou, C., Kaiki-Astara, A., Guiba-Tziampiri, O., 2004b. Erythropoietin prevents hypoxia/ischemia-induced DNA fragmentation in an experimental model of perinatal asphyxia. *Neurosci Lett* 366, 24-28.

Statler, P.A., McPherson, R.J., Bauer, L.A., Kellert, B.A., Juul, S.E., 2007. Pharmacokinetics of high-dose recombinant erythropoietin in plasma and brain of neonatal rats. *Pediatr Res* 61, 671-675.

Stejskal, E.O., Tanner, J.E., 1965. Spin diffusion measurements: spin echoes in the presence of a time-dependent field gradient. *J. Chem. Phys.* 42, 288 - 292.

Stone, B.S., Zhang, J., Mack, D.W., Mori, S., Martin, L.J., Northington, F.J., 2008. Delayed neural network degeneration after neonatal hypoxia-ischemia. *Ann Neurol* 64, 535-546.

Sun, Y., Calvert, J.W., Zhang, J.H., 2005. Neonatal hypoxia/ischemia is associated with decreased inflammatory mediators after erythropoietin administration. *Stroke* 36, 1672-1678.

Tait, M.J., Saadoun, S., Bell, B.A., Papadopoulos, M.C., 2008. Water movements in the brain: role of aquaporins. *Trends Neurosci* 31, 37-43.

Takeoka, M., Soman, T.B., Yoshii, A., Caviness, V.S., Gonzalez, R.G., Grant, P.E., Krishnamoorthy, K.S., 2002. Diffusion-weighted images in neonatal cerebral hypoxic-ischemic injury. *Pediatr Neurol* 26, 274-281.

Tekgul, H., Serdaroglu, G., Yalman, O., Tutuncuoglu, S., 2004. Prognostic correlative values of the late-infancy MRI pattern in term infants with perinatal asphyxia. *Pediatr Neurol* 31, 35-41.

Thomalla, G., Glauche, V., Koch, M.A., Beaulieu, C., Weiller, C., Rother, J., 2004. Diffusion tensor imaging detects early Wallerian degeneration of the pyramidal tract after ischemic stroke. *Neuroimage* 22, 1767-1774.

Thompson, C.M., Puterman, A.S., Linley, L.L., Hann, F.M., van der Elst, C.W., Molteno, C.D., Malan, A.F., 1997. The value of a scoring system for hypoxic ischaemic encephalopathy in predicting neurodevelopmental outcome. *Acta Paediatr* 86, 757-761.

Thoresen, M., 2000. Cooling the newborn after asphyxia - physiological and experimental background and its clinical use. *Semin Neonatol* 5, 61-73.

Thornberg, E., Thiringer, K., Odeback, Milsom, I., 1995. Birth asphyxia: incidence, clinical course and outcome in a Swedish population. *Acta Paediatr* 84, 927-932.

Ting, P., Yamaguchi, S., Bacher, J.D., Killens, R.H., Myers, R.E., 1983. Hypoxic-ischemic cerebral necrosis in midgestational sheep fetuses: physiopathologic correlations. *Exp Neurol* 80, 227-245.

Torrance, H.L., Benders, M.J., Derks, J.B., Rademaker, C.M., Bos, A.F., Van Den Berg, P., Longini, M., Buonocore, G., Venegas, M., Baquero, H., Visser, G.H., Van Bel, F., 2009. Maternal allopurinol during fetal hypoxia lowers cord blood levels of the brain injury marker S-100B. *Pediatrics* 124, 350-357.

Tourdias, T., Dragonu, I., Fushimi, Y., Deloire, M.S., Boiziau, C., Brochet, B., Moonen, C., Petry, K.G., Dousset, V., 2009. Aquaporin 4 correlates with apparent diffusion coefficient and hydrocephalus severity in the rat brain: A combined MRI-histological study. *Neuroimage*.

Trescher, W.H., Lehman, R.A., Vannucci, R.C., 1990. The influence of growth retardation on perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *Early Hum Dev* 21, 165-173.

Uehara, H., Yoshioka, H., Kawase, S., Nagai, H., Ohmae, T., Hasegawa, K., Sawada, T., 1999. A new model of white matter injury in neonatal rats with bilateral carotid artery occlusion. *Brain Res* 837, 213-220.

van der Kooij, M.A., Groenendaal, F., Kavelaars, A., Heijnen, C.J., van Bel, F., 2008. Neuroprotective properties and mechanisms of erythropoietin in in vitro and in vivo experimental models for hypoxia/ischemia. *Brain Res Rev* 59, 22-33.

van der Zijden, J.P., van der Toorn, A., van der Marel, K., Dijkhuizen, R.M., 2008. Longitudinal in vivo MRI of alterations in perilesional tissue after transient ischemic stroke in rats. *Exp Neurol* 212, 207-212.

van Pul, C., Buijs, J., Janssen, M.J., Roos, G.F., Vlaardingerbroek, M.T., Wijn, P.F., 2005. Selecting the best index for following the temporal evolution of apparent diffusion coefficient and diffusion anisotropy after hypoxic-ischemic white matter injury in neonates. *AJNR Am J Neuroradiol* 26, 469-481.

Vannucci, R.C., Vannucci, S.J., 1997. A model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *Ann N Y Acad Sci* 835, 234-249.

Verkman, A.S., Binder, D.K., Bloch, O., Auguste, K., Papadopoulos, M.C., 2006. Three distinct roles of aquaporin-4 in brain function revealed by knockout mice. *Biochim Biophys Acta* 1758, 1085-1093.

Vermeulen, R.J., van Schie, P.E., Hendriks, L., Barkhof, F., van Weissenbruch, M., Knol, D.L., Pouwels, P.J., 2008. Diffusion-weighted and conventional MR imaging in neonatal hypoxic ischemia: two-year follow-up study. *Radiology* 249, 631-639.

Vial, F., Serriere, S., Barantin, L., Montharu, J., Nadal-Desbarats, L., Pourcelot, L., Seguin, F., 2004. A newborn piglet study of moderate hypoxic-ischemic brain injury by 1H-MRS and MRI. *Magn Reson Imaging* 22, 457-465.

Vigneron, D.B., Barkovich, A.J., Noworolski, S.M., von dem Bussche, M., Henry, R.G., Lu, Y., Partridge, J.C., Gregory, G., Ferriero, D.M., 2001. Three-dimensional proton MR spectroscopic imaging of premature and term neonates. *AJNR Am J Neuroradiol* 22, 1424-1433.

Wakana, S., Jiang, H., Nagae-Poetscher, L.M., van Zijl, P.C., Mori, S., 2004. Fiber tract-based atlas of human white matter anatomy. *Radiology* 230, 77-87.

Wang, S., Wu, E.X., Tam, C.N., Lau, H.F., Cheung, P.T., Khong, P.L., 2008. Characterization of white matter injury in a hypoxic-ischemic neonatal rat model by diffusion tensor MRI. *Stroke* 39, 2348-2353.

Wang, X., Zhu, C., Gerwien, J.G., Schratzenholz, A., Sandberg, M., Leist, M., Blomgren, K., 2004. The nonerythropoietic asialoerythropoietin protects against neonatal hypoxia-ischemia as potently as erythropoietin. *J Neurochem* 91, 900-910.

Wang, Y., Cheung, P.T., Shen, G.X., Bhatia, I., Wu, E.X., Qiu, D., Khong, P.L., 2007. Comparing diffusion-weighted and T2-weighted MR imaging for the quantification of infarct size in a neonatal rat hypoxic-ischemic model at 24h post-injury. *Int J Dev Neurosci* 25, 1-5.

Wang, Y., Cheung, P.T., Shen, G.X., Wu, E.X., Cao, G., Bart, I., Wong, W.H., Khong, P.L., 2006. Hypoxic-ischemic brain injury in the neonatal rat model: relationship between lesion size at early MR imaging and irreversible infarction. *AJNR Am J Neuroradiol* 27, 51-54.

Ward, P., Counsell, S., Allsop, J., Cowan, F., Shen, Y., Edwards, D., Rutherford, M., 2006. Reduced fractional anisotropy on diffusion tensor magnetic resonance imaging after hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics* 117, e619-630.

Wayenberg, J.L., Vermeylen, D., Damis, E., 1998. Définition de l'asphyxie à la naissance et incidence des complications neurologiques et systémiques chez le nouveau-né à terme. *Arch Pediatr* 5, 1065-1071.

Wendland, M.F., Faustino, J., West, T., Manabat, C., Holtzman, D.M., Vexler, Z.S., 2008. Early diffusion-weighted MRI as a predictor of caspase-3 activation after hypoxic-ischemic insult in neonatal rodents. *Stroke* 39, 1862-1868.

Whitelaw, A., Thorensen, M., 2002. Clinical assessment and therapeutic interventions for hypoxic-ischemic encephalopathy in full-term infant. In: Lagercrantz, H., Hanson, M., Evrard, P., Rodeck, C. (Eds.), *The newborn brain. Neuroscience and clinical applications*. Press Syndicate of the University of Cambridge, Cambridge, pp. 415 - 442.

Wolf, R.L., Zimmerman, R.A., Clancy, R., Haselgrove, J.H., 2001. Quantitative apparent diffusion coefficient measurements in term neonates for early detection of hypoxic-ischemic brain injury: initial experience. *Radiology* 218, 825-833.

Yager, J.Y., Ashwal, S., 2009. Animal models of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *Pediatr Neurol* 40, 156-167.

- Yang, J., Wu, E.X., 2007. Manganese-enhanced MRI detected the gray matter lesions in the late phase of mild hypoxic-ischemic injury in neonatal rat. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2007, 51-54.
- Yanney, M., Marlow, N., 2004. Paediatric consequences of fetal growth restriction. *Semin Fetal Neonatal Med* 9, 411-418.
- Yis, U., Kurul, S.H., Kumral, A., Tugyan, K., Cilaker, S., Yilmaz, O., Genc, S., Genc, K., 2008. Effect of erythropoietin on oxygen-induced brain injury in the newborn rat. *Neurosci Lett* 448, 245-249.
- Yoon, B.H., Kim, C.J., Romero, R., Jun, J.K., Park, K.H., Choi, S.T., Chi, J.G., 1997. Experimentally induced intrauterine infection causes fetal brain white matter lesions in rabbits. *Am J Obstet Gynecol* 177, 797-802.
- Yoon, B.H., Romero, R., Yang, S.H., Jun, J.K., Kim, I.O., Choi, J.H., Syn, H.C., 1996. Interleukin-6 concentrations in umbilical cord plasma are elevated in neonates with white matter lesions associated with periventricular leukomalacia. *Am J Obstet Gynecol* 174, 1433-1440.
- Zhang, J., Chen, Y.B., Hardwick, J.M., Miller, M.I., Plachez, C., Richards, L.J., Yarowsky, P., van Zijl, P., Mori, S., 2005. Magnetic resonance diffusion tensor microimaging reveals a role for Bcl-x in brain development and homeostasis. *J Neurosci* 25, 1881-1888.
- Zhang, J., Richards, L.J., Miller, M.I., Yarowsky, P., van Zijl, P., Mori, S., 2006. Characterization of mouse brain and its development using diffusion tensor imaging and computational techniques. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 1, 2252-2255.
- Zhu, C., Hallin, U., Ozaki, Y., Grander, R., Gatzinsky, K., Bahr, B., Karlsson, J.O., Shibasaki, F., Hagberg, H., Blomgren, K., 2009a. Nuclear translocation and calpain-dependent reduction of Bcl-2 after neonatal cerebral hypoxia-ischemia. *Brain Behav Immun*.
- Zhu, C., Kang, W., Xu, F., Cheng, X., Zhang, Z., Jia, L., Ji, L., Guo, X., Xiong, H., Simbruner, G., Blomgren, K., Wang, X., 2009b. Erythropoietin improved neurologic outcomes in newborns with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics* 124, e218-226.
- Zhu, W., Zhong, W., Qi, J., Yin, P., Wang, C., Chang, L., 2008. Proton magnetic resonance spectroscopy in neonates with hypoxic-ischemic injury and its prognostic value. *Transl Res* 152, 225-232.
- Zupan Simunek, V., 2008. Definition de l'asphyxie intrapartum et consequences sur le devenir. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 37 Suppl 1, S7-15.



Short term effect of erythropoietin on brain lesions and aquaporin-4 expression in a hypoxic-ischemic neonatal rat model: an MR-Diffusion Imaging and immunohistochemistry study

Journal:	<i>Journal of Neurochemistry</i>
Manuscript ID:	JNC-E-2009-1394
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	07-Nov-2009
Complete List of Authors:	<p>Brissaud, Olivier; University Bordeaux 2, Centre de résonance magnétique des systèmes biologiques UMR-CNRS 5536; Children' Hospital, Pediatric and Neonatal Intensive Care</p> <p>Villega, Frédéric; Children' Hospital, Pediatric and Neonatal Intensive Care</p> <p>Konsman, Jan Peter; University Bordeaux 2, Centre de résonance magnétique des systèmes biologiques UMR-CNRS 5536</p> <p>Sanchez, Stéphane; University Bordeaux 2, Centre de résonance magnétique des systèmes biologiques UMR-CNRS 5536</p> <p>Raffard, Gérard; University Bordeaux 2, Centre de résonance magnétique des systèmes biologiques UMR-CNRS 5536</p> <p>Franconi, Jean-Michel; University Bordeaux 2, Centre de résonance magnétique des systèmes biologiques UMR-CNRS 5536</p> <p>Chateil, Jean-François; University Bordeaux 2, Centre de résonance magnétique des systèmes biologiques UMR-CNRS 5536; Children' Hospital, Pediatric Radiology</p> <p>Bouzier-Sore, Anne-Karine; University Bordeaux 2, Centre de résonance magnétique des systèmes biologiques UMR-CNRS 5536</p>
Keywords:	DWI, MRI, neonate, hypoxia-ischemia, erythropoietin, aquaporin-4

1
2
3 **Short term effect of erythropoietin on brain lesions and aquaporin-4**
4
5
6 **expression in a hypoxic-ischemic neonatal rat model: an MR-Diffusion**
7
8
9 **Imaging and immunohistochemistry study**
10
11
12
13
14
15

16 Olivier Brissaud*¹, Frédéric Villega¹, Jan Pieter Konsman², Stéphane Sanchez³, Gérard
17 Raffard³, Jean-Michel Franconi³, Jean-François Chateil^{1,3}, Anne-Karine Bouzier-Sore³.
18
19
20
21
22

23 ¹: Children's Hospital, CHU Bordeaux, Place Amélie Raba-Léon, 33076 Bordeaux, France.
24

25 ²: Psychoneuroimmunology, Nutrition and Genetics laboratory, CNRS UMR 5226, University
26 of Bordeaux, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux cedex, France.
27
28

29 ³: RMSB Center, UMR 5536, 146 rue Léo Saignat, case 93, 33076 Bordeaux cedex, France.
30
31
32
33
34

35 * : **CORRESPONDING AUTHOR :**

36 Dr Olivier Brissaud
37

38 Mail: olivier.brissaud@chu-bordeaux.fr
39

40 Tel : +33556795643
41

42 Fax : +33556796113
43
44
45
46

47 **ABBREVIATIONS:** DWI: diffusion-weighted imaging, Epo: erythropoietin,
48

49 AQP4: aquaporin 4, ADC: apparent diffusion coefficient, HI: hypoxia-ischemia,
50

51 MRI: magnetic resonance imaging
52
53
54
55
56
57
58
59
60

ABSTRACT

Erythropoietin (Epo) is an endogenous cytokine that regulates hematopoiesis and is widely used to treat anemia. In addition, it has recently aroused interest in the neurosciences since the new concept of Epo as a neuroprotective agent has emerged. Therefore, the potential protective effect of human recombinant Epo (r-hu-Epo) on a hypoxic-ischemic (HI) pup rat model was studied. Cerebral HI was obtained by permanent left carotid artery ligation of pups followed by a 2h hypoxia. Three hours after carotid occlusion, brain lesions were assessed by MR-diffusion weighted imaging. Intraperitoneal administration of r-hu-Epo (30U/g-dose) limited both the HI-induced brain lesion surface and the decrease in apparent diffusion coefficient (ADC) in the lesion. To identify potential mechanisms underlying the effects of Epo, immunohistochemical detection of caspase-3 and water channel protein aquaporin-4 (AQP4) was performed. No early apoptosis was detected, but up-regulation of AQP4 expression was observed in HI-pups that received r-hu-Epo compared to HI-animals without treatment.

This study demonstrates an early neuroprotective effect of Epo with regard to brain lesion surface and ADC values. One possible mechanism for limiting brain edema could be a better clearance of excess water in brain tissue back to the blood flow, a process possibly mediated by aquaporin-4.

RUNNING TITLE: Epo's effect in HI rat neonates by DWI

KEY-WORDS: DWI, MRI, neonate, hypoxia-ischemia, erythropoietin, aquaporin-4.

INTRODUCTION

Severe neurological impairment or death related to perinatal asphyxia concerns 0.2 to 1.3/1000 live clinical births in developed countries. Neurological protection in this condition remains a challenge and treatment outcomes have been rather poor until now (Perlman 2006). Several neonatal animal models have been developed to study perinatal asphyxia and its associated physiopathology. These models include transient or persistent ischemia with or without hypoxia in pup rats (Rice et al. 1981; Hagberg et al. 1997; Vannucci and Vannucci 1997) and they have been used to explore brain damage as well as potential therapeutic approaches (for review, see Gonzalez et al. (Gonzalez and Ferriero 2008).

Magnetic resonance imaging (MRI), including diffusion-weighted imaging (DWI), is a method of choice to explore the brain since it offers a non-invasive way to probe microscopic structural information on brain *in vivo* (Le Bihan 2007). Fractional anisotropy (FA) and the apparent diffusion coefficient (ADC) are known to reflect local microstructural properties. DWI provides excellent contrast visualization of hypoxia-ischemia induced brain lesions, in which ADC measurements show early restricted water diffusion, a common feature of cerebral tissue abnormalities in relation with cytotoxic edema (Chalela et al. 2001; Guadagno et al. 2006; Ward et al. 2006).

Over the past decade, various candidate molecules for neuroprotection have been studied in neonatal rat models, including minocyclin (Fan et al. 2006; Carty et al. 2008; Buller et al. 2009), allopurinol (Benders et al. 2006; Chaudhari and McGuire 2008), deferoxamine (Shadid et al. 1998), and magnesium sulfate (Khashaba et al. 2006; Spandou et al. 2007; Pazaiti et al. 2009). Erythropoietin (Epo), a hemopoietic growth factor, has emerged as one of the most interesting neuroprotective agents (Sakanaka et al. 1998; Kumral et al. 2003; Spandou et al. 2004; Sola et al. 2005; Gonzalez et al. 2007; van der Kooij et al. 2008). Epo was originally used in patients suffering from anemia to stimulate red blood cell proliferation,

1
2
3 particularly in premature babies (Shannon et al. 1995). Its humoral mediating role in the
4
5 maturation and proliferation of erythroid progenitor cells has been known since 1906 (van der
6
7 Kooij et al. 2008). In addition, the neuroprotective properties of Epo have been known for
8
9 several years, even if its underlying mechanisms remain unclear (for recent review, see Rabie
10
11 and Marti (Rabie and Marti 2008). Epo can cross the blood-brain barrier and its receptors are
12
13 abundantly expressed in the mammalian brain (Chin et al. 2000). However, experiments
14
15 addressing the effect of Epo on HI have mostly been done with histological methods and only
16
17 a few used an *in vivo* imaging approach (Ehrenreich et al. 2002; Chang et al. 2005;
18
19 Miskowiak et al. 2007; Verdonck et al. 2007).
20
21
22
23

24
25 The aim of our study was to evaluate the potential early neuroprotective effect of Epo
26
27 with DWI performed 3 hours after an HI insult in the neonate rat. We measured infarct size,
28
29 FA and ADC values in the lesion. Since Epo is known to modulate water permeability
30
31 (Gunnarson et al. 2009), we also performed immunohistochemistry to detect early apoptosis
32
33 induction with caspase-3 antibodies and expression of the water channel protein aquaporin-4
34
35 (AQP4).
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

MATERIAL AND METHODS

Animal model

Rats of postnatal day (P) 7 or 8, weighing 19.8 ± 2.7 g, were divided into three groups: Group I: control group (sham, n = 5); Group II: HI group (ischemia + 2h-hypoxia, n = 16); Group III: HI-Epo group (ischemia + intraperitoneal injection of Epo + 2h-hypoxia, n = 17).

Pups were subjected to the surgical procedure described by Rice and al. (Rice et al. 1981). Briefly, seven and eight day-old Wistar rats were anesthetized with isoflurane (4% induction, 1.5% maintenance). After a midline neck incision under local anesthesia (bupivacaine 0.5%), the left common carotid artery was isolated then permanently ligatured (Vicryl® 7/0). Total duration of surgery never exceeded 20 minutes, after which animals were allowed to recover (half an hour) on a heated mattress to maintain body temperature. Pups were then placed in a hypoxic chamber and exposed to hypoxia under an 8% oxygen – 92% nitrogen atmosphere for 2 hours. Hypoxic level was monitored by an oximeter (Airox BioMS®, Pau, France) and maintained between 7.9 and 8.1% of oxygen. Hypoxic box volume was around 840 cm³ (15 x 7 x 8 cm). Chamber temperature was maintained at 31 - 33°C and humidity > 80%. After hypoxic exposure, rat pups were returned to their heated mattress until magnetic resonance imaging (MRI), which was performed 30 min later (three hours after the end of the ligature). For MRI, pups were anesthetized with isoflurane (4% induction, 1.4% maintenance) and respiration was monitored by a ventral electrode. Warmed water circulating in the gradient coil system was used to maintain body temperature. Fifteen pups were sacrificed by decapitation immediately after MRI (Group I, n = 4; Group II, n = 6 and Group III, n = 5). Brains were rapidly removed, rinsed in phosphate-buffered saline (PBS), immersion-fixed in 4% paraformaldehyde in PBS (over night). Before being frozen, fixed brains were rinsed in PBS-glucose (10%).

Drug and dose

Epo (r-hu-Epo, Eprex[®], 4000UI/0.4 ml, Janssen-Cilag, Issy-les-Moulineaux, France) was administered intraperitoneally immediately after carotid ligation and before hypoxia at a dose of 30,000UI/kg, corresponding to 600UI/20g. This dose is known to achieve the most successful neuroprotective response (Kellert et al. 2007).

Magnetic Resonance Imaging

Each pup was studied 3 h after carotid ligation on a horizontal 4.7T Biospec 47/50 system (Bruker, Ettlingen, Germany) equipped with a 6-cm BG6 gradient system capable of 950mT/m maximum strength. Measurements were performed with a birdcage resonator (35-mm diameter and 80-mm length) tuned to 200.3MHz. Coronal T2-weighted images of the brain were obtained using a RARE sequence, 3 slices, 2mm thick, FOV 2.5×2.5cm, TE 100ms, TR 5000ms, rare factor 8, matrix 128×128. DWI was performed 3h after ischemic insult with a pulsed gradient spin echo sequence derived from the Stejskal-Tanner relationship (Stejskal and Tanner 1965) using the following parameters: one coronal slice, localized at the level of the caudate nucleus, 2mm thick, FOV 2.5×2.5cm, TE 20ms, TR 1800ms, matrix 128×128, δ 5ms, Δ 8.598ms, 12 directions, b values 0-400-1000s/mm². Duration of DWI acquisition was 96 min.

Data processing

DW images and ADC cartographies were exported on a personal computer and post-processed by using CCHIPS[®] software under Linux[®]. Stroke area surface was plotted by a computer mouse and calculated by the software as a number of pixels. At the same time, the mean and the median values of ADC (mm²/s) and FA in the selected area were obtained. CCHIPS software gave the ADC results in cm²/s (Figure 1). For clarity and comparison, we

1
2
3 decided to express all the results concerning ADC in mm²/s. Intra-observer variability was
4
5 calculated after three measurements each separated by one month for the first 10 rats. Inter-
6
7 observer variability was also calculated after three measurements done by two observers at
8
9 three different times for the first 10 rats. No statistical difference was found within and
10
11 between observers.
12
13

14 15 16 17 **Immunohistochemistry**

18
19
20 Twenty micrometer-thick coronal brain slices were cut on a cryostat from 1 mm
21
22 anterior to the bregma to 1 mm posterior to this anatomical landmark and processed for
23
24 immunohistochemical detection of cysteinyl aspartate-specific proteinase-3 (caspase-3) and
25
26 aquaporin-4 (AQP4), using the streptavidin-biotin-immunoperoxidase technique, as
27
28 previously described (Konsman et al., 1999). Briefly, sections were post-fixed in 4 % PFA in
29
30 PBS for 10 minutes at 4°C, followed by two rinses in PBS for 10 minutes and two washes in
31
32 PBS, 2% gelatin, 0.25% triton for 10 minutes. Slices were then incubated overnight at room
33
34 temperature with the primary rabbit antibody raised against AQP4 and caspase-3 (diluted
35
36 1:500, Sigma-Aldrich, Germany), in PBS-2% normal donkey serum. After two rinses in the
37
38 same buffer, sections were treated for 30 min with 0.3% hydrogen peroxide and again washed
39
40 in PBS. Sections were subsequently incubated 90 minutes with biotinylated donkey anti-
41
42 rabbit immunoglobulins (diluted 1:200, Jackson Immunoresearch Laboratories INC) and
43
44 90 minutes with a streptavidin-biotin-peroxidase complex (diluted 1:1000, Vector
45
46 Laboratories, USA) with intermittent washes. Afterwards, slices were immersed in Tris-
47
48 buffered saline (0.05 M) for 10 minutes and in sodium acetate (0.1 M; pH=6) for 10 minutes.
49
50 Sections were then stained using diaminobenzidine as a chromogen in the presence of nickel
51
52 ions. Finally, sections were air-dried, dehydrated in graded ethanol solutions, defatted in
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 xylene and coverslipped in Depex[®] mounting medium (VMR International Ltd, Poole,
4
5
6 England).

7
8 Stained sections were examined through a 10× objective mounted on a transmitted
9
10 light microscope (Nikon[®] Eclipse E400, Champigny sur Marne, France). Images were
11
12 captured using a high resolution CCD video camera (Nikon[®] DMX1200, Champigny sur
13
14 Marne, France) and fed into a personal computer. Image processing was performed using a
15
16 PC version of NIH imaging software, Scion Image[®] (Scion, Frederick, MD, USA) on grey
17
18 images by defining brightness and surface above which labeling had to be taken into account.
19
20 Once established, these parameters remained unchanged. The image was then converted to a
21
22 binary image and the caspase-3 and AQP-4 immunostaining areas were measured specifically
23
24 in the somatosensory cortex. Photomicrographs for illustrations were taken with the same
25
26 setup, and Adobe Photoshop[®] CS2 (Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA, USA) was
27
28 used to adjust contrast and brightness and to apply labels.
29
30
31
32
33
34
35

36 *Statistical analysis*

37
38 Results were expressed as means ± standard deviation or median as appropriate. For
39
40 imaging analysis, comparison of stroke area, ADC and FA values between Groups II and III
41
42 were performed by a Student t-test. For immunohistochemistry analysis, immunostaining area
43
44 was expressed as percentage of total image surface. Mann-Whitney statistical tests were used
45
46 to compare immunostaining areas between Groups II and III. $P < 0.05$ was considered
47
48 significant.
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

RESULTS

Animals

Thirty-eight Wistar pups were used in the study; 5 in Group I (control, 2 P7 and 3 P8), 16 in Group II (HI, 8 P7 and 8 P8) and 17 in Group III (HI-Epo, 8 P7 and 9 P8). No statistical difference was noted concerning body weight between groups (Group I: $20.9 \pm 1.6\text{g}$, Group II: $19.9 \pm 2.6\text{g}$; Group III: $19.4 \pm 1.8\text{g}$).

Epo effect

Stroke appeared as an easily identifiable hypointensity of signal area in comparison with the whole brain, allowing its limits to be plotted by a computer mouse (Figure 1). Stroke area surface was estimated as a number of pixels and at the same time the mean and the median values of ADC and FA in the selected area were obtained. Stroke surfaces, ADC and FA values were measured for each rat and are presented in Figure 2. The mean stroke area values in Groups II and III were 638.68 ± 348.76 pixels and 393.7 ± 270.5 pixels, respectively ($p = 0.03$), indicating a smaller brain lesion in HI pups treated with Epo (Figure 3). Brain lesion surfaces were significantly reduced by 40% when 30U/g of Epo were intraperitoneally injected between the carotid ligature and the 120-min hypoxia.

The mean FA values in stroke area in Groups II and III were 0.305 ± 0.065 and 0.304 ± 0.06 , respectively ($p = 0.95$). Therefore, no difference was observed in FA values between Groups II and III.

The mean values of ADC in stroke area were $0.565 \times 10^{-3} \pm 0.086 \times 10^{-3}$ mm²/s and $0.695 \times 10^{-3} \pm 0.06 \times 10^{-3}$ mm²/s, respectively in Groups II and III ($p = 0.006$). Compared to ADC values found in controls ($0.99 \pm 0.09 \times 10^{-3}$ mm²/s) a 45% decrease was observed in Group II whereas only a 30% decrease was found in Group III, indicating that the decrease was lesser after Epo administration.

Immunohistochemistry

In control brains no Caspase-3 immunostaining was observed, whereas only a few Caspase-3-positive cell bodies were found in Groups II and III. This relative lack of apoptosis markers may be due to the early time point at which animals were sacrificed after HI.

In control animals, we observed weak AQP4 immunostaining in the choroid plexus, but with no significant contrast in the somatosensory cortex (Figure 4, A, B and C). In Groups II and III, positive AQP4 immunostaining was observed around small cerebral vessels located in both the white and grey matter. The intensity of AQP-4 immunostaining in the injured primary somatomotor area showed significant increases in group III compared to group II (median 4.5% vs. 0.5%, $p=0.01$). In contrast, no difference in AQP-4 immunostaining in the healthy contralateral cortex was found between Groups II and III. In group III, there was a significant ipsi/contralateral hemispheric difference in AQP-4 immunoreactivity with increased immunostaining in the injured cortex (medians 4.5% vs. 0.6%, $p=0.028$). No left-right hemispheric difference in AQP-4 immunoreactivity was found in group II.

DISCUSSION

Methodological considerations

Late DWI exploration (>24h after brain injury) in neonatal HI rats has been previously reported (Wang et al. 2006; Ashwal et al. 2007; Wang et al. 2007; Yang and Wu 2007). We chose to explore neonatal HI rats shortly after carotid ligation. Early DWI explorations after neonatal rat brain injury have been reported in the literature (Fau et al. 2007; van der Zijden et al. 2008; Wendland et al. 2008). . In 1995, Rumpel et al. used DWI and histology to explore neonatal rat brain after an HI insult in order to evaluate short- and long-term consequences (Rumpel et al. 1995). They showed that unilateral carotid ligation-induced ischemia lasting more than 30 minutes causes an unequivocal cytotoxic edema, followed by a more extensive vasogenic edema 12 to 24 hours preceding histological markers of cerebral infarction. In addition, they confirmed that a unilateral carotid ligation alone does not lead to brain abnormalities that can be detected by DWI. The accuracy of DWI for detecting hypoxic ischemic lesion in neonatal rat brain shortly after injury was well documented in the paper by Fau et al. (Fau et al. 2007). However, to our knowledge, no publication has yet reported early DWI evaluation of the neuroprotective Epo effects in the neonatal HI rat model.

Epo administration and stroke area

Many studies have reported histological or immunohistochemical results after Epo in HI rat pups (Rumpel et al. 1995; Kumral et al. 2003; Demers et al. 2005; Sun et al. 2005; Kumral et al. 2006; Meng et al. 2006; Pacary et al. 2006; Kellert et al. 2007; Kumral et al. 2007; McPherson et al. 2007; Statler et al. 2007; Kim et al. 2008; van der Kooij et al. 2008; Yis et al. 2008) but no study have yet compared *in vivo* imaging in HI between rat pups treated or not with Epo. In adult rats, Epo injection (5U/g) before and up to three hours after focal brain ischemia reduced injury by approximately 60 to 55%, respectively (Brines et al.

1
2
3 2000). In a histological study conducted by Wang et al. on P7 pups, infarct volumes were
4 reduced by 50% after Epo injection 4 hours prior to carotid ligation and hypoxia (50 min)
5
6 (Wang et al. 2004). In this study, 10U/g was injected but when the same total dose of Epo was
7
8 administered at two times (5U/g 24h and 4 h prior to HI), the treatment was ineffective. This
9
10 indicates that a high dose of Epo is required to obtain a therapeutic effect in neonates. This
11
12 was confirmed by Kellert et al. who determined the optimal Epo dose after HI insult in P7 rats
13
14 (Kellert et al. 2007). They showed that the neuroprotective effect of Epo was dose-dependent
15
16 and that the greatest effect was found with a 30U/g dose. These data justified our choice to
17
18 use a unique dose of 30U/g of Epo as it achieves the most successful neuroprotective
19
20 response. However, even if high doses of Epo have been reported to be safe (Kellert et al.
21
22 2007; Statler et al. 2007), we acknowledge that this dosage may not be compatible with
23
24 administration in humans.
25
26
27
28
29
30
31
32
33

Epo administration and fractional anisotropy in stroke

34
35
36 No difference was observed in FA values between Groups II and III. By measuring FA
37
38 in the developing rat brain, Huang et al. showed a progressive decrease in cortical areas in
39
40 healthy neonatal rats at 0, 3, 7, 11 and 19 days of life (Huang et al. 2008), thus providing a
41
42 standard allowing the detection of abnormalities in cortical development in neonatal animal
43
44 models. Normal FA values in healthy neonatal P7 rat brain in this study were 0.3 to 0.4. Sotak
45
46 et al. (Sotak 2002) found that in the early stage of brain injury in human, FA values were not
47
48 different from those of controls. This absence of difference might be due to the time of
49
50 examination (DWI), which was early after the insult. Our results are in accordance with this
51
52 theory since in the stroke area 3 hours after the carotid ligation, the mean FA values in Groups
53
54 II and III were similar and equal to 0.3, i.e. the value found by Huang (Huang et al. 2008). A
55
56 decrease in FA values did occur but later (24h after the insult). A recent paper by Wang et al.
57
58
59
60

1
2
3 (Wang et al. 2008) explored white matter injury at D1 in an HI neonatal rat model by DTI and
4
5 showed that DTI parameters represented by FA, trace, $\lambda_{\text{parallel}}$ and $\lambda_{\text{perpendicular}}$ are useful
6
7 in characterizing WM injury (in terms of severity of damage); λ_{I} and λ_{\perp} in particular may
8
9 make it possible to differentiate the axonal structure breakdown due to axonal swelling,
10
11 axonal transport dysfunction or irreversible histological damage.
12
13
14
15
16

17 *Epo administration and Apparent Diffusion Coefficient measurement in stroke*

18
19
20 The kinetics of ADC variations in neonatal HI rat are well understood (Derugin et al.
21
22 2000; Meng et al. 2005; Meng et al. 2006). In injured cerebral cortex in the neonatal HI rat
23
24 model, ADC values decrease early (from one hour post-HI) with a statistical difference
25
26 between lesion and controlateral hemisphere or control (Meng et al. 2005). In the present study,
27
28 the same difference was observed 24 hours post-HI. In a recent paper (Wang et al. 2008),
29
30 Wang explored the best ADC threshold in the injured hemisphere in comparison with the
31
32 controlateral hemisphere to predict as best as possible the final size of stroke in the neonatal
33
34 HI rat model. They concluded that injured areas with an 80%-ADC decrease compared to the
35
36 controlateral hemisphere (1 to 2 hours post-HI) should be considered to define the final stroke
37
38 size.
39
40
41
42

43
44 A few days to a few weeks after injury, ADC values pseudonormalize in the lesion, a
45
46 phenomenon which indicates the destruction of tissue organization resulting in an increased
47
48 isotropy (Meng et al. 2006; van der Zijden et al. 2008). In our study, rats underwent DWI
49
50 examination 3 hours after HI injury. Our data concerning ADC values for HI rats are in
51
52 accordance with the literature: the mean ADC value in stroke was significantly lower than in
53
54 the controlateral hemisphere (respectively $0.565 \pm 0.086 \times 10^{-3}$ and $0.98 \pm 0.08 \times 10^{-3}$ $p > 10^{-6}$)
55
56 (van der Zijden et al. 2008; Wang et al. 2008).
57
58
59
60

Immunohistochemistry: caspase 3 and aquaporin-4 expression in the neonatal brain

Epo had an effect not only on brain surface lesions but also on ADC values. The mechanism of Epo on water diffusion remains uncertain. Since the control of water homeostasis is modulated by specific water channel proteins called aquaporin (AQP), we decided to look for the presence of aquaporin-4 by immunohistochemistry. Aquaporin is a transmembrane protein (MW around 30,000 D) involved in the passage of water through the plasma membrane and across the blood brain barrier. AQP4 is mainly expressed in pericapillary astrocytic endfeet and is the major water channel in the brain (Nielsen et al. 1997; Badaut et al. 2002; Fu et al. 2007; Tait et al. 2008; Gunnarson et al. 2009; Hirt et al. 2009).

The expression of AQP-4 thus increased in and around the damaged cortical area as soon as 3h after carotid occlusion in treated rats. Several studies have already shown the important function of AQP-4 in cytotoxic and vasogenic brain edemas, glial cell migration and neural signal transduction (Verkman et al. 2006). A recent study by Tourdias et al. hypothesized that up-regulation of AQP-4 in brain, in response to hydrocephalus, may participate in clearance of excess fluid to the blood stream (Tourdias et al. 2009). That study was one of the first to correlate HI-induced changes in ADC in the periventricular edema to the spatial and temporal expression of AQP-4. Interestingly, its authors observed that the higher the ADC values were in this zone, the higher was the AQP-4 expression. Our present results indicate a similar association between ADC in stroke and AQP-4 expression in the brain. Indeed, high ADC values in the stroke area in Epo-treated rat pups correspond to a high level of brain AQP-4 expression.

It would be interesting to explore Epo receptor (Epo-R) expression in HI newborn rats treated by Epo to see whether Epo-R upregulates in the HI hemisphere in correlation with increasing AQP-4 expression. Expression of Epo and Epo-R can be modulated by hypoxia in

1
2
3 immature and mature brain. An increase in Epo and Epo-R mRNA has been reported in
4
5 rodent and human brain after ischemia but with a different pattern (Spandou et al. 2004).
6
7 Brain Epo-R mRNA expression increases dramatically in injured rat brain hemisphere
8
9 immediately and 24 hours after HI, whereas it is undetectable in controls. The opposite was
10
11 found for Epo mRNA levels for which a significant difference appeared one day after the HI
12
13 insult compared to controls.
14
15

16
17 In view of these data, Epo-R may be rapidly up-regulated by HI whereas endogenous
18
19 Epo protein expression increases only 24h after, thus yielding a time lag in the response.
20
21 Therefore, the administration of r-hu-Epo immediately after carotid ligation and just before
22
23 hypoxia could compensate for this delay between Epo-R and endogenous Epo expression,
24
25 leading to an early response and thus accounting for its neuroprotective action in the ischemic
26
27 brain.
28
29
30
31
32
33

34 ***Limits of the study***

35
36 Owing to technical limitations, it was not possible to explore more than one slice in
37
38 our study. Thus we could not explore the spatial FA and ADC distribution. Measurements for
39
40 ADC and FA in the injured hemisphere were performed only in the stroke area because it was
41
42 not possible to create reproducible masks to compare these parameters in the caudate nucleus,
43
44 for example. It would have been interesting to measure ADC and FA in regions without any
45
46 apparent abnormality.
47
48
49
50
51
52

53 ***Conclusion***

54
55 We conclude that Epo has a protective effect in HI, possibly through an early up-
56
57 regulation of aquaporin-4 expression. This effect seems to be immediate, in contrast to the
58
59 classic “late” neuroprotective effects of Epo that are known to depend upon gene activation.
60

1
2
3 One possible mechanism for the limited brain edema observed in the HI-Epo group could be a
4
5 better clearance of water excess from brain tissues to blood by aquaporin-4. The next step will
6
7 be to perform DWI (ADC and FA measurements) and immunohistochemical (aquaporin-4)
8
9 longitudinal studies on this neonatal HI rat model after Epo treatment in order to observe the
10
11 possible long-term effect of this neuroprotective molecule.
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Peer Review

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the CNRS. We would like to thank Janssen-Cilag who generously provided the r-hu-Epo and Dr. Thomas Tourdias for providing the histological protocol for AQP4.

For Peer Review

REFERENCES

- 1
2
3
4
5
6 Ashwal S., Tone B., Tian H. R., Chong S. and Obenaus A. (2007) Comparison of two
7 neonatal ischemic injury models using magnetic resonance imaging. *Pediatr Res* **61**,
8 9-14.
- 9
10 Badaut J., Lasbennes F., Magistretti P. J. and Regli L. (2002) Aquaporins in brain:
11 distribution, physiology, and pathophysiology. *J Cereb Blood Flow Metab* **22**, 367-
12 378.
- 13
14 Benders M. J., Bos A. F., Rademaker C. M., Rijken M., Torrance H. L., Groenendaal F. and
15 van Bel F. (2006) Early postnatal allopurinol does not improve short term outcome
16 after severe birth asphyxia. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* **91**, F163-165.
- 17
18 Brines M. L., Ghezzi P., Keenan S., Agnello D., de Lanerolle N. C., Cerami C., Itri L. M. and
19 Cerami A. (2000) Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against
20 experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 10526-10531.
- 21
22 Buller K. M., Carty M. L., Reinebrant H. E. and Wixey J. A. (2009) Minocycline: a
23 neuroprotective agent for hypoxic-ischemic brain injury in the neonate? *J Neurosci*
24 *Res* **87**, 599-608.
- 25
26 Carty M. L., Wixey J. A., Colditz P. B. and Buller K. M. (2008) Post-insult minocycline
27 treatment attenuates hypoxia-ischemia-induced neuroinflammation and white matter
28 injury in the neonatal rat: a comparison of two different dose regimens. *Int J Dev*
29 *Neurosci* **26**, 477-485.
- 30
31 Chalela J. A., Wolf R. L., Maldjian J. A. and Kasner S. E. (2001) MRI identification of early
32 white matter injury in anoxic-ischemic encephalopathy. *Neurology* **56**, 481-485.
- 33
34 Chang Y. S., Mu D., Wendland M., Sheldon R. A., Vexler Z. S., McQuillen P. S. and Ferriero
35 D. M. (2005) Erythropoietin improves functional and histological outcome in neonatal
36 stroke. *Pediatr Res* **58**, 106-111.
- 37
38 Chaudhari T. and McGuire W. (2008) Allopurinol for preventing mortality and morbidity in
39 newborn infants with suspected hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Cochrane*
40 *Database Syst Rev*, CD006817.
- 41
42 Chin K., Yu X., Beleslin-Cokic B., Liu C., Shen K., Mohrenweiser H. W. and Noguchi C. T.
43 (2000) Production and processing of erythropoietin receptor transcripts in brain. *Brain*
44 *Res Mol Brain Res* **81**, 29-42.
- 45
46 Demers E. J., McPherson R. J. and Juul S. E. (2005) Erythropoietin protects dopaminergic
47 neurons and improves neurobehavioral outcomes in juvenile rats after neonatal
48 hypoxia-ischemia. *Pediatr Res* **58**, 297-301.
- 49
50 Derugin N., Wendland M., Muramatsu K., Roberts T. P., Gregory G., Ferriero D. M. and
51 Vexler Z. S. (2000) Evolution of brain injury after transient middle cerebral artery
52 occlusion in neonatal rats. *Stroke* **31**, 1752-1761.
- 53
54 Ehrenreich H., Hasselblatt M., Dembowski C., et al. (2002) Erythropoietin therapy for acute
55 stroke is both safe and beneficial. *Mol Med* **8**, 495-505.
- 56
57 Fan L. W., Lin S., Pang Y., Rhodes P. G. and Cai Z. (2006) Minocycline attenuates hypoxia-
58 ischemia-induced neurological dysfunction and brain injury in the juvenile rat. *Eur J*
59 *Neurosci* **24**, 341-350.
- 60
61 Fau S., Po C., Gillet B., Sizonenko S., Mariani J., Meric P. and Charriaut-Marlangue C.
(2007) Effect of the reperfusion after cerebral ischemia in neonatal rats using MRI
monitoring. *Exp Neurol* **208**, 297-304.
- 62
63 Fu X., Li Q., Feng Z. and Mu D. (2007) The roles of aquaporin-4 in brain edema following
neonatal hypoxia ischemia and reoxygenation in a cultured rat astrocyte model. *Glia*
55, 935-941.

- 1
2
3 Gonzalez F. F. and Ferriero D. M. (2008) Therapeutics for neonatal brain injury. *Pharmacol Ther* **120**, 43-53.
- 4
5
6 Gonzalez F. F., McQuillen P., Mu D., Chang Y., Wendland M., Vexler Z. and Ferriero D. M. (2007) Erythropoietin enhances long-term neuroprotection and neurogenesis in neonatal stroke. *Dev Neurosci* **29**, 321-330.
- 7
8
9 Guadagno J. V., Jones P. S., Fryer T. D., et al. (2006) Local relationships between restricted water diffusion and oxygen consumption in the ischemic human brain. *Stroke* **37**, 1741-1748.
- 10
11
12
13 Gunnarson E., Song Y., Kowalewski J. M., Brismar H., Brines M., Cerami A., Andersson U., Zelenina M. and A. A. (2009) Erythropoietin modulation of astrocyte water permeability as a component of neuroprotection. *PNAS* **106**, 1602-1607.
- 14
15
16 Hagberg H., Bona E., Gilland E. and Puka-Sundvall M. (1997) Hypoxia-ischaemia model in the 7-day-old rat: possibilities and shortcomings. *Acta Paediatr Suppl* **422**, 85-88.
- 17
18
19 Hirt L., Ternon B., Price M., Mastour N., Brunet J. F. and Badaut J. (2009) Protective role of early aquaporin 4 induction against postischemic edema formation. *J Cereb Blood Flow Metab* **29**, 423-433.
- 20
21
22 Huang H., Yamamoto A., Hossain M. A., Younes L. and Mori S. (2008) Quantitative cortical mapping of fractional anisotropy in developing rat brains. *J Neurosci* **28**, 1427-1433.
- 23
24
25 Kellert B. A., McPherson R. J. and Juul S. E. (2007) A comparison of high-dose recombinant erythropoietin treatment regimens in brain-injured neonatal rats. *Pediatr Res* **61**, 451-455.
- 26
27
28 Khashaba M. T., Shouman B. O., Shaltout A. A., Al-Marsafawy H. M., Abdel-Aziz M. M., Patel K. and Aly H. (2006) Excitatory amino acids and magnesium sulfate in neonatal asphyxia. *Brain Dev* **28**, 375-379.
- 29
30
31 Kim S. S., Lee K. H., Sung D. K., Shim J. W., Kim M. J., Jeon G. W., Chang Y. S. and Park W. S. (2008) Erythropoietin attenuates brain injury, subventricular zone expansion, and sensorimotor deficits in hypoxic-ischemic neonatal rats. *J Korean Med Sci* **23**, 484-491.
- 32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
- Konsman J. P., Kelley K., Dantzer R. (1999) Temporal and spatial relationships between lipopolysaccharide-induced expression of Fos, interleukin-1beta and inducible nitric oxide synthase in rat brain. *Neuroscience* **89**, 535-548.
- Kumral A., Ozer E., Yilmaz O., Akhisaroglu M., Gokmen N., Duman N., Ulukus C., Genc S. and Ozkan H. (2003) Neuroprotective effect of erythropoietin on hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Biol Neonate* **83**, 224-228.
- Kumral A., Genc S., Ozer E., Yilmaz O., Gokmen N., Koroglu T. F., Duman N., Genc K. and Ozkan H. (2006) Erythropoietin downregulates bax and DP5 proapoptotic gene expression in neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Biol Neonate* **89**, 205-210.
- Kumral A., Baskin H., Yesilirmak D. C., et al. (2007) Erythropoietin attenuates lipopolysaccharide-induced white matter injury in the neonatal rat brain. *Neonatology* **92**, 269-278.
- Le Bihan D. (2007) The 'wet mind': water and functional neuroimaging. *Phys Med Biol* **52**, R57-90.
- McPherson R. J., Demers E. J. and Juul S. E. (2007) Safety of high-dose recombinant erythropoietin in a neonatal rat model. *Neonatology* **91**, 36-43.
- Meng S., Qiao M., Foniok T. and Tuor U. I. (2005) White matter damage precedes that in gray matter despite similar magnetic resonance imaging changes following cerebral hypoxia-ischemia in neonatal rats. *Exp Brain Res* **166**, 56-60.
- Meng S., Qiao M., Scobie K., Tomanek B. and Tuor U. I. (2006) Evolution of magnetic resonance imaging changes associated with cerebral hypoxia-ischemia and a relatively selective white matter injury in neonatal rats. *Pediatr Res* **59**, 554-559.

- 1
2
3 Miskowiak K., O'Sullivan U. and Harmer C. J. (2007) Erythropoietin reduces neural and
4 cognitive processing of fear in human models of antidepressant drug action. *Biol*
5 *Psychiatry* **62**, 1244-1250.
6
7 Nielsen S., Nagelhus E. A., Amiry-Moghaddam M., Bourque C., Agre P. and Ottersen O. P.
8 (1997) Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high-
9 resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain. *J Neurosci* **17**, 171-
10 180.
11 Pacary E., Petit E. and Bernaudin M. (2006) Erythropoietin, a cytoprotective and regenerative
12 cytokine, and the hypoxic brain. *Neurodegener Dis* **3**, 87-93.
13 Pazaiti A., Soubasi V., Spandou E., Karkavelas G., Georgiou T., Karalis P. and Guiba-
14 Tziampiri O. (2009) Evaluation of long-lasting sensorimotor consequences following
15 neonatal hypoxic-ischemic brain injury in rats: the neuroprotective role of MgSO₄.
16 *Neonatology* **95**, 33-40.
17 Perlman J. M. (2006) Intervention strategies for neonatal hypoxic-ischemic cerebral injury.
18 *Clin Ther* **28**, 1353-1365.
19 Rabie T. and Marti H. H. (2008) Brain protection by erythropoietin: a manifold task.
20 *Physiology (Bethesda)* **23**, 263-274.
21 Rice J. E., 3rd, Vannucci R. C. and Brierley J. B. (1981) The influence of immaturity on
22 hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol* **9**, 131-141.
23 Rumpel H., Buchli R., Gehrmann J., Aguzzi A., Illi O. and Martin E. (1995) Magnetic
24 resonance imaging of brain edema in the neonatal rat: a comparison of short and long
25 term hypoxia-ischemia. *Pediatr Res* **38**, 113-118.
26 Sakanaka M., Wen T. C., Matsuda S., Masuda S., Morishita E., Nagao M. and Sasaki R.
27 (1998) In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage.
28 *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 4635-4640.
29 Shadid M., Moison R., Steendijk P., Hiltermann L., Berger H. M. and van Bel F. (1998) The
30 effect of antioxidative combination therapy on post hypoxic-ischemic perfusion,
31 metabolism, and electrical activity of the newborn brain. *Pediatr Res* **44**, 119-124.
32 Shannon K. M., Keith J. F., 3rd, Mentzer W. C., et al. (1995) Recombinant human
33 erythropoietin stimulates erythropoiesis and reduces erythrocyte transfusions in very
34 low birth weight preterm infants. *Pediatrics* **95**, 1-8.
35 Sola A., Wen T. C., Hamrick S. E. and Ferriero D. M. (2005) Potential for protection and
36 repair following injury to the developing brain: a role for erythropoietin? *Pediatr Res*
37 **57**, 110R-117R.
38 Sotak C. H. (2002) The role of diffusion tensor imaging in the evaluation of ischemic brain
39 injury - a review. *NMR Biomed* **15**, 561-569.
40 Spandou E., Soubasi V., Papoutsopoulou S., Karkavelas G., Simeonidou C., Kaiki-Astara A.
41 and Guiba-Tziampiri O. (2004) Erythropoietin prevents hypoxia/ischemia-induced
42 DNA fragmentation in an experimental model of perinatal asphyxia. *Neurosci Lett*
43 **366**, 24-28.
44 Spandou E., Soubasi V., Papoutsopoulou S., Augoustides-Savvopoulou P., Loizidis T., Pazaiti
45 A., Karkavelas G. and Guiba-Tziampiri O. (2007) Neuroprotective effect of long-term
46 MgSO₄ administration after cerebral hypoxia-ischemia in newborn rats is related to
47 the severity of brain damage. *Reprod Sci* **14**, 667-677.
48 Statler P. A., McPherson R. J., Bauer L. A., Kellert B. A. and Juul S. E. (2007)
49 Pharmacokinetics of high-dose recombinant erythropoietin in plasma and brain of
50 neonatal rats. *Pediatr Res* **61**, 671-675.
51 Stejskal E. O. and Tanner J. E. (1965) Spin diffusion measurements: spin echoes in the
52 presence of a time-dependent field gradient. *J. Chem. Phys.* **42**, 288-292.
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 Sun Y., Calvert J. W. and Zhang J. H. (2005) Neonatal hypoxia/ischemia is associated with
4 decreased inflammatory mediators after erythropoietin administration. *Stroke* **36**,
5 1672-1678.
6
7 Tait M. J., Saadoun S., Bell B. A. and Papadopoulos M. C. (2008) Water movements in the
8 brain: role of aquaporins. *Trends Neurosci* **31**, 37-43.
9
10 Tourdias T., Dragonu I., Fushimi Y., Deloire M. S., Boiziau C., Brochet B., Moonen C., Petry
11 K. G. and Dousset V. (2009) Aquaporin 4 correlates with apparent diffusion
12 coefficient and hydrocephalus severity in the rat brain: a combined MRI-histological
13 study. *Neuroimage* **47**, 659-666.
14
15 van der Kooij M. A., Groenendaal F., Kavelaars A., Heijnen C. J. and van Bel F. (2008)
16 Neuroprotective properties and mechanisms of erythropoietin in in vitro and in vivo
17 experimental models for hypoxia/ischemia. *Brain Res Rev* **59**, 22-33.
18
19 van der Zijden J. P., van der Toorn A., van der Marel K. and Dijkhuizen R. M. (2008)
20 Longitudinal in vivo MRI of alterations in perilesional tissue after transient ischemic
21 stroke in rats. *Exp Neurol* **212**, 207-212.
22
23 Vannucci R. C. and Vannucci S. J. (1997) A model of perinatal hypoxic-ischemic brain
24 damage. *Ann N Y Acad Sci* **835**, 234-249.
25
26 Verdonck O., Lahrech H., Francony G., Carle O., Farion R., Van de Looij Y., Remy C.,
27 Segebarth C. and Payen J. F. (2007) Erythropoietin protects from post-traumatic
28 edema in the rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* **27**, 1369-1376.
29
30 Verkman A. S., Binder D. K., Bloch O., Auguste K. and Papadopoulos M. C. (2006) Three
31 distinct roles of aquaporin-4 in brain function revealed by knockout mice. *Biochim*
32 *Biophys Acta* **1758**, 1085-1093.
33
34 Wang S., Wu E. X., Tam C. N., Lau H. F., Cheung P. T. and Khong P. L. (2008)
35 Characterization of white matter injury in a hypoxic-ischemic neonatal rat model by
36 diffusion tensor MRI. *Stroke* **39**, 2348-2353.
37
38 Wang X., Zhu C., Gerwien J. G., Schratzenholz A., Sandberg M., Leist M. and Blomgren K.
39 (2004) The nonerythropoietic asialoerythropoietin protects against neonatal hypoxia-
40 ischemia as potently as erythropoietin. *J Neurochem* **91**, 900-910.
41
42 Wang Y., Cheung P. T., Shen G. X., Bhatia I., Wu E. X., Qiu D. and Khong P. L. (2007)
43 Comparing diffusion-weighted and T2-weighted MR imaging for the quantification of
44 infarct size in a neonatal rat hypoxic-ischemic model at 24h post-injury. *Int J Dev*
45 *Neurosci* **25**, 1-5.
46
47 Wang Y., Cheung P. T., Shen G. X., Wu E. X., Cao G., Bart I., Wong W. H. and Khong P. L.
48 (2006) Hypoxic-ischemic brain injury in the neonatal rat model: relationship between
49 lesion size at early MR imaging and irreversible infarction. *AJNR Am J Neuroradiol*
50 **27**, 51-54.
51
52 Ward P., Counsell S., Allsop J., Cowan F., Shen Y., Edwards D. and Rutherford M. (2006)
53 Reduced fractional anisotropy on diffusion tensor magnetic resonance imaging after
54 hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics* **117**, e619-630.
55
56 Wendland M. F., Faustino J., West T., Manabat C., Holtzman D. M. and Vexler Z. S. (2008)
57 Early diffusion-weighted MRI as a predictor of caspase-3 activation after hypoxic-
58 ischemic insult in neonatal rodents. *Stroke* **39**, 1862-1868.
59
60 Yang J. and Wu E. X. (2007) Manganese-enhanced MRI detected the gray matter lesions in
the late phase of mild hypoxic-ischemic injury in neonatal rat. *Conf Proc IEEE Eng
Med Biol Soc* **2007**, 51-54.
- Yis U., Kurul S. H., Kumral A., Tugyan K., Cilaker S., Yilmaz O., Genc S. and Genc K.
(2008) Effect of erythropoietin on oxygen-induced brain injury in the newborn rat.
Neurosci Lett **448**, 245-249.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Peer Review

LEGENDS

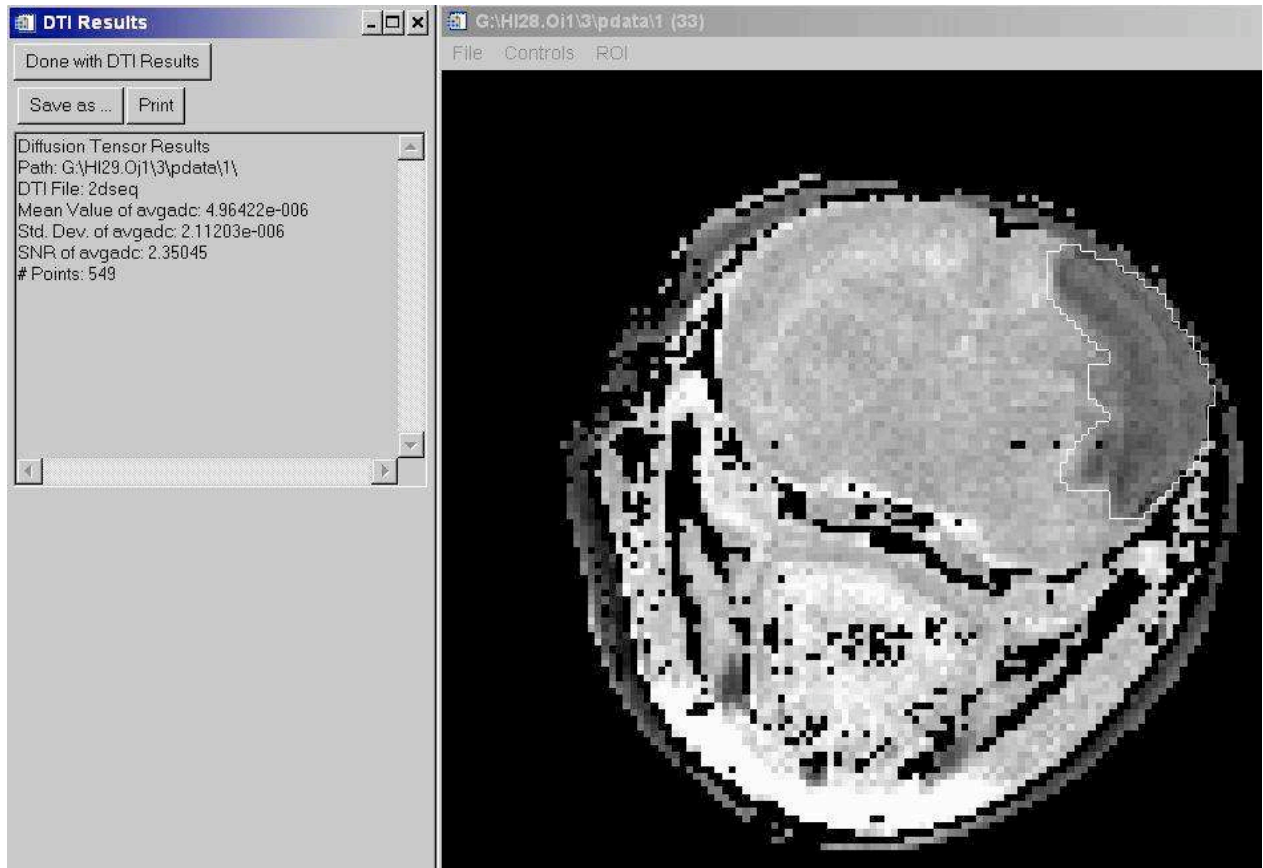
Figure 1: Post-treatment of DTI in P7/8 Wistar rats. On the right side, the ADC map with the delineated stroke ROI. On the left side, measurements obtained in the ROI (stroke area: 549 pixels; Mean ADC value in the stroke: 4.96×10^{-6} cm²/s)

Figure 2: Comparison between stroke area (A), ADC (B) and FA (C) values in stroke in pups treated or not treated with Epo. Statistical differences were observed in stroke area and ADC value (* $p < 0.05$) but not for FA values (NS: no significant).

Figure 3: Stroke area (in number of pixels) between a Group II (left) and a Group III (right) pup. Statistical difference was observed between Group II (638.68 ± 348.76 points) and Group III (393.7 ± 270.5 points), $p = 0.006$.

Figure 4: AQP 4 immunohistochemistry. Micrographs of AQP-4 immunostained sections from the left primary somatomotor cortex of a rat from group II (A magnification x2, B x10, C x40) and group III (D magnification x2, E x10, F x40), shown in the inset at higher magnification (scale bar 100 μ m in 10x magnification) in the immunostaining observed predominantly around small cerebral vessels.

Figure 1



iew

Figure 2

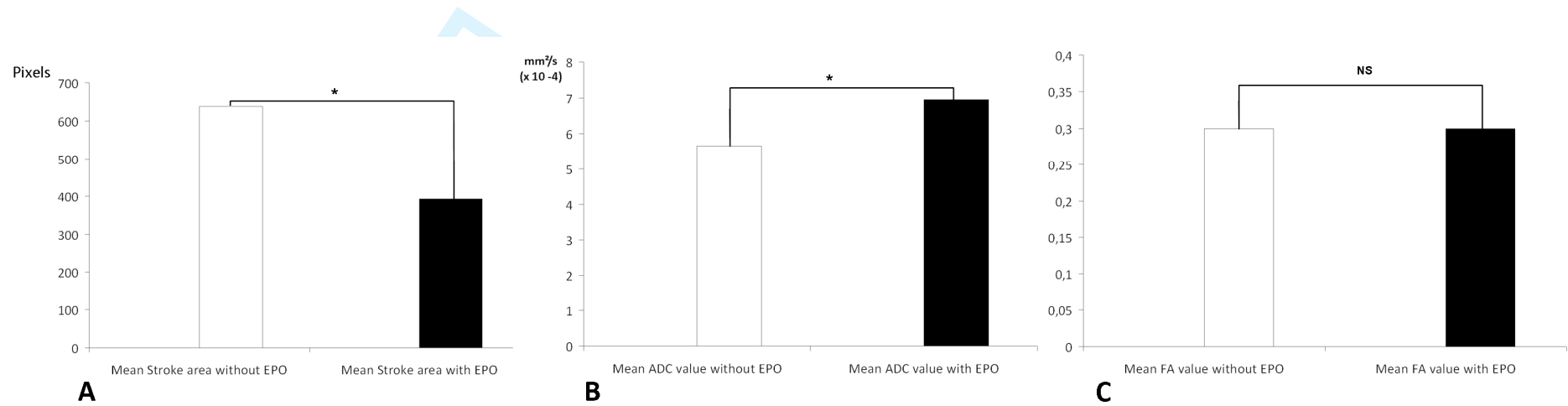


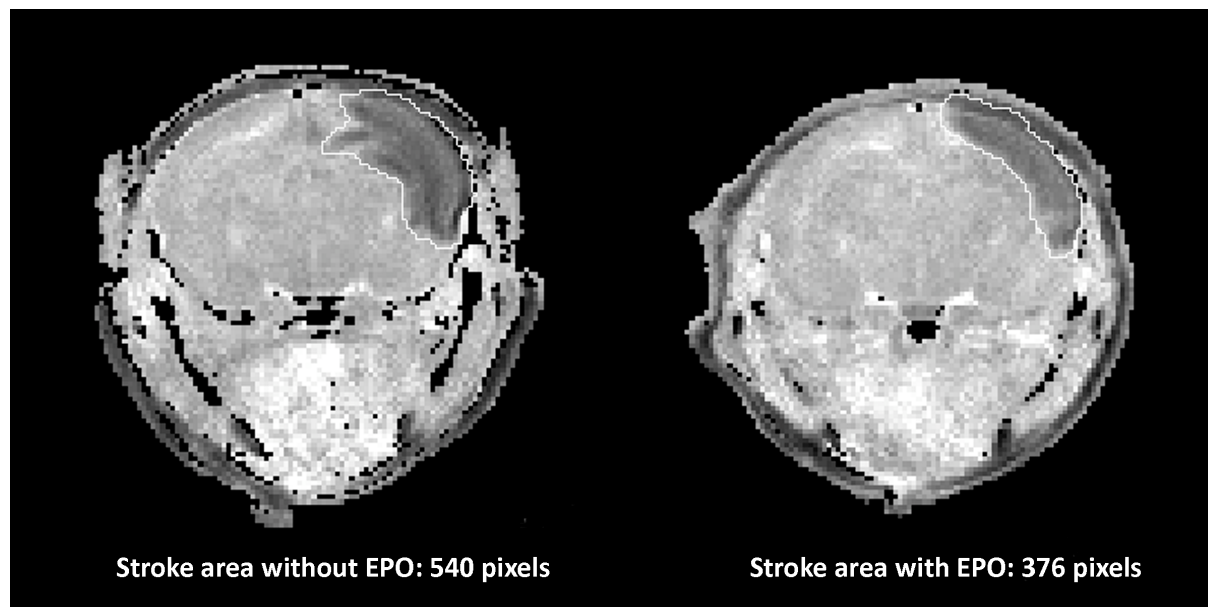
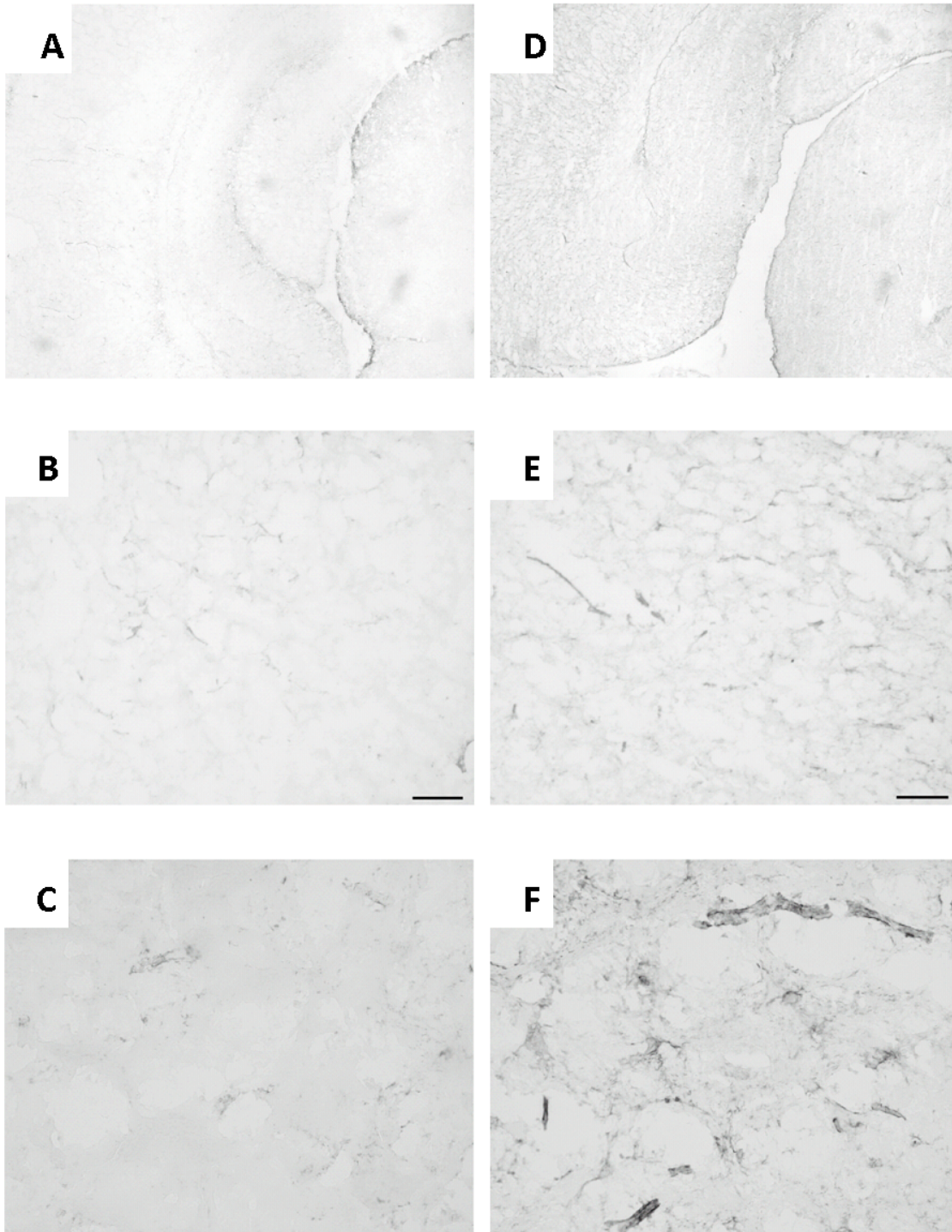
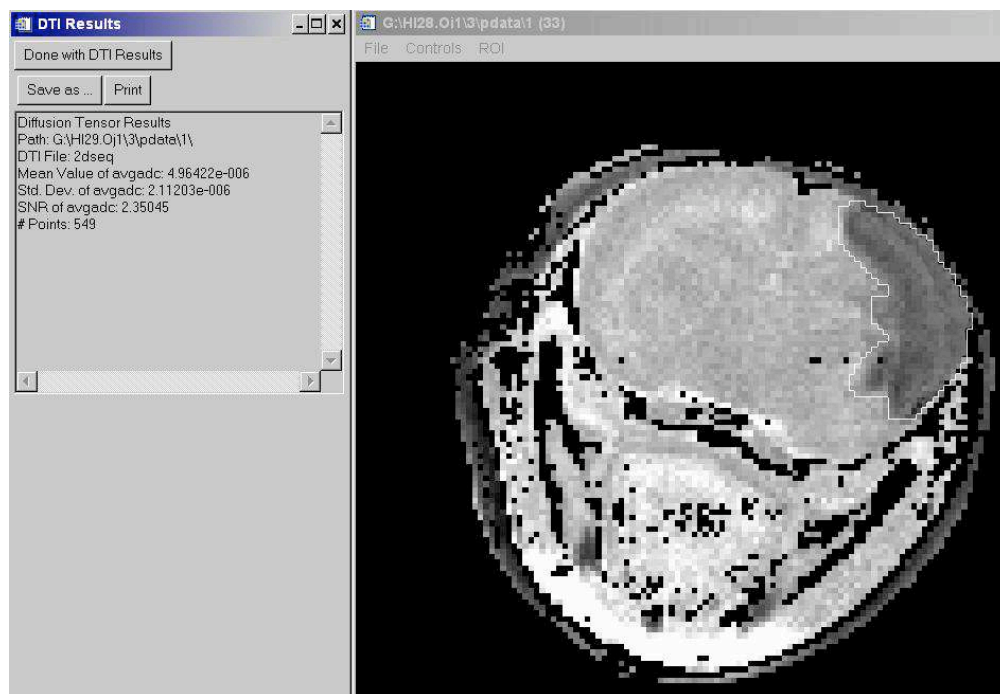
Figure 3

Figure 4

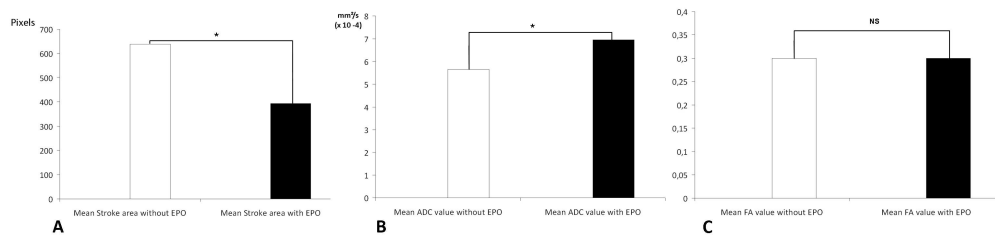


1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



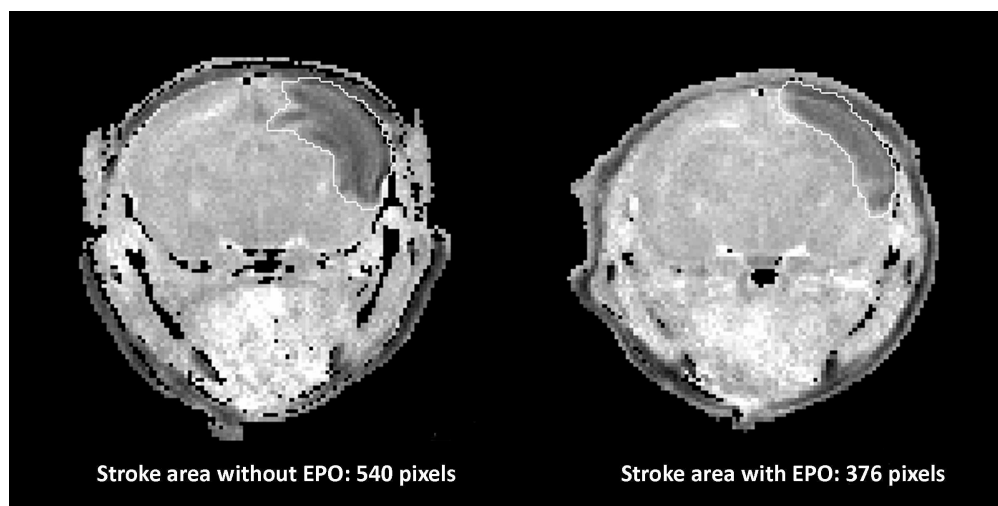
Post-treatment of DTI in P7/8 Wistar rats. On the right side, the ADC map with the delineated stroke ROI. On the left side, measurements obtained in the ROI (stroke area: 549 pixels; Mean ADC value in the stroke: $4.96 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$)
79x55mm (300 x 300 DPI)

review



Comparison between stroke area (A), ADC (B) and FA (C) values in stroke in pups treated or not treated with Epo. Statistical differences were observed in stroke area and ADC value (* $p < 0.05$) but not for FA values (NS: no significant).
260x62mm (300 x 300 DPI)

Or Peer Review

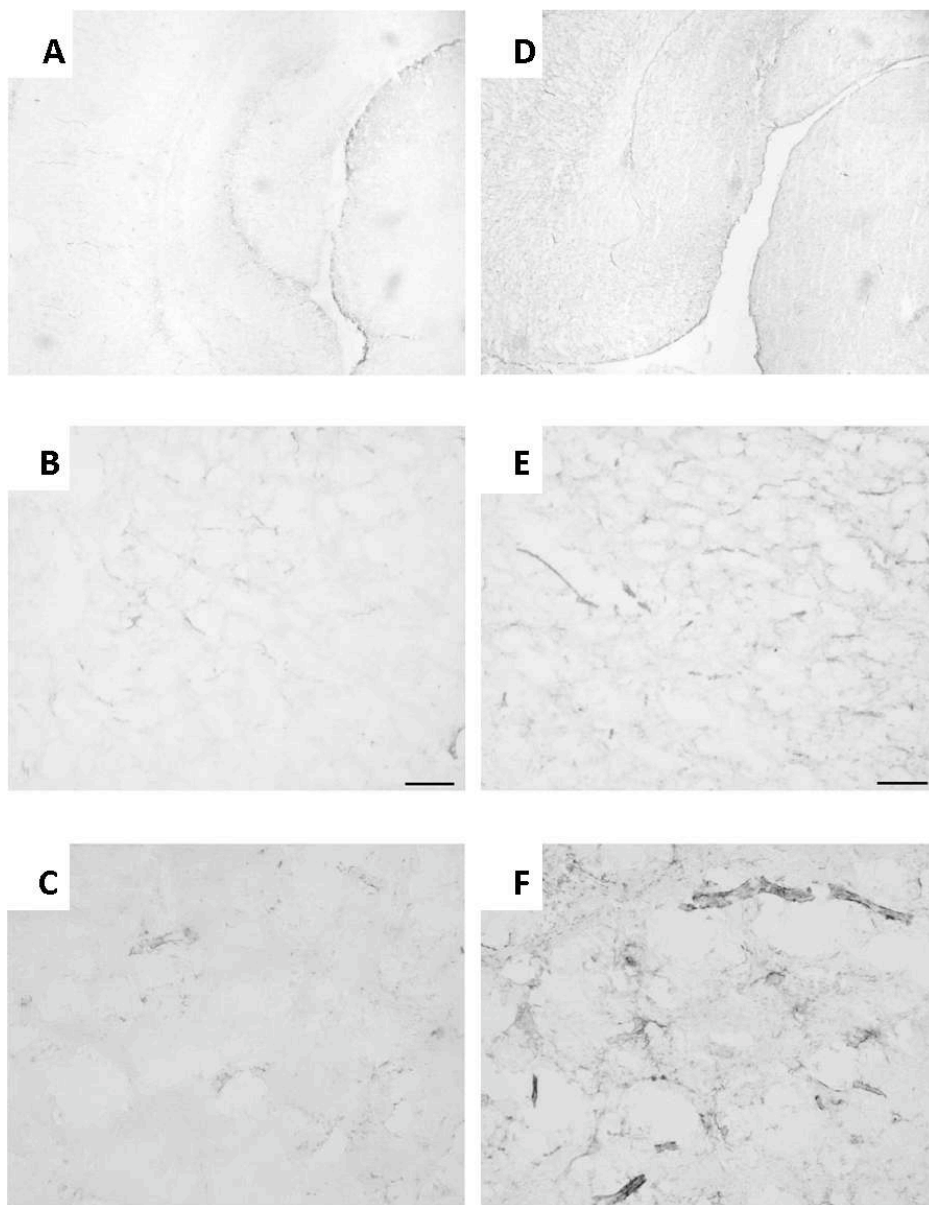


Stroke area (in number of pixels) between a Group II (left) and a Group III (right) pup. Statistical difference was observed between Group II (638.68 ± 348.76 points) and Group III (393.7 ± 270.5 points), $p = 0.006$.

203x101mm (300 x 300 DPI)

er Review

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



AQP 4 immunohistochemistry. Micrographs of AQP-4 immunostained sections from the left primary somatomotor cortex of a rat from group II (A magnification x2, B x10, C x40) and group III (D magnification x2, E x10, F x40), shown in the inset at higher magnification (scale bar 100 μ m in 10x magnification) in the immunostaining observed predominantly around small cerebral vessels.
75x97mm (300 x 300 DPI)

Efficiency of Fractional Anisotropy and Apparent Coefficient of Diffusion on Diffusion Tensor Imaging in Prognosis of Neonates with Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. A Methodologic Prospective Pilot Study

ORIGINAL RESEARCH

AQ: A

O. Brissaud
M. Amirault
F. Villega
O. Periot
J.F. Chateil
M. Allard

BACKGROUND AND PURPOSE: The DTI parameters (FA and ADC) reflect the properties of the brain microstructure. Decreased anisotropy is a common feature of cerebral tissue abnormalities. Our study investigates the neurologic prognostic efficiency of these parameters in white (PLIC, CP) and gray matter (PP) in the first days of life in term neonates with HIE. We hypothesize that lesions in related brain areas could be part of a physiopathologic substratum supporting neurologic deficiencies in this population.

MATERIALS AND METHODS: A total of 22 neonates included (13 girls; mean gestational age, 40 weeks \pm 9 days; birth weight, 3203 \pm 584 g) underwent brain MR imaging between day 1 and day 6 after birth; 6 noncollinear direction DTI was performed. FA and ADC were measured on specific brain areas. Amiel-Tison score was performed on day 8.5 \pm 4 (group A, favorable outcome [n = 16]; group B, unfavorable outcome [n = 6]).

RESULTS: Intraobserver and interobserver comparison in DTI parameter measurements showed a coefficient of variability of less than 5%. In PLIC and PP, the ADC values were lower in group B compared with group A (P = .000027), whereas in PLIC and CP, the FA values were lower in group B compared with group A (P < .02).

CONCLUSIONS: These findings indicate that a poor early neurologic outcome in neonates with HIE is associated with lower FA or ADC values in specific areas of white or gray matter. The difference in ADC/FA changes in the different brain areas explored may support possibly different pathologic processes.

ABBREVIATIONS: ADC = apparent diffusion coefficient; AS = Apgar score at birth/5 minutes; BW = birth weight; CA = cardiac arrest; CP = cerebral peduncles; CS = cesarean section; CV = coefficient of variability; D = delivery; DTI = diffusion tensor imaging; DWI = diffusion-weighted imaging; E = epinephrine; FA, fractional anisotropy; FHRA = fetal heart rate abnormalities; FOV = field of view; GA = gestational age; HIE = hypoxic-ischemic encephalopathy; IE = instrumental extraction; IUGR = intrauterine growth retardation; MSL = meconium-stained liquor; NI = normal; NC = nuchal cord; ND = not done; PLIC, posterior limb of internal capsule; PP = putamen/pallidum; S = seizures; SE = status epilepticus; SS = Sarnat Score.

Severe neurologic impairment or death in relationship to perinatal asphyxia in developed countries concerns 0.2 to 1.3 of 1000 live births.¹⁻⁶ Clinical anamnesis, Apgar score, Sarnat classification, Amiel-Tison neurologic assessment,^{7,8} biologic and electrical examinations, and cranial sonography are efficient tools for evaluation of cerebral integrity in neonates. MR imaging, including DWI, contributes to highlighting brain abnormalities.^{9,10} Clinical evaluation and conventional MR imaging parameters are efficient to distinguish severe to minor HIE, but it remains discussed regarding long-term outcome for infants with moderate HIE. DTI measures the diffusion of water in cerebral tissue¹¹⁻¹³ and quantitative parameters such as FA and ADC reflect the microstructure properties

in local areas. Decreased anisotropy is a common feature of cerebral tissue abnormalities.^{13,14} Normal and pathologic data for FA and ADC of the neonatal brain structures are available,^{10,12,13,15-19} and some authors suggest that early FA values could be an early prognostic factor for functional outcome in infants with HIE.¹² The aim of our study was to compare, in full-term neonates suspected to have HIE, the ADC and FA values in specific areas in white matter (PLIC and CP) and in gray matter (PP) with the early neurologic outcome at the end of the first week of life, by using the Amiel-Tison score.⁷ We hypothesize that lesions in related brain areas could be part of a physiopathologic substratum supporting neurologic deficiencies in neonates with HIE.

Materials and Methods

Patients

During 1 year, we prospectively enrolled 22 consecutive neonates (13 girls, 9 boys; mean gestational age, 40 weeks \pm 9 days; median, 40 weeks plus 2 days, and birth weight 3203 \pm 584 g). The inclusion

Received April 24, 2009; accepted after revision June 26.

From Université de Bordeaux, Bordeaux, France.

Please address correspondence to Olivier Brissaud, Unité de Réanimation Pédiatrique et Néonatale, Place Amélie Raba Léon, Hôpital des Enfants, 33076 Bordeaux cedex, France; e-mail: olivier.brissaud@chu-bordeaux.fr

DOI 10.3174/ajnr.A1805

criteria were gestational age of older than 37 weeks, an Apgar score at 5 minutes of 5 or less, late deceleration on fetal monitoring, bradycardia lower than 80 bpm at 5 minutes, cardiac arrest, and/or the need for intratracheal or intravenous administration of epinephrine. All neonates with chromosomal disease, cardiac or central nervous system malformations, congenital infection, or inborn metabolic errors were excluded (immediately or secondarily).

The local Human Ethics Committee approved the study, and we obtained parental informed consent.

Clinical Data Collection

Antenatal history, birth conditions, birth weight, sex, gestational age at birth, Apgar score, Sarnat classification⁸ in the first hours of life, and the day of the MR imaging examination were recorded. Apgar score at 5 minutes was considered good if the score was more than 5 (9 infants) and poor if 5 or less (10 infants).

Early Neurologic Outcome

During the first week of life, or as soon as possible after tracheal tube removal and drug decrease, the neonates underwent neurologic examination (ie, early neurologic outcome) by a pediatrician specialized in neurology (F.V.), blinded to the MR imaging data. We identified 2 groups according to the Amiel-Tison neurologic assessment at term⁷: no disability, minor disability, or moderate disability (group A) and severe disability or death (group B).

MR Imaging and Postprocessing

All patients were intubated during MR imaging examination (between day 1 and day 6). All neonates were carried to the MR imaging unit in a transport incubator accompanied by an intensivist experienced in neonatology who remained in attendance throughout the scanning process. No neonate was too unstable to support medical transport. Temperature, blood pressure, heart rate, and all vital signs were monitored during transport. Sedation was adapted to optimize data acquisition (intravenous opioids and/or midazolam). Ventilation was done manually during the MR imaging examinations. Pulse oximetry and electrocardiogram (Maglife, Brucker, France) were monitored throughout the procedure. All infants wore ear protections (Natus MiniMuffs; Natus Medical, San Carlos, California).

We collected all MR imaging data using a 1.5 magnet (Gyroscom Intera system; Philips, Best, the Netherlands) equipped of 20mT/m gradients.

MR Imaging methods. Acquisition was performed with a sensitivity-encoding standard head coil, with the following sequences:

- T1-weighted spin-echo sagittal sections (TR, 479 ms; TE, 17 ms);
- T1-weighted inversion-recovery axial sections (TR, 2097 ms; TI, 850 ms; TE, 14 ms);
- T2-weighted turbo spin-echo axial (TR, 4409 ms; TE, 135 ms) and coronal (TR, 4258 ms; TE, 130 ms) sections; and
- DWI with single shot echo-planar imaging (TR, 2367 ms; TE, 88 ms; 16 sections; NSA, 2; b-value, 0/800 s/mm²; section thickness, 5 mm; FOV: 250 × 250; matrix, 112 × 90).
- DTI with pulsed field gradients in 16 (6 noncollinear) directions with single shot echo-planar imaging (TR, 7000 ms; TE, 81 ms; 40 sections; NSA, 3; b-value, 0/700 s/mm²; section thickness, 2.2 mm; FOV, 176 × 176; matrix, 80 × 80; DTI time acquisition, 6 minutes; total scanning time ≤ 1 hour).

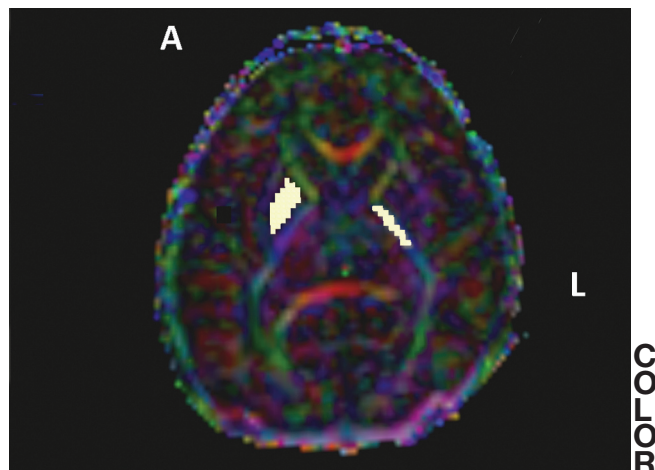


Fig 1. PP and PLIC (white squares) region-of-interest positioning on native tensor diffusion map. The 3 vector elements were assigned to red (*x* element, left-right), green (*y*, anteroposterior), and blue (*z*, superior-inferior) with a proportional intensity scale according to the FA values.

Postprocessing and MR Imaging Data Analysis

Conventional MR images and DWI. Images were analyzed by a senior radiologist well experienced in interpreting neonatal brain MR imaging scans (J.F.C.), blinded to clinical ratings and DTI findings and who established an imaging severity score. This score (from 0–22) was generated according to consensual literature reports on MR imaging and DWI abnormalities in neonates with HIE.^{9,20} The higher the MR imaging score, the worse the prognosis for the infants.

DTI postprocessing. DTI data were postprocessed (quantification of the ADC and FA), by use of the PRIDE fiber-tracking tool software (Philips Research Integrated Development Environment, Best, the Netherlands). DTI-based color maps were created from the FA values. Diffusion encoded FA-weighted images were calculated according to the method proposed by Pajevic and Pierpaoli.²¹ For all region-of-interest analyses, voxels were selected from the FA maps in native space, as describe previously²² by 2 co-investigators (O.B., M.A.) blinded to the subject's clinical and outcome status, according to anatomic landmarks as follows:

- PLIC: Map at the level of the basal ganglia, where the angle between anterior and PLIC was the most acute (Fig 1). **F1**
- PP: At the same section level as PLIC. Voxels were selected on the putamen and the pallidum (Fig 1).
- CP: We first chose on an anatomic map, the level where the cerebral peduncles were the most visible. We selected the section located between the superior and inferior colliculi. Voxels were then positioned on the FA map (Fig 2). **F2**

FA and ADC measurements by PRIDE were performed for each region of interest at the left and right side. DTI voxel regions were selected in relationship to their greater vulnerability in term neonates with HIE.

Statistical Analyses

Comparison between qualitative data was performed with the Fisher exact test (Apgar score at 5 minutes vs early neurologic assessment).

Intraobserver and interobserver comparison: Both manual (PLIC, PP) and single-point (CP) methods were used for region-of-interest positioning on the FA maps. The size of the region of interest varied according to the individual anatomy of the patients. Interobserver and intraobserver error concerning FA and ADC values were ex-

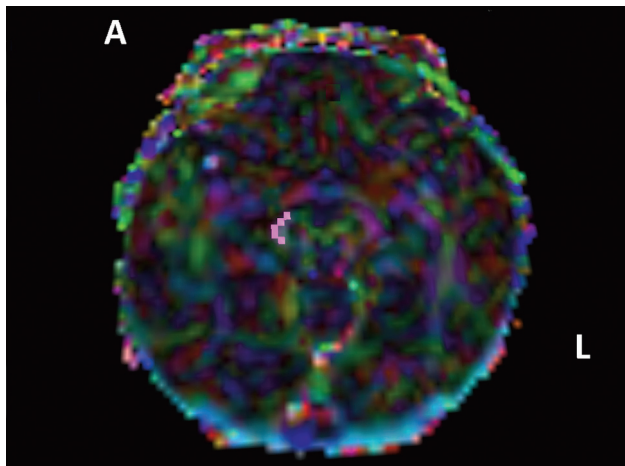


Fig 2. The CP region-of-interest positioning (*purple squares*) on native tensor diffusion map.

pressed by calculating the CV ($CV = SD/mean$) after repeating measurements chosen at random, for 8 neonates. For intraobserver reproducibility, measurements were done 3 times for each neonate.

We performed group comparison using the Wilcoxon signed-rank test for paired sample (comparison of left side vs the right side for each patient) and analysis of variance or the Kruskal-Wallis Multiple-Comparison Z-Value test for nonpaired data (Sarnat score vs MR imaging score, Sarnat score vs FA or ADC values) as appropriate. Comparison between quantitative data and early neurologic outcome was done with use of the Mann-Whitney nonparametric test. All statistical analyses were done on NCSS software (Jerry Hintze; NCSS, Utah). Differences were considered significant if $P < .05$. For the Kruskal-Wallis multiple-comparison Z-value test, differences in medians were considered significant if the z-value is more than 2.39 (Bonferroni correction).

Results

Descriptive Clinical Data

(On-line Table 1) Complete analysis was performed in 22 neonates. The median Apgar score was 2 (22 infants) at birth and 5 (19 infants) at 5 minutes. Seven neonates had had cardiac arrest at birth. Eight neonates required epinephrine. The Sarnat score was 3 in 13 children, 2 in 7 children, and 1 in 2 children. The median Sarnat score was 3. Thirteen neonates presented seizures in the first 2 days of life; Amiel-Tison score was obtained for all live neonates and performed on 8.5 ± 4 days (median, 8 days). Group A included 16 infants (6 with moderate and 10 with no or minor neurologic abnormalities), and group B included 6 infants (5 deaths).

Conventional MR Imaging and DWI Data Analysis

All neonates underwent MR imaging in the first 6 days of life (median, 4 days; mean, 4 ± 1.65 days).

Descriptive analysis. Results are reported in on-line tables 2 and 3. Lack of hyperintensity of the PLIC on T1WI (17 infants) and white matter abnormalities on DWI (15 infants) were the most often observed abnormalities. Brain swelling and petechial abnormalities of white matter (3 infants each) were unusual. Seven infants had brain stem abnormalities. Mean MR imaging score was 6.36 ± 4.5 (range, 1–18; median, 6).

Correlation between initial perinatal clinical examination and MR imaging score. We found no correlation between MR imaging score and Apgar score at 5 minutes or Sarnat score. Median MR imaging score was 4 in group A and 10 in group B ($P = .02$).

DTI Data Analysis

Descriptive analysis. Results are reported in on-line Table 4 (DTI data). Intraobserver comparison in FA and ADC measurements did not reveal statistical difference ($CV < 3\%$). For interobserver measurements, CV was less than 4% for the PLIC, less than 5% for the CP, and less than 4% for the PP. The median number of voxels on the left PLIC was 16 (range, 12–24) and on the right PLIC was 18 (range, 11–33). The median number of voxels on the left PP was 80 (range, 46–110) and on the right PP was 76 (range, 48–101). Both for the left and the right side, the median number of voxels on the CP was 9 (left range, 4–15; right range, 5–14). Whatever the region of interest (ie, PLIC, PP, or CP), there was no significant difference between left and right FA or ADC values.

Correlation between perinatal clinical data and DTI measurements. The group with a poor Apgar score at 5 minutes had significant lower ADC values on PLIC and PP (right PLIC, $P = .05$; left PLIC, $P = .002$; right PP, $P = .05$; left PP, $P = .01$) but not on CP. No statistical correlation was observed between the Sarnat score and DTI parameters measurements.

Correlation between DTI parameters measurements and early neurologic outcome. Results are summarized in Table 1. In white matter areas (PLIC and CP), FA was significantly decreased in group B vs group A. In the opposite, only ADC was significantly decreased in PP, in group B vs group A. In addition, we also observed a significant decrease of ADC values in PLIC in group B vs group A.

Discussion

The main result of this pilot study is that DTI values measured in specific brain areas during the first 6 days of life correlated significantly with early neurologic outcome in infants with conditions likely to lead to HIE. With selective region-of-interest analysis, lower ADC values in PLIC and PP and lower FA values in PLIC and CP bilaterally correlated significantly with poor early neurologic outcome. These results suggest that DTI measurement could be efficient in the determination of early prognosis and that pathologic processes underlying adverse neurologic outcome are quite different in PLIC and PP compared with CP.

Methodologic Considerations

We report clinical data and MR imaging parameters in a homogeneous cohort of 22 full-term neonates that fulfilled strict conditions with potential HIE. As ADC and FA values might change during the first weeks of life, specifically in HI conditions, the delay between the insult and MR imaging acquisition remains open to discussion. In our study, because of the risk for ADC pseudonormalization from the end of the first week,²³ we decided to perform the MR imaging studies between D1 and D6. We developed anatomic well-defined boundary points (identified separately in each patient) that depict the variation in DTI indices as a function of position within the brain. Manual region-of-interest selection allows

Comparison between ADC and FA values on the left and right sides with early neurologic outcome

		Group A	Group B	P
PLIC	Right ADC (mean [median] \pm SD) (mm ² /s)	1.101 (1.115) \pm 0.071	0.676 (0.692) \pm 0.079	.000027
	Left ADC (mean [median] \pm SD) (mm ² /s)	1.074 (1.082) \pm 0.068	0.665 (0.706) \pm 0.093	.000027
	Right FA (mean [median] \pm SD)	0.461 (0.458) \pm 0.057	0.391 (0.413) \pm 0.057	.006
	Left FA (mean [median] \pm SD)	0.457 (0.455) \pm 0.047	0.369 (0.378) \pm 0.091	.02
PP	Right ADC (mean [median] \pm SD)	1.177 (1.162) \pm 0.077	0.74 (0.763) \pm 0.14	.000027
	Left ADC (mean [median] \pm SD)	1.163 (1.153) \pm 0.08	0.722 (0.749) \pm 0.14	.000027
	Right FA (mean [median] \pm SD)	0.151 (0.149) \pm 0.019	0.148 (0.134) \pm 0.32	.49
	Left FA (mean [median] \pm SD)	0.155 (0.150) \pm 0.021	0.154 (0.156) \pm 0.035	.74
CP	Right ADC (mean [median] \pm SD)	1.391 (1.369) \pm 0.265	1.370 (1.376) \pm 0.565	.91
	Left ADC (mean [median] \pm SD)	1.4 (1.367) \pm 0.26	1.3 (1.5) \pm 0.339	.85
	Right FA (mean [median] \pm SD)	0.382 (0.383) \pm 0.033	0.312 (0.316) \pm 0.058	.006
	Left FA (mean [median] \pm SD)	0.385 (0.381) \pm 0.043	0.3 (0.3) \pm 0.05	.003

measurements on native space, without image transformation, and is more efficient for individual clinical analysis, whereas voxel-based method requires normalization of data, which induces loss of anatomic precision.²⁴ However, an a priori hypothesis concerning a few selected structures to be assessed is required. In our study, we selected PLIC and PP because of their known HI sensitivity. CP region of interest was chosen because 1) it mediates the communication of neuronal networks including telencephala, rhombencephala, and spinal cord (corticospinal tract); and 2) in adult cohorts, CP alteration has been described in patients with poor neurologic outcome in traumatic brain injury, in spinocerebellar ataxia types 1 and 2, and in stroke.²⁵⁻²⁷ In each case, anatomic landmarks for selected regions of interest were positioned according to Wakana et al.²² However, regions of interest drawn on DTI may have low resolution, but the strong high interrater and intrarater reliability demonstrates the reproducibility of the method.

Early Neurologic Outcome and Imaging Parameters

As previously shown,^{9,20,28} MR imaging score including conventional MR imaging and DWI data correlate significantly with early neurologic outcome of neonates with HIE conditions. The recent publication of Liauw et al²⁸ supports the use of this type of score according to reference standard injury patterns in HIE.

In our study, we showed that ADC values alone in the PP and PLIC, but not in CP, during the first days following HI brain injury appear as a sensitive marker to evaluate infants' early neurologic outcome as appreciated by the Amiel-Tison score. The lower the ADC value in those regions between day 1 and day 6, the worse the early neurologic outcome. Our results are consistent with the literature. Hunt et al²⁹ in 28 neonates with HIE found that the ADC value in the PLIC was significantly greater for those who survived compared with those who died. Barkovich et al (10 neonates with HIE)¹¹ and Wolf et al (13 neonates with HIE)³⁰ reported an early high reduction of water diffusion in injured patients (up to 60% compared with control subjects) in specific brain areas (corticospinal tracts, thalami). Vermeulen et al³¹ confirmed the interest of early ADC measurement, particularly on the PLIC, to predict the prognosis of neonates with HI at 2 years. Some authors have suggested that an ADC value lower than 0.85×10^{-3} mm²/s on PLIC is associated with a poor outcome. In our study, all of the neonates with a mean ADC value lower than

0.8×10^{-3} mm²/s on the PLIC and 0.9×10^{-3} mm²/s on the PP had a severe early neurologic outcome or died. Recently, Liauw et al³² in 24 neonates showed the strong interest of ADC measurement, particularly in regions with no visual abnormality on conventional MR imaging and DWI. The authors hypothesize that brain tissue may be disrupted despite normal MR imaging appearance, particularly in the basal ganglia and brain stem.

Bartha et al¹⁵ explored DTI data (ADC and FA) in white matter (optic radiation, corticospinal tracts, posterior white matter, frontal white matter) and gray matter (basal ganglia, thalami, calcarine cortex) of 14 healthy infants at term, giving reference values. However, FA measurement in a specific area in neonates with HI to predict outcome is poorly reported in the literature. Ward et al¹³ in 20 neonates with HI observed that FA remained decreased, whereas ADC pseudonormalized with time. In the same time, the authors reported that FA decreased in only some severe basal ganglia and white matter injury but decreased in all moderate basal ganglia and white matter injury. The authors' conclusion was that FA might represent an interesting marker in neonates, particularly in moderate HI and also when results of ADC values are normal. We could not observe such results in our study because we did not make chronologic comparisons in our predictive factors (ADC and FA).

Malik et al¹² on 17 mild to moderate neonates with HI reported the FA changes with time, showing an increase of this parameter between the 1st and 12th weeks of life. In our study, whereas FA values in PP did not correlate with early neurologic outcome, FA values in CP and PLIC areas correlated with early neurologic outcome, both on the right and left sides (ie, the lower the FA values in CP and PLIC, the worse the infants' early neurologic outcome). In our study, FA alteration on CP correlated with poor early neurologic outcome, whereas not concerning ADC values on this area. In adult studies, a **AO: C** decrease of FA value on the CP in the first 2 weeks after ischemic stroke correlated with motor deficit at the time of imaging and 3 months later, whereas no pathologic findings have been observed with T1-weighted and T2-weighted images and ADC maps in these areas.^{26,27} These results in adult patients highlight the potentially strong interest in FA measurement regarding brain injury conditions, particularly on CP. Groenendaal et al³³ explored the prewallarian degeneration of the CP in 39 neonates (term and near-term) with HI conditions. The authors showed the high positive predictive value of

the association of PLIC and CP abnormal signal intensity on DWI for delayed neurodevelopment outcome. Moreover, in this study, 14 of the 15 neonates with prewallarian degeneration had a poor neurologic outcome. More recently, Domi et al³⁴ reported the DWI changes in descending corticospinal tracts in CP in 14 neonates with acute arterial ischemic stroke. These authors showed that all children without signal intensity abnormality on descending corticospinal tracts had normal results on standardized neurologic examination after 1 year of life. FA and ADC values, imaging markers commonly used to study microstructural white or gray matter abnormalities,^{13,14} provide limited information for determination of specific pathologic processes at a cellular level. Moreover, the differential alteration in FA and ADC values we found here may reflect differences in pathologic processes, either in PLIC and PP or in CP areas. Low FA could reflect an early loss of structural integrity of fiber tracts that might explain our results on PLIC and CP, whereas ADC after an early phase of decrease in severe brain injury usually pseudonormalize. Thus, the lowering of both FA and ADC in PLIC can reflect the severity of the injury in those infants. The hypothesis for only lowering FA (not ADC) in CP in infants with a poor early neurologic outcome may be the occurrence of a prewallarian degeneration in the descending corticospinal tracts as it has been suggested in neonatal and adult brain injury.^{26,33,34}

Further studies are required to better understand physiopathologic processes leading to cerebral impairment in HIE. From a functional point of view, the DTI values probably represent part of the anatomic support behind the clinical perturbations observed in infants with HIE. Moreover, their correlation with early neurologic outcome suggests that these parameters could be robust prognostic factors for a long-term outcome with infants with moderate disability.

Limits of the Study

Although encouraging, our results should be interpreted with caution because of the small size of our sample. For ethical reasons, there was no control group. In addition, region-of-interest positioning may be difficult in some small areas, such as the CP. This finding invites us to be prudent in analyzing the results.

Conclusions

In our study, we showed that DTI parameters in specific brain areas had strong correlations with early neurologic outcome in infants with HIE, reflecting differences in damaged tissue mechanisms in the PLIC and PP or in the CP areas. Indeed, we can hypothesize that these indices could represent robust parameters to predict long-term outcome in HIE. Taking into account these results, studies are now needed to evaluate 1) the long-term prognostic value of DTI parameters (FA and ADC) in neonates with moderate injury; and 2) to discriminate among no disability, mild disability, and moderate disability. This could lead to the evaluation of protective treatments for a relatively short term.

Acknowledgments

The authors thank Prof. Chêne and Ms. S. Leproust from USMR of Bordeaux for their help with methodology, all of the

pediatric radiologic unit workers, and the pediatric SMUR team of the University Hospital of Bordeaux. Also, the authors thank Philips for the opportunity to use PRIDE software for DTI data posttreatment, M. Bordessoules for excellent technical assistance, W. Mayo for helpful discussions, and Dr. L. Harper for his assistance with editing the manuscript in the English language. Part of this work was supported by CHU of Bordeaux (O.B.) and region of Aquitaine (M.A.).

O. Brissaud performed conception and design of the research, acquired, analyzed and interpreted the data, performed statistical analysis, handled funding and supervision, drafted the manuscript, and made critical revision of the manuscript for important intellectual content. M. Amirault acquired, analyzed, and interpreted the data and performed statistical analysis. F. Villega acquired the data, handled funding and supervision, drafted the manuscript, and made critical revisions to the manuscript for important intellectual content. O. Periot acquired, analyzed, and interpreted the data and handled funding and supervision. J.F. Chateil handled conception and design of the research; acquired, analyzed, and interpreted the data; handled funding and supervision; drafted the manuscript; and made critical revisions to the manuscript for important intellectual content. M. Allard handled conception and design of the research, handled funding and supervision, drafted the manuscript, and made critical revisions to the manuscript for important intellectual content.

References

- Wayenberg JL, Vermeylen D, Damis E. [Définition de l'asphyxie à la naissance et incidence des complications neurologiques et systémiques chez le nouveau-né à terme]. *Arch Pédiatr* 1998;5:1065-71
- Adamson SJ, Alessandri LM, Badawi N, et al. Predictors of neonatal encephalopathy in full-term infants. *BMJ* 1995;311:598-602
- Ekert P, Perlman M, Steinlin M, et al. Predicting the outcome of postasphyxial hypoxic-ischemic encephalopathy within 4 hours of birth. *J Pediatr* 1997;131:613-17
- Finer NN, Robertson CM, Richards RT, et al. Hypoxic-ischemic encephalopathy in term neonates: Perinatal factors and outcome. *J Pediatr* 1981;98:112-17
- Smith J, Wells L, Dodd K. The continuing fall in incidence of hypoxic-ischemic encephalopathy in term infants. *BJOG*. 2000;107:461-66
- Thornberg E, Thiringer K, Odeback, et al. Birth asphyxia: Incidence, clinical course and outcome in a Swedish population. *Acta Paediatr* 1995;84:927-32
- Gosselin J, Gahagan S, Amiel-Tison C. The Amiel-Tison neurological assessment at term: Conceptual and methodological continuity in the course of follow-up. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2005;11:34-51
- Sarnat HB, Sarnat MS. Neonatal encephalopathy. Following foetal distress. A clinical and electroencephalography study. *Arch Neurol* 1976;33:696-705
- Brissaud O, Chateil JF, Bordessoules M, et al. Chemical shift imaging and localised magnetic resonance spectroscopy in full-term asphyxiated neonates. *Pediatr Radiol* 2005;35:998-1005
- Rutherford M, Counsell S, Allsop J, et al. Diffusion-weighted magnetic resonance imaging in term perinatal brain injury: A comparison with site of lesion and time from birth. *Pediatrics* 2004;114:1004-14
- Barkovich AJ, Miller SP, Bartha A, et al. MR imaging, MR spectroscopy, and diffusion tensor imaging of sequential studies in neonates with encephalopathy. *AJNR Am J Neuroradiol* 2006;27:533-47
- Malik GK, Trivedi R, Gupta RK, et al. Serial quantitative diffusion tensor MRI of the term neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE). *Neuropediatrics* 2006;37:337-43
- Ward P, Counsell S, Allsop J, et al. Reduced fractional anisotropy on diffusion tensor magnetic resonance imaging after hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics* 2006;117:e619-30
- van Pul C, Buijs J, Janssen MJ, et al. Selecting the best index for following the temporal evolution of apparent diffusion coefficient and diffusion anisotropy after hypoxic-ischemic white matter injury in neonates. *AJNR Am J Neuroradiol* 2005;26:469-81
- Bartha AI, Yap KR, Miller SP, et al. The normal neonatal brain: MR imaging, diffusion tensor imaging, and 3d MR spectroscopy in healthy term neonates. *AJNR Am J Neuroradiol* 2007;28:1015-21

16. Cascio CJ, Gerig G, Piven J **Diffusion tensor imaging: Application to the study of the developing brain.** *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 2007;46:213–23
17. Hermoye L, Saint-Martin C, Cosnard G, et al. **Pediatric diffusion tensor imaging: Normal database and observation of the white matter maturation in early childhood.** *Neuroimage* 2006;29:493–504
18. Miller SP, McQuillen PS, Hamrick S, et al. **Abnormal brain development in newborns with congenital heart disease.** *N Engl J Med* 2007;357:1928–38
19. Mukherjee P, Miller JH, Shimony JS, et al. **Diffusion-tensor MR imaging of gray and white matter development during normal human brain maturation.** *AJNR Am J Neuroradiol* 2002;23:1445–56
20. Meyer-Witte S, Brissaud O, Brun M, et al. [Apport pronostique de la resonance magnetique cerebrale dans l'encephalopathie hypoxique-ischemique du nouveau-ne a terme: Score d'imagerie, spectroscopie. Etude de 26 cas]. *Arch Pediatr* 2008;15:9–23
21. Pajevic S, Pierpaoli C. **Color schemes to represent the orientation of anisotropic tissues from diffusion tensor data: Application to white matter fiber tract mapping in the human brain.** *Magn Reson Med* 1999;42:526–40
22. Wakana S, Jiang H, Nagae-Poetscher LM, et al. **Fiber tract-based atlas of human white matter anatomy.** *Radiology* 2004;230:77–87
23. Winter JD, Lee DS, Hung RM, et al. **Apparent diffusion coefficient pseudonormalization time in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy.** *Pediatr Neurol* 2007;37:255–62
24. Snook L, Plewes C, Beaulieu C. **Voxel based versus region of interest analysis in diffusion tensor imaging of neurodevelopment.** *Neuroimage* 2007;34:243–52
25. Mandelli ML, De Simone T, Minati L, et al. **Diffusion tensor imaging of spinocerebellar ataxias types 1 and 2.** *AJNR Am J Neuroradiol* 2007;28:1996–2000
26. Sidaros A, Engberg AW, Sidaros K, et al. **Diffusion tensor imaging during recovery from severe traumatic brain injury and relation to clinical outcome: A longitudinal study.** *Brain* 2008;131:559–72
27. Thomalla G, Glauche V, Koch MA, et al. **Diffusion tensor imaging detects early wallerian degeneration of the pyramidal tract after ischemic stroke.** *Neuroimage* 2004;22:1767–74
28. Liauw L, van der Grond J, van den Berg-Huysmans AA, et al. **Hypoxic-ischemic encephalopathy: Diagnostic value of conventional MR imaging pulse sequences in term-born neonates.** *Radiology* 2008;247:204–12
29. Hunt RW, Neil JJ, Coleman LT, et al. **Apparent diffusion coefficient in the posterior limb of the internal capsule predicts outcome after perinatal asphyxia.** *Pediatrics* 2004;114:999–1003
30. Wolf RL, Zimmerman RA, Clancy R, et al. **Quantitative apparent diffusion coefficient measurements in term neonates for early detection of hypoxic-ischemic brain injury: Initial experience.** *Radiology* 2001;218:825–33
31. Vermeulen RJ, van Schie PE, Hendriks L, et al. **Diffusion-weighted and conventional mr imaging in neonatal hypoxic ischemia: Two-year follow-up study.** *Radiology* 2008;249:631–39
32. Liauw L, van Wezel-Meijler G, Veen S, et al. **Do apparent diffusion coefficient measurements predict outcome in children with neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy?** *AJNR Am J Neuroradiol* 2009;30:264–70
33. Groenendaal F, Benders MJ, de Vries LS. **Pre-wallerian degeneration in the neonatal brain following perinatal cerebral hypoxia-ischemia demonstrated with MRI.** *Semin Perinatol* 2006;30:146–50
34. Domi T, deVeber G, Shroff M, et al. **Corticospinal tract pre-wallerian degeneration: A novel outcome predictor for pediatric stroke on acute MRI.** *Stroke* 2009;40:780–87

On-line Table 1: Clinical data concerning the 22 patients included in the study

Patients	MRI		GA		History	D	A.S	CA	E	S	SS	Day of Examination	Amiel-Tison Score	Outcome Group
	Date (day)	Sex	BW (g)	(weeks + days)										
1	6	F	3050	41+2	MSL	NI	1/5	No	No	Yes	3	8	Death day 19	B
2	5	F	3000	41+3	FHRA	NI	1/1	No	Yes	Yes	3	8	Death day 12	B
3	4	F	3730	40+2	FHRA, MSL	CS	3/10	No	No	Yes	2	17	Moderate abnormalities	A
4	3	F	3070	40	Head retention, NC	NI + IE	1/3	No	No	No	2	8	None or minor abnormalities	A
5	5	F	3040	40+5	FHRA, MSL	NI + IE	2/9	No	No	Yes SE	3	12	Moderate abnormalities	A
6	2	F	4000	39	NC	NI	0/ND	Yes	Yes	No	3	10	None or minor abnormalities	A
7	4	M	2380	38	FHRA, IUGR	CS	6/7	No	N	Yes	2	17	Moderate abnormalities	A
8	3	M	3620	41	None	NI	2/8	Yes	No	Yes	1	13	None or minor abnormalities	A
9	4	M	3760	40	Dystocia + MSL	NI	1/3	No	No	Yes	3	7	Moderate abnormalities	A
10	4	M	3510	40	FHRA	CS	0/ND	No	Yes	Yes	3	13	Severe abnormalities	B
11	5	M	2800	39	FHRA	CS	5/8	No	No	No	1	9	Moderate abnormalities	A
12	6	F	3700	41	Major FHRA	NI	3/3	No	No	Gasps	3	4	Death day 6	B
13	5	M	3450	39+2	NC	NI	1/5	No	No	Yes	2	6	Moderate abnormalities	A
14	4	F	2575	37+4	NONE	NI	0/ND	Y	Y	No	3	6	None or minor abnormalities	A
15	3	F	2570	37	FHRA	C	2/6	No	No	No	3	3	None or minor abnormalities	A
16	3	M	4480	40+4	None	C	1/4	No	No	No	3	4	None or minor abnormalities	A
17	1	F	3100	40+2	FHRA	C	0/0	Y	Y	No	3	ND	Death day 2	B
18	1	F	3000	38	NC FHRA	C	1/1	Y	Y	No	3	ND	Death day 2	B
19	1	M	3570	38+1	FHRA	NI	2/10	Y	Y	Y	2	5	Moderate abnormalities	A
20	6	F	2560	41+3	FHRA	NI	5/7	Y	Y	No	2	5	None or minor abnormalities	A
21	3	M	3450	38+2	None	C	1/2	No	No	Y	3	6	None or minor abnormalities	A
22	1	F	2050	38	IUGR	C	2/6	No	No	No	2	7	None or minor abnormalities	A

On-line Table 2: Codifications for MRI score

A	Brain swelling: 0 none; 2 yes
B	Grey/white matter differentiation: 0 Present; 1 absent in one localization; 2 absent in more than one localization
C	High signal in the PLIC on T1-W: 0 Normal; 1 mild decrease; 2 absent
D	Hyperintensity on T1-W sequences on PP and T: 0 None; 1 one localization; 2 more than 1 localization
E	Hyperintensity on T2 sequences on PP and T: 0 None; 1 one localization; 2 more than one localization
F	Brain stem abnormalities on T1-W and/or T2-W sequences: 0 None; 1 yes
G	Cortex abnormalities on T1 and/or T2 sequences: 0 None; 1 one localization; 2 more than one localization
H	White-matter petechial abnormalities: 0 None; 1 one localization; 2 more than one localization
I	Subarachnoid hemorrhages: 0 None; 1 yes
J	White-matter abnormalities in DWI: 0 None; 1 one localization; 2 more than one localization
K	Basal ganglia abnormalities in DWI: 0 None; 1 one localization; 2 more than one localization
L	Cerebral cortex abnormalities in DWI: 0 None; 1 one localization; 2 more than one localization

On-line Table 3: MRI score results for the 22 neonates

Case	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	Total	Outcome
1	2	2	2	1	0	1	2	0	0	2	0	0	12	B
2	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	2	0	4	B
3	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	A
4	0	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	3	A
5	0	1	0	0	0	0	1	0	0	2	1	2	7	A
6	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2	A
7	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	A
8	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	4	A
9	0	0	1	0	2	1	0	0	1	2	0	0	7	A
10	2	0	2	0	2	1	2	0	1	2	2	2	16	B
11	0	0	0	1	1	1	0	2	0	2	0	0	7	A
12	2	2	2	0	2	1	2	0	1	2	2	2	18	B
13	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	4	A
14	0	0	2	2	0	0	0	2	1	2	0	0	9	A
15	0	0	2	2	0	0	0	0	0	2	0	0	6	A
16	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	A
17	0	0	2	0	0	0	0	0	0	2	2	0	6	B
18	0	1	0	0	2	0	1	0	0	2	2	0	8	B
19	0	1	1	1	0	0	1	0	1	2	0	1	8	A
20	0	0	1	1	0	0	0	0	0	2	0	0	4	A
21	0	0	0	2	2	1	0	0	0	2	2	0	9	A
22	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2	0	0	3	A

Note:—The abnormalities listed in table 2a are summed in table 2b for each case to generate a score (total).

On-line Table 4: Diffusion tensor imaging results in the 22 patients (ADC: $\times 10^{-3}$ mm/s²)

Patients	PLIC						PP						CP					
	Right		Left		Mean		Right		Left		Mean		Right		Left		Mean	
	FA	ADC	FA	ADC	FA	ADC	FA	ADC	FA	ADC	FA	ADC	FA	ADC	FA	ADC	FA	ADC
1 ^a	0,282	0,673	0,21	0,715	0,246	0,694	0,139	0,729	0,113	0,713	0,126	0,721	0,211	2,219	0,265	1,495	0,238	1,857
2 ^a	0,378	0,774	0,356	0,745	0,367	0,76	0,127	0,797	0,123	0,785	0,125	0,791	0,334	1,445	0,24	1,521	0,287	1,483
3	0,399	1,137	0,442	1,098	0,421	1,117	0,12	1,139	0,127	1,155	0,123	1,147	0,333	1,802	0,39	1,502	0,361	1,652
4	0,466	1,096	0,413	1,061	0,44	1,078	0,175	1,143	0,133	1,13	0,154	1,136	0,387	1,465	0,327	1,421	0,357	1,443
5	0,331	1,069	0,446	1,003	0,389	1,036	0,145	1,107	0,144	1,056	0,144	1,082	0,366	1,457	0,374	1,074	0,37	1,265
6	0,449	1,19	0,371	1,131	0,41	1,161	0,151	1,286	0,156	1,279	0,153	1,282	0,383	1,666	0,355	1,319	0,369	1,493
7	0,443	1,152	0,418	1,121	0,43	1,136	0,123	1,203	0,127	1,195	0,125	1,199	0,382	1,931	0,386	1,313	0,384	1,622
8	0,468	1,163	0,496	1,099	0,483	1,131	0,191	1,153	0,199	1,132	0,195	1,142	0,413	1,257	0,392	2,028	0,402	1,643
9	0,447	1,058	0,509	1,035	0,478	1,047	0,151	1,142	0,157	1,11	0,154	1,126	0,427	1,264	0,444	1,08	0,436	1,172
10 ^a	0,406	0,734	0,459	0,697	0,433	0,716	0,131	0,875	0,181	0,838	0,156	0,856	0,305	1,711	0,32	1,505	0,312	1,608
11	0,422	1,142	0,488	1,124	0,455	1,133	0,167	1,285	0,188	1,254	0,178	1,270	0,405	1,365	0,469	1,141	0,437	1,253
12 ^a	0,424	0,6	0,45	0,538	0,437	0,569	0,211	0,594	0,195	0,561	0,203	0,577	0,307	0,644	0,293	0,718	0,3	0,681
13	0,549	1,08	0,528	1,071	0,539	1,076	0,152	1,167	0,171	1,153	0,162	1,160	0,417	1,517	0,376	1,389	0,396	1,453
14	0,472	1,154	0,467	1,135	0,47	1,144	0,137	1,264	0,146	1,277	0,141	1,270	0,384	1,59	0,358	1,788	0,371	1,59
15	0,483	1,133	0,463	1,104	0,474	1,119	0,151	1,264	0,15	1,282	0,150	1,273	0,35	1,159	0,366	1,2	0,358	1,18
16	0,508	1,098	0,433	1,067	0,471	1,082	0,141	1,218	0,152	1,163	0,146	1,190	0,44	1,374	0,446	1,346	0,443	1,36
17 ^a	0,436	0,568	0,341	0,555	0,389	0,562	0,156	0,544	0,181	0,541	0,169	0,542	0,327	0,895	0,385	1,067	0,356	0,981
18 ^a	0,421	0,712	0,401	0,74	0,411	0,726	0,125	0,9	0,132	0,896	0,128	0,899	0,392	1,308	0,315	1,531	0,353	1,42
19	0,574	1,055	0,478	1,089	0,527	1,072	0,183	1,191	0,155	1,179	0,169	1,185	0,399	1,028	0,408	1,51	0,403	1,269
20	0,44	1,066	0,448	1,076	0,445	1,071	0,149	1,158	0,144	1,141	0,147	1,149	0,339	1,177	0,361	1,595	0,35	1,386
21	0,426	1,143	0,378	1,067	0,402	1,105	0,139	1,147	0,19	1,127	0,165	1,137	0,333	1,216	0,304	1,54	0,319	1,378
22	0,498	0,882	0,527	0,854	0,513	0,868	0,146	0,981	0,15	0,99	0,148	0,986	0,356	0,997	0,404	1,155	0,38	1,076
Mean	0,442	0,985	0,433	0,96	0,438	0,973	0,150	1,059	0,155	1,043	0,153	1,051	0,363	1,386	0,363	1,375	0,363	1,376
SD	0,064	0,206	0,072	0,199	0,062	0,202	0,023	0,222	0,025	0,224	0,022	0,223	0,051	0,356	0,058	0,279	0,05	0,26

^a indicates ●●●.

ABSTRACT: Severe neurological impairment or death in relation to perinatal asphyxia in developed countries concern 0.2 to 1.3/1000 live births. Clinical evaluation and conventional Magnetic Resonance Imaging (MRI) parameters are efficient to distinguish severe to minor Hypoxic-Ischemic Encephalopathy (HIE), but it remains discussed regarding long term outcome for babies with moderate HIE. Diffusion Tensor Imaging (DTI) measures the diffusion of water in cerebral tissue and quantitative parameters such as Fractional Anisotropy (FA) and Apparent Diffusion Coefficient (ADC) reflect the microstructure properties in local areas. We conducted in the same time a clinical and an experimental study. The aim of the clinical study was to evaluate MRI, MR Spectroscopy (MRS) and DTI parameters in asphyxiated full-term neonates. We showed that MRI (including conventional diffusion) and MRS represent interesting tools to evaluate the early neurological outcome in HIE neonates. DTI parameters in specific brain areas had strong correlations with early and at 6 months neurological outcome in babies with HIE. Studies are needed to evaluate the long-term prognostic value of DTI parameters in neonates with moderate injury. The aim of the experimental study was to evaluate the short-term effects of erythropoietin (Epo) on brain lesions (MR-Diffusion Imaging) and aquaporin-4 (immunohistochemistry) expression in a HI neonatal rat model. The potential protective effect of human recombinant Epo on a HI pup rat model was studied. We conclude that Epo has a short-term protective effect in HI pup rat model (reduction of stroke area; increase of ADC value in stroke area in treated rats), possibly through an early up-regulation of aquaporin-4 expression. One possible mechanism could be a better clearance of water excess from brain tissues to blood by aquaporin-4.

RESUME : Le handicap ou les décès en rapport avec l'asphyxie périnatale dans les pays développés correspondent à 0,2 à 1,3/1000 naissances vivantes. L'évaluation clinique et l'IRM conventionnelle permettent de distinguer les formes modérées des formes graves d'Encéphalopathies Hypoxiques Ischémiques (EHI). Le pronostic des EHI modérées reste difficile à préciser. L'imagerie des tenseurs de diffusion (DTI) mesure la diffusion de l'eau dans les tissus cérébraux et les paramètres quantitatifs tels que la Fraction d'Anisotropie et le Coefficient Apparent de Diffusion de l'eau (ADC) reflètent les propriétés microstructurales tissulaires. Nous avons mené une étude clinique et une étude expérimentale. L'objectif de l'étude clinique était d'évaluer les paramètres d'IRM, de SRM et de DTI chez les nouveau-nés asphyxiés à terme. Nous avons montré que l'IRM (y compris la diffusion conventionnelle) et les ratios du Lactate en SRM sont des outils intéressants pour l'évaluation neurologique précoce de ces nouveau-nés. Les paramètres de DTI (FA et ADC) dans des zones spécifiques cérébrales (capsules internes, pédoncules cérébraux, putamen/pallidum) sont fortement corrélés avec l'évolution neurologique précoce (J8) et à 6 mois, reflétant de possibles différences dans les mécanismes physiopathologiques impliqués. Des études sont nécessaires pour évaluer à long terme la valeur pronostique de ces paramètres. L'objectif de l'étude expérimentale était d'évaluer les effets à court terme de l'érythropoïétine (Epo) sur les lésions cérébrales en imagerie de diffusion et l'expression de l'aquaporine-4 en immunohistochimie dans un modèle HI de rat nouveau-né. L'effet protecteur potentiel de l'Epo humaine recombinante sur les rats a été étudié. L'Epo a un effet neuroprotecteur précocement dans notre modèle (réduction de la surface de l'accident vasculaire cérébral AVC, augmentation de la valeur d'ADC dans l'AVC chez les rats traités), éventuellement grâce à une « up-régulation » de l'expression de l'aquaporine-4. Un mécanisme possible de la diminution de l'œdème cérébral pourrait être une meilleure élimination de l'excès d'eau des tissus cérébraux vers la circulation sanguine via l'aquaporine-4.