

UNIVERSITE D'AIX-MARSEILLE
ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE
FACULTE DE PHARMACIE DE MARSEILLE
VASCULAR RESEARCH OF MARSEILLE (Inserm UMR_1076)

Thèse présentée pour obtenir le grade universitaire de docteur

Discipline : Pathologie Humaine
Spécialité : Pathologie vasculaire et nutrition

Isabelle GRANDVUILLEMIN-MATHERON

**Effets protecteurs précoces et tardifs de thérapie cellulaire par
administration de cellules mononuclées et de progéniteurs endothéliaux
issus du sang de cordon humain dans l'encéphalopathie hypoxo-
ischémique néonatale expérimentale chez le rat**

*Long-Term recovery after endothelial colony-forming cells or human umbilical cord blood
cells administration in a rat model of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy.*

Soutenue le 21/12/2017 devant le jury :

Pr Florence SABATIER	Aix-Marseille Université	Présidente
Pr Thierry DEBILLON	Université Joseph Fourier, Grenoble	Rapporteur
Pr Michel PLOTKINE	Université Paris Descartes	Rapporteur
Dr Youssef BENNIS	CURS Amiens-Picardie	Examineur
Pr Benjamin GUILLET	Aix-Marseille Université	Directeur de thèse

Résumé

L'hypoxo-ischémie cérébrale néonatale représente une des principales causes de mortalité et de morbidité chez les nouveau-nés. Sa physiopathologie est complexe et implique différents processus délétères menant vers la perte neuronale par apoptose et responsables de déficits sensori-moteurs et cognitifs.

De récents travaux expérimentaux ont permis de rapporter que la greffe de cellules humaines issues de sang de cordon (HUCBCs) conduit à une amélioration des scores neuro-comportementaux dans le modèle expérimental de cette pathologie chez le rongeur. Il existe également une autre population de cellules souches, monocellulaire et endothéliale, les progéniteurs endothéliaux circulants (ECFCs) semblent représenter une alternative thérapeutique prometteuse comme cela a été rapporté au sein du laboratoire VRCM sur des modèles d'ischémie cérébrale adulte.

Dans ce contexte, le but de cette étude a été de caractériser et de comparer l'effet des ECFCs et HUCBCs sur l'amélioration des scores neuro-comportementaux mais aussi à l'échelle moléculaire et fonctionnelle dans le modèle d'hypoxo-ischémie néonatale selon Rice-Vannucci et ce à court (7 jours après l'épisode ischémique) et à long terme (12 semaines après l'épisode ischémique).

L'injection intrapéritonéale d'ECFCs ou de HUCBCs, 2 jours après l'accident hypoxo-ischémique, a été corrélée à une amélioration des capacités de motricité et de mémorisation précoce, mais également tardive des animaux à l'âge adulte, ainsi qu'une diminution des comportements anxieux. L'analyse histologique a permis d'observer que l'injection d'ECFC ou d'HUCBC a été corrélée à une augmentation de la densité capillaire en temps précoce et tardif. L'imagerie de perfusion cérébrale SPECT/CT a permis d'objectiver une restauration complète de la perfusion cérébrale de l'hémisphère lésé à l'âge adulte par les deux types cellulaires, signant les effets définitifs protecteurs en terme de viabilité et de fonctionnalité du parenchyme. Ces observations tardives sont associées à un effet protecteur précoce de ces cellules sur l'augmentation de la survie neuronale et la diminution de l'astroglie réactionnelle ou encore un effet sur la composante inflammatoire par la diminution de l'activation de la microglie pro-inflammatoire au niveau striatal.

Les résultats de cette étude ouvrent ainsi de nouvelles perspectives pour l'usage des ECFCs dans le traitement de l'HI néonatale. Parallèlement à ces travaux expérimentaux, des essais cliniques en cours évaluent la faisabilité et la tolérance d'injections d'HUCBCs en contexte d'encéphalopathie hypoxo-ischémique du fait de la facilité d'obtention et du caractère autologue de ces cellules.

Abstract

Neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy (NHIE) is a dramatic perinatal complication, associated with poor neurological prognosis despite neuroprotection by therapeutic hypothermia, in the absence of an available curative therapy. We evaluated and compared ready-to-use human umbilical cord blood cells (HUCBCs) and bankable but allogeneic endothelial progenitors (ECFCs) as cell therapy candidate for NHIE. We compared benefits of HUCBC and ECFC transplantation 48 hours after injury in male rat NHIE model, based on the Rice-Vannucci approach. Based on behavioral tests, immune-histological assessment and metabolic imaging of brain perfusion using SPECT, HUCBC or ECFC administration provided equally early and sustained functional benefits, up to 8 weeks after injury. These results were associated with total normalization of injured hemisphere cerebral blood flow assessed by SPECT/CT imaging. In conclusion, even if ECFCs represent an efficient candidate, HUCBCs' autologous criteria and easier availability make them the ideal candidate for hypoxic-ischemic cell therapy.

Remerciements

A Madame le Professeur Florence SABATIER, je vous remercie d'avoir accepté de présider ce jury. Je vous remercie pour votre aide, votre disponibilité durant toutes ces années et votre expertise dans le domaine de la thérapie cellulaire.

A Monsieur le Professeur Michel PLOTKINE, je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail en étant rapporteur. Je vous témoigne mon plus profond respect.

A Monsieur le Professeur Thierry DEBILLON, je vous remercie de m'avoir fait l'honneur d'être rapporteur de cette thèse. Je vous remercie pour votre jugement et votre expertise. Je vous prie de recevoir mon estime et ma reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Benjamin GUILLET, je vous remercie de m'avoir soutenue tout au long de ce parcours. Vous m'avez guidée et encadrée. Je vous adresse toute ma reconnaissance.

A Monsieur le Docteur Youssef BENNIS, je vous remercie sincèrement d'avoir accepté de juger ce travail.

A Madame le Professeur Françoise DIGNAT-GEORGE, je vous remercie de m'avoir acceptée au sein de votre équipe durant toutes ces années.

A Monsieur le Professeur Umberto SIMEONI, je vous remercie de m'avoir proposé ce sujet il y a quelques années !

A Monsieur le Docteur Farid BOUBRED, un collègue, devenu chef de service, devenu un ami. Merci pour ce temps passé à corriger, proposer, recorriger.... Je te remercie pour ton enseignement et pour ton aide, toujours avec simplicité et humilité.

A mes chères consœurs avec qui je partage l'amour de la néonatalogie, ces joies et ces moments difficiles, ces longues journées, et ces nuits interminables depuis maintenant 10 ans... A Isa L, pour nos années « labo », pour ces années de complicité à l'hôpital mais aussi en dehors du boulot, pour nos délires et nos fous-rires... A Virginie, pour notre amitié et notre complicité au quotidien, pour ton soutien dans tous les moments forts, pour ton rôle de « marraine de cœur » pour mes enfants... A Camille, pour ta gentillesse sans faille, ton dévouement et tes « pétages » de plomb ... A Valérie, pour ton soutien dans les bons comme les moins bons moments... A Laurence pour ton travail acharné mais aussi tes gros délires qui nous font bien rire... A Clotilde, pour cette aventure de thérapie cellulaire qui nous tient à cœur et pour ta « zen attitude » au quotidien... A Patricia, pour ton expérience et ta gentillesse... A Ludivine et Odeline, Anaïs, Justine, Blandine avec qui j'aime et ai aimé travailler.

A toutes les infirmières, puéricultrices, cadres, auxiliaires, psychologues du service de Médecine Néonatale de l'hôpital de la Conception, pour leur humanité, leur gentillesse et la rigueur de leur travail.

Aux petits patients, passés et futurs, et à leur combat pour la vie...

A tous mes compagnons de route au sein du laboratoire : Philippe pour tout ce que tu m'as appris, ta gentillesse et nos moments de complicité ; A Sandrine, pour nos petites pauses café, nos secrets partagés... A Youssef, Lionel, Cherazade pour nos partages de paillasse

A mes parents et mes sœurs, pour cette complicité, cet amour inconditionnel et cette union qui fait notre force...

A mes beaux-frères, belle-sœur, beaux-parents, mon neveu et mes nièces, pour tout l'amour que vous me donnez...

A Timothée et Fanélie, vous êtes ma force, ma joie et ma fierté

A Anthony, mon soutien permanent, ma moitié, mon compagnon de route

*Je voulais simplement vous dire **un grand MERCI***

*A Madame le Professeur Pascale PISANO,
à jamais dans nos pensées,
ce travail vous est dédié ...*

Table des matières

Résumé	1
Abstract.....	3
Remerciements	4
A. INTRODUCTION GENERALE	9
1. L'encéphalopathie hypoxo-ischémique néonatale.....	11
1.1 Définition	11
1.2 Physiopathologie.....	11
1.3 Diagnostic d'EHI néonatale.....	14
1.4 Prise en charge actuelle de l'EHI	17
1.4.1 Prise en charge globale.....	17
1.4.2 Hypothermie thérapeutique	17
1.4.2.1 Généralités.....	17
1.4.2.2 Recommandations actuelles.....	18
1.4.2.3 Mécanismes d'action.....	18
1.4.3 Nouvelles thérapeutiques	19
2. Cellules de sang de cordon et ischémie cérébrale.....	21
2.1 Contexte général	21
2.2 Particularité des progéniteurs endothéliaux.....	22
2.2.1 Définition des progéniteurs endothéliaux.....	22
2.2.2 Rôle des EPCs	24
2.3 HUCBCs dans l'ischémie cérébrale.....	25
2.4 Mécanismes d'action.....	26
3. Article :	29
B. TRAVAIL EXPERIMENTAL.....	30
C. DISCUSSION	33
1. Points forts.....	34
1.1. Place de la thérapie cellulaire dans le traitement de l'EHI	34
1.2. Points forts techniques de l'étude: tests comportementaux, évaluation dans le temps, imagerie fonctionnelle	34
1.3. Choix cellulaire	36
1.4. Evaluation et rôle des cellules progénitrices endothéliales.....	37

2. Limites et Perspectives	38
2.1. Hypothermie thérapeutique	38
2.2. Modèle animal	38
2.3. Etudes cliniques.....	40
D. CONCLUSION	44
Bibliographie	46

A. INTRODUCTION GENERALE

L'encéphalopathie hypoxo-ischémique néonatale, dont l'incidence est d'environ 2 pour mille naissances vivantes, reflète les conséquences cérébrales d'une privation aiguë d'oxygène associée à une ischémie, à proximité de la naissance, secondaire à un défaut d'apport ou d'utilisation d'oxygène, d'intensité et de durée variables. Elle entre dans le cadre général de l'asphyxie périnatale, définie sur le plan clinique par une atteinte neurologique, un score d'Apgar bas à 5 minutes, une acidose métabolique, , et une atteinte multi-systémique dans les formes graves.

Les complications les plus sévères sont le décès et les handicaps neuro-sensoriels à long terme. L'encéphalopathie hypoxo-ischémique néonatale se caractérise en effet par des lésions et pertes de cellules en particulier neuronales.

L'hypothermie thérapeutique contrôlée limite la sévérité des lésions cérébrale mais son efficacité, modérée, ne prévient que partiellement la dégénérescence cellulaire. D'autres stratégies thérapeutiques sont nécessaires. Le recours aux cellules souches issues du sang de cordon représente une stratégie prometteuse en médecine régénérative en raison des potentialités de ces cellules, mais également de leur facilité d'obtention.

1. L'encéphalopathie hypoxo-ischémique néonatale

1.1 Définition

L'encéphalopathie hypoxo-ischémique (EHI) est la conséquence cérébrale d'une privation d'oxygène, secondaire à un défaut d'apport ou d'utilisation d'oxygène. Dans le domaine de la périnatalité, elle entre dans le cadre de l'anoxo-ischémie périnatale définie par une insuffisance des échanges gazeux à proximité de l'accouchement, responsable d'une acidose métabolique, d'un score d'Apgar anormalement bas à 5 minutes de vie, d'une atteinte neurologique et multi-systémique¹. Plus souvent, dans la littérature, l'anoxo-ischémie est définie par un pH sanguin fœtal inférieur à 7, un score d'Apgar inférieur à 3 à 5 minutes de vie ou l'association d'un pH inférieur à 7 et un score d'Apgar inférieur ou égale à 3 à 5 minutes de vie et des anomalies du rythme cardiaque fœtal au monitoring. Ces dernières définitions ne prennent pas en compte le degré de l'asphyxie puisque seule une faible proportion de ces enfants présentera une asphyxie sévère avec une atteinte cérébrale irréversible et une encéphalopathie hypoxo-ischémique post-natale².

Lors d'un accouchement à terme, une asphyxie intrapartum survient dans 0,5% des cas. Celle-ci comporte parmi ses complications 5-15% de décès, 60% de défaillances organiques et 40% d'encéphalopathies qui évolueront dans 15-25% des cas vers des séquelles neurologiques graves, à type de paralysie cérébrale, retard mental, troubles cognitifs et épilepsie^{3, 4}. La fréquence de l'encéphalopathie néonatale est de 2 pour mille naissances environ, dont 50% sont attribuables à l'asphyxie intrapartum^{5, 6}.

1.2 Physiopathologie

L'accident hypoxo-ischémique cérébral est secondaire à une interruption plus ou moins brutale de la perfusion cérébrale, conduisant à un défaut d'apport en oxygène et en glucose au tissu cérébral⁷. Cette défaillance énergétique va initier une cascade de réactions biochimiques entraînant dysfonctionnement cellulaire, stress oxydatif, et réaction inflammatoire inappropriée⁸.

Les études menées sur différents modèles précliniques d'EHl ont permis de schématiser la physiopathologie qui apparaît divisée en plusieurs phases successives⁹:

- La première résulte de la défaillance énergétique primaire qui a lieu dans les minutes qui suivent l'épisode ischémique initial. Durant cette phase, le tissu cérébral subit une déplétion brusque et rapide de glucose, d'ATP et de dioxygène déclenchant ainsi plusieurs dérèglements au niveau cellulaire¹⁰⁻¹² dont l'acidose (métabolisme anaérobie), la dépolarisation des membranes neuronales responsable d'une accumulation d'eau, de sodium et de calcium intracellulaire, puis d'un œdème cytotoxique, la libération et l'inhibition de la recapture de neurotransmetteurs excitateurs (excitotoxicité) et l'inhibition de synthèse protéique entraînant le tissu ischémié vers une nécrose cellulaire^{13, 14}.
- La restauration du débit sanguin cérébral définit une phase intermédiaire de reperfusion du tissu : on assiste à la récupération partielle du métabolisme oxydatif, responsable d'une production excessive de radicaux libres, d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et à une dysfonction mitochondriale¹⁵.
- Selon la sévérité de la phase primaire, une phase secondaire de défaillance énergétique se met en place plusieurs heures après l'accident ischémique. Cette phase est le siège de processus similaires à la première (défaillance du métabolisme oxydatif mitochondrial, production excessive de radicaux libres, inhibition de synthèse protéique, œdème cellulaire cytotoxique, accumulation d'acides aminés excitateurs)¹⁶ et entraîne ainsi l'extension de la lésion primaire par un mécanisme cette fois principalement apoptotique sans acidose tissulaire¹⁷⁻²⁰, entretenant ainsi un environnement inflammatoire dans cette zone et majorant la perte neuronale initiale. Cette neuro-inflammation est de plus en plus considérée comme une composante majeure de la physiopathologie, et implique la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les cellules ischémiées, l'activation de la microglie et des astrocytes ainsi que l'infiltration leucocytaire. C'est l'action synergique de ces différents éléments cellulaires qui est en cause dans l'aggravation des lésions cérébrales²¹.

Parallèlement à ces processus neurodégénératifs, une réponse physiologique régénérative est initiée, notamment neurogénique au niveau des zones germinatives du cerveau que sont la zone sous-ventriculaire et la zone sous-granulaire du gyrus

denté. Néanmoins, cette compensation ne permet pas de pallier à la perte cellulaire engendrée et n'aboutit pas à un réseau neuronal fonctionnel²².

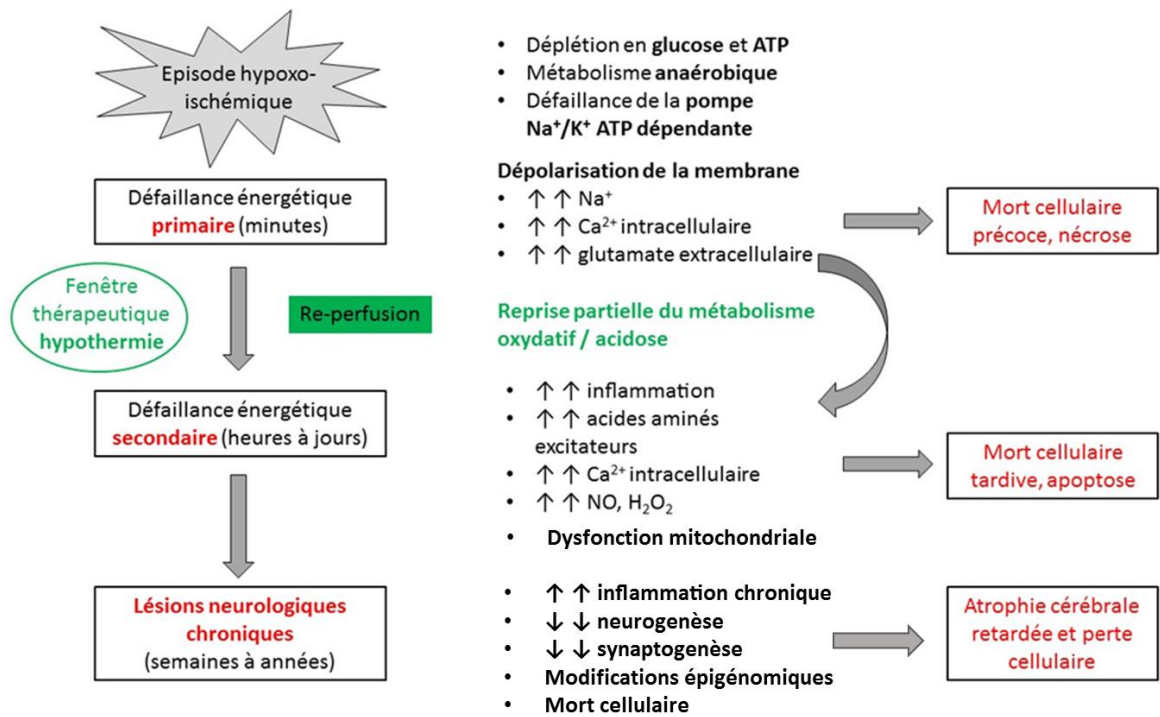


Figure 1 : Mécanismes physiopathologiques impliqués dans l'hypoxo-ischémie néonatale.

D'après Liao Y, Cotten M et al. 2013.

1.3 Diagnostic d'EHI néonatale

Le diagnostic d'EHI néonatale repose sur un faisceau d'arguments anamnestiques, cliniques et biologiques:

- **Anamnèse obstétricale** : existence d'un événement sentinelle (rupture utérine, procidence du cordon, hématome rétroplacentaire, accouchement dystocique, etc...) responsable de signes d'hypoxie fœtale (anomalies du rythme cardiaque fœtal, diminution de la saturation en oxygène de l'hémoglobine, pH sanguin diminué, émission anténatale de méconium)
- **Signes cliniques** : associant une mauvaise adaptation à la naissance évaluée par un score d'Apgar bas (annexe 1), des signes cliniques d'encéphalopathie classés par ordre de gravité selon la classification de Sarnat ²³ (annexe 2) :
 - Stade I « mineur » : caractérisé par une irritabilité, une hypertonie périphérique, avec préservation des réflexes archaïques.
 - Stade II « modéré » : léthargie, réflexes archaïques émoussés
 - Stade III « sévère » : marqué par un état comateux, une hypotonie axiale majeure, une abolition des réflexes archaïques, des mouvements anormaux (des clonies, mouvements de pédalage ou d'extension des membres) et abolition de la respiration.

Des convulsions focales intermittentes, voire un état de mal convulsif peuvent être notés dans les stades II et III. Ces crises surviennent de façon décalée par rapport à la naissance, le plus souvent dans les 24 premières heures.

- **Données biologiques** évocatrices d'asphyxie périnatale : acidose métabolique au sang du cordon ou dans la 1^{ère} heure de vie, hyperlactacidémie ^{24, 25}. De nombreux marqueurs de stress oxydatif et d'inflammation représentent des marqueurs potentiels du devenir neurologique à long terme et sont à l'étude : protéine S100, interleukine-1b, interleukine 6, serum creatine phosphokinase-brain specific (CK-BB), Lactate deshydrogenase (LDH) ²⁶⁻²⁹.
- **L'évaluation électro-encéphalographique**, basée sur les travaux d'Allest et al.³⁰ aide au diagnostic de gravité de l'encéphalopathie hypoxo-ischémique :
 - Dans le stade I : EEG normal ou subnormal

- Dans le stade II : tracé intermédiaire, continu de bas voltage (5-25 μ V), continu lent ou discontinu de type A (graphoéléments physiologiques) ou B (graphoéléments pathologiques), avec plus ou moins des crises électriques ou électro-cliniques
 - Dans le stade III : tracé très pathologique, de bas voltage avec rythme thêta, paroxystique ou périodique, voire inactif, d'amplitude < 5 μ V, avec plus ou moins des crises électriques ou électro-cliniques.
- **L'imagerie cérébrale** permet d'établir un bilan lésionnel. L'IRM cérébrale reste l'examen de référence dans la détection des lésions cérébrales post anoxiques ^{31, 32}.

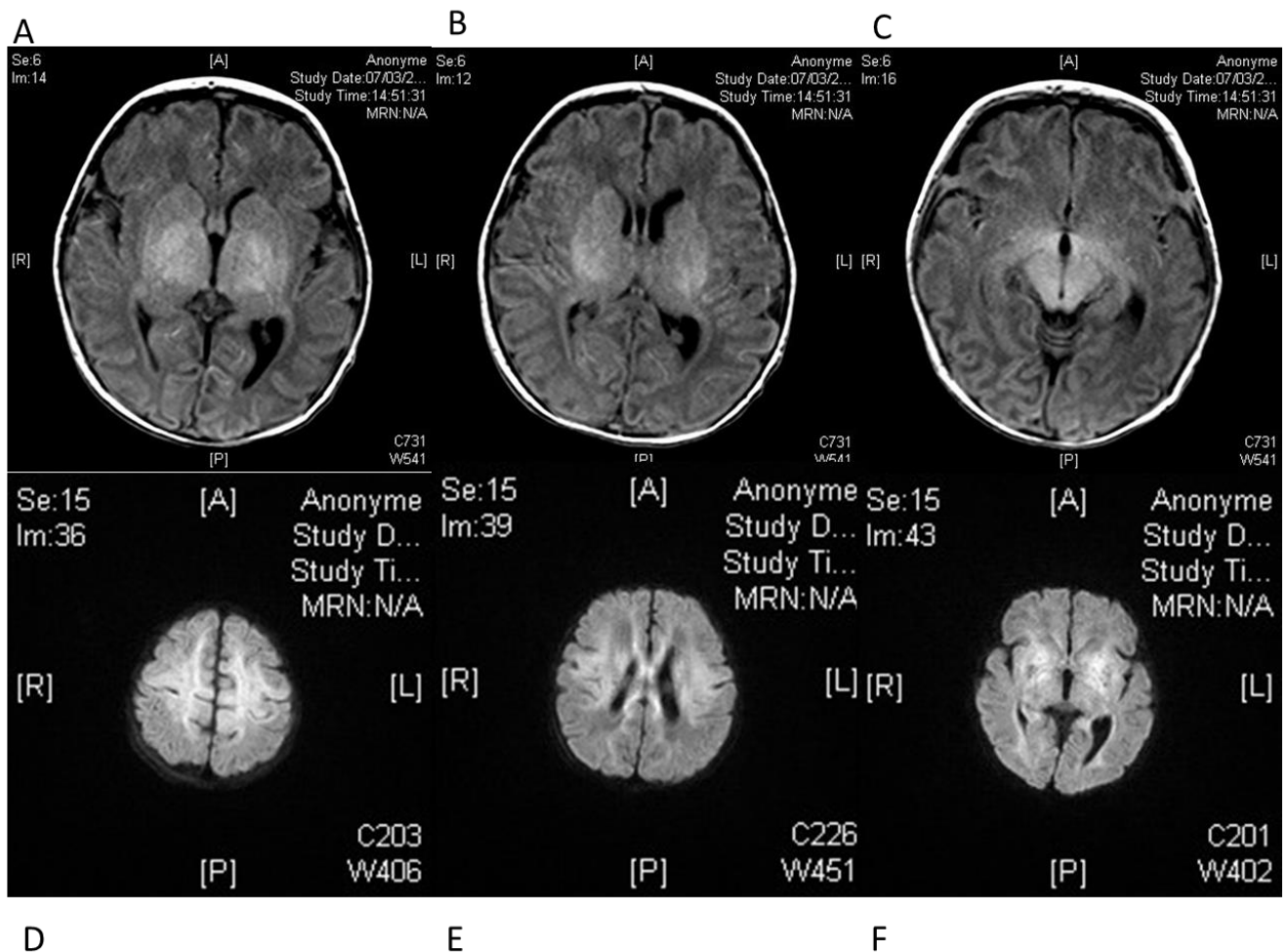


Figure 2. IRM cérébrale à J 5 de vie: lésions d'encéphalopathie hypoxo-ischémique sévère chez un nouveau-né à terme. A, B, C : séquence T1. D, E, F : séquence de diffusion.

Robertson et Perlman ont établi une cartographie des lésions cérébrales en fonction du mode de constitution de l'asphyxie périnatale, résumées dans le tableau ci-dessous³ :

Caractéristiques temporelles de l'asphyxie	Degré de l'asphyxie	Topographie des lésions en IRM	Nature des séquelles
Aiguë, quasi complète	Modérée	Ganglions de la base et thalami	Paralysie cérébrale athétoïde ou dystonique, fonctions cognitives intactes ou légèrement touchées
	Sévère ou prolongée	Ganglions de la base et thalami + atteinte du cortex	Quadriparésie spastique sévère Cécité corticale Microcéphalie Déficit cognitif
Prolongée et partielle	Modérée (exemple de l'insuffisance placentaire avec ralentissements tardifs)	Substance blanche sous corticale	Quadriplégie spastique Déficit cognitif variable
	Sévère	Atteinte corticale diffuse	Quadriplégie spastique Déficit cognitif sévère Microcéphalie Cécité corticale

Tableau 1. Cartographie des lésions cérébrales selon le type d'asphyxie périnatale.
D'après Robertson et al. Follow-up of the term infant after hypoxic-ischemic encephalopathy. Paediatr Child Health 2006;11:278-282.

De nombreuses études ont montré que l'IRM cérébrale, réalisée entre 5 jours et 14 jours post accident hypoxo-ischémique était utile mais non suffisante pour établir un pronostic neurologique³³.

1.4 Prise en charge actuelle de l'EHI

1.4.1 Prise en charge globale

La prise en charge des nouveau-nés atteints d'asphyxie périnatale débute dès la naissance et doit être réalisée par une équipe médicale expérimentée. Une des phases importantes de la prise en charge comporte des soins non spécifiques comportant notamment une ventilation mécanique, le maintien de la fonction hémodynamique, le maintien en euglycémie, le traitement symptomatique des défaillances d'organes, une nutrition artificielle et la limitation des stress douloureux^{24, 34}.

Un élément-clé de la réanimation d'un nouveau-né présentant une asphyxie périnatale est d'établir le plus précocement possible une ventilation efficace permettant la mise en place d'une capacité respiratoire fonctionnelle résiduelle et par la même une circulation sanguine efficace. Chez un nouveau-né déjà hypoxique, un délai au rétablissement de cette capacité fonctionnelle résiduelle pourrait aggraver les lésions ischémiques. La mise en place d'une ventilation assistée très précoce, avant même le clampage du cordon ombilical, a été étudiée chez l'agneau et a montré une amélioration de la perfusion cérébrale et du débit cardiaque³⁵. De plus amples recherches sont nécessaires pour déterminer d'éventuels bénéfices de la réanimation du nouveau-né présentant une asphyxie périnatale avec un cordon ombilical non clampé^{36, 37}.

1.4.2 Hypothermie thérapeutique

1.4.2.1 Généralités

Différents modèles animaux d'EHI chez le raton, le porcelet ou le fœtus d'agneau ont mis en évidence un effet neuroprotecteur de l'hypothermie³⁸⁻⁴⁰ en réduisant la température cérébrale de 2-3°C après un épisode asphyxique.

L'hypothermie thérapeutique débutée dans les premières heures de vie, durant la phase intermédiaire de reperfusion (fenêtre thérapeutique) est la principale innovation de ces dernières années dans le traitement de l'EHI^{11, 41}. Elle est recommandée par la Société Française de Néonatalogie depuis 2010²⁴. Des études cliniques randomisées ont montré que l'hypothermie thérapeutique réduit significativement le nombre combiné de décès et de handicaps majeurs et augmente la survie sans handicap à moyen terme⁴²⁻⁴⁶. Des études

récentes portant sur le devenir à long terme (7-8 ans) confirment les résultats bénéfiques mis en évidence à 18-24 mois⁴⁷⁻⁵⁰.

1.4.2.2 Recommandations actuelles

Des critères anamnestiques, cliniques et biologiques ont été définis et validés par la Société française de Néonatalogie²⁴ (annexe 3).

Les recommandations actuelles concernant la mise en hypothermie contrôlée sont :

- Début de refroidissement le plus tôt possible, avant 6 heures de vie
- Refroidissement global par un matelas
- Température centrale cible : 33.5-34°C
- Durée de 72 heures
- Réchauffement très progressif (0.2-0.4°C/h) jusqu'à 36-36.5°C

1.4.2.3 Mécanismes d'action

Un des modes d'action principal de l'hypothermie contrôlée est la réduction du métabolisme énergétique cérébral de 5 à 8% par degré centigrade⁵¹. D'autres effets neuroprotecteurs ont été mis en évidence dans les modèles animaux :

- diminution de la réaction inflammatoire, par diminution de la réaction microgliale et de la production de cytokines pro-inflammatoires
- réduction de la mort cellulaire par apoptose, par inhibition de l'activité de la caspase-3 activée
- diminution de l'excitotoxicité, par diminution de la production d'acides aminés excitateurs et des radicaux libres.

1.4.3 Nouvelles thérapeutiques

L'hypothermie contrôlée est actuellement le seul traitement ayant prouvé son efficacité. Un enfant sur 8 serait amélioré par cette thérapeutique, notamment en cas d'EHl modérée⁴⁶. Néanmoins, environ 25-30% des enfants ne répond pas favorablement à cette thérapeutique^{52, 53}. D'où la nécessité de développer d'autres stratégies neuroprotectrices à utiliser en synergie avec l'hypothermie.

Les principales thérapeutiques prometteuses aujourd'hui à l'étude sont présentées dans la figure 3; elles ciblent les différentes voies responsables de la neurotoxicité liée à l'hypoxo-ischémie cérébrale que sont la voie inflammatoire, le stress oxydatif, l'excitotoxicité par libération des acides aminés excitateurs. Le temps optimal d'administration de ces thérapeutiques, lié à leurs mécanismes d'actions est un paramètre important.

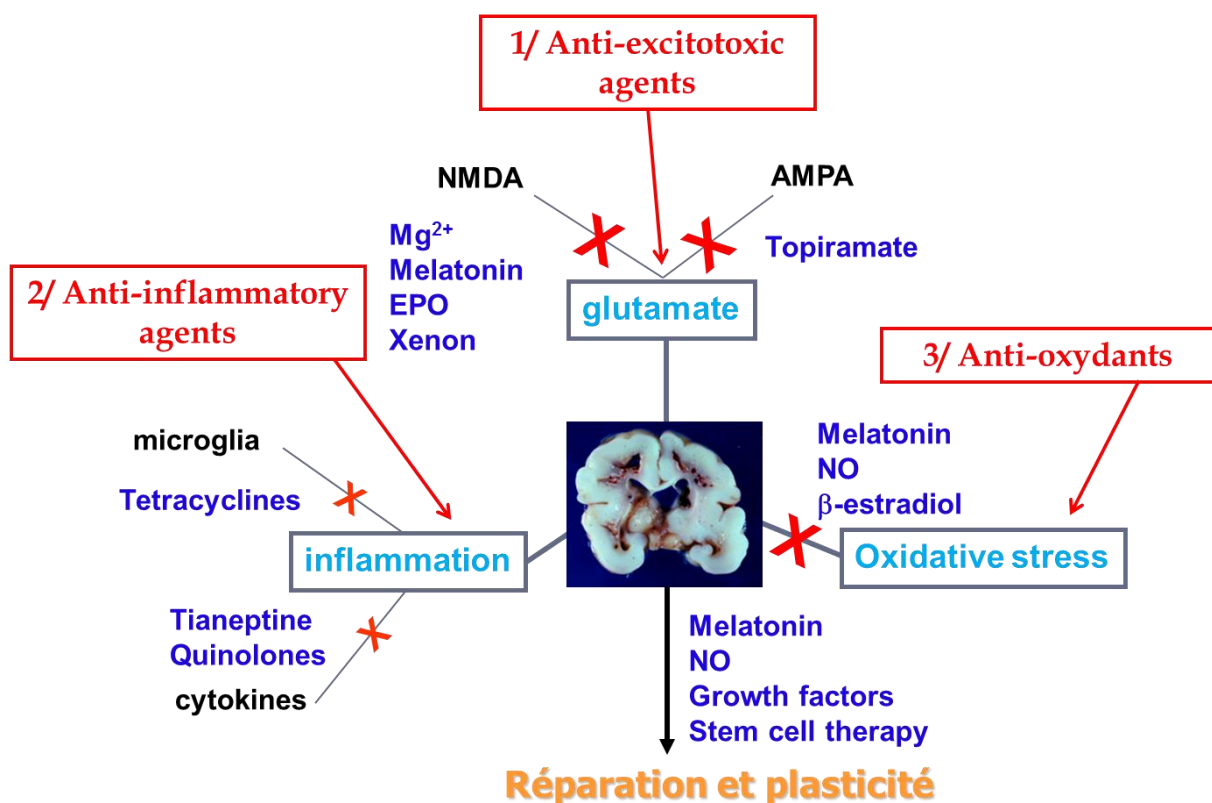


Figure 3. Stratégies thérapeutiques innovantes dans l'encéphalopathie hypoxo-ischémique néonatale

Un résumé des études cliniques et précliniques des principaux agents neuroprotecteurs est présenté dans le tableau 2.

Thérapie adjuvante	Mécanisme d'action	Etudes précliniques	Etudes cliniques randomisées
Mélatonine	Agent antioxydant et anti-apoptotique	Modèle d'AVC chez le rat adulte : réduction de 43% de la taille de l'infarctus avec Mélatonine ⁵⁴ Etude chez le porcelet : amélioration de la neuroprotection avec l'association Mélatonine forte dose + hypothermie versus hypothermie seule ⁵⁵	Oral Mélatonine (10 mg/kg/j, 5 doses). n=15 groupe mélatonine + hypothermie / n=15 groupe hypothermie seule. Amélioration du devenir combiné « survie sans séquelle neurodéveloppementale à 6 mois » (p<0.001) ⁵⁶
Erythropoïétine	Effet neurotrophique, antioxydant, anti-inflammatoire, anti-apoptotique Effet chronique : érythropoïèse, angiogenèse, neurogenèse	Modèle d'asphyxie (occlusion du cordon ombilical) chez le primate non humain : hypothermie + EPO améliore le devenir neurologique ⁵⁷	Etude NEAT ^{58, 59} Phase II : association hypothermie + EPO a montré un meilleur devenir à court terme et moins de lésions à l'IRM.
Allopurinol	Diminue production de radicaux libres ; à haute dose : chélateur du fer et capteur de radicaux libres	Porcelet avec EHI : allopurinol améliore les images obtenues en IRM et en spectroscopie au Phosphore, pas d'amélioration de l'inflammation ⁶⁰	Cochrane : besoin d'études supplémentaires.
Sulfate de Magnésium	Inhibiteur de l'excitotoxicité, en bloquant les neurotransmetteurs excitateurs (glutamate)	Modèle d'EHI chez le porcelet ⁶¹ : pas d'effet utilisé seul effet bénéfique en association avec hypothermie ⁶²	Méta-analyse ⁶² : besoin d'études supplémentaires.
Xenon	Antagoniste du NMDA, anti-apoptotique	Modèle d'EHI chez le porcelet : effet bénéfique de l'association Xenon+ hypothermie versus hypothermie seule ⁶³	TOBY-XE ⁶⁴ : pas d'effet bénéfique en association avec hypothermie

Tableau 2. Résumé d'études Expérimentales Et Cliniques De Thérapeutiques Neuroprotectrices Novatrices.

Parmi ces différentes pistes thérapeutiques, la thérapie cellulaire utilisant le sang de cordon représente une stratégie prometteuse en médecine régénérative, en raison des potentialités de ces cellules et de leur facilité d'obtention.

2. Cellules de sang de cordon et ischémie cérébrale

2.1 Contexte général

L'administration de cellules mononuclées issues du sang de cordon ombilical représente une des alternatives thérapeutiques prometteuses pour le traitement de l'encéphalopathie hypoxo-ischémique du nouveau-né. En plus d'être facilement disponible, ces cellules présentent un potentiel immunogène moins important que celui d'autres sources de cellules souches utilisées en thérapie cellulaire, telles que la moelle osseuse. Les cellules mononuclées issues du sang de cordon (Human Umbilical Cord Blood Cells, HUCBCs) sont d'ores et déjà utilisées dans le traitement de pathologies hématopoïétiques et immunologiques.

On distingue au sein des HUCBCs quatre populations de cellules souches utilisées dans les études expérimentales : les cellules souches hématopoïétiques, les cellules souches mésenchymateuses, les progéniteurs endothéliaux ainsi que d'autres cellules souches multipotentes ayant un potentiel de différenciation neuronale.

- *Progéniteurs hématopoïétiques :*

Exprimant les marqueurs, CD34, CD133, CD45, les progéniteurs hématopoïétiques représentent la population de progéniteurs majoritaire dans le sang de cordon, à l'origine des applications en thérapie cellulaire des pathologies onco-hématologiques ou immunitaires. La capacité de transdifférenciation de ces progéniteurs CD133+ en conditions de culture spécifique a été suggérée par la mise en évidence d'une upregulation de facteurs de transcription associés à la neurogenèse précoce mais est actuellement débattue^{65, 66}.

- *Cellules souches mésenchymateuses :*

A cote des progéniteurs hématopoïétiques, le sang de cordon contient une population de cellules souches multipotentes, représentée principalement par les cellules souches mésenchymateuses. Bien que présentes en quantité plus restreinte que dans la moelle osseuse, ces cellules souches mésenchymateuses possèdent une capacité de différenciation vers la lignée neurale documentée *in vitro* comme *in vivo*⁶⁷. Après

isolement à partir de la fraction cellulaire négative pour les marqueurs hématopoïétiques CD34 et CD45, ou la fraction Lin négative, et expansion *in vitro*, ces cellules se développent en cellules adhérentes caractérisées par l'expression de divers marqueurs tels que CD73, STRO1, CD13, CD29, CD44 et CD90, CD105. Ces cellules sont capables de se comporter comme des précurseurs de cellules de divers phénotypes : ostéoblastes, chondroblastes, adipocytes et cellules neurales. L'engagement de ces cellules vers une différenciation neurale dépend d'une culture en présence de divers morphogènes tels que l'acide rétinoïque et des facteurs de croissance tels que le NGF. Il est objectivé par l'acquisition de marqueurs de cellules gliales (GFAP), de marqueurs neuronaux (B3 tubulin) et l'acquisition de propriétés électrophysiologiques spécifiques^{68, 69}. De plus *in vivo*, ces cellules ont la capacité d'être recrutées par les tissus cérébraux après injection systémique et de s'engager dans la lignée astrocytaire et neuronale. Enfin, ces cellules sont caractérisées par la production de diverses cytokines et facteurs de croissance à l'origine d'un effet trophique puissant pouvant participer à un effet neuroprotecteur et neurorégénératif⁷⁰.

- *Progéniteurs endothéliaux* : ils font l'objet du prochain chapitre.

2.2 Particularité des progéniteurs endothéliaux

2.2.1 Définition des progéniteurs endothéliaux

Les progéniteurs endothéliaux circulants (EPCs) identifiés initialement par le groupe d'Asahara, sont définis comme une population hétérogène mais ayant en commun un haut potentiel prolifératif, l'expression de marqueurs endothéliaux mais aussi la capacité de se différencier *in situ* en cellules endothéliales et contribuer ainsi à la néovascularisation tant *in vitro* qu'*in vivo*⁷¹⁻⁷⁴. L'ontogénie de ces cellules n'est cependant que partiellement connue et leur identification, difficile, soumise à controverse.

Biologiquement, elles peuvent être définies par la présence de marqueurs d'immaturité, tels le CD133, et de marqueurs endothéliaux (CD34 et le récepteur 2 du VEGF (vascular growth factor)). Plusieurs autres marqueurs de la lignée endothéliale peuvent être retrouvés sur la cellule progénitrice endothéliale circulante comme le CD 131 (PECAM-1) et CD146, le facteur von Willebrand et l'eNOS (NO synthase endothéliale). Enfin, elles

expriment aussi le proto-oncogène c-kit, un récepteur de type kinase et CXCR4, un récepteur leucocytaire (LESTR), impliquées dans le recrutement, la migration et la prolifération des EPCS (tableau 3)

Marqueur	Cellules endothéliales circulantes (CECs)	Progéniteurs endothéliaux (EPCs)	Cellules souches hématopoïétiques (CSHs)
CD133	-	+	+
CD34	+	+	+
VEGFR-2	+	+	+
c-kit (CD117)	+	+	+
PECAM-1 (CD31)	+	+	-
CD144 (VE cadherine)	+	+	-
CD62-E (sélectine E)	+	+	-
CD45	-	-	+

Tableau 3. Marqueurs phénotypiques exprimés par les cellules endothéliales circulantes (CECs), les progéniteurs endothéliaux circulants (EPCs) et les cellules souches hématopoïétiques (CSHs). D'après Sabatier et al⁷⁵.

Les EPCs ont été identifiés et isolés à partir de la moelle osseuse⁷⁶⁻⁷⁸, du sang périphérique^{71, 79}, du sang de cordon ombilical humain⁸⁰⁻⁸⁴, du foie fœtal⁸⁵, et des adipocytes⁸⁶.

Les EPCs représentent moins de 1% de l'ensemble des cellules de la moelle osseuse, et 0.002 à 0.02% des cellules mononuclées du sang périphérique⁸⁷. De façon intéressante, cette population est présente dans le sang de cordon ombilical en quantité environ 10 à 30 fois supérieure à celle du sang périphérique adulte et présente un potentiel clonogénique très supérieur en rapport avec l'immaturité des cellules souches du sang du cordon⁷³.

De fait, différentes méthodes de culture permettant une production *in vitro* d'analogues des EPCs endogènes ont été décrites⁸⁸ aboutissant à deux grands types d'EPCs différents :

- Les EPCs dits « précoces » ou « myéloïdes », obtenus après 3 à 5 jours de culture à partir de cellules mononuclées du sang périphérique (PB-MNS) ou du sang de cordon ombilical, présentent un potentiel de prolifération limité et un phénotype associant des marqueurs endothéliaux et la persistance de marqueurs monocytes/macrophages⁸⁹.

- Les ECFCs (endothelial clonoy-forming cells), initialement appelés EPCs « tardifs » ou « late EPCs » : ce sont des cellules capables de former, après 2 à 3 semaines de culture à partir de sang total ou de sang de cordon ombilical⁸⁹, des colonies de cellules adhérentes à fort potentiel de prolifération, possédant une différenciation endothéliale complète et homogène et ayant la capacité de pouvoir s'intégrer dans des vaisseaux en cours de croissance et ainsi générer des structures vasculaires⁹⁰. Depuis 2008, les ECFCs sont considérés comme les « vrais » analogues in vitro des EPCs retrouvés dans le compartiment vasculaire^{91, 92}.

2.2.2 Rôle des EPCs

En condition de stress mécanique (cisaillement ou « shear stress ») ou d'hypoxie, les cellules endothéliales sécrètent de nombreux facteurs augmentant la perméabilité vasculaire et induisant la mobilisation d'EPCs, comme le VEGF-A, FGF-2, GM-CSF/G-CSF ou les angiopoïétines, SDF-1 et l'érythropoïétine^{89, 93, 94}.

VEGF-A agit via différents récepteurs membranaires (VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3) :

- VEGFR1 (Flt1) est responsable de la mobilisation des cellules hématopoïétiques et influence la migration cellulaire et la chimiotaxie.
- VEGFR2 (KDR) est responsable de la croissance et de la survie cellulaire, mais aussi de la perméabilité vasculaire.

La sécrétion de ces différents facteurs de croissance (notamment VEGF, angiopoïétine-1) va activer une protéine kinase Akt qui détient un rôle central dans l'angiogenèse. L'activation de la voie Akt induit la survie (effet anti-apoptotique), la prolifération et la migration des cellules endothéliales, mais aussi une augmentation de la production de monoxyde d'azote (NO) via une activation de la NO synthase endothéliale⁹⁵.

De façon synergique, la molécule SDF-1, via son récepteur CXCR4 participe au recrutement et à la mobilisation des EPCs vers la niche angiogénique^{96, 97}. Cet environnement angiogénique, maintenu par la sécrétion autocrine de facteurs angiogéniques (VEGF-A)⁸⁹ par la cellule progénitrice elle-même, va aboutir à la prolifération puis à la différenciation in situ des EPCs et, par des mécanismes d'interaction intercellulaire, à leur incorporation dans les néo-vaisseaux (vasculogenèse) mais surtout, par une régulation paracrine, au recrutement de cellules endothéliales locales et l'induction de l'angiogenèse⁹⁶⁻⁹⁹.

2.3 HUCBCs dans l'ischémie cérébrale

Les cellules mononuclées du sang de cordon ont fait l'objet de différentes études précliniques visant à évaluer leur effet bénéfique dans les modèles de lésions cérébrales^{100, 101}.

La situation la plus documentée est celle de l'ischémie cérébrale^{102, 103}, incluant des études chez le lapin, les macaques et les rongeurs. Le modèle le plus fréquemment utilisé est le modèle d'ischémie focale transitoire chez le rat adulte¹⁰⁴⁻¹¹⁴.

L'injection systémique d'HUCBCs à des rats après occlusion transitoire de l'artère cérébrale moyenne s'accompagne d'un bénéfice significatif sur la fonction neurologique objectivé par une amélioration de différents scores moteurs et somatosensoriels^{104, 107, 108}. Dans certaines études, les analyses histologiques révèlent la présence de cellules injectées dans les tissus cérébraux ischémiés attestant de leur capacité de recrutement ou « homing » et l'expression de marqueurs de différenciation neuronale et astrogliale^{105, 106, 109}. Cette thérapie cellulaire s'accompagne dans certaines études d'une réduction du volume de la zone infarctée et son bénéfice est relié de manière dose dépendante avec le nombre de cellules transplantées. Une réduction des manifestations inflammatoires et de la dégénérescence neuronale par apoptose a été également mise en évidence après injection de cellules du sang de cordon réalisée 48h après induction de l'ischémie témoignant de l'effet neuroprotecteur de ces cellules^{106, 108}.

Dans le cadre de l'hypoxo-ischémie cérébrale néonatale, la majorité des études animales sont basées sur le modèle de Rice et Vannucci chez le rongeur^{115, 116}, qui consiste en une occlusion unilatérale de l'artère carotide commune, suivie d'une phase d'hypoxie sévère à 8% d'oxygène. La majorité des études montrent une réduction de la zone infarctée, une amélioration significative des fonctions neuro-cognitives à court et moyen terme après administration d'HUCBCs¹¹⁷⁻¹²². Les variations de résultats chez certains auteurs^{123, 124} semblent être liées à des variations méthodologiques incluant les variations de doses, de voies d'administration ou encore du délai d'administration des HUCBCs par rapport à l'hypoxo-ischémie^{22, 121, 123, 124}. Cf. *Paragraphe 3, Article 1, Review*.

2.4 Mécanismes d'action

Le concept des niches neurovasculaires (figure 4):

De nombreuses études se sont focalisées sur la seule protection des neurones (concept de la neuroprotection directe) étant donné que cette population cellulaire a longtemps été considérée comme l'unité élémentaire de la neurotransmission. Cependant, ces dernières années ont vu naître de nouveaux concepts et acteurs, dont l'unité neurovasculaire. Il met en exergue des interactions dynamiques entre les cellules endothéliales du cerveau, les cellules gliales, les neurones ainsi que la matrice extracellulaire, permettant de mieux comprendre la physiopathologie des atteintes du système nerveux central et ainsi de révéler de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles. De ce fait, pour préserver un tissu cérébral fonctionnel, il ne suffit pas de protéger les cellules neuronales mais il est nécessaire d'agir sur l'ensemble des signaux régissant ce réseau neurovasculaire¹²⁵⁻¹²⁷. Le concept de niches neurovasculaires joue quant à lui un rôle crucial dans la régulation de la prolifération, la différenciation et la survie des progéniteurs neuronaux. Les astrocytes, représentant plus de la moitié des cellules du gyrus denté, et se trouvant en contact direct avec les cellules en prolifération et les vaisseaux sanguins, fournissent un support structurel ainsi que certains facteurs nécessaires à la neurogenèse.

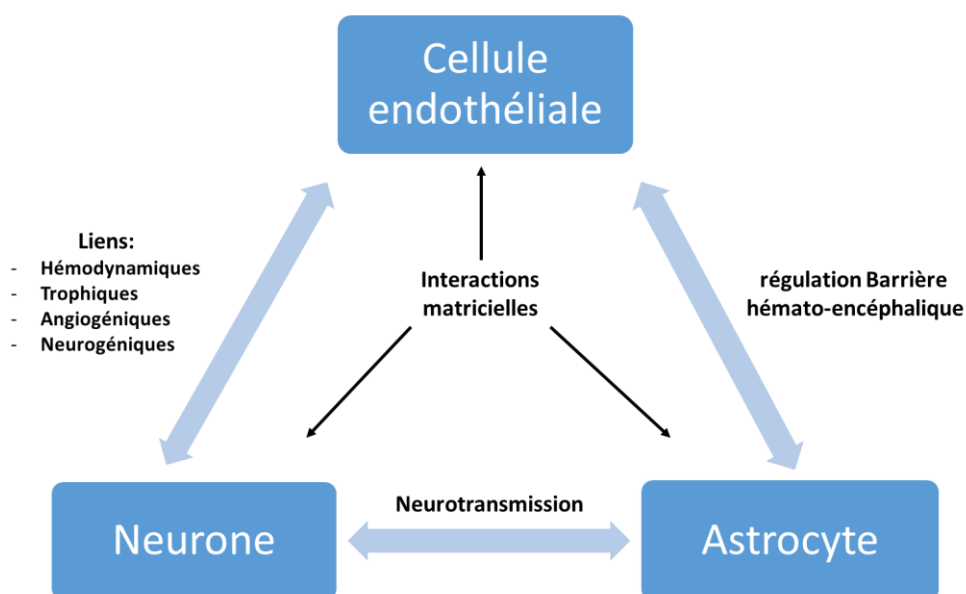


Figure 4. Schéma de la niche neurovasculaire, soulignant les aspects fonctionnels de l'interaction cellule-cellule et cellules-matrice D'après Lok et al¹²⁵..

Les cellules endothéliales produisent également des facteurs promoteurs de la neurogenèse et impliqués dans la différenciation, favorisant ainsi l'engagement des cellules en prolifération vers la lignée neuronale¹²⁸⁻¹³⁰. Les mécanismes sous-tendant l'impact bénéfique des cellules mononuclées du sang de cordon sur la récupération neurologique sont encore mal élucidés. En particulier, la contribution respective et spécifique des différentes populations de progéniteurs ou cellules souches est difficile à établir laissant penser qu'elles agissent de manière synergique sur l'amélioration des déficits neurologiques.

Ces mécanismes impliquent peut être le remplacement ou la régénération de cellules cérébrales, incluant neurones, astrocytes, et oligodendrocytes, qui dépend du potentiel de différenciation neurale des cellules transplantées. Les cellules telles que les cellules souches mésenchymateuses, et les cellules pluripotentes/multipotentes, capables de se comporter comme des progéniteurs neuronaux contribuent donc à l'effet thérapeutique observé : en effet, une étude menée par le groupe de Habich et al en 2006 démontre que l'injection intra carotidienne de cellules de sang de cordon dépletées en progéniteurs hématopoïétiques et différenciés *in vitro* vers un phénotype neural améliore les déficits neurologiques dans des modèles de lésions cérébrales chez le rat¹³¹. Néanmoins les observations expérimentales s'accordent sur le faible nombre de cellules transplantées effectivement et durablement présentes dans les tissus lésés suggérant que d'autres mécanismes complémentaires entrent en jeu. Parmi ceux-ci, il est démontré que les cellules du sang de cordon exercent une action paracrine liée à la production de substances régulatrices de la survie neuronale et gliale en particulier de facteurs neurotrophiques tels que le BDNF, GDNF, NGF, Neurotrophin 3, Neurotrophin 4-5. En effet le niveau d'expression de ces molécules dans les tissus cérébraux augmente après infusion systémique de cellules de sang de cordon dans les modèles expérimentaux d'ischémie cérébrale¹³². De plus, l'effet angiogénique et la régénération endothéliale, partie intégrante de l'unité neurovasculaire, dépendant des progéniteurs endothéliaux du sang de cordon semblent contribuer significativement à l'effet thérapeutique.

Il a été montré que cette réponse angiogénique induite par les progéniteurs endothéliaux fournit une niche vasculaire favorable non seulement à la survie des neurones mais également aux processus de neurogenèse endogène¹³³.

Les modèles de transplantation développés par notre laboratoire et d'autres équipes, et utilisant des préparations purifiées ou enrichies en progéniteurs endothéliaux du sang de

cordon au cours de l'ischémie cérébrale, ont mis en évidence une participation des cellules transplantées à la réparation des cellules endothéliales cérébrales et à la stimulation des processus de néovascularisation ^{112-114, 134, 135}.

L'ensemble de ces travaux ont été réalisés sur des modèles expérimentaux chez l'animal adulte, et ainsi les effets et les potentialités thérapeutiques des ECFCs n'avaient, avant ce travail, pas encore été étudiés dans le modèle d'encéphalopathie hypoxo-ischémique néonatale.

3. Article :

“Umbilical cord blood cells and neonatal hypoxo-ischemic encephalopathy: potential role of endothelial colony-forming cells?”

L'objectif de ce travail était de pouvoir apporter un état de l'art sur l'évaluation des effets neuroprotecteurs des HUCBCs dans le modèle néonatal d'encéphalopathie hypoxo-ischémique chez le rat, ainsi qu'une description des potentiels mécanismes ces cellules. Nous avons ensuite réalisé une revue de la littérature concernant les effets protecteurs et angiogéniques des ECFCs dans les modèles d'ischémie chez le rat adulte, et notamment dans l'ischémie cérébrale adulte par occlusion transitoire de l'artère cérébrale moyenne. Nous avons ainsi discuté du rôle potentiel de la réparation vasculaire par les ECFCs dans le modèle néonatal d'hypoxo-ischémie cérébrale. Enfin, nous avons discuté du lien possible entre les études expérimentales et les études cliniques en cours et à venir sur l'encéphalopathie hypoxo-ischémique néonatale.

Umbilical cord blood cells in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy: potential role of endothelial colony-forming cells?

Isabelle Grandvullemin^{1,2}, Clotilde Des Robert², Julie Veran⁵, Florence Sabatier^{1,5},
Philippe Garrigue^{1,3,4}, Benjamin Guillet^{1,3,4}, Farid Boubred^{1,2}

¹ Aix Marseille Univ, INSERM, VRCM, UMR_S1076, UFR de Pharmacie, Marseille, 13385, France

² APHM, CHU La Conception, Department of Neonatology, Marseille, 13385, France

³ APHM, Radiopharmacy, Marseille, 13385, France

⁴ Aix Marseille Univ, CERIMED, Marseille, 13385, France

⁵ APHM, CHU La Conception, Cell Culture and Therapy Laboratory, INSERM CBT-1409
Marseille, 13385, France

Corresponding author: Isabelle Grandvullemin

Isabelle.grandvullemin@ap-hm.fr

1- INTRODUCTION

Neonatal hypoxic ischemic encephalopathy (NHIE) is a major cause of death worldwide and of long term neurological disorders including learning disabilities, cerebral palsy or epilepsy¹⁻³. NHIE occurs in 1 to 3 per 1000 live full-term births. Perinatal events associated with NHIE include in many cases umbilical cord occlusion or prolapse, placental abruption and obstructed labor, but many cases remain unexplained. The pathophysiological mechanism leading to brain injury is complex. Therapeutic hypothermia associated with symptomatic treatment are commonly proposed in such a situation⁴⁻⁹. However a recent meta-analysis have shown a limited effect of hypothermia on death and neurological disorders at 18 -24 months¹⁰. Novel and additional therapies including cell therapy are currently developed to better limit brain damage and to improve long term neurologic functions. Among them, cell therapy using umbilical cord blood cells transplantation may represent a promising therapy for both. We focused our review on the human umbilical cord blood mononuclear cells (HUCBCs) and their endothelial progenitor's fraction as valuable candidate for cell therapy in NHIE.

2- HUMAN UMBILICAL CORD BLOOD CELLS

Human umbilical cord blood (HUCB) contains a number of stem, progenitor and immunosuppressive cells which have potential repair activity¹¹. The HUCB mononuclear

cells fraction contains four stem cells populations: hematopoietic stem cells, mesenchymal stem cells, endothelial progenitors and pluripotent cells.

Hematopoietic stem cells (HSCs) are the source of most blood cell lineages. The hematopoietic cell markers are CD34, CD45 and CD133. Therapeutic effects of HSCs transplantation are used in hematopoietic and immune diseases¹². Recent studies indicate that human cord blood-derived CD133 hematopoietic stem cells can trans-differentiate into neural cell types of neuron-like cells, astrocytes, and oligodendrocytes after retinoic acid or nerve growth factor treatment¹³⁻¹⁵.

Mesenchymal stem cells (MSCs) derived from cord blood have been shown to generate neural stem cells in vitro¹⁶ leading to functional improvement in rodent models of perinatal brain injury^{17, 18}. However, isolation of MSCs from umbilical cord blood is difficult¹⁹ because of a small number of MSCs circulating in the UCB^{18, 20}.

Endothelial progenitor cells (EPCs) represent a small fraction of the blood mononuclear cell population enriched for the stem marker CD34²¹. First described in blood by Asahara et al²², EPCs are immature cells which derive from bone marrow. They have the capacity to proliferate, migrate, and home to sites of neovascularization. They also differentiate into mature endothelial cells in situ²³. EPCs play a critical role in vascular repair and new blood vessels formation.

Pluripotent stem cells: several studies showed that umbilical cord blood contains embryonic-like stem cells (ESCs) which have a potential of neural differentiation^{24, 25}.

Umbilical cord blood contains also immunosuppressive cells and monocytes which can contribute to neuroprotective effect of HUCBCs¹¹. Regulatory T-cells regulate immune

response. A single injection of HUCB-T cells has been shown to promote proliferation of neural progenitor cells and neuronal survival in rodents²⁶.

3- HUCBCs AND NEONATAL HYPOXIC ISCHEMIC ENCEPHALOPATHY

Animal neonatal models of HIE have been developed in rabbits²⁷, newborn macacas^{28, 29} and rodents³⁰⁻³². The most used model is a variation of the Rice-Vannucci rat model of neonatal HIE, involving unilateral ligation of the common carotid artery followed by a systemic hypoxia induced by inhalation of 8% oxygen/balance nitrogen³⁰⁻³². This procedure is conducted in the 7-day-old pups (P7), which correspond to cortical maturity of near-term and term gestation in humans³⁰⁻³⁴. In this model, the damage is usually restricted to the cerebral ipsilateral hemisphere and concerns cerebral cortex, the subcortical and periventricular white matter, the striatum/thalamus and the hippocampus³². Meier et al. were first to report intraperitoneal HUCBCs administration (1.10^7 HUCBCs) 24 hours after cerebral hypoxia-ischemia (HI) in 7 day-old rat pups³⁵. They showed a reduction of spastic paresis as assessed by footprint and walking analysis. Migration of these cells to the damaged brain region was observed as early as 3 days and up to two weeks after administration. Even if effective, these cells did not show any markers of neural transdifferentiation³⁵. Number following experimental studies confirmed such beneficial effects with various amplitude (**table 1**). Using *in vivo* electrophysiological methodology, the same authors found that 1.10^7 HUCBCs administration 24 hours after injury significantly preserved somatosensory function³⁶. Yasuhara et al. reported that delayed intravenously injection of a low dose (1.5×10^4) of HUCBCs, performed 7 days after cerebral HI, significantly improved motor asymmetry and motor coordination 7 and 14

days after HI. Only a few cells were found in the damaged brain, suggesting a paracrine role of the transplanted cells by increased levels of neural growth factor (NGF), glial cell line derived neurotrophic factor (GDNF) and brain derived neurotrophic factor (BDNF)³⁷. Additionally, these authors showed that co-treatment with Mannitol in neonatal HIE enhanced the therapeutic benefits of HUCB grafts by permeating the Blood Brain Barrier, thereby improving cell brain homing and increasing the CNS levels of GDNF, NGF and BDNF³⁷.

We recently performed a mutliparametric (neurological scoring, histology, cerebral blood perfusion imaging) and long term study up to 2 month after HI, and demonstrated that intraperitoneal injection of 1.10^7 HUCBCs 48h after injury limited cellular apoptosis, microglial and astrocytic reaction, restored cerebral capillary density and improved neuronal cell survival³⁸. We used metabolic imaging of brain perfusion using SPECT/CT and observed a total restoration of long term cerebral blood flow perfusion after HUCBC administration.

One can question the validity of this model and the translation of these findings to human since this model is a postnatal acute cerebral HI (7 days after birth) and it uses exogenic HUCBCs. Interestingly, in a model of perinatal asphyxia after cord blood clamping in lambs, Aridas et al. have demonstrated similar neuroprotective effect of autologous UCBCs³⁹. These late findings validate results from rodents 'experiments.

4- ENDOTHELIAL PROGENITOR CELLS AND NEONATAL HIE

Endothelial progenitor cells (EPCs), represent a small fraction of the HUCB mononuclear cells (0.1-0.2%) ²¹. They are produced in bone marrow and hematopoietic organs during

fetal period and participate to vasculogenesis/angiogenesis and vascular endothelial function and integrity^{40, 41}. A hierarchical definition of EPCs has been established according to their phenotype and functional properties^{42, 43}. The first population, called colony-forming unit endothelial cells forms colonies that appear early in culture, display endothelial markers, but do not form vessels *in vivo*^{43, 44}. The second, called endothelial colony-forming cells (ECFCs) with high proliferative potential, also considered as “late EPC” give rise to colonies 7 to 21 days after plating. ECFCs display an endothelial phenotype, form clonogenic cell clusters, and have the capacity to incorporate into new blood vessels in immunodeficient mice^{21, 45-47}. Cord blood ECFC levels and clonogenic activities are higher than adult peripheral blood ECFCs^{21, 45-47}.

These cells play a critical role in vascular repair and tissue recovery by promoting neovascularization. Their production and blood availability are stimulated after ischemic events. Both the number and the functional activity of EPCs are inversely correlated with cardiovascular and metabolic severity diseases; they can be used as a prognostic marker of cardiovascular diseases as well⁴⁸⁻⁵².

In vivo, ECFCs have been shown to promote angiogenesis, and muscular regeneration in mouse after hind limb ischemia^{53, 54}. In a recent study using an adult rat model of transient middle cerebral artery occlusion (MCAO), we demonstrated that ECFCs injected 24 h after MCAO significantly settled in the injured area and improved functional recovery, reduced ischemia-induced apoptosis and potentiated ischemia-induced angiogenesis and neurogenesis, restored blood brain barrier (BBB) integrity and cerebral blood flow⁵⁵⁻⁵⁷. These beneficial effects are markedly enhanced after *in vitro* pretreatment with erythropoietin^{53, 55}.

The effects of endothelial progenitor cells administration after neonatal cerebral HI have little been investigated. We recently investigate for the first time the role of ECFCs in the neonatal model of cerebral hypoxic-ischemic injury and observed similar neuro-protective effects than HUCBCS³⁸. Based on behavioral tests, immune-histological assessment and metabolic imaging of brain perfusion using SPECT, we observed that ECFCs administration 48h after HI injury significantly prevented cellular apoptosis, microglial and astrocytic overreaction, restored cerebral capillary density, improved neuronal cell survival and long-term neurologic functions at 12 weeks of age. ECFCs also cerebral blood flow as assessed by SPECT-CT imaging³⁸. These results support the role of angiogenesis in the tissue repair after hypoxic-ischemic injury. Our findings confirmed results from Kidani et al. who found neuroprotective effects of HUCB-derived CD133+ cells on neonatal mouse hypoxic-ischemic encephalopathy model⁵⁸.

5. POTENTIAL MECHANISMS OF HUCBCs IN NEONATAL HI INJURY

The mechanisms of neuroprotective effects of HUCBCs administration after neonatal cerebral HI injury are unclear. It is now recognized that these neuroprotective effects result from paracrine/neurotrophic pathway rather than from engraft process⁵⁹⁻⁶¹. HUCBCs administration is associated with reduced apoptosis, oxidative stress, inflammation, and enhanced neovascularization and functional regeneration (**figure 1**). Pimentel-Coelho et al. demonstrated that intraperitoneal injection of $2 \cdot 10^6$ HUCBCs 3 hours after HI in P7 rats improved sensorimotor reflexes initially impaired by hypoxic-ischemic injury, with only few cells found in the damaged brain 2 days after engraftment, suggesting acute anti-apoptotic and anti-inflammatory effects of cells grafts due to transient cytokines or growth

factor release from HUCBCs. Indeed, HUCB transplantation protected from activated caspase-3-dependent cell death and reduced microglial activation in different regions of the cerebral cortex⁵⁹. Rosenkranz et al. demonstrated that the homing of HUCBCs in the damaged brain depends on the expression of the chemokine stromal-derived factor-1 (SDF-1). Indeed, 2 and 14 days after hypoxic-ischemic injury, expression of SDF-1 was found significantly increased in lesioned brain hemispheres and was mainly associated with astrocytes and transplanted HUCB cells expressing the SDF-1 receptor CXCR4 migrated to the lesion site⁶⁰. As a proof of concept, inhibition of SDF-1 by application of neutralizing antibodies in vivo resulted in a significantly reduced number of HUCB cells settled at the lesioned area. More recently, the same team reported that intraperitoneal injection of 1.10^7 HUCBCs 24 hours after HI was associated with the decline in harmful processes of the secondary phase after the insult, with a reduction in lesion-induced apoptosis, determined by expression of cleaved caspase-3, and with an increased number of vital neurons. Furthermore, even if transient, HUCBC transplantation-induced increases in neurotrophic (BDNF) and pro-angiogenic (VEGF, Tie-2 protein and Occludin) factors within the lesion, initiate and promote long term regenerative processes such as angiogenesis⁶¹. Furthermore, HUCBCs can produce positive effects on glial cells (protection of mature oligodendrocytes and astrocytes from hypoxia)^{62, 63}.

Neuroprotective effect of ECFCs are summarized in figure 2. In hypoxic conditions, ECFCs have the potency of secreting several growth factors (VEGF, SDF-1, PDGF, HGF) which allow proliferation, migration of ECFCs, recruitment and activation of resident endothelial cells, promoting angiogenesis⁶⁴⁻⁶⁶. ECFCs have also the ability to improve

neurogenesis by releasing neurotrophic factors (VEGF, BDNF, HGF)⁶⁷. All these capabilities lead to the protection of the neurovascular unit^{68, 69}.

5- VARIABLES TO BE CLARIFIED IN EXPERIMENTAL CELL TRANSPLANTATION

Thus, according previous reports, the beneficial effects of HUCBC transplantation on preclinical models of HI seems to be demonstrated. However, it remains necessary to determine the optimal treatment conditions in order to evaluate them in patients and several aspects of cell therapy need to be clarified, including timing of transplantation after injury, mode of administration, cellular type, and dosage.

Which administration route?

Peripherally administered HUCBCs could be trapped or migrate in other organs such as the spleen or the lungs⁷⁰. In adult models of cerebral hypoxia-ischemia, intra-arterial delivery bypasses the peripheral filtering organs, leading to higher cell engraftment to the brain⁷¹, and greater efficacy^{72, 73} compared to intravenous infusion. Intra-arterial delivery is poorly documented in HI neonatal models.

In fact, in those models, intraperitoneal, intravenous or intracerebral injections¹⁷ has been mainly evaluated. Greggio et al. in 2016 used for the first time intra-arterial transplantation of 1.10^6 or 1.10^7 HUCBC 24h after HI injury in a model of neonatal hypoxic-ischemic insult. These authors reported significantly dose-dependently improved learning and long-term spatial memory impairments at 9 weeks after injury. Cellular migration to the injured brain hemisphere was studied, and human cells were found as early as 3 and 6 hours post-

transplantation and at 7 and 30 days later⁷⁴. However protective effects and the number of engrafted cells was not compared with other systemic injections (intravenous or intraperitoneal).

How many cells to administer?

De Paula et al. demonstrated that intravenously HUCBCs transplantation improved in a dose dependent manner spatial memory and brain morphological changes. High dose (10^8 cells) of HUCBCs in comparison of low dose (1.10^6) significantly attenuated HI-induced spatial memory impairment 8 weeks after the treatment. Furthermore, medium dose (10^7 cells) and transplantation of high-doses of cells provided significant brain damage repair after hypoxic-ischemic injury⁷⁵.

When performing cells administration?

Unlike rat model with myocardial infarction⁷⁶, no study described the optimal time for cell injection in the rat model of neonatal HI. Effects of HUCBC transplantation have been observed in all these studies with various timing of administration from 3 h up to 2 days after injury. Pimentel-coelho et al. described a region-specific effect of HUCBC administration 3 hours after injury⁵⁹. It would be easily extrapolated that earliest transplantation might be the most effective, but this hypothesis has to be balanced since, recently, Hattori et al. observed that an early injection of HUCBC (6h after HI injury) even if was associated with a transient reduction in numbers of apoptosis and oxidative stress marker-positive cells, did not induce long-term morphological or functional protection⁷⁷. In contrast, we reported that HUCBC administration 2 days after HI induced long term recovery³⁸. It can be thought that a delay after the onset of HI is more suitable when the brain microenvironment has entered the stage regeneration.

6. CLINICAL STUDIES

In clinical practice, cord blood has been used for 20 years to treat more than 80 serious and various diseases. The first study using autologous umbilical cord cells in newborn, at Duke University, has been recently published. Cotten et al. tested the feasibility and safety of autologous umbilical cord blood cells on acute neonatal hypoxic ischemic encephalopathy⁷⁸. Twenty three newborns born after 35 weeks of gestation and meeting criteria of cooling, received non-cryopreserved autologous UCB cells, along with concurrent whole body cooling. They received between $1 \cdot 10^7$ to $5 \cdot 10^7$ cells per kilogram per dose at 24, 48 and 72 postnatal hours after anti-inflammatory pretreatment. The authors concluded that collection, preparation and intravenous infusion of fresh autologous volume and red-reduced cord blood cells was feasible and safe. To date, others studies using autologous umbilical cord blood cells in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy are in progress in Singapore (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01649648), in Japan (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT025256618), and in China (NCT 02551003). A French multicenter clinical trial is ongoing (NEOSTEM, NCT02881970)

Autologous HUCBCs administration seems feasible and safe. Other studies are needed to determine the efficacy of such a strategy on improving death and neurological disorders related to NHIE. Further studies are still required to investigate the impact of perinatal asphyxia on HUCBCs functions and to investigate ways to improve cells functions.

7. CONCLUSION

Neonatal hypoxic ischemic encephalopathy is a rare but dramatic perinatal complication due to brain asphyxia. Neurological and neurosensory sequelae are frequent in survivors, due to neuronal damage and loss. For the moment, only total or partial body hypothermia can partially prevent death/long term neurological disabilities. However, no treatment exists to restore neuronal functions.

Cord blood stem cells are a promising treatment for the near future. Experimental studies revealed sufficient data on safety and efficacy and the particular role of endothelial progenitor cells. The time has come for clinical trials which are essential to evaluate the safety, feasibility and efficacy of autologous cell therapy in neonatal asphyxia. A considerable amount of research is still needed to confirm preliminary results, and optimize the administration route, the timing, dosing and the methods of cells preservation for secondary administration.

Bibliography

1. Dixon G, Badawi N, Kurinczuk JJ, Keogh JM, Silburn SR, Zubrick SR, et al. Early developmental outcomes after newborn encephalopathy. *Pediatrics*. 2002;109:26-33
2. Robertson CM, Finer NN, Grace MG. School performance of survivors of neonatal encephalopathy associated with birth asphyxia at term. *J Pediatr*. 1989;114:753-760
3. Shankaran S, Woldt E, Koepke T, Bedard MP, Nandy R. Acute neonatal morbidity and long-term central nervous system sequelae of perinatal asphyxia in term infants. *Early Hum Dev*. 1991;25:135-148
4. Gluckman PD, Wyatt JS, Azzopardi D, Ballard R, Edwards AD, Ferriero DM, et al. Selective head cooling with mild systemic hypothermia after neonatal encephalopathy: Multicentre randomised trial. *Lancet*. 2005;365:663-670
5. Jacobs SE, Berg M, Hunt R, Tarnow-Mordi WO, Inder TE, Davis PG. Cooling for newborns with hypoxic ischaemic encephalopathy. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013;CD003311
6. Jacobs SE, Morley CJ, Inder TE, Stewart MJ, Smith KR, McNamara PJ, et al. Whole-body hypothermia for term and near-term newborns with hypoxic-ischemic encephalopathy: A randomized controlled trial. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2011;165:692-700
7. Azzopardi D, Strohm B, Edwards AD, Halliday H, Juszczak E, Levene M, et al. Treatment of asphyxiated newborns with moderate hypothermia in routine clinical practice: How cooling is managed in the uk outside a clinical trial. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2009;94:F260-264
8. Azzopardi DV, Strohm B, Edwards AD, Dyet L, Halliday HL, Juszczak E, et al. Moderate hypothermia to treat perinatal asphyxial encephalopathy. *N Engl J Med*. 2009;361:1349-1358
9. Shankaran S, Laptook AR, Ehrenkranz RA, Tyson JE, McDonald SA, Donovan EF, et al. Whole-body hypothermia for neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy. *N Engl J Med*. 2005;353:1574-1584
10. Azzopardi D, Strohm B, Marlow N, Brocklehurst P, Deierl A, Eddama O, et al. Effects of hypothermia for perinatal asphyxia on childhood outcomes. *N Engl J Med*. 2014;371:140-149
11. Tolar J, Hippen KL, Blazar BR. Immune regulatory cells in umbilical cord blood: T regulatory cells and mesenchymal stromal cells. *Br J Haematol*. 2009;147:200-206
12. Rogers I, Casper RF. Umbilical cord blood stem cells. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2004;18:893-908
13. Jang YK, Park JJ, Lee MC, Yoon BH, Yang YS, Yang SE, et al. Retinoic acid-mediated induction of neurons and glial cells from human umbilical cord-derived hematopoietic stem cells. *J Neurosci Res*. 2004;75:573-584
14. Nikolova T, Wu M, Brumbarov K, Alt R, Opitz H, Boheler KR, et al. Wnt-conditioned media differentially affect the proliferation and differentiation of cord blood-derived cd133+ cells in vitro. *Differentiation*. 2007;75:100-111
15. Sanchez-Ramos JR, Song S, Kamath SG, Zigova T, Willing A, Cardozo-Pelaez F, et al. Expression of neural markers in human umbilical cord blood. *Exp Neurol*. 2001;171:109-115
16. Fu YS, Shih YT, Cheng YC, Min MY. Transformation of human umbilical mesenchymal cells into neurons in vitro. *J Biomed Sci*. 2004;11:652-660
17. Xia G, Hong X, Chen X, Lan F, Zhang G, Liao L. Intracerebral transplantation of mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord blood alleviates hypoxic ischemic brain injury in rat neonates. *J Perinat Med*. 2010;38:215-221

18. Kaneko Y, Tajiri N, Su TP, Wang Y, Borlongan CV. Combination treatment of hypothermia and mesenchymal stromal cells amplifies neuroprotection in primary rat neurons exposed to hypoxic-ischemic-like injury in vitro: Role of the opioid system. *PLoS One*. 2012;7:e47583
19. Secco M, Zucconi E, Vieira NM, Fogaça LL, Cerqueira A, Carvalho MD, et al. Multipotent stem cells from umbilical cord: Cord is richer than blood! *Stem Cells*. 2008;26:146-150
20. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*. 2006;24:1294-1301
21. Ingram DA, Mead LE, Tanaka H, Meade V, Fenoglio A, Mortell K, et al. Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood*. 2004;104:2752-2760
22. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997;275:964-967
23. Kawamoto A, Asahara T. Role of progenitor endothelial cells in cardiovascular disease and upcoming therapies. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2007;70:477-484
24. McGuckin C, Jurga M, Ali H, Strbad M, Forraz N. Culture of embryonic-like stem cells from human umbilical cord blood and onward differentiation to neural cells in vitro. *Nat Protoc*. 2008;3:1046-1055
25. McGuckin CP, Forraz N, Baradez MO, Navran S, Zhao J, Urban R, et al. Production of stem cells with embryonic characteristics from human umbilical cord blood. *Cell Prolif*. 2005;38:245-255
26. Shahaduzzaman M, Golden JE, Green S, Gronda AE, Adrien E, Ahmed A, et al. A single administration of human umbilical cord blood t cells produces long-lasting effects in the aging hippocampus. *Age (Dordr)*. 2013;35:2071-2087
27. Tan S, Drobyshesky A, Jilling T, Ji X, Ullman LM, Englof I, et al. Model of cerebral palsy in the perinatal rabbit. *J Child Neurol*. 2005;20:972-979
28. Jacobson Misbe EN, Richards TL, McPherson RJ, Burbacher TM, Juul SE. Perinatal asphyxia in a nonhuman primate model. *Dev Neurosci*. 2011;33:210-221
29. Juul SE, Aylward E, Richards T, McPherson RJ, Kuratani J, Burbacher TM. Prenatal cord clamping in newborn macaca nemestrina: A model of perinatal asphyxia. *Dev Neurosci*. 2007;29:311-320
30. Rice JE, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol*. 1981;9:131-141
31. Vannucci RC, Connor JR, Mauger DT, Palmer C, Smith MB, Towfighi J, et al. Rat model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *J Neurosci Res*. 1999;55:158-163
32. Vannucci SJ, Hagberg H. Hypoxia-ischemia in the immature brain. *J Exp Biol*. 2004;207:3149-3154
33. Clancy F. Stem cell research. Hope ... Hype? Hard work. *Minn Med*. 2001;84:25-29
34. Semple BD, Blomgren K, Gimlin K, Ferriero DM, Noble-Haeusslein LJ. Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Prog Neurobiol*. 2013;106-107:1-16
35. Meier C, Middelani J, Wasielewski B, Neuheff S, Roth-Haerer A, Gantert M, et al. Spastic paresis after perinatal brain damage in rats is reduced by human cord blood mononuclear cells. *Pediatr Res*. 2006;59:244-249
36. Geissler M, Dinse HR, Neuheff S, Kreikemeier K, Meier C. Human umbilical cord blood cells restore brain damage induced changes in rat somatosensory cortex. *PLoS One*. 2011;6:e20194
37. Yasuhara T, Hara K, Maki M, Xu L, Yu G, Ali MM, et al. Mannitol facilitates neurotrophic factor up-regulation and behavioural recovery in neonatal hypoxic-ischaemic rats with human umbilical cord blood grafts. *J Cell Mol Med*. 2010;14:914-921

38. Grandvuillemin I, Garrigue P, Ramdani A, Boubred F, Simeoni U, Dignat-George F, et al. Long-term recovery after endothelial colony-forming cells or human umbilical cord blood cells administration in a rat model of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Stem Cells Transl Med.* 2017
39. Aridas JD, McDonald CA, Paton MC, Yawno T, Sutherland AE, Nitsos I, et al. Cord blood mononuclear cells prevent neuronal apoptosis in response to perinatal asphyxia in the newborn lamb. *J Physiol.* 2016;594:1421-1435
40. Dignat-George F, Sampol J, Lip G, Blann AD. Circulating endothelial cells: Realities and promises in vascular disorders. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2003;33:495-499
41. Sabatier F, Lacroix R, Camoin-Jau L, Anfosso F, Sampol J, Dignat-George F. [circulating endothelial cells, microparticles and progenitors: Towards the definition of vascular competence]. *Rev Med Interne.* 2011;32:54-63
42. Prater DN, Case J, Ingram DA, Yoder MC. Working hypothesis to redefine endothelial progenitor cells. *Leukemia.* 2007;21:1141-1149
43. Yoder MC, Mead LE, Prater D, Krier TR, Mroueh KN, Li F, et al. Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. *Blood.* 2007;109:1801-1809
44. Purhonen S, Palm J, Rossi D, Kaskenpää N, Rajantie I, Ylä-Herttuala S, et al. Bone marrow-derived circulating endothelial precursors do not contribute to vascular endothelium and are not needed for tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105:6620-6625
45. Tasev D, Konijnenberg LS, Amado-Azevedo J, van Wijhe MH, Koolwijk P, van Hinsbergh VW. Cd34 expression modulates tube-forming capacity and barrier properties of peripheral blood-derived endothelial colony-forming cells (ecfcs). *Angiogenesis.* 2016;19:325-338
46. Tasev D, Koolwijk P, van Hinsbergh VW. Therapeutic potential of human-derived endothelial colony-forming cells in animal models. *Tissue Eng Part B Rev.* 2016;22:371-382
47. Yoder MC, Ingram DA. Endothelial progenitor cell: Ongoing controversy for defining these cells and their role in neoangiogenesis in the murine system. *Curr Opin Hematol.* 2009;16:269-273
48. Chen JZ, Zhang FR, Tao QM, Wang XX, Zhu JH. Number and activity of endothelial progenitor cells from peripheral blood in patients with hypercholesterolaemia. *Clin Sci (Lond).* 2004;107:273-280
49. Kim YS, Park EH, Kim YC, Koh YG. Clinical outcomes of mesenchymal stem cell injection with arthroscopic treatment in older patients with osteochondral lesions of the talus. *Am J Sports Med.* 2013;41:1090-1099
50. Lambiase PD, Edwards RJ, Anthopoulos P, Rahman S, Meng YG, Bucknall CA, et al. Circulating humoral factors and endothelial progenitor cells in patients with differing coronary collateral support. *Circulation.* 2004;109:2986-2992
51. Tepper OM, Galiano RD, Capla JM, Kalka C, Gagne PJ, Jacobowitz GR, et al. Human endothelial progenitor cells from type ii diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. *Circulation.* 2002;106:2781-2786
52. Murphy C, Kanaganayagam GS, Jiang B, Chowienzyk PJ, Zbinden R, Saha M, et al. Vascular dysfunction and reduced circulating endothelial progenitor cells in young healthy uk south asian men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:936-942
53. Bennis Y, Sarlon-Bartoli G, Guillet B, Lucas L, Pellegrini L, Velly L, et al. Priming of late endothelial progenitor cells with erythropoietin before transplantation requires the cd131 receptor subunit and enhances their angiogenic potential. *J Thromb Haemost.* 2012;10:1914-1928

54. Hur J, Yoon CH, Kim HS, Choi JH, Kang HJ, Hwang KK, et al. Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovasclogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:288-293
55. Garrigue P, Hache G, Bennis Y, Brige P, Stalin J, Pellegrini L, et al. Epo pretreatment of ecfcs enhances functional recovery after transplantation in a rat model of cerebral ischemia through an increase of their homing abilities: A spect/ct study. *J Nucl Med.* 2016
56. Moubarik C, Guillet B, Youssef B, Codaccioni JL, Piercecchi MD, Sabatier F, et al. Transplanted late outgrowth endothelial progenitor cells as cell therapy product for stroke. *Stem Cell Rev.* 2011;7:208-220
57. Pellegrini L, Bennis Y, Guillet B, Velly L, Garrigue P, Sabatier F, et al. Therapeutic benefit of a combined strategy using erythropoietin and endothelial progenitor cells after transient focal cerebral ischemia in rats. *Neurol Res.* 2013;35:937-947
58. Kidani Y, Miki Y, Nomimura N, Minakawa S, Tanaka N, Miyoshi H, et al. The therapeutic effect of cd133(+) cells derived from human umbilical cord blood on neonatal mouse hypoxic-ischemic encephalopathy model. *Life Sci.* 2016;157:108-115
59. Pimentel-Coelho PM, Magalhães ES, Lopes LM, deAzevedo LC, Santiago MF, Mendez-Otero R. Human cord blood transplantation in a neonatal rat model of hypoxic-ischemic brain damage: Functional outcome related to neuroprotection in the striatum. *Stem Cells Dev.* 2010;19:351-358
60. Rosenkranz K, Kumbruch S, Lebermann K, Marschner K, Jensen A, Dermietzel R, et al. The chemokine sdf-1/cxcl12 contributes to the 'homing' of umbilical cord blood cells to a hypoxic-ischemic lesion in the rat brain. *J Neurosci Res.* 2010;88:1223-1233
61. Rosenkranz K, Kumbruch S, Tenbusch M, Marcus K, Marschner K, Dermietzel R, et al. Transplantation of human umbilical cord blood cells mediated beneficial effects on apoptosis, angiogenesis and neuronal survival after hypoxic-ischemic brain injury in rats. *Cell Tissue Res.* 2012;348:429-438
62. Jiang L, Womble T, Saporta S, Chen N, Sanberg CD, Sanberg PR, et al. Human umbilical cord blood cells decrease microglial survival in vitro. *Stem Cells Dev.* 2010;19:221-228
63. Villapol S, Gelot A, Renolleau S, Charriaut-Marlangue C. Astrocyte responses after neonatal ischemia: The yin and the yang. *Neuroscientist.* 2008;14:339-344
64. Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med.* 2003;9:685-693
65. Krenning G, van Luyn MJ, Harmsen MC. Endothelial progenitor cell-based neovascularization: Implications for therapy. *Trends Mol Med.* 2009;15:180-189
66. Otrock ZK, Mahfouz RA, Makarem JA, Shamseddine AI. Understanding the biology of angiogenesis: Review of the most important molecular mechanisms. *Blood Cells Mol Dis.* 2007;39:212-220
67. Zhao YH, Yuan B, Chen J, Feng DH, Zhao B, Qin C, et al. Endothelial progenitor cells: Therapeutic perspective for ischemic stroke. *CNS Neurosci Ther.* 2013;19:67-75
68. Ohab JJ, Fleming S, Blesch A, Carmichael ST. A neurovascular niche for neurogenesis after stroke. *J Neurosci.* 2006;26:13007-13016
69. Wang J, Chen Y, Yang Y, Xiao X, Chen S, Zhang C, et al. Endothelial progenitor cells and neural progenitor cells synergistically protect cerebral endothelial cells from hypoxia/reoxygenation-induced injury via activating the pi3k/akt pathway. *Mol Brain.* 2016;9:12
70. Fischer UM, Harting MT, Jimenez F, Monzon-Posadas WO, Xue H, Savitz SI, et al. Pulmonary passage is a major obstacle for intravenous stem cell delivery: The pulmonary first-pass effect. *Stem Cells Dev.* 2009;18:683-692
71. Li L, Jiang Q, Ding G, Zhang L, Zhang ZG, Li Q, et al. Effects of administration route on migration and distribution of neural progenitor cells transplanted into rats with focal cerebral ischemia, an mri study. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2010;30:653-662

72. Kamiya N, Ueda M, Igarashi H, Nishiyama Y, Suda S, Inaba T, et al. Intra-arterial transplantation of bone marrow mononuclear cells immediately after reperfusion decreases brain injury after focal ischemia in rats. *Life Sci.* 2008;83:433-437
73. Pendharkar AV, Chua JY, Andres RH, Wang N, Gaeta X, Wang H, et al. Biodistribution of neural stem cells after intravascular therapy for hypoxic-ischemia. *Stroke.* 2010;41:2064-2070
74. Greggio S, de Paula S, Azevedo PN, Venturin GT, Dacosta JC. Intra-arterial transplantation of human umbilical cord blood mononuclear cells in neonatal hypoxic-ischemic rats. *Life Sci.* 2014;96:33-39
75. de Paula S, Greggio S, Marinowic DR, Machado DC, DaCosta JC. The dose-response effect of acute intravenous transplantation of human umbilical cord blood cells on brain damage and spatial memory deficits in neonatal hypoxia-ischemia. *Neuroscience.* 2012;210:431-441
76. Xing YL, Shen LH, Li HW, Zhang YC, Zhao L, Zhao SM, et al. Optimal time for human umbilical cord blood cell transplantation in rats with myocardial infarction. *Chin Med J (Engl).* 2009;122:2833-2839
77. Hattori T, Sato Y, Kondo T, Ichinohashi Y, Sugiyama Y, Yamamoto M, et al. Administration of umbilical cord blood cells transiently decreased hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Dev Neurosci.* 2015;37:95-104
78. Cotten CM, Murtha AP, Goldberg RN, Grotegut CA, Smith PB, Goldstein RF, et al. Feasibility of autologous cord blood cells for infants with hypoxic-ischemic encephalopathy. *J Pediatr.* 2014;164:973-979 e971

Table 1. HUCBCs administration after neonatal cerebral hypoxia-ischemia: experimental studies.

<i>Animal model, Age</i>	<i>Duration of hypoxia</i>	<i>Dose, Route, timing of administration</i>	<i>Functional outcomes (behavioral tests)</i>	<i>Cellular and molecular assays</i>	<i>Engraftment</i>	<i>References</i>
Wistar rats, P7	80 min	1 x 10 ⁷ HUCBCs; intraperitoneal 24 h after HI	Reduced spastic paresis (Foot print analysis, 14 days after injection)	-	Many cells in the lesioned hemisphere, confined to the area of activated microglia (at 3 days and 21 days after injection)	<i>Meier et al, Ped Research 2006</i>
Wistar rats, P7	120 min	1 x 10 ⁷ HUCBCs; Intravenous (jugular vein) 24 h after HI	No effect on spatial memory deficit (Morris water maze, Open field activity, Cylinder rearing test, Grid walking test Tapered/ ledged beam walking test), 21 days after HI	No effect in volume of injured hemisphere, 21 days after HI	Few cells located in both ipsilateral and controlateral hemisphere, 24 hours, 7 days and 3 weeks after HI	<i>De Paula et al, Ped Research 2009</i>
Lister-Hooded rats, P7	90 min	2 x 10 ⁶ HUCBCs; intraperitoneal 3 h after HI	Improved performance of neonatal reflexes (cliff aversion and negative geotaxis) 4 days but not at 7 days after HI	Decreased neuronal cell death in the ipsilateral striatum. Decreased microglial activation in the cortex. No effect in the infarct size.	Few cells in the ischemic cortex and striatum (2 days after injection)	<i>Pimentel-Coelho et al, Stem Cell Dev 2010</i>
Sprague-Dawley rats, P7	150 min	1.5 x 10 ⁴ HUCBCs +/- Mannitol Intravenous (jugular vein) 7 days after HI	20-25% improvement of motor outcome (Rotarod test, Elevate body swing test) 7 and 14 days post injection of HUCBC with or without Mannitol	Increased growth factors in brain tissues (GDNF, BDNF, and NGF) 3 days after injection, with upregulation with Mannitol	Few cells in ipsilateral hippocampus, 14 days after injection. No difference in the number of cells with or without Mannitol	<i>Yasuhara et al, J Cell Mol Med 2010</i>

<i>Animal model, Age</i>	<i>Duration of hypoxia</i>	<i>Dose, site, timing of administration</i>	<i>Functional outcomes (behavioral tests)</i>	<i>Cellular and molecular assays</i>	<i>Engraftment</i>	<i>References</i>
Wistar rats, P7	80 min	1 x 10 ⁷ HUCBCs Intraperitoneal 24 h after HI	Recovery of the cortical maps size and receptive fields (footprint analysis, cylinder test) 40 days post injection	No change in size of brain atrophy	Many cells in peri-infarct area, 41 days after injection	<i>Geissler et al, PlosOne 2011</i>
Sprague-Dawley, P7	90 min	1 x 10 ⁷ HUCBCs +Ciclosporine A Intravenous (jugular vein) 24 h after HI	Improved behavioral performances (Cylinder test, Basic motor test, Passive avoidance test, Forced swim test, Light/dark exploration)	Increased microglial activation in the striatum, 7 days after HI, Increased protection of mature neurons in the neocortex ten weeks after HI	Many cells in the ipsilateral periventricular striatum, 7 days but not 3 weeks after HI	<i>Bae et al, Cell Transplant 2012</i>
Wistar rats, P7	80 min	1 x 10 ⁷ HUCBCs Intraperitoneal 24 h after HI	-	Improvement of angiogenesis (increased expression Tie-2, occluding) Reduction in apoptosis (reduced expression of cleaved caspase-3) Increase in neuronal survival (NeuN) Increase in neurotrophic and pro-angiogenic growth factors (BDNF, VEGF) in the lesioned hemisphere	-	<i>Rosenkranz et al, Cell Tissue Res 2012</i>
Wistar rats, P7	80 min	1 x 10 ⁷ HUCBCs Intraperitoneal 24 h after HI	Improved motor function (forelimb use bias, muscle strength and distal spasticity) both short- and long-term	Decreased activation of microglia/macrophages and reactive astrogliosis, and reduced peri-lesional astrocytic wall Down regulation of Connexion 43	HUCBCs localized in astrocyte-rich zone	<i>Wasielowski et al, Brain Res 2012</i>
Sprague-Dawley, P7	90 min	1 x 10 ⁷ HUCBCs or 5 x 10 ⁵ ECFCs Intraperitoneal 48 h after HI	Early and sustained Improvement behavioral performances (morris water maze, elevated plus maze, novel object recognition test) up to 8 weeks post HI Same results with HUCBCs and ECFCs	Normalization of injured hemisphere cerebral blood flow (SPECT/CT) Decreased in apoptosis and microglia activation (TUNEL, iNOS) 7 days post HI. Improved neuronal survival (NeuN) 7 days and 12 weeks post HI decrease of delayed astrogliosis (GFAP) 12 weeks post HI Improved cerebral capillary density (eNOS) at 7 days and 12 weeks post HI	-	<i>Grandvuillemin et al, Stem Cells Transl Med 2017</i>

Figure 1. Neuroprotective effects of HUCBCs administration.

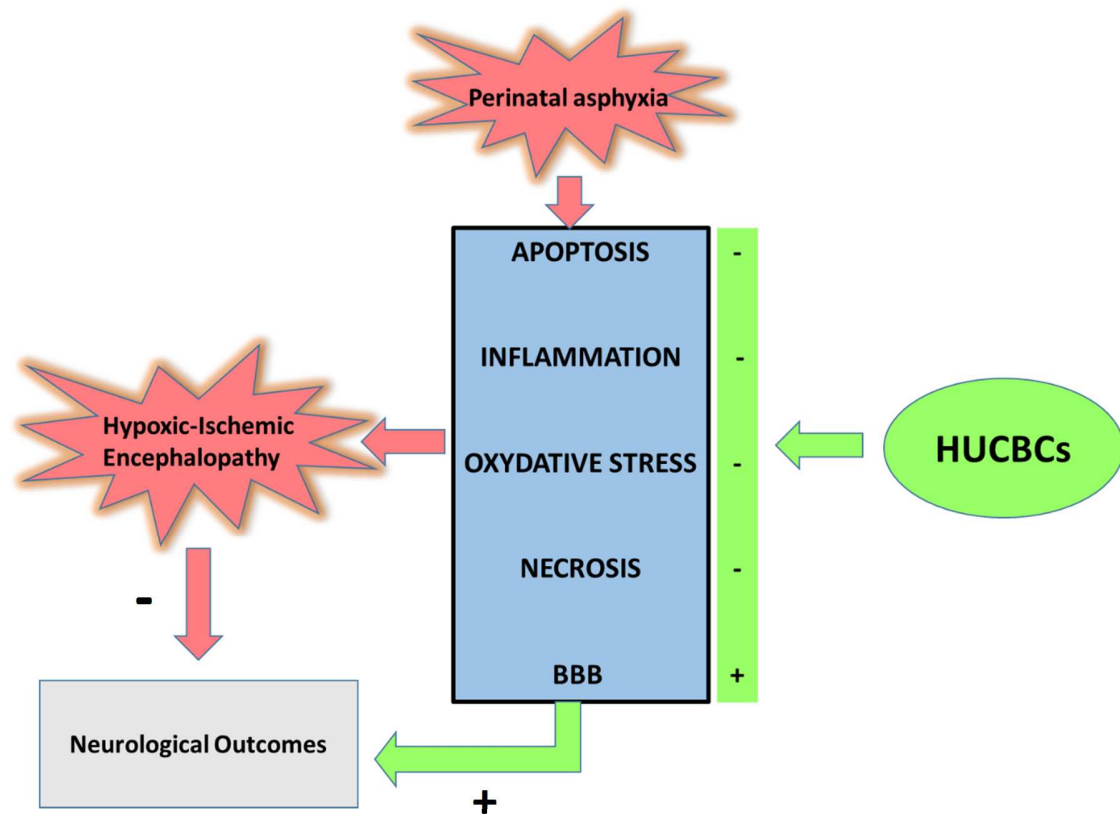
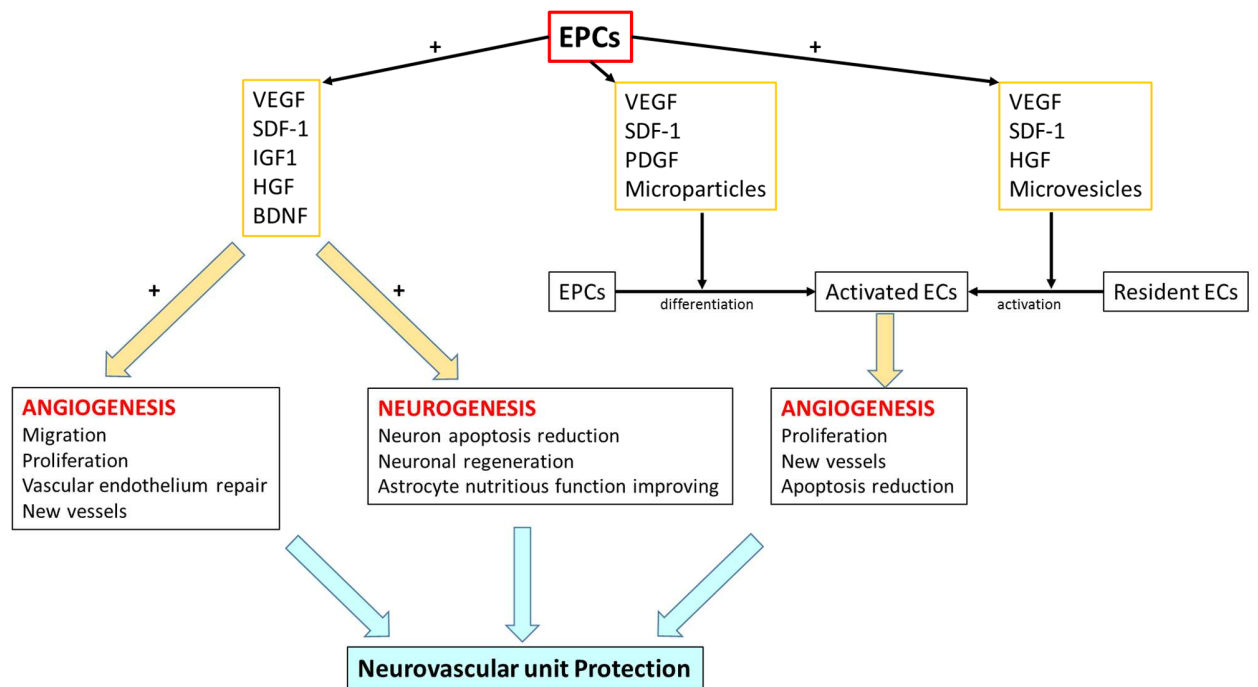


Figure 2. The effects of EPCs on neurogenesis, angiogenesis and neurovascular unit protection.

EPCs: endothelial progenitor cells. ECs: endothelial cells. VEGF: vascular endothelial growth factor. SDF-1: stromal cell-derived factor-1. HGF: hepatocyte growth factor. BDNF: brain-derived neurotrophic factor. PDGF: platelet-derived growth factor



B. TRAVAIL EXPERIMENTAL

“Long-term recovery after endothelial-colony forming cells or human umbilical cord blood cells”

L'hypoxo-ischémie cérébrale néonatale représente une des principales causes de mortalité et de morbidité chez les nouveau-nés. Sa physiopathologie est complexe et implique différents processus délétères menant vers la perte neuronale par apoptose et responsables de déficits sensori-moteurs et cognitifs.

Des travaux antérieurs ont rapporté une amélioration des scores neuro-comportementaux dans le modèle expérimental de cette pathologie par administration systémique de cellules humaines mononuclées issues de sang de cordon ombilical (HUCBCs). Cependant, une autre population de cellules souches, les progéniteurs endothéliaux circulants (ECFCs) semblent également représenter une alternative thérapeutique prometteuse dans le traitement de l'ischémie cérébrale et n'ont pas encore été évalués.

Le but de cette étude a été d'évaluer et de comparer les effets bénéfiques potentiels des ECFCs et HUCBCs par une évaluation longitudinale neuro-comportementale complète associée à une évaluation des mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans le modèle d'hypoxo-ischémie néonatale selon Rice-Vanucci et ce à court (7 jours après l'épisode ischémique) et à long terme (12 semaines après l'épisode ischémique).

La première étape de ce travail a été de mettre en place et valider le modèle d'hypoxo-ischémie chez le raton, selon le modèle de Rice et Vannucci, au sein de notre laboratoire (VRCM, UMR_S 1076 AMU).

La deuxième étape a été de réaliser un ensemble d'évaluations neuro-comportementales, validées dans la littérature et permettant une analyse complète des déficits et de la récupération neurologique clinique des animaux, dans les apprentissages de mémorisation, dans l'évaluation de l'anxiété et ce juste après l'accident hypoxo-ischémique, mais également chez le rat adulte, afin d'évaluer les effets de l'hypoxo-ischémie et de la thérapie cellulaire à long terme.

La troisième étape a consisté à réaliser des analyses immunohistochimiques évaluant les effets de ces deux types cellulaires à l'échelle tissulaire, notamment sur l'apoptose, l'inflammation, la survie neuronale et la néovascularisation.

Parallèlement à ces études fonctionnelles et histologiques, nous avons réalisé une analyse par imagerie fonctionnelle isotopique microSPECT (tomographie par émission monophotonique), permettant d'évaluer la perfusion cérébrale *in vivo* reflétant ainsi la viabilité tissulaire et l'activité cérébrale. Cette technique est basée sur la détection par une gamma-caméra de la captation d'un radiotracer au niveau cérébral, captation proportionnelle à la perfusion tissulaire. Cette technique est associée à un micro-CT (Scanner) apportant à l'image anatomique, qui après reconstruction des données, peut être fusionnée à l'image scintigraphique tomographique.

Nous avons montré, après injection intrapéritonéale à la fois d'ECFCs ou d'HUCBCs, 2 jours après l'accident hypoxo-ischémique:

- une récupération des capacités de mémorisation précoce et tardive des animaux
- une diminution des comportements anxieux.

A l'échelle tissulaire :

- une augmentation de la survie neuronale
- une réduction de l'astroglie réactionnelle.
- nous avons également mis en évidence une diminution de l'activité de la microglie pro-inflammatoire, 7 jours après l'accident hypoxo-ischémique après administration d'ECFCs ou d'HUCBCs.
- enfin, cette étude a montré que l'administration d'ECFCs ou d'HUCBCs permettait une restauration de la perfusion cérébrale des animaux à l'âge adulte par imagerie SPECT/CT.

Les ECFCs et les HUCBCs exercent ainsi un effet bénéfique sur l'unité neuro-vasculaire et la composante inflammatoire. Il s'agit de la première étude évaluant les effets des ECFCs dans ce modèle d'hypoxo-ischémie néonatale.

Les résultats de cette étude ouvrent ainsi de nouvelles perspectives pour l'usage des ECFCs dans le traitement de l'HI néonatale. Cependant, la facilité d'obtention et le caractère autologue des HUCBCs et leur caractère autologue font de ce type cellulaire le candidat idéal comme thérapie cellulaire dans l'encéphalopathie hypoxo-ischémique néonatale.



Long-Term Recovery After Endothelial Colony-Forming Cells or Human Umbilical Cord Blood Cells Administration in a Rat Model of Neonatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy

^aAix Marseille Univ, INSERM, VRCM, UMR_1076, UFR de Pharmacie, ^dCERIMED, Aix Marseille Univ, Marseille, France; ^bAPHM, CHU La Conception, Department of Neonatology, Marseille, France; ^cAPHM, Radiopharmacy, Marseille, France; ^eDivision of Pediatrics, CHUV & University of Lausanne, Switzerland; ^fAPHM, CHU La Conception, Cell Culture and Therapy Laboratory, INSERM CBT-1409, Marseille, France

Correspondence: Guillet Benjamin, Ph.D., Pharm.D., Faculté de Pharmacie, Laboratoire de Pharmacodynamie, 27 Boulevard Jean-Moulin, 13385 Marseille Cedex 05, France. Telephone: (33) 04 91 83 56 41; Fax: (33) 04 91 80 29 24; e-mail: benjamin.guillet@univ-amu.fr

Received March 30, 2017; accepted for publication July 26, 2017

<http://dx.doi.org/10.1002/sctm.17-0074>

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

ISABELLE GRANDVUILLEMIN ^{a,b} PHILIPPE GARRIGUE,^{a,c,d} ALAA RAMDANI,^a FARID BOUBRED,^{a,b} UMBERTO SIMEONI,^e FRANÇOISE DIGNAT-GEORGE,^a FLORENCE SABATIER,^{a,f} BENJAMIN GUILLET^{a,c,d}

Key Words. Human umbilical cord blood cells • Endothelial colony-forming cells • Neonatal hypoxic ischemic encephalopathy • Single photon emission computed tomography • Rat model

ABSTRACT

Neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy (NHIE) is a dramatic perinatal complication, associated with poor neurological prognosis despite neuroprotection by therapeutic hypothermia, in the absence of an available curative therapy. We evaluated and compared ready-to-use human umbilical cord blood cells (HUCBC) and bankable but allogeneic endothelial progenitors (ECFC) as cell therapy candidate for NHIE. We compared benefits of HUCBC and ECFC transplantation 48 hours after injury in male rat NHIE model, based on the Rice-Vannucci approach. Based on behavioral tests, immune-histological assessment and metabolic imaging of brain perfusion using single photon emission computed tomography (SPECT), HUCBC, or ECFC administration provided equally early and sustained functional benefits, up to 8 weeks after injury. These results were associated with total normalization of injured hemisphere cerebral blood flow assessed by SPECT/CT imaging. In conclusion, even if ECFC represent an efficient candidate, HUCBC autologous criteria and easier availability make them the ideal candidate for hypoxic-ischemic cell therapy. *STEM CELLS TRANSLATIONAL MEDICINE* 2017;00:000–000

SIGNIFICANCE STATEMENT

Neonatal hypoxic ischemic encephalopathy is a dramatic perinatal complication. Neurological and neurosensory sequelae are frequent in survivors, including motor or learning disabilities, cerebral palsy, or epilepsy. Facing the absence of effective curative therapy, many hopes have been credited in cell therapy strategies. Based on behavioral tests, immune-histological assessment and metabolic imaging of brain perfusion using single photon emission computed tomography, we report in this work that cell transplantation of both human umbilical cord blood cells and endothelial progenitors provided equally early and sustained functional benefits, up to adulthood.

INTRODUCTION

Neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy (NHIE) is a dramatic consequence of perinatal asphyxia, causing neonatal mortality and severe morbidity including cerebral palsy, sensory sequelae, epilepsy, cognitive impairment, and learning disabilities. Cerebral hypoxia-ischemia (HI) induces a cascade of events including inflammation, excitotoxic amino acids release, and oxidative stress, leading to cell and neuronal apoptosis and tissue necrosis. Therapeutic hypothermia proposed in severe NHIE has shown beneficial, but limited neuroprotective effects [1–3]. Additional therapeutic strategies are under investigation.

Experimental studies using autologous or heterologous human umbilical cord blood cells (HUCBC) or mesenchymal stem cells demonstrated neuroprotective effects in NHIE models [4–7]. The mechanisms of their effects have been shown to involve paracrine and growth factors release, rather than engraftment and direct repair mechanisms [4–6]. Long-term consequences of such treatment on brain metabolism and functional neurologic abilities have been little investigated [8].

The neuroprotective effects of HUCBC may be linked to endothelial progenitor cells. These cells are a small fraction of the blood mononuclear cell population [9, 10] and play a critical role in

vascular repair and tissue recovery by promoting the formation of new blood vessels in conditions of tissue ischemia. Endothelial colony-forming cells (ECFC) are a homogeneous, well-characterized population of endothelial progenitor cells with high proliferating capacity. They are considered to be relevant endothelial progenitors due to their specific vasculogenic activity [11–13]. We and others have previously reported protective and regenerative effects of ECFC administration in an adult model of cerebral ischemia [14, 15]. To date, the effects of ECFC administration have not been investigated in models of NHIE. Data from preclinical studies are still needed and are essential to design and support future clinical trials aiming to investigate the neuroprotective effects of autologous administration of cord blood cells in infants with severe NHIE. Indeed, the high concentration of active cells (progenitor, immune, and stem cells), the ease of access and well-known cell processing techniques make cord blood a potential neuroprotective therapy for infants suffering NHIE [4, 5, 7, 16].

The aim of this study was to evaluate and compare the effects of HUCBC and ECFC administration after neonatal cerebral HI in the rat. Histologic, single photon emission computed tomography (SPECT) imaging used for brain metabolism and perfusion activity, and neurologic functions were assessed during the neonatal period and in adulthood.

MATERIALS AND METHODS

The experimental protocol is presented in Figure 1.

Animal Care and Surgical Procedure of Cerebral HI

This study was approved by the local institutional Animal Care and Use Committee (CE14, Aix-Marseille Université, agreement 3-17012013) and was conducted according to the official edict presented by the French Ministry of Agriculture (Paris, France) and the recommendations of the Helsinki Declaration. The experiments were conducted in an authorized laboratory (C13-055-20). Pregnant Sprague-Dawley rats (Charles Rivers, l'Arbresle, France, <http://www.criver.com> $n = 23$) were housed in a room with a 12-hour light/dark cycle at a controlled temperature of 22°C. They had access to food and water ad libitum. After each delivery, litter sizes were adjusted to 10 pups per litter. Neonatal rats were carried by their mothers until they were weaned (day 21). They were then housed four per cage on standard rat chow (Safe-UAR).

Only male rats ($n = 122$) were used in our study to avoid bias due to gender differences [17]. Each neurological, histological, and isotopic imaging assessment was performed by a single investigator blinded to the experimental groups.

A variation of the Rice-Vannucci model of NHIE was used [18–20]. On postnatal day 7 (P7), rat pups ($n = 99$) were anesthetized with inhaled 3% sevoflurane. The right common carotid artery was permanently double-ligated using a 5.0 surgical silk and severed. Pups were allowed to recover with their dams for 2 hours, and then placed into a hypoxia chamber in a water bath maintained at 37°C, under a constant flow of 1.5 l/minute humidified 8% oxygen/balance nitrogen for 90 minutes. SHAM rat pups ($n = 23$) underwent anesthesia, incision, and exposure of the right common carotid artery without ligation or hypoxia. At the end of the procedure, pups were returned to their cage and allowed to recover for 48 hours.

Cell Preparation and Transplantation

HUCBC samples (30–50 ml) from healthy human donors were collected, in compliance with the French law and after obtaining

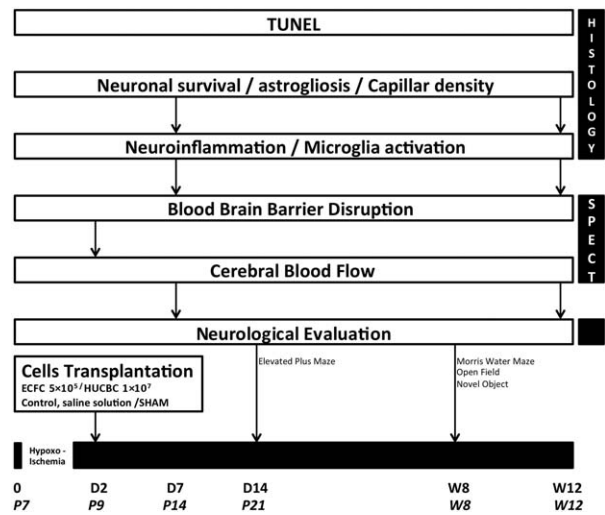


Figure 1. Experimental protocol. Abbreviations: ECFC, endothelial colony-forming cells; HUCBC, human umbilical cord blood cells; P7, postnatal day 7; SPECT, single photon emission computed tomography.

written informed consent forms from the parents. The cord blood cells were obtained from anonymous donations and 52% of the donors were male newborns. Preparation of the mononuclear cell fraction was performed by the Ficoll gradient technique (Amersham, Freiburg, Germany, <http://www.amershambioscience.com>). Blood samples were processed within 24 hours after collection. Before cell transplantation, HUCBC were washed three times with phosphate-buffered saline (PBS) then suspended in PBS (1×10^7 cells per 0.5 milliliter).

ECFC were isolated as previously described from HUCBC [21]. Before cell transplantation, ECFC were starved overnight in endothelial basal medium-2/with 2% fetal calf serum, washed three times with PBS then suspended in PBS (5×10^5 cells per 0.5 milliliter).

Experimental Groups

Forty-eight hours after the surgical procedure, HI pups were randomly allocated to three groups. Control pups ($n = 35$) were intraperitoneally injected with saline solution (500 μ l) and the other interventional animal groups either with HUCBC ($1 \times 10^7/500 \mu$ l, $n = 21$) or ECFC ($5 \times 10^5/500 \mu$ l, $n = 43$). SHAM pups ($n = 23$) were intraperitoneally injected with saline solution (500 μ l). Before cell or saline injections, pups were briefly anesthetized with 3% sevoflurane inhalation.

Neurological Assessment

Neurological assessment was performed at 14 days and 8 weeks after HI.

Elevated Plus Maze Test. The elevated plus maze (EPM) test was performed on P21 ($n = 10/\text{group}$) to evaluate animal anxiety as previously described [22]. The EPM apparatus consists of two open arms (50 $\times$ 10 $\times$ 1 cm) and two closed arms (50 $\times$ 10 $\times$ 40 cm) crossing on a common central platform (10 $\times$ 10 cm) forming a plus shape, elevated to 50 cm above the floor. The anxiety-related behaviors of each animal were video-recorded for a period of 5 minutes and analyzed with the Etho-Vision XT7 (Noldus Information Technology, Leesburg, Virginia,

<http://www.noldus.com>). Briefly, the rat was placed on the central platform with its head facing an open arm. The arm entry was defined as all four paws into an open or a closed arm. The total time each animal spent in any different section of the maze (open arms, central platform, and closed arms) was recorded. Results were expressed as mean $\pm$ SD percent of “open arms entries” (OAE ratio, number of OAE divided by the sum of entries in both open and closed arms), percent of “closed arms entries” (CAE ratio, number of CAE divided by the sum of entries in both open and closed arms), percent of “open arms time” (OAT%, time spent in open arms divided by the sum of time spent in both closed and open arms) and percent of “closed arms time” (CAT%, time spent in closed arms divided by the sum of time spent in both closed and open arms). The animal’s natural tendency is to stay in closed spaces because of its unconditioned fear for open spaces and height.

Open Field Test. At 8 weeks, each rat ($n = 10$ in each group) was placed in an empty open field (OF; 100×100 cm) and allowed to freely explore the arena for 5 minutes. General locomotor behavior (total distance moved and velocity of movement) was analyzed with EthoVision XT 7.

Novel Object Recognition Test. At 8 weeks, the animal’s exploratory behavior and its nonspatial learning and memory capacities were assessed with novel object recognition test [23, 24]. Briefly, the rat ($n = 10$ /group) was placed in an open apparatus (100×100 cm). Each animal’s journey was video-recorded and analyzed with the EthoVision XT7 software. The day before the test, animals received a habituation session of 30 minutes in the OF. On the testing day, each rat completed four 3-minute sessions (intertrial interval of 30 minutes). During the first three sessions, the rat was allowed to explore the arena, which contained two identical objects. Total exploration time of the two objects was noted. For the fourth session, one of the original objects was replaced by a novel, different-shaped object, then each rat was returned to the arena and was allowed to explore both objects (novel + familiar) for 3 minutes. The “object exploration” was considered when the rat sniffed at the novel object within a 1 cm-distance or touched the novel object with its nose. The time spent on each object exploration was video-recorded and a discrimination ratio was calculated (time spent to explore the novel object compared with the total exploration time). The latency period to the first exploration of the novel object was also measured.

Morris Water Maze Test. Spatial learning and memory performance were evaluated 8 weeks after HI lesion with the **Morris water maze** (MWM) test ($n = 10$ /group) as previously described by Li et al. [25]. The MWM consists of a black circular pool virtually divided in four equal quadrants located in a well-lit white room with several spatial cues. Two centimeters beneath the water surface and hidden from the rat’s view was a black circular platform.

(a) Spatial Acquisition Test. Training on spatial version of the MWM was carried out over five consecutive days. On each day, rats received four training trials in which the hidden platform was left at the same place. The mean latency time to find the platform was measured for individual animals on each day as a learning score. A different starting location was used in each trial, which consisted of a swim followed by a 30-seconds platform rest. Rats that did not find the platform within 60 seconds were guided to it by the experimenter.

(b) Reference Memory Test (Probe Trial). To assess long-term memory, 24 hours after the final trial, the platform was removed from its fixed location and the time spent in the target quadrant over 60 seconds was measured.

Histologic and Immunohistochemistry Assessment

Animals were deeply anesthetized 7 days and 12 weeks after HI with a lethal dose of pentobarbital (Clin Midy, Gentilly, France) and rat brains were fixed by trans-cardiac perfusion with 4% phosphate-buffered paraformaldehyde (PFA) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France, <http://www.sigmaaldrich.com>). After decapitation, the brain was removed from the skull and post-fixed for 24 hours in 4% PFA at 4°C and was successively cryopreserved, snap-frozen, and stocked at -80°C . Frozen sections were cut with a sliding microtome (CM1900, Leica, France SA, <http://www.leicabiosystems.com>) and stored at -80°C . All sections were examined using a light and fluorescent microscope (Eclipse TE 2000-U, Nikon France SA, <https://www.nikoninstruments.com>) equipped with a digital camera (DXM1200, Nikon France SA) and an image analyzer (Lucia 5.0 software, Nikon France SA). Histologic analysis was performed in 5–10 fields at the cortical level of ipsilateral hemisphere and in the corresponding location within contralateral hemisphere.

TUNEL Staining. Apoptotic cells were detected on 8 μm -thick sections 7 days after injury by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated 2'-deoxyuridine 5'-triphosphate nick-end labeling (TUNEL) as previously described [26]. Only cells containing apoptotic bodies are referred to as apoptotic cells. TUNEL positive cells were counted under high-power microscope and expressed as number of positive cells per square mm section.

Immunofluorescent Staining. After nonspecific protein binding blocking, slices were incubated (1/100, 2 hours, 4°C) with the primary antibody (eNOS: 610297, BD Pharmingen, <http://www.bdbiosciences.com>; NeuN: MAB377, Millipore, <http://www.merckmillipore.com>; glial fibrillary acidic protein, GFAP: M0761, Dako, <http://www.agilent.com>) and were incubated secondary antibodies. Cerebral vessel density (eNOS), neuronal survival (NeuN), and astrogliosis (GFAP) are expressed as ipsilateral-to-contralateral (i/c) ratio.

Immunohistochemistry. After endogen peroxidase activity blocking and nonspecific protein binding blocking, sections were incubated with mouse monoclonal anti-iNOS (1/100, 4 hours, BD Pharmingen, 610297) and then incubated with the biotinylated secondary antibody and visualized with 3,3'-diaminobenzidine (ThermoFischer, <http://www.thermoFisher.com>). Neuroinflammation is expressed as i/c ratio.

Single Photon Emission Computed Tomography

Radiotracers. Hexamethylpropyleneamine oxime kit (HMPAO, Cerestab, General Electrics, Velizy-Villacoublay, France, <http://www.gehealthcare.com>) was radiolabeled with fresh [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]TcO $_4^-$ pertechnetate solution (500 MBq/1 ml) following the manufacturer’s instructions.

SPECT Data Acquisition. Seven days (P14) and 12 weeks after HI insult, 20 MBq of [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]Tc-HMPAO were injected through the tail vein to assess cerebral blood flow (CBF). Thirty minutes after [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]Tc-HMPAO injection, the animals were anesthetized with

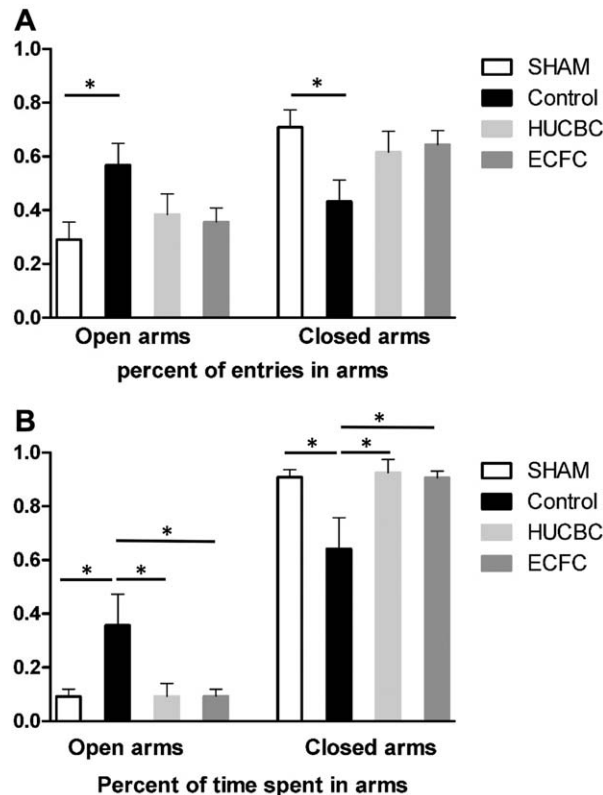


Figure 2. Evaluation of HUCBC or ECFC administration on anxiety-like behavior measured by the elevated plus maze test at post-natal day 21. **(A):** Percent of entries in open arms and in closed arms. **(B):** Percent of time spent in open arms and in closed arms. (mean $\pm$ SD; *, $p < .05$ compared with Control; $n = 10$ in each group). Abbreviations: ECFC, endothelial colony-forming cells; HUCBC, human umbilical cord blood cells.

1.5% sevoflurane and a cerebral SPECT/CT imaging was acquired for 20 minutes (NanoSPECT/CT+ camera, Bioscan Europe Ltd, Paris, France).

SPECT Image Analysis. Images analysis was performed using the 3D-ROI module part of InVivoScope software v2.0p4 (InVivo, Boston, <https://www.invivo.com>). Two volumes of interest (VOI) were drawn over right (ipsilateral) and left (contralateral) cerebral hemisphere for each animal in the axial section. Radioactivity inside each VOI was quantified and corrected by the tissue volume (MBq/mm³). We then calculated the i/c ratios (i/c, %). Image color scales were normalized in order to illustrate CBF.

Statistical Analysis

Values were reported as mean $\pm$ SD unless otherwise indicated. Physiological parameters were analyzed by unpaired t test. TUNEL and immunoassaying data were tested for normality and were compared with unpaired t test with Bonferroni correction for post hoc intergroup comparisons. Behavioral and morphological outcomes were compared between the groups using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by post hoc Bonferroni test. Statistical analyses were performed with Prism software v5.03 (GraphPad Software, La Jolla, CA). A p value $< .05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Survival rate: Survival rate after hypoxic-ischemic injury was 96%.

Locomotor behavior: To analyze locomotor behavior, OF activity was performed at W8 in all experiment groups. Physical abilities were similar in all groups (data not shown).

Neurological Assessment

HUCBC or ECFC Administration Equally Rescues Hypoxic-Ischemic-Induced Short-Term Anxiety-Like Behavior Abnormalities. The EPM test was performed on day P21 ($n = 10$ /group). The animal's natural tendency is to stay in enclosed spaces, as was the case with the SHAM group (91% of time spent in closed arms). After HI injury, we observed a higher OAE ratio in the Control group compared with the SHAM group (OAE ratio, Control: 0.568 ± 0.08 , SHAM: 0.290 ± 0.06 ; $p < .05$, $n = 10$, Fig. 2A) and a higher percent of time in the open arms (OAT%, Control: 0.357 ± 0.1 , SHAM: 0.091 ± 0.02 , $p < .05$, $n = 10$, Fig. 2B). After cellular therapy, we observed a significant decrease in OAT ratio in the HUCBC (0.091 ± 0.04 , $p < .05$, $n = 10$) and ECFC groups (0.094 ± 0.02 , $p < .05$, $n = 10$) compared with the Control group (Fig. 2B). There was no significant difference between HUCBC, ECFC, and SHAM animals.

HUCBC or ECFC Administration Equally Rescues Hypoxic-Ischemic-Induced Long-Term Cognitive Deficits. Morris Water Maze Test. Control rats showed significant spatial and learning memory deficits 8 weeks after HI as compared with SHAM rats. **(a) Spatial acquisition test** (Fig. 3A): During the five training days, the mean escape latencies to find the platform in the HUCBC and ECFC groups were significantly shorter than in Control rats (HUCBC: 29.1 ± 6.6 seconds; ECFC: 25.8 ± 7.2 seconds; Control: 44.6 ± 3.1 seconds, $n = 10$ in each group, HUCBC vs. Control $p < .01$; ECFC vs. Control $p < .05$). There were no significant differences between the HUCBC, ECFC, and SHAM groups. **(b) Reference memory test (probe trial, Fig. 3B):** Twenty-four hours after the last training session, the time spent in the target quadrant (without the platform) was measured. The SHAM, HUCBC, and ECFC groups showed longer time spent in the target quadrant than Control rats (SHAM vs. Control, $p < .01$; ECFC and HUCBC vs. Control, $p < .05$). There was no difference between the ECFC, HUCBC, and SHAM groups.

Novel Object Recognition Test. HI resulted in cognitive deficit involving nonspatial working memory and exploratory capacities during the novel object recognition test, with a discrimination ratio significantly reduced in the Control group compared with the SHAM group, (respectively, 0.55 ± 0.1 and 0.92 ± 0.03 ; $p < .05$; $n = 10$ /group, Fig. 4A). HUCBC and ECFC administration significantly increased exploratory and memory performance compared with the Control group, with a higher discrimination ratio (HUCBC: 0.88 ± 0.02 , $p < .05$; $n = 10$; ECFC: 0.89 ± 0.03 , $p < .05$; $n = 10$, Fig. 4A). The mean escape latency to first exploration of the novel object was significantly increased in the Control group compared with the SHAM group (respectively 24.0 ± 3.2 seconds and 8.31 ± 2.2 seconds, $p < .01$, $n = 10$ in each group, Fig. 4B) and was reduced in the HUCBC (11.28 ± 1.8 seconds, $p < .01$, $n = 10$, Fig. 4B) and ECFC (10.15 ± 2.6 seconds, $p < .05$, $n = 10$, Fig. 4B) groups. There was no difference between the ECFC, HUCBC, and SHAM groups.

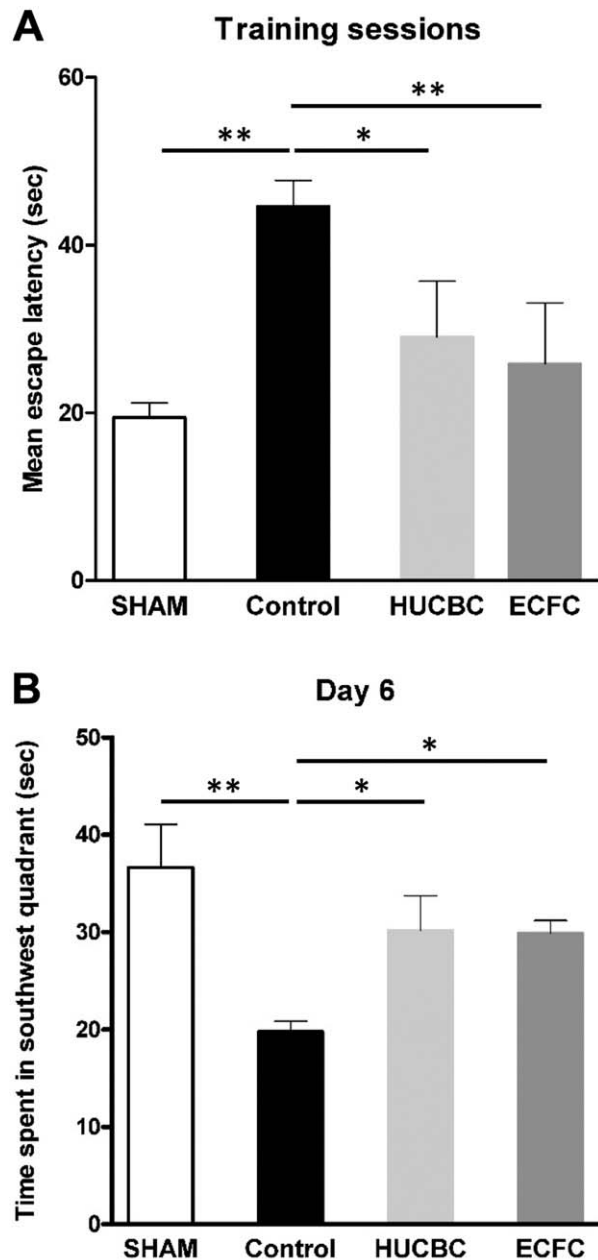


Figure 3. Evaluation of cognitive function with the Morris water maze test at post-natal 8 weeks. **(A):** Spatial acquisition test (Training sessions). **(B):** Reference memory test (day 6). (mean $\pm$ SD; *, $p < .05$ compared with Control; **, $p < .01$ compared with Control; $n = 10$ in each group; one-way analysis of variance followed by post hoc Bonferroni test). Abbreviations: ECFC, endothelial colony-forming cells; HUCBC, human umbilical cord blood cells.

Histological and Immunochemical Assessment

HUCBC or ECFC Administration Decreased Apoptosis and Neuroinflammation Activation 7 Days After Neonatal HI. Seven days post-HI, the HUCBC group revealed a significantly lower cortical neuroinflammation than the Control group (HUCBC vs. Control: 0.9 ± 0.15 vs. 1.6 ± 0.34 ; $p = .038$; $n = 5$ per group, Fig. 5A). The ECFC group revealed a trend to a lower neuroinflammation in the ipsilateral cortex than the Control group but this difference was not statistically significant (ECFC vs. Control; 1.1 ± 0.11 vs. 1.6 ± 0.34 ; $p = .08$, $n = 5$ per group, Fig. 5A).

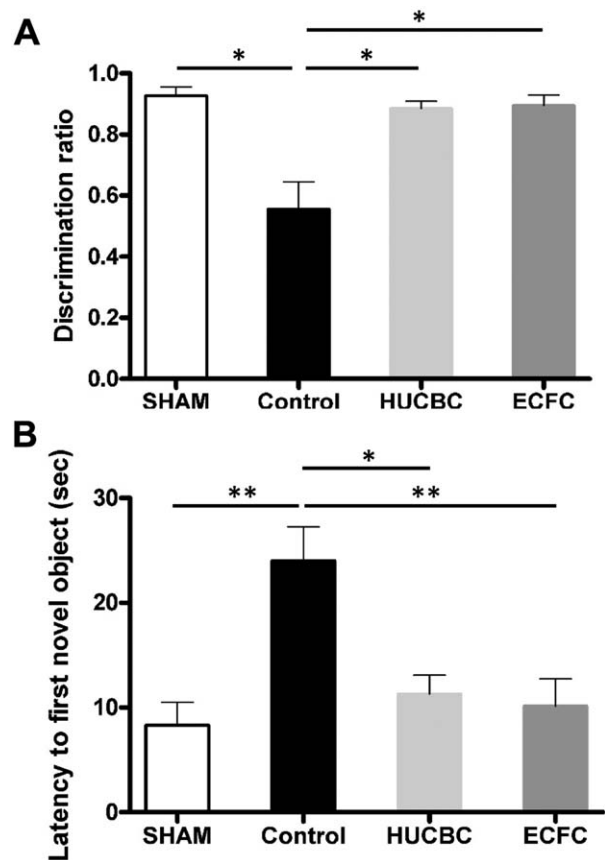


Figure 4. Evaluation of HUCBC and ECFC administration on Novel Object Recognition test at post-natal 8 weeks. **(A):** Discrimination ratio. **(B):** The mean escape latency to first exploration of the novel object. (mean $\pm$ SD; *, $p < .05$ compared with Control; **, $p < .01$ compared with Control; $n = 10$ in each group; one-way analysis of variance followed by post hoc Bonferroni test). Abbreviations: ECFC, endothelial colony-forming cells; HUCBC, human umbilical cord blood cells.

Similarly, 7 days after HI, apoptotic cell number (Fig. 5B) was significantly lower in the HUCBC (5.5 ± 1.2 cells/mm²; $p = .005$, $n = 6$) and ECFC groups (3.2 ± 1.3 cells/mm², $p = .006$, $n = 6$) than in the Control group (57.5 ± 2.1 cells/mm², $n = 6$).

HUCBC and ECFC Administration Equally Improved Early and Late Neuronal Survival and Prevented the Formation of Astrocytic Scar. Neuronal survival: HI induced a significant and extended decrease of NeuN-immunopositive cells in the ipsilateral hemisphere 7 days (0.99 ± 0.08 vs. 0.80 ± 0.07 in the SHAM and Control groups respectively, $p = .026$, $n = 4$ in each group, Fig. 6Aa, 6Ac) and 12 weeks after HI insult (0.99 ± 0.15 vs. 0.74 ± 0.1 in the SHAM and Control groups respectively, $p = .025$, $n = 4$ /group, Fig. 6Ab, 6Ad).

Seven days after HI (Fig. 6Aa, 6Ac), NeuN-positive cells i/c ratios were significantly increased in the HUCBC (0.95 ± 0.03 , $p = .0094$, $n = 4$) and ECFC (0.90 ± 0.05 , $p = .043$, $n = 4$) groups in comparison with the Control group.

Twelve weeks after HI (Fig. 6Ab, 6Ad), NeuN-positive cells i/c ratios were still significantly increased in the HUCBC group (0.98 ± 0.13 , $p = .022$, $n = 4$) and in the ECFC group (1.09 ± 0.11 , $p < .001$; $n = 4$) in comparison with the Control group.

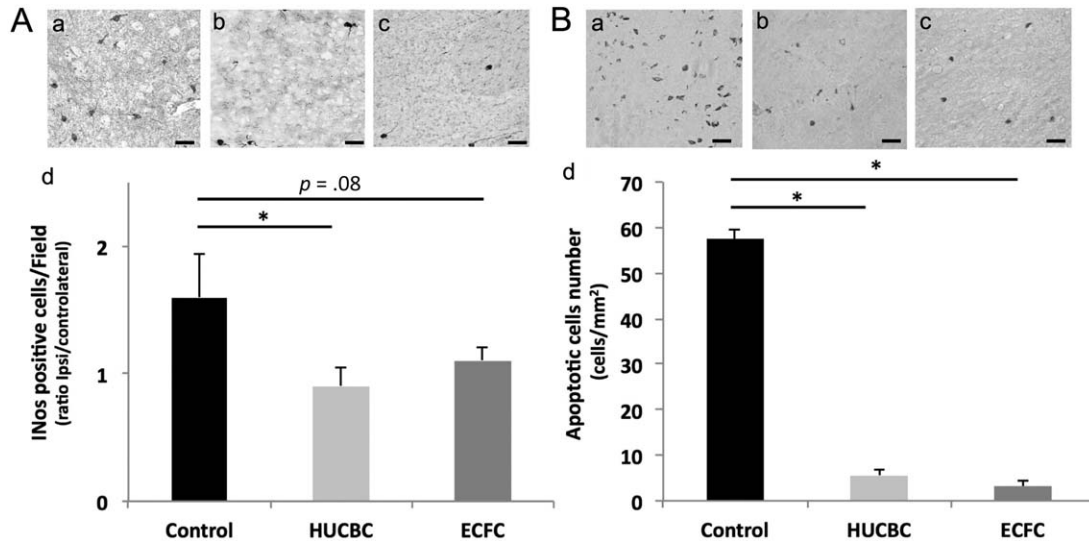


Figure 5. Effects of HUCBC and ECFC administration on neuroinflammation (A) and apoptosis (B) 7 days after neonatal HI. (A): Representative photographs of iNOS immunohistochemistry in ipsilateral cortical brain section of Control (Aa), HUCBC (Ab), and ECFC (Ac) groups. (Ad): Quantification of iNOS immunopositive cells (ipsilateral/contralateral ratio), Scale bar: 40 μ m. (B): Representative photographs of TUNEL immunohistochemistry in ipsilateral cortical brain section of Control (Ba), HUCBC (Bb), and ECFC (Bc) groups. (Bd): quantification of apoptotic cells in the ipsilateral hemisphere. (mean $\pm$ SD; *, $p < .05$ compared with Control, **, $p < .005$ compared with Control; $n = 5$ –6 in each group; unpaired t test followed by post-hoc Bonferroni test). Abbreviations: ECFC, endothelial colony-forming cells; HUCBC, human umbilical cord blood cells.

No Difference was Observed Between the SHAM, ECFC, and HUCBC Groups 7 Days and 12 Weeks After HI. Astrogliosis: HI induced a significant and extended increase in astrogliosis, expressed as i/c GFAP ratio, 7 days (0.82 ± 0.20 vs. 1.59 ± 0.12 in the SHAM and Control groups respectively, $p < .001$, $n = 5$ /group, Fig. 6Ba, 6Bc) and 12 weeks after HI (0.98 ± 0.24 vs. 3.53 ± 0.9 in the SHAM and Control groups respectively, $p = .004$, $n = 5$ /group, Fig. 6Bb, 6Bd).

Seven days after insult (Fig. 6Ba, 6Bc), no significant decrease in astrogliosis was observed in the ECFC and HUCBC groups compared with the Control group; whereas at W12 (Fig. 6Bb, 6Bd) we observed a huge delayed decrease in astrogliosis in the ECFC (0.96 ± 0.23 , $p < .001$, $n = 5$) and HUCBC (1.24 ± 0.63 , $p < .05$, $n = 5$) groups compared with the Control group. No difference was observed between the SHAM, ECFC, and HUCBC at W12.

HUCBC and ECFC Administration Both Resulted in an Early and Sustained Increase in Cerebral Capillary Density, from Day 7 to 12 Weeks After Neonatal HI. In comparison with SHAM animals, HI was associated with a significant reduction in cerebral capillary density (i/c ratios) 7 days (0.97 ± 0.03 vs. 0.73 ± 0.04 in SHAM and Control animals respectively, $p < .001$, $n = 4$ /group, Fig. 6Ca, 6Cc) and 12 weeks after HI insult (0.98 ± 0.05 vs. 0.76 ± 0.08 in SHAM and Control animals respectively, $p = .0014$, $n = 4$ /group, Fig. 6Cb, 6Cd).

Seven Days After HI. cerebral capillary density was significantly higher in the HUCBC (1.00 ± 0.06 ; $p < .001$; $n = 5$) group and in the ECFC (1.09 ± 0.08 ; $p < .001$; $n = 6$) group in comparison with the Control group. No difference was observed between the SHAM, ECFC, and HUCBC groups. (Fig. 6Ca, 6Cc).

Twelve Weeks After HI. cerebral capillary density was significantly higher in the HUCBC (0.93 ± 0.11 ; $p = .034$, $n = 6$) group and in the ECFC (1.02 ± 0.08 ; $p < .001$, $n = 6$) group in comparison with the Control group. No difference was observed between the SHAM, ECFC, and HUCBC groups (Fig. 6Cb, 6Cd).

Single Photon Emission Computed Tomography

Cerebral Blood Flow. Although no significant difference was found between conditions at P14, at W12 we observed in the Control group a significant decrease in CBF i/c ratios ($77\% \pm 2\%$, $n = 5$) compared with the SHAM ($99\% \pm 3\%$, $n = 5$, $p = .019$) group and a significant improvement in the HUCBC ($95\% \pm 2\%$, $p = .017$, $n = 5$) and ECFC ($96\% \pm 2\%$, $p = .014$, $n = 7$) groups compared with the Control group (Fig. 7).

DISCUSSION

Using a rat neonatal model of brain HI, we demonstrated that HUCBC or ECFC administration similarly (a) limited cellular apoptosis, neuroinflammation, and astrocytic reaction, (b) restored cerebral capillary density, and (c) improved neuronal cell survival. Long-term CBF and neurologic functions were definitively improved as well.

Administration of HUCBC after neonatal cerebral HI in rats limits the severity of brain injury and improves long-term neurologic functions. Meier et al. were the first to describe improved neurologic functions in rats with neonatal cerebral HI after intraperitoneal infusion of HUCBC (1×10^7 HUCB cells), 24 hours after cerebral injury [7], and a preservation of somatosensory functions in the ipsilateral hemisphere at P48 [27]. These effects have been demonstrated in studies using different doses, administration route, or administration timing of HUCBC after neonatal cerebral insult [4–6, 28, 29]. Yasuhara et al. have shown improved motor coordination as early as the 7th day after intravenous administration of low doses of HUCBC (1.5×10^4) [4]. Pimentel-Coelho demonstrated that intraperitoneal injection of 2×10^6 HUCBC 3 hours after the ischemic episode improved sensorimotor reflexes up to 10 days after injection. Most of these effects were associated with decreased neuroinflammation and less apoptosis reaction [6, 30]. The mechanism by which HUCBC do limit brain injury is unclear.

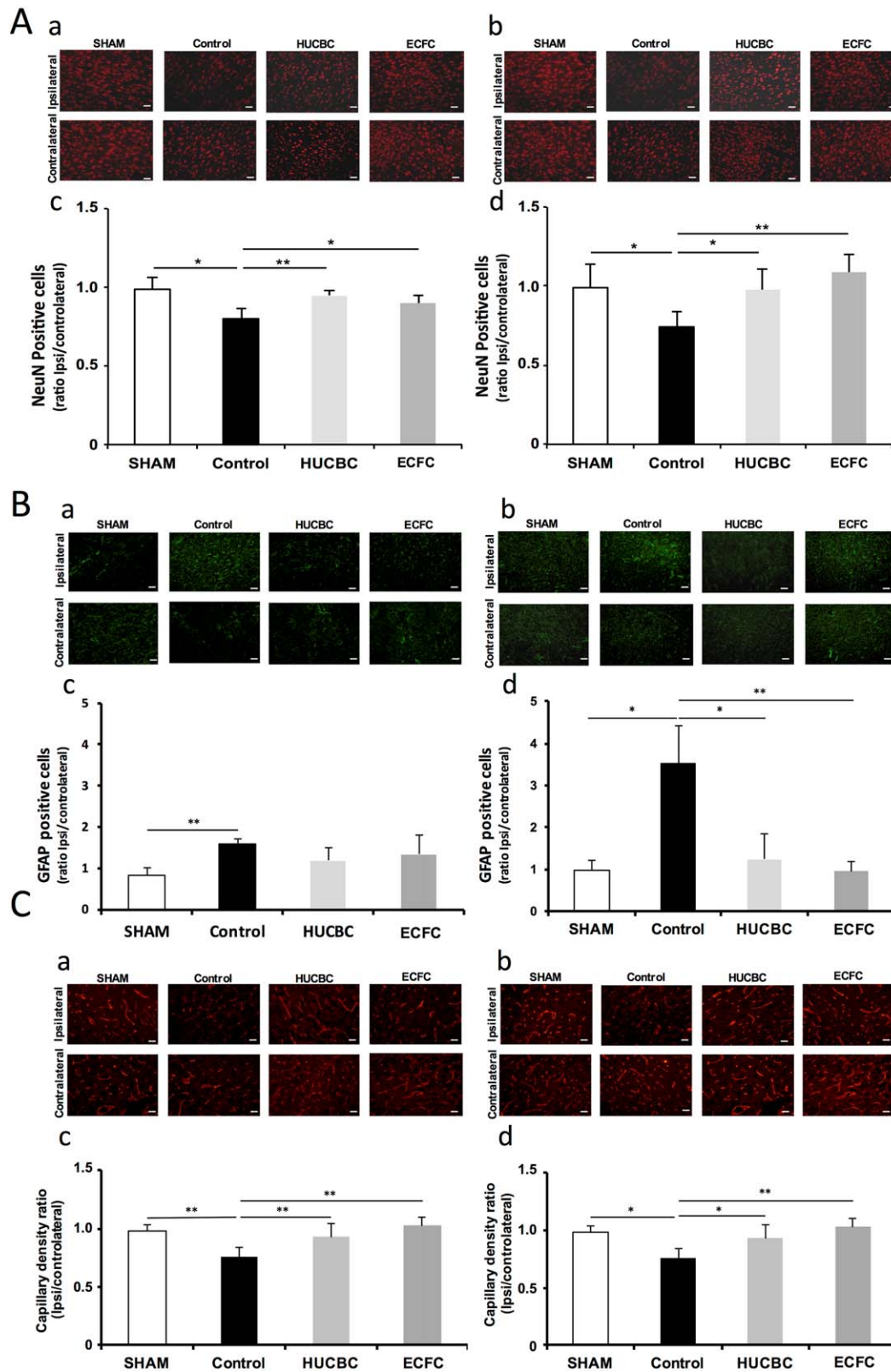


Figure 6. Effects of HUCBC and ECFC administration on neuronal survival (A), astrogliosis (B), and capillary density (C) 7 days (a, c) and 12 weeks (b, d) after neonatal HI. Representative NeuN immunofluorescence (red) at P14 (Aa) and W12 (Ac), Representative glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunofluorescence (green) at P14 (Ba) and W12 (Bc) and Representative eNOS immunofluorescence (red) at P14 (Ca) and W12 (Cc). Ipsilateral/contralateral ratio of NeuN-immunopositive cells at P14 (Ab) and W12 (Ad), ipsilateral/contralateral ratio of GFAP-immunopositive cells at P14 (Bb) and W12 (Bd) and ipsilateral/contralateral ratio of eNOS-immunopositive cells at P14 (Cb) and W12 (Cd), (mean $\pm$ SD; *, $p < .05$ compared with Control; **, $p < .01$ compared with Control, $n = 5$ in each group; unpaired t test followed by post hoc Bonferroni test; scale bars = 20 μ m). Abbreviations: ECFC, endothelial colony-forming cells; HUCBC, human umbilical cord blood cells.

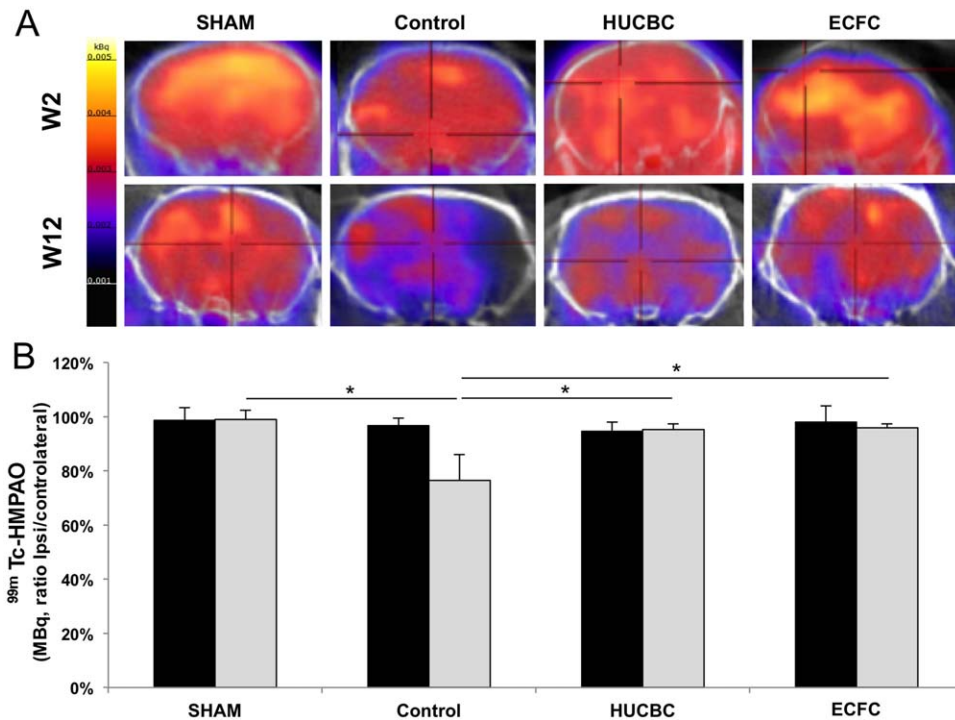


Figure 7. Effects of HUCBC and ECFC administration on cerebral blood flow (CBF) SPECT/CT 2 weeks and 12 weeks after hypoxia-ischemia. **(A):** Brain representative tomographic images of ^{99m}Tc -HMPAO SPECT/CT assessing CBF 2 weeks (top row) and 12 weeks (bottom row) after hypoxia-ischemia. **(B):** Quantification of ^{99m}Tc -HMPAO activity in ischemic hemisphere (% of contralateral activity) 2 weeks (black bars) and 12 weeks (gray bars) after hypoxia-ischemia (mean $\pm$ SD; *, $p < .05$ compared with Control; $n = 4$ –5 in each group; one-way analysis of variance followed by post-hoc Bonferroni test). Abbreviations: ECFC, endothelial colony-forming cells; HMPAO, hexamethylpropyleneamine oxime; HUCBC, human umbilical cord blood cells.

Cord blood contains different cell types with various functions including mesenchymal cells, stem cells, progenitor cells, immune cells (T-regulatory lymphocytes), and endothelial progenitor cells which contribute to the neuroprotective effects. It has been proposed that such effects result from in situ trophic/growth factors release rather than from engraftment process [4, 6, 31], and studies found a limited number, or an absence of HUCBC in the injured brain [4, 5, 7, 28]. Our findings provide further evidence on the neuroprotective effects of HUCBC which sustain in adulthood.

The relevant findings of this study concern the significant neuroprotective effects of ECFC administration after neonatal cerebral HI, which have never been evaluated as cell therapy for neonatal cerebral HI. ECFC are considered to be the relevant endothelial progenitors due to their specific vasculogenic activity [11, 12]. We previously showed that intravenous administration of ECFC contributed to vascular recovery, limited tissue injury after hind limb ischemia, and transient cerebral ischemia in adult rodents [14, 15, 32–35]. In all these models, ECFC administration was associated with a decrease in apoptosis, a growth factor release enhancement and a neovascularization stimulation.

Beneficial effects of the administration of ECFC or HUCBC 3 days after cerebral HI in pups sustained in adulthood. Compared with the Control group, ECFC and HUCBC administration limited neuronal death, neuroinflammation and preserved capillary density. We observed that cell therapy did not prevent early glial cell proliferation, supposed to be protective, but prevent delayed glial scar, reinforcing the hypothesis of a temporary astroglial border that could limit ischemia to surrounding tissues [36]. The effects of astroglial and microglia

on inflammation and oxidative stress reactions are debated [37, 38], but a sustained microglial activation has been shown to affect tissue integrity after ischemic injury through secreting cytotoxic cytokines and free radicals [39–43].

We originally used $\mu\text{SPECT/CT}$ imaging to follow-up brain metabolism after cerebral HI from neonatal period to adulthood. Brain perfusion is a critical parameter of cerebral tissue physiology; maintenance of brain metabolism is finely tuned and needs a constant provision of oxygen and glucose. Cerebral SPECT/CT imaging showed a huge decrease in brain perfusion in Control rats compared with the SHAM group at the adult stage (W12). These alterations were associated with significant impaired neurologic functions and brain damages. Although no difference was observed on day 7 after cerebral HI, adult HUCBC- or ECFC-treated animals recovered brain metabolism and perfusion with less extended brain damages and better neurological functions. Pathophysiological processes including cell activity and cell proliferation, tissue inflammation or regenerative processes may maintain tissue metabolism and explain unchanged brain perfusion soon after cerebral HI as observed in adult cerebral HI models [44]. All of these findings make CBF as evaluated by SPECT/CT imaging a reliable tool to assess long-term consequences of neonatal HI and the effects of experimental therapies.

The current study provides further evidence on the neuroprotective effects of HUCBC and ECFC after neonatal cerebral HI in the rat. The experimental design included heterologous cell therapy which questions the reliability of the model. However, some evidence argues for the effectiveness of these cells. Neuroprotective effects of cord blood cells have been demonstrated in

immunodeficient rodents [4, 45] and in a model of NHIE in lamb after autologous administration of cord blood cells [46]. We did not investigate the effects of hypothermia as used in clinical practice because our aim was to compare the effects of both HUCBC and ECFC. The strength of our study was to investigate long-term consequences of HUCBC and ECFC administration in a model of neonatal cerebral HI using histologic, neurologic and SPECT imaging tools. We found similar long-term neuroprotective effects between both cell therapies which underlines the robustness of cell therapies as therapeutic candidate for neonatal HI.

Clinical Implications

Caution is required when extrapolating our findings to infants since current findings were observed in a specific experimental model; but evidence argues for their potential relevance for NHIE. The Rice-Vannucci model is considered a reference for studying neonatal HI brain, since cortical maturity at 7 days post-delivery in rats is similar to that of human newborns [19, 47]. We observed, as previously reported [4, 5, 7, 16, 28, 29], that neonatal cerebral HI induced long-term neurofunctional and cognitive deficits with significant impaired spatial and nonspatial memory skills and behavior disorders in stress conditions, as can be seen in children born with NHIE. The rat model is a valuable model for studying pathophysiological mechanisms of NHIE and for evaluating the efficacy and tolerance of cellular therapies. Our findings and previous studies provide sufficient data on the effectiveness and the safety of using these cells in NHIE conditions [48–50].

NHIE is the second cause of neonatal death worldwide [51] and is associated with high risk of long-term neurocognitive disabilities in surviving infants. Therapeutic hypothermia, which is the only protective therapy proposed in such a situation, has limited neuroprotective effects [1–3, 52, 53]. Combined therapies are currently evaluated, out of which cell therapy using HUCBC has promising potential neuroprotective effects. HUCBC are easily and immediately available at the patient's bedside just after birth. Recently, in only one study, HUCBC administrations have been shown to be feasible and well tolerated in newborns with severe NHIE [54]. Using ECFC from cord blood is more debated. Their use in clinical practice remains tricky since ECFC are allogeneic and take several days to be produced. We have characterized cord blood stem cells of neonates with neonatal asphyxia and compared them with those from healthy newborn infants (NEOCORD,

NCT01284673). We observed that neonatal asphyxia seemed to enrich cord blood stem cell content, with a higher quantity of endothelial progenitor cells found in cord blood of asphyxiated neonates (unpublished data). All these arguments confirm our choice to establish and set up a clinical study (NEOSTEM, NCT02881970). Three other studies are ongoing (NCT01506258, NCT02256618, NCT02605018) and the neonatal physician community has placed much hope in these strategies.

CONCLUSION

In the current study, we reported that a single HUCBC or ECFC administration after neonatal cerebral HI in rat equally limited glial cell proliferation, prevented apoptosis and neuronal loss and improved capillary growth, CBF using μ SPECT/CT imaging, and neurologic functions up to young adulthood. Our findings provide further evidence on the effectiveness and tolerability of HUCBC as the potential candidate for clinical HI cell therapy.

ACKNOWLEDGMENT

We thank Samantha Fernandez and Lionel Pellegrini for their excellent technical support.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

I.G.: conception and design, collection and/or assembly of data, data analysis and interpretation, manuscript writing; P.G. and A.R.: collection and/or assembly of data, data analysis and interpretation, manuscript writing; F.B. and U.S.: conception and design, final approval of manuscript; F.D.G.: conception and design, administrative support, final approval of manuscript; F.S.: conception and design, administrative support, provision of study material or patients, final approval of manuscript; B.G.: conception and design, financial support, administrative support, provision of study material or patients, data analysis and interpretation, manuscript writing, final approval of manuscript.

DISCLOSURE OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

The authors indicated no potential conflicts of interest.

REFERENCES

- 1 Azzopardi DV, Strohm B, Edwards AD et al. Moderate hypothermia to treat perinatal asphyxial encephalopathy. *N Engl J Med* 2009; 361:1349–1358.
- 2 Shankaran S, Laptook AR, Ehrenkranz RA et al. Whole-body hypothermia for neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy. *N Engl J Med* 2005;353:1574–1584.
- 3 Gluckman PD, Wyatt JS, Azzopardi D et al. Selective head cooling with mild systemic hypothermia after neonatal encephalopathy: Multicentre randomised trial. *Lancet* 2005;365:663–670.
- 4 Yasuhara T, Hara K, Maki M et al. Mannitol facilitates neurotrophic factor up-regulation and behavioural recovery in neonatal hypoxic-ischaemic rats with human umbilical cord blood grafts. *J Cell Mol Med* 2010;14:914–921.
- 5 Pimentel-Coelho PM, Magalhaes ES, Lopes LM et al. Human cord blood transplantation in a neonatal rat model of hypoxic-ischemic brain damage: Functional outcome related to neuroprotection in the striatum. *Stem Cells Dev* 2010;19:351–358.
- 6 Rosenkranz K, Kumbrich S, Tenbusch M et al. Transplantation of human umbilical cord blood cells mediated beneficial effects on apoptosis, angiogenesis and neuronal survival after hypoxic-ischemic brain injury in rats. *Cell Tissue Res* 2012;348:429–438.
- 7 Meier C, Middelani J, Wasielewski B et al. Spastic paresis after perinatal brain damage in rats is reduced by human cord blood mononuclear cells. *Pediatr Res* 2006;59:244–249.
- 8 Bae SH, Kong TH, Lee HS et al. Long-lasting paracrine effects of human cord blood cells on damaged neocortex in an animal model of cerebral palsy. *Cell Transplant* 2012; 21:2497–2515.
- 9 Ingram DA, Mead LE, Tanaka H et al. Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood* 2004;104: 2752–2760.
- 10 Chen JZ, Zhang FR, Tao QM et al. Number and activity of endothelial progenitor cells from peripheral blood in patients with hypercholesterolaemia. *Clin Sci (Lond)* 2004;107: 273–280.
- 11 Kawamoto A, Asahara T. Role of progenitor endothelial cells in cardiovascular disease and upcoming therapies. *Catheter Cardiovasc Interv* 2007;70:477–484.
- 12 Yoder MC, Mead LE, Prater D et al. Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. *Blood* 2007;109:1801–1809.

- 13 Bompais H, Chagraoui J, Canron X et al. Human endothelial cells derived from circulating progenitors display specific functional properties compared with mature vessel wall endothelial cells. *Blood* 2004;103:2577–2584.
- 14 Moubarik C, Guillet B, Youssef B et al. Transplanted late outgrowth endothelial progenitor cells as cell therapy product for stroke. *Stem Cell Rev* 2011;7:208–220.
- 15 Pellegrini L, Bennis Y, Guillet B et al. Therapeutic benefit of a combined strategy using erythropoietin and endothelial progenitor cells after transient focal cerebral ischemia in rats. *Neurol Res* 2013;35:937–947.
- 16 Fan LW, Lin S, Pang Y et al. Hypoxia-ischemia induced neurological dysfunction and brain injury in the neonatal rat. *Behav Brain Res* 2005;165:80–90.
- 17 Arteni NS, Pereira LO, Rodrigues AL et al. Lateralized and sex-dependent behavioral and morphological effects of unilateral neonatal cerebral hypoxia-ischemia in the rat. *Behav Brain Res* 2010;210:92–98.
- 18 Levine S. Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. *Am J Pathol* 1960;36:1–17.
- 19 Vannucci RC, Connor JR, Mauger DT et al. Rat model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *J Neurosci Res* 1999;55:158–163.
- 20 Vannucci SJ, Hagberg H. Hypoxia-ischemia in the immature brain. *J Exp Biol* 2004;207:3149–3154.
- 21 Cuccini W, Poitevin S, Poitevin G et al. Tissue factor up-regulation in proinflammatory conditions confers thrombin generation capacity to endothelial colony-forming cells without influencing non-coagulant properties in vitro. *J Thromb Haemost* 2010;8:2042–2052.
- 22 Ming-Yan H, Luo YL, Zhang XC et al. Hypoxic-ischemic injury decreases anxiety-like behavior in rats when associated with loss of tyrosine-hydroxylase immunoreactive neurons of the substantia nigra. *Braz J Med Biol Res* 2012;45:13–19.
- 23 Bartolini L, Casamenti F, Pepeu G. Aniracetam restores object recognition impaired by age, scopolamine, and nucleus basalis lesions. *Pharmacol Biochem Behav* 1996;53:277–283.
- 24 Dere E, Huston JP, De Souza Silva MA. The pharmacology, neuroanatomy and neurogenetics of one-trial object recognition in rodents. *Neurosci Biobehav Rev* 2007;31:673–704.
- 25 Li Y, Liang G, Wang S et al. Effects of fetal exposure to isoflurane on postnatal memory and learning in rats. *Neuropharmacology* 2007;53:942–950.
- 26 Codaccioni JL, Velly LJ, Moubarik C et al. Sevoflurane preconditioning against focal cerebral ischemia: Inhibition of apoptosis in the face of transient improvement of neurological outcome. *Anesthesiology* 2009;110:1271–1278.
- 27 Geissler M, Dinse HR, Neuheff S et al. Human umbilical cord blood cells restore brain damage induced changes in rat somatosensory cortex. *PLoS One* 2011;6:e20194.
- 28 de Paula S, Vitola AS, Greggio S et al. Hemispheric brain injury and behavioral deficits induced by severe neonatal hypoxia-ischemia in rats are not attenuated by intravenous administration of human umbilical cord blood cells. *Pediatr Res* 2009;65:631–635.
- 29 de Paula S, Greggio S, Marinowicz DR et al. The dose-response effect of acute intravenous transplantation of human umbilical cord blood cells on brain damage and spatial memory deficits in neonatal hypoxia-ischemia. *Neuroscience* 2012;210:431–441.
- 30 Pimentel-Coelho PM, Mendez-Otero R. Cell therapy for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Stem Cells Dev* 2010;19:299–310.
- 31 Rosenkranz K, Kumbrich S, Lebermann K et al. The chemokine SDF-1/CXCL12 contributes to the ‘homing’ of umbilical cord blood cells to a hypoxic-ischemic lesion in the rat brain. *J Neurosci Res* 2010;88:1223–1233.
- 32 Bennis Y, Sarlon-Bartoli G, Guillet B et al. Priming of late endothelial progenitor cells with erythropoietin before transplantation requires the CD131 receptor subunit and enhances their angiogenic potential. *J Thromb Haemost* 2012;10:1914–1928.
- 33 Hache G, Garrigue P, Bennis Y et al. ARA290, A Specific Agonist of Erythropoietin/CD131 Heteroreceptor, Improves Circulating Endothelial Progenitors’ Angiogenic Potential and Homing Ability. *Shock* 2016;46:390–397.
- 34 Garrigue P, Giacomino L, Bucci C et al. Single photon emission computed tomography imaging of cerebral blood flow, blood-brain barrier disruption, and apoptosis time course after focal cerebral ischemia in rats. *Int J Stroke* 2016;11:117–126.
- 35 Garrigue P, Hache G, Bennis Y et al. EPO pretreatment of ECFCs enhances functional recovery after transplantation in a rat model of cerebral ischemia through an increase of their homing abilities: A SPECT/CT study. *J Nucl Med* 2016;57:1798–1804.
- 36 Renault-Mihara F, Okada S, Shibata S et al. Spinal cord injury: Emerging beneficial role of reactive astrocytes’ migration. *Int J Biochem Cell Biol* 2008;40:1649–1653.
- 37 Robel S, Bardehle S, Lepier A et al. Genetic deletion of cdc42 reveals a crucial role for astrocyte recruitment to the injury site in vitro and in vivo. *J Neurosci* 2011;31:12471–12482.
- 38 Sofroniew MV. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci* 2009;32:638–647.
- 39 Dinkel K, Dhabhar FS, Sapolsky RM. Neurotoxic effects of polymorphonuclear granulocytes on hippocampal primary cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:331–336.
- 40 Butovsky O, Talpalar AE, Ben-Yaakov K et al. Activation of microglia by aggregated beta-amyloid or lipopolysaccharide impairs MHC-II expression and renders them cytotoxic whereas IFN-gamma and IL-4 render them protective. *Mol Cell Neurosci* 2005;29:381–393.
- 41 Lehnardt S, Massillon L, Follett P et al. Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:8514–8519.
- 42 Kaur C, Rathnasamy G, Ling EA. Roles of activated microglia in hypoxia induced neuroinflammation in the developing brain and the retina. *J Neuroimmune Pharmacol* 2013;8:66–78.
- 43 Bain JM, Ziegler A, Yang Z et al. TGFbeta1 stimulates the over-production of white matter astrocytes from precursors of the ‘brain marrow’ in a rodent model of neonatal encephalopathy. *PLoS One* 2010;5:e9567.
- 44 Martin A, Mace E, Boisgard R et al. Imaging of perfusion, angiogenesis, and tissue elasticity after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 2012;32:1496–1507.
- 45 Kidani Y, Miki Y, Nomimura N et al. The therapeutic effect of CD133(+) cells derived from human umbilical cord blood on neonatal mouse hypoxic-ischemic encephalopathy model. *Life Sci* 2016;157:108–115.
- 46 Aridas JD, McDonald CA, Paton MC et al. Cord blood mononuclear cells prevent neuronal apoptosis in response to perinatal asphyxia in the newborn lamb. *J Physiol* 2016;594:1421–1435.
- 47 Rice JE, 3rd, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol* 1981;9:131–141.
- 48 Taupin P. Transplantation of two populations of stem cells to improve engraftment: WO2008060932. *Expert Opin Ther Pat* 2010;20:1259–1263.
- 49 Rocha V, Crotta A, Ruggeri A et al. Double cord blood transplantation: Extending the use of unrelated umbilical cord blood cells for patients with hematological diseases. *Best Pract Res Clin Haematol* 2010;23:223–229.
- 50 Brunstein CG. Umbilical cord blood transplantation for the treatment of hematologic malignancies. *Cancer Control* 2011;18:222–236.
- 51 Lawn JE CS, Zupan J; Lancet Neonatal Survival Steering Team. 4 million neonatal deaths: When? Where? Why? *Lancet* 2005;365:891–900.
- 52 Moon CJ, Youn YA, Yum SK et al. Cytokine changes in newborns with therapeutic hypothermia after hypoxic ischemic encephalopathy. *J Perinatol* 2016;36:1092–1096.
- 53 McAdams RM, Juul SE. Neonatal encephalopathy: Update on therapeutic hypothermia and other novel therapeutics. *Clin Perinatol* 2016;43:485–500.
- 54 Cotten CM, Murtha AP, Goldberg RN et al. Feasibility of autologous cord blood cells for infants with hypoxic-ischemic encephalopathy. *J Pediatr* 2014;164:973–979 e971.

C. DISCUSSION

1. Points forts

1.1. Place de la thérapie cellulaire dans le traitement de l'EHI

Comme présenté précédemment, la prise en charge de l'encéphalopathie hypoxo-ischémique représente un enjeu majeur du fait de sa gravité et du haut risque de décès et de séquelles à long terme. En dehors de l'hypothermie thérapeutique, aucun traitement curatif n'est validé. Le développement de stratégies complémentaires à l'hypothermie thérapeutique est nécessaire. Au cours de ces dernières années, nous assistons à une recherche intensive concernant de nombreuses molécules à visée neuroprotectrices, c'est-à-dire capables de retarder ou prévenir la mort neuronale. Il faudra attendre des données cliniques pour évaluer leur bénéfice et la faisabilité de leur utilisation en pratique courante.

Une autre stratégie thérapeutique repose sur une médecine régénérative basée sur la neurorestauration, pouvant stimuler la réparation endogène et la régénération du tissu cérébral endommagé par l'hypoxo-ischémie cérébrale. La thérapie cellulaire est l'approche thérapeutique principale permettant d'accompagner et de renforcer la neurorestauration physiologique initiée au niveau cérébral après un accident hypoxo-ischémique. Ce travail confirme la place potentielle de la thérapie cellulaire dans le traitement de l'encéphalopathie hypoxo-ischémique, en association avec l'hypothermie thérapeutique.

1.2. Points forts techniques de l'étude: tests comportementaux, évaluation dans le temps, imagerie fonctionnelle

Dans notre étude, nous avons confirmé les bénéfices de la thérapie cellulaire par les cellules mononuclées du sang de cordon (HUCBs) et évalué pour la première fois les effets des ECFCs par l'intermédiaire d'une évaluation fonctionnelle complète, reposant sur une batterie de tests comportementaux complémentaires, reconnus et validés dans la littérature¹³⁶⁻¹³⁹.

Les études publiées ayant été menées seulement à des temps précoces (3 semaines après l'accident hypoxo-ischémique)^{22, 117, 119}, il nous a paru intéressant d'étudier l'effet de la thérapie cellulaire à long terme dans notre modèle. Nous avons ainsi mis en évidence la persistance des effets bénéfiques de ces deux types cellulaires issus du sang de cordon à l'âge adulte tant sur le plan neurocomportemental (8 semaines après l'accident hypoxo-ischémique) que sur le plan histologique (12 semaines après l'accident hypoxo-ischémique).

Nous rapportons également pour la première fois, l'évaluation de la perfusion cérébrale par imagerie fonctionnelle isotopique SPECT/CT à différents temps post hypoxo-ischémie (7 jours et 8 semaines).

L'imagerie fonctionnelle représente un outil puissant pour l'étude du développement cérébral. La base des explorations fonctionnelles du système nerveux central est fondée sur l'hypothèse d'un couplage spatiotemporel entre la fonction neuronale et la perfusion locale (unité neuro-vasculaire). Il a été démontré un lien étroit entre la variation du débit sanguin cérébral local et le métabolisme énergétique cérébral lié à l'activité neuronale^{125, 140}. La tomographie d'émission monophotonique (SPECT) couplée à un scanner est une méthode de reconstruction d'images de distribution de traceurs radioactifs. Elle permet une mesure directe et non invasive de la perfusion cérébrale régionale^{141, 142}. Ainsi, 12 semaines après l'hypoxo-ischémie cérébrale néonatale, la baisse de perfusion cérébrale de la zone ischémisée quantifiée par imagerie SPECT reflète un hypométabolisme localisé témoignant d'atteinte fonctionnelle cérébrale cicatricielle et définitive¹⁴².

Dans notre étude, l'utilisation de la SPECT/CT a permis de suivre l'évolution de la perfusion cérébrale de façon longitudinale, à deux temps donnés, individu par individu, permettant ainsi de corrélérer la récupération neuro-comportementale à long terme avec la restauration de la perfusion cérébrale chez les animaux lésés ayant bénéficié de l'injection d'ECFCs ou HUCBCs.

En accord avec ce que nous avons préalablement rapporté chez le rat adulte (Garrigue 2016) à des temps précoces (7 jours après l'ischémie), l'imagerie SPECT/CT de perfusion cérébrale n'a pas permis de mettre en évidence de modification significative en raison de la concomitance de nombreux processus ayant des répercussions antagonistes sur le flux

cérébral, tels que l'atteinte neuronale, l'inflammation réactionnelle ou encore la régénération.

Nous avons également évalué (résultats non présentés), par imagerie SPECT/CT au ^{99m}Tc -DTPA, les effets de l'administration des HUCBCs ou ECFCs sur la rupture de la barrière hématoencéphalique (BHE) induite par l'atteinte ischémique. Au cours de travaux antérieurs, sur le modèle MCAO adulte (Garrigue JNM 2017), nous avons rapporté un effet très important de l'administration des ECFCs sur l'atténuation de la rupture de la BHE. Malheureusement, nous n'avons pas pu mettre en évidence une telle protection sur notre modèle chez le rat nouveau-né, certainement en raison d'une perméabilité résiduelle de la BHE au cours du développement^{143, 144}

1.3. Choix cellulaire

Les cellules souches sont définies par deux critères : l'autorenouvellement qui assure leur maintien à long terme, et la capacité à générer une descendance différenciée et fonctionnelle. Deux principaux types de cellules souches sont étudiées dans le domaine de l'ischémie cérébrale : les cellules souches embryonnaires et les cellules souches adultes¹⁴⁵.

Les cellules souches embryonnaires font l'objet d'intenses recherches en raison de leur potentiel d'expansion quasiment illimité et leur répertoire de différenciation. Ces cellules totipotentes ont en effet la capacité de générer tous les tissus de l'organisme y compris ceux du système nerveux. Néanmoins leur applicabilité en clinique est à court et moyen terme largement compromise en raison non seulement de considérations éthiques mais également d'un manque de maîtrise des conditions de prolifération et différenciation qui expose à un risque majeur de tératomes^{146, 147}.

Les cellules souches neurales dérivées de tissus fœtaux ou adultes ont l'avantage d'une différenciation organe spécifique mieux définie et d'un risque moindre de division incontrôlées, mais leur usage est rendu difficile en raison leur manque d'accessibilité pour l'usage clinique.

Dans ce contexte, les cellules souches mononuclées issues du sang de cordon représentent une alternative de choix, de par les avantages suivants : une facilité d'obtention, sans

risque pour le donneur, une thérapie autologue mieux tolérée, risque moindre de transmission de maladies infectieuses, une capacité d'être stockées, et une préparation rapide en vue de l'injection dans un faible délai. En effet, la préparation standardisée de concentrés de cellules mononuclées à partir d'unités de sang placentaire est, depuis 1998 une technique très largement utilisée dans le traitement d'hémopathies malignes ou affections du système immunitaire. De plus, les différentes populations de cellules souches présentes dans le sang de cordon ont des propriétés compatibles avec une efficacité dans la régénération de tissus cérébraux lésés¹⁴⁸⁻¹⁵⁰.

1.4. Evaluation et rôle des cellules progénitrices endothéliales

Comme nous l'avons dit précédemment, nous rapportons pour la première fois l'effet neuroprotecteur des progéniteurs endothéliaux tardifs issus du sang de cordon ombilical (ECFCs) dans le modèle d'encéphalopathie hypoxo-ischémique néonatale. La comparaison des ECFCs et HUCBCs sur le plan comportemental, histologique et en neuro imagerie, a mis en évidence une efficacité équivalente de ces cellules. L'intérêt d'évaluer les progéniteurs endothéliaux comme base de thérapie cellulaire repose sur plusieurs observations majeures :

- leurs propriétés angiogéniques démontrées par des études *in vitro*¹⁵¹, et *in vivo*¹⁵²
- la corrélation existante entre la diminution du nombre de progéniteurs endothéliaux endogènes chez l'homme et les facteurs de risque d'accident vasculaire ischémique cérébral^{153, 154}
- de même, chez l'homme, l'augmentation du taux sanguin d'EPCs après AVC ischémique est considérée comme un facteur de meilleur pronostic^{155, 156}
- une diminution du nombre d'EPCs associée à une altération de leur capacité angiogénique et clonogénique chez des nouveau-nés présentant une restriction de croissance intra-utérine par dysfonction endothéliale¹⁵⁷⁻¹⁵⁹
- la mobilisation des EPCs endogènes dans des modèles animaux d'ischémie cérébrale adulte¹⁶⁰, corrélée à une augmentation de la néovascularisation et du flux sanguin au sein des territoires ischémiés favorisant la récupération fonctionnelle¹⁶¹

- la mise en évidence des propriétés migratoires *in vivo* vers la zone lésée après injection intraveineuse d'EPCs exogènes après MCAO chez le lapin¹⁵²

Dans notre étude, la mise en évidence d'une efficacité équivalente des ECFCs par rapport aux HUCBCs appuie l'hypothèse d'un rôle prépondérant de cette fraction cellulaire au sein des cellules du sang du cordon, et du rôle important de l'angiogenèse dans la réparation neuronale.

2. Limites et Perspectives

2.1. Hypothermie thérapeutique

Nous n'avons pas, dans cette étude expérimentale, réalisé d'hypothermie thérapeutique, seul traitement actuellement reconnu en pratique clinique. Les bénéfices de l'hypothermie en matière de neuroprotection ont déjà été démontrés dans le modèle animal utilisé dans notre étude^{40, 162, 163}. L'objectif de cette étude s'est porté sur l'évaluation de l'effet seul des ECFCs ou HUCBCs dans l'hypoxo-ischémie cérébrale. Une des perspectives est de poursuivre cette étude en évaluant les effets combinés de l'hypothermie thérapeutique et des cellules souches. En effet, on ne peut exclure un effet de l'hypothermie sur l'activité des cellules de sang de cordon. Quelques études animales ont observé que la combinaison de l'hypothermie à la thérapie cellulaire présentait un effet synergique¹⁶⁴⁻¹⁶⁶.

2.2. Modèle animal

L'une de principale limite de la recherche sur l'hypoxo-ischémie néonatale réside dans le fait que peu d'études animales reproduisent le vrai accident hypoxo-ischémique intra-utérin. Quelques modèles expérimentaux, notamment chez le fœtus de brebis, miment l'accident hypoxique par occlusion du cordon ombilical¹⁶⁷. Le modèle animal d'hypoxo-ischémie cérébrale selon Rice-Vanucci ne mime pas forcément l'accident hypoxo-ischémique subi en période périnatale par les nouveau-nés. Toutefois, il est validé scientifiquement et est considéré comme un modèle de référence pour l'étude de l'encéphalopathie hypoxo-ischémique néonatale¹¹⁶. En effet, les comparaisons multiples

concernant la croissance anatomique cérébrale, les étapes de neurogenèse, synaptogenèse, gliogenèse, maturation, myélinisation, mais aussi les variations biochimiques et moléculaires liées à l'âge, ont démontré que le cerveau du rat entre 7 et 10 jours de vie correspondait chez le nouveau-né humain à un âge gestationnel proche du terme (36-40 semaines de gestation), donc approprié pour l'étude des lésions cérébrales du nouveau-né à terme^{115, 168-170}. Une des limites de ce modèle réside dans la variabilité lésionnelle entre les animaux¹⁷¹. De plus, il se rapproche d'autres modèles animaux d'accident hypoxo-ischémique, notamment chez la brebis.

Une autre remarque s'impose : les cellules souches de sang de cordon utilisées dans les modèles expérimentaux sont toutes issues de nouveau-né humain sain (sans asphyxie). L'impact de l'asphyxie néonatale sur les cellules souches du sang de cordon autologue, dont dépend le bénéfice de telles thérapies, n'est pas clairement établi. Or, il est important de documenter si l'hypoxie tissulaire ainsi que l'hypoxémie et l'acidose métabolique sanguine qui accompagnent cette situation physiopathologique ne compromettent pas le nombre et la fonctionnalité de ces cellules et donc leur potentialité thérapeutique. Plusieurs études se sont penchées sur les conséquences *in vitro* d'un préconditionnement hypoxique des ECFCs. En effet, Decaris et al. ont comparé les propriétés angiogéniques des ECFCs *in vitro* en milieu physiologique ou milieu hypoxique et ont mis en évidence une amélioration des capacités de prolifération, de migration et de tubulogenèse des ECFCs en condition d'hypoxie en comparaison aux conditions physiologiques¹⁷². Dans un modèle animal d'ischémie de la patte, un préconditionnement *ex vivo* par hypoxie des ECFCs (hypo-ECFC), a permis une amélioration de la densité capillaire, du flux sanguin et des capacités de prolifération et de survie de ces cellules¹⁷³. Cependant, l'équipe de He et al. a très récemment observé *in vitro* que l'hypoxie inhibait la prolifération, la migration des ECFCs ainsi que l'angiogenèse ; les effets de l'hypoxie sur les ECFCs seraient liés à une surexpression de l'HIF-1 α (hypoxia inducible factor-1 α), responsable d'un arrêt du cycle cellulaire¹⁷⁴. Ces observations contradictoires sembleraient être liées aux différents modes d'hypoxie (hypoxie aiguë ou chronique), ou encore aux différents types cellulaires utilisés (EPCs précoces ou ECFCs)¹⁷⁴.

Actuellement, aucune étude expérimentale n'a évalué les effets de cellules souches issues de sang de cordon en contexte d'asphyxie périnatale.

En pratique clinique aussi, les caractéristiques des cellules de sang de cordon ayant subi une hypoxie doivent être déterminées sur un produit cellulaire frais, ou ayant subi une étape de congélation (puisque la cryoconservation peut être imposée par un protocole thérapeutique nécessitant une administration de cellules au-delà de 48 heures suivant la naissance). Ainsi, une étude préclinique observationnelle a été réalisée au sein de l'Assistance Publique Hôpitaux de Marseille (service de thérapie cellulaire, service de Médecine néonatale, Maternité de l'hôpital de la Conception) afin de comparer les caractéristiques cellulaires du sang de cordon de nouveau-nés sains (n=18) et de nouveau-nés présentant une asphyxie périnatale (n=4). Nous avons mis en évidence une viabilité préservée des cellules mononuclées du sang de cordon (HUCBCs). Nous avons également observé une augmentation significative du nombre d'ECFCs dans le sang de cordon des nouveau-nés avec asphyxie en comparaison aux nouveau-nés sains, avec une viabilité cellulaire également conservée (étude NEOCORD, NCT01284673). Il est nécessaire de poursuivre ces investigations afin de déterminer les caractéristiques fonctionnelles de ces cellules notamment leurs propriétés angiogéniques par l'intermédiaire d'études *in vitro* mais également par le biais des études cliniques.

2.3. Etudes cliniques

Le challenge de ces futures années est de déterminer quelles stratégies thérapeutiques, combinées à l'hypothermie contrôlée sont sûres et amélioreront la neuroprotection.

Plusieurs études cliniques utilisant la thérapie cellulaire sont en cours et sont résumées dans le tableau 4.

Un large essai clinique de sécurité et de faisabilité d'un traitement des enfants atteints d'encéphalopathie hypoxo-ischémique périnatale par les cellules autologues du sang de cordon a été réalisé à l'université de Duke (ClinicalTrials.gov registration number NCT00593242). 23 nouveau-nés présentant une encéphalopathie hypoxo-ischémique secondaire à une asphyxie périnatale ont reçus une à 4 injections intraveineuses de 5×10^7 HUCBCs frais et autologues. La collection, la préparation et l'administration se sont avérés faisables et sûrs¹⁷⁵. Une étude clinique en phase II est en cours.

Forts des données expérimentales recueillies au cours de ce travail qui confirment le rôle bénéfique des cellules souches issues du sang de cordon, le premier essai clinique français multicentrique devrait être mis en place dans les prochains mois. Cette étude évaluera la faisabilité, la sécurité et les effets cliniques de l'administration de cellules mononuclées autologues du sang du cordon dans la prise en charge précoce des encéphalopathies hypoxo-ischémiques néonatales sévères (ClinicalTrials.gov registration number NCT02881970). Cet essai, s'il partage les objectifs d'évaluation de la sécurité et de la faisabilité d'une telle approche avec les essais en cours, s'en différenciera par la séquence thérapeutique envisagée, une administration retardée du produit de thérapie cellulaire étant prévue pour une partie des patients inclus dans le but de déterminer le timing optimal d'intervention, ainsi que par une caractérisation biologique du produit cellulaire injecté.

Clinical Trial registration number	Traitement	Dose(s)	Objectifs	Statut actuel (nombre de patients)	lieu	titre
NCT02256618	HUCBCs autologues + hypothermie	3 doses : 12-24 h 36-48 h 60-72 h	-Faisabilité -effets secondaires	Recrutement (6)	Nagoya, Japon	Autologous cord blood cell therapy for neonatal encephalopathy
NCT02551003	HUCBCs autologues + hypothermie	1 à 3 doses : < 24 h 36-48 h 60-72 h	-Sûreté -survie à 18 mois -séquelles à 18 mois (clinique et IRM)	Recrutement (60)	Shangäi, Chine	Neuroprotective effects of autologous cord blood combined with hypothermia following neonatal encephalopathy
NCT02612155	HUCBCs autologues + hypothermie <i>versus</i> placebo + hypothermie	1 à 2 doses : < 24 h 48 h	-Survie à 1 an -% d'enfants avec score de Bayley $\geq$ 85 à 2 ans	Recrutement (160)	Duke, Durham, USA	A multi-site study of autologous cord blood Cells for hypoxic Ischemic encephalopathy
NCT02881970	HUCBCs autologues + hypothermie	1 à 2 doses : 48-72 h 3 semaines	-Faisabilité -Sûreté -survie et neuro-développement à 2 ans (clinique et IRM)	En attente (20)	Marseille, APHM, France	Neonatal hypoxic ischemic encephalopathy : safety and feasibility study of a curative treatment with autologous cord blood stem cells
NCT01649648	HUCBCs autologues	Non précisé	-sûreté -neuro-développement à 2 ans	Terminée (2)	Singapore	Autologous cord blood cells for brain injury in term newborns

Tableau 4. Principales études cliniques utilisant les cellules mononuclées du sang de cordon autologues dans l'encéphalopathie hypoxo-ischémique néonatale.
Clinical Trials.gov, 02/10/2017

Actuellement, après la naissance de nouveau-nés à terme, se pratique de plus en plus le clampage retardé du cordon afin d'optimiser leur statut en fer¹⁷⁶. Cette pratique, sans danger, conduit de fait à enrichir la circulation du nouveau-né en cellules hématopoïétiques et en cellules souches présentes dans le sang de cordon. De façon intéressante, elle a été rapportée comme bénéfique au développement psychomoteur de l'enfant dans des études menées dans les pays en voie de développement. Or le clampage de cordon retardé n'est actuellement pas réalisé en cas de nécessité de réanimation, afin de ne pas retarder la prise en charge de l'enfant.

Ainsi l'administration de cellules nucléées de sang de cordon permettrait d'enrichir la circulation sanguine du nouveau-né en cellules potentiellement bénéfiques. De plus,

l'intérêt de prélever le sang de cordon pour une réinjection différée serait de pouvoir injecter les cellules souches, à un moment choisi, probablement durant la phase de vasodilatation secondaire à la vasoconstriction initiale cérébrale. Enfin, la préparation des cellules inclut une phase de concentration de ces dernières permettant ainsi un effet rhéologique moindre chez ces enfants placés en hypothermie. De plus cette phase de préparation pourrait permettre la réalisation d'un prétraitement des cellules afin de potentialiser leur capacité de migration vers le foyer ischémique, leur résistance face au stress tissulaire ou bien leur potentiel régénératif comme nous l'avons récemment rapporté sur le modèle MCAO adulte¹¹².

D. CONCLUSION

L'encéphalopathie hypoxo-ischémique néonatale liée à une asphyxie périnatale est une des principales causes de mortalité et de morbidité du nouveau-né à terme. L'hypothermie thérapeutique contrôlée développée ces dernières années a montré des effets neuroprotecteurs mais limités. Des thérapies adjuvantes sont à l'étude. Le recours aux cellules mononuclées du sang de cordon ombilical (HUCBCs) représente une stratégie prometteuse en médecine régénérative en raison des potentialités de ces cellules, de leur faible immunogénicité et de leur facilité d'obtention. Au sein des cellules mononuclées du sang de cordon ombilical se trouve une faible fraction de cellules progénitrices endothéliales (ECFCs) reconnues pour leurs capacités angiogéniques. Dans un modèle expérimental d'encéphalopathie hypoxo-ischémique du raton selon Rice et Vannucci, nous avons démontré que l'administration d'HUCBCs ou d'ECFCs présentait de façon équivalente des effets neuroprotecteurs par l'amélioration des fonctions neurologiques, la réduction de la prolifération des cellules gliales, de l'apoptose et de la perte neuronale, l'amélioration de la néovascularisation et de la perfusion cérébrale à long terme. Il est maintenant nécessaire d'évaluer par des études cliniques, la faisabilité, la sûreté et l'efficacité de l'administration de cellules autologues mononuclées du sang de cordon dans l'encéphalopathie hypoxo-ischémique néonatale modérée à sévère.

Bibliographie

1. Use and abuse of the apgar score. Committee on fetus and newborn, american academy of pediatrics, and committee on obstetric practice, american college of obstetricians and gynecologists. *Pediatrics*. 1996;98:141-142
2. Marret S, Jadas V, Kieffer A, Chollat C, Rondeau S, Chadie A. [treatment of encephalopathy by hypothermia in the term newborn]. *Arch Pediatr*. 2014;21:1026-1034
3. Robertson CM, Perlman M. Follow-up of the term infant after hypoxic-ischemic encephalopathy. *Paediatr Child Health*. 2006;11:278-282
4. Dixon G, Badawi N, Kurinczuk JJ, Keogh JM, Silburn SR, Zubrick SR, et al. Early developmental outcomes after newborn encephalopathy. *Pediatrics*. 2002;109:26-33
5. Robertson CM, Finer NN, Grace MG. School performance of survivors of neonatal encephalopathy associated with birth asphyxia at term. *J Pediatr*. 1989;114:753-760
6. Lawn JE CS, Zupan J; Lancet Neonatal Survival Steering Team. 4 million neonatal deaths: When? Where? Why? *Lancet*. 2005;365:891-900
7. McLean C, Ferriero D. Mechanisms of hypoxic-ischemic injury in the term infant. *Semin Perinatol*. 2004;28:425-432
8. Thornton C, Rousset CI, Kichev A, Miyakuni Y, Vontell R, Baburamani AA, et al. Molecular mechanisms of neonatal brain injury. *Neurol Res Int*. 2012;2012:506320
9. Fathali N, Khatibi NH, Ostrowski RP, Zhang JH. The evolving landscape of neuroinflammation after neonatal hypoxia-ischemia. *Acta Neurochir Suppl*. 2011;111:93-100
10. Brillault J, Lam TI, Rutkowski JM, Foroutan S, O'Donnell ME. Hypoxia effects on cell volume and ion uptake of cerebral microvascular endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2008;294:C88-96
11. Shankaran S. Neonatal encephalopathy: Treatment with hypothermia. *J Neurotrauma*. 2009;26:437-443
12. Hausmann R, Seidl S, Betz P. Hypoxic changes in purkinje cells of the human cerebellum. *Int J Legal Med*. 2007;121:175-183
13. Johnston MV, Trescher WH, Ishida A, Nakajima W. Neurobiology of hypoxic-ischemic injury in the developing brain. *Pediatr Res*. 2001;49:735-741
14. Leonardo CC, Pennypacker KR. Neuroinflammation and mmps: Potential therapeutic targets in neonatal hypoxic-ischemic injury. *J Neuroinflammation*. 2009;6:13
15. Arteaga O, Álvarez A, Revuelta M, Santaolalla F, Urtasun A, Hilario E. Role of antioxidants in neonatal hypoxic-ischemic brain injury: New therapeutic approaches. *Int J Mol Sci*. 2017;18
16. Thornton C, Leaw B, Mallard C, Nair S, Jinnai M, Hagberg H. Cell death in the developing brain after hypoxia-ischemia. *Front Cell Neurosci*. 2017;11:248
17. Perlman JM. Brain injury in the term infant. *Semin Perinatol*. 2004;28:415-424
18. Liu XH, Kwon D, Schielke GP, Yang GY, Silverstein FS, Barks JD. Mice deficient in interleukin-1 converting enzyme are resistant to neonatal hypoxic-ischemic brain damage. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1999;19:1099-1108
19. Tan WK, Williams CE, During MJ, Mallard CE, Gunning MI, Gunn AJ, et al. Accumulation of cytotoxins during the development of seizures and edema after hypoxic-ischemic injury in late gestation fetal sheep. *Pediatr Res*. 1996;39:791-797
20. Gluckman PD, Guan J, Williams C, Scheepens A, Zhang R, Bennet L, et al. Asphyxial brain injury-the role of the igf system. *Mol Cell Endocrinol*. 1998;140:95-99
21. Pimentel VC, Bellé LP, Pinheiro FV, De Bona KS, Da Luz SC, Moretto MB. Adenosine deaminase activity, lipid peroxidation and astrocyte responses in the cerebral cortex of rats after neonatal hypoxia ischemia. *Int J Dev Neurosci*. 2009;27:857-862
22. Liao Y, Cotten M, Tan S, Kurtzberg J, Cairo MS. Rescuing the neonatal brain from hypoxic injury with autologous cord blood. *Bone Marrow Transplant*. 2013;48:890-900

23. Sarnat HB, Sarnat MS. Neonatal encephalopathy following fetal distress. A clinical and electroencephalographic study. *Arch Neurol*. 1976;33:696-705
24. Saliba E, Debillon T. [hypothermia for hypoxic-ischemic encephalopathy in fullterm newborns]. *Arch Pediatr*. 2010;17 Suppl 3:S67-77
25. Vesoulis ZA, Liao SM, Rao R, Trivedi SB, Cahill AG, Mathur AM. Re-examining the arterial cord blood gas ph screening criteria in neonatal encephalopathy. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2017
26. Alkholy UM, Abdalmonem N, Zaki A, Ali YF, Mohamed SA, Abdelsalam NI, et al. Early predictors of brain damage in full-term newborns with hypoxic ischemic encephalopathy. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2017;13:2133-2139
27. Thoresen M, Liu X, Jary S, Brown E, Sabir H, Stone J, et al. Lactate dehydrogenase in hypothermia-treated newborn infants with hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Acta Paediatr*. 2012;101:1038-1044
28. Ramaswamy V, Horton J, Vandermeer B, Buscemi N, Miller S, Yager J. Systematic review of biomarkers of brain injury in term neonatal encephalopathy. *Pediatr Neurol*. 2009;40:215-226
29. Massaro AN, Chang T, Kadom N, Tsuchida T, Scafidi J, Glass P, et al. Biomarkers of brain injury in neonatal encephalopathy treated with hypothermia. *J Pediatr*. 2012;161:434-440
30. d'Allest AM, André M, Radvanyi-Bouvet MF. [contribution of electroencephalography to the diagnosis and prognosis of perinatal asphyxia in full-term neonates]. *Arch Pediatr*. 1996;3 Suppl 1:254s-256s
31. Goergen SK, Ang H, Wong F, Carse EA, Charlton M, Evans R, et al. Early mri in term infants with perinatal hypoxic-ischaemic brain injury: Interobserver agreement and mri predictors of outcome at 2 years. *Clin Radiol*. 2014;69:72-81
32. Martinez-Biarge M, Bregant T, Wusthoff CJ, Chew AT, Diez-Sebastian J, Rutherford MA, et al. White matter and cortical injury in hypoxic-ischemic encephalopathy: Antecedent factors and 2-year outcome. *J Pediatr*. 2012;161:799-807
33. van Laerhoven H, de Haan TR, Offringa M, Post B, van der Lee JH. Prognostic tests in term neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy: A systematic review. *Pediatrics*. 2013;131:88-98
34. Meau-Petit V, Tasseau A, Le bail F, Ayachi A, Layouni I, Patkai J, et al. [induced hypothermia in the term newborn infant after perinatal asphyxia]. *Arch Pediatr*. 2010;17:282-289
35. Bhatt S, Alison BJ, Wallace EM, Crossley KJ, Gill AW, Kluckow M, et al. Delaying cord clamping until ventilation onset improves cardiovascular function at birth in preterm lambs. *J Physiol*. 2013;591:2113-2126
36. Hooper SB, Te Pas AB, Lang J, van Vonderen JJ, Roehr CC, Kluckow M, et al. Cardiovascular transition at birth: A physiological sequence. *Pediatr Res*. 2015;77:608-614
37. Kluckow M, Hooper SB. Using physiology to guide time to cord clamping. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2015;20:225-231
38. Thoresen M, Simmonds M, Satas S, Tooley J, Silver IA. Effective selective head cooling during posthypoxic hypothermia in newborn piglets. *Pediatr Res*. 2001;49:594-599
39. Tooley JR, Satas S, Porter H, Silver IA, Thoresen M. Head cooling with mild systemic hypothermia in anesthetized piglets is neuroprotective. *Ann Neurol*. 2003;53:65-72
40. Bona E, Hagberg H, Løberg EM, Bågenholm R, Thoresen M. Protective effects of moderate hypothermia after neonatal hypoxia-ischemia: Short- and long-term outcome. *Pediatr Res*. 1998;43:738-745
41. Debillon T, Daoud P, Durand P, Cantagrel S, Jouvét P, Saizou C, et al. Whole-body cooling after perinatal asphyxia: A pilot study in term neonates. *Dev Med Child Neurol*. 2003;45:17-23
42. Gluckman PD, Wyatt JS, Azzopardi D, Ballard R, Edwards AD, Ferriero DM, et al. Selective head cooling with mild systemic hypothermia after neonatal encephalopathy: Multicentre randomised trial. *Lancet*. 2005;365:663-670

43. Shankaran S, Laptook AR, Ehrenkranz RA, Tyson JE, McDonald SA, Donovan EF, et al. Whole-body hypothermia for neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy. *N Engl J Med*. 2005;353:1574-1584
44. Azzopardi DV, Strohm B, Edwards AD, Dyet L, Halliday HL, Juszczak E, et al. Moderate hypothermia to treat perinatal asphyxial encephalopathy. *N Engl J Med*. 2009;361:1349-1358
45. Edwards AD, Brocklehurst P, Gunn AJ, Halliday H, Juszczak E, Levene M, et al. Neurological outcomes at 18 months of age after moderate hypothermia for perinatal hypoxic ischaemic encephalopathy: Synthesis and meta-analysis of trial data. *BMJ*. 2010;340:c363
46. Jacobs SE, Berg M, Hunt R, Tarnow-Mordi WO, Inder TE, Davis PG. Cooling for newborns with hypoxic ischaemic encephalopathy. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013;CD003311
47. Azzopardi D, Strohm B, Marlow N, Brocklehurst P, Deierl A, Eddama O, et al. Effects of hypothermia for perinatal asphyxia on childhood outcomes. *N Engl J Med*. 2014;371:140-149
48. Shankaran S. Therapeutic hypothermia for neonatal encephalopathy. *Curr Treat Options Neurol*. 2012;14:608-619
49. Shankaran S, Barnes PD, Hintz SR, Laptook AR, Zaterka-Baxter KM, McDonald SA, et al. Brain injury following trial of hypothermia for neonatal hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2012;97:F398-404
50. Guillet R, Edwards AD, Thoresen M, Ferriero DM, Gluckman PD, Whitelaw A, et al. Seven- to eight-year follow-up of the coolcap trial of head cooling for neonatal encephalopathy. *Pediatr Res*. 2012;71:205-209
51. Erecinska M, Thoresen M, Silver IA. Effects of hypothermia on energy metabolism in mammalian central nervous system. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2003;23:513-530
52. Thoresen M. Cooling after perinatal asphyxia. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2015;20:65
53. Thoresen M. Who should we cool after perinatal asphyxia? *Semin Fetal Neonatal Med*. 2015;20:66-71
54. Macleod MR, O'Collins T, Horky LL, Howells DW, Donnan GA. Systematic review and meta-analysis of the efficacy of melatonin in experimental stroke. *J Pineal Res*. 2005;38:35-41
55. Robertson NJ, Faulkner S, Fleiss B, Bainbridge A, Andorka C, Price D, et al. Melatonin augments hypothermic neuroprotection in a perinatal asphyxia model. *Brain*. 2013;136:90-105
56. Aly H, Elmahdy H, El-Dib M, Rowisha M, Awany M, El-Gohary T, et al. Melatonin use for neuroprotection in perinatal asphyxia: A randomized controlled pilot study. *J Perinatol*. 2015;35:186-191
57. Traudt CM, McPherson RJ, Bauer LA, Richards TL, Burbacher TM, McAdams RM, et al. Concurrent erythropoietin and hypothermia treatment improve outcomes in a term nonhuman primate model of perinatal asphyxia. *Dev Neurosci*. 2013;35:491-503
58. Wu YW, Mathur AM, Chang T, McKinstry RC, Mulkey SB, Mayock DE, et al. High-dose erythropoietin and hypothermia for hypoxic-ischemic encephalopathy: A phase ii trial. *Pediatrics*. 2016;137
59. Wu YW, Bauer LA, Ballard RA, Ferriero DM, Glidden DV, Mayock DE, et al. Erythropoietin for neuroprotection in neonatal encephalopathy: Safety and pharmacokinetics. *Pediatrics*. 2012;130:683-691
60. Peeters-Scholte C, Braun K, Koster J, Kops N, Blomgren K, Buonocore G, et al. Effects of allopurinol and deferoxamine on reperfusion injury of the brain in newborn piglets after neonatal hypoxia-ischemia. *Pediatr Res*. 2003;54:516-522
61. Penrice J, Amess PN, Punwani S, Wylezinska M, Tysczuk L, D'Souza P, et al. Magnesium sulfate after transient hypoxia-ischemia fails to prevent delayed cerebral energy failure in the newborn piglet. *Pediatr Res*. 1997;41:443-447
62. Galinsky R, Bennet L, Groenendaal F, Lear CA, Tan S, van Bel F, et al. Magnesium is not consistently neuroprotective for perinatal hypoxia-ischemia in term-equivalent models in preclinical studies: A systematic review. *Dev Neurosci*. 2014;36:73-82
63. Chakkarapani E, Dingley J, Liu X, Hoque N, Aquilina K, Porter H, et al. Xenon enhances hypothermic neuroprotection in asphyxiated newborn pigs. *Ann Neurol*. 2010;68:330-341

64. Azzopardi D, Robertson NJ, Bainbridge A, Cady E, Charles-Edwards G, Deierl A, et al. Moderate hypothermia within 6 h of birth plus inhaled xenon versus moderate hypothermia alone after birth asphyxia (toby-xe): A proof-of-concept, open-label, randomised controlled trial. *Lancet Neurol*. 2016;15:145-153
65. Jang YK, Park JJ, Lee MC, Yoon BH, Yang YS, Yang SE, et al. Retinoic acid-mediated induction of neurons and glial cells from human umbilical cord-derived hematopoietic stem cells. *J Neurosci Res*. 2004;75:573-584
66. Nikolova T, Wu M, Brumbarov K, Alt R, Opitz H, Boheler KR, et al. Wnt-conditioned media differentially affect the proliferation and differentiation of cord blood-derived cd133+ cells in vitro. *Differentiation*. 2007;75:100-111
67. Low CB, Liou YC, Tang BL. Neural differentiation and potential use of stem cells from the human umbilical cord for central nervous system transplantation therapy. *J Neurosci Res*. 2008;86:1670-1679
68. Jurga M, Lipkowski AW, Lukomska B, Buzanska L, Kurzepa K, Sobanski T, et al. Generation of functional neural artificial tissue from human umbilical cord blood stem cells. *Tissue Eng Part C Methods*. 2009;15:365-372
69. Chua SJ, Bielecki R, Wong CJ, Yamanaka N, Rogers IM, Casper RF. Neural progenitors, neurons and oligodendrocytes from human umbilical cord blood cells in a serum-free, feeder-free cell culture. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;379:217-221
70. Wakabayashi K, Nagai A, Sheikh AM, Shiota Y, Narantuya D, Watanabe T, et al. Transplantation of human mesenchymal stem cells promotes functional improvement and increased expression of neurotrophic factors in a rat focal cerebral ischemia model. *J Neurosci Res*. 2010;88:1017-1025
71. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997;275:964-967
72. Ingram DA, Mead LE, Moore DB, Woodard W, Fenoglio A, Yoder MC. Vessel wall-derived endothelial cells rapidly proliferate because they contain a complete hierarchy of endothelial progenitor cells. *Blood*. 2005;105:2783-2786
73. Ingram DA, Mead LE, Tanaka H, Meade V, Fenoglio A, Mortell K, et al. Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood*. 2004;104:2752-2760
74. Yoder MC. Is endothelium the origin of endothelial progenitor cells? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30:1094-1103
75. Sabatier F, Lacroix R, Camoin-Jau L, Anfosso F, Sampol J, Dignat-George F. [circulating endothelial cells, microparticles and progenitors: Towards the definition of vascular competence]. *Rev Med Interne*. 2011;32:54-63
76. Qian C, Tio RA, Roks AJ, Boddeus KM, Harmsen MC, van Gilst WH, et al. A promising technique for transplantation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells into rat heart. *Cardiovasc Pathol*. 2007;16:127-135
77. Quirici N, Soligo D, Caneva L, Servida F, Bossolasco P, Delilieri GL. Differentiation and expansion of endothelial cells from human bone marrow cd133(+) cells. *Br J Haematol*. 2001;115:186-194
78. Shi Q, Rafii S, Wu MH, Wijelath ES, Yu C, Ishida A, et al. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood*. 1998;92:362-367
79. Navarro-Sobrinho M, Rosell A, Hernandez-Guillamon M, Penalba A, Ribó M, Alvarez-Sabín J, et al. Mobilization, endothelial differentiation and functional capacity of endothelial progenitor cells after ischemic stroke. *Microvasc Res*. 2010;80:317-323
80. Bompais H, Chagraoui J, Canron X, Crisan M, Liu XH, Anjo A, et al. Human endothelial cells derived from circulating progenitors display specific functional properties compared with mature vessel wall endothelial cells. *Blood*. 2004;103:2577-2584

81. Murohara T, Ikeda H, Duan J, Shintani S, Sasaki K, Eguchi H, et al. Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *J Clin Invest*. 2000;105:1527-1536
82. Nieda M, Nicol A, Denning-Kendall P, Sweetenham J, Bradley B, Hows J. Endothelial cell precursors are normal components of human umbilical cord blood. *Br J Haematol*. 1997;98:775-777
83. Smadja DM, Bièche I, Uzan G, Bompais H, Muller L, Boisson-Vidal C, et al. Par-1 activation on human late endothelial progenitor cells enhances angiogenesis in vitro with upregulation of the sdf-1/cxcr4 system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:2321-2327
84. Smadja DM, Laurendeau I, Avignon C, Vidaud M, Aiach M, Gaussem P. The angiopoietin pathway is modulated by par-1 activation on human endothelial progenitor cells. *J Thromb Haemost*. 2006;4:2051-2058
85. Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, et al. Expression of vegfr-2 and ac133 by circulating human cd34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood*. 2000;95:952-958
86. Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, André M, Nibbelink M, Tamarat R, et al. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: Physiological and therapeutic perspectives. *Circulation*. 2004;109:656-663
87. Smadja DM, Bièche I, Helley D, Laurendeau I, Simonin G, Muller L, et al. Increased vegfr2 expression during human late endothelial progenitor cells expansion enhances in vitro angiogenesis with up-regulation of integrin alpha(6). *J Cell Mol Med*. 2007;11:1149-1161
88. Prater DN, Case J, Ingram DA, Yoder MC. Working hypothesis to redefine endothelial progenitor cells. *Leukemia*. 2007;21:1141-1149
89. Hur J, Yoon CH, Kim HS, Choi JH, Kang HJ, Hwang KK, et al. Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovasculogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:288-293
90. Yoder MC, Mead LE, Prater D, Krier TR, Mroueh KN, Li F, et al. Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. *Blood*. 2007;109:1801-1809
91. Madonna R, De Caterina R. Circulating endothelial progenitor cells: Do they live up to their name? *Vascul Pharmacol*. 2015;67-69:2-5
92. Mead LE, Prater D, Yoder MC, Ingram DA. Isolation and characterization of endothelial progenitor cells from human blood. *Curr Protoc Stem Cell Biol*. 2008;Chapter 2:Unit 2C.1
93. Avouac J, Wipff J, Goldman O, Ruiz B, Couraud PO, Chiochia G, et al. Angiogenesis in systemic sclerosis: Impaired expression of vascular endothelial growth factor receptor 1 in endothelial progenitor-derived cells under hypoxic conditions. *Arthritis Rheum*. 2008;58:3550-3561
94. Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells functional characterization. *Trends Cardiovasc Med*. 2004;14:318-322
95. Shiojima I, Walsh K. Role of akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis. *Circ Res*. 2002;90:1243-1250
96. Eguchi M, Masuda H, Asahara T. Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *Clin Exp Nephrol*. 2007;11:18-25
97. Otrock ZK, Mahfouz RA, Makarem JA, Shamseddine AI. Understanding the biology of angiogenesis: Review of the most important molecular mechanisms. *Blood Cells Mol Dis*. 2007;39:212-220
98. Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med*. 2003;9:685-693
99. Krenning G, van Luyn MJ, Harmsen MC. Endothelial progenitor cell-based neovascularization: Implications for therapy. *Trends Mol Med*. 2009;15:180-189
100. Garbuzova-Davis S, Willing AE, Saporta S, Bickford PC, Gemma C, Chen N, et al. Novel cell therapy approaches for brain repair. *Prog Brain Res*. 2006;157:207-222
101. Newman MB, Emerich DF, Borlongan CV, Sanberg CD, Sanberg PR. Use of human umbilical cord blood (hucb) cells to repair the damaged brain. *Curr Neurovasc Res*. 2004;1:269-281

102. Park DH, Borlongan CV, Willing AE, Eve DJ, Cruz LE, Sanberg CD, et al. Human umbilical cord blood cell grafts for brain ischemia. *Cell Transplant*. 2009;18:985-998
103. Yu G, Borlongan CV, Stahl CE, Hess DC, Ou Y, Kaneko Y, et al. Systemic delivery of umbilical cord blood cells for stroke therapy: A review. *Restor Neurol Neurosci*. 2009;27:41-54
104. Chen J, Sanberg PR, Li Y, Wang L, Lu M, Willing AE, et al. Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats. *Stroke*. 2001;32:2682-2688
105. Jiang L, Womble T, Saporta S, Chen N, Sanberg CD, Sanberg PR, et al. Human umbilical cord blood cells decrease microglial survival in vitro. *Stem Cells Dev*. 2010;19:221-228
106. Newcomb JD, Ajmo CT, Sanberg CD, Sanberg PR, Pennypacker KR, Willing AE. Timing of cord blood treatment after experimental stroke determines therapeutic efficacy. *Cell Transplant*. 2006;15:213-223
107. Newman MB, Willing AE, Manresa JJ, Davis-Sanberg C, Sanberg PR. Stroke-induced migration of human umbilical cord blood cells: Time course and cytokines. *Stem Cells Dev*. 2005;14:576-586
108. Vendrame M, Cassady J, Newcomb J, Butler T, Pennypacker KR, Zigova T, et al. Infusion of human umbilical cord blood cells in a rat model of stroke dose-dependently rescues behavioral deficits and reduces infarct volume. *Stroke*. 2004;35:2390-2395
109. Vendrame M, Gemma C, de Mesquita D, Collier L, Bickford PC, Sanberg CD, et al. Anti-inflammatory effects of human cord blood cells in a rat model of stroke. *Stem Cells Dev*. 2005;14:595-604
110. Bennis Y, Sarlon-Bartoli G, Guillet B, Lucas L, Pellegrini L, Velly L, et al. Priming of late endothelial progenitor cells with erythropoietin before transplantation requires the cd131 receptor subunit and enhances their angiogenic potential. *J Thromb Haemost*. 2012;10:1914-1928
111. Garrigue P, Giacomino L, Bucci C, Muzio V, Filannino MA, Sabatier F, et al. Single photon emission computed tomography imaging of cerebral blood flow, blood-brain barrier disruption, and apoptosis time course after focal cerebral ischemia in rats. *Int J Stroke*. 2016;11:117-126
112. Garrigue P, Hache G, Bennis Y, Brige P, Stalin J, Pellegrini L, et al. Epo pretreatment of ecfcs enhances functional recovery after transplantation in a rat model of cerebral ischemia through an increase of their homing abilities: A spect/ct study. *J Nucl Med*. 2016
113. Moubarik C, Guillet B, Youssef B, Codaccioni JL, Piercecchi MD, Sabatier F, et al. Transplanted late outgrowth endothelial progenitor cells as cell therapy product for stroke. *Stem Cell Rev*. 2011;7:208-220
114. Pellegrini L, Bennis Y, Guillet B, Velly L, Garrigue P, Sabatier F, et al. Therapeutic benefit of a combined strategy using erythropoietin and endothelial progenitor cells after transient focal cerebral ischemia in rats. *Neurol Res*. 2013;35:937-947
115. Rice JE, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol*. 1981;9:131-141
116. Vannucci SJ, Hagberg H. Hypoxia-ischemia in the immature brain. *J Exp Biol*. 2004;207:3149-3154
117. Meier C, Middelani J, Wasielewski B, Neuhoﬀ S, Roth-Haerer A, Gantert M, et al. Spastic paresis after perinatal brain damage in rats is reduced by human cord blood mononuclear cells. *Pediatr Res*. 2006;59:244-249
118. Pimentel-Coelho PM, Magalhaes ES, Lopes LM, deAzevedo LC, Santiago MF, Mendez-Otero R. Human cord blood transplantation in a neonatal rat model of hypoxic-ischemic brain damage: Functional outcome related to neuroprotection in the striatum. *Stem Cells Dev*. 2010;19:351-358
119. Yasuhara T, Hara K, Maki M, Xu L, Yu G, Ali MM, et al. Mannitol facilitates neurotrophic factor up-regulation and behavioural recovery in neonatal hypoxic-ischaemic rats with human umbilical cord blood grafts. *J Cell Mol Med*. 2010;14:914-921

120. Geissler M, Dinse HR, Neuhoﬀ S, Kreikemeier K, Meier C. Human umbilical cord blood cells restore brain damage induced changes in rat somatosensory cortex. *PLoS One*. 2011;6:e20194
121. Rosenkranz K, Kumbruch S, Tenbusch M, Marcus K, Marschner K, Dermietzel R, et al. Transplantation of human umbilical cord blood cells mediated beneficial effects on apoptosis, angiogenesis and neuronal survival after hypoxic-ischemic brain injury in rats. *Cell Tissue Res*. 2012;348:429-438
122. Bae SH, Kong TH, Lee HS, Kim KS, Hong KS, Chopp M, et al. Long-lasting paracrine effects of human cord blood cells on damaged neocortex in an animal model of cerebral palsy. *Cell Transplant*. 2012;21:2497-2515
123. de Paula S, Vitola AS, Greggio S, de Paula D, Mello PB, Lubianca JM, et al. Hemispheric brain injury and behavioral deficits induced by severe neonatal hypoxia-ischemia in rats are not attenuated by intravenous administration of human umbilical cord blood cells. *Pediatr Res*. 2009;65:631-635
124. de Paula S, Greggio S, Marinowicz DR, Machado DC, DaCosta JC. The dose-response effect of acute intravenous transplantation of human umbilical cord blood cells on brain damage and spatial memory deficits in neonatal hypoxia-ischemia. *Neuroscience*. 2012;210:431-441
125. Lok J, Gupta P, Guo S, Kim WJ, Whalen MJ, van Leyen K, et al. Cell-cell signaling in the neurovascular unit. *Neurochem Res*. 2007;32:2032-2045
126. del Zoppo GJ. Stroke and neurovascular protection. *N Engl J Med*. 2006;354:553-555
127. Iadecola C. Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci*. 2004;5:347-360
128. Palmer TD, Willhoite AR, Gage FH. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol*. 2000;425:479-494
129. Shen Q, Goderie SK, Jin L, Karanth N, Sun Y, Abramova N, et al. Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science*. 2004;304:1338-1340
130. Song H, Stevens CF, Gage FH. Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature*. 2002;417:39-44
131. Habich A, Jurga M, Markiewicz I, Lukomska B, Bany-Laszewicz U, Domanska-Janik K. Early appearance of stem/progenitor cells with neural-like characteristics in human cord blood mononuclear fraction cultured in vitro. *Exp Hematol*. 2006;34:914-925
132. Yasuhara T, Matsukawa N, Yu G, Xu L, Mays RW, Kovach J, et al. Behavioral and histological characterization of intrahippocampal grafts of human bone marrow-derived multipotent progenitor cells in neonatal rats with hypoxic-ischemic injury. *Cell Transplant*. 2006;15:231-238
133. Ohab JJ, Fleming S, Blesch A, Carmichael ST. A neurovascular niche for neurogenesis after stroke. *J Neurosci*. 2006;26:13007-13016
134. Jung KH, Roh JK. Circulating endothelial progenitor cells in cerebrovascular disease. *J Clin Neurol*. 2008;4:139-147
135. Taguchi A, Soma T, Tanaka H, Kanda T, Nishimura H, Yoshikawa H, et al. Administration of cd34+ cells after stroke enhances neurogenesis via angiogenesis in a mouse model. *J Clin Invest*. 2004;114:330-338
136. Bartolini L, Casamenti F, Pepeu G. Aniracetam restores object recognition impaired by age, scopolamine, and nucleus basalis lesions. *Pharmacol Biochem Behav*. 1996;53:277-283
137. Dere E, Huston JP, De Souza Silva MA. The pharmacology, neuroanatomy and neurogenetics of one-trial object recognition in rodents. *Neurosci Biobehav Rev*. 2007;31:673-704
138. Li Y, Liang G, Wang S, Meng Q, Wang Q, Wei H. Effects of fetal exposure to isoflurane on postnatal memory and learning in rats. *Neuropharmacology*. 2007;53:942-950
139. Ming-Yan H, Luo YL, Zhang XC, Liu H, Gao R, Wu JJ. Hypoxic-ischemic injury decreases anxiety-like behavior in rats when associated with loss of tyrosine-hydroxylase immunoreactive neurons of the substantia nigra. *Braz J Med Biol Res*. 2012;45:13-19

140. Volpe JJ, Herscovitch P, Perlman JM, Raichle ME. Positron emission tomography in the newborn: Extensive impairment of regional cerebral blood flow with intraventricular hemorrhage and hemorrhagic intracerebral involvement. *Pediatrics*. 1983;72:589-601
141. Saliba E, Barantin L, Akoka S, Tranquart F, Pourcelot L, Gold F, et al. [circulation and cerebral metabolism in neonatal hypoxia-ischemia]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*. 1997;26:465-469
142. Shankaran S, Kottamasu SR, Kuhns L. Brain sonography, computed tomography, and single-photon emission computed tomography in term neonates with perinatal asphyxia. *Clin Perinatol*. 1993;20:379-394
143. Diaz R, Miguel PM, Deniz BF, Confortim HD, Barbosa S, Mendonça MCP, et al. Environmental enrichment attenuates the blood brain barrier dysfunction induced by the neonatal hypoxia-ischemia. *Int J Dev Neurosci*. 2016;53:35-45
144. Moretti R, Pansiot J, Bettati D, Strazielle N, Gherzi-Egea JF, Damante G, et al. Blood-brain barrier dysfunction in disorders of the developing brain. *Front Neurosci*. 2015;9:40
145. Hicks A, Jolkkonen J. Challenges and possibilities of intravascular cell therapy in stroke. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2009;69:1-11
146. Dressel R, Schindehütte J, Kuhlmann T, Elsner L, Novota P, Baier PC, et al. The tumorigenicity of mouse embryonic stem cells and in vitro differentiated neuronal cells is controlled by the recipients' immune response. *PLoS One*. 2008;3:e2622
147. Zhao T, Zhang ZN, Rong Z, Xu Y. Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2011;474:212-215
148. Domanska-Janik K, Buzanska L, Lukomska B. A novel, neural potential of non-hematopoietic human umbilical cord blood stem cells. *Int J Dev Biol*. 2008;52:237-248
149. Park DH, Borlongan CV, Eve DJ, Sanberg PR. The emerging field of cell and tissue engineering. *Med Sci Monit*. 2008;14:RA206-220
150. Sanberg PR, Greene-Zavertnik CR. Stem cells and development publishes neural stem cells compendium. *Cell Transplant*. 2005;14:855-857
151. Melero-Martin JM, Khan ZA, Picard A, Wu X, Paruchuri S, Bischoff J. In vivo vasculogenic potential of human blood-derived endothelial progenitor cells. *Blood*. 2007;109:4761-4768
152. Chen ZZ, Jiang XD, Zhang LL, Shang JH, Du MX, Xu G, et al. Beneficial effect of autologous transplantation of bone marrow stromal cells and endothelial progenitor cells on cerebral ischemia in rabbits. *Neurosci Lett*. 2008;445:36-41
153. Regueiro A, Cuadrado-Godia E, Bueno-Betí C, Diaz-Ricart M, Oliveras A, Novella S, et al. Mobilization of endothelial progenitor cells in acute cardiovascular events in the procell study: Time-course after acute myocardial infarction and stroke. *J Mol Cell Cardiol*. 2015;80:146-155
154. Targonski PV, Bonetti PO, Pumper GM, Higano ST, Holmes DR, Lerman A. Coronary endothelial dysfunction is associated with an increased risk of cerebrovascular events. *Circulation*. 2003;107:2805-2809
155. Sobrino T, Hurtado O, Moro MA, Rodríguez-Yáñez M, Castellanos M, Brea D, et al. The increase of circulating endothelial progenitor cells after acute ischemic stroke is associated with good outcome. *Stroke*. 2007;38:2759-2764
156. Tsai NW, Hung SH, Huang CR, Chang HW, Chang WN, Lee LH, et al. The association between circulating endothelial progenitor cells and outcome in different subtypes of acute ischemic stroke. *Clin Chim Acta*. 2014;427:6-10
157. Ligi I, Grandvuillemin I, Andres V, Dignat-George F, Simeoni U. Low birth weight infants and the developmental programming of hypertension: A focus on vascular factors. *Semin Perinatol*. 2010;34:188-192
158. Ligi I, Simoncini S, Tellier E, Grandvuillemin I, Marcelli M, Bikfalvi A, et al. Altered angiogenesis in low birth weight individuals: A role for anti-angiogenic circulating factors. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2014;27:233-238

159. Ligi I, Simoncini S, Tellier E, Vassallo PF, Sabatier F, Guillet B, et al. A switch toward angiostatic gene expression impairs the angiogenic properties of endothelial progenitor cells in low birth weight preterm infants. *Blood*. 2011;118:1699-1709
160. Hess DC, Hill WD, Martin-Studdard A, Carroll J, Brailer J, Carothers J. Bone marrow as a source of endothelial cells and neuron-expressing cells after stroke. *Stroke*. 2002;33:1362-1368
161. Rouhl RP, van Oostenbrugge RJ, Damoiseaux J, Tervaert JW, Lodder J. Endothelial progenitor cell research in stroke: A potential shift in pathophysiological and therapeutic concepts. *Stroke*. 2008;39:2158-2165
162. Mishima K, Ikeda T, Aoo N, Takai N, Takahashi S, Egashira N, et al. Hypoxia-ischemic insult in neonatal rats induced slowly progressive brain damage related to memory impairment. *Neurosci Lett*. 2005;376:194-199
163. Trescher WH, Ishiwa S, Johnston MV. Brief post-hypoxic-ischemic hypothermia markedly delays neonatal brain injury. *Brain Dev*. 1997;19:326-338
164. Kaneko Y, Tajiri N, Su TP, Wang Y, Borlongan CV. Combination treatment of hypothermia and mesenchymal stromal cells amplifies neuroprotection in primary rat neurons exposed to hypoxic-ischemic-like injury in vitro: Role of the opioid system. *PLoS One*. 2012;7:e47583
165. Park WS, Sung SI, Ahn SY, Yoo HS, Sung DK, Im GH, et al. Hypothermia augments neuroprotective activity of mesenchymal stem cells for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *PLoS One*. 2015;10:e0120893
166. Wang D, Zhang J. Effects of hypothermia combined with neural stem cell transplantation on recovery of neurological function in rats with spinal cord injury. *Mol Med Rep*. 2015;11:1759-1767
167. Mallard EC, Williams CE, Johnston BM, Gluckman PD. Increased vulnerability to neuronal damage after umbilical cord occlusion in fetal sheep with advancing gestation. *Am J Obstet Gynecol*. 1994;170:206-214
168. Clancy F. Stem cell research. Hope ... Hype? Hard work. *Minn Med*. 2001;84:25-29
169. Hudome S, Palmer C, Roberts RL, Mauger D, Housman C, Towfighi J. The role of neutrophils in the production of hypoxic-ischemic brain injury in the neonatal rat. *Pediatr Res*. 1997;41:607-616
170. Semple BD, Blomgren K, Gimlin K, Ferriero DM, Noble-Haeusslein LJ. Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Prog Neurobiol*. 2013;106-107:1-16
171. Mallard C, Vexler ZS. Modeling ischemia in the immature brain: How translational are animal models? *Stroke*. 2015;46:3006-3011
172. Decaris ML, Lee CI, Yoder MC, Tarantal AF, Leach JK. Influence of the oxygen microenvironment on the proangiogenic potential of human endothelial colony forming cells. *Angiogenesis*. 2009;12:303-311
173. Lee SH, Lee JH, Han YS, Ryu JM, Yoon YM, Han HJ. Hypoxia accelerates vascular repair of endothelial colony-forming cells on ischemic injury via stat3-bcl3 axis. *Stem Cell Res Ther*. 2015;6:139
174. He M, Ma S, Cai Q, Wu Y, Shao C, Kong H, et al. Hypoxia induces the dysfunction of human endothelial colony-forming cells via hif-1 α signaling. *Respir Physiol Neurobiol*. 2017;247:87-95
175. Cotten CM, Murtha AP, Goldberg RN, Grotegut CA, Smith PB, Goldstein RF, et al. Feasibility of autologous cord blood cells for infants with hypoxic-ischemic encephalopathy. *J Pediatr*. 2013
176. Richmond S, Wyllie J. European resuscitation council guidelines for resuscitation 2010 section 7. Resuscitation of babies at birth. *Resuscitation*. 2010;81:1389-1399

Annexes

Annexe 1 :

Le Score d'adaptation à la vie extra-utérine selon Apgar.

	0	1	2
Cœur	Pas de cœur	FC <100	FC >100
Respiration	Pas de mvt respiratoire	Respiration irrégulière	Respiration régulière
Couleur	Blanc ou bleu	Rose sauf extrémités bleues	Rose
Tonus	Grande hypotonie	Tonus faible aux extrémités	Bon tonus
Réactivité	Aréactif	Grimace aux stimulations	Bon cri aux stimulations

Annexe 2 :

Classification des stades d'encéphalopathie hypoxo-ischémique selon Sarnat²³(1976)

Items	Stade I	Stade II	Stade III
Niveau de conscience	Alerte Hyperexcitabilité	Léthargie	Coma
Posture	Flexion distale	Flexion distale forte	Enroulement des membres supérieurs
Tonus Musculaire	Normal	Hypotonie Mains et pieds crispés	Flasque
Réflexes ostéo-tendineux	Augmentés	Augmentés	Diminués ou absents
Activité motrice	Harmonieuse, variée	Pauvre ou agitation Mouvements stéréotypés	Absentes ou trémulations
Réflexes archaïques			
Succion	Active	Faible ou mâchonnements	Absente
Moro	Exagéré	Incomplet	Absent
Grasping	Normal à exagéré	Exagéré	Absent
Système nerveux autonome			
Pupilles	Dilatées	Myosis	Variables ou fixes
Respiration	Régulière	Variable	Irrégulières, apnées
Fréquence cardiaque	Normale ou tachycardie	Bradycardie	Bradycardie
Convulsions	Absentes	Fréquentes	Récurrentes

Annexe 3 :

Critères d'inclusion des nouveau-nés dans le protocole de soins d'hypothermie contrôlée en cas d'encéphalopathie hypoxo-ischémique.

Recommandations de la Société Française de Néonatalogie. Saliba E, Debillon T.²⁴2010

CRITÈRES D'INCLUSION :

Evaluation par les 3 critères successifs A, B et C listés ci-dessous : **A+B+C = Hypothermie durée réglée pour 72 heures.**

A- Nouveau-né $\geq$ 36.0 SA et un poids de naissance $\geq$ 1800 g né dans un **contexte d'asphyxie périnatale** : événement aigu périnatal (exemple : décollement placentaire, prolapsus du cordon et /ou anomalies sévères du rythme cardiaque fœtal : décélérations tardives ou variables répétées, baisse de la variabilité, absence d'accélération) **avec au moins UN des critères suivants**

- 1- Apgar $\leq$ 5 à 10 minutes après la naissance
- 2- Réanimation (intubation endotrachéale ou ventilation au masque), à 10 minutes
- 3- Acidose définie par pH < 7 et BD ≥ 16 mmol/l ou taux de lactates ≥ 11 mmol/l au cordon ou tout autre gaz artériel, veineux ou capillaire réalisé dans les 60 minutes après la naissance.

En l'absence de gaz du sang OU en cas de pH compris entre 7.01 et 7.15 OU BD compris entre 10 à 15.9 mmol/l, l'enfant doit avoir un **contexte d'asphyxie périnatale ET le critère 1 ou 2**

Si l'enfant remplit les conditions **A** faire l'évaluation neurologique en utilisant les critères **B**

B – Encéphalopathie modérée à sévère (score de Sarnat H. Arch Neurol. 1976 ; 33 : 696-705).
Atteinte des fonctions corticales : léthargie (réponses aux stimulations : réduites) ou coma (réponses aux stimulations : absentes) **ET au moins UN ou plus des signes suivants :**

- 1- Hypotonie globale ou limitée à la partie supérieure du corps
- 2- Réflexes anormaux : Moro (faible ou absent) ou anomalies oculomotrices ou pupillaires (pupilles serrées ou dilatées non réactives)
- 3- Succion absente ou faible
- 4- Convulsions cliniques

Si l'enfant remplit les **critères A et B**, faire une évaluation électro -physiologique avec un EEG et/ou un aEEG

C- Trente minutes d'enregistrement d'EEG (8 électrodes) et/ou un aEEG réalisés après 1 heure de naissance et à 30 minutes d'une injection de phénobarbital si celle-ci a été nécessaire, sont **indispensables pour poursuivre l'hypothermie réglée**.

EEG ou aEEG qui montrent des **anomalies du tracé de fond avec UN des critères péjoratifs** suivants à l'EEG standard ou à l'amplitude EEG (aEEG) :

Critères d'anomalies à l'EEG standard 8 électrodes :

- Tracé paroxystique sans figures physiologiques (burst suppression)
- Tracé très pauvre enrichi de quelques ondes thêta
- Tracé inactif (amplitude < 5µV)
- Activité critique continue

Critères d'anomalies aEEG

- Tracé discontinu – modérément anormal- limite inférieure < 5µV et limite supérieure > 10µV
- Tracé discontinu- sévèrement anormal- limite inférieure < 5µV et limite supérieure < 10µV
- Tracé paroxystique- burst suppression
- Activité critique continue

Si les **critères A+B+C** sont présents l'enfant est traité par **hypothermie contrôlée** (température rectale ou œsophagienne maintenue à **33.5°C ± 0.5°C**) prolongée pour une durée de **72 heures** au moins après son début. L'hypothermie peut être arrêtée si dans les 6 premières heures de vie l'EEG ou l'aEEG sont normaux. Dans ce cas un réchauffement lent sur 6 heures est recommandé.

CRITÈRES D'EXCLUSION :

- Un RCIU sévère PN < 1800 g
- Des anomalies chromosomiques ou congénitales sévères
- Traumatismes neurologiques (hémorragies intracérébrales, lésions médullaires)
- Un nouveau-né avec une encéphalopathie hypoxo-ischémique sévère et pour lequel une prise en charge palliative est envisagée
- La chirurgie n'est pas une contre-indication si les constantes vitales et biologiques sont stabilisées.

Résumé

L'hypoxo-ischémie cérébrale néonatale représente une des principales causes de mortalité et de morbidité chez les nouveau-nés. Sa physiopathologie est complexe et implique différents processus délétères menant vers la perte neuronale par apoptose et responsables de déficits sensori-moteurs et cognitifs.

De récents travaux expérimentaux ont permis de rapporter que la greffe de cellules humaines issues de sang de cordon (HUCBCs) conduit à une amélioration des scores neuro-comportementaux dans le modèle expérimental de cette pathologie chez le rongeur. Il existe également une autre population de cellules souches, monocellulaire et endothéliale, les progéniteurs endothéliaux circulants (ECFCs) semblent représenter une alternative thérapeutique prometteuse comme cela a été rapporté au sein du laboratoire VRCM sur des modèles d'ischémie cérébrale adulte.

Dans ce contexte, le but de cette étude a été de caractériser et de comparer l'effet des ECFCs et HUCBCs sur l'amélioration des scores neuro-comportementaux mais aussi à l'échelle moléculaire et fonctionnelle dans le modèle d'hypoxo-ischémie néonatale selon Rice-Vanucci et ce à court (7 jours après l'épisode ischémique) et à long terme (12 semaines après l'épisode ischémique).

L'injection intrapéritonéale d'ECFCs ou de HUCBCs, 2 jours après l'accident hypoxo-ischémique, a été corrélée à une amélioration des capacités de motricité et de mémorisation précoce, mais également tardive des animaux à l'âge adulte, ainsi qu'une diminution des comportements anxieux. L'analyse histologique a permis d'observer que l'injection d'ECFC ou d'HUCBC a été corrélée à une augmentation de la densité capillaire en temps précoce et tardif. L'imagerie de perfusion cérébrale SPECT/CT a permis d'objectiver une restauration complète de la perfusion cérébrale de l'hémisphère lésé à l'âge adulte par les deux types cellulaires, signant les effets définitifs protecteurs en terme de viabilité et de fonctionnalité du parenchyme. Ces observations tardives sont associées à un effet protecteur précoce de ces cellules sur l'augmentation de la survie neuronale et la diminution de l'astrogliose réactionnelle ou encore un effet sur la composante inflammatoire par la diminution de l'activation de la microglie pro-inflammatoire au niveau striatal.

Les résultats de cette étude ouvrent ainsi de nouvelles perspectives pour l'usage des ECFCs dans le traitement de l'HI néonatale. Parallèlement à ces travaux expérimentaux, des essais cliniques en cours évaluent la faisabilité et la tolérance d'injections d'HUCBCs en contexte d'encéphalopathie hypoxo-ischémique du fait de la facilité d'obtention et du caractère autologue de ces cellules.